

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL

NATÁLIA MEDEIROS TEIXEIRA

**Aplicação de ultrassom na etanólise do óleo de babaçu mediada pela lipase
de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-βCD**

LORENA
2011

NATÁLIA MEDEIROS TEIXEIRA

Aplicação de ultrassom na etanólise do óleo de babaçu mediada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-βCD

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 concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos

Área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos

Orientador: Prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira

Versão Original

**LORENA
2011**

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.

Catálogo na Publicação

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Teixeira, Natália Medeiros

Aplicação de ultrassom na etanólise do óleo de babaçu mediada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-βCD. / Natália Medeiros Teixeira. – 2011.

110 p: il.

Dissertação (Mestre 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, 2012.

Orientador: Pedro Carlos de Oliveira.

1. Ultrassom 2. Biodiesel 3. Lipase PS 4. Óleo de babaçu 5. Etanol. I. Título.

544.57 – CDU

Dedicatória

*A Deus, meus pais, familiares e amigos que
contribuíram para a realização deste trabalho*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu amor incondicional em todos os momentos. Às vezes achamos que não foi o melhor o caminho escolhido, com o passar do tempo vemos que Ele nunca erra.

Aos meus pais, Paulo e Marisa, por terem me concebido a vida, e mesmo em momentos difíceis me apoiaram (moralmente e financeiramente), me incentivaram, me deram amor e carinho, sem eles nada disso teria acontecido, nada disso teria valor. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao Prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira, meu orientador, pela amizade, companheirismo, confiança, incentivo e pela competência em orientar este trabalho. Agradeço os momentos de convivência, os ensinamentos, as conversas e o espaço cedido em sua sala.

À Prof. Dr^a. Heizir Ferreira de Castro, por me acolher em seu Laboratório de Biocatálise e dar as diretrizes e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço o incentivo, os conselhos e os ensinamentos.

Ao Dr. Adriano Aguiar Mendes, pela amizade e pelos todos bons conselhos e contribuições para a realização deste trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Biocatálise: Ana Karine, Ariela, Gi, Grazi, Lívia, Paty, Weriton, Dr^a. Larissa, Aline, Thamy e Karen. Obrigada pela ótima convivência, pelas conversas, pelas risadas, pelos cafés, pelo incentivo e pela amizade de vocês que levarei pra minha vida.

À minha família de Lorena, minhas queridas companheiras da República Zerólas e agregadas: Ana, Giu, Muri, Re, Ti, Dani, Me, Fer, Ana Karine. E as minhas eternas amigas que mesmo longe estavam sempre presentes: Thamy, Pri, Aline, Pola, Carol. Obrigada meninas por TUDO: apoio, companheirismo, amor, fidelidade, puxão de orelha, brigas, risadas, choros, alegrias, entusiasmo, confiança, festas, estudos e aprendizados.

A todos meus familiares e amigos, que com palavras de conforto deixaram esse caminho mais tranquilo. Obrigada pelo amor e carinho transmitidos.

Ao meu namorado Julio, por todo incentivo, amor, paciência e companheirismo.

A minha terapeuta Renata Moure, que com profissionalismo, amizade e muito incentivo colaborou para a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Suzuki, pela realização das análises de difração de raio-X e

Ao Prof. Durval, Jorge e Bento pelas realizações das análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Ao Prof. Dr. Edson C. Botelho e sua aluna Aline pelas realizações das análises termogravimétricas (TGA/DTG) na Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho.

Aos diversos funcionários da Escola de Engenharia de Lorena e a todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

TEIXEIRA, N. M. **Aplicação de ultrassom na etanólise do óleo de babaçu mediada pela lipase PS imobilizada em SiO₂-βCD**. 2011,110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2012.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do ultrassom em diferentes etapas: no pré-tratamento da lipase de *Burkholderia cepacia* (lipase PS), na preparação do derivado imobilizado desta enzima em um suporte híbrido composto por sílica e β-ciclodextrina e na síntese de biodiesel utilizando o óleo de babaçu e etanol como matérias-primas. Na primeira parte do trabalho foi realizada a caracterização do suporte híbrido polissiloxano-β-ciclodextrina (SiO₂-βCD). Os resultados foram comparados com os dados de caracterização do suporte híbrido polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA). Os derivados imobilizados e a lipase PS na sua forma livre foram caracterizados quanto aos seus parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) e estabilidade térmica (K_d) a 60°C e quanto às suas propriedades morfológicas por meio das seguintes análises: microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de difração de raio-X (DRX), área superficial, tamanho e volume de poro (método BET) e termogravimetria (TGA). De um modo geral, o derivado imobilizado PS/SiO₂-βCD apresentou um desempenho similar ao do PS/SiO₂-PVA quanto a morfologia, propriedades cinéticas e térmicas e aplicação na etanólise do óleo de babaçu. Na segunda parte do trabalho estudou-se a influência do ultrassom na atividade hidrolítica da lipase livre, na preparação do derivado imobilizado e na reação de transesterificação. A atividade hidrolítica da solução enzimática (lipase PS) sonicada durante 2 h diminuiu em cerca de 40%. Os derivados imobilizados preparados tanto pelo método convencional (somente agitação magnética), como pela influência do ultrassom tiveram preservadas as suas características morfológicas e atividades hidrolíticas. Foi observada a possibilidade de redução nos tempos envolvidos nas etapas de preparação do derivado imobilizado. Na síntese de biodiesel, utilizando óleo de babaçu e etanol catalisada por PS/SiO₂-βCD, na razão de 1:7 a 45°C o rendimento de transesterificação sob efeito de ondas ultrassônicas, teve uma redução de 67% no tempo de reação para um rendimento de 80% em relação a reação realizada por agitação magnética. A variação na razão molar não alterou significativamente o rendimento, pois em 8 h de reação no ultrassom, nas mesmas condições, o rendimento na razão de 1:4 e 1:10 foram respectivamente 68% e 55%.

Palavras-chave: Ultrassom, Biodiesel, Lipase PS, SiO₂-βCD, Óleo de babaçu, Etanol

ABSTRACT

TEIXEIRA, N. M. **Application of ultrasound in the ethanolsis of babassu oil mediated by lipase PS immobilized on SiO₂-βCD.** 2011, 110 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2012.

The present work aimed at studying the effect of ultrasound as pre-treatment of *Burkholderia cepacia* lipase (lipase PS), in preparation of this enzyme immobilized on a hybrid support composed by silica and β-cyclodextrin and in the synthesis of biodiesel using babassu oil and ethanol as raw materials. In the first step of the work was developed the characterization of the hybrid support polysiloxane-βcyclodextrin (βCD-SiO₂). Such results were compared with the polysiloxane-polyvinyl alcohol (SiO₂-PVA) results. The free and immobilized lipase PS were characterized regarding their kinetic parameters (K_m and V_{max}) and thermal stability at 60°C and regarding their morphological properties by the following analysis: scanning electron microscopy (SEM), spectroscopy of x-ray diffraction (XRD), surface area, size and volume pore (BET) and thermogravimetric analysis (TGA). In general, the derivative PS/SiO₂-βCD showed similar performance to PS/SiO₂-PVA regarding morphology, kinetic and thermal proprieties and application in the ethanolsis of babassu oil. In the second step of the work was studied the influence of ultrasound on hydrolytic activities of free enzyme, immobilized derivative preparation and transesterification reaction. The hydrolytic activities of enzyme solution (lipase PS) sonicated for 2 h decreased by about 35 %. Both immobilized derivatives prepared by the convention method (just magnetic stirring), as the influence of ultrasound had preserved their morphological characteristics and hydrolytic activities. It was observed the possibility of time reducing involved in the steps of immobilized derivative preparation. In the synthesis of biodiesel using babassu oil and ethanol catalyzed by PS/SiO₂-βCD, at a ratio of 1:7 at 45°C the yield of transesterification under influence of ultrasound waves, had time reduction of 67% (when yield was 80%) in relation to reaction carried out by magnetic stirring. The variation in molar ratio didn't alter the yield, significantly, because in 8 h of ultrasound reaction under the same conditions, the yield in the molar ratio of 1:4 and 1:10 were respectively 68% and 55%.

Keywords: Ultrasound, Biodiesel, Lipase PS, SiO₂-βCD, Babassu oil, Ethanol

LISTA DE TABELA

Tabela 2.1 Aplicações de ultrassom envolvendo enzimas.....	25
Tabela 2.2 Reações realizadas sob a influência de ultrassom de banho	26
Tabela 2.3 Aplicações industriais das lipases	37
Tabela 2.4 Propriedades de sistemas com enzimas imobilizadas	39
Tabela 2.5 Composição química do óleo de babaçu.....	52
Tabela 2.6 Características das principais oleaginosas do Brasil.....	53
Tabela 3.1 Tempos utilizados nas etapas de preparação do derivado imobilizado	62
Tabela 4.1 Área superficial específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para as matrizes de SiO ₂ -βCD e de SiO ₂ -PVA	69
Tabela 4.2 Atividade hidrolítica e umidade dos derivados imobilizados e rendimento de imobilização.....	76
Tabela 4.3 Parâmetros cinéticos para lipase livre e para os derivados imobilizados	78
Tabela 4.4 Constantes de inativação térmica e tempos de meia-vida da lipase PS imobilizada	79
Tabela 4.5 Rendimento de transesterificação e viscosidade cinemática.....	82
Tabela 4.6 Redução do tempo no preparo do derivado imobilizado utilizando agitação magnética (AM) e ultrassom (US).....	84
Tabela 4.7 Parâmetros cinéticos para PS livre e imobilizada	84
Tabela 4.9 Comparação tempo e da produtividade para as reações aquecidas por agitação magnética e por ultrassom para um rendimento de aproximadamente 80%.	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Região de frequência do som	21
Figura 2.2	Crescimento da bolha e implosão num líquido irradiado por ultrassom.....	22
Figura 2.3	Esquema representativo do mecanismo catalítico proposto para lipases.....	32
Figura 2.4	Representação da estrutura tridimensional da conformação aberta da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>	34
Figura 2.5	Reações catalisadas por lipases	35
Figura 2.6	Métodos de imobilização	40
Figura 2.7	Interação entre suporte e enzima.....	43
Figura 2.8	Estrutura do tetraetilortossilicato (TEOS).....	45
Figura 2.9	Representação da estrutura tronco-cônica invertida de uma CD	46
Figura 2.10	Representação esquemática das ciclodextrinas	47
Figura 2.11	Produção anual de B100 (biodiesel 100%) no Brasil.....	48
Figura 2.12	Esquema representativo das reações de transesterificação de óleos e gorduras..	50
Figura 2.13	Cacho dos frutos de babaçu (a); corte transversal do babaçu (b).....	54
Figura 3.1	Banho de ultrassom (a) e Funções do Pannel (b).....	58
Figura 3.2	Esquema da metodologia utilizada na aplicação de ondas ultrassônicas no pré-tratamento de lipase PS.....	59
Figura 3.3	Esquema representativo da formação da PS imobilizada em SiO ₂ -PVA.....	66
Figura 3.4	Esquema representativo da formação da PS imobilizada em SiO ₂ -βCD	66
Figura 4.1	Difratogramas dos suportes de SiO ₂ -βCD e SiO ₂ -PVA puros e ativados	70
Figura 4.2	Microscopia eletrônica de varredura dos suportes híbridos de SiO ₂ -βCD e SiO ₂ -PVA puros(a, c) e ativados (b, d), respectivamente.....	72
Figura 4.4	Curvas de DTG do suporte SiO ₂ -βCD puro e ativado, lipase PS livre e derivado imobilizado PS/SiO ₂ -βCD.	73
Figura 4.5	Curvas de TGA do suporte SiO ₂ -PVA puro e ativado, lipase PS livre e derivado imobilizado PS/SiO ₂ -PVA.....	74
Figura 4.6	Curvas de DTG do suporte SiO ₂ -PVA puro e ativado, lipase PS livre e derivado imobilizado PS/SiO ₂ -PVA.....	74
Figura 4.7	Difratogramas dos derivados imobilizados	76
	PS/SiO ₂ -βCD (a) e PS/SiO ₂ -PVA (b)	76

Figura 4.8 Atividade hidrolítica ($U\ g^{-1}$) da lipase PS em função da concentração do substrato ($mmol\ L^{-1}$).....	78
Figura 4.9 Atividade hidrolítica ($U\ g^{-1}$) da lipase PS imobilizada em SiO_2 - β CD e SiO_2 -PVA em função da concentração do substrato ($mmol\ L^{-1}$).....	78
Figura 4.10 Atividade hidrolítica e residual da lipase PS imobilizada em SiO_2 - β CD e SiO_2 -PVA.....	80
Figura 4.11 Perfil de formação de ésteres etílicos e rendimento de transesterificação em função do tempo utilizando o biocatalisador PS/ SiO_2 - β CD	81
Figura 4.12 Perfil de formação de ésteres etílicos e rendimento de transesterificação em função do tempo utilizando o biocatalisador PS/ SiO_2 -PVA.....	81
Figura 4.13 Comparação da atividade hidrolítica enzimática da lipase PS (tampão fosfato pH 7,0 a $37^\circ C$) no banho convencional e no banho de ultrassom por diferentes métodos.....	83
Figura 4.14 Formação de ésteres de etila em função do tempo de reação pelo método convencional na razão de 1:7.....	86
Figura 4.15 Formação de ésteres de etila em função do tempo de reação por ultrassom na razão de 1:7	86
Figura 4.16 Formação de ésteres de etila em função do tempo de reação por ultrassom na razão de 1:4	86
Figura 4.17 Formação de ésteres de etila em função do tempo de reação por ultrassom na razão de 1:10.....	87
Figura 4.18 Comparação de rendimento de transesterificação em função do tempo de reação por ultrassom na razão de 1:4, 1:7 e 1:10	88

LISTA DE SIGLAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
BET	Brunauer, Emmett e Teller
BJH	Barrett, Joyner e Halenda
DRX	Espectroscopia de difração de raio-X
K_d	Constante de inativação térmica
K_m	Constante de Michaelis-Menten
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PEG	Polietilenoglicol
PS	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
PS/SiO ₂ -PVA	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada no suporte de polissiloxano-álcool polivinílico
PS/SiO ₂ - β CD	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada no suporte de Polissiloxano- β -ciclodextrina
PVA	Álcool polivinílico
SiO ₂ -PVA	Polissiloxano-álcool polivinílico
SiO ₂ - β CD	Polissiloxano- β -ciclodextrina
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TEOS	Tetraetilortossilicato
TGA	Análise termogravimétrica
V_{max}	Velocidade máxima
β CD	β -ciclodextrina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Ultrassom	21
2.1.1 <i>Efeito do ultrassom na biocatálise</i>	23
2.2 Lipases	30
2.2.1 <i>Lipases como biocatalisadores e suas aplicações</i>	30
2.2.2 <i>Mecanismos de catálise das lipases</i>	32
2.2.3 <i>A lipase de Burkholderia cepacia (lipase PS)</i>	33
2.2.4 <i>Reações catalisadas pelas lipases e suas aplicações</i>	34
2.3 Imobilização de enzimas	38
2.3.1 <i>Técnicas de imobilização</i>	40
2.3.2 <i>Suportes híbridos para imobilização de enzimas</i>	42
2.4 Biodiesel	48
2.4.1 <i>Aspectos gerais</i>	48
2.4.2 <i>Reação de transesterificação</i>	49
2.4.3 <i>Matéria prima: óleo de babaçu</i>	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1 Materiais	55
3.1.1 <i>Fonte de enzima</i>	55
3.1.2 <i>Suportes de imobilização</i>	55
3.1.3 <i>Substrato</i>	55
3.1.4 <i>Outros reagentes</i>	55
3.2 Principais equipamentos	56
3.3 Metodologia experimental	56
3.3.1 <i>Síntese dos suportes híbridos</i>	56
3.3.2 <i>Ativação dos suportes híbridos</i>	56
3.3.3 <i>Imobilização da lipase PS nos suportes ativados</i>	57
3.3.4 <i>Reação de transesterificação enzimática por agitação magnética</i>	57

3.3.5 Estudo da influência do ultrassom no pré-tratamento da lipase PS, na preparação do derivado imobilizado e nas reações de transesterificação	58
3.3.5.1 Pré-tratamento da lipase de Burkholderia cepacia (PS).....	58
3.3.5.2 Preparação do derivado imobilizado.....	61
3.3.5.3 Reação de transesterificação enzimática.....	62
3.3.6 Purificação dos produtos formados na reação de transesterificação	62
3.4 Metodologias de análises	63
3.4.1 Caracterização dos suportes híbridos	63
3.4.1.1 Análises de superfície, tamanho e volume de poros (BET).....	63
3.4.1.2 Difração de raio-X (DRX)	63
3.4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	63
3.4.2 Caracterização dos derivados imobilizados	64
3.4.2.1 Determinação da atividade hidrolítica	64
3.4.2.2 Teor de umidade.....	64
3.4.2.3 Parâmetros cinéticos	64
3.4.2.4 Estabilidade térmica.....	65
3.4.2.5 Análise Termogravimétrica (TGA).....	67
3.4.3 Caracterização do biodiesel	67
3.4.3.1 Determinação dos ésteres formados e cálculo do rendimento de transesterificação	67
3.4.3.2 Viscosidade	68
3.4.3.3 Densidade.....	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 Caracterização do suporte híbrido.....	69
4.1.1 Análise textural	69
4.1.2 Difração de Raio-X (DRX).....	69
4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	71
4.2 Caracterização do derivado imobilizado	72
4.2.1 Análise termogravimétrica (TGA)	72
4.2.2 Difração de raio X (DRX).....	75
4.2.3 Rendimento de imobilização	76
4.2.4 Parâmetros cinéticos.....	77

4.2.5 Estabilidade térmica.....	79
4.3 Comparação do desempenho da lipase PS imobilizada em diferentes suportes	80
4.4 Efeito do ultrassom	82
4.4.1 Influência do ultrassom na lipase livre.....	82
4.4.2 Influência do ultrassom no preparo do derivado imobilizado	83
4.4.3 Influência do ultrassom nas reações de transesterificação	85
5 CONCLUSÕES.....	89
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

A ultrassonicação tem sido utilizada para acelerar a velocidade de numerosas reações químicas por meio do fenômeno da cavitação originado pelas ondas ultrassônicas. A aplicação de ultrassom em reações químicas apresenta algumas vantagens, como redução do tamanho de partículas e geração de radicais livres, favorecendo os mecanismos que envolvem esses radicais, além de aumentar a velocidade de fluido, facilitando a transferência de massa durante a reação. Embora o fenômeno dessas ondas venha sendo explorado com sucesso nas reações químicas, os efeitos dessas ondas em reações catalisadas por enzimas têm sido muito pouco estudados. A literatura reporta que a ultrassonicação pode provocar mudanças interessantes nesses biocatalisadores com conseqüente redução nas limitações de transferência de massa e aumento de sua atividade de catálise (ROY; GUPTA, 2004; SHAH; GUPTA, 2008; ROKHINA; LENS; VIRTUTYTE, 2009).

Das enzimas utilizadas nos processos biocatalisados, as lipases são especialmente atraentes em função das suas diferentes aplicações com extrema simplicidade de processo, qualidade superior do produto final e excelente rendimento. As lipases microbianas recebem mais atenção que as lipases de origem animal e vegetal, por apresentarem diversidade de atividade catalítica e alto rendimento, além de sua relativamente fácil manipulação genética e maior estabilidade térmica (JAEGER; REETZ, 1998).

Apesar das vantagens catalíticas das enzimas, especificamente as lipases, sua utilização em processos industriais tem sido limitada, principalmente devido a: baixa estabilidade nas condições de operação, elevado custo de obtenção (desde o isolamento até a purificação), dificuldade técnica e elevado custo de recuperação do produto ao final da reação. Isto restringe o emprego de enzimas solúveis, principalmente em reações de batelada, onde ao final do processo, a enzima dificilmente consegue ser recuperada, impedindo sua reutilização em bateladas posteriores. Com a finalidade de aproveitar o potencial catalítico das enzimas, e reunir as vantagens dessas proteínas sobre os catalisadores químicos, tem-se estudado formas de torná-las insolúveis ao meio reacional. Neste contexto, uma forma que tem apresentado

resultados bem satisfatórios é a de ligar as enzimas a suportes sólidos insolúveis no meio reacional, conhecidas como enzimas imobilizadas (DE CASTRO et al., 2008).

Visando ampliar as rotas de produção de biodiesel de modo a contribuir para a ampliação da sua produção a curto e médio prazo, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do ultrassom em três diferentes etapas: no pré-tratamento da lipase de *Burkholderia cepacia* (lipase PS), na preparação do derivado imobilizado desta enzima em um suporte híbrido composto por sílica e β -ciclodextrina e na síntese de biodiesel utilizando o óleo de babaçu e etanol como matérias-primas e o derivado preparado como biocatalisador.

Era esperado que a biocompatibilidade da sílica sob a forma do precursor silano, o tetraetilortossilicato (TEOS), com a β CD, fosse uma opção promissora para imobilização da enzima utilizada nesse trabalho. O desempenho do derivado obtido foi comparado com o desempenho do polissiloxano-álcool polivinílico (SiO_2 -PVA), suporte já utilizado em biocatálise com regular sucesso. Os derivados imobilizados foram caracterizados quanto as suas propriedades morfológicas e cinéticas, bem como utilizados para mediar a síntese de biodiesel a partir de óleo de babaçu e etanol.

O óleo de babaçu possui excelentes características, devido sua composição ser predominantemente láurica. Este fato facilita a reação de transesterificação, pois os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que interagem mais eficaz e efetivamente com o agente transesterificante e com o catalisador, de modo a se obter um produto, biodiesel, de excelentes características físico-químicas (LIMA et al., 2007).

A utilização do etanol como agente acilante em substituição ao metanol é função da vantagem oferecida pela produção do etanol no Brasil, o que torna o biodiesel totalmente independente do petróleo, promovendo, assim, a produção de combustível completamente agrícola. As desvantagens da produção do biodiesel etílico (mais lenta, maior consumo de álcool, maiores dificuldades de separação) são compensadas por suas vantagens, como: gerar menor opacidade na fumaça que o biodiesel metílico e sua temperatura de combustão ser menor, significando, entre outras, uma redução nas emissões de NO_x (PENTEADO, 2005; FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009; GOG et al., 2012).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ultrassom

Ultrassons são ondas mecânicas com frequência maior que 16 kHz que se propagam em ciclos sucessivos de compressão e rarefação através de qualquer meio material e que não podem ser sentidas pelo homem (MASON; LORIMER, 1988). Os ultrassons têm uma gama de aplicações na medicina, biologia e engenharia. Na área de interesse da biologia, os ultrassons são empregados para o rompimento de paredes de células e na homogeneização. Na medicina e engenharia, geradores de ultrassons de baixas e altas potências ou frequências são empregados, respectivamente, para exames diagnósticos e para o desbaste de superfícies. Aplicações que envolvem diagnósticos fazem medidas relacionadas com a propagação, atenuação ou reflexão das ondas ultrassônicas, sendo que para este fim, as ondas devem apresentar frequências superiores a 1,0 MHz. Por outro lado, ondas ultrassônicas com frequências entre 16 kHz e 1000 kHz e alta potência, são empregadas para solda e modelagem de peças, desbaste de sólidos (metais e cristais, entre outros) e degradação de tumores (SUSLICK, 1990).

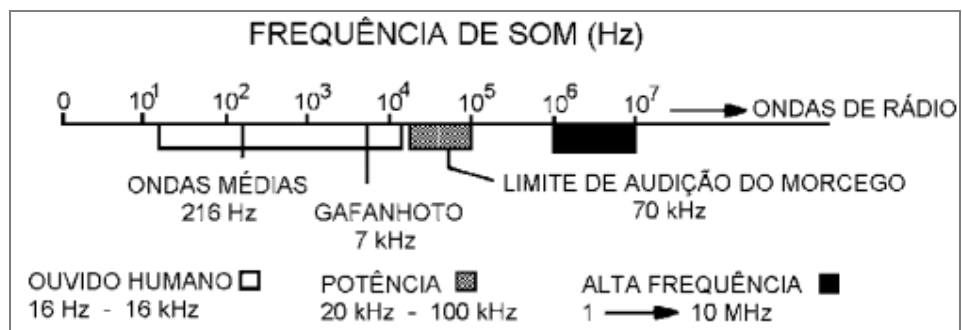


Figura 2.1 Região de frequência do som
 Fonte: MARTINES, DAVOLES e JUNIOR, 2000

Pela Figura 2.1 pode-se ter uma idéia da frequência do ultrassom em relação à sensibilidade do ouvido humano. A sensibilidade do ouvido humano está na faixa de 16 Hz a 16 KHz, a frequência característica de ultrassom, em geral, está no intervalo de 16 KHz a 1 MHz. Sendo que frequências de 1 a 10 MHz correspondem à região de alta frequência. (MARTINES; DAVOLES; JUNIOR, 2000).

Segundo Suslick (1989) o processo de ultrassom é um fenômeno físico baseado no processo de criar, aumentar e implodir cavidades de vapor e gases em um líquido promovendo efeitos de ativação em reações químicas, este processo é chamado de cavitação. Durante a etapa de compressão a pressão é positiva, enquanto que a expansão resulta em vácuo, chamado de pressão negativa, constituindo-se em ciclos de compressão-expansão que geram as cavidades.

Portanto, o aumento da cavidade depende da intensidade da onda. O ultrassom de alta intensidade pode expandir a cavidade tão rapidamente durante um ciclo de pressão negativa que a cavidade não terá a chance de diminuir durante o ciclo de pressão positiva. Neste processo, as cavidades podem crescer rapidamente em um único ciclo de vibração. No ultrassom de baixa intensidade o tamanho da cavidade oscila em fases de acordo com os ciclos de expansão e compressão, onde a área da superfície da cavidade produzida por esse ultrassom é ligeiramente maior durante os ciclos de expansão do que durante os ciclos de compressão. Assim, a quantidade de gás difundida dentro ou fora da cavidade depende da área de superfície e a difusão na cavidade durante o ciclo de expansão é ligeiramente maior do que durante o ciclo de compressão. Portanto, para cada ciclo de vibração a cavidade expande um pouco mais e após muitos ciclos as cavidades irão crescer lentamente (Figura 2.2) (SUSLICK, 1989).

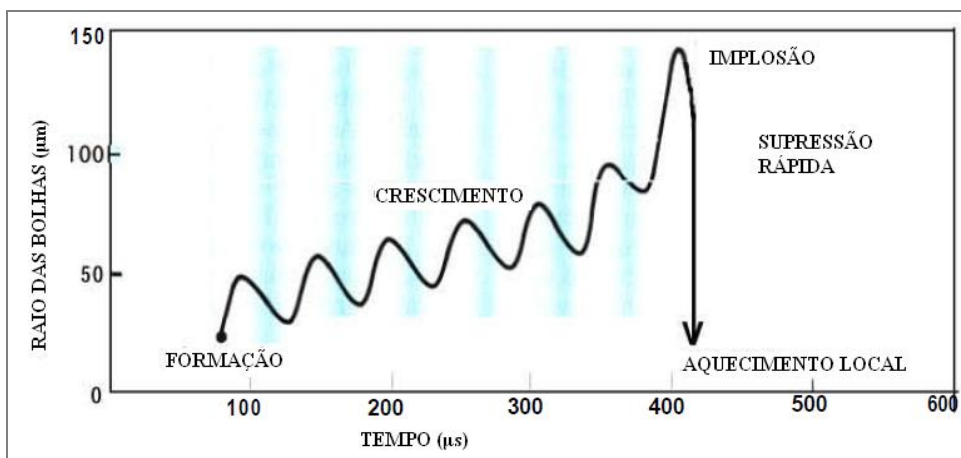


Figura 2.2 Crescimento da bolha e implosão num líquido irradiado por ultrassom

Fonte: SUSLICK, 1989

O crescimento da cavidade pode eventualmente alcançar um tamanho crítico, onde a energia do ultrassom será mais absorvida. Esse tamanho crítico depende da frequência das ondas do ultrassom, onde a 20 kHz o tamanho crítico da cavidade é de aproximadamente 170 microns de diâmetro. Neste caso, a cavidade pode aumentar rapidamente em um único ciclo de vibração (SUSLICK, 1989).

A aplicação de ultrassom em reações químicas é descrita na literatura, pois apresenta algumas vantagens, a saber:

- redução do tamanho de partículas de moléculas;
- geração de radicais livres facilitando mecanismos que envolvem os radicais livres;
- aumento da velocidade de fluido, facilitando a transferência de massa durante a reação.

Este método pode ser empregado em sistemas homogêneos e heterogêneos com o objetivo de aumentar a miscibilidade entre os reagentes. Em meios homogêneos, pode ocorrer um aumento excessivo da temperatura e pressão nas bolhas formadas por efeito da irradiação e em sistemas heterogêneos, quando se utilizam partículas sólidas e líquidos imiscíveis, que também é favorecida a miscibilidade das fases. Em relação aos sistemas heterogêneos com partículas sólidas, tem-se como exemplo as reações catalisadas por enzimas imobilizadas (ROKHINA; LENS; VIRTUTYTE, 2009).

2.1.1 Efeito do ultrassom na biocatálise

Os efeitos do ultrassom em reações enzimáticas podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro grupo envolve o uso do ultrassom como um pré-tratamento enzimático para reduzir o tamanho da partícula, o que é especialmente relevante quando são usadas enzimas em pó para catalisar reações em meios orgânicos. Em tais casos, acredita-se que a redução no tamanho da partícula e, conseqüentemente, o aumento da área superficial catalítica reduza as transferências de massa. Em contrapartida, o segundo grupo envolve o uso do ultrassom durante toda a reação, onde a energia de cavitação acelera a velocidade de reação, ainda que os mecanismos pelos quais isto ocorra não sejam claros (GUPTA; ROY, 2004;

SHAH; GUPTA, 2008). Pode ser que o acesso do substrato ao sítio ativo seja facilitado pelo aumento do movimento das moléculas líquidas, ou ainda aumento da homogeneidade do meio reacional. Esse método pode acelerar as reações enzimáticas, e alguns estudos demonstram a inativação da enzima (SINISTERRA, 1992; ROKHINA; LENS; VIRTUTYTE, 2009).

De uma forma geral, as enzimas são conhecidas por ficarem mais estáveis em solventes orgânicos, portanto não é surpresa que em todos os casos que apresentaram aumento de velocidade com o tratamento ultrassônico, exista o envolvimento de catálise enzimática em meios orgânicos. Pela estabilidade das enzimas em meio orgânico ser maior que em meio aquoso, a sua aplicação em reações assistidas por irradiação ultrassônica é considerada uma importante ferramenta em biotransformação (VULFSON, 1997; GUPTA; ROY, 2004; SHAH; GUPTA, 2008).

Esta técnica tem sido amplamente empregada em reações enzimáticas em meios não-convencionais com o objetivo de aumentar a miscibilidade de substratos em determinados tipos de solventes, e com isto, aumentar a velocidade de reação (WANG et al., 2007; BABICZ et al., 2010; YU et al., 2010; XIAO et al., 2011).

Segundo Sinisterra (1992) a alta intensidade da irradiação ultrassônica pode inativar as enzimas. A inativação é mais acentuada na presença de grande quantidade de moléculas de água, o que pode ser explicado pelo aumento da energia cinética, e conseqüentemente da temperatura da água induzida pelo ultrassom. No entanto, a presença de uma pequena quantidade de água em meio não convencional pode atuar como uma proteção à enzima, onde as moléculas de água permanecem em volta da enzima, de forma que nem mesmo a influência do ultrassom interfira na inativação da enzima.

O uso de baixa frequência de ultrassom (10 - 60 kHz) para o melhoramento de diversos processos biotecnológicos tem sido reportado pela literatura especializada. Nesse caso, a sonoquímica se associou à biotecnologia com a finalidade de melhorar a eficiência dos seus processos, como a produção de biodiesel, além do monitoramento dos bioprocessos, desempenho dos biocatalisadores e biosensores e no tratamento biológico de esgoto (ROKHINA; LENS; VIRTUTYTE, 2009).

Uma onda de ultrassom pode controlar as características da enzima alterando a sua estrutura em resposta a uma perturbação dinâmica. A irradiação de 10 a 100 kHz é capaz de perturbar regiões estruturais de uma enzima e, conseqüentemente, afetar sua atividade, o que permite o controle sobre a função da enzima. Portanto, a tolerância das enzimas pelo ultrassom depende da sua localização na célula, da sua massa molecular e do meio que ela se encontra, mas pouco pode se afirmar a respeito do efeito dessas nas enzimas, pois existem relatos contraditórios de inativação e ativação de biocatalizadores sob influencia da irradiação ultrassônica (SINISTERRA, 1992; ROKHINA; LENS; VIRTUTYTE, 2009; KWIATKOWSKA et al.,2011).

A Tabela 2.1 mostra formas variadas de aplicação do ultrassom em relação às enzimas. E a Tabela 2.2 mostra exemplos de reações catalisadas por enzimas sob a influência de ultrassom de banho.

Tabela 2.1 Aplicações de ultrassom envolvendo enzimas

Aplicações do ultrassom	Referências
Na estabilidade de enzimas em meio aquosos e não aquosos	VULFSON, 1997; ÖZBEK; ÜLGEN, 2000; SHAH; GUPTA, 2008
No processo de imobilização de enzimas	SHARMA et al., 2009; SHARMA et al., 2011
Nas reações catalisadas por enzimas	TALUKDER et al., 2006;; SHAH; GUPTA, 2008; BABICZ et al., 2010; YU et al., 2010; XIAO et al., 2011; LIU et al., 2011; GONÇALVES et al., 2012

Tabela 2.2 Reações realizadas sob a influência de ultrassom de banho

Reações	Frequência	Potência	Rendimento	Tempo	Referência
Hidrólise de azeite de oliva catalisada pela lipase <i>Chromobacterium viscosum</i> .	25 – 36 kHz	106 W	n.i	n.i.	TALUKDER et al., 2006
Hidrólise do óleo de soja em meio livre de solvente catalisada pela lipase <i>C. lipolytica</i>	28 kHz	1,64 W mL ⁻¹	70%	12 h	LIU et al., 2008
Síntese de biodiesel catalisado pela lipase <i>Burkholderia cepacia</i> pré-tratada por ondas ultrassonoras durante 4h.	40 kHz	100 W	79%	24 h	SHAH; GUPTA, 2008
Hidrólise de diacilgliceróis catalisada pelas lipases comerciais: Novozyme 435, Lipozyme TL IM e RM IM	47 kHz	125 W	32, 40 e 41%	1h 30min	BABICZ et al., 2010
Catálise da síntese de biodiesel com óleo de soja e metanol pela Novozyme 435	40 kHz	200-500 W	96%	4 h	YU et al., 2010
Tratamento da lipase <i>Burkholderia cepacia</i> e catálise da síntese de troxerutin	80 kHz	150 W	87,3%	8 h	XIAO et al., 2011
Síntese de biodiesel catalisada pela lipase <i>Burkholderia cepacia</i> em líquidos iônicos	40 kHz	120 W	83%	16 h	LIU et al., 2011
Hidrólise de diacilgliceróis catalisada pelas lipases comerciais Lipozyme TL IM e RM IM	40 kHz	n.i.	34 e 39%	1h 30min	GONÇALVES et al., 2012

n.i.: não identificado

Vulfson (1991) utilizou ultrassom, como pré-tratamento, na suspensão de subtilisina em álcool e permitiu um aumento catalítico da enzima, esse efeito foi maior em alcoóis de cadeias longas, e quando realizada em meio aquoso houve uma queda brusca na atividade relativa, considerando assim maior resistência da enzima sonicada em meio orgânico do que em meio aquoso. Na interesterificação catalisada pela subtilisina houve um aumento na velocidade de reação, quando realizada sob a influência do ultrassom.

Özbek e Ülgen (2000) testaram o potencial do ultrassom em seis enzimas comerciais: álcool desidrogenase (ADH), malate desidrogenase (MDH), glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), lactase desidrogenase (LDH), fosfato desidrogenase (AP) e β -glucosidase (β G). Estas enzimas foram tamponadas e sonicadas com ultrassom de sonda a frequência de 20 kHz, potência de 40 W, a temperatura de 5°C. Para esses autores, a aplicação do ultrassom em diversas enzimas resultou em decréscimos nas atividades, em outras as atividades se mantiveram inalteradas. Foram realizados estudos que comprovaram que a irradiação de alta intensidade é prejudicial às enzimas, pois provavelmente as inativam, e que o ultrassom de baixa intensidade é a melhor opção para aplicação nas enzimas.

Estudos comparativos do uso do ultrassom e da agitação magnética da acilação enzimática da troxerrutina pela protease alcalina de *Bacillus subtilis* foram realizados por Xiao e colaboradores (2010). Foram utilizadas enzimas pré-tratadas irradiadas por um período de 8 h, e em seguida aplicadas na reação de troxerrutina e a conversão teve um aumento de 65% (de 56,3% para 87,3%), comparando-se as enzimas não tratadas com as enzimas tratadas.

Shah e Gupta (2008) realizaram o pré-tratamento ultrassônico (40 kHz; 44, 66 e 110 W; 40 °C) das lipases de *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas fluorescens* em tampão aquoso e solvente orgânico. Verificaram um aumento na taxa para a transesterificação do butirato de etila para butirato de butila, de 66% para 82%. Da mesma forma, a conversão de óleo de pinhão manso em biodiesel foi melhorada de 34% (sem pré-tratamento) para 79%. As análises de espectro de dicroísmo circular e microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicaram que a estrutura secundária da enzima permaneceu inalterada, mas o micro-ambiente de aminoácidos aromáticos e estrutura terciária da enzima foram perturbados, fazendo com que aumentasse o poder catalítico dessas enzimas.

A lipase de *Burkholderia cepacia* foi estudada em diferentes líquidos iônicos a temperatura ambiente. O melhor líquido iônico relatado na síntese de biodiesel, por óleo de soja e metanol, catalisada pela lipase teve um rendimento de 82,2%. Quando assistida por ultrassom essa reação teve uma redução do tempo de 83% (LIU et al., 2011).

Produção de diacilgliceróis pela hidrólise das lipases comerciais Lipozyme PS IM e TL IM, utilizando óleo de palma, sob irradiação do ultrassom. Os melhores resultados de rendimento de diacilglicerol foram de 34 e 39%, respectivamente, utilizando 1% de Lipozyme PS IM e 2% para Lipozyme TL IM (GONÇALVES et al., 2012). Assim, obteve-se um bom rendimento para os diacilgliceróis em menores tempos de reação e sob condições brandas, mostrando ser vantajosa a utilização do ultrassom em reações enzimáticas. Um trabalho semelhante foi relatado por Babicz e colaboradores (2010).

Foi realizado para a catálise da lipase na hidrólise de óleo de soja em sistema livre de solvente, usando um ultrassom de potência de $1,64 \text{ W mL}^{-1}$ a 28 kHz e a 40°C. A temperatura ótima e temperatura de inativação da lipase no banho de ultrassom foi de 5-10°C mais alta em relação aos resultados obtidos por agitação, enquanto que o efeito do pH foi similar e a velocidade de reação de hidrólise global foi duas vezes maior que a do banho de agitação (LIU et al., 2008).

A hidrólise de óleo de oliva catalisada pela lipase *Cromobacterium viscosum* no sistema bifásico de água/isooctano foi 1,75 vezes mais efetivo em ultrassom do que com agitação a 25°C. A atividade da lipase depende da potência do ultrassom e da quantidade de água no isooctano e sob condições ótimas a velocidade máxima de reação foi superior com o ultrassom, mas a constante de Michaelis-Menten manteve-se a mesma, comprovando que a lipase não perdeu afinidade ao substrato (TALUKDER et al., 2006).

A produção de biodiesel com óleo de soja e metanol por meio da transesterificação por Novozym 435 foi conduzida sob duas diferentes condições de irradiação ultrassônica e vibração com a finalidade de comparar os seus efeitos globais. Com relação a irradiação de vibração, o ultrassom aumentou significativamente a atividade da Novozym 435. Sob condições ótimas (50% da energia ultrassônica, 50 rpm de vibração, razão molar de 1:1:6 para óleo/álcool amílico/metanol, 6% de Novozym 435 e 40°C) rendimento de 96% de éster metílico de ácido graxo foram alcançados em 4 h. Além disso, o uso repetido de

Novozym 435 após cinco ciclos não mostrou perda na atividade enzimática, o que sugere que esta enzima manteve-se estável (YU et al., 2010).

Lipases de diferentes fontes, *Pseudomonas fluorescens* (lipase AK), *Burkholderia cepacia* (lipase PS), *Penicillium camemcertii* (lipase G) e lipase de pâncreas de porco (PPL), foram previamente imobilizadas em polisiloxano-polialcool vinílico (SiO₂-PVA). Estes derivados imobilizados foram aplicados na síntese de monoésteres de xilitol por reação de esterificação usando ácido oléico como grupo de doadores de acila, o derivado que mais se destacou foi o da lipase G. O uso do ultrassom diminuiu o tempo de reação, aumentou a conversão e a produtividade, enquanto que para o método convencional o rendimento foi de 39,82% em 9 h, para o método sob influência das ondas ultrassônicas foi de 60,30% em 6 h (RUFINO et al., 2010).

Um método não convencional para imobilização de enzimas foi testado por Sharma et al. (2011), utilizando diferentes superfícies sólidas sob a ação de ondas ultrassônicas como fonte de energia. Este método de banho de ultrassom possui muitas vantagens em relação ao banho comum, pois reduz o tempo de imobilização de enzimas sem perder sua atividade hidrolítica, além de dispensar o uso de aquecimento térmico.

A sonificação tem como vantagens o baixo custo de operação e a não necessidade de equipamentos ou treinamentos técnicos sofisticados. Entretanto, a inativação de alguns produtos pela ultrassonicação pode ser causada por efeitos mecânicos, por exemplo, tensão de cisalhamento formada por redemoinhos decorrentes das ondas (ÖSBEK; ÜLGEN, 2000).

Ao contrário da inativação tradicional, o processo de ultrassom não destrói o sítio ativo de uma enzima. No entanto, algumas enzimas quando submetidas às ondas ultrassônicas foram inativadas devido à alta potência utilizada, causada provavelmente pela reação de radicais hidroxilas ou pontes de hidrogênio, podendo ocorrer a agregação de enzimas, ocultando o sítio ativo, enquanto que ao mesmo tempo, diminuiu a estabilidade proteica. Além disso, as forças de cisalhamento, que ocorrem no fluido durante a irradiação de ultrassom, também tiveram um papel significativo na inativação da enzima (ROKHINA; LENS; VIRTUTYTE, 2009).

2.2 Lipases

2.2.1 Lipases como biocatalisadores e suas aplicações

Nos últimos anos, a pesquisa sobre a utilização de enzimas vem crescendo em diversos campos de aplicação e levaram a uma melhor compreensão do comportamento catalítico das enzimas e, juntamente com a engenharia molecular, conduziram às novas aplicações de várias enzimas como, por exemplo, proteases, acilases, oxidase, amilases, glicosidases, celulases e lipases (VILLENEUVE, 2007).

As lipases (E.C. 3.1.1.3) pertencem a um grupo especial de esterases, onde uma definição clássica descreve estas enzimas como glicerol éster hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando di- ou monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. O sítio ativo de lipase é formado por uma tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. A serina catalítica, localizada no C-terminal da fita $\beta 5$, faz parte de um pentapeptídeo altamente conservado GX SXG, onde G= glicina; S= serina; X1= histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico (REIS et al., 2009; JAEGER; REETZ, 1998).

A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela diferenças de especificidade preferencial das duas enzimas. Essa especificidade pode se expressar quanto ao tipo de reação, de substrato ou por fatores que afetam a ligação enzima-substrato. Há vários tipos de especificidade encontrados:

- a) quanto ao substrato: diferentes velocidades de hidrólise entre triacilgliceróis ou monoacilgliceróis catalisadas por uma mesma enzima ou enzimas purificadas de uma mesma fonte;
- b) posicional ou regioseletividade: hidrólise preferencial de ésteres primários, secundários, terciários ou hidrólise não específica, liberando ácidos graxos das três posições;
- c) quanto aos ácidos graxos que compõem o substrato ou tiposseletividade: preferência por ácidos graxos específicos, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações;

- d) estereoespecificidade: discriminação entre enantiômeros, no caso de substratos racêmicos. Pode-se observar também a combinação dos tipos citados ou a ausência de especificidade (DE CASTRO et al., 2004; PAQUES; MACEDO, 2006).

A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei* (BRADY et al., 1990), *Geotrichum candidum* (SCHRAG et al., 1997) e da lipase pancreática humana (WINKLER; DÁRCY; HUNZIKER, 1990) por difração de raio-X, propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial: o sítio ativo destas enzimas é recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid”, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial devem ser fatores determinantes para a caracterização de lipases. (REIS, et al, 2009)

Apesar da presença da tampa hidrofóbica ser comumente relatada neste fenômeno, mais recentemente, descobriu-se que a presença desta estrutura não está necessariamente correlacionada com o fenômeno de ativação interfacial. Assim, todas as lipases que apresentam o fenômeno de ativação interfacial também possuem a tampa hidrofóbica, mas o contrário não é sempre verdadeiro. Por exemplo, as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica B* possuem uma tampa hidrofóbica cobrindo seus sítios ativos, mas não apresentam a ativação interfacial. Portanto, pode-se concluir que a presença da tampa hidrofóbica e o fenômeno de ativação interfacial são critérios adequados e específicos para classificar uma enzima como lipase e diferenciá-la das esterases (JAEGER; REETZ, 1998), o que justifica a definição clássica para lipases verdadeiras, ou seja, enzimas que hidrolisam triacilgliceróis de cadeia longa.

Segundo Jaeger e Reetz (1998) as lipases microbianas recebem uma maior atenção que as lipases de origem animal e vegetal, pois apresentam diversidade de atividade catalítica, alto rendimento, relativa facilidade de manipulação genética e maior estabilidade térmica.

Outra vantagem das lipases microbianas, do ponto de vista econômico e industrial, é sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de produzi-las. Vários gêneros de microrganismos podem ser empregados para produção de lipases, tais como os fungos dos gêneros *Trichosporon*, *Botrytis*, *Pichia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, e *Geotrichum*, leveduras do gênero *Tulopsis* e *Candida* e

bactérias do gênero *Streptomyces*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* (FABER, 1997; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

2.2.2 Mecanismos de catálise das lipases

As lipases seguem um ciclo catalítico hidrolítico semelhante aquele já estabelecido para a quimiotripsina (Figura 2.3). A hidrólise do substrato ocorre em duas etapas: inicialmente, o resíduo de histidina da tampa hidrofóbica aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila do resíduo de serina do sítio catalítico. Ocorre, então, um ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila serínica ao carbono carbonílico da ligação éster do substrato (1), formando um intermediário tetraédrico (2). O anel imidazólico do resíduo de histidina fica protonado e carregado positivamente, sendo estabilizado pela carga negativa do resíduo ácido. O intermediário tetraédrico é estabilizado por duas pontes de hidrogênio formadas com as ligações amida entre os resíduos de aminoácidos específicos. Um álcool é liberado, deixando um complexo acil-enzima (3). Em um segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila, o ácido graxo é liberado e a enzima é regenerada (4) (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

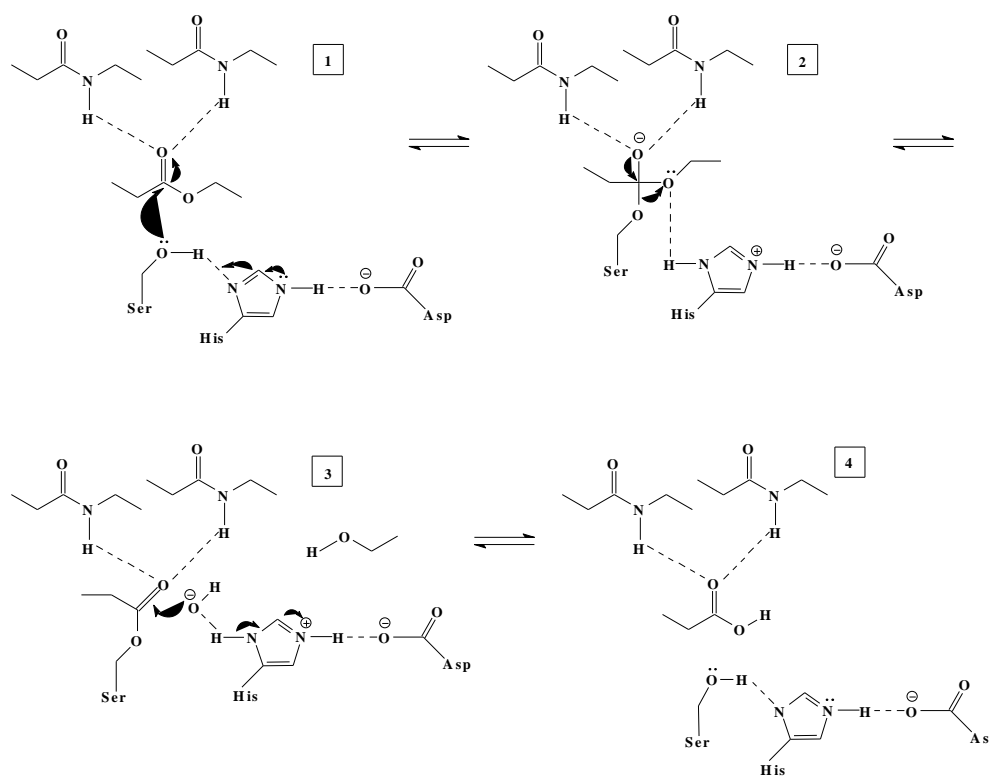


Figura 2.3 Esquema representativo do mecanismo catalítico proposto para lipases
Fonte: JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999

2.2.3 A lipase de *Burkholderia cepacia* (lipase PS)

A espécie bacteriana de *Burkholderia cepacia* (lipase PS, anteriormente *Pseudomonas cepacia*) (Figura 2.4) é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, com temperatura ótima de crescimento entre 30 e 35°C e utilizam mais de 200 compostos como fonte de carbono e energia (PADILHA, 2010). São bactérias produtoras de lipases extracelulares com característica de alta estabilidade e atividade. Essas lipases possuem massa molecular de 33 kDa, estabilidade em solventes orgânicos, altas temperaturas e em diferentes valores de pH, tendo pH ótimo entre 7 e 8.

A lipase PS é uma preparação enzimática desenvolvida pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltda., UK) obtida por fermentação submersa de uma linhagem selecionada proveniente de *Burkholderia cepacia*, e posteriormente purificada por precipitação com etanol. Contém cerca de 25% de proteína e alguns aditivos ou estabilizantes como diatomáceas, dextrinas e CaCl₂ e possui elevada atividade lipolítica (AMANO, 2011). Possuem diversas aplicações como aditivos em detergentes e em síntese orgânica, devido ao alto grau de enantiosseletividade. Como consequência, tem sido utilizada também na resolução quiral de racematos, produzindo enantiômeros puros. As lipases obtidas dessa fonte possuem em seu sítio ativo a presença da tríade catalítica formada por resíduos de aminoácidos de serina, histidina e aspartato (REETZ E JAEGER, 1998; AMANO, 2011).

As estruturas tridimensionais determinadas por Schrag et al. (1997) da conformação aberta da lipase PS 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 α_4 com a hélice α_9 e as duas fitas β antiparalelas (Figura 2.4), englobando os resíduos 214-228 da molécula (SCHRAG et al., 1997; KIM et al., 1997). As fitas β estão representadas como setas em verde e as hélices em azul. A posição do íon Ca²⁺ está indicada em amarelo e os resíduos da tríade catalítica estão mostrados em vermelho

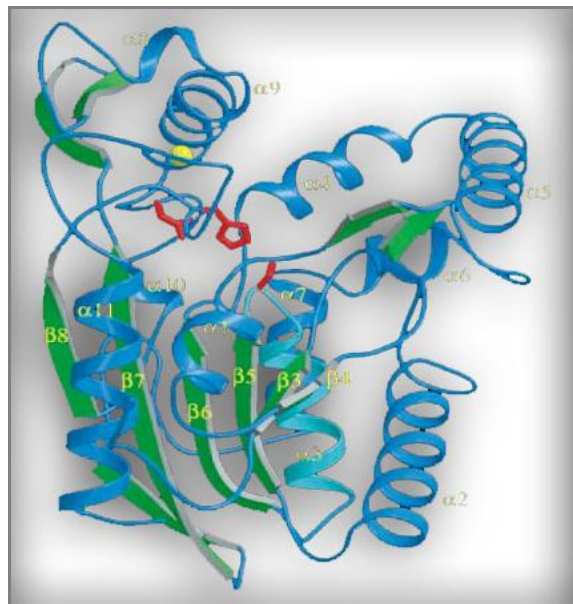


Figura 2.4 Representação da estrutura tridimensional da conformação aberta da lipase de *Burkholderia cepacia*.
Fonte: SCHRAG et al., 1997

2.2.4 Reações catalisadas pelas lipases e suas aplicações

De acordo com Jaeger e Reetz (1998) e Shu et al. (2010) as reações catalisadas por lipases são processadas normalmente com alta regioseletividade e/ou enantioseletividade, tornando-as um importante grupo de biocatalisadores. As razões para o enorme potencial biotecnológico de lipases incluem alguns fatos:

- são estáveis em solventes orgânicos;
- não requerem cofatores;
- possuem ampla especificidade de substrato;
- apresentam enantioseletividade alta.

Os processos que utilizam lipases são especialmente atraentes em função das diferentes aplicações desta enzima, com extrema simplicidade de processo, qualidade superior do produto final e excelente rendimento. Lipases catalisam a clivagem de ligações éster via reação de hidrólise (com concomitante consumo de moléculas de água) (PAIVA; BALCÃO; MALCATA, 2000). Também podem catalisar a reação reversa, isto é, a formação de ésteres a partir de um álcool e um ácido carboxílico com liberação de

molécula de água, num processo denominado esterificação (REIS et al., 2009).

Esses dois processos básicos podem ser combinados num padrão sequencial para dar origem a um grupo de reações usualmente denominadas de transesterificações, que, dependendo do substrato de partida, podem ser acidólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um ácido carboxílico), alcoólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um álcool) e interesterificação (quando dois grupos acilas são deslocados entre dois ésteres), sem ocorrer nem consumo nem formação de água (Figura 2.5) (DE CASTRO et al., 2004).

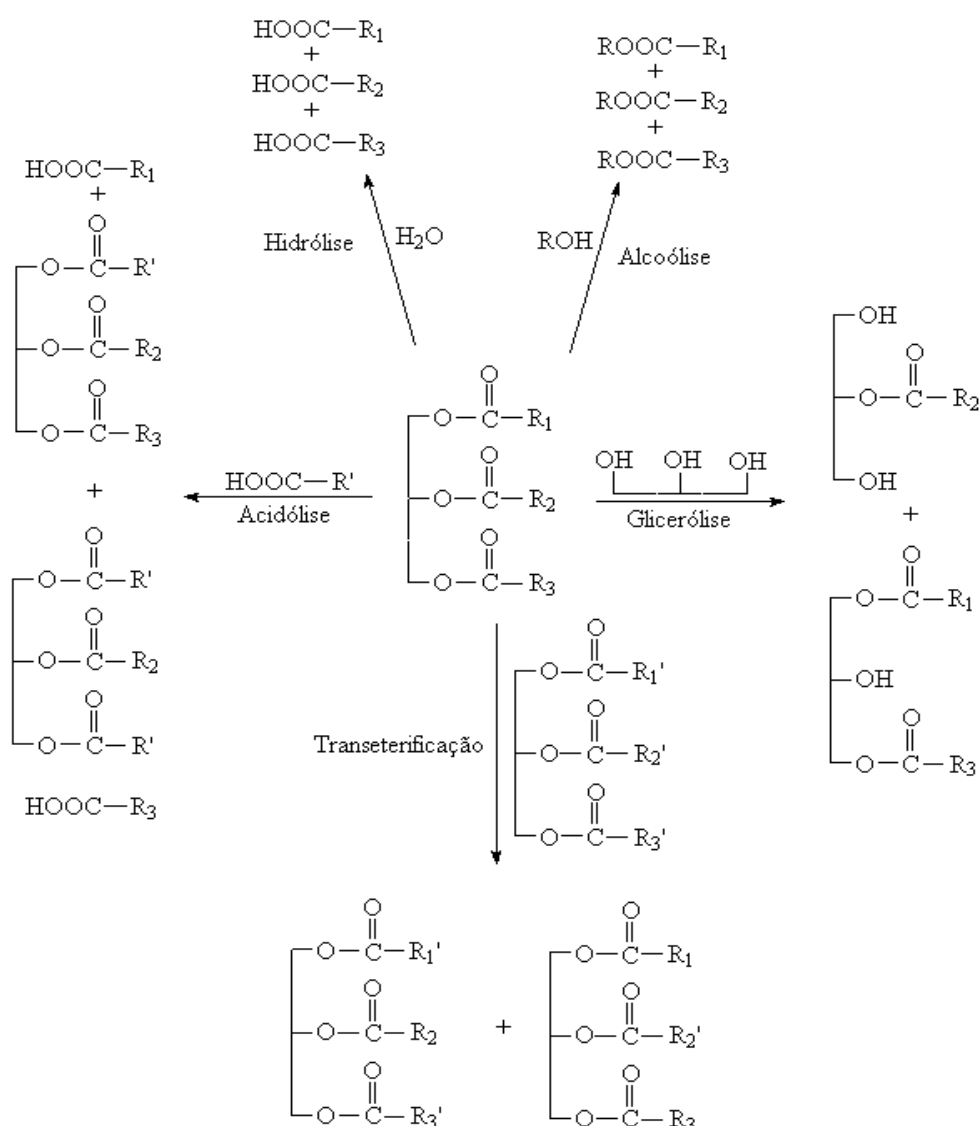


Figura 2.5 Reações catalisadas por lipases

Fonte: DE CASTRO et al., 2004

A água é, talvez, o componente mais importante quando o biocatalisador é utilizado em meio orgânico. Está bem documentado na literatura que uma quantidade mínima de água, que é dependente do tipo de solvente e das características do suporte utilizado, é absolutamente necessária para a solvatação da enzima ou dos substratos e produtos. Entretanto, o excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise e não a de síntese. As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte. A água contribui ainda para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, e pode também limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009; GUMEL et al., 2011; GOG et al., 2012)

Outros compostos, além de água e álcool, podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas. Desta forma, as lipases podem participar de reações como aminólises, tiotransesterificações e oximólises, em solventes orgânicos, com elevada seletividade (FABER, 1997; VILLENEUVE et al., 2000).

O uso deste biocatalisador em aminólise de ésteres, em meios anidros, tem sido bem sucedido na síntese de peptídeos e amidas de ácidos graxos. Esses resultados são promissores para a utilização de tecnologia de lipases em síntese de peptídeos opticamente ativos, polímeros, surfactantes e novos detergentes com baixo custo (VILLENEUVE et al., 2000).

A atividade hidrolítica da lipase pode ser diretamente relacionada com sua atividade de síntese, mas é independente de sua atividade de interesterificação. Geralmente lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (DE CASTRO et al., 2004).

A Tabela 2.2 mostra as diversas aplicações das lipases na indústria. As principais áreas de atuação são alimentícia, médica, farmacêutica, tratamento de efluentes, detergentes, química fina e transesterificação de óleos (biodiesel) (GANDHI, 1997).

Tabela 2.3 Aplicações industriais das lipases

Indústria	Aplicação
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite Aumento do aroma, da qualidade e da vida de prateleira
Cervejaria	Aumento do aroma e aceleração do processo fermentativo
Molhos e condimentos	Aumento de propriedades funcionais da gema de ovo
Processamento de carnes	Desenvolvimento de aromas e redução no conteúdo de gorduras
Óleos e gorduras	Transesterificação de óleos – introdução de ácidos graxos de interesse em óleos e gorduras naturais
Química fina	Síntese de ésteres e resolução de racematos
Detergentes	Hidrólise de gorduras
Farmacêutica	Auxiliares de digestão
Médica	Determinação de lipídeos no sangue (biossensores)
Couro	Remoção de gordura da matéria-prima
Tratamento de resíduos	Decomposição de lipídeos de efluentes

Fonte: Gandhi (1997)

Apesar das vantagens catalíticas das lipases, sua utilização em processos industriais é limitada, principalmente devido a: i) baixa estabilidade nas condições de operação; ii) elevado custo de obtenção da enzima (desde o isolamento até a purificação), iii) dificuldade técnica e elevado custo de recuperação e separação do produto ao final da reação. Isto restringe o emprego de enzimas solúveis, principalmente em reações de batelada, onde ao final do processo, a enzima dificilmente consegue ser recuperada, impedindo sua reutilização em bateladas posteriores. Com a finalidade de aproveitar o potencial catalítico das enzimas, e reunir as vantagens dessas proteínas sobre os catalisadores químicos, tem-se estudado formas de torná-las insolúveis ao meio reacional. Neste contexto, uma forma que tem apresentado resultados bem satisfatórios é ligar as enzimas em suportes sólidos insolúveis ao meio reacional (DE CASTRO et al., 2008).

2.3 Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma importante ferramenta para a estabilização da enzima, pois permite a sua reutilização e reduz a inativação por influência da temperatura e solventes orgânicos, o que pode ser atrativo para o setor industrial (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005; GUISÁN, 2006; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

De acordo com De Castro et al. (2008) o termo “enzima imobilizada” foi empregado por Katchalski–Katzir, na primeira Conferência de Engenharia Enzimática realizada em Henniker, EUA em 1971, para designar enzima fisicamente confinada ou localizada numa certa região do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser usada repetidamente e continuamente. Nesta técnica, a enzima fica retida no interior (poros) ou na superfície de um material que é utilizado como suporte. O complexo esquema enzima–suporte mantém as características físicas do suporte e, ao mesmo tempo, retém a atividade biológica da enzima na forma solúvel. O termo “enzima imobilizada” inclui ainda:

- A modificação das enzimas de forma a torná-las insolúveis em água.
- A utilização de enzimas na forma solúvel em reatores equipados com membranas de ultrafiltração, que permitem o escoamento dos produtos da reação, mas retêm a enzima no interior do reator.
- A restrição da mobilidade da enzima pela ligação a outra molécula, que torna o sistema insolúvel no meio de reação. O sistema imobilizado permite a condução de reações em reatores contínuos, com fácil separação de catalisador–produto, e o aumento da produtividade do processo (massa de substrato/massa de biocatalisador).

A Tabela 2.3 apresenta as principais vantagens e desvantagens de sistemas com enzimas imobilizadas.

Tabela 2.4 Propriedades de sistemas com enzimas imobilizadas

Vantagens	Desvantagens
Reuso do catalisador	Perda ou redução da atividade
Maior facilidade na operação do reator	Limitação difusional
Maior facilidade na separação dos produtos	Custo adicional
Ampla escolha do reator	

Fonte: Guisán, 2006

A tecnologia de imobilização de enzimas envolve basicamente a escolha de um suporte e do método de imobilização nesse suporte, pois a enzima imobilizada não deve acarretar em alterações estruturais danosas à atividade catalítica, bem como modificações no sítio ativo para obter um imobilizado ativo e estável (VILLENEUVE et al., 2000). Essa tecnologia dispõe atualmente de várias técnicas de imobilização assim como de um grande número de matrizes, englobando materiais orgânicos e inorgânicos, naturais ou sintéticos. Apesar da existência de suportes baratos, como polímeros e minerais naturais, a utilização de enzimas imobilizadas em processos exige a elaboração de matrizes específicas para essa finalidade, que resultem em preparados imobilizados com elevadas atividades e características hidrodinâmicas adequadas ao uso em reatores. As mais recentes tecnologias requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas nos materiais convencionais (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

Nos últimos anos, com o intuito de aumentar a atividade catalítica de lipases, foram apresentados na literatura várias pesquisas com o objetivo de imobilizar ou modificar a estrutura nativa, sendo que estes processos envolvem diferentes graus de complexidade e eficiência, pois, os métodos de imobilização requerem uma interação fraca ou a formação de ligações covalentes entre a lipase e o suporte (OLIVEIRA; ALVES; DE CASTRO, 2000ab; PAULA et al., 2007; PAULA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008; SANTOS et al., 2008a,b,c; DA RÓS et al., 2010; SILVA et al., 2011a; SILVA et al., 2011b; MENDES et al., 2011c).

2.3.1 Técnicas de imobilização

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização. Na literatura, inúmeros métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e aperfeiçoar as várias aplicações (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI; 2004; DE CASTRO et al., 2008; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009)

A imobilização pode ocorrer por meio da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional por meio de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação por uma membrana polimérica. (DE CASTRO et al., 2008; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI; 2004). A Figura 2.6 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas.

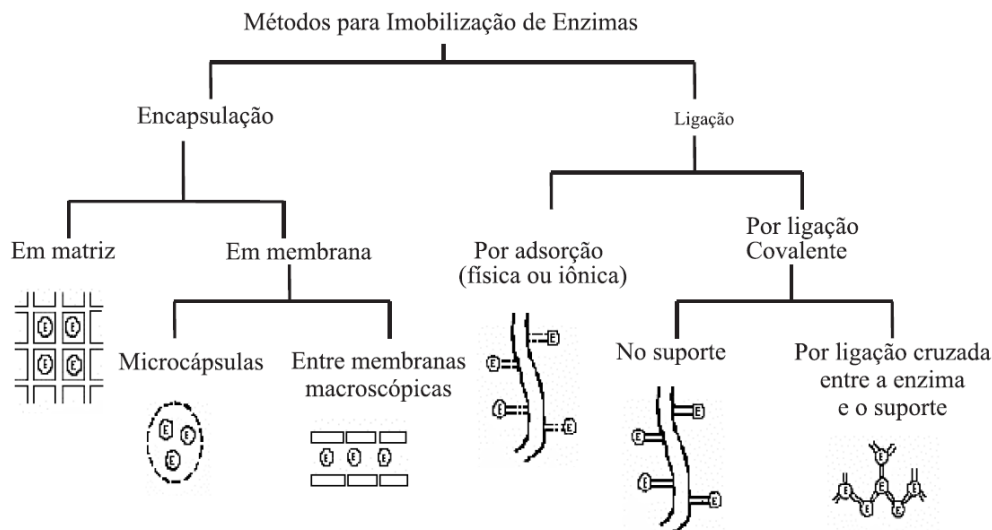


Figura 2.6 Métodos de imobilização

Fonte: DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do derivado, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades

finais desejadas para a enzima imobilizada (DE CASTRO et al., 2008; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009)

A adsorção física é o método mais simples e o mais empregado para imobilização de enzimas. Nesse caso, o biocatalisador é estabilizado por interações fracas com o suporte como forças de van der Waals (interações hidrofóbicas), pontes de hidrogênio e ligações iônicas. As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada. A grande desvantagem é a dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iônica (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

A encapsulação consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros entrecruzados como poliacrilamida, gelatina, alginato, carragenana, resinas de poliuretano e silanos. As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima no interior de um volume relativamente pequeno, e à possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como principais desvantagens, têm-se: a restrição de que os biocatalisadores podem ser aplicados somente com substratos de baixa massa molecular; a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização; a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e, os possíveis efeitos de difusão de substratos e/ou produtos no interior da matriz porosa (MENDES et al., 2011b).

A imobilização por ligação covalente baseia-se na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de ligação em suportes. É necessário conhecer a densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte e a sua geometria para reduzir a formação do complexo enzima-suporte inativo. Este método pode também afetar a estrutura ativa da enzima, devido à alteração do centro ativo. Suas principais vantagens são a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos; os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e

leito fluidizado e, a carga de enzima permanece constante após a etapa de imobilização (DE CASTRO et al., 2008; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

Ultimamente, têm sido empregados diferentes suportes e protocolos de ativação com o propósito de estabilizar derivados de lipases. Dentre estes suportes, podem-se citar os suportes orgânicos copolímero de estireno/divinilbenzeno (OLIVEIRA, 1999; OLIVEIRA; ALVES; DE CASTRO, 2000 a,b; SANTOS; CASTRO, 2006), quitina (GOMES; PEREIRA; DE CASTRO, 2004), quitosana (PEREIRA; ZANIN; DE CASTRO, 2003; SILVA et al., 2011a; MENDES et al., 2011c,c) celulignina (PÉREZ et al., 2007), suportes inorgânicos como celite (CASTRO et al., 1999), óxido de nióbio (MIRANDA; SILVA; DE CASTRO, 2006, DA RÓS et al., 2010), fosfato de zircônio (MENDES et al., 2007), sílica de porosidade controlada (SOARES et al., 1999) e partículas híbridas de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) (MOREIRA et al., 2007; PAULA et al., 2008; SANTOS et al., 2008 a,b,c; FREITAS et al., 2009; DA RÓS et al., 2010; FREITAS et al., 2010; PAULA et al., 2010; FREITAS et al., 2011; SILVA et al., 2011b). Dos suportes testados, os biocatalisadores com maior atividade catalítica e estabilidade térmica foram preparados a partir de matrizes híbridas de materiais orgânicos e inorgânicos.

2.3.2 Suportes híbridos para imobilização de enzimas

A interação entre enzima e suporte deve proporcionar um derivado imobilizado com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas (Figura 2.7). Diversos parâmetros importantes devem ser considerados, como: pH, temperatura, força iônica, pressão, agitação, liberação de co-fatores e do substrato coma remoção dos produtos. Estes fatores influem no desempenho do suporte, na conformação da enzima, na velocidade de transferência de massa e de reação intrínseca, e, portanto, afetam o comportamento da enzima imobilizada (DE CASTRO et al., 2008).

Segundo De Castro e colaboradores (2008) para a seleção de um suporte para uma determinada aplicação devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como as possibilidades relativas de regeneração do material.

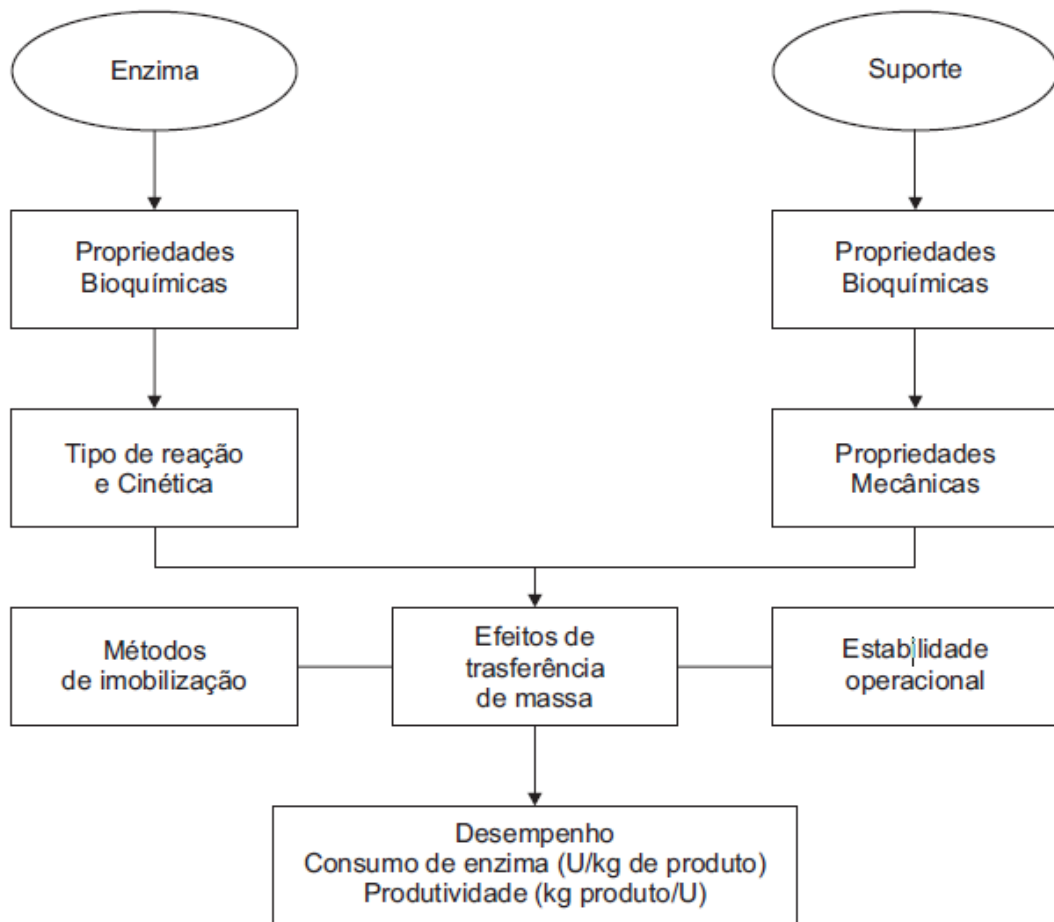


Figura 2.7 Interação entre suporte e enzima

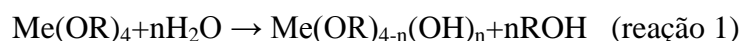
Fonte: DE CASTRO et al. (2008)

- Características Mecânicas: Diâmetro do poro, comportamento de compressão, tamanho da partícula; área superficial; volume acessível da matriz, resistência à compactação em operações de altas vazões para reatores de leito fixo; abrasão para reatores agitados e velocidade de sedimentação para leitos fluidizados.
- Características Morfológicas: Suportes não-porosos (baixa área superficial), porosos (grande área superficial), estrutura de gel
- Características Químicas: Composição e base química, grupos funcionais, estabilidade química, contribuições da superfície do suporte, tais como: os microefeitos (pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, efeito redutor e a presença de íons metálicos)

Entre os suportes que tem merecido atenção, destacam-se os polissiloxanos obtidos pela técnica sol-gel, que envolve a hidrólise e condensação de Si(OR)_2 em presença de um trialcóxissilano. Essa técnica tem sido utilizada, principalmente, para a imobilização da enzima lipase por apresentar boa retenção de atividade (AVNIR et al., 2006; NOUREDDINI; GAO, 2007)

O processo sol-gel pode ser facilmente reconhecido, pois trata de qualquer rota de síntese de materiais no qual em um determinado momento ocorre a transição de um sistema de um líquido “sol” (essencialmente coloidal) para sistema gel (sólido) (AVNIR et al., 2006; NOUREDDINI; GAO, 2007).

A química do processo sol-gel é baseada em reações de “polimerização” inorgânica. Esse processo é simples e envolve uma reação em três etapas. Na primeira etapa, hidrólise de um precursor alcóxido de um metal ou de um semi-metal leva a formação de um produto hidroxilado e o álcool correspondente:



Em seguida, ocorre uma condensação entre um grupamento não hidrolisado do alcóxido e uma hidroxila (reação 2) ou entre duas hidroxilas (reação 3) com formação de uma mistura coloidal chamada de “sol”:



Na terceira e última etapa, ocorre a policondensação entre os colóides seguidos de reticulação, formando uma rede tridimensional porosa e vítrea (AVNIR et al., 2006; NOUREDDINI; GAO, 2007). Os precursores mais comumente utilizados são os chamados alcóxidos metálicos, entre os quais, o mais estudado é o tetraetilortossilicato (TEOS) (Figura 2.8).

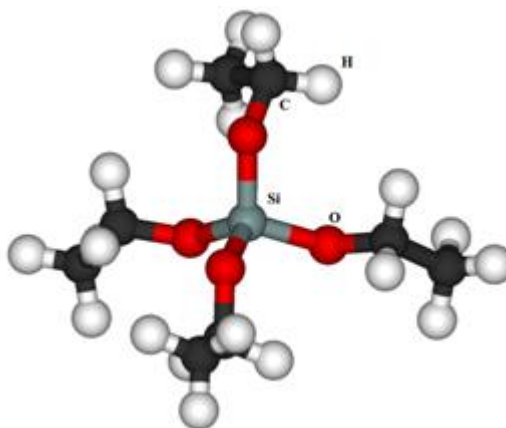


Figura 2.8 Estrutura do tetraetilortossilicato (TEOS)

A possibilidade de incorporação de um material orgânico em uma fase inorgânica é extremamente atraente para a preparação de suportes para a imobilização de enzimas de interesse industrial como lipases (SANTOS et al., 2008 a,b,c; PAULA et al., 2008; DA RÓS et al., 2010).

Diferentes compostos orgânicos têm sido empregados na síntese destas matrizes, porém os biopolímeros mostram-se promissores devido ao seu baixo custo, baixa toxicidade, biocompatibilidade, e propriedades multifuncionais (SANTOS et al., 2008 a,b,c; PAULA et al., 2008; DA RÓS et al., 2010). As matrizes híbridas contendo biopolímeros são atraentes materiais para dispositivos ópticos, filmes, lentes de contato, sensores, adsorventes e catalisadores (SMITHA et al., 2008).

A biocompatibilidade de precursores silanos como o TEOS, com diferentes biopolímeros tais como quitosana (SMITHA et al., 2008; SILVA et al., 2011a; MENDES et al., 2011b), celulose (XIE; YU; SHI, 2009), álcool polivinílico (SILVA et al., 2011b; FREITAS et al., 2011; PAULA et al., 2010; DA ROS et al., 2010; FREITAS et al., 2009; ; SANTOS et al., 2008a; SANTOS et al., 2008b; SANTOS et al., 2008c; PAULA et al., 2008; MOREIRA et al., 2007). e carragenana (SHCHIPUNOV, 2003) é reportada na literatura.

A matriz híbrida de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA), já consolidada no Laboratório de Biocatálise, combina os atributos físico-químicos de materiais inorgânicos e orgânicos, permitindo a manipulação da hidrofiliabilidade e hidrofobicidade, condutividade elétrica, carga iônica, porosidade e propriedades mecânicas em geral, bem como elevada atividade e estabilidade (MOREIRA et al., 2007; PAULA et al., 2008; SANTOS et al.,

2008 a,b,c; FREITAS et al., 2009; DA RÓS et al., 2010; FREITAS et al., 2010; PAULA et al., 2010; FREITAS et al., 2011; SILVA et al., 2011b).

Ozmen, Sezgin e Yilmaz (2009) utilizaram um suporte polimérico constituído de ciclodextrina ideal para imobilização de enzimas. Abbehausen et al. (2010) e Esmaili e Yazdanparast (2010) preparam matrizes híbridas da combinação de sílica e β -ciclodextrina. Assim a proposta do presente trabalho tem como base fazer uma matriz para imobilização de enzimas que possa ter características semelhantes ao SiO_2 -PVA, fazendo a substituição do álcool polivinílico pela β -ciclodextrina.

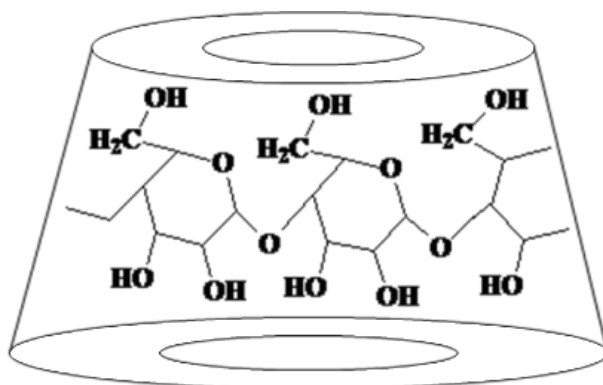
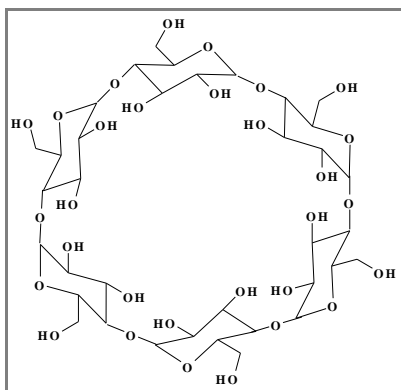
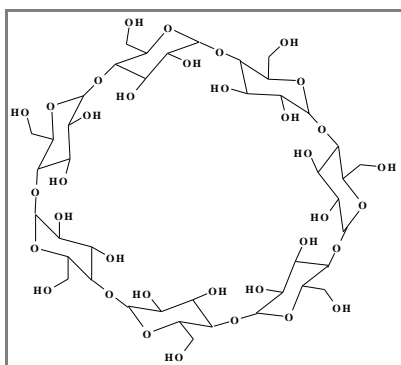
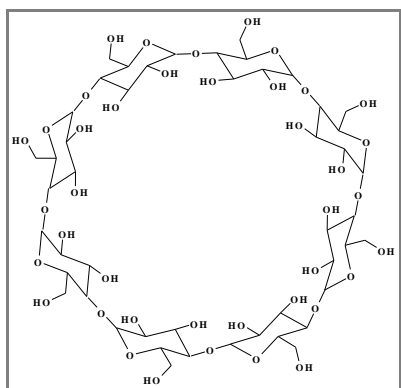


Figura 2.9 Representação da estrutura tronco-cônica invertida de uma CD

As ciclodextrinas (CD's) são oligossacarídeos cíclicos que possuem a forma tronco-cônica invertida, (Figura 2.9) com a superfície externa hidrofílica (hidroxilas primárias e secundárias) e a cavidade interna hidrofóbica (grupos C-H e oxigênios glicosídicos), permitindo que encapsulem, a nível molecular, uma variedade de moléculas orgânicas e inorgânicas (SZJETLI, 1990). As suas moléculas são formadas por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1-4. As CDs mais comuns são constituídas de 6, 7 ou 8 unidades de glicose, sendo denominadas de α CD, β CD e γ CD, respectivamente (Figura 2.10) (OZMEN; SEZGIN; YILMAZ, 2009).

 α -Ciclodextrina β -Ciclodextrina γ -Ciclodextrina**Figura 2.10** Representação esquemática das ciclodextrinas

Neste contexto a utilização de ciclodextrina como biopolímero para a síntese de matrizes híbridas pode ser uma opção promissora em função de suas propriedades físicas e químicas. Na literatura especializada não é muito reportada a sua aplicação para a obtenção de matrizes híbridas para imobilização de enzimas. O presente trabalho tem o intuito de sintetizar essa matriz, imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* (lipase PS), e aplicar este biocatalisador na síntese de produção de ésteres etílicos, o biodiesel. Este biocombustível tem sido largamente estudado e produzido com a finalidade de se ter uma alternativa de energia.

2.4 Biodiesel

2.4.1 Aspectos gerais

O esgotamento dos recursos fósseis e a crescente conscientização ecológica da sociedade têm conduzido à procura de combustíveis a partir de fontes renováveis como a biomassa vegetal. Outras fontes alternativas de energia como solar, eólica e energia obtida por clivagem de radioisótopos também tem sido intensamente estudadas. Todas estas fontes de energia renováveis contribuem para a redução da emissão de dióxido de carbono no ar atmosférico (ANTCZAK et al., 2009).

O biodiesel tem se tornado uma fonte promissora de fontes renováveis de combustível. No Brasil a produção deste biocombustível, tem crescido largamente nos últimos anos. A Figura 2.11 mostra a produção do biodiesel no país desde 2005, e como pode ser observado no gráfico em menos de 5 anos cresceu de aproximadamente 700 m³ para 1,6 milhões de m³ de biodiesel 100%.

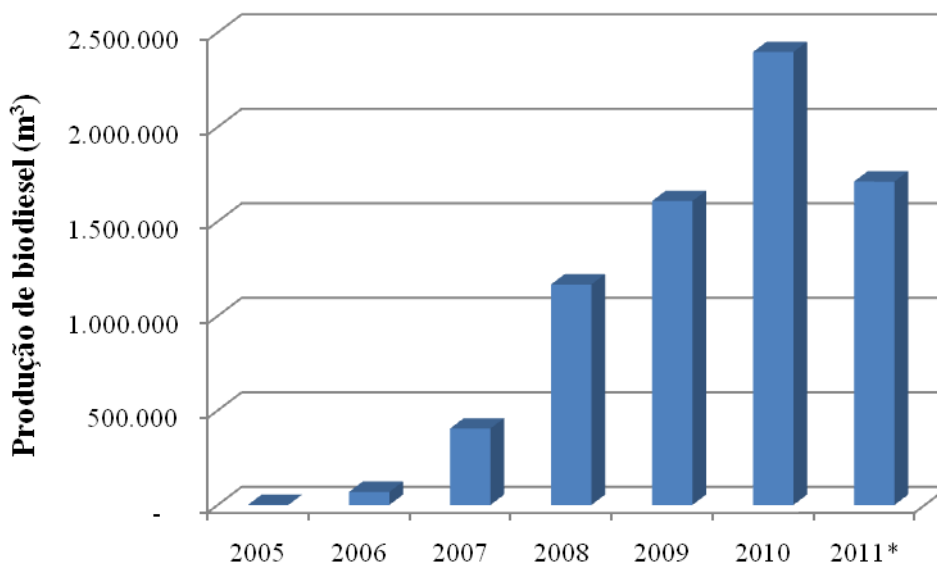


Figura 2.11 Produção anual de B100 (biodiesel 100%) no Brasil

Fonte: ANP, 2011 (*Até o mês de Agosto)

A história do biodiesel iniciou-se no século XIX, quando a companhia francesa Otto demonstrou o funcionamento de um pequeno motor diesel com óleo de amendoim em uma exposição em Paris. Nas décadas de 1930 a 1940, Rudolf Diesel deu sequência aos

estudos dos óleos vegetais em motores diesel (KNOTHE et al., 2006). Mas a utilização direta dos óleos vegetais como combustível não foi implementada e é impraticável para uso em longo prazo devido à alta viscosidade, baixa volatilidade, formação de ácidos graxos livres que resultam na formação de goma de oxidação, polimerização e deposição de carbono (ANTCZAK et al., 2009; RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUAR, 2008).

De acordo com Knothe et al. (2006) para adquirir propriedades, tais como viscosidade, semelhantes aos combustíveis fósseis, são utilizados quatro métodos: mistura de óleos vegetais com petrodiesel, pirólise, microemulsificação e transesterificação.

No entanto, a transesterificação tem sido o método mais utilizado, com intuito de melhorar as propriedades físicas dos combustíveis para o motor diesel. Os óleos vegetais, quando submetidos ao processo de transesterificação, reduzem os valores do ponto de névoa e viscosidade, assim o produto obtido, biodiesel, pode ser queimado diretamente em motores diesel sem necessidade de adaptação (FUKUDA, KONDO; NODA, 2001).

2.4.2 Reação de transesterificação

Na transesterificação (Figura 2.12), os óleos vegetais e gorduras animais reagem na presença de um catalisador homogêneo ou heterogêneo, com um álcool de cadeia curta para produzir ésteres alquílicos. Os óleos vegetais e gorduras animais têm na maior parte de sua composição os triacilgliceróis ou triglicerídeos (TAG), que são ésteres de ácidos graxos com glicerol (ou glicerina) (KNOTHE et al., 2006). Os álcoois mais empregados são o metanol e etanol (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007; PAULA et al., 2007; FREITAS et al., 2009; ANTCZAK et al., 2009).

Porém, a seleção do etanol como agente acilante em substituição ao metanol é função da vantagem oferecida pelo etanol no país, pois este é produzido em larga escala para ser misturado à gasolina, além de ser um produto obtido de fontes renováveis o que torna o processo de obtenção de biodiesel totalmente independente do petróleo, promovendo, assim, a produção de combustível completamente agrícola.

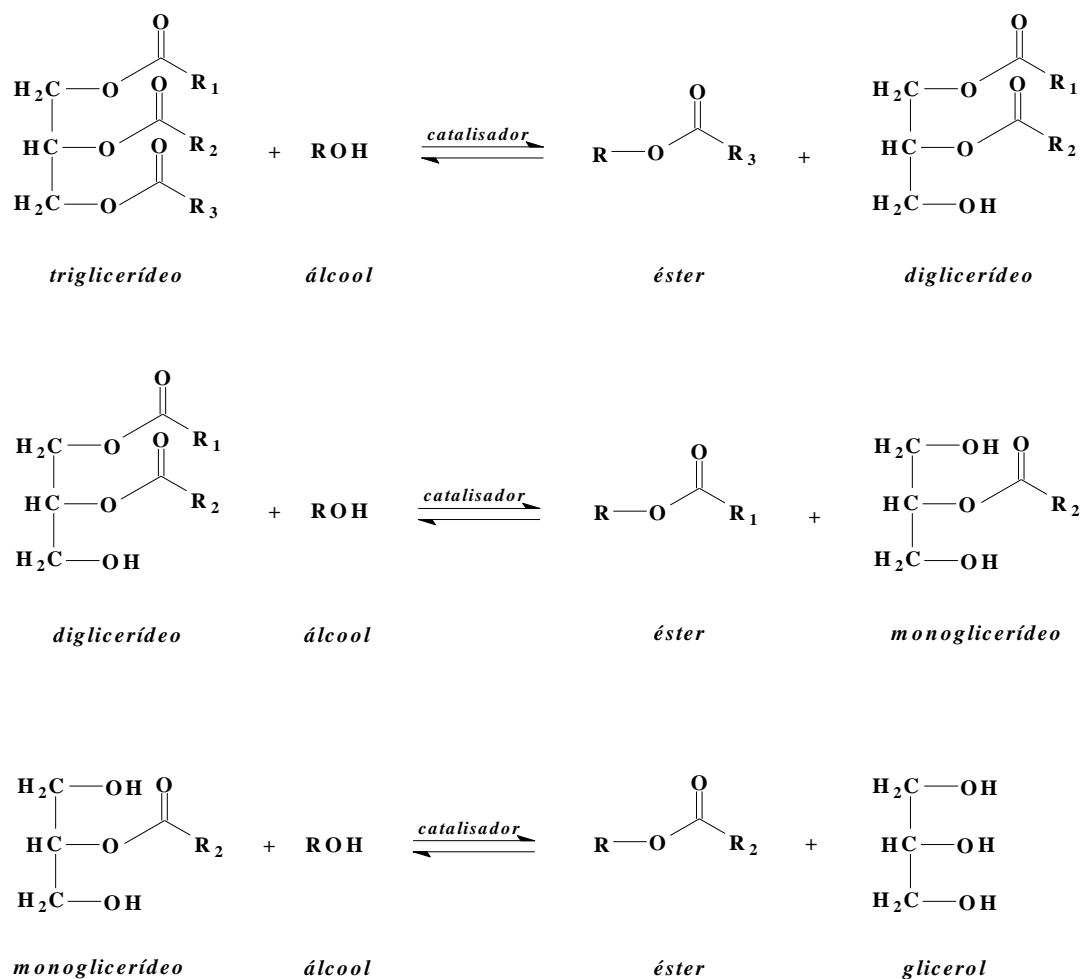


Figura 2.12 Esquema representativo das reações de transesterificação de óleos e gorduras

Destaca-se, que ainda existem algumas desvantagens técnicas existentes na produção do biodiesel pela rota etílica (mais lenta, maior consumo de álcool, maiores dificuldades de separação), mas que são compensadas pelas características do biodiesel etílico, tais como: gera menor opacidade na fumaça que o biodiesel metílico e sua temperatura de combustão é menor, significando, entre outras, uma redução nas emissões de NO_x (PENTEADO, 2005; FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009; GOG et al., 2012). Sendo assim, é válido e estratégico qualquer esforço para se aperfeiçoar a rota etílica de produção de biodiesel.

Os catalisadores usados na reação de transesterificação podem ser homogêneos ou heterogêneos. Os catalisadores homogêneos mais usados são: hidróxidos de sódio (NaOH), potássio (KOH), ou ainda metóxido de sódio (ANTCZAK et al., 2009).

Embora a produção do biodiesel por catalisadores homogêneos já esteja consagrada, ainda existem alguns problemas a ela associados que impedem a continuação de seu desenvolvimento, tais como a recuperação da glicerina e a necessidade do uso de óleos ou gorduras refinados como matéria-prima de origem. As desvantagens de se utilizar catalisadores homogêneos podem ser superadas pelo emprego de lipases como biocatalisadores para a síntese de ésteres. As vantagens da catálise incluem a habilidade de esterificar os ácidos graxos livres presentes tanto em acilgliceróis como na forma livre em uma única etapa; a produção de uma fração de glicerol com teor mínimo de água e pouco ou nenhum material inorgânico contaminante; e a possibilidade de reciclagem do catalisador. Os gargalos para o uso de catálise enzimática incluem o alto custo das lipases em comparação com os catalisadores homogêneos e a inativação das lipases por contaminação da matéria-prima por álcoois polares (KNOTHE et al., 2006).

2.4.3 *Matéria prima: óleo de babaçu*

Em relação ao aumento da produção de óleos vegetais, o Brasil possui em torno de 150 milhões de alqueires que poderão ser incorporados à produção agrícola, sendo 90 milhões referentes às novas fronteiras e 60 milhões às terras e pastagens. Essa área está distribuída em todo o território nacional e a produção de oleaginosa implica em fatores edafoclimáticos, onde o Brasil é bastante diverso neste aspecto. Diante disso, culturas como as de soja, milho, amendoim, girassol, mamona, babaçu e palma, poderão ser exploradas para fins de produção de biodiesel (LIMA et al., 2007).

O babaçu é uma fonte de biomassa sustentável no Nordeste e Centro-oeste do Brasil e tem um potencial significativo para a produção de biodiesel de cerca de 900 Kg/ha ano, além de ser possível aproveitar economicamente para produção de carvão, óleo combustível, gás, lubrificante e óleo comestível (TEIXEIRA; CARVALHO, 2007).

No que tange à produção de óleo combustível, o óleo de babaçu possui características excelentes resultados para produção de biodiesel, pois sua composição é predominantemente láurica (C12:0) (Tabela 2.5) Este fato facilita a reação de transesterificação, pois os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que interagem mais eficaz e efetivamente com o agente transesterificante e com o catalisador, de modo a se obter um produto, biodiesel, de excelentes características físico-químicas. (LIMA et al., 2007).

Tabela 2.5 Composição química do óleo de babaçu

Ácido graxo	Contribuição percentual
Ácido caprílico (C8:0)	5,0%
Ácido cáprico (C10:0)	6,0%
Ácido láurico (C12:0)	44,0%
Ácido mirístico (C14:0)	17,0%
Ácido palmítico (C16:0)	8,0%
Ácido esteárico (C18:0)	4,5%
Ácido oléico (C18:1)	14,0%
Ácido linoléico (C18:2)	2,0%

O principal produto do babaçu é o óleo da amêndoa, constituindo aproximadamente 65% do peso da amêndoa, esse óleo é subproduto para a fabricação de sabão, glicerina e óleo comestível, mais tarde transformado em margarina, e de uma torta utilizada na produção de ração animal e de óleo comestível. A partir da polpa da semente, o processo de obtenção do óleo pode ser obtido por processos tradicionais, seguido apenas da neutralização e purificação deste óleo onde através de uma reação de transesterificação com metanol ou etanol pode-se chegar ao biodiesel que é um combustível limpo e renovável apropriado para movimentar veículos ciclo diesel (TEIXEIRA; CARVALHO, 2007)

As práticas agrícolas adotadas no cultivo das espécies produtoras de biodiesel são aspectos determinantes das eficiências econômica e energética do processo de obtenção. Devido à diversidade climática e à grande extensão territorial, nove culturas são indicadas para a extração de biodiesel no país. A Tabela 2.6 lista as espécies consideradas potenciais pelo Ministério da Ciência e Tecnologia e o potencial produtivo de cada uma. De acordo com a Tabela 2.6, observa-se que a amêndoa do babaçu tem o maior teor de óleo (66%) dentre as oleaginosas apresentadas, além da palmeira ser produtiva todos os meses do ano.

Tabela 2.6 Características das principais oleaginosas do Brasil

Espécie	Nome científico	Origem do óleo	Teor de óleo (%)	Meses de colheita por ano
Dendê	<i>Elaeis guineensis</i> <i>L.</i>	Amêndoa	22	12
Côco	<i>Cocos nucifera</i> <i>L.</i>	Fruto	55-60	12
Babaçu	<i>Orbignya</i> <i>phalerata</i> <i>Mart</i>	Amêndoa	66	12
Girassol	<i>Helianthus annuus</i> <i>L.</i>	Grão	38 – 48	3
Canola	<i>Brassica napus</i> <i>L.</i>	Grão	40 – 48	3
Mamona	<i>Ricinus communis</i> <i>L.</i>	Grão	45 – 50	3
Amendoim	<i>Arachis hypogea</i> <i>L.</i>	Grão	40 – 43	3
Soja	<i>Glycine Max</i> (<i>L.</i>) <i>Merril</i>	Grão	18	3
Algodão	<i>Gossypum</i> <i>hirsutum</i> <i>L.</i>	Grão	15	3

O Nordeste brasileiro, por exemplo, possui uma área de cerca de 12 milhões de alqueires plantados com babaçu, sendo que a maior parte está concentrada no estado do Maranhão. Todo mês, são extraídas em torno de 140.000 t de amêndoas destes babaçuais. O babaçu é uma palmeira de até 20 m de altura, que é encontrada naturalmente no Brasil e na Colômbia. Os principais produtos são pequenos cocos, chamados de drupas que se fixam em cachos (Figura 2.13a), 4 por árvore por temporada, com 15-25 frutos de coco cada. Os frutos são elipsóides pesando 90-280 g. O fruto tem uma anatomia específica, o que o torna diferente dos cocos convencionais e da palma cultivada na Ásia (TEIXEIRA, 2008).

Externamente, ele tem uma fina casca que envolve uma camada de amido derivado (o mesocarpo), bem como um núcleo do côco há um endocarpo duro de madeira, com 3-4 sementes partir do qual o óleo de palma é extraído (Figura 2.13b). A porcentagem de cada componente do fruto varia de local para local. De acordo com a literatura a composição do babaçu é: 11% do epicarpo, 23% do mesocarpo, 59% do endocarpo e 17% da amêndoa (TEIXEIRA, 2008).

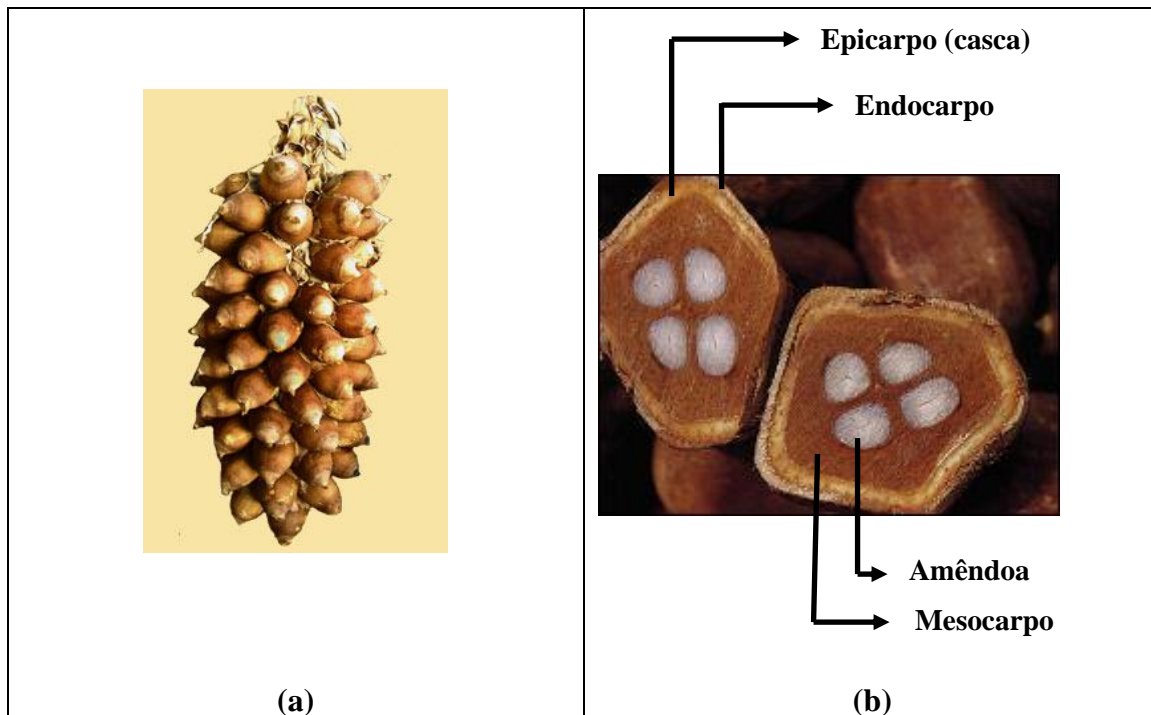


Figura 2.13 Cacho dos frutos de babaçu (a); corte transversal do babaçu (b)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Fonte de enzima

Foi utilizada a lipase microbiana comercial de *Burkholderia cepacia* (lipase PS), manufaturada pela Amano Pharmaceuticals e adquirida comercialmente da Sigma Co. (St. Louis, MO, USA).

3.1.2 Suportes de imobilização

Como suportes para imobilização do biocatalisador foram utilizados compostos híbridos de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO_2 -PVA) ou polissiloxano- β -ciclodextrina (SiO_2 - β CD) preparados pela técnica sol-gel adaptada do trabalho desenvolvido por Paula et al. (2008). Como precursores foram utilizados o tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Sigma e álcool polivinílico (PVA) 88% ou β -ciclodextrina (β CD) 98% adquiridos da Acros Organics. Os demais reagentes utilizados para a síntese dos suportes foram álcool etílico 95% (Fmaia) e HCl mínimo 36% (Isofar).

3.1.3 Substrato

O substrato utilizado na síntese do biodiesel foi constituído de etanol anidro 99,8% (Fmaia, Cotia, São Paulo) e óleo de babaçu refinado fornecido gentilmente pela Cognis (Jacareí, São Paulo, Brasil).

3.1.4 Outros reagentes

Outros reagentes utilizados foram: hexano (Cromoline), álcool butílico terciário (Vetec), polietilenoglicol MM1500 (Synth) e epiclorigrina 99% (Acros Organics); acetona (Fmaia), álcool etílico comercial, hidróxido de potássio 85% (Fmaia), indicador ácido-base (fenolftaleína - Coleman), goma arábica em pó pura (Vetec), óleo de oliva comercial com baixo teor de acidez (Carbonell), tampão fosfato de sódio $0,1\text{mol L}^{-1}$ e pH 7 e água

destilada. Foram utilizados também padrões cromatográficos (ésteres etílicos) previamente sintetizados por via química (URIOSTE et al., 2008).

3.2 Principais equipamentos

Os principais equipamentos utilizados foram: potenciômetro (Modelo TEC2, Tecnal), balança analítica (Modelo AY220, Shimadzu), placa com agitação magnética e controle de temperatura (Modelo 752A, Fisatom), moinho de facas (Modelo MA048, Marconi), bureta digital 50 mL (Hirshmann Techcolor), balança analítica, Karl Fisher (ID 50, Marte Mettler DL18, Titrator), microscópio eletrônico de varredura (Modelo LEO1450VP, Schott Zeiss do Brasil), difratômetro (Modelo XRD 6000, Shimadzu), rota evaporador (Modelo 801, Fisatom), viscosímetro (Modelo LVDVIIIICP-CP 520, Brookfield), centrífuga (Modelo 206 BL, Excelsa II, Fanem), Lavadora ultrassônica (Modelo USC 1800A UltraSonic Cleaner, Unique).

3.3 Metodologia experimental

3.3.1 Síntese dos suportes híbridos

Os compostos híbridos de SiO₂-PVA e SiO₂-βCD foram sintetizados segundo metodologia adaptada e descrita por Paula et al. (2008), baseada na mistura de 50 mL de tetraetilortossilicato (TEOS), 50 mL de etanol e 60 mL de uma solução de PVA 2% m/v ou 60 mL de solução de βCD 2% m/v. As misturas foram aquecidas a 60 °C, sob agitação, com adição de 1,0 mL de HCl concentrado. Após um período de incubação de 40 min, a preparação foi vertida em moldes de acetato e mantida por 48 h a temperatura ambiente até completa solidificação (formação da rede interpenetrada de SiO₂-PVA ou SiO₂-βCD). Os compostos foram então triturados em moinho de facas até que passasse completamente por uma peneira padrão série Tyler de 42 MESH e ficasse retido em peneira de 60 MESH.

3.3.2 Ativação dos suportes híbridos

Os suportes foram embebidos em solução 2,5% v/v do agente de ativação epicloridrina em tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹ e pH 7), na proporção massa de suporte: volume de

solução de 1:10, sendo esta mistura mantida sob agitação por 2 h à temperatura ambiente. Após este período, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada e solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹ e pH 7,0), e em seguida levado à estufa a 60 °C por 24 h (PAULA et al., 2008).

3.3.3 Imobilização da lipase PS nos suportes ativados

Os suportes previamente ativados de SiO₂-PVA ou SiO₂-βCD foram embebidos em hexano numa relação sólido: líquido de 1:10 e mantido sob agitação branda por 40 min. Após este período, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 250 mg de lipase PS na sua forma livre e 100 µL de solução aquosa contendo 5 mg mL⁻¹ de polietilenoglicol MM 1500 (PEG-1500). As suspensões contendo enzima e suporte foram mantidas sob suave agitação a temperatura ambiente por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a 4°C. Os derivados imobilizados foram recuperados por filtração a vácuo, seguido de sucessivas lavagens com hexano até a que umidade dos derivados imobilizados atingissem um valor de no mínimo 10% e no máximo 15%. O rendimento de imobilização (η%) foi calculado pela equação 3.1.

$$\eta \text{ (\%)} = \frac{U_s}{U_0} \quad \text{Equação 3.1}$$

Em que: U₀ = unidades de atividade oferecidas para imobilização; U_s= unidades de atividade enzimática total presente no suporte (atividade x massa seca).

3.3.4 Reação de transesterificação enzimática por agitação magnética

As reações de síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu e álcool etílico absoluto foram realizadas em reatores de vidro cilíndrico (40 mL) hermeticamente fechados, utilizando-se agitação magnética na temperatura de 45 °C e razão molar 1:7 (óleo de babaçu:etanol). As reações foram incubadas com as preparações de lipase PS imobilizada (em SiO₂-PVA e SiO₂-β-CD) com atividade enzimática de 500 U por grama de óleo. As reações foram conduzidas por um período máximo de 72 h e monitoradas pela retirada de alíquotas do meio reacional para dosagem dos ésteres etílicos formados.

3.3.5 Estudo da influência do ultrassom no pré-tratamento da lipase PS, na preparação do derivado imobilizado e nas reações de transesterificação

Um banho de ultrassom é um equipamento utilizado principalmente como lavadora de utensílios, como materiais cirúrgicos e vidrarias de laboratório. Trata-se de um método rápido, econômico e higiênico. A fim de estudar a eficiência desse equipamento em processos envolvendo biocatalizadores, nesse trabalho o equipamento da Unique, Modelo USC 1800 (Figura 3.1) foi utilizado no pré-tratamento da lipase PS, na preparação dos derivados imobilizados e nas reações de transesterificação mediadas pela PS imobilizada nas matrizes híbridas de SiO₂-PVA e SiO₂-βCD. O equipamento tem capacidade pra 3,8 L, frequência de 40 Hz, com variação de aquecimento de 30 a 65°C (± 5°C), dimensões de 300x151x100 mm, variação de potência de 30 a 100 W.

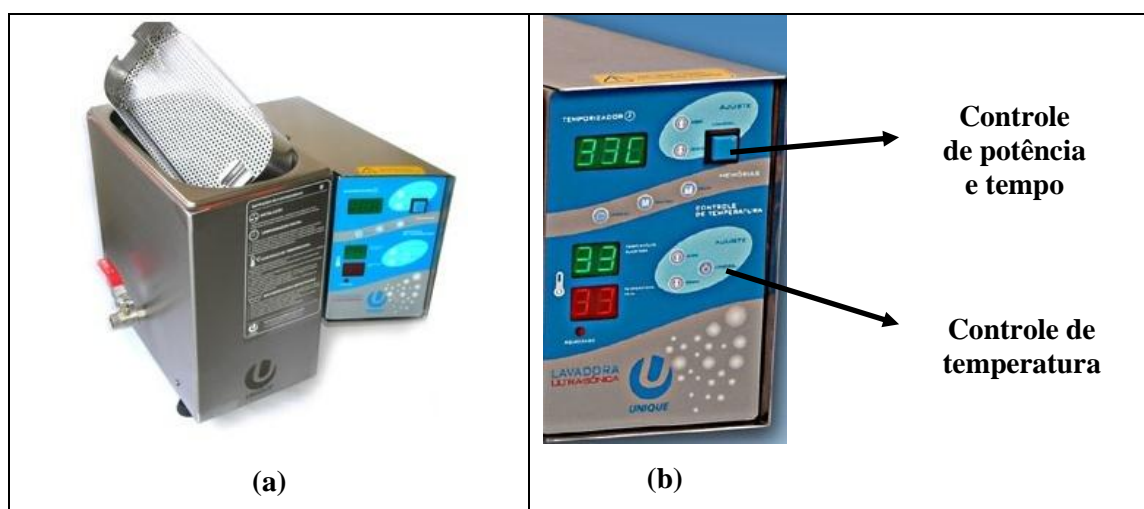


Figura 3.1 Banho de ultrassom (a) e Funções do Painel (b)

3.3.5.1 Pré-tratamento da lipase de *Burkholderia cepacia* (PS)

Foram desenvolvidos quatro métodos para estudar a influencia das ondas ultrassonoras nas etapas de pré-tratamento da enzima.

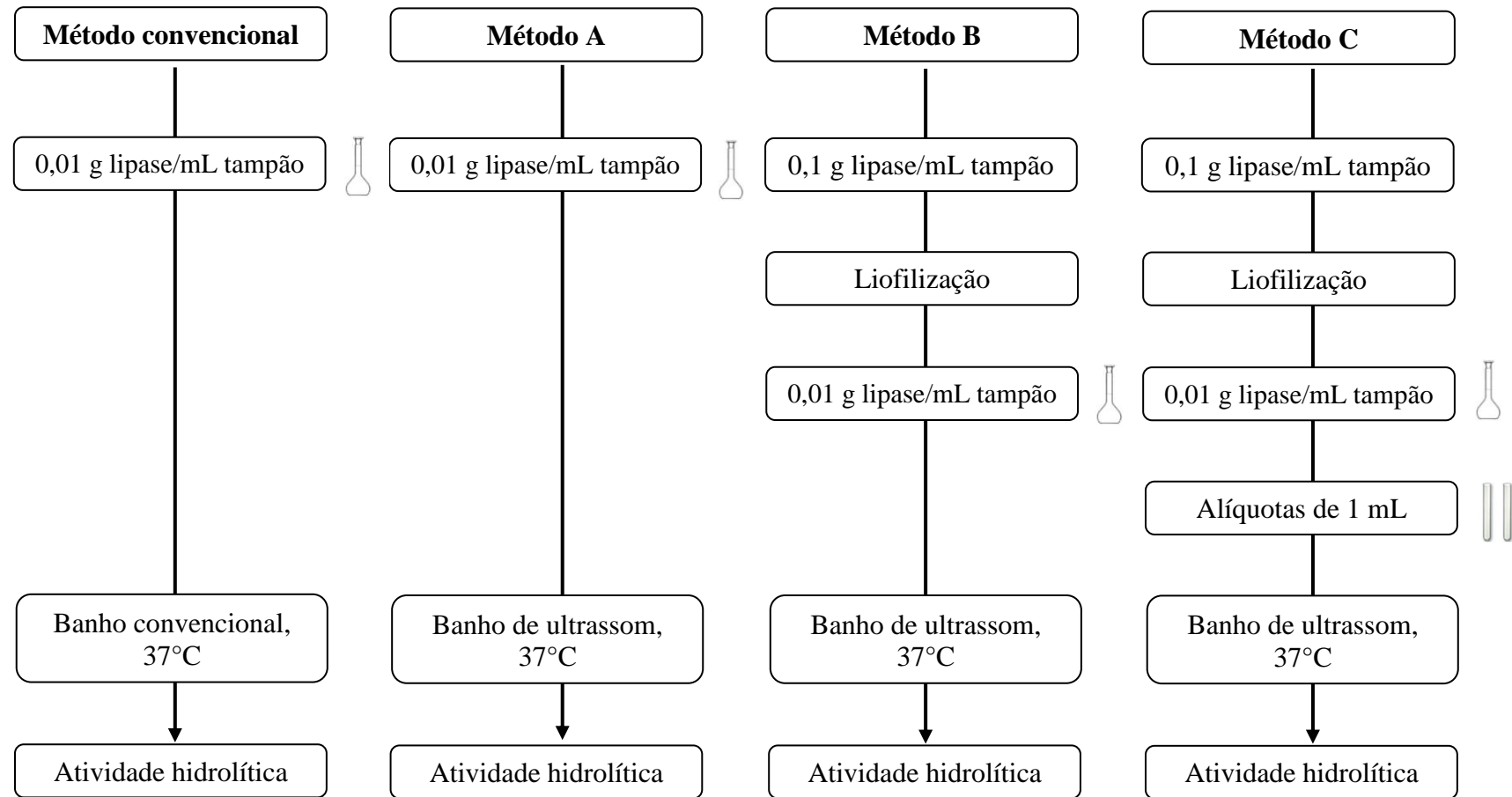


Figura 3.2 Esquema da metodologia utilizada na aplicação de ondas ultrassônicas no pré-tratamento de lipase PS

Método Convencional

Em um balão volumétrico de 50,0 mL foram dissolvidos 0,5 g de lipase de *Burkholderia cepacia* (PS) em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,0. O tratamento térmico foi realizado em um banho comum a temperatura de 37°C . O balão volumétrico foi colocado diretamente no banho, retirando-se alíquotas para acompanhamento de atividade hidrolítica nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 min de tratamento térmico. As atividades de hidrólise do azeite de oliva foram realizadas em triplicata com a incubação de 1,0 mL da solução enzimática.

Método A

Em um balão volumétrico de 50,0 mL foram dissolvidos 0,5 g de lipase de *Burkholderia cepacia* (PS) em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,0. O tratamento ultrassônico foi realizado usando o banho de ultrassom (Modelo USC 1800A UltraSonic Cleaner, Unique) a uma frequência de 40 kHz, com potência de 100W e temperatura de 37°C , de acordo com Shah e Gupta (2008) com as devidas adaptações. O balão volumétrico foi colocado diretamente no banho ultrassônico, retirando-se alíquotas para acompanhamento de atividade hidrolítica nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 min de tratamento ultrassônico. Para evitar elevação brusca de temperatura, a ultrassonicação de enzimas não deve ser conduzida continuamente. Assim foram realizados ciclos de 5 minutos de ultrassonicação seguidos de uma pausa de 10 minutos a cada ciclo. As atividades de hidrólise do azeite de oliva foram realizadas em triplicata com a incubação de 1,0 mL da solução enzimática devidamente sonicada.

Método B

Em 10 mL de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,0 foi dissolvido 1g de lipase de *Burkholderia cepacia* (PS), a solução foi então liofilizada por 12 h e em seguida armazenada a -4°C em um frasco totalmente fechado por 18 h. Em um balão volumétrico de 50,0 mL foram dissolvidos 0,5 g de lipase de *Burkholderia cepacia* (PS) liofilizada em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,0. O tratamento ultrassônico foi realizado usando o banho de ultrassom (Modelo USC 1800A UltraSonic Cleaner, Unique) a uma frequência de 40 kHz, com potência de 100 W e temperatura de 37°C , de acordo com Shah e Gupta (2008) com as devidas adaptações. O balão volumétrico foi colocado diretamente no banho

ultrassônico, retirando-se alíquotas nos tempos de 0, 30, 60, 90, 120 min de tratamento ultrassônico. Para evitar elevação brusca de temperatura, a ultrassonicação de enzimas não foi conduzida continuamente. Assim, foram realizados ciclos de 5 min de ultrassonicação seguidos de uma pausa de 10 minutos a cada ciclo. As atividades de hidrólise do azeite de oliva foram realizadas em triplicata com a incubação de 1,0 mL da solução enzimática devidamente sonicada.

Método C

Em 10 mL de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,0 foi dissolvido 1g de lipase de *Burkholderia cepacia* (PS), a solução foi então liofilizada por 12 h e em seguida armazenada a -4°C em um frasco totalmente fechado por 18 h. O tratamento ultrassônico foi realizado usando o banho de ultrassom (Modelo USC 1800A UltraSonic Cleaner, Unique) a uma frequência de 40 kHz, potência de 100 W e temperatura de 37°C , de acordo com Shah e Gupta (2008) com as devidas adaptações. As amostras liofilizadas foram colocadas separadamente em tubos de ensaio, retirando-se alíquotas de em um tempo total de 0, 30, 60, 90, 120 min de tratamento ultrassônico. Para evitar aumentos bruscos de temperatura, a ultrassonicação de enzimas não deve ser conduzida continuamente. Assim foram realizados ciclos de 5 min ultrassonicação seguidos de uma pausa de 10 min a cada ciclo. As atividades hidrolíticas de azeite de oliva foram realizadas em triplicata com a incubação de 1,0 mL da solução enzimática devidamente sonicada.

3.3.5.2 Preparação do derivado imobilizado

Foram realizados testes para comparar o processo de preparação de derivado imobilizado utilizando agitação magnética e ultrassom. O processo foi dividido em duas etapas: ativação do suporte e imobilização da enzima (preparação do suporte e imobilização). A ativação do suporte foi realizada pela adição de solução 2,5 % de epicloridrina em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7, na proporção 1:10 (agente de ativação:suporte). Para imobilização da lipase o suporte ativado foi inicialmente colocado em contato com hexano e em seguida foram adicionadas solução 5 mg mL^{-1} de PEG1500 e lipase, na proporção de 1g de suporte:100 μL de PEG1500:250 mg de enzima.

O processo de imobilização convencional é composto por ativação do suporte com epicloridrina por 2 horas sob agitação magnética seguida do contato do suporte ativado

com hexano por 40 min e adição do PEG1500 e enzima também sob agitação magnética por 2 horas. Com o objetivo de avaliar o efeito das ondas ultrassônicas na preparação do derivado imobilizado sem alterar suas características morfológicas e físico-químicas realizou-se um estudo com a redução do tempo envolvido em cada etapa. Os tempos e condições utilizados nas etapas de ativação e de imobilização estão mostrados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Tempos utilizados nas etapas de preparação do derivado imobilizado

Redução do tempo (%)	0%	50%	75%	87,5%	
Ativação	120 min	60 min	30 min	15 min	
Imobilização	Suporte + hexano	40 min	20 min	10 min	5 min
	Suporte + PEG + lipase	120 min	60 min	30 min	15 min

3.3.5.3 Reação de transesterificação enzimática

As reações de síntese de biodiesel, a partir do óleo de babaçu e álcool etílico absoluto, foram realizadas em enlenmeyers de 125 mL utilizando-se banho de ultrassom na temperatura de 45°C e razões molares 1:4, 1:7 e 1:10 (óleo de babaçu:etanol). As reações foram incubadas com preparações de lipase PS imobilizada em SiO₂-βCD com atividade enzimática de 500 U por grama de meio reacional. As reações foram conduzidas por um período de 12 h e monitoradas pela retirada de alíquotas do meio reacional para dosagem dos ésteres etílicos formados.

3.3.6 Purificação dos produtos formados na reação de transesterificação

Para a separação da glicerina liberada na síntese do biodiesel, o meio reacional foi submetido a uma etapa de purificação, constituída basicamente de lavagem com água destilada. O volume da amostra recolhido foi medido e em seguida adicionado o mesmo volume de água destilada. Essa mistura foi transferida para um funil de decantação, efetuando-se uma agitação e deixando a mistura em repouso por 30 min para a separação das fases. A fase superior composta pelos ésteres de etila (biodiesel) e a fase inferior por glicerol e água de lavagem. A fase inferior foi descartada e a fase superior submetida à

evaporação em rota-evaporador. Em seguida Sulfato de Sódio anidro foi adicionado à amostra para a retirada total de água.

3.4 Metodologias de análises

3.4.1 Caracterização dos suportes híbridos

3.4.1.1 Análises de superfície, tamanho e volume de poros (BET)

As medidas de área superficial foram realizadas por adsorção, usando nitrogênio como adsorbato. As amostras foram previamente degaseificadas abaixo de 50 mmHg a 100 °C por 2 horas e as análises foram realizadas a 77 K, usando nitrogênio líquido. A área superficial foi calculada pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller). O volume do poro e a área superficial específica com base no cálculo de BJH (Barrett, Joyner e Halenda) foram avaliados pelo software BET (NOVA Quantachrome 1200) (SANTOS et al., 2008; ÁVILA; CRNKOVIC; MILIOLI, 2010).

3.4.1.2 Difração de raio-X (DRX)

Os suportes híbridos de SiO₂-PVA e SiO₂-β-CD puros e ativados com epicloridrina foram submetidos à análise de difratometria de raios-X. As amostras foram colocadas sobre o suporte de alumínio e as análises realizadas em intervalo angular de 10 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 40 kV e uma corrente de 30 mA. A radiação utilizada foi CuKα com monocromador de grafite e comprimento de onda de 1,5418 Å.

3.4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas com a finalidade de verificar alterações conformacionais nos diferentes suportes puros e ativados com a inserção agente de ativação (epicloridrina). Micrografias das superfícies das

amostras foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura da marca LEO, modelo 1450 VP com EDS acoplado.

3.4.2 Caracterização dos derivados imobilizados

3.4.2.1 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade enzimática da lipase nas formas livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH (0,025 mol L⁻¹) utilizando fenolftaleína como indicador. Para a lipase livre foi empregado 1,0 mL de solução enzimática (2 mg de enzima por mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0) e 0,05g dos derivados imobilizados. Os cálculos foram realizados utilizando a equação 3.2 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação (U g⁻¹), nas condições do ensaio.

$$\text{Atividade (U g}^{-1}\text{)} = \frac{(V_A - V_B) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot m} \quad \text{Equação 3.2}$$

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

3.4.2.2 Teor de umidade

Os teores de água nos suportes, nos derivados imobilizados e na lipase livre foram medidos diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (Marte ID 50) durante 15 min a 100 °C.

3.4.2.3 Parâmetros cinéticos

Para o cálculo da constante de Michaelis-Menten foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variáveis, obtidos através de emulsões preparadas em diferentes proporções de azeite de oliva (10%, 20%, 30%, 40% e

50%) e solução aquosa de goma arábica (7% m v⁻¹). As análises foram conduzidas em meio tamponado a pH 7,0 e temperatura de 37°C.

As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisadas pela lipase de *Burkholderia cepacia* livre e pelos derivados imobilizados em SiO₂-PVA e SiO₂-βCD preparados por agitação magnética e por ultrassom foram determinadas de acordo com a metodologia de hidrólise do azeite de oliva já descrita anteriormente. As constantes cinéticas K_m e V_{max} foram determinadas pelo Programa Enzfitter versão 1.05 publicado pela Elsevier-Biosoft, 1987.

Os parâmetros cinéticos foram determinados considerando-se a cinética de Michaelis-Menten e ajustando os dados experimentais de acordo com a Equação 3.3.

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação 3.3}$$

Em que V₀=Velocidade inicial de reação, V_{max}=Velocidade máxima de reação, [S]=Concentração do substrato, K_m=Constante de Michaelis-Menten

3.4.2.4 Estabilidade térmica

O efeito da temperatura na estabilidade da lipase PS imobilizada nos suportes SiO₂-PVA e SiO₂-βCD foi analisada por meio da incubação em 4 mL de heptano das amostras dos derivados imobilizados (0,05 g) numa temperatura de 60 °C. Depois de diferentes períodos de incubação (0, 5, 1, 2, 3 e 4 h), o excesso de heptano foi descartado e imediatamente determinado a atividade residual a 37 °C, pela adição de 5 mL de substrato preparado (emulsão do azeite de oliva/ água) e 4 mL de tampão fosfato pH 7,0, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). As constantes de inativação K_d (h⁻¹), foram calculadas pela equação 3.3.

$$\ln A = \ln A_0 - K_d \cdot t \quad \text{Equação 3.4}$$

Em que: A₀ = atividade enzimática inicial; A = atividade residual após tratamento térmico durante um certo período de incubação (t).

As Figuras 3.3 e 3.4 mostram os esquemas representativos da formação da PS imobilizada em SiO_2 -PVA e SiO_2 - β CD, respectivamente.

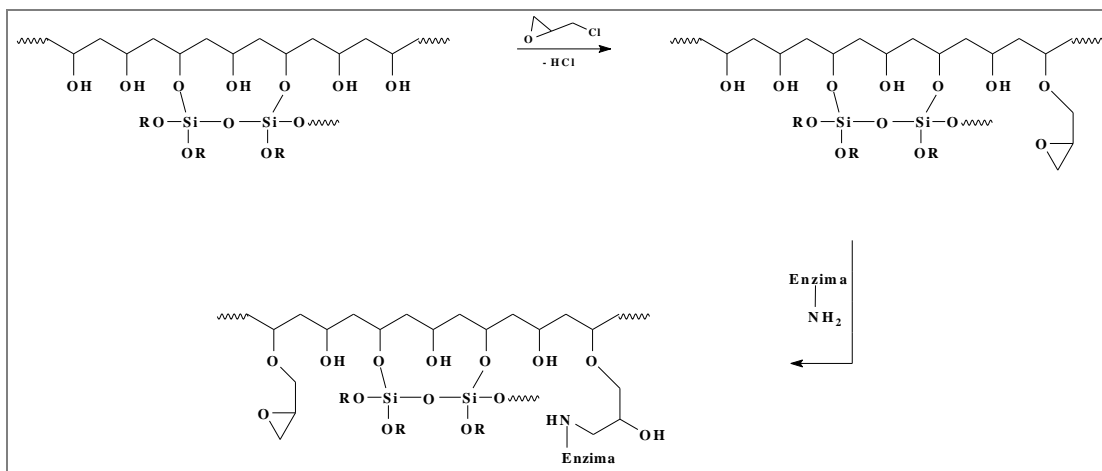


Figura 3.3 Esquema representativo da formação da PS imobilizada em SiO_2 -PVA
Fonte: SANTOS et al., 2008

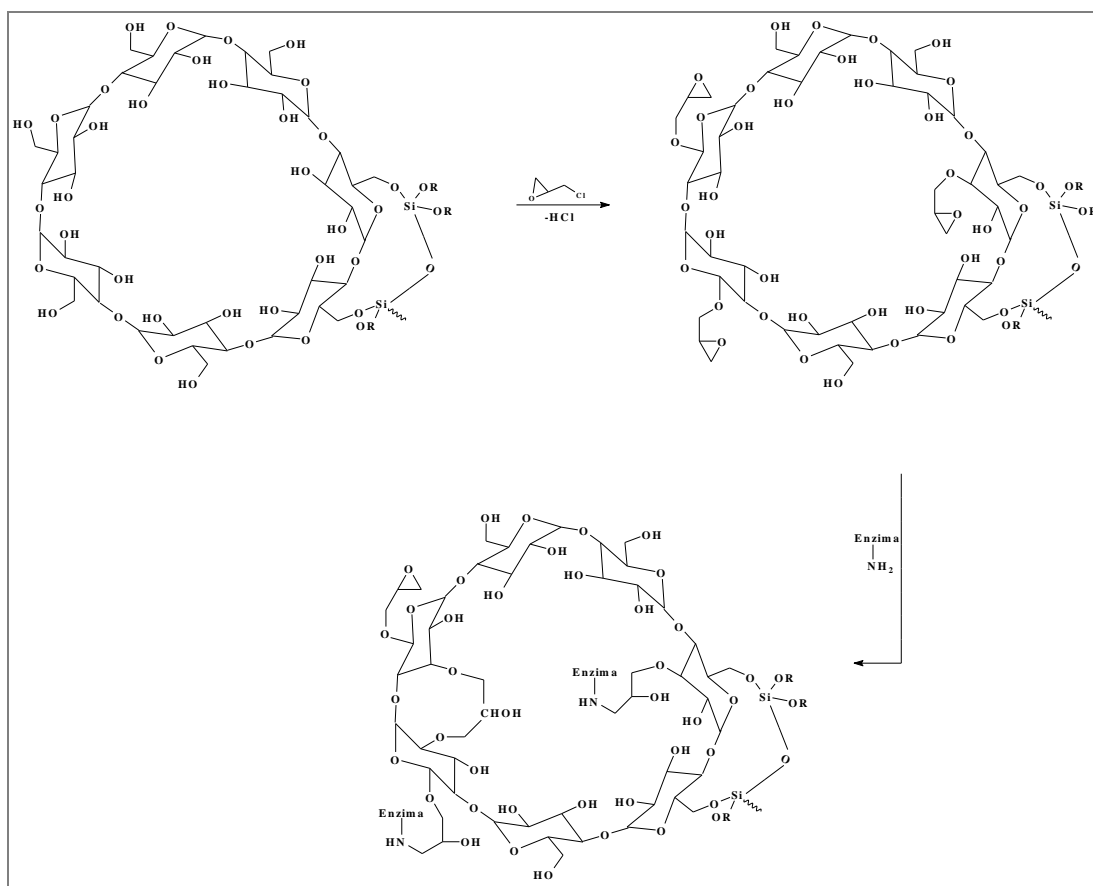


Figura 3.4 Esquema representativo da formação da PS imobilizada em SiO_2 - β CD

3.4.2.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria (TGA/DTG) foi realizada em uma termobalança da marca SEIKO, modelo TG/DTA 6200. Esta técnica possibilita determinar a variação de massa resultante em função da temperatura ou tempo, fornece informações sobre a composição e estabilidade térmica da amostra. As análises foram realizadas na faixa de temperatura entre 30 e 800°C a uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ sob atmosfera de nitrogênio. Foram utilizadas aproximadamente 10 mg de cada amostra (SiO₂-βCD puro, SiO₂-βCD ativado com epícloridrina e lipase PS pura e imobilizada em SiO₂-βCD).

3.4.3 Caracterização do biodiesel

3.4.3.1 Determinação dos ésteres formados e cálculo do rendimento de transesterificação

Para a análise dos monoésteres de ácido graxo empregou-se um Cromatógrafo de fase gasosa Varian – Modelo CG 3800 equipado com uma coluna de aço inoxidável empacotada (5%DEGS CHR-WHP 80/100 6ft 2.0mmID 1/8inOD, RESTEK 80/100) e detector de ionização em chama (FID). A temperatura do detector foi fixada em 230°C e a do injetor em 190°C. O Nitrogênio foi usado como gás de arraste num fluxo de 25 mL min⁻¹. Os fluxos dos gases de arraste para chama de ionização foram: 30 mL min⁻¹ de H₂ e 300 mL min⁻¹ de ar sintético. A temperatura da coluna inicialmente foi mantida a 120 °C por 15 minutos e em seguida aquecida numa taxa de 25°C min⁻¹, até 170 °C, permanecendo nessas condições por 26 min. O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (M_t) em relação à massa teórica esperada de ésteres de etila (M_e). M_e foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial do óleo de babaçu (M₀), da massa molecular correspondente a cada ácido (MM_a) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela equação 3.5 (a), em que M₀ corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (C_a), com a massa inicial de óleo utilizada (Mi) equação 3.5 (b). O rendimento foi calculado dividindo a massa total de ésteres determinada pela análise de cromatografia gasosa (Mt) pela massa teórica de ésteres de etila (Me), conforme mostrado na equação 3.5 (c).

$$M_e = \frac{(M_0 \cdot MM_e)}{MM_a} \quad (a) \quad M_0 = C_a \cdot M_i \quad (b) \quad R = \frac{M_i}{\sum M_e} \cdot 100 \quad (c) \quad \text{Equação 3.5}$$

3.4.3.2 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 em duplicata a 50°C.

3.4.3.3 Densidade

Os valores de densidade foram determinados utilizando um densímetro digital Modelo DMA 35n EX (Anton Paar). As medidas foram feitas a 15°C, empregando-se 2,0 mL da amostra.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do suporte híbrido

4.1.1 Análise textural

As características texturais derivadas dos experimentos de adsorção/desorção dos suportes de SiO₂-βCD e SiO₂-PVA pelo método BET estão apresentadas na Tabela 4.1.

Observa-se que os valores de área superficial específica, volumes específicos de poros e diâmetro médio de poros do suporte híbrido de ciclodextrina (SiO₂-βCD) são valores próximos aos do suporte de SiO₂-PVA. Dessa forma, em termos de propriedades texturais, conclui-se que o suporte de ciclodextrina pode ser uma alternativa promissora para imobilização de enzimas em substituição ao SiO₂-PVA, já utilizado no Laboratório de Biocatálise com regular sucesso.

Tabela 4.1 Área superficial específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para as matrizes de SiO₂-βCD e de SiO₂-PVA

Suportes	Área superficial específica (m ² g ⁻¹)	Volume específico de poro (cm ³ g ⁻¹)	Diâmetro médio de poro (Å)
SiO ₂ -βCD	442,0	0,1550	28,221
SiO ₂ -PVA	486,4	0,3463	28,483

4.1.2 Difração de Raio-X (DRX)

Os dados de difração de Raio-X fornecem informações importantes sobre a estrutura de qualquer material a nível atômico. Trata-se de uma técnica não destrutiva, que apresenta, entre outras vantagens a realização de determinação multielementares simultâneas, a possibilidade de análise qualitativa e quantitativa e que permite analisar amostras sólidas e líquidas (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMOLRA, 2001).

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, 1978).

Os difratogramas de raios X dos suportes puros e ativados estão apresentados nas Figuras 4.1 (a) e (b).

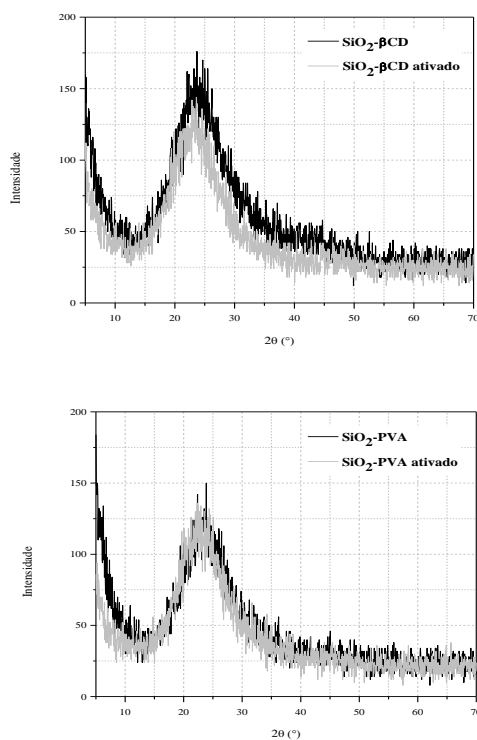


Figura 4.1 Difratogramas dos suportes de SiO₂-βCD e SiO₂-PVA puros e ativados

A βCD é cristalina e apresenta difrações principais em 12°, 18° e 19° (2θ) (UYAR et al., 2009); o halo de maior intensidade é o de 12° (2θ). Igualmente cristalino é o PVA apresentando picos característicos de cristalinidade em 19,35°, 22,4° e 40,28° (2θ) apresentando o halo de maior intensidade em 19,35° (2θ) (COSTA Jr ; MANSUR, 2008). Os difratogramas obtidos a partir dos suportes SiO₂-βCD e SiO₂-PVA apresentam picos de baixa intensidade e com expressiva largura em 24° e 23° (2θ) respectivamente, indicando formação de estruturas predominantemente amorfas pela presença da sílica (KIM et al., 2004). 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). Considera-se, uma distribuição homogênea do componente orgânico na matriz inorgânica não permitindo a formação de agregados de enzima (ABBEHAUSEN et al., 2011).

No caso do híbrido constituído de β CD, objeto desse trabalho, essa distribuição homogênea pode ser atribuída ao grande número de hidroxilas por unidade de área, encontrado nesse material. Essas hidroxilas são as responsáveis diretas pela compatibilidade do biopolímero com a matriz inorgânica por meio de pontes de hidrogênio (POLARZ et al., 2001). De maneira similar, a homogeneidade do suporte SiO_2 -PVA é promovida pela presença do catalisador ácido presente na síntese do híbrido (KOTOKY; DOLUI, 2004). De acordo com Sharp (1995), esse ácido é o responsável direto pela formação de um número significativo de pontes de hidrogênio entre os polímeros e pelo desenvolvimento da rede tridimensional do polisilicato.

A análise dos resultados revela que o precursor silano apresentou boa miscibilidade com os biopolímeros, corroborando com o esquema de preparação e ativação dos suportes híbridos. Neste sentido os materiais interagem por ligação covalente, por interação iônica e pontes de hidrogênio (FAN et.al., 2006).

Depois de ativados ambos os suportes híbridos apresentaram difratogramas semelhantes aos suportes puros, permitindo considerar que a ativação não modificou a estrutura do material.

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens micrografadas dos suportes híbridos puros e ativados com epícloridrina são mostradas nas Figuras 4.2 (a, b, c e d). Pode ser observado que a presença do agente de ativação não provocou alteração morfológica dos materiais híbridos, condição essencial para a imobilização por ligação covalente. Os suportes ativados (Figura 4.2 b e d) possuem forma irregular, homogeneidade nos tamanhos das partículas e porosidade satisfatória (avaliada no item 4.1.1). Tais características são auxiliares na estabilização da imobilização da lipase.

Mais uma vez, o suporte híbrido de SiO_2 - β CD mostra propriedades semelhantes ao SiO_2 -PVA, constituindo-se em uma matriz promissora para o processo de imobilização.

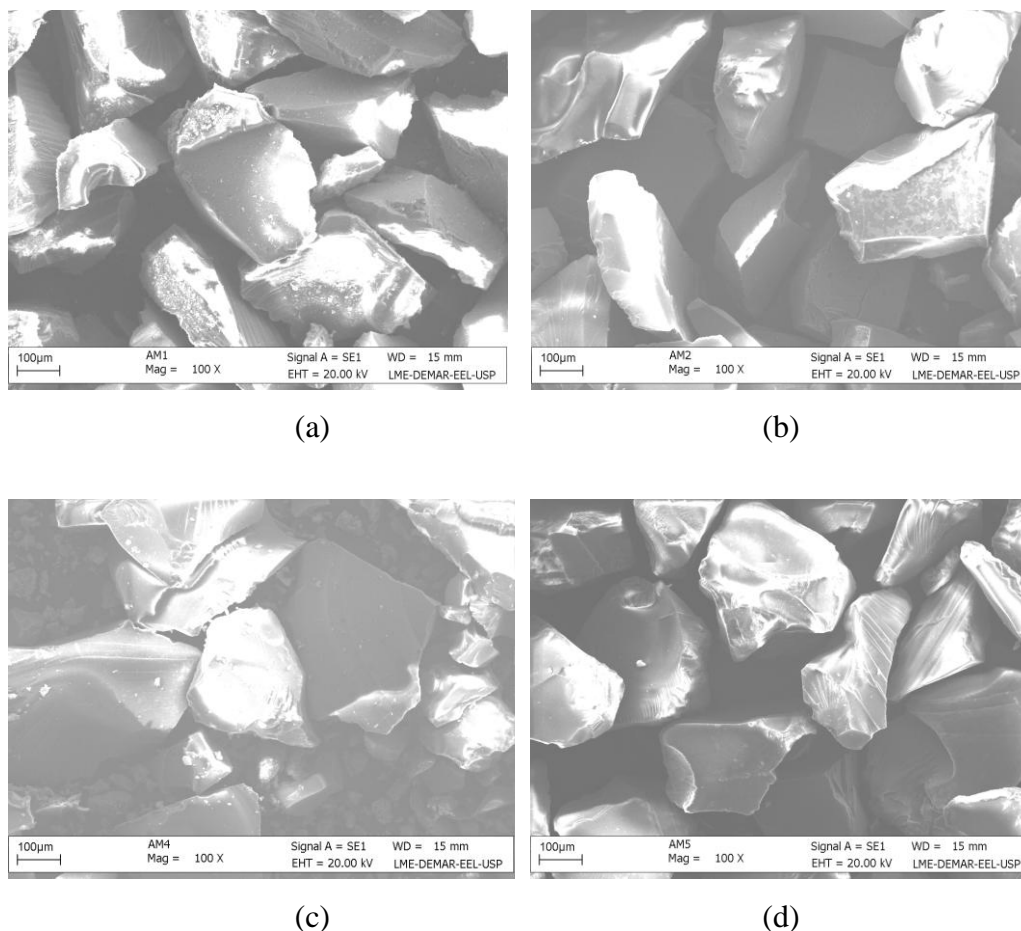


Figura 4.2 Microscopia eletrônica de varredura dos suportes híbridos de SiO_2 - β CD e SiO_2 -PVA puros(a, c) e ativados (b, d), respectivamente

4.2 Caracterização do derivado imobilizado

4.2.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria (TGA) é uma técnica na qual a variação da massa de uma substância é medida em função da temperatura ou tempo enquanto a substância é submetida a uma programação controlada de temperatura. A análise dos dados fornece informações sobre possíveis mudanças conformacionais e estabilidade térmica do material analisado. Os resultados são apresentados sob forma de curvas termogravimétricas (TGA's) e termogravimétricas diferenciais (DTG's), em que a primeira derivada de cada curva de TGA é plotada em relação à temperatura ou tempo. Os resultados de TGA para os híbridos, lipase livre e derivados imobilizados estão apresentados nas Figuras 4.3 a 4.6.

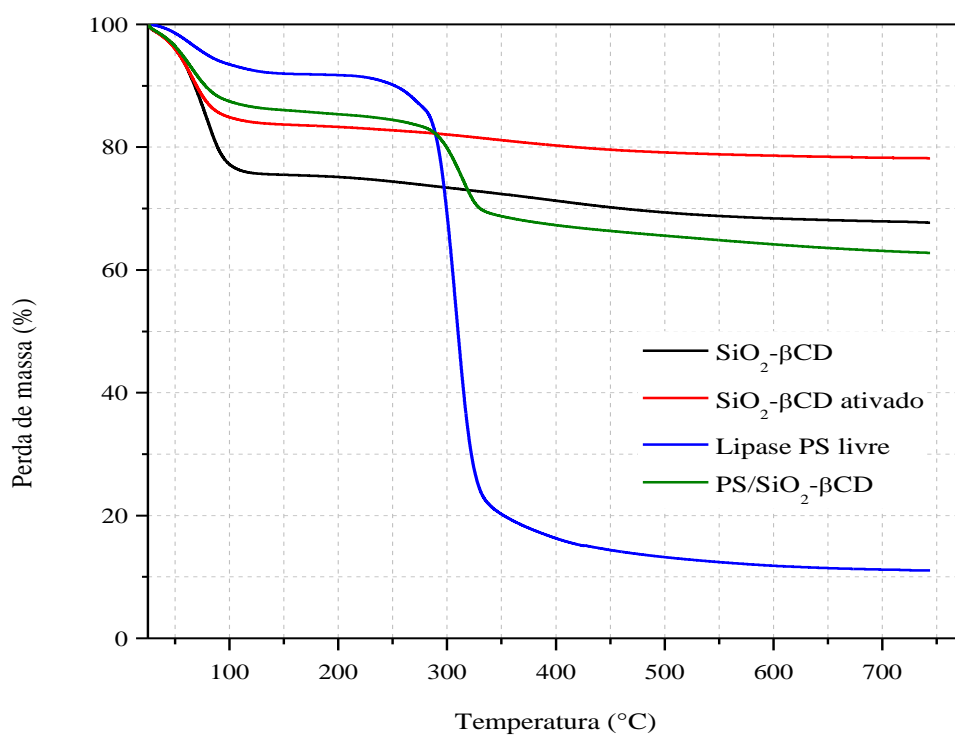


Figura 4.3 Curvas de TGA do suporte SiO₂-βCD puro e ativado, lipase PS livre e derivado imobilizado PS/SiO₂-βCD.

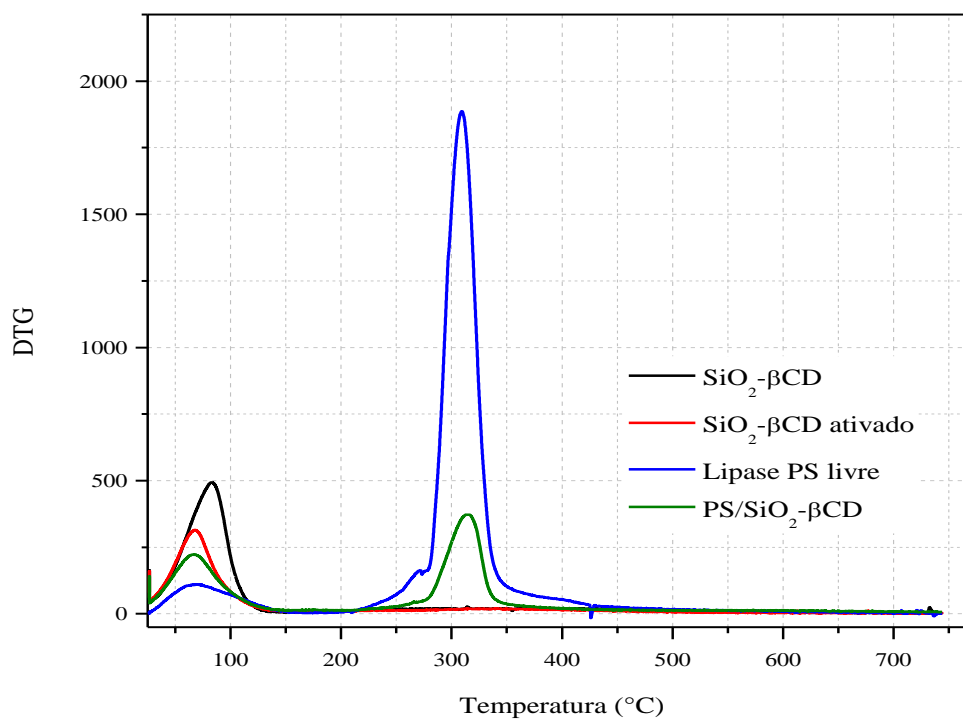


Figura 4.4 Curvas de DTG do suporte SiO₂-βCD puro e ativado, lipase PS livre e derivado imobilizado PS/SiO₂-βCD.

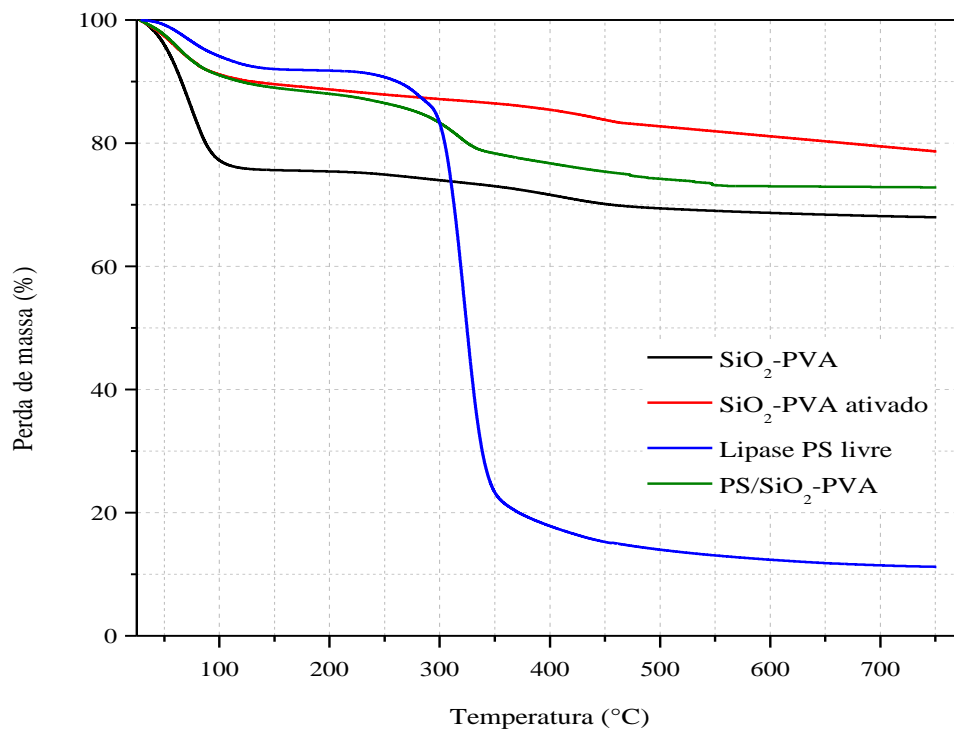


Figura 4.5 Curvas de TGA do suporte SiO₂-PVA puro e ativado, lipase PS livre e derivado imobilizado PS/SiO₂-PVA.

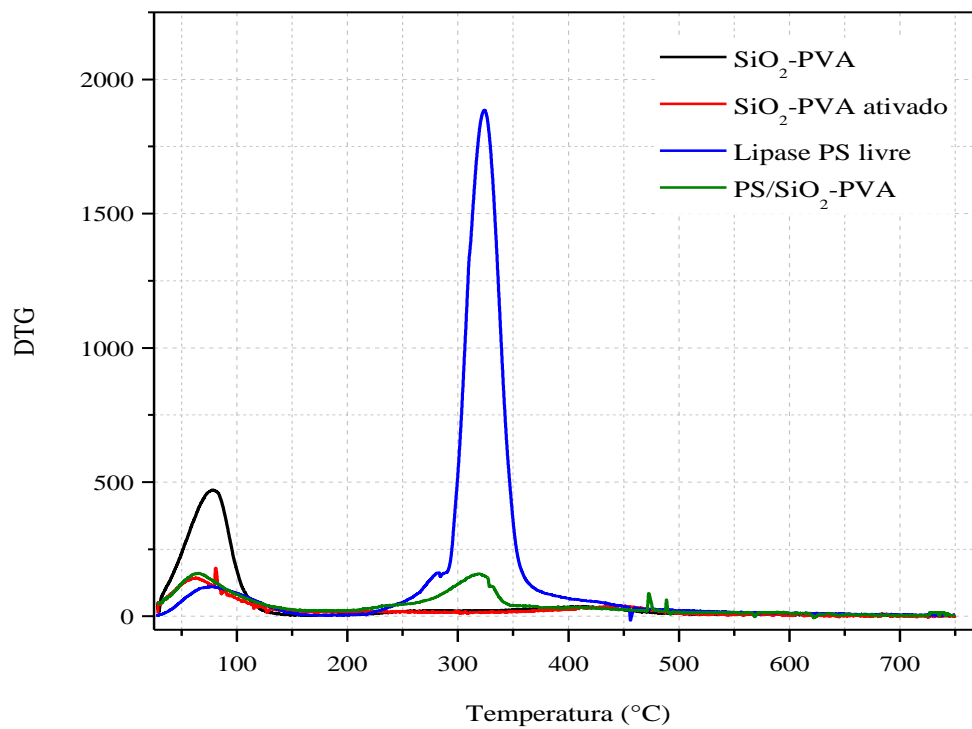


Figura 4.6 Curvas de DTG do suporte SiO₂-PVA puro e ativado, lipase PS livre e derivado imobilizado PS/SiO₂-PVA.

A lipase livre apresentou dois eventos térmicos, o primeiro em torno de 100°C (perda de água) e o segundo em torno de 300°C atribuído à decomposição de agentes estabilizantes presente na preparação da lipase (SILVA et al. 2011).

O suporte puro de SiO₂-βCD apresenta dois eventos térmicos respectivamente nas temperaturas de 95 e 328°C. O primeiro evento é atribuído à perda de água e o segundo pode estar relacionado com a parte orgânica do híbrido, a βCD. Segundo Trotta et al. (2000), há um efeito acentuado da estrutura das ciclodextrinas sobre sua estabilidade térmica. A αCD apresenta temperatura de degradação em 297°C, a γCD em 293°C e a βCD em torno de 314°C. O suporte ativado apresentou eventos em 86 e 315°C. Embora os eventos tenham ocorrido praticamente nas mesmas temperaturas, observa-se nos eventos, discreta diminuição de perda de massa. Essa menor perda de massa pode ser atribuída à reticulação adicional após a etapa de ativação. O derivado imobilizado apresentou diminuição de perda de massa num evento térmico por volta de 300°C, por conta de sua provável ligação covalente ao suporte mediada pelo agente de ativação (epicloridrina).

4.2.2 Difração de raio X (DRX)

Os difratogramas de raios X dos derivados imobilizados PS/SiO₂-βCD e PS/SiO₂-PVA estão apresentados nas Figuras 4.7 (a) e (b) respectivamente. A lipase livre é altamente cristalina apresentando difrações principais em 21,9° e 36,5° (2θ) (SILVA et al. 2011). Conforme já mencionado, βCD é cristalina e apresenta difrações principais em 12°, 18° e 19° (2θ) (UYAR et al., 2009) e o PVA também apresenta estrutura cristalina, com picos característicos de cristalinidade em 19,35°, 22,4° e 40,28° (2θ) (COSTA Jr e MANSUR, 2008). Os derivados imobilizados apresentaram-se amorfos com picos de difração de baixa intensidade e com expressiva largura em 22,5° e 23° (2θ) respectivamente, confirmando a distribuição homogênea da βCD e do PVA na matriz inorgânica e conseqüentemente da lipase nos derivados imobilizados (ABBEHAUSEN, et al., 2011).

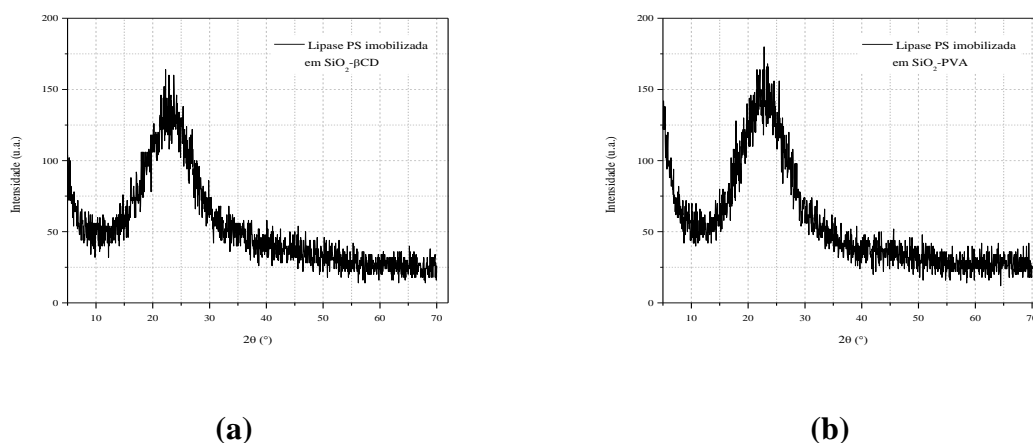


Figura 4.7 Difratogramas dos derivados imobilizados PS/SiO₂-βCD (a) e PS/SiO₂-PVA (b)

4.2.3 Rendimento de imobilização

Os suportes ativado foram carregados com 250 mg de lipase PS por grama de suporte, correspondendo a 14636,75±1011,04 unidades de atividade por grama de enzima. A Tabela 4.2 apresenta os dados de atividade hidrolítica dos derivados imobilizados, bem como os rendimentos de imobilização obtidos para cada tipo de suporte.

Tabela 4.2 Atividade hidrolítica, umidade dos derivados imobilizados e rendimento de imobilização

Derivado imobilizado	Atividade hidrolítica (U g ⁻¹)	Umidade (%)	Rendimento de imobilização (%)
PS/SiO ₂ -βCD	1696,22±95,66	11,88	46,36
PS/SiO ₂ -PVA	1716,13±169,78	11,86	46,59

Estes resultados mostram que apesar da diferente conformação estrutural da βCD em relação ao PVA, ambos os suportes híbridos apresentaram a mesma disponibilidade para acomodar as lipases (avaliado em 4.1), tanto que os dados de atividade hidrolítica e rendimento de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-βCD e SiO₂-PVA foram similares, como mostrados na Tabela 4.2.

4.2.4 Parâmetros cinéticos

A partir das curvas de atividade hidrolítica em função da concentração de substrato, foram obtidos os parâmetros cinéticos K_m (mmol L^{-1}) e V_{max} (U g^{-1}) para cada uma das preparações em estudo. Os resultados obtidos sugerem que as atividades hidrolíticas da enzima livre e imobilizada em função da concentração do substrato seguem a cinética de Michaelis-Menten, indicando que na faixa de concentração estudada (10% a 50% de azeite de oliva) não se detectou uma possível inibição pelo produto formado (APÊNDICE A).

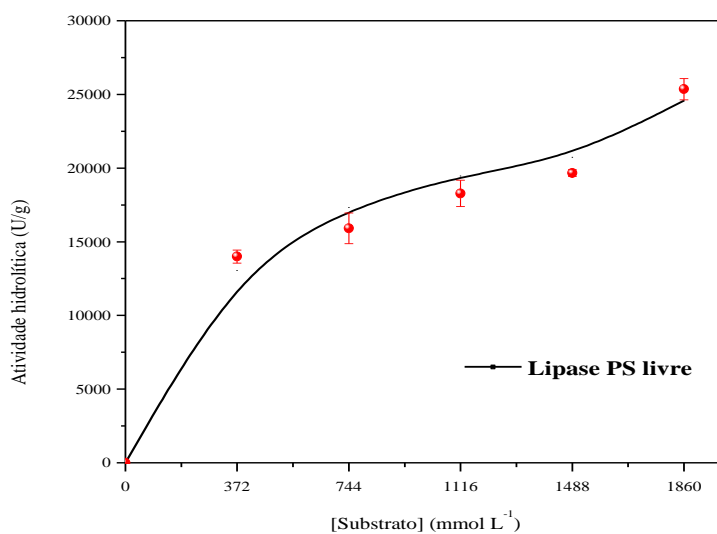
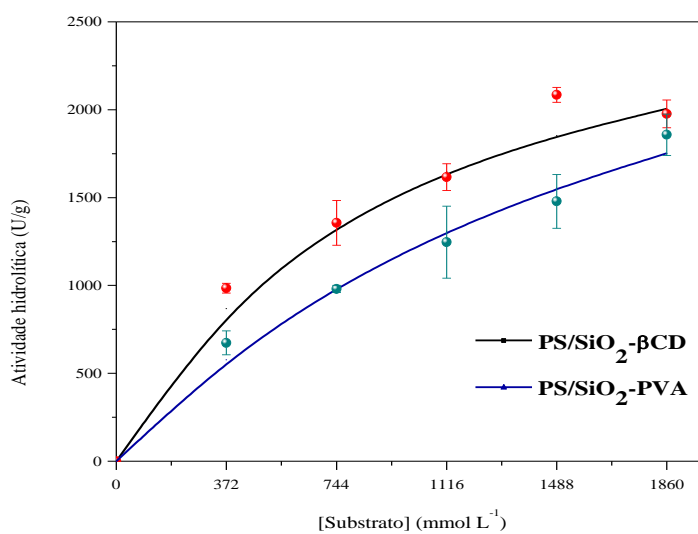
Nas Figuras 4.8 e 4.9 são apresentadas as atividades hidrolíticas da lipase PS livre e dos derivados imobilizados PS/SiO₂-βCD e PS/SiO₂-PVA em função da concentração do substrato em ácidos graxos. Os parâmetros cinéticos são mostrados na Tabela 4.3 calculados a partir da equação 3.3.

A lipase PS livre teve K_m igual a 355 mmol L^{-1} e V_{max} igual a 13165 U g^{-1} . O derivado imobilizado PS/SiO₂-βCD teve K_m igual a 903 mmol L^{-1} e V_{max} igual a 2980 U g^{-1} , enquanto que o derivado imobilizado PS/SiO₂-PVA teve K_m igual a 1927 mmol L^{-1} e V_{max} igual a 3569 U g^{-1} . De acordo com a literatura, quanto maior o valor de K_m menor afinidade da enzima pelo substrato (PETER; AHLERS; MOREIRA, 1987). Enzimas imobilizadas dificultam a transferência de massa dos reagentes para a superfície (difusão externa) e para os poros (difusão interna) fazendo com que tenha uma perda de afinidade com o substrato em relação à enzima livre (MENDES et al., 2007).

Como esperado, os derivados imobilizados tiveram K_m maior que a lipase livre, confirmando a diminuição de afinidade com o substrato após a lipase ter sido imobilizada. O derivado PS/SiO₂-βCD tem uma maior afinidade pelo substrato que o derivado PS/SiO₂-PVA, possivelmente devido a maior hidrofobicidade do SiO₂-βCD em relação ao suporte SiO₂-PVA. Por outro lado, a velocidade máxima da lipase imobilizada em SiO₂-PVA é maior que em SiO₂-βCD, devido a limitação difusional que a lipase enfrenta no SiO₂-βCD.

Tabela 4.3 Parâmetros cinéticos para lipase livre e para os derivados imobilizados

Biocatalisador	K_m (mmol L ⁻¹)	V_{max} (U g ⁻¹)
Lipase PS	354,69±92,30	13164,50±913,87
PS/SiO ₂ -βCD	903,28±202,59	2979,69±289,76
PS/SiO ₂ -PVA	1927,30±492,64	3568,67±510,15

**Figura 4.8** Atividade hidrolítica (U g⁻¹) da lipase PS em função da concentração do substrato (mmol L⁻¹)**Figura 4.9** Atividade hidrolítica (U g⁻¹) da lipase PS imobilizada em SiO₂-βCD e SiO₂-PVA em função da concentração do substrato (mmol L⁻¹)

4.2.5 Estabilidade térmica

Foram realizados experimentos de tratamento térmico, com temperatura do banho de 60 °C, nas lipases livre e imobilizadas nos suportes SiO₂-βCD e SiO₂-PVA para avaliar a perda de atividade hidrolítica e assim determinar a constante de inativação térmica (K_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$). Os valores das constantes de inativação térmica e os tempos de meia-vida encontram-se na Tabela 4.4.

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial da enzima. Observa-se que o tempo de meia-vida da lipase livre é extremamente menor que da lipase imobilizada, conferindo estabilidade térmica à enzima imobilizada, o que comprova que a técnica de imobilização é realmente eficaz. Na Figura 4.10, verifica-se que no tempo de 60 min a enzima livre perdeu em torno de 40% do seu potencial catalítico, enquanto que as lipases imobilizadas perderam na faixa de 10 % (APÊNDICE B).

O suporte de ciclodextrina conferiu mais estabilidade térmica a lipase, pois o tempo de meia-vida da lipase imobilizada no SiO₂-βCD foi 1,7 vezes maior que no SiO₂-PVA, provavelmente devido a sua cavidade hidrofóbica que proporcionou uma região mais protegida para a lipase se alojar, aumentando assim a estabilidade térmica do derivado imobilizado. Nota-se na Figura 4.10 que no tempo de 30 min a perda catalítica a lipase imobilizada no SiO₂-βCD foi de 1% e quando imobilizada no SiO₂-PVA foi de aproximadamente 13%, comprovando mais uma vez que o híbrido de ciclodextrina é mais hidrofóbico que o híbrido de PVA, pois ele protege a lipase nas suas cavidades da ação do efeito térmico.

Tabela 4.4 Constantes de inativação térmica e tempos de meia-vida da lipase PS imobilizada

Biocatalisador	K_d (h ⁻¹)	Tempo de meia-vida (h)
Lipase PS	0,3108	2,14
PS/SiO ₂ -βCD	0,0523	13,25
PS/SiO ₂ -PVA	0,0922	7,52

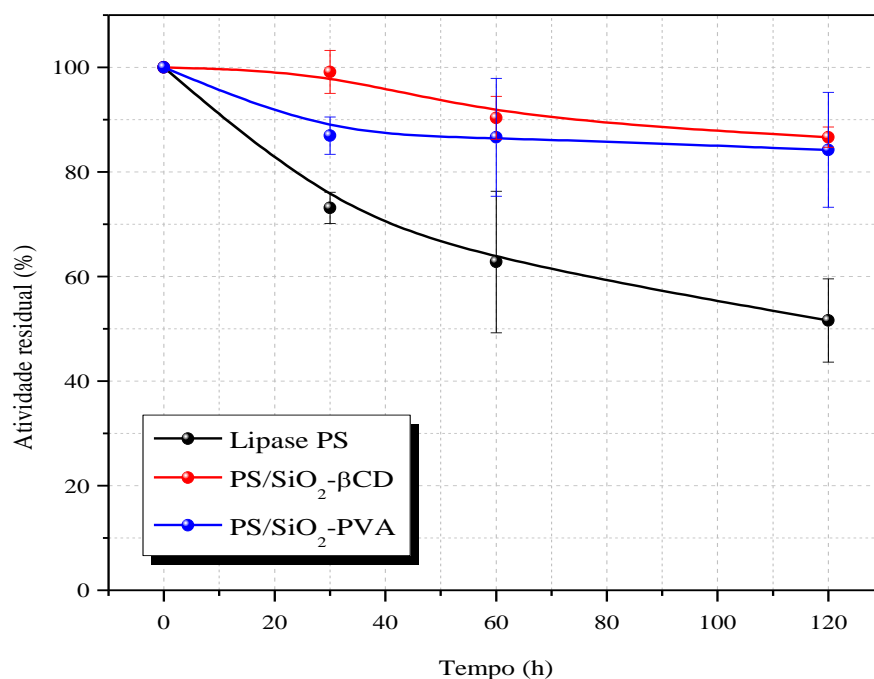


Figura 4.10 Atividade hidrolítica residual da lipase PS imobilizada em SiO₂-βCD e SiO₂-PVA

4.3 Comparação do desempenho da lipase PS imobilizada em diferentes suportes

A lipase de *Burkholderia cepacia* (lipase PS) foi imobilizada nos suportes de SiO₂-βCD (APÊNDICE C) e de SiO₂-PVA (APÊNDICE D) para catalisar a reação de transesterificação de óleo de babaçu e álcool etílico, na razão molar de 1:7, a temperatura de 45°C, sob agitação magnética. As Figuras 4.11 e 4.12 mostram os perfis de formação de ésteres etílicos e rendimento de transesterificação em função do tempo.

Como pode ser observado nas curvas de formação de ésteres etílicos para a catálise da lipase imobilizada nos dois suportes, ambos apresentaram o mesmo perfil. Nas curvas de rendimento de transesterificação pode-se notar que ambos os biocatalisadores tem o mesmo desempenho para tempos iguais. O derivado imobilizado de PS/ SiO₂-βCD conseguiu rendimento de 93% em 24 h, e 90% para o biocatalisador PS/ SiO₂-PVA. E para o tempo de 48 h o rendimento foi de 98% e 96%, respectivamente.

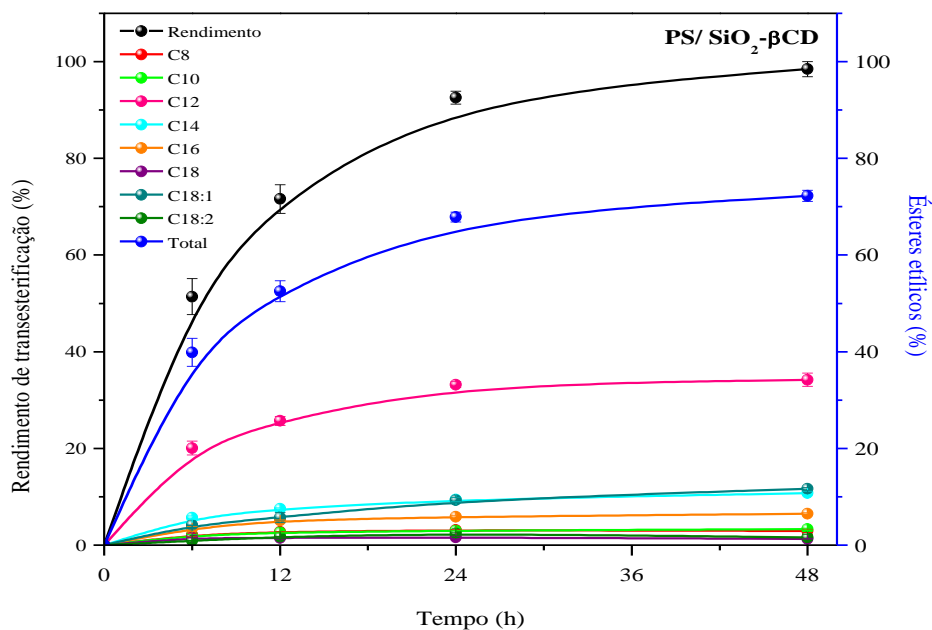


Figura 4.11 Perfil de formação de ésteres etílicos e rendimento de transesterificação em função do tempo utilizando o biocatalisador PS/ SiO₂-βCD

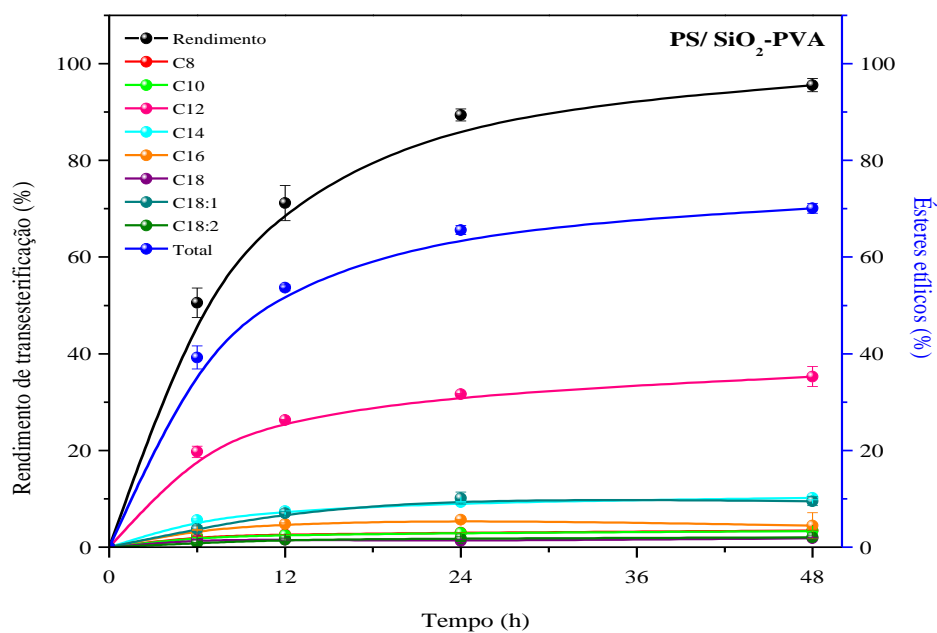


Figura 4.12 Perfil de formação de ésteres etílicos e rendimento de transesterificação em função do tempo utilizando o biocatalisador PS/ SiO₂-PVA

A Tabela 4.5 mostra o rendimento de transesterificação para o biodiesel formado e sua respectiva viscosidade para ambos os biocatalisadores utilizados (PS/ SiO₂-βCD e PS/ SiO₂-PVA, no tempo final da reação de 48 h, confirmados pelas viscosidades cinemáticas (APÊNDICE E). Os valores dessa tabela e os gráficos apresentados nas Figuras 4.11 e 4.12 mostram que os perfis são bastante semelhantes, confirmando que o híbrido de ciclodextrina pode ser usado como alternativa ao suporte de SiO₂-PVA na imobilização de enzimas para aplicação na transesterificação enzimática.

Tabela 4.5 Rendimento de transesterificação e viscosidade cinemática

Derivado imobilizado	Rendimento de transesterificação (%)	Viscosidade cinemática (cSt)
PS/SiO ₂ -βCD	98,46	4,431
PS/SiO ₂ -PVA	95,57	4,394

4.4 Efeito do ultrassom

4.4.1 Influência do ultrassom na lipase livre

A Figura 4.13 apresenta as atividades residuais da lipase de *Burkholderia cepacia* em função do tempo de incubação no banho de ultrassom de acordo com as metodologias descritas no item 3.3.5.1 e ilustrada na Figura 3.2. Observa-se que o processo de liofilização e o volume de solução enzimática sonicada no banho de ultrassom não influenciaram os valores de atividade hidrolítica (metodologias A, B e C). A solução de lipases que não sofreram ação das ondas de ultrassom (metodologia convencional) não tiveram alteração nas suas atividades hidrolíticas (APÊNDICE F).

Na Figura 4.13 pode-se observar que a atividade residual da lipase PS em meio tampão fosfato (pH 7,0, 0,1 M) permaneceu estável sem a ação do ultrassom, já o contrário apresentou uma queda de aproximadamente 35% em 2 h de incubação no banho de ultrassom. Não é surpresa que a estabilidade das enzimas em meio orgânico é maior que em meio aquoso (ROY; GUPTA, 2004), com a ação das ondas ultrassônicas não foi diferente, pois o uso do ultrassom nas soluções enzimáticas em meio tamponado fez com que a atividade hidrolítica diminuíssem.

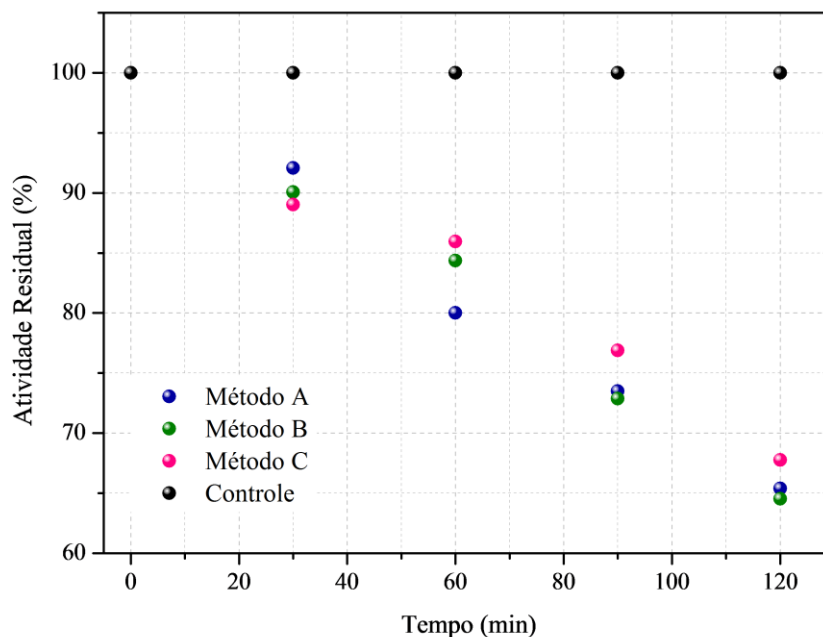


Figura 4.13 Comparação da atividade hidrolítica enzimática da lipase PS (tampão fosfato pH 7,0 a 37°C) no banho convencional e no banho de ultrassom por diferentes métodos

Vulfson (1991) realizou pré-tratamento na subtilisina e observou nitidamente em ultrassom uma queda brusca da atividade residual da enzima em meio aquoso do que no meio orgânico. Ösbek e Ülgen (2000) testaram a estabilidade de 6 enzimas em meio tampão, e obtiveram diferentes resultados para cada tipo de enzima, todas se mostraram instáveis, umas mais outras menos. O uso do ultrassom em meio aquoso tem efeito negativo e pode ser explicado pelo aumento da energia cinética e conseqüentemente da temperatura da água induzida pelo ultrassom (SINISTERRA, 1992). Outra hipótese, é que as ondas ultrassônicas podem ter auxiliado a formação de radicais hidroxilas ou pontes de hidrogênio, podendo ocorrer a agregação de enzimas, ocultando o sítio ativo, enquanto que ao mesmo tempo, diminuiu a estabilidade protéica (ROKHINA; LENS; VIRTUTYTE, 2009).

4.4.2 Influência do ultrassom no preparo do derivado imobilizado

A Tabela 4.6 mostra as atividades hidrolíticas dos derivados imobilizados, bem como os rendimentos de imobilização obtidos pela ação da agitação magnética e das ondas ultrassônicas, nos tempos devidos para cada método utilizado. Os derivados imobilizados

apresentaram atividades entre 1907 e 2150 U g⁻¹, correspondendo a rendimentos de imobilização entre 44 e 50%. Verifica-se que não houve variações significativas nos valores de atividade hidrolítica e de rendimento de imobilização, além de ter redução significativa no tempo de preparo do derivado imobilizado (até 87,5 %).

Tabela 4.6 Redução do tempo no preparo do derivado imobilizado utilizando agitação magnética (AM) e ultrassom (US)

Redução do tempo (%)		0%	50%	75%	87,5%
Atividade hidrolítica (U g ⁻¹)	AM	2149,92±73,83	1906,71±117,40	1967,44±61,45	1972,55±62,02
	US	1960,12±56,93	1950,98±128,85	2020,09±120,47	1894,11±115,07
Rendimento de imobilização (%)	AM	50,05±1,72	44,39±2,73	45,81±1,43	45,92±1,44
	US	45,63±1,33	45,42±3,00	47,03±2,80	44,01±2,68

A Tabela 4.7 apresenta os valores de K_m e V_{max} da lipase PS na sua forma livre e imobilizada preparada pela ação da agitação magnética e das ondas ultrassonoras. Os valores de K_m para os dois derivados imobilizados aumentaram em relação ao K_m da lipase PS na sua forma livre. Todavia foi observada ligeira redução do valor do K_m para o derivado obtido sob a influência do ultrassom (APÊNDICE G).

Tabela 4.7 Parâmetros cinéticos para PS livre e imobilizada

Parâmetros Cinéticos	Lipase PS livre	Agitação Magnética	Ultrassom
K_m (mmol L ⁻¹)	354,69±92,30	903,28±202,59	686,52±166,55
V_{max} (U g ⁻¹)	13164,50±913,87	2979,69±289,76	2836,52±261,24

Embora pouco se saiba sobre o comportamento da enzima na presença de ondas ultrassonoras, tais ondas podem ser capazes de controlar algumas características do biocatalisador (ROKHINA, LENS E VIRKUTYTE, 2009). Neste caso, o ultrassom melhorou a afinidade do derivado ao substrato quando o K_m diminuiu de 835 mmol L⁻¹ para 687 mmol L⁻¹, e a velocidade máxima manteve-se a mesma.

4.4.3 Influência do ultrassom nas reações de transesterificação

Após testar a influência das ondas de ultrassom no potencial catalítico enzimático e na preparação dos derivados imobilizados, foi realizado o teste do efeito do ultrassom nas reações de transesterificação enzimática. Para efeito de comparação foram utilizadas as condições mais próximas possíveis da reação por sistema de agitação magnética.

As reações foram procedidas na razão molar de 1:7 (óleo de babaçu: etanol), a temperatura de 45°C, catalisadas por lipase PS imobilizada por ligação covalente na matriz híbrida SiO₂-βCD. Primeiramente, a reação de transesterificação foi conduzida por sistema de agitação magnética, neste caso foi utilizado condensador com refluxo de banho. Quando utilizado sistema de banho de ultrassom o refluxo foi dispensado.

Nas Figuras 4.14 e 4.15 estão esquematizados os perfis de formação dos ésteres de etila em função do tempo de reação de transesterificação etílica do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO₂-βCD por agitação magnética e por ultrassom, respectivamente.

A Tabela 4.9 mostra uma comparação do tempo e da produtividade quando a conversão atinge aproximadamente 80% para a etanolise de babaçu sob agitação magnética e irradiação de ondas ultrassônicas. Para a reação efetuada com agitação magnética temos um rendimento de 79,74% e produtividade de 45,29 mg ésteres g⁻¹ h⁻¹ durante um tempo de 24 h, enquanto que com as influências das ondas de ultrassom o rendimento foi de 85,54% e a produtividade de 145,36 mg ésteres g⁻¹ h⁻¹ por um tempo de apenas 8 h. Isso representa uma formação de ésteres etílicos três vezes mais rápido quando utilizado ultrassom.

Tabela 4.9 Comparação tempo e da produtividade para as reações aquecidas por agitação magnética e por ultrassom para um rendimento de aproximadamente 80%.

Método	Tempo (h)	Produtividade (mg ésteres g ⁻¹ h ⁻¹)
Agitação Magnética	24	45,29
Ultrassom	8	145,36

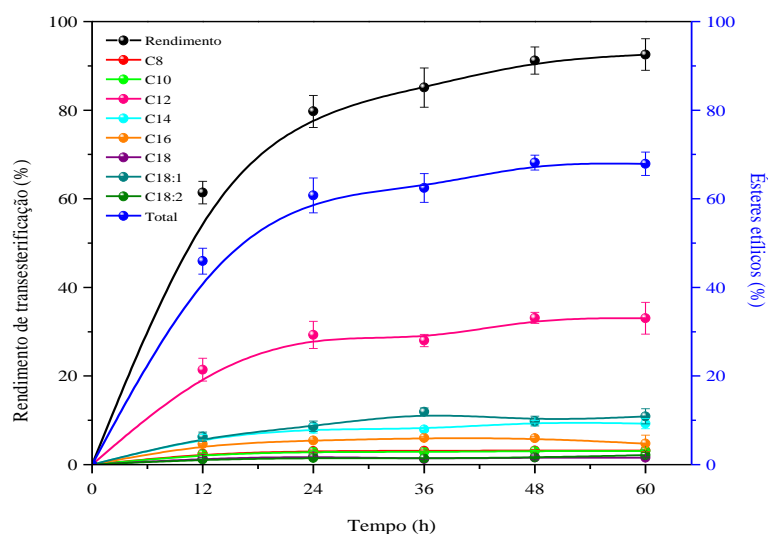


Figura 4.14 Formação de ésteres de etila em função do tempo de reação pelo método convencional na razão de 1:7.

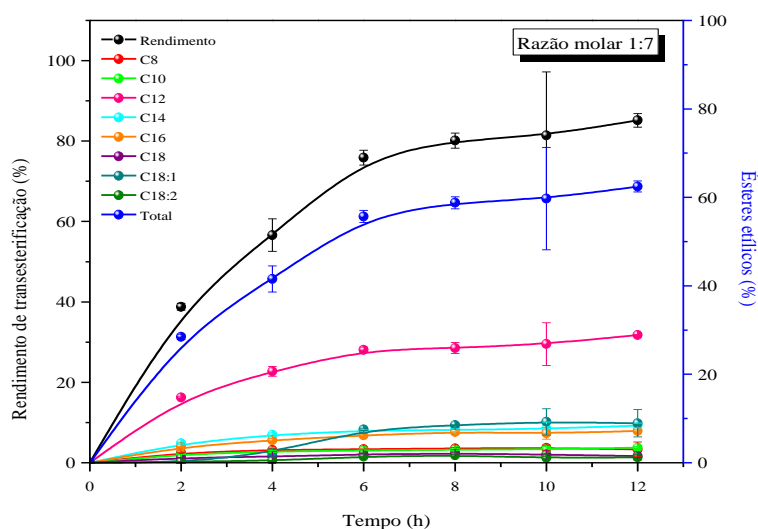


Figura 4.15 Formação de ésteres de etila em função do tempo de reação por ultrassom na razão de 1:7

Para um maior aprofundamento dos estudos de reações de transesterificação por influência das ondas ultrassônicas, foram realizados mais outros testes variando-se a razão molar. Assim, foram realizadas reações nas razões molares de 1:4 e 1:10 (óleo de babaçu: etanol), a temperatura de 45°C, catalisadas por lipase PS imobilizada por ligação covalente na matriz híbrida SiO₂-βCD.

Nos resultados anteriores, para reações conduzidas sob ação do ultrassom na razão molar de 1:7, o rendimento de transesterificação foi de 80% para um tempo de 8 h de reação, e nas horas seguintes o rendimento se manteve o mesmo. A variação na razão

molar não alterou significativamente o rendimento, no mesmo tempo de reação o rendimento na razão de 1:4 e 1:10 foram respectivamente 68% e 55%. As Figuras 4.16 e 4.17 mostram a formação de ésteres de etila.

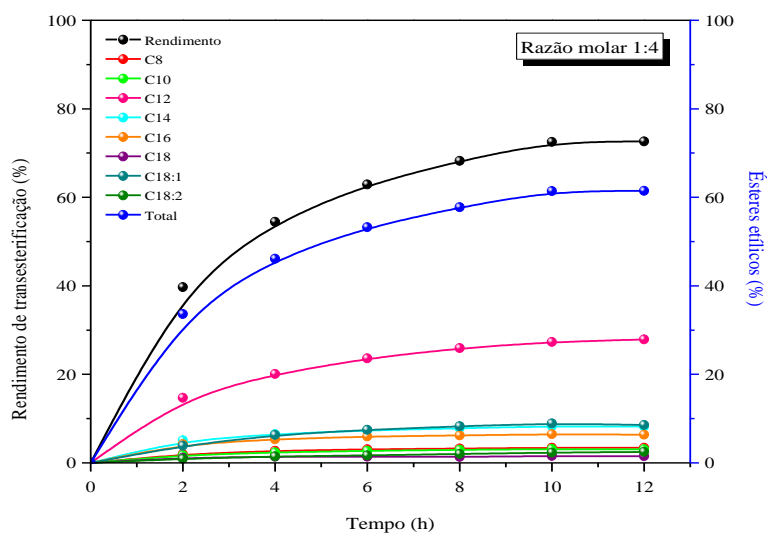


Figura 4.16 Formação de ésteres de etila em função do tempo de reação por ultrassom na razão de 1:4

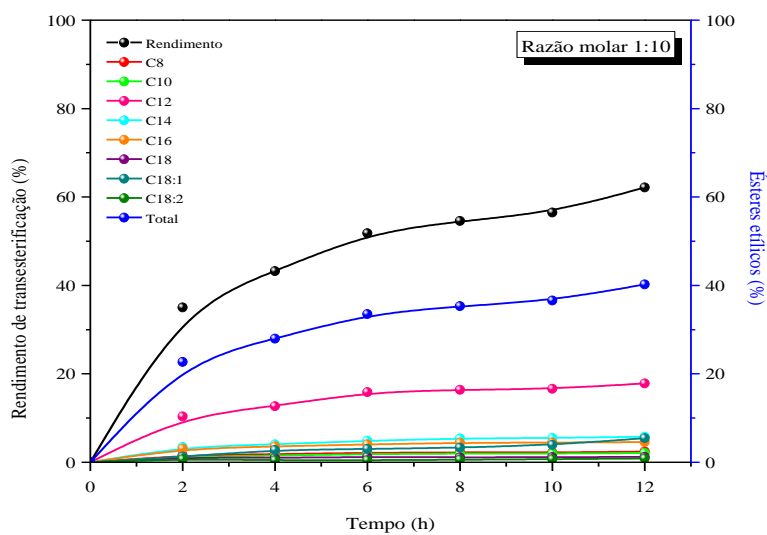


Figura 4.17 Formação de ésteres de etila em função do tempo de reação por ultrassom na razão de 1:10.

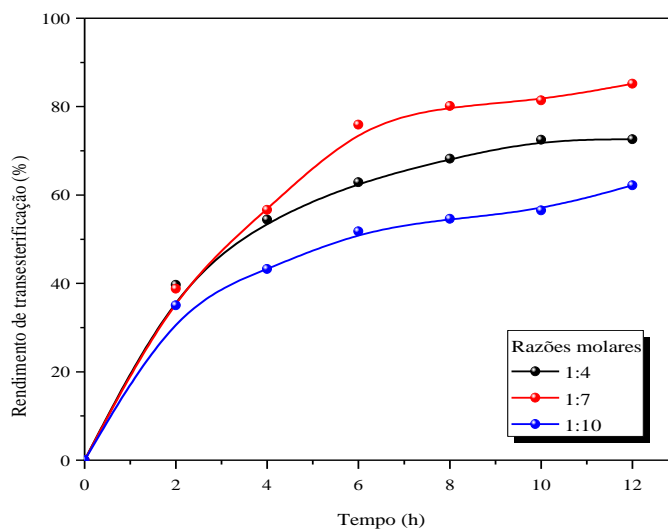


Figura 4.18 Comparação de rendimento de transesterificação em função do tempo de reação por ultrassom na razão de 1:4, 1:7 e 1:10

Na Figura 4.18 é apresentada a comparação de rendimento de transesterificação para as razões molares de 1:4, 1:7 e 1:10, e revela que a melhor proporção foi para a reação com razão molar de 1:7. Desta forma, acredita-se que o aumento e a diminuição da proporção de álcool para óleo não contribuiu para o melhoramento das reações conduzidas sob influência do ultrassom.

Por outro lado, a possibilidade de substituir o aquecimento convencional pelo aquecimento de ondas ultrassônicas é uma alternativa promissora para a produção de biodiesel, pois como mostrado na Tabela 4.9, tem-se uma redução de aproximadamente 67% do tempo de reação se comparado a realizada por ultrassom e a realizada por agitação magnética, para um rendimento de 80%. E ainda uma produtividade triplicada. Neste contexto, a aplicação do ultrassom de banho na transesterificação enzimática do óleo de babaçu com álcool etílico constituiu um procedimento experimental de excelência para a produção de biodiesel, permitindo alcançar rendimentos de reação em menor período de tempo.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influencia do ultrassom na biocatálise, realizado em três etapas: a primeira delas no desempenho da lipase de *Burkholderia cepacia* em meio aquoso, em seguida na preparação do derivado imobilizado desta lipase em suporte híbrido composto por sílica e β -ciclodextrina finalizando com a síntese de biodiesel catalisada pelo biocatalisador preparado utilizando o óleo de babaçu e etanol como matérias-primas.

Os resultados foram satisfatórios, e com base nesses resultados, pode-se concluir que:

- De acordo com as propriedades morfológicas (BET, raio-X, MEV), cinéticas (K_m , V_{max}) e térmicas (K_d , $t_{1/2}$ e TGA/DTG) o desempenho do híbrido de SiO_2 - β CD utilizado como suporte para imobilização da lipase PS, foi tão bom quanto o derivado imobilizado dessa enzima no suporte SiO_2 -PVA. A utilização deste biocatalisador na reação de transesterificação com óleo de babaçu e etanol foi satisfatório e rendimentos foram bastante semelhantes para ambos os derivados.
- A ação das ondas ultrassônicas durante um período de 2 h proporcionou um decréscimo de aproximadamente 35% na atividade hidrolítica da lipase livre em meio tampão fosfato (pH 7,0, 0,1M).
- A preparação dos derivados imobilizados de lipase PS imobilizada em SiO_2 - β CD em diversos tempos, tanto pelo método convencional (agitação magnética) como na presença das ondas ultrassônicas não mostrou alteração nas características morfológicas e nas atividades hidrolíticas.
- Na síntese de biodiesel, utilizando óleo de babaçu e etanol catalisada por PS/ SiO_2 - β CD, na razão de 1:7 a 45°C o rendimento de transesterificação sob efeito de ondas ultrassônicas, teve uma redução de 67% (de 24 h para 8 h) no tempo de reação para um rendimento de 80% em relação a reação realizada por agitação magnética. A variação na razão molar não alterou significativamente o rendimento, pois em 8 h

de reação no ultrassom, nas mesmas condições, os rendimentos na razão de 1:4 e 1:10 foram respectivamente 68% e 55%.

De uma forma geral, a aplicação do ultrassom tem efeito negativo em lipases presentes em meios aquosos. Por outro lado, na preparação de biocatalisadores não foi observado mudanças. Já na etanólise de óleo de babaçu, as ondas de ultrassom tiveram um efeito altamente benéfico, pois provocou uma redução de 67% do tempo de reação sem alterar a qualidade do produto formado.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aprofundar os estudos de preparação de derivados imobilizados com influência de ondas de ultrassom, para investigar se as ondas de ultrassom não alteraram outras propriedades do biocatalisador, como: estabilidade térmica, perda de atividade hidrolítica na estocagem, dosagem de proteína, dosagem de grupos epóxi no suporte híbrido, entre outras análises pertinentes ao estudo.
- Realizar reações enzimáticas utilizando ultrassom de banho com acoplamento de agitação mecânica e condensador de refluxo, para fornecer ao meio reacional maior homogeneidade do meio.
- Avaliar a possibilidade de transesterificação sob influência de ondas de ultrassom em regime de bateladas consecutivas.

REFERÊNCIAS

- ABBEHAUSEN C.; FORMIGA A. L. B.; SABADINI E.; YOSHIDA I. V. P. A β -Cyclodextrin/siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and inclusion complexes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, p. 1867-1876, 2010.
- ANP: Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Dados estatísticos**. Disponível em <http://www.anp.gov.br/?pg=58457&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1321482282217>. Acesso em 10 de Outubro de 2010.
- ANTCZAK, M.S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185–1194, 2009.
- ÁVILA, I.; CRNKOVIC, P. M.; MILIOLI, F. E. Metodologia para o estudo da porosidade de dolomita em ensaio de sulfatação interrompida. **Química Nova**, v. 33, p. 1732-1738, 2010.
- 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.
- BABICZ, I.; LEITE, S. G. F.; SOUZA, R. O. M. A.; ANTUNES, O. A. C. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 4-6, 2010.
- BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, p. 767-770, 1990.
- COSTA Jr., E.S.; MANSUR, H.S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação na engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, p. 1460-1466, 2008.
- CULLITY, B. D. **Elements of X-Ray Diffraction**. Massachusetts: Hardcover, Addison Wesley Publishing Company, 1978.
- DA RÓS, P. C. M., **Etanólise de óleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de micro-ondas**. 2009.131 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), Lorena, 2009.
- 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.

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

DE CASTRO, H. F. , OLIVEIRA, P. C. , SOARES, C. M. F., ZANIN, G. M. Immobilization of Porcine Pancreatic Lipase on Celite for Application in the Synthesis of Butyl Butyrate in a Nonaqueous System. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.76, p.147-152, 1999.

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

DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. 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, Brasil: Interciência, 2008. Cap. 6. p. 123. ISBN 978-85-7193-189-3.

ESMAEILI, M., A.; YAZDANPARAST, R. Beta-cyclodextrin-bonded silica assists alkaline phosphatase and carbonic anhydrase refolding in a solid phase assisted refolding approach. **Process Biochemistry**, v, 45, p. 239–246, 2010.

FABER, K., ed. Em **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft:, 1997.

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.

FIAMETTI, K. G.; SYCHOSKI, M. M.; CESARO, A.; FURIGO Jr., A.; BRETANHA, L. C. Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 981–987, 2011.

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, F.; 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 SiO₂-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 87-90, 2010.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C., 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.; SILVA, G. S.; SANTOS, J. C.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO H. F. Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor. **European Food Research and Technology**, v. 233, p. 743-750, 2011.

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

GANDHI, N. N. Applications of lipases. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, p. 621-634, 1997.

GOG A.; ROMAN M.; TOS M.; PAIZS C.; IRIMIE F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification e Current state and perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, p. 10-16, 2012

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

GONÇALVES, K. M.; SUTILI, F. K.; LEITE, S. G. F.; DE SOUZA, R. O. M. A.; LEAL, I. C. R. Palm oil hydrolysis catalyzed by lipases under ultrasound irradiation – The use of experimental design as a tool for variables evaluation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 232–236, 2012.

GUISAN, J.M. Immobilization of enzymes for use in organic media. In: GUIBAN, J.M. editor. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, 2006. p. 1-13.

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M.; HEIDELBERG, T.; CHISTI, Y. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2079–2090, 2011.

GUPTA, M.N.; ROY, I. Enzymes in organic media: Forms, function and applications. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 2575-2583, 2004.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453-468, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbiology Technology**, v.39, p. 235-251, 2006.

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

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

KIM, D. S.; PARK, H. B.; RHIM, J. W.; LEE, Y. M. Preparation and characterization of crosslinked PVA/SiO₂ hybrid membranes containing sulfonic acid groups for direct methanol fuel cell applications. **Journal of Membrane Science**, v. 240, p. 37-48, 2004.

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.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel** 1.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KOTOKY, T.; DOLUI, S. K. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol (PVA)/silica hybrid composites derived through the sol-gel method in aqueous medium: Effect of acid content, silica content and viscosity of PVA on the dispersion characteristics of silica and the physical properties of the composites. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 29, p. 107-114, 2004.

KWIATKOWSKA, B.; BENNETT, J.; AKUNNA, J.; WALKER, G.M.; BREMNER, D.H. Stimulation of bioprocesses by ultrasound. *Biotechnology Advances*, **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 768–780, 2011.

LIMA, J. R. O.; SILVA, R. B.; SILVA, C. C. M.; SANTOS, L. S. S.; SANTOS Jr., J. R.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R. Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. **Química Nova**, v. 30, p. 600-603, 2007.

LIU, Y. X.; JIN, Q. Z.; SHAN, L.; LIU, Y. F.; SHEN, W.; WANG, X. G. The effect of ultrasound on lipasecatalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. **Ultrason Sonochem**, v. 15, p. 402-407, 2008.

LIU, Y.; CHEN, D.; YAN, Y.; PENG, C.; XU, L. Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10414–10418, 2011.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 1-10, 2005.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 1300-1311, 2007.

MARTINES, M. A. U.; DAVOLES, M. D.; JUNIOR, M. J. O efeito do ultra-som em reações químicas. **Química Nova**, v. 2, p. 251-256, 2000.

MASON, T.J.; LORIMER, J.P. **Sonochemistry: Theory, Applications and Uses of Ultrasound in Chemistry**, Chichester: Ellis Horwood Limited, 1988.

MENDES, A. A. **Seleção de Suportes e Protocolos de Imobilização de Lipases para a Síntese Enzimática de Biodiesel**, 2009, 194 p. Tese (Doutorado. Em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos (Ufscar), São Carlos, 2009.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; RODRIGUES, D. S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 1055-1066, 2011c.

MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; DE CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 109-115, 2011a.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011b.

MENDES, A.A.; BARBOSA, B.C.M.; SILVA, M.L.C.P.; CASTRO, H.F. Morphological, biochemical and kinetic properties of lipase from *Candida rugosa* immobilized in zirconium phosphate. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, p. 393-400, 2007.

MIRANDA, M.; SILVA, M. L. C. P.; CASTRO, H. F. Optimized immobilization of microbial lipase on hydrous niobium oxide. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p. 566-572, 2006.

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

NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Mathematical methods to correct spectral interferences and interelemental effects in x-ray fluorescence quantitative analysis. **Química Nova**, v. 24, p. 531-539, 2001.

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

OLIVEIRA, P. C. **Estudo da imobilização de lipase em copolímero de poli(estireno)-divinilbenzeno e aplicação na síntese do butirato de butila**, 1999. 92 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, 1999.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; DE CASTRO, H. F. Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, v.5, p. 63-71, 2000b.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G.M.; CASTRO, H.F. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v.23, p. 632-636, 2000a.

ÖSBEK, B.; ÜLGEN, K. O. The stability of enzymes after sonication. **Process Biochemistry**, v.35, p. 1037-1043, 2000.

OZMEN, E. Y.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. 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***, 2010, 126 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 187-204, 2000.

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

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

PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; FREITAS, L.; DE CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Interesterification of milkfat and soybean oil blends catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 117–121, 2010.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; 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.

PENTEADO, M. C. P. S. **Identificação dos gargalos e estabelecimento de um plano de ação para o sucesso do programa brasileiro de biodiesel**, 2005, 159 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Automotiva) - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2005.

PEREIRA, E.B.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.20, p.343-355, 2003.

PÉREZ, V.H.; DA SILVA, G.S.; GOMES, F.M.; 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.

PETER, H. W.; AHLERS, J.; MOREIRA, R. A. **Cinética Enzimática**, 1ª ed. Fortaleza: Edições UFC, 1987.

POLARZ, S.; SMARSLY, B.; BRONSTEIN, L.; ANTONIETTI, M. From cyclodextrin assemblies to porous materials by silica templating. **Angewandte Chemie**, v. 113, p. 4549-4553, 2001.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975-3981, 2008.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147–148, p. 237–250, 2009.

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100-109, 2008.

ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRTUTYTE, J. Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 298-306, 2009.

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.

SANTOS, J. C.; PATRÍCIA, M. D.; NUNES, G. F. M.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Covalent attachment of *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane–polyvinyl alcohol with different activating compounds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, p. 229–236, 2008c.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. 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, 2008b.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; ROCHA, C. G. F.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. 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. 4823–4826, 2008c.

SANTOS, J.C.; CASTRO, H.F. Optimization of lipase-catalysed synthesis of butyl butyrate using a factorial design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1007-1011, 2006.

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.

SHAH, S. S.; GUPTA, M. N. The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media. **Chemistry Central Journal**, v. 2, p. 1-9, 2008.

SHARMA, P.; KANNOUJIA, D. K.; BASIR, S.; NAHAR, P. Rapid immobilization of enzymes onto solid supports by ultrasound waves. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 39, p. 289-292, 2011.

SHARP, K. G. Hybrid organic inorganic composites. In: MARK, J. E.; LEE, C. Y. -C; BIANCONI, P. A. **California: ACS Symposium Series**, 1995, p. 585 e 165.

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

SHU, Z. Y.; JIANG, H.; LIN, R. F.; JIANG, Y. M.; LIN, L.; HUANG, J. Z. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 1-8, 2010.

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, 2011.

SINISTERRA, J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. **Ultrasonics**, v. 30, n. 3, p. 180-185, 1992.

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.; 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.77/79, p. 745-757, 1999.

STEFĂNESCU, M.; STOIA, M.; STEFĂNESCU, O.; DA VIDESCU, C.; VLASE, G.; SFÎRLOAGA, P. Synthesis and characterization of poly(vinyl alcohol)/ ethylene glycol /silica hybrids. Thermal analysis and FT-IR study. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 55, p. 17-23, 2010.

SUSLICK, K.S. Sonochemistry. **Science**, v. 247, p. 1439-1445, 1990.

SUSLICK, K.S. The Chemical effects of ultrasound, **Scientific American**, v.80, p. 80-86, 1989.

TALUKDER, M. M. R.; ZAMAN, M. M.; WU, J. C.; KAWANISHI, T. Ultrasonication enhanced hydrolytic activity of lipase in water/iso-octane two-phase systems. **Biocatal Biotransform**, v. 24, p. 189-194, 2006.

TEIXEIRA M. A. Babassu-a new approach for an ancient Brazilian biomass. **Biomass and Bionergy**, v. 32, p. 857-864, 2008.

TEIXEIRA M. A.; CARVALHO M. G. Regulatory mechanism for biomass renewable energy in Brazil, a case study of the Brazilian Babassu oil extraction industry. **Energy**, v.32, p. 999-1005, 2007.

TROTTA, F.; ZANETTI, M.; CAMINO, G. Thermal degradation of cyclodextrins. **Polymer Degradation and Stability**, v. 69, p. 373-379, 2000.

URIOSTE, D., CASTRO, M. B. A., BIAGGIO, F. C., DE CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 407-412, 2008.

UYAR, T.; NUR, Y.; HACALOGLU, J.; BESENBACHER, F. Electrospinning of functional poly(methyl methacrylate) nanofibers containing cyclodextrin-menthol inclusion complexes. **Nanotechnology**, v. 20, p. 125703 (10pp), 2009.

VILLENEUVE, P. Lipase in lipophilization reaction. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 515-536, 2007.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J.; **Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme**, v.9, p. 113, 2000.

VULFSON, E. N.; SARNEY, D. B.; LAW, B. A. Enhancement of subtilisin-catalyzed interesterification in organic-solvents by ultrasound irradiation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 123-126, 1991.

WANG, J.X.; HUANG, Q.D.; HUANG, F.H.; WANG, J.W.; HUANG, Q.J. Lipase-catalyzed production of biodiesel from high acid value waste oil using ultrasonic assistant. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 1121-1128, 2007.

WINKLER, F. K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 771-774, 1990.

XIAO, Y.; YANG, L.; MAO, P.; ZHAO, Z.; LIN, X. Ultrasound-promoted enzymatic synthesis of troxerutin esters in nonaqueous solvents. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 303-309, 2011.

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.

YU, D.; TIAN, L.; WU, H.; WANG, S.; WANG, Y.; MA, D.; FANG, X. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 519-525, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Atividade hidrolítica da lipase PS livre e dos derivados imobilizados PS/SiO₂-βCD e PS/SiO₂-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
60	40	2232

Ácidos graxos (mM)	lipase PS		PS/SiO ₂ -βCD		PS/SiO ₂ -PVA	
	A _{exp}	A _{cal}	A _{exp}	A _{cal}	A _{exp}	A _{cal}
0	0	0	0	0	0	0
372	7164,6	6739,10	503,30	468,79	673,14	577,61
744	8590,14	8914,66	795,10	780,56	980,25	994,31
1116	9379,29	9989,64	9117,20	1002,87	1246,47	1309,11
1488	10699,65	10630,60	12078,52	1169,41	1478,69	1555,32
1860	11543,53	11056,20	13271,41	1298,81	1857,25	1753,16

A_{exp}: Atividade hidrolítica experimental (U g⁻¹); A_{cal}: Atividade hidrolítica calculada (U g⁻¹)

APÊNDICE B – Estabilidade térmica da lipase PS livre e dos derivados imobilizados PS/SiO₂-βCD e PS/SiO₂-PVA.

Atividade residual da lipase PS livre e dos derivados imobilizados PS/SiO₂-βCD e PS/SiO₂-PVA submetidos a tratamento térmico (60°C).

Estabilidade térmica mediada em meio aquoso (tampão fosfato 0,1M, pH 7,0) para a lipase livre, e em meio orgânico (heptano) para os derivados imobilizados.

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

Tempo (min)	Atividade hidrolítica (U g ⁻¹)			Atividade Residual (%)		
	Lipase PS	PS/SiO ₂ -βCD	PS/SiO ₂ -PVA	Lipase PS	PS/SiO ₂ -βCD	PS/SiO ₂ -PVA
0	8668,75	1624,99	1.857,32	100,00	100,00	100,00
30	6347,35	1609,79	1.617,52	73,22	99,06	87,09
60	5412,95	1468,95	1.600,41	62,44	90,40	86,17
120	4456,65	1408,41	1.556,12	51,41	86,67	83,78

APÊNDICE C – Dados referentes aos testes de etanólise do óleo de babaçu, na razão molar de 1:7, empregando o derivado imobilizado PS/SiO₂-βCD, 500 unidades de atividade / g de óleo, , sob agitação magnética a 45°C.

Ácidos graxos	Concentração ésteres etílicos (% m/m)			
	6 h	12 h	24 h	48 h
Ácido caprílico (C8:0)	2,13±0,36	2,75±0,05	3,10±0,05	2,95±0,34
Ácido cáprico (C10:0)	1,96±0,29	2,58±0,07	3,01±0,06	3,30±0,19
Ácido láurico (C12:0)	20,06±1,43	25,70±0,92	33,19±0,59	34,21±1,39
Ácido mirístico (C14:0)	5,67±0,37	7,49±0,22	9,41±0,48	10,77±0,41
Ácido palmítico (C16:0)	3,50±0,38	5,11±0,14	5,83±0,33	6,51±0,21
Ácido esteárico (C18:0)	1,53±0,06	1,45±0,21	1,60±0,28	1,30±0,09
Ácido oléico (C18:1)	4,12±0,03	5,71±1,05	9,32±0,50	11,62±0,26
Ácido linoléico (C18:2)	0,91±0,03	1,71±0,08	2,40±0,27	1,57±0,58
Total	39,88±2,89	52,51±2,15	67,86±1,02	72,22±1,14
Rendimento Total	51,38±3,73	71,59±2,93	92,56±1,32	98,46±1,56

APÊNDICE D – Dados referentes aos testes de etanólise do óleo de babaçu, na razão molar de 1:7, empregando o derivado imobilizado PS/SiO₂-PVA, 500 unidades de atividade / g de óleo, sob agitação magnética a 45°C.

Ácidos graxos	Concentração ésteres etílicos (% m/m)			
	6 h	12 h	24 h	48 h
Ácido caprílico (C8:0)	2,24±0,02	2,61±0,01	2,98±0,02	3,46±0,04
Ácido cáprico (C10:0)	2,03±0,01	2,49±0,03	2,90±0,03	3,32±0,08
Ácido láurico (C12:0)	19,70±1,20	26,310,10±	31,62±0,13	35,29±2,08
Ácido mirístico (C14:0)	5,57±0,31	7,47±0,01	9,28±0,12	10,19±0,40
Ácido palmítico (C16:0)	3,56±0,04	4,77±0,24	5,64±0,03	4,44±2,70
Ácido esteárico (C18:0)	1,52±0,07	1,51±0,22	1,24±0,26	1,84±0,21
Ácido oléico (C18:1)	3,75±0,66	6,98±0,37	10,14±1,24	9,51±0,91
Ácido linoléico (C18:2)	0,84±0,13	1,52±0,36	1,79±0,38	2,05±0,42
Total	39,22±2,39	53,66±0,60	65,58±0,93	70,10±1,01
Rendimento Total	50,54±3,08	71,16±3,65	89,41±1,27	95,57±1,38

APÊNDICE E - Viscosidade do biodiesel catalisado pelos derivados imobilizados PS/SiO₂-βCD e PS/SiO₂-PVA, utilizando óleo de babaçu e etanol, na razão molar de 1:7, sob agitação magnética a 45°C.

Biocatalisador utilizado	Viscosidade dinâmica (cP)	densidade (g cm ⁻³)	Viscosidade Cinemática (cSt)
PS/SiO ₂ -βCD	3,96	0,8937	4,43
PS/SiO ₂ -PVA	3,91	0,8898	4,39

APÊNDICE F – Comparação da atividade hidrolítica enzimática da lipase PS (tampão fosfato pH 7,0 a 37°C) no banho convencional(Controle) e no banho de ultrassom por diferentes métodos (A, B e C)

Tempo (min)	Atividade residual(%)			
	Controle	Método A	Método B	Método C
0	100,00	100,00	100,00	100,00
30	100,00	92,08	90,07	89,03
60	100,00	80,00	84,35	85,94
90	100,00	73,50	72,87	76,88
120	100,00	65,40	64,53	67,76

APÊNDICE G – Atividade hidrolítica e dos derivados imobilizado PS/SiO₂-βCD preparado por agitação magnética e por ultrassom, utilizando diferentes concentrações de azeite de oliva para determinação dos parâmetros cinéticos.

Ácidos graxos (mM)	Agitação magnética		Ultrassom	
	A _{exp}	A _{cal}	A _{exp}	A _{cal}
0	0	0	0	0
372	984,3701	869,17	1133,956	996,84
744	1355,605	1345,78	1466,345	1475,23
1116	1616,573	1646,79	1598,715	1756,16
1488	2084,322	1854,14	2277,008	1940,98
1860	1976,172	2005,67	2020,676	2071,8

APÊNDICE H – Dados referentes aos testes de etanolise do óleo de babaçu, na razão molar de 1:4, empregando o derivado imobilizado PS/SiO₂-βCD, 500 unidades de atividade / g de óleo, sob irradiação ultrassônica a 45°C.

Ácidos graxos	Concentração ésteres etílicos (% m/m)					
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
Ácido caprílico (C8:0)	1,95	2,70	3,05	3,25	3,41	3,39
Ácido cáprico (C10:0)	1,71	2,36	2,72	2,94	3,10	3,09
Ácido láurico (C12:0)	14,67	20,08	23,63	25,92	27,33	27,87
Ácido mirístico (C14:0)	5,07	6,49	7,37	7,81	8,26	8,21
Ácido palmítico (C16:0)	4,22	5,33	5,98	6,18	6,46	6,37
Ácido esteárico (C18:0)	1,15	1,37	1,39	1,34	1,56	1,51
Ácido oléico (C18:1)	3,90	6,33	7,45	8,28	8,93	8,58
Ácido linoléico (C18:2)	0,92	1,43	1,67	2,05	2,33	2,46
Total	33,60	46,10	53,26	57,77	61,39	61,48
Rendimento Total	39,68	54,44	62,90	68,22	72,49	72,60

APÊNDICE I– Dados referentes aos testes de etanolise do óleo de babaçu, na razão molar de 1:7, empregando o derivado imobilizado PS/SiO₂-βCD, 500 unidades de atividade / g de óleo, sob irradiação ultrassônica a 45°C.

Ácidos graxos	Concentração ésteres etílicos (% m/m)					
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
Ácido caprílico (C8:0)	2,28±0,07	2,89±0,27	3,04±0,10	3,22±0,22	3,33±0,64	3,03±1,63
Ácido cáprico (C10:0)	1,89±0,01	2,55±0,23	2,81±0,08	2,95±0,20	3,04±0,59	3,40±0,32
Ácido láurico (C12:0)	14,76±0,31	20,64±1,10	25,53±0,61	25,95±1,24	26,83±4,85	28,86±0,10
Ácido mirístico (C14:0)	4,43±0,24	6,31±0,43	7,26±0,14	7,42±0,29	7,69±1,52	8,40±0,55
Ácido palmítico (C16:0)	3,60±0,12	5,08±0,41	6,19±0,15	6,95±0,55	6,64±1,33	7,15±0,33
Ácido esteárico (C18:0)	1,12±0,01	1,41±0,06	1,94±0,12	2,09±0,16	1,83±0,12	1,48±0,25
Ácido oléico (C18:1)	0,05±0,09	2,18±0,87	7,54±0,27	8,49±0,05	9,26±2,98	8,93±3,10
Ácido linoléico (C18:2)	0,25±0,02	0,46±0,01	1,37±0,10	1,71±0,26	1,10±0,27	1,20±0,57
Total	28,45±0,62	41,53±2,96	55,68±1,35	58,77±1,36	59,73±11,59	62,46±1,24
Rendimento Total	38,78±0,85	56,61±4,03	75,91±1,85	80,12±1,86	81,42±15,80	85,15±1,69

APÊNDICE J– Dados referentes aos testes de etanolise do óleo de babaçu, na razão molar de 1:10, empregando o derivado imobilizado PS/SiO₂-βCD, 500 unidades de atividade / g de óleo, sob irradiação ultrassônica a 45°C.

Ácidos graxos	Concentração ésteres etílicos (% m/m)					
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
Ácido caprílico (C8:0)	1,54	1,87	2,15	2,25	2,21	2,42
Ácido cáprico (C10:0)	1,21	1,53	1,84	1,97	1,96	2,07
Ácido láurico (C12:0)	10,34	12,70	15,88	16,39	16,63	17,85
Ácido mirístico (C14:0)	3,47	4,03	4,87	5,38	5,52	5,79
Ácido palmítico (C16:0)	3,07	3,58	4,08	4,38	4,47	4,58
Ácido esteárico (C18:0)	1,09	1,01	1,23	1,08	1,17	1,21
Ácido oléico (C18:1)	1,25	2,76	3,03	3,29	3,93	5,44
Ácido linoléico (C18:2)	0,69	0,49	0,44	0,56	0,67	0,86
Total	22,67	27,97	33,51	35,32	36,56	40,23
Rendimento Total	35,03	43,23	51,79	54,59	56,51	62,18