

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**SÍNTESE DE ÉSTERES METÁLICOS CATALISADA POR LIPASE B DE
Candida antarctica IMOBILIZADA EM SUPORTES HIDROFÓBICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JAKELINE KATHIELE POPPE

PORTO ALEGRE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**SÍNTESE DE ÉSTERES METÁLICOS CATALISADA POR LIPASE B DE
Candida antarctica IMOBILIZADA EM SUPORTES HIDROFÓBICOS**

JAKELINE KATHIELE POPPE

Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química.

Orientador:

Prof. PhD. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientador:

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

PORTO ALEGRE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Síntese de ésteres metílicos catalisada por lipase B de Candida antarctica imobilizada em suportes hidrofóbicos*, elaborada por Jakeline Kathiele Poppe, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Prof. Dr. Aline Schilling Cassini

Prof. Dr. Julio Xandro Heck

Agradecimentos

Ao meu orientador, Marco Antônio Záchia Ayub, e meu co-orientador Rafael Costa Rodrigues por confiarem em mim e por todo apoio, incentivo e amizade durante a orientação deste trabalho. Esses dois anos foram muito enriquecedores para minha formação.

À técnica Aline Fernanda Rodrigues Leuven, meus sinceros agradecimentos pelo auxílio em toda a parte cromatográfica realizada neste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRGS, em especial ao funcionário Patrício Freitas pela pronta ajuda sempre que necessário.

Aos colegas do Bioteclab, em especial a minha “co-co-orientadora” Carla Roberta Matte agradeço pelo auxílio e por estar sempre disponível a ajudar no que fosse necessário.

A todos da minha família que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse concluído, pelos ensinamentos, incentivo e apoio em todos os momentos desta jornada.

Ao meu noivo Cleber Todeschini, por me inspirar a fazer sempre o melhor e pela sua presença, (mesmo à distância) tão importante na minha vida.

Resumo

Neste trabalho, duas preparações de lipase imobilizada (EC 3.1.1.3), tipo B (CALB) de *Candida antarctica*, foram comparadas como biocatalisadores na síntese de ésteres metílicos. CALB imobilizada comercialmente (Novozym 435 - CALB-435) e CALB imobilizada em esferas de estireno-divinilbenzeno (CALB-MCI) foram testadas para as reações de transesterificação. Um delineamento composto central rotacional (DDCR) e metodologia de superfície de resposta (MSR) foram utilizados para otimizar a relação razão molar álcool:óleo, teor de enzimas, e a água adicionada nas reações. As duas preparações de enzimas mostraram diferentes condições ótimas para a produção de ésteres metílicos, com a taxa inicial da reação de 51,47 mmol L⁻¹ h⁻¹ para CALB-435, e 57 mmol L⁻¹ h⁻¹ para CALB-MCI. O estudo do tempo de reação indicou que em 72 h foi possível obter conversões próximas a 100 % para ambos os derivados. Um alto rendimento de conversão foi obtido sob as condições otimizadas, indicando que a RSM pode ser usada para descrever adequadamente a relação entre os parâmetros de reação e da resposta (teor de ésteres metílicos). Sobre a estabilidade operacional durante as experiências de reutilização, ambos preparados enzimáticos mantiveram 70 % de sua atividade inicial após oito bateladas, sugerindo sua aplicabilidade na produção de biodiesel.

Palavras-chave: Lipase; ésteres metílicos; suportes hidrofóbicos; transesterificação; MSR; reuso de enzimas.

Abstract

In this work two preparations of immobilized lipase (EC 3.1.1.3), type B (CALB) from *Candida antarctica*, were compared as biocatalysts in the synthesis of esters. Commercial Novozym 435 (CALB-435) and CALB immobilized on styrene-divinylbenzene beads (CALB-MCI) were tested for the transesterification reactions. Central composite design rotational (DCCR) and response surface methodology (RSM) were used to optimize the substrate molar ratio, enzyme content, and the added water. The two enzyme preparations have shown different optimal conditions for the production of methyl esters, with initial rates of reaction $51.47 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for CALB-435, and $57 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for CALB-MCI. The study of reaction time indicated that in 72 h it was possible to obtain conversions close to 100 % for both derivatives. A high yield conversion was obtained under the optimized conditions, indicating that RSM can be used to adequately describe the relationship between the reaction parameters and the response (yield conversion) in lipase-catalyzed biodiesel synthesis. Over the operational stability during experiments of batch reuse, both prepared enzymatic maintained 70 % of their initial activity after eight batches, suggesting their potential for economical application on biodiesel production.

Key-words: Lipase; methyl esters; hydrophobic supports; transesterification; RSM; enzyme reuse.

Sumário

Introdução.....	1
Revisão Bibliográfica	4
2.1 Biodiesel	4
2.1.1 Aspectos gerais	4
2.1.2 Transesterificação de óleos e gorduras.....	6
2.1.3 Catálise alcalina	8
2.1.4 Catálise enzimática.....	8
2.2 Lipases.....	10
2.2.1 Considerações iniciais	10
2.2.2 Ativação interfacial das lipases.....	11
2.2.3 Mecanismo de atuação das lipases	14
2.2.4 Técnicas de imobilização de lipases.....	16
2.2.4.1 <i>Imobilização de lipases pelo método de adsorção</i>	17
2.2.5 Fatores que influenciam a atividade das lipases em reações de biocatálise	19
2.3 Planejamento experimental fatorial.....	22
Materiais e Métodos.....	26
3.1 Materiais e reagentes.....	26
3.1.1 Características físicas dos suportes de imobilização.....	26
3.1.1.1 Resina macroporosa metacrilato de metil-co-divinilbenzeno.....	26
3.1.1.2 Resina macroporosa estireno-divinilbenzeno	27
3.2 Métodos	27

3.2.1 Procedimento de imobilização	27
3.2.2 Hidratação do suporte.....	27
3.2.3 Imobilização por adsorção	28
3.2.4 Delineamento experimental	28
3.2.5 Análise estatística.....	29
3.2.6 Reações de transesterificação	29
3.2.7 Análise por Cromatografia Gasosa (CG).....	30
3.2.8 Reuso da enzima imobilizada	31
Resultados e Discussão.....	32
4.1 Otimização dos parâmetros para transesterificação	32
4.1.2 Otimização das condições reacionais para lipase B de <i>Candida antarctica</i> imobilizada comercialmente (CALB-435).....	33
4.1.3 Otimização das condições reacionais para lipase B de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em suporte hidrofóbico MCI GEL CHP20P (CALB-MCI)	38
4.2 Cursos da reação de transesterificação	44
4.3 Reuso da enzima	47
Conclusões.....	52
Perspectivas.....	54
Referências Bibliográficas	55
Apêndice A.....	67
Apêndice B	68

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Reação de transesterificação para síntese de biodiesel	7
Figura 2.2 – Estrutura tridimensional da lipase do tipo B de <i>Candida antarctica</i> , com os respectivos resíduos dos aminoácidos do sítio ativo (Fonte: adaptado de KNOW <i>et al.</i> , 2007)	12
Figura 2.3 – Distintas conformações da lipase de <i>Candida rugosa</i> . (a) Conformação fechada; (b) Conformação aberta (Fonte: RODRIGUES <i>et al.</i> , 2009).....	13
Figura 2.4 – Mecanismo de reação de transesterificação com a lipase do tipo B de <i>Candida antarctica</i> . (Fonte: adaptado de DIJKSTRA, 2006)	15
Figura 2.5 – Lipase nas conformações: (a) aberta e fechada; e (b) imobilizada em suportes hidrofóbicos. (Fonte: adaptado de HANEFELD <i>et al.</i> , 2009).....	18
Figura 2.6 – Representação de um delineamento composto central rotacional. (Fonte: adaptado de MATEUS <i>et al.</i> , 2001).....	23
Figura 4.1 - Curvas de contorno para CALB-435 em função da taxa inicial de reação de síntese de ésteres metílicos ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) para (A) Razão molar álcool:óleo <i>versus</i> quantidade de enzima; (B) quantidade de água <i>versus</i> quantidade de enzima; (C) Razão molar <i>versus</i> quantidade de água. Os menores valores na escala correspondem aos menores níveis da variável, enquanto que os valores maiores representam os níveis mais elevados da mesma ..	36
Figura 4.2 – Curvas de contorno para CALB-MCI em função da taxa inicial de reação de síntese de ésteres metílicos para (a) Razão molar <i>versus</i> quantidade de enzima; (b) quantidade de água <i>versus</i> quantidade de enzima; (c) Razão molar <i>versus</i> quantidade de água. Os menores valores na escala correspondem aos menores níveis da variável, enquanto que os valores maiores representam os níveis mais elevados da mesma.....	40
Figura 4.3 – Cinética de síntese de metil ésteres sob as condições otimizadas. (–□–) CALB-435; (–□–) CALB-MCI	45

Figura 4.4 – SDS-PAGE de diferentes derivados de CALB. Linha 1: marcador de peso molecular (kDa); linha 2: CALB-435; linha 3: CALB-MCI. (Fonte: adaptado de Graebin <i>et al.</i> , 2012)	47
Figura 4.5 – Enzimas recuperadas após o 1º ciclo reacional. Tratamento com hexano: a) CALB-435 e b) CALB-MCI; Tratamento sem lavagem: c) CALB-435 e d) CALB-MCI.....	49
Figura 4.6 – Estabilidade operacional dos biocatalisadores em 8 ciclos de reuso. (–□–) CALB-MCI; (–□–) CALB-435. Símbolos fechados: tratamento com hexano; Símbolos abertos: sem tratamento. Todas as reações foram desenvolvidas sob as condições otimizadas com duração de 24 horas.....	50
Figura B1 – Diagrama de Pareto obtido a partir do DCCR para a enzima CALB-435, tendo como variável resposta taxa inicial de reação de síntese de ésteres metílicos	68
Figura B2 – Diagrama de Pareto obtido a partir do DCCR para a enzima CALB-MCI, tendo como variável resposta taxa inicial de reação de síntese de ésteres metílicos	69
Figura B3 – Superfície de resposta em função da taxa inicial de reação ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) correspondente ao efeito das variáveis razão molar álcool:óleo <i>versus</i> quantidade de enzima. A) CALB-435; B) CALB-MCI	70
Figura B4 – Superfície de resposta em função da taxa inicial de reação ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) correspondente ao efeito das variáveis quantidade de água <i>versus</i> quantidade de enzima. A) CALB-435; B) CALB-MCI	70
Figura B5 – Superfície de resposta em função da taxa inicial de reação ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) correspondente ao efeito das variáveis quantidade de enzima <i>versus</i> razão molar. A) CALB-435; B) CALB-MCI.....	71

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Composição percentual de ácidos graxos presentes em óleos vegetais. Fonte: NETO <i>et al.</i> , 2000; CORSINI <i>et al.</i> , 2008	6
Tabela 2.2 – Trabalhos que utilizam a transesterificação enzimática de óleos e gorduras na síntese de biodiesel	10
Tabela 3.1 - Variáveis do processo de transesterificação e dos seus limites utilizadas na CCD	29
Tabela 4.1 - Valores reais e codificados e resposta do DCCR para as enzimas CALB-435 e CALB-MCI.....	33
Tabela 4.2 - Análise estatística do DCCR para CALB-435. * Estatisticamente significativo a 95 % de confiança.....	34
Tabela 4.3 – Resultados da otimização das variáveis de reação para enzima CALB-435. * RM = Razão molar álcool:óleo; % ENZ = quantidade de enzima; % ÁGUA = quantidade de água	37
Tabela 4.4 - Análise estatística do DCCR para CALB-MCI. * Estatisticamente significativo a 95 % de confiança.....	38
Tabela 4.5 – Resultados da otimização das variáveis de reação para enzima CALB-MCI. * RM = Razão molar álcool:óleo; % ENZ = quantidade de enzima; % ÁGUA = quantidade de água	41
Tabela 4.6 – Dados de perda de massa de enzima nos ciclos com tratamento com hexano ...	48
Tabela A1 – Teor de ésteres metílicos produzido pelas lipases estudadas	67
Tabela A2 – Estabilidade operacional dos biocatalisadores em 8 ciclos de reuso	67

Lista de Símbolos

CG – Cromatógrafo gasoso
FID – Detector de ionização de chama
mg - miligramas
mM – milimolar
PNPB – p-nitrofenil butirato
RPM – Rotações por minuto
seg – segundos

Siglas

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM – Sociedade Americana de Testes e Materiais
Asp – Ácido aspártico
CMC – Concentração micelar crítica
DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional
GLU – Glutaraldeído
His – Histidina
MSR – Metodologia de Superfície de Resposta
Ser – Serina
SiO₂-PVA – suporte híbrido sílica - álcool polivinílico

Letras gregas

α – Conformação α -hélice enzimática

β – Conformação β -pregueada enzimática

CAPÍTULO 1

Introdução

As reações de esterificação e transesterificação têm grande importância industrial, na produção de sabores e aromas e para a produção de ésteres de biodiesel. O biodiesel é uma mistura de mono-álquil ésteres de ácidos graxos, obtido pela transesterificação de óleos vegetais com alcoóis de cadeia curta (geralmente metanol), sendo esta reação catalisada por diversos tipos de agentes. Além dos óleos vegetais, também pode ser utilizadas outras fontes de matéria-prima como gordura animal, resíduos de óleos das indústrias de extração e restaurantes, e óleo de microalgas (ANTCZAK *et al.*, 2009).

Em razão da maior rapidez, simplicidade e eficiência, a catálise em meio alcalino ainda prevalece como a rota tecnológica mais comumente utilizada para a produção industrial de biodiesel. No entanto, um de seus maiores inconvenientes está relacionado à inevitável produção de sabões, tanto pela neutralização dos ácidos graxos livres quanto pela saponificação dos triacilglicerídeos. Reações secundárias como estas são indesejáveis, pois além de consumirem parte do catalisador, dificultam o processo de separação do glicerol e a purificação do biodiesel, diminuindo o rendimento da reação (AKOH *et al.*, 2007; LEUNG *et al.*, 2010). Soma-se a isso a geração de grandes quantidades de efluentes aquosos alcalinos quando se utiliza a “lavagem por via úmida” para a remoção do catalisador dissolvido, além da remoção completa do álcool e de qualquer tipo de material inorgânico utilizado na reação (DABDOUB *et al.*, 2009).

A opção pelo uso de catalisadores enzimáticos, principalmente as lipases, destaca-se como uma alternativa à catálise alcalina devido às vantagens que este processo oferece tais como: condições brandas de operação, facilidade na remoção do catalisador do meio onde se encontra o produto e possibilidade de reutilização do mesmo em vários ciclos reacionais (LECA *et al.*, 2010).

O processo enzimático utiliza diversas lipases derivadas predominantemente de bactérias, fungos e leveduras, tais como: *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* e bactérias do gênero *Pseudomonas* (RIBEIRO *et al.*, 2011). Estas enzimas possuem a função biológica de catalisar a hidrólise parcial ou completa de gorduras e óleos, desempenhando um papel fundamental no metabolismo dos lipídeos. No entanto, em meios reacionais com restrição de água, podem ainda catalisar outros tipos de reação, a exemplo da transesterificação (SOUZA, 2010).

Cada enzima catalisa, geralmente, uma única reação química ou um conjunto muito restrito de reações intimamente relacionadas, sendo que a formação de produtos secundários residuais raramente ocorre. A especificidade para com o substrato é muita elevada, sendo por vezes absoluta (CASTRO *et al.*, 2004). Todavia, a atividade enzimática é, geralmente, muito sensível às condições reacionais, que podem conduzir à sua inativação. A imobilização de enzimas em suportes sólidos surge como uma importante ferramenta para a estabilização da enzima em função das interações físicas e químicas que ocorrem entre o suporte e as moléculas da mesma.

Entre outras vantagens, a imobilização promove geralmente um aumento da estabilidade da enzima frente à temperatura e a solventes orgânicos e permite a sua fácil separação do meio de reação, possibilitando sua reutilização. Essas vantagens fazem com que a catálise enzimática torne-se atrativa para o setor industrial, já que o custo das lipases ainda é o principal obstáculo em relação à exploração de seu potencial (RODRIGUES *et al.*, 2008b; RODRIGUES, 2009; IDRIS e BUKHARI, 2012).

As lipases podem ser imobilizadas em diferentes suportes de natureza orgânica e inorgânica com o emprego de diversos métodos de imobilização tais como adsorção física, encapsulação, reticulação (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004), ou por ligação covalente (RODRIGUES *et al.*, 2009a). A adsorção física de enzimas em suportes sólidos hidrofóbicos é a técnica mais empregada industrialmente devido principalmente ao baixo custo, pois não é necessária a ativação do suporte e permite fácil reuso do derivado imobilizado após vários ciclos (SECUNDO *et al.*, 2008).

Com base nesses aspectos, o presente trabalho teve por objetivo estudar a síntese de ésteres metílicos, a partir do óleo de soja, via transesterificação enzimática. Como catalisadoras foram empregadas a lipase do tipo B de *Candida antarctica* imobilizada em suporte hidrofóbico MCI GEL CHP20P, e a mesma lipase imobilizada comercialmente denominada Novozym 435. Os objetivos específicos foram: (i) sintetizar ésteres metílicos utilizando a enzima CALB imobilizada em esferas de estireno-divinilbenzeno comparando com a comercial Novozym 435; (ii) verificar, através de um planejamento estatístico, a influência das variáveis de processo: quantidade de enzima, quantidade de água e razão molar álcool:óleo sobre a conversão em metil ésteres; (iii) comparar o rendimento da transesterificação das duas formas imobilizadas de *Candida antarctica*; (iv) reutilização das enzimas imobilizadas em sucessivos ciclos de operação.

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Biodiesel

2.1.1 Aspectos gerais

Segundo a Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM), o biodiesel é classificado como uma mistura de ésteres de cadeias longas derivadas de ácidos graxos oriundos de lipídios renováveis (fontes não fósseis) como óleo vegetal ou gordura animal (ZHANG *et al.*, 2003).

No Brasil, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, através da lei nº 11097 de 13 de janeiro de 2005 definiu o biodiesel como sendo: “Biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” (ANP, 2008).

O biodiesel possui algumas características que representam vantagem sobre os combustíveis derivados do petróleo. Essas vantagens incluem, em nível de Brasil, redução à dependência de importação de petróleo, a ausência praticamente completa de enxofre e de compostos aromáticos, a presença de maior ponto de fulgor e alto número de cetano, que proporciona períodos mais curtos de atraso da ignição (ENCINAR *et al.*, 2002). Além disso, sequestra mais gás carbônico da atmosfera durante a sua produção do que emite quando está

sendo queimado, ajudando, com isto, a controlar o crescente conteúdo de gás carbônico da atmosfera (GHESTI *et al.*, 2012). Outra importante vantagem do biodiesel é referente a maior disponibilidade de matérias primas para sua produção em uma grande variedade de fontes renováveis, cujos resíduos são de rápida biodegradabilidade (PARENTE, 2003).

Os óleos vegetais mais comuns para produção de biodiesel no Brasil são os provenientes do milho, amendoim, algodão, palma e soja (GERIS *et al.*, 2007). O óleo de soja surgiu como um subproduto do processamento do farelo e, atualmente, tornou-se um dos mais produzidos no mercado de óleos vegetais. Dada a importância do agronegócio da soja no mercado brasileiro, é relativamente fácil reconhecer que essa oleaginosa apresenta o maior potencial para servir de modelo ao desenvolvimento de um programa nacional de biodiesel, visto que quase 90 % da produção de óleo no Brasil provém dessa leguminosa (CAIXETA, 2009). Outras fontes de triacilgliceróis para produção do biodiesel são provenientes de gorduras animais e óleos residuais como os oriundos da fritura de alimentos (RODRIGUES, 2009). Quimicamente, os óleos e gorduras animais e vegetais consistem de moléculas de triacilglicerídeos, as quais são constituídas de três ácidos graxos de cadeia longa ligados na forma de ésteres a uma molécula de glicerol. Esses ácidos graxos variam na extensão da cadeia carbônica, no número, orientação e posição das ligações duplas (MEHER *et al.*, 2006).

O número de insaturações, o posicionamento dessas e o tamanho da cadeia refletem nos pontos de fusão e ebulição dos óleos. Para moléculas que não têm insaturações, a massa molar, a qual é proporcional ao tamanho da cadeia, é o que determina as variações do ponto de ebulição. Por consequência disso, os óleos vegetais que possuem ácidos graxos com muitas insaturações são líquidos a temperatura ambiente (20 °C). No entanto, cadeias que contêm pouca ou nenhuma insaturação apresentam maior ponto de fusão, caracterizando-as como sólidas a temperatura ambiente (RACT e GIOIELLI, 2008). Na Tabela 2.1 abaixo está apresentada a composição de ácidos graxos de diversos tipos de óleos vegetais..

Tabela 2.1 – Composição percentual de ácidos graxos presentes em óleos vegetais.

Ácidos graxos	Algodão	Milho	Mamona	Girassol	Palma	Soja
Mistúrico C14:0	0,7	-	-	traços	0,71	0,2
Palmítico C16:0	23,91	9,9	1	6,14	41,86	11
Palmitoléico C16:1	0,5	-	-	traços	0,15	traços
Estearíco C18:0	2,9	3,1	1	3,7	4,86	3,45
Oléico C18:1n9c	16,26	29,1	3	27	42,09	23
Riconoléico C18:1n9c _{10H}	-	-	90	-	-	-
Linoléico C18:2n6c	52,68	56,8	4,2	60,48	8,67	54
Linolênico C18:3n6c	0,1	1,1	0,3	traços	0,22	7
Araquídico C20:0	0,31	-	-	0,23	0,37	0,5
Behênico C22:0	0,15	-	-	0,66	-	0,3

Fonte: (NETO *et al.*, 2000; CORSINI *et al.*, 2008).

A aplicação direta dos óleos vegetais nos motores é limitada por algumas propriedades físicas e químicas dos mesmos, principalmente sua alta viscosidade, a acidez, a baixa volatilidade, os ácidos graxos livres contidos nos óleos, a presença de gomas, a deposição de carbonos e o caráter poliinsaturado, que acarretam em alguns problemas aos motores, bem como em uma combustão incompleta (KNOTHE, 2006). Visando reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, diferentes alternativas têm sido consideradas, tais como diluição, microemulsão com metanol ou etanol, craqueamento catalítico e reação de transesterificação com metanol ou etanol (FUKUDA *et al.*, 2001). Entre essas alternativas, a transesterificação tem se apresentado como a melhor opção, visto que o processo é relativamente simples promovendo a obtenção de um combustível cujas propriedades são similares as do óleo diesel (DORADO *et al.*, 2003; GERIS *et al.*, 2007).

2.1.2 Transesterificação de óleos e gorduras

Industrialmente, a transesterificação é o processo mais utilizado para a produção de biodiesel e consiste em uma reação química entre óleos vegetais ou gordura animal com álcoois primários na presença de um catalisador, resultando em uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol (Figura 2.1). Excesso de álcool na reação faz-se necessário de modo a aumentar o rendimento em ésteres, e favorecer o deslocamento químico dos reagentes para os produtos (SUAREZ *et al.*, 2007).

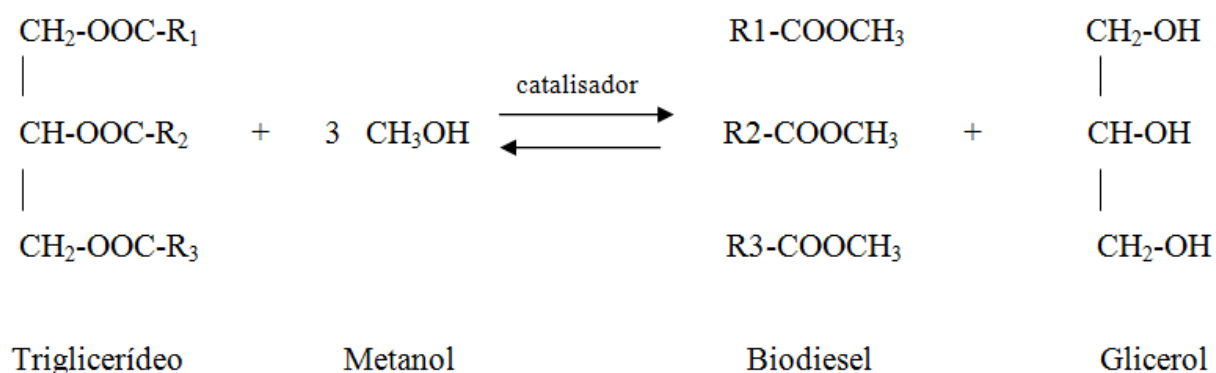


Figura 2.1 – Reação de transesterificação para síntese de biodiesel.

De forma geral, a reação de transesterificação pode ser descrita como uma reação reversível em que um éster é transformado em outro pela mudança na porção alcóxi. Esta transformação ocorre em três etapas sequenciais: inicialmente, as moléculas de triglicerídeos são convertidas em diglicerídeos, depois em monoglicerídeos e, finalmente, em glicerol, produzindo um mol de éster a cada etapa reacional. O álcool, que é considerado o agente de transesterificação, deve conter até oito átomos de carbono em sua cadeia. No entanto, devido às propriedades conferidas ao produto, os álcoois metílico (metanol) e etílico (etanol) figuram entre os principais agentes de transesterificação e são os mais freqüentemente empregados no processo (BARNWAL e SHARMA, 2005).

O álcool utilizado para a reação de transesterificação influencia na necessidade de uso de um solvente orgânico. Alcoóis de cadeia menor, como metanol e etanol, apresentam uma solubilidade menor aos óleos normalmente utilizados para produção de biodiesel. Álcoois com cadeia maior, como propanol ou butanol, apresentam melhor solubilidade ao óleo e dispensam o uso de um solvente orgânico na reação. No entanto, o metanol é mais amplamente aplicado em escala comercial e, por ser mais reativo, implica em menor temperatura e tempo de reação. O etanol, além de ter produção consolidada no Brasil, é consideravelmente menos tóxico, é renovável e produz biodiesel com maior número de cetano e lubricidade. Uma grande desvantagem do etanol está no fato deste promover uma maior dispersão da glicerina no biodiesel, dificultando a sua separação (LÔBO *et al.*, 2009).

Os catalisadores utilizados na transesterificação podem ser de diversos tipos, como alcalinos, ácidos, biocatalisadores, ou catalisadores heterogêneos, e dentre estes, apenas os alcalinos são utilizados a nível industrial (RODRIGUES, 2009).

2.1.3 Catálise alcalina

O processo de transesterificação de gorduras e óleos vegetais para a síntese de biodiesel catalisada por substâncias básicas tem sido utilizado largamente em escala industrial e altas conversões são obtidas. A catálise alcalina é aproximadamente 4000 vezes mais rápida do que a ácida quando é utilizado a mesma quantidade de catalisador, e a maior parte dos trabalhos aponta para vantagens no processo (LOTERO *et al.*, 2005).

Os catalisadores alcalinos são menos corrosivos que os catalisadores ácidos e os mais usados são os hidróxidos de potássio (KOH) e de sódio (NaOH) (GERPEN, 2005). Além disso, o catalisador alcalino exige menores razões molares entre o álcool e o óleo vegetal e altas conversões são facilmente alcançadas (FUKUDA *et al.*, 2001). Por esses motivos, os catalisadores básicos tradicionais são largamente utilizados na indústria para obtenção de biodiesel.

Um inconveniente da catálise alcalina são os problemas operacionais de reação. Quando o óleo vegetal apresenta altos teores de ácido graxo livre, são formados sabões que, além de consumirem parte do catalisador durante sua formação, acabam gerando emulsões e dificultando o processo de purificação do biodiesel e a separação da glicerina no final da reação (MEHER *et al.*, 2006; DEMIRBAS, 2008). Assim, uma grande quantidade de água é necessária para a purificação dos ésteres, gerando grandes quantidades de rejeitos aquosos com pH inadequados para descarte e o tratamento destes passa por um processo de neutralização que gera um volume ainda maior de resíduos aquosos. Além disso, as reações necessitam ser conduzidas a temperaturas elevadas com alto gasto de energia.

Entre os processos testados para contornar estes problemas, a utilização de enzimas, mais precisamente lipases, é um dos mais promissores na produção do biodiesel por transesterificação (NIE *et al.*, 2006; XIAO *et al.*, 2009; ZHENG *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2010).

2.1.4 Catálise enzimática

O processo de obtenção de biodiesel pela via a enzimática tem despertado o interesse da comunidade científica, e fatores como a fonte do óleo vegetal, o meio reacional (presença ou ausência de solvente orgânico), tipo de álcool, e razão molar álcool:óleo são os principais focos das investigações (ISO *et al.*, 2001; ENCINAR *et al.*, 2002; HA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2008b; LECA *et al.*, 2010; GAGNON e VASUDEVAN, 2011).

As enzimas apresentam propriedades que as tornam altamente requisitadas como catalisadores. Elas são versáteis e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido, em condições brandas de reação. Além disso, a atividade enzimática pode ser regulada com relativa facilidade, bastando modificar as condições do meio de reação, como, por exemplo, pela alteração do valor de pH ou pela adição de algum inibidor. Toda enzima, em razão da sua grande especificidade, catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas indesejáveis que são comuns em sínteses químicas. Os processos industriais que empregam enzimas são, em geral, relativamente simples, fáceis de controlar e energeticamente eficientes (OLIVEIRA e MANTOVANI, 2009) e, além disso, a separação do glicerol gerado como subproduto e a purificação dos ésteres produzidos é facilmente realizada (FUKUDA *et al.*, 2001).

A transesterificação catalisada por lipases é aplicável aos óleos vegetais refinados e brutos contendo ácidos graxos livres (AGL), resíduos de gorduras e de fritura. Como doadores acila, diversos alcoóis podem ser empregados, entre os principais, destacam-se o metanol e o etanol (RANGANATHAN *et al.*, 2008), que são utilizados em excesso para proporcionar alto rendimento na reação.

Além disso, as lipases empregadas em reações de síntese de biodiesel são preferencialmente utilizadas na forma imobilizada, pois este processo reduz o efeito de inativação da enzima na presença de álcoois de cadeia curta e a solventes, e permite a reutilização do biocatalisador, reduzindo os custos do processo. Na Tabela 2.2 se encontram diversos estudos visando à síntese de biodiesel pela rota enzimática desenvolvidos nos últimos anos.

Tabela 2.2 – Trabalhos que utilizam a transesterificação enzimática de óleos e gorduras na síntese de biodiesel.

Lipase	Suporte de imobilização	Álcool	Óleo	Conversão (%)	Tempo (h)	Referência
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Resina acrílica	Metanol	Soja	66 %	12 h	(HA <i>et al.</i> , 2007)
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Resina acrílica	Metanol	Algodão	97 %	24 h	(ROYON <i>et al.</i> , 2007)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Poliuretano ativada com GLU	Metanol	Canola	90 %	24 h	(DIZGE e KESKINLER, 2008)
<i>Pseudomonas cepacia</i> (Amano)	Esferas de hidrogel	Metanol	Girassol	70 %	24 h	(MARDER <i>et al.</i> , 2008)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Sílica	Metanol	Milho	85 %	12 h	(WANG <i>et al.</i> , 2008)
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Resina acrílica	Metanol	Palma	92 %	10 h	(TALUKDER <i>et al.</i> , 2009)
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Resina acrílica	Metanol	Soja	97 %	25 h	(ZHENG <i>et al.</i> , 2009)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SiO ₂ -PVA	Etanol	Palma	86 %	24 h	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Resina acrílica	Etanol	Palma	91 %	24 h	(SILVA <i>et al.</i> , 2011)
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Resina acrílica	Etanol	Soja	85 %	24h	(ROSSET <i>et al.</i> , 2011)

2.2 Lipases

2.2.1 Considerações iniciais

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza protéica constituídas por longas cadeias de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas, segundo um arranjo tridimensional. Apresentam uma elevada eficiência catalítica em condições operacionais suaves, como temperaturas brandas, pressão atmosférica e pH próximo do neutro, o que permite realizar

transformações químicas complexas mesmo quando em pequenas quantidade (BETSY e KEOGH, 2005). São, portanto, um tipo de proteína com atividade catalítica, sendo que a singularidade desses compostos decorre do elevado grau de especificidade ao substrato sob as quais atuam.

As enzimas são classificadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam ou o tipo de reação que catalisam. Nesse contexto, as lipases classificam-se como enzimas que pertencem à classe das hidrolases (E.C.3.1.1.3), que “in vivo” catalisam a hidrólise de triglicérides aos ácidos graxos correspondentes e glicerol na interface água e óleo (SHARMA *et al.*, 2001; MENDES *et al.*, 2011). São capazes de catalisar não apenas reações de hidrólise, mas também atuam na alcoólise e aminólise, e “in vitro”, as lipases podem atuar também como catalisadoras em reações de esterificação ou transesterificação, quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (KRISHNA *et al.*, 2000).

Lipases são usualmente obtidas a partir de fontes animais (estômago, tecido adiposo, vascular e linfático, lisossomos), vegetais (oleaginosas) e microbianas (bactérias e fungos), exercendo um papel chave na modificação biológica de lipídios. A maioria das lipases utilizadas como catalisadores em síntese orgânica são de origem microbiana, como as lipases de *Candida rugosa* (MORENO-PIRAJÁN e GIRALDO, 2011), *Pseudomonas fluorescens* (DEVANESAN *et al.*, 2007), *Rhizopus oryzae* (LI *et al.*, 2007), *Burkholderia cepacia* (KAWAKAMI *et al.*, 2011), *Aspergillus niger* (XIAO *et al.*, 2011), *Thermomyces lanuginosus* (RODRIGUES *et al.*, 2009b), *Rhizomucor miehei* (AL-ZUHAIIR *et al.*, 2007) e *Candida antarctica* (LIU *et al.*, 2010). As razões para o enorme potencial biotecnológico de lipases microbianas devem-se à (a) serem mais estáveis em solventes orgânicos, (b) não necessitarem de co-fatores, (c) possuírem uma grande especificidade ao substrato e (d) exibirem uma alta enantioseletividade (JAEGER e EGGERT, 2002), além de poderem ser produzidas em abundância por fermentação.

A aplicabilidade de lipases na indústria é potencialmente muito grande, estando entre os biocatalisadores mais utilizados na área de química orgânica (DIAZ *et al.*, 2006), em reações de síntese de medicamentos (JAEGUER *et al.*, 1999), síntese de ésteres de biodiesel (HA *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008a; CHEN *et al.*, 2009) e síntese de ésteres de aromas e sabores (PANDEY *et al.*, 1999; GRAEBIN *et al.*, 2012). Lipases também são empregadas na biorremediação de solos e

efluentes para remoção de óleos presentes nas águas residuais de indústrias de refinação de óleos, fábricas de laticínios, restaurantes ou residências (ALBERTON *et al.*, 2010).

Outros campos de aplicação para as lipases são na indústria têxtil, onde auxiliam na remoção de lubrificantes, a fim de promover uma melhor absorção da tinta ao tecido (HASAN *et al.*, 2006). Também são utilizadas na tecnologia de fabricação de detergentes, onde são adicionadas ao processo para promoverem a remoção de manchas de gordura em tecidos (CASTRO *et al.*, 2004).

2.2.2 Ativação interfacial das lipases

A partir dos estudos estruturais disponíveis na literatura entende-se que o sítio catalítico das lipases é bastante complexo e a estrutura da enzima ao redor do sítio ativo varia significativamente de uma lipase para outra. Entretanto, alguns elementos estruturais são comuns para todas as lipases: a tríade catalítica, formada por resíduos dos aminoácidos serina, histidina e aspartato (ou glutamato) e um dobramento característico na conformação α/β hidrolase (JAEGER *et al.*, 1994). A estrutura tridimensional da lipase do tipo B de *Candida antarctica* e seu sítio ativo estão apresentados na Figura 2.2.



Figura 2.2 – Estrutura tridimensional da lipase do tipo B de *Candida antarctica*, com os respectivos resíduos dos aminoácidos do sítio ativo (Fonte: adaptado de KNOW *et al.*, 2007).

A tríade de aminoácidos é freqüentemente protegida na molécula por uma cadeia polipeptídica hidrofóbica em forma de α -hélice comumente chamada de tampa, ou *lid*, que, ao interagir com a interface lipídeo/água, sofre uma mudança conformacional expondo o sítio ativo. Estudos de raios-X realizados por Uppenberg e colaboradores (1995), com a lipase da *Candida antarctica*, revelam a existência de uma “tampa” similar recobrendo a tríade catalítica Ser-His-Asp. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases (JAEGER e REETZ, 1998).

Em ambientes aquosos, sem o seu substrato natural, a “tampa” cobre o sítio catalítico, a lipase é inativa, e diz-se que ela está na sua forma “fechada”. Na presença de substratos hidrofóbicos, as lipases são “adsorvidas” na interface hidrofóbica, o que promove mudanças dramáticas na estrutura enzimática, levando à forma “aberta” da lipase, deixando a enzima ativa. Nesta conformação, o movimento do *lid*, não apenas abre o acesso ao sítio ativo como também expõe uma extensa zona hidrofóbica que interage favoravelmente com a interface lipídica (DEREWENDA *et al.*, 1992) (Figura 2.3). Esta mudança na estrutura tridimensional da lipase em interfaces água/óleo é conhecida como “ativação interfacial”.

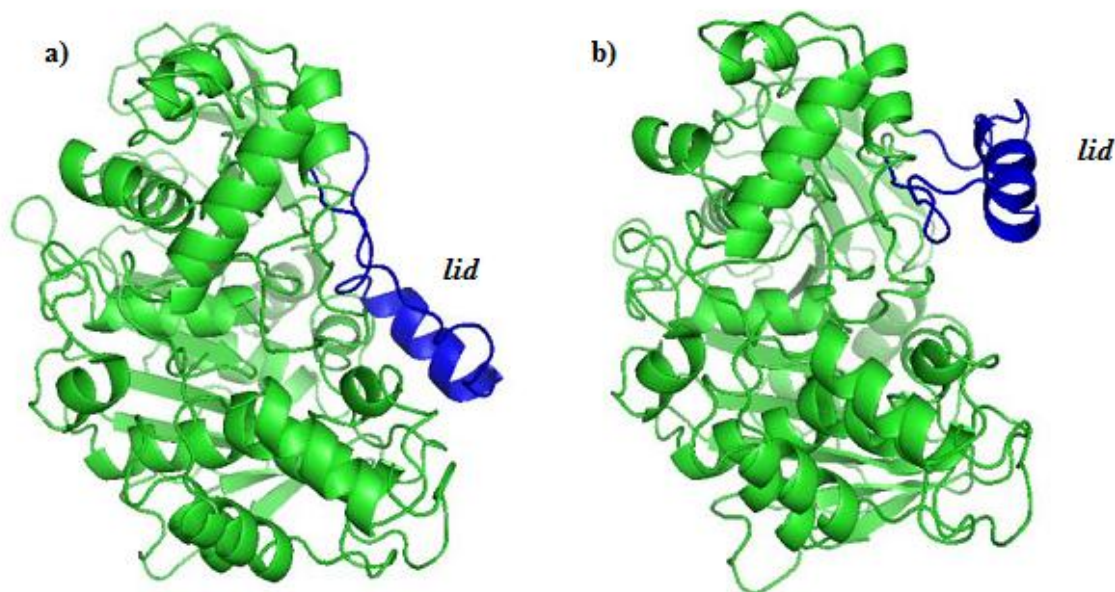


Figura 2.3 – Distintas conformações da lipase de *Candida rugosa*. (a) Conformação fechada; (b) Conformação aberta. Estruturas obtidas através do Protein Data Bank (PDB) utilizando o software Pymol v. 0.99. Os códigos pdb para as lipases são: 1trh e 1crl, respectivamente (Fonte: RODRIGUES, 2009).

O fenômeno da ativação interfacial foi proposto por Sarda e Desnuelle (1958) após verificar diferença no comportamento de cinética entre enzimas. Os autores verificaram que a

atividade de esterases era função da concentração do substrato de acordo com o modelo clássico de Michaelis-Menten, no qual a velocidade máxima ocorria antes do limite de solubilidade do substrato ser atingido e da formação de agregados e/ou interfaces. Já a atividade das lipases, se caracterizou por manter-se constante até que a concentração micelar crítica (CMC) do substrato no sistema fosse alcançado, e aumentando a partir desse ponto. Desse modo, a ativação interfacial ficou caracterizada como o fenômeno de aumento de atividade enzimática quando há formação de interfaces.

A lipase do tipo B de *Candida antarctica* (CALB) tem sido a lipase mais amplamente utilizada em sínteses orgânicas (ANDERSON *et al.*, 1998). Com sua estrutura completamente elucidada (UPPENBERG *et al.*, 1994) e mecanismo do sítio catalítico bem conhecido (KWON *et al.*, 2007), essa enzima tem sido amplamente usada nas pesquisas e na indústria, principalmente por possuir uma característica chamada promiscuidade catalítica (COPLEY, 2003), que é a habilidade do sítio ativo da enzima em catalisar diferentes transformações químicas, demonstrando alta estereoespecificidade em substratos quirais durante a hidrólise ou a síntese orgânica.

2.2.3 Mecanismo de atuação das lipases

Independente do tipo de reação catalisada (hidrólise, esterificação ou transesterificação), a descrição mais geral e aceita da ação catalítica da lipase é o mecanismo Ping Pong Bi-Bi (BOUSQUET-DUBOUCH *et al.*, 2001). Este mecanismo leva em consideração o que se passa no sítio ativo da enzima que é constituído pela tríade catalítica serina 105, histidina 224 e aspartato 187 (Figura 2.4).

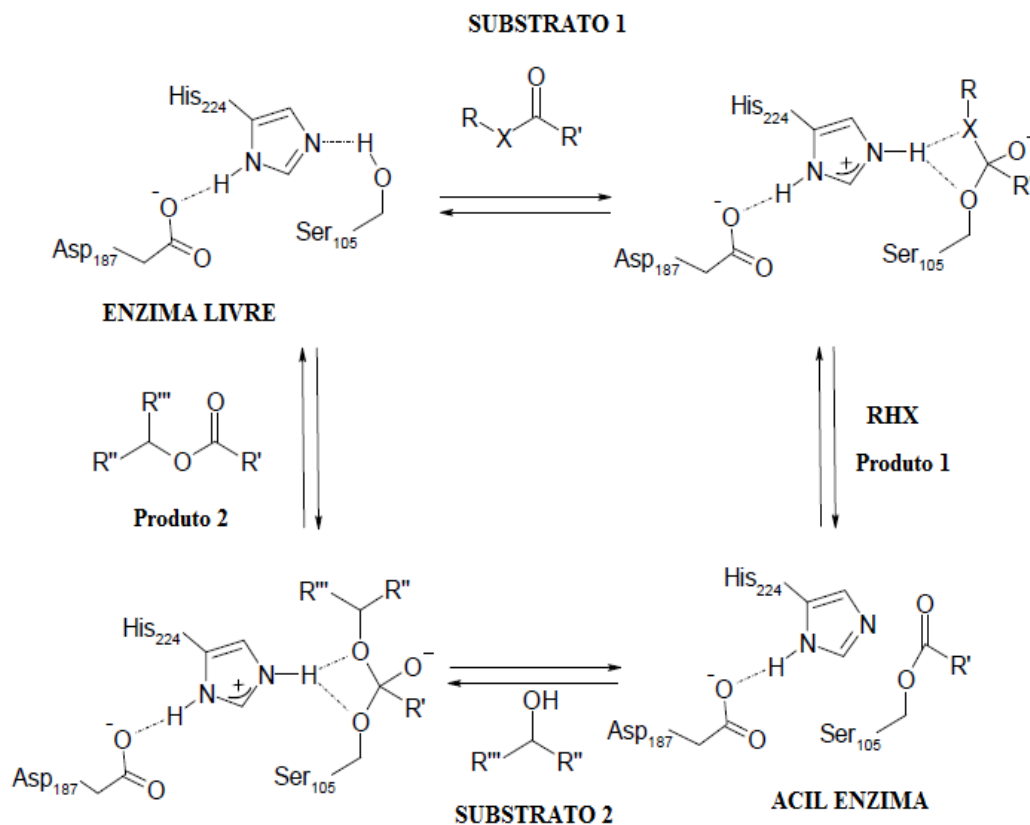


Figura 2.4 – Mecanismo de reação de transesterificação com a lipase do tipo B de *Candida antarctica*. (Fonte: adaptado de DIJKSTRA, 2006).

Reações enzimáticas com dois substratos são chamadas de reações de transferência de grupos onde um grupo é transferido pela enzima de um doador para um receptor de elétrons. Neste tipo de reação, que envolve dois substratos e dois produtos (reação bibi), a enzima reage com o primeiro substrato (triglicerídeo) para formar um complexo intermediário que se decompõe formando um diglicerídeo (Produto 1) e uma enzima covalentemente modificada (intermediário acil-enzima), que, por sua vez, interage com o segundo substrato (álcool) para formar o segundo produto (o éster alquílico, Produto 2) liberando a enzima original. Repetindo-se o ciclo, sendo o Produto 1 o novo substrato, tem-se a formação de glicerina e éster alquílico.

Inicialmente, o átomo de carbono do grupo carbonila do substrato é atacado pelo oxigênio do grupo hidroxila da serina. Mediante a transformação da ligação C=O do substrato numa ligação simples o átomo de oxigênio adquire uma carga negativa. Forma-se assim um complexo de transição intermediário com geometria tetraédrica em torno do referido átomo de carbono por meio de pontes de hidrogênio entre o oxianion e dois grupos NH das cadeias principais. Como resultado da formação deste complexo, um próton é transferido da serina para a histidina. O aspartato, que é desprotonado, neutraliza parcialmente a carga que se

desenvolve no complexo de transição. Como a forma protonada da histidina perde o próton, a ligação da carbonila é refeita e desfaz-se o intermediário tetraédrico liberando o álcool como primeiro produto. A cadeia alquílica do primeiro substrato permanece covalentemente ligada à serina, formando o intermediário acil enzima finalizando a primeira etapa da acilação. Na etapa posterior, uma desacilação ocorre de forma semelhante, mas na ordem inversa. O álcool ataca nucleofílicamente o intermediário acil enzima, formando mais uma vez, com o auxílio da histidina, um novo intermediário tetraédrico que colapsa liberando o segundo produto, o éster. Conseqüentemente, a enzima retorna ao estado inicial (FALCÃO, 2011).

2.2.4 Técnicas de imobilização de lipases

Como o custo de produção da lipase é um dos maiores obstáculos para a comercialização dos processos catalisados por esta enzima, várias alternativas têm sido investigadas visando desenvolver sistemas que tenham custos competitivos. A recuperação com o reuso da enzima representa uma das opções e, para isso, a imobilização da enzima em suportes sólidos adequados tem sido utilizada para atingir esses objetivos.

A imobilização tem como finalidade aproveitar o potencial catalítico das enzimas e torná-las insolúveis ao meio reacional permitindo sua reutilização e facilitando a recuperação dos produtos, além de minimizar a produção de efluentes (ZANIN e MORAES, 2004). Além disso, muitas vezes com o processo de imobilização, as propriedades enzimáticas são alteradas, produzindo biocatalisadores com atividade, especificidade e estabilidade aumentadas, dependendo do tipo de imobilização e da enzima (PERSSON *et al.*, 2002). Dessa forma, ao se obter uma enzima imobilizada ativa, estável e com boa especificidade ao substrato, a maioria das desvantagens das enzimas durante o processo catalítico são eliminadas.

Lipases imobilizadas são geralmente usadas para executar biotransformações das mais interessantes aplicações industriais que muitas vezes ocorrem em meio não aquoso. Muitas técnicas e diferentes suportes têm sido empregados para imobilização de lipases, e estes têm sido bem sucedidos para a imobilização sobre materiais hidrofóbicos e hidrofílicos, tais como partículas porosas de kaolinita, resinas macroporosas, zeólitas, esferas SiO₂ funcionalizadas em nanoescala, etc. (MACARIO *et al.*, 2008).

As técnicas usualmente empregadas para imobilizar enzimas em suportes sólidos são baseadas em mecanismos físicos e químicos, sendo os principais processos de imobilização

classificados em cinco tipos (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004): (a) Separação por membranas - neste método, a enzima encontra-se fisicamente separada do meio de reação, através de uma película (membrana) semipermeável; (b) Microencapsulação - consiste na preparação de um sistema emulsificado, onde a enzima está confinada no interior de micelas; (c) Entrelaçamento em polímeros - neste caso, as enzimas são aprisionadas entre as malhas de um polímero geleiforme; (d) Por formação de ligação covalente - a enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações químicas covalentes, que são normalmente estabelecidas entre os aminogrupos primários e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima e os grupos reativos do suporte; (e) Imobilização por adsorção - este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, por meio de ligações eletrostáticas e hidrofóbicas, tais como interações iônicas, forças de “van der Waals”, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Este último tipo de imobilização causa uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima, se comparado a imobilização covalente, e por isso, geralmente não promove perda da atividade catalítica (SALIS *et al.*, 2008).

2.2.4.1 Imobilização de lipases pelo método de adsorção

Entre os métodos de imobilização já citados, a adsorção hidrofóbica através do mecanismo de ativação interfacial vem se tornando um método muito promissor na área de imobilização, pois é capaz de combinar as etapas de adsorção, purificação e imobilização com elevada ativação da lipase. No setor industrial, este é o procedimento mais empregado, pois é de baixo custo e causa poucos efeitos deletérios para a atividade e seletividade enzimática (SECUNDO *et al.*, 2008).

A adsorção consiste na incubação do suporte em uma solução enzimática e nesse processo ocorre a transferência de proteínas (adsorvato) para uma superfície sólida (adsorvente). As forças de ligação envolvidas nesse processo são estabilizadas por mudanças entrópicas ou hidrofóbicas, onde enzimas que possuem uma extensa superfície hidrofóbica irão interagir melhor com suportes hidrofóbicos, enquanto que enzimas glicosiladas ou com extensa porção hidrofílica interagem favoravelmente com suportes hidrofílicos (HANEFELD *et al.*, 2009).

As lipases parecem ter uma tendência natural de serem adsorvidas em superfícies hidrofóbicas, como gotas de óleo (seu substrato natural) (PALOMO *et al.*, 2005). Isso ocorre porque estas enzimas possuem “caminhos” hidrofóbicos, ou seja, resíduos de aminoácidos concentrados em uma determinada região do sítio ativo, e que fazem com que haja uma

interação desta região com superfícies hidrofóbicas (PETKAR *et al.*, 2006). Nestas condições, as lipases “confundem” a superfície do suporte com a superfície das gotas de óleo, de forma a se adsorverem fortemente a estes suportes (Figura 2.5). No momento em que há contato com a superfície hidrofóbica, o *lid* desloca-se expondo o sítio ativo da enzima, direcionando a estrutura da lipase para a conformação aberta, imobilizando-se na sua conformação aberta e promovendo a estabilidade da enzima (PALOMO *et al.*, 2006; MATEO *et al.*, 2007).

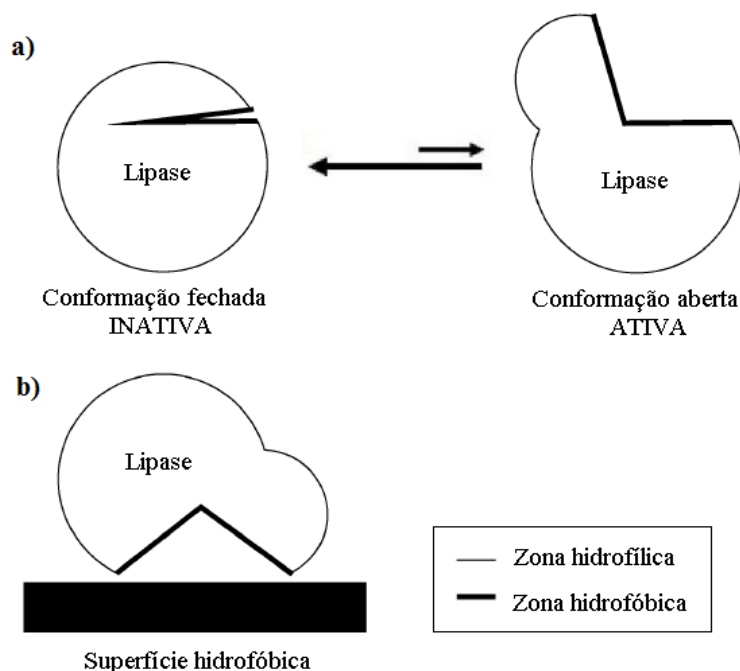


Figura 2.5 – Lipase nas conformações: (a) aberta e fechada; e (b) imobilizada em suportes hidrofóbicos. (Fonte: adaptado de HANEFELD *et al.*, 2009).

As técnicas de imobilização tornam as enzimas reutilizáveis, principalmente ao fato de manterem sua atividade ao longo de vários ciclos de reação. Para estudar este atributo, Ting *et al.* (2006) imobilizaram uma lipase de *Candida rugosa* em esferas de quitosana e utilizaram essa enzima imobilizada na hidrólise de óleo de soja. Os autores obtiveram 88 % de conversão e esse biocatalisador pode ser reutilizado por 8 vezes perdendo apenas 20 % de sua atividade inicial. Li *et al.* (2006) também reportaram a alta estabilidade de lipases frente a muitos ciclos de operação. O grupo utilizou uma combinação de duas lipases microbianas na proporção de 1 % de *Candida antarctica* (Novozym 435) e 3 % de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) 1,3-específica, alcançando um rendimento de biodiesel de 95 %. Os autores desenvolveram a reação a partir do óleo de colza utilizando ter-butanol como solvente de reação em uma proporção em volume de 1:1 sob a massa de óleo, e a razão molar de

metanol:óleo manteve-se em 4:1. A reação teve duração de 12 h e a atividade catalítica da lipase foi mantida mesmo após 100 dias, representando 200 ciclos de reutilização.

Shimada *et al.* (1999) também reportaram o grande número de ciclos de reuso com alta atividade catalítica lipásica. Os autores investigaram a metanólise contínua de óleo vegetal utilizando a lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica*. Na etapa inicial dos testes, a reação foi conduzida na razão molar de álcool:óleo de 1,5:1 e 4 % de enzima, com duração de 10 h a 30 °C. Após 95 % do metanol ter sido consumido na formação do éster, um segundo equivalente molar de metanol foi adicionado e a reação continuou durante 14 h. Um terceiro equivalente molar de metanol foi novamente adicionado e a reação continuou durante mais 24 h. Neste processo em três etapas, foi possível obter uma conversão de 98,4 % de ésteres metílicos. No entanto, os autores ainda relataram que mais de 95 % da conversão de éster foi mantida, mesmo depois de ser testado 50 ciclos de reação (100 dias).

Outra vantagem da imobilização por adsorção é que muitas vezes ela leva a um aumento da atividade das lipases. Isso foi verificado por Palomo *et al.* (2002), que imobilizaram a lipase de *Mucor miehei* em um suporte altamente hidrofóbico (Octadecyl Sepabeads) e esta apresentou uma atividade 20 vezes superior quando comparado com a forma solúvel da mesma enzima.

2.2.5 Fatores que influenciam a atividade das lipases em reações de biocatálise

Os estudos para produção de biodiesel por via enzimática têm focado principalmente a otimização dos processos de produção no sentido de se obter bons rendimentos reacionais, detalhando a influência desses fatores na atividade catalítica das lipases.

Parâmetros como tipo de álcool empregado (cadeia curta, cadeia longa ou ramificada), concentração da enzima e de água no meio de reação, razão molar entre o óleo e o álcool, temperatura, agitação, tipo de suporte de imobilização e presença ou ausência de solvente orgânico no meio reacional são alguns fatores mais estudados e tem-se observado que estes afetam de maneira significativa no rendimento da reação (BOUAID *et al.*, 2007; HE *et al.*, 2007; DIZGE e KESKINLER, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008a; HAO *et al.*, 2012).

A quantidade de água utilizada em reações de biocatálise é um fator determinante para a atividade, a estabilidade e a especificidade da enzima, onde pequenas variações no seu conteúdo podem provocar grandes modificações na atividade enzimática. As enzimas são praticamente inativas em sistemas completamente anidros, e a água, quando adicionada a

estes sistemas, atua como um tampão entre a superfície da enzima e o meio reacional, contribuindo para manter a atividade enzimática através do aumento da polaridade e da flexibilidade do sítio ativo da enzima (RAHMAN *et al.*, 2008). Por outro lado, o excesso de água facilita a agregação da enzima provocando um decréscimo de sua atividade (YANG e RUSSELL, 1996).

De forma geral, menos do que uma monocamada de água é necessária para a enzima mostrar atividade catalítica. Quando a quantidade de água aumenta, aumenta a flexibilidade da enzima e a atividade. Porém, depois de certa dose de água as reações hidrolíticas tornam-se significativas, sendo esperada então, uma redução no rendimento da reação de transesterificação provocada pela hidrólise do substrato (VILLENEUVE *et al.*, 2007). Sendo assim, o ótimo conteúdo de água tem por objetivo minimizar a reação de hidrólise e maximizar a atividade da enzima para a reação de transesterificação (NOUREDDINI *et al.*, 2005).

Para uma dada reação, o valor ótimo da água depende consideravelmente da enzima empregada, do tipo de suporte utilizado, dos diferentes grupos funcionais e arranjos tridimensionais que cada enzima possui ou, finalmente, da hidrofobicidade do suporte onde a enzima se encontra imobilizada (SALIS *et al.*, 2003).

Em um estudo desenvolvido por Villeneuve *et al.* (2007), foi analisada a capacidade da lipase de *Carica papaya* catalisar a reação de alcoolise entre trilaurina (C₁₂) e n-butanol através da variação no nível de hidratação da enzima. Para esta lipase, a variação no nível de hidratação influenciou fortemente no rendimento da reação, onde o conteúdo ótimo manteve-se em 2 % (fração mássica). Em reações catalisadas por *Carica papaya* especificamente, quantidades de água maiores que 2 % provocam a absorção de água em excesso pela enzima, o que acarreta no deslocamento do equilíbrio da reação em favor da hidrólise, diminuindo a formação do éster.

No entanto, para Noureddini *et al.* (2005) o aumento na quantidade de água usada em reações de transesterificação provoca um aumento considerável no rendimento de ésteres. No trabalho desenvolvido pelo grupo, a reação foi catalisada pela lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em um suporte hidrofóbico, o óleo de soja foi utilizado como substrato, e dois tipos de álcoois foram testados, metanol e etanol. Condições ideais de conteúdo de água foram de 5 % para um rendimento de ésteres metílicos de 67 %, e 3 % de água para rendimento de ésteres etílicos de 65 %. As reações tiveram duração de 1 h.

A razão molar de substrato também é uma variável com grande influência em reações de síntese de biodiesel. Como indicado anteriormente, a reação de transesterificação requer 3 moles de álcool por mol de triglicérido para se obter 3 moles de ésteres de ácidos graxos e de 1 mol de glicerol. O álcool é utilizado em excesso para assegurar o deslocamento do equilíbrio da reação em função da síntese, e para minimizar as limitações de difusão. Entretanto, níveis excessivos de álcool podem inibir a atividade da enzima e assim diminuir sua atividade catalítica ao longo da reação de transesterificação (RODRIGUES, 2009).

Para estudar o efeito de inibição enzimática provocado pelo excesso de álcool, Dossat *et al.* (2002) conduziram uma transesterificação de óleo de girassol enriquecido com ácido oleico para a síntese de biodiesel catalisada pela lipase imobilizada de *Mucor miehei* (Lipozyme IM-20). Foram utilizadas três razões molares álcool:óleo (3:1, 4:1 e 5:1), onde o doador acila empregado foi o butanol, com a reação ocorrendo a 40 °C e em meio isento de solvente. O maior rendimento de ésteres foi em torno de 65 % obtido com a menor proporção de álcool. O aumento da razão molar butanol:óleo promoveu a inativação da enzima, reduzindo com isso, a concentração de biodiesel formado.

Por outro lado, Saad (2005) obteve maiores rendimentos de ésteres quando utilizou a maior proporção de etanol:óleo. O autor utilizou a lipase de *Burkholderia cepacia* na transesterificação de óleo de milho, com razões molares de 3:1 e 6:1.

É importante ressaltar que cada lipase possui certa afinidade por diferentes tipos de álcoois, sendo a sua atividade fortemente influenciada. RODRIGUES *et al.* (2008b) determinaram a habilidade de três lipases imobilizadas disponíveis comercialmente (Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM e Novozym 435) na transesterificação de diferentes óleos vegetais (soja, girassol e arroz), bem como o efeito da razão molar álcool:óleo com os álcoois metanol, etanol, propanol e butanol. As razões molares testadas estavam na faixa de 3:1 a 12:1. A enzima Novozym 435 apresentou melhores rendimentos (45 %) nas reações de metanólise, empregando razão molar de 5:1 (metanol:óleo); Lipozyme TL-IM mostrou-se mais efetiva em reações de etanólise, com rendimento de 55 %, empregando razão molar 7:1 (etanol:óleo) e Lipozyme RM-IM apresentou elevados rendimentos (55 %) nas reações de butanólise, com razão molar de 9:1 (butanol:óleo). Para todas as lipases, a temperatura ótima de reação situou-se na faixa de 30 °C a 35 °C.

O teor de enzima utilizado na reação de transesterificação é outro fator determinante a ser analisado, uma vez que o aumento da quantidade de enzima favorece o aumento da velocidade da reação (RODRIGUES, 2009). Entretanto, de acordo com Krishna *et al.* (2001)

existe um limite onde a taxa de formação de produto permanece constante. No trabalho desenvolvido pelos autores, foi utilizada a lipase Lipozyme IM-20 imobilizada comercialmente na reação de esterificação de acetato de isoamila. O objetivo foi testar alguns parâmetros que afetam a reação, mas principalmente, analisar o conteúdo ótimo de enzima necessária para se obter altas taxas de conversão. Foram testadas quantidades de enzima entre 0,5 g e 10 g, com reações de duração de 72 h. Os resultados indicam que com 3 g de enzima foi possível alcançar rendimentos de 95 % de produto, ficando este valor inalterado mesmo após a adição de maiores concentrações enzimática. Isto pode ser explicado pelo fato de que o sítio ativo das moléculas de enzimas presentes em excesso na reação não estariam expostos para o substrato, e dessa forma, não apresentaram contribuição positiva para a reação (GANDHI *et al.*, 1995).

2.3 Planejamento experimental fatorial

Tendo em vista o grande número de variáveis e condições experimentais que podem afetar os processos de biocatálise, muitos trabalhos relatam o uso de um delineamento fatorial para a otimização das condições reacionais usadas em reações de síntese.

O planejamento experimental é uma ferramenta essencial no desenvolvimento de novos processos e no aprimoramento de processos em utilização. Um planejamento adequado permite a redução da variabilidade de resultados, a redução de tempos de análise e dos custos envolvidos, além de minimizar o número de experimentos, tendo como base a análise estatística. Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se, pois permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2005).

Dentre os delineamentos padrões, o Delineamento Composto Central (DCC) é o mais popular, necessitando poucos ensaios para sua realização. Basicamente, estes experimentos são fatoriais simétricos (todos os pontos equidistantes do ponto central) e de segunda ordem, que possuem características interessantes para a busca de um ponto que de a resposta ótima: um número menor de tratamentos em relação aos fatoriais completos e o fato de poderem ser realizados sequencialmente. Podem ser do tipo ortogonal ou rotacional (MATEUS *et al.*, 2001).

O delineamento composto central rotacional (DCCR) é constituído de uma parte fatorial 2^k , uma parte axial e pontos centrais. No caso de três fatores, por exemplo, há uma parte fatorial ($2^3 = 8$ tratamentos nos níveis -1 e +1, para cada fator), que permite estimar todos os efeitos de primeiro grau e o efeito das interações; seis pontos na parte axial (nos níveis $-\alpha$ e $+\alpha$ para um dos eixos e no nível zero para os outros dois fatores); e um ponto na parte central do delineamento, abrangendo $2^3 + 2 \times (3) + 1 = 15$ pontos. O valor de α define se o delineamento será do tipo ortogonal ou rotacional, por exemplo, α igual a 1,21 é um DCC ortogonal e um α de 1,68 é um DCC rotacional (MATEUS *et al.*, 2001).

Os pontos centrais melhoram as estimativas dos efeitos quadráticos e possibilitam graus de liberdade adicionais para o erro. Além disso, os pontos centrais permitem informação extra quanto ao centro da região experimental, onde os melhores valores resposta estão frequentemente localizados (MATEUS *et al.*, 2001). A Figura 2.6 é uma representação esquemática de um DCCR.

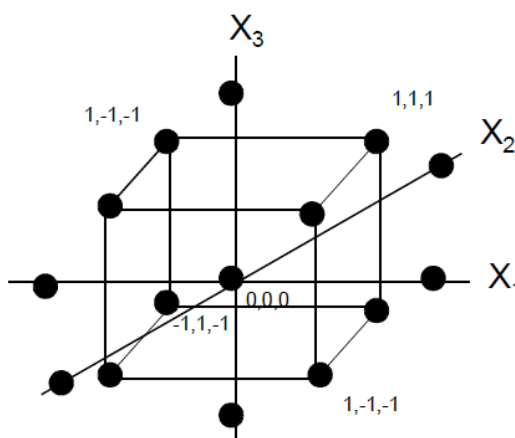


Figura 2.6 – Representação de um delineamento composto central rotacional.
(Fonte: adaptado de MATEUS *et al.*, 2001).

É possível ainda elaborar um modelo matemático, que se validado estatisticamente, pode ser usado para obtenção da Superfície de Resposta. A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), do inglês “Response Surface Methodology” (RMS), é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais e análise de experimentos, que procura relacionar respostas com os níveis de fatores quantitativos e suas interações (CHAVES, 2008). Esta metodologia é útil na determinação da influência de uma ou mais variáveis sobre outra variável de interesse, podendo ser descrita pela Equação 2.1:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad (2.1)$$

onde:

- Y é a variável de resposta;
- X_i, X_j são as variáveis referentes aos fatores;
- β_0 é o ponto de interseção;
- β_i são referentes aos efeitos lineares;
- β_{ii} são referentes aos efeitos quadráticos;
- β_{ij} são referentes aos efeitos de interação dupla;
- ε é o erro experimental (MATEUS *et al.*, 2001).

Muitos trabalhos podem ser encontrados na literatura desenvolvidos a fim de aperfeiçoar a síntese de biodiesel, através do uso de delineamento experimental. Nesse sentido, Shao *et al.* (2008) realizaram a otimização do processo de produção de biodiesel de colza através de um planejamento fatorial 2^4 , para encontrar as condições ótimas de operação por meio da metodologia de superfície de resposta (MSR). A lipase de *Candida rugosa* imobilizada em esferas de quitosana foi utilizada como catalisadora, e metanol como álcool da reação. O rendimento máximo de metil ésteres foi de 63,6 %, numa temperatura de reação de 45 °C; razão molar de 4:1 álcool:óleo; 8 % de enzima e 6 % de água. Os autores concluíram que essa metodologia é uma ferramenta adequada para a otimização do processo de produção de biodiesel, uma vez que a análise de MSR mostrou boa correspondência entre os valores experimentais e os previstos.

Shieh *et al.* (2003) também empregaram a metodologia de superfície de resposta (MSR) para avaliar a eficiência da reação de metanólise de óleo de soja utilizando a lipase de *Rhizomucor* (Lipozyme IM-77) como catalisadora. Os autores obtiveram 92 % conversão de biodiesel em 6,3 h de reação a 37 °C utilizando uma proporção molar de 3,4:1 álcool:óleo, na presença de 5,8 % de água.

Do mesmo modo, Rodrigues *et al.* (2008b) desenvolveram a síntese de ésteres etílicos, utilizando óleo de soja e etanol num sistema isento de solvente, catalisado pela lipase de *Thermomyces lanuginosus*. Um planejamento composto central aliado a MSR foram utilizados para otimizar a síntese de biodiesel a partir dos parâmetros: tempo de reação; quantidade adicionada de água; temperatura; razão molar álcool:óleo e teor de enzima. O rendimento máximo obtido experimentalmente foi de 96 %, valor muito próximo do máximo previsto na análise de 94,4 %. Estes valores demonstram que o modelo empírico derivado de

MSR pode ser usado para descrever adequadamente a relação entre os parâmetros de reação e da resposta (rendimento de conversão) na síntese de biodiesel.

CAPÍTULO 3

Materiais e Métodos

3.1 Materiais e reagentes

Lipase comercial de *Candida antarctica* (Lipozyme CALB) foi gentilmente cedida pela empresa LNF Latino Americana (Bento Gonçalves, Brasil). Lipase de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica (Novozym 435) e suporte poroso de estireno-divinilbenzeno MCI GEL CHP20P (Mitsubishi Chemical Corporation.) foram obtidos da empresa Sigma Aldrich Corporation (Saint Louis, USA). Óleo de soja refinado foi adquirido de um supermercado local sem qualquer tratamento prévio. Metanol, hexano e outros reagentes químicos foram de grau analítico.

3.1.1 Características físicas dos suportes de imobilização

3.1.1.1 Resina macroporosa metacrilato de metil-co-divinilbenzeno

O suporte utilizado na imobilização comercial de CALB possui um tamanho de partícula entre 315 μm e 1000 μm , área superficial de 130 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ e diâmetro de poro de 150 Å (CHEN *et al.*, 2008).

3.1.1.2 Resina macroporosa estireno-divinilbenzeno (MCI GEL CHP20P)

Este suporte apresenta um tamanho de partícula de 75 µm a 150 µm, uma área superficial média de 500 m² g⁻¹, e poros com diâmetro de 500 Å (HERNANDEZ *et al.*, 2011).

3.2 Métodos

Todos os experimentos desenvolvidos neste trabalho tiveram a finalidade de realizar uma comparação entre os dois tipos de derivados imobilizados de *Candida antarctica*: a) lipase Novozym 435 imobilizada comercialmente e denominada neste trabalho por CALB-435; b) lipase imobilizada no laboratório em um suporte altamente hidrofóbico denominada de CALB-MCI.

3.2.1 Procedimento de imobilização

Os itens a seguir descrevem os processos para a imobilização da enzima CALB no suporte MCI GEL CHP20P. Estes procedimentos foram desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do professor Roberto Fernandez-Lafuente, do Instituto de Catálises – ICP (Departamento de Biocatálises) do Consejo Superior de Investigaciones Científicas em Madrid, através de uma parceria entre o referido grupo e os orientadores desta pesquisa.

3.2.2 Hidratação do suporte

Suportes de estireno-divinilbenzeno são altamente hidrofóbicos e devem ser tratados, a fim de permitir que a água possa penetrar em seus poros, diminuindo sua hidrofobicidade. Uma amostra de 5 g de suporte foi ressuspensa em 50 mL de solução de acetonitrila durante 1 h sob agitação moderada, seguido pela adição de 50 mL de água. Após 1 h de agitação moderada, o suporte foi filtrado e ressuspenso em 50 mL de água e mantido por mais uma hora, sob agitação suave. Finalmente, o suporte foi lavado 5 vezes em um funil de vidro com 5 volumes de água.

3.2.3 Imobilização por adsorção

Uma quantidade de 5 g do suporte hidratado foi ressuspensa em 250 mL de uma solução enzimática de lipase (CALB) contendo 600 mg de proteína. A solução era constituída de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7. A mistura foi colocada a 20 °C durante 24 h, sob agitação suave. Após o tempo determinado, foi medida a atividade do sobrenadante através do ensaio PNPB (HERNANDEZ *et al.*, 2011) para verificar a ocorrência da imobilização. A enzima imobilizada foi filtrada e lavada com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7.

3.2.4 Delineamento experimental

Para uma avaliação mais precisa da influência de uma determinada variável sobre o rendimento da reação no processo de síntese de biodiesel metílico, realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três variáveis. Os oito primeiros ensaios referem-se ao planejamento fatorial completo 2^3 , com níveis -1 e +1, cuja função é fornecer os parâmetros lineares (L) do modelo de regressão. Os demais ensaios referem-se aos pontos axiais que foram realizados nos níveis: -1,68; 0 e +1,68, cuja função é fornecer os parâmetros quadráticos (Q) do modelo de regressão. Os últimos 4 ensaios (nível 0) são uma quadruplicata no ponto central, cujo objetivo é avaliar o erro experimental (padrão) do planejamento.

A seleção das variáveis que mais influenciam no processo de produção de biodiesel foi definida com base em trabalhos disponíveis na literatura (RODRIGUES e AYUB, 2011), e os valores das variáveis independentes e seus valores codificados e não codificados seguem na Tabela 3.1.

Neste trabalho, a massa do óleo de soja, a agitação e a temperatura usada em cada experimento foram mantidas constantes em 1 g (1,101 mmol), 180 rpm e 30 °C, respectivamente. Cabe ressaltar que o tempo de reação foi no máximo de 6 h, com amostras retiradas em determinados intervalos de tempo para medir a taxa inicial da reação ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Tabela 3.1- Variáveis do processo de transesterificação e dos seus limites utilizadas na CCD.

Variáveis	Nome	Níveis codificados				
		-1,68	-1	0	1	1,68
X ₁	Razão molar do substrato (metanol:óleo de soja)	3	4,21	6	7,78	9
X ₂	Teor de enzima por massa de óleo (%)	5	9,04	15	20,95	25
X ₃	Quantidade de água por massa de óleo (%)	0	2,02	5	7,97	10

3.2.5 Análise estatística

A influência dos fatores foi avaliada no programa Statistica 7.0 (Statsoft, EUA), no qual as variáveis independentes foram: razão molar metanol:óleo, quantidade de enzima e quantidade de água.

Os experimentos foram realizados segundo a matriz de planejamento obtida, obtendo-se uma resposta, ou seja, a taxa inicial de reação. Os efeitos das variáveis, os respectivos erros e a significância estatística (p) foram calculados a um limite de confiança de 95 %. A Análise de Resíduos foi realizada através do Teste de Significância do ajuste do modelo, baseados na Análise de Variância (ANOVA). O modelo polinomial de segunda ordem utilizado para modelagem dos dados experimentais foi determinada por equação de Fisher F-teste (Equação 3.1). A variância explicada pela modelo é dada pelos coeficientes de determinação múltipla, R^2 . As curvas de contorno e as superfícies de respostas foram obtidas para definir as faixas ótimas operacionais de cada variável.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{33} X_{32} + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \quad (3.1)$$

3.2.6 Reações de transesterificação

As reações para ambos derivados de CALB foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL com volume fixo de 1 g de óleo de soja, e quantidades variáveis de metanol, água e enzima, de acordo com a Tabela 3.1 do delineamento experimental (Seção 3.3). As misturas foram levadas para agitador orbital a 180 rpm a 30 °C.

3.2.7 Análise por Cromatografia Gasosa (CG)

Ao término das reações, o conteúdo dos frascos foi transferido para tubos tipo Falcon e lavado com 5 mL de água destilada a fim de promover a separação dos ésteres metílicos sintetizados. Os tubos foram centrifugados a 2500 g durante 5 min para separação das fases formadas, sendo elas: a) fase superior contendo os ésteres metílicos (biodiesel) e b) fase inferior contendo o glicerol, os mono-, di-, e triglicerídeos não reagidos e a enzima sedimentada.

Para o procedimento de análise do biodiesel, 0,1 mL de amostra foi misturada a 0,1 mL de padrão interno butil-hidroxitolueno de concentração 0,4 mg mL⁻¹. As amostras foram analisadas em triplicata, no cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, modelo GC-14B, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar SLB-IL100 (30 m × 0,25 mm i.d × 0,20 μm) (Supelco). A temperatura do injetor foi de 250 °C, relação *split* = 50:1 e a temperatura do detector FID foi 250 °C. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com fluxo de 40 cm seg⁻¹. As condições cromatográficas foram: temperatura inicial da coluna de 100 °C, taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹ até atingir a temperatura final de 250 °C. A quantidade de amostra injetada foi de 1 μL e o tempo total da análise foi de 60 min.

O teor de ésteres em cada amostra (C) foi calculado pela Equação 3.2, baseado em uma adaptação na Norma 14103 – método utilizado para a determinação da porcentagem de ésteres metílicos de ácidos graxo presentes em uma amostra por cromatografia gasosa com calibração interna – adequada para biodiesel com ésteres metílicos entre C₁₄ e C₂₄. Nesse caso, determinou-se o percentual total de ésteres em cada amostra, e a partir disso a taxa inicial da reação.

$$C (\%) = \frac{\Sigma A}{A_{PI}} \times \frac{C_{PI} \times V_{PI}}{m_{amostra}} \times 100 \% \quad (3.2)$$

Na qual,

ΣA = Soma da área total dos picos de ésteres metílicos de C₁₄ até C₂₄;

A_{PI} = Área do pico correspondente ao padrão interno;

C_{PI} = Concentração do padrão interno (mg mL⁻¹);

V_{PI} = Volume de padrão interno (mL);

m = Massa da amostra (mg).

3.2.8 Reuso da enzima imobilizada

Ambos os derivados imobilizados de CALB foram testados quanto à reutilização em 8 ensaios seqüenciais. As reações de transesterificação tiveram duração de 24 h e foram conduzidas de acordo com as condições operacionais otimizadas na Seção 3.2.4 do delineamento experimental.

Ao término de cada ensaio, as enzimas foram separadas do meio de reação por simples filtração e submetidas a dois diferentes tratamentos antes do novo ciclo: a) lavagem com 30 mL de solvente hexano e b) sem lavagem. Depois disso foram secas durante 24 h a 40 °C. A cada etapa de reutilização, as enzimas foram pesadas e o volume dos reagentes da reação foi corrigido para um valor proporcional à quantidade do biocatalisador, visto que poderiam ocorrer pequenas perdas de massa do material no processo.

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

4.1 Otimização dos parâmetros para transesterificação

Tendo como objetivo estudar as variáveis relevantes na reação de transesterificação, utilizou-se um planejamento experimental verificando a influencia de três variáveis independentes: razão molar metanol:óleo, concentração de enzima e concentração de água na resposta taxa inicial de reação enzimática ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$). A Tabela 4.1 mostra a matriz de planejamento dos dados experimentais, bem como o resultado da taxa inicial de reação para as enzimas CALB-435 e CALB-MCI.

Este tipo de planejamento permitiu a obtenção de modelos matemáticos com parâmetros lineares e quadráticos (múltipla regressão) das variáveis estudadas. Foram calculados os efeitos principais e de interação das variáveis, os seus respectivos coeficientes para o modelo matemático, bem como a análise de variância - ANOVA para determinar a validade do modelo.

Tabela 4.1 - Valores reais e codificados e resposta do DCCR para as enzimas CALB-435 e CALB-MCI

Experimento	RM metanol:óleo	Enzima (%)	Água (%)	CALB-435	CALB-MCI
				Taxa inicial de reação (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)	Taxa inicial de reação (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)
1	4,21:1 (- 1)	9,04 (- 1)	2,02 (- 1)	3,46	15,24
2	4,21:1 (- 1)	9,04 (- 1)	7,97 (+ 1)	5,80	6,82
3	4,21:1 (- 1)	20,95 (+ 1)	2,02 (- 1)	14,86	29,07
4	4,21:1 (- 1)	20,95 (+ 1)	7,97 (+ 1)	22,78	24,38
5	7,78:1 (+ 1)	9,04 (- 1)	2,02 (- 1)	1,95	7,98
6	7,78:1 (+ 1)	9,04 (- 1)	7,97 (+ 1)	3,35	2,60
7	7,78:1 (+ 1)	20,95 (+ 1)	2,02 (- 1)	11,95	25,26
8	7,78:1 (+ 1)	20,95 (+ 1)	7,97 (+ 1)	12,49	14,20
9	3:1 (- 1,68)	15 (0)	5 (0)	20,08	31,98
10	9:1 (+ 1,68)	16 (0)	5 (0)	10,63	18,73
11	6:1 (0)	5 (- 1,68)	5 (0)	6,77	4,92
12	6:1 (0)	25 (+ 1,68)	5 (0)	50,07	47,68
13	6:1 (0)	15 (0)	0 (- 1,68)	15,31	41,56
14	6:1 (0)	15 (0)	10 (+1,68)	21,64	8,93
15	6:1 (0)	15 (0)	5 (0)	18,81	23,51
16	6:1 (0)	15 (0)	5 (0)	22,18	24,11
17	6:1 (0)	15 (0)	5 (0)	24,22	20,90

4.1.2 Otimização das condições reacionais para lipase B de *Candida antarctica* imobilizada comercialmente (CALB-435)

De acordo com a Tabela 4.1 (Seção 4.1), a maior taxa inicial de reação para a síntese de ésteres com a enzima CALB-435 foi de 50,07 mmol L⁻¹ h⁻¹, obtido no experimento 12 nas seguintes condições de processamento: Razão molar álcool:óleo 6:1, 25 % de enzima e 5 % de água. A partir dos dados apresentados nesta tabela e com auxílio do software Statistica 7.0 foi analisado o efeito de cada um desses parâmetros na taxa de reação de síntese de ésteres metílicos.

Na Tabela 4.2 encontram-se os coeficientes de cada variável estudada, assim como os valores dos efeitos, p-valor e seus respectivos erros padrões. Para que seja tomada a decisão de que os efeitos calculados sejam estatisticamente significativos, o valor de p correspondente deve ser menor do que 0,05, ao nível de significância de 95 %.

Tabela 4.2 - Análise estatística do DCCR para CALB-435.

Variáveis	Efeito	Coefficiente de regressão	Erro padrão do coeficiente	p-valor
Média*	22,525	22,525	1,574	0,005
Linear				
X ₁	-4,845	-2,423	1,479	0,082
X ₂ *	18,612	9,306	1,479	0,006
X ₃	3,350	1,675	1,479	0,152
Quadrático				
X ₁ X ₁ *	-9,795	-4,898	1,630	0,027
X ₂ X ₂	0,879	0,440	1,630	0,644
X ₃ X ₃ *	-7,584	-3,792	1,630	0,043
Interações				
X ₁ X ₂	-2,312	-1,156	1,932	0,354
X ₁ X ₃	-2,080	-1,040	1,932	0,394
X ₂ X ₃	1,179	0,589	1,932	0,604

* Estatisticamente significativo a 95 % de confiança. X₁ - Razão molar álcool:óleo; X₂ - Quantidade de enzima; X₃ - Quantidade de água.

O efeito linear da variável quantidade de enzima (X₂) e os efeitos quadráticos das variáveis razão molar (X₁) e quantidade de água (X₃) foram estatisticamente significativos, ao nível de 95 % de confiança. Todos os outros efeitos não foram significativos (resultados correspondentes são apresentados na Figura B1 do Apêndice B).

Os dados experimentais foram ajustados pelo modelo de regressão considerando apenas as variáveis que possuem efeito significativo. A equação obtida para a taxa inicial de reação é dada pela Equação 4.1:

$$Y = 22,52 + 9,30 X_2 - 4,89 X_1^2 - 3,79 X_3^2 \quad (4.1)$$

A análise de variância (ANOVA) para o modelo foi realizada com um nível de confiança de 95 % para p = 0,0109, e a avaliação da qualidade estatística do modelo foi determinada pelo teste de Fisher, revelando um valor de F calculado de 6,50. O coeficiente de determinação apresentou um valor de R² de 0,71.

Analisando esta modelagem, o valor do coeficiente ficou um pouco abaixo de esperado, onde os valores ideais que explicam melhor o modelo são aqueles mais próximos de 1. Algumas alternativas para a correção desse valor seriam aumentar o intervalo dos níveis da variável mais problemática (quantidade de enzima) e a inclusão de mais variáveis no planejamento, que mesmo que tenham muito pouco poder explicativo sobre a variável

dependente, aumentariam o valor de R^2 . Entretanto, isto incentivaria a inclusão indiscriminada de variáveis, prejudicando o princípio da parcimónia (FARBER, 2010).

Foram construídos gráficos de curvas de contorno, pois permitem a definição das condições mais adequadas que maximizam a resposta, mostradas na Figura 4.1. Os gráficos foram utilizados para definir as faixas ótimas operacionais para o processo de produção do biodiesel metílico de óleo de soja com o derivado CALB-435, em função da taxa inicial de reação.

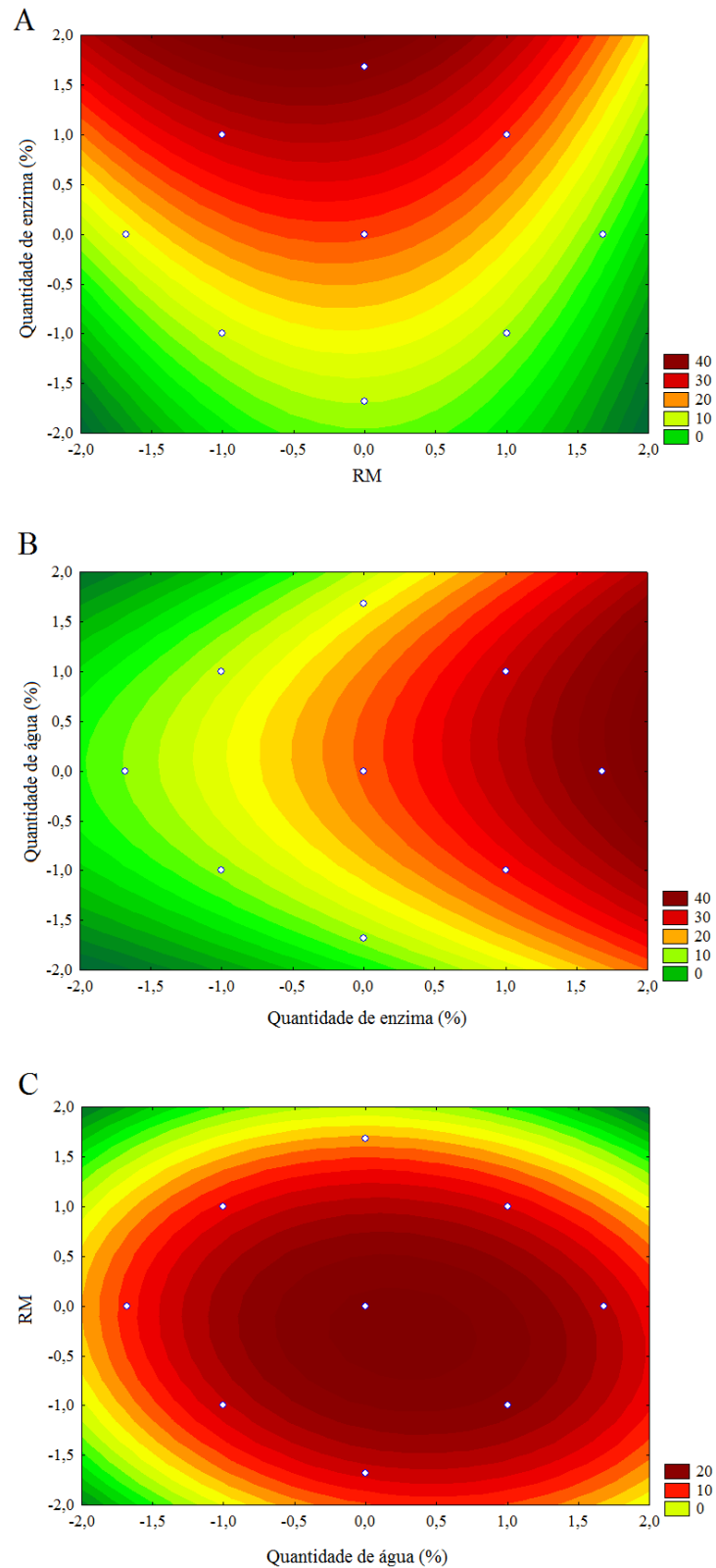


Figura 4.1 - Curvas de contorno para CALB-435 em função da taxa inicial de reação de síntese de ésteres metílicos ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) para (A) Razão molar álcool:óleo *versus* quantidade de enzima; (B) quantidade de água *versus* quantidade de enzima; (C) Razão molar *versus* quantidade de água. Os menores valores na escala correspondem aos menores níveis da variável, enquanto que os valores maiores representam os níveis mais elevados da mesma.

A Figura 4.1 (A) representa o efeito da interação entre as variáveis razão molar e quantidade de enzima sob a taxa inicial de reação, mantendo-se a variável quantidade de água fixada no ponto central. Um acréscimo na quantidade de enzima resulta em uma melhora na taxa inicial da reação, desde que a razão molar mantenha-se num nível intermediário. O mesmo ocorre na Figura 4.1 (B), que indica o efeito das variáveis quantidade de enzima e quantidade de água, com a variável razão molar fixada no ponto central. Nesta figura, a maior taxa inicial de reação será obtida no maior nível de quantidade de enzima, com um nível médio de água. A Figura 4.1 (C) representa o efeito das variáveis razão molar e quantidade de água sob a taxa inicial de reação, mantendo a variável quantidade de enzima fixada no ponto central. Ambas devem situar-se em níveis intermediários para se obter as maiores taxas de reação (resultados complementares são apresentados nas Figuras B3) A, B4) A e B5) A, no Apêndice B).

Através da otimização fornecida pela análise estatística, pode-se concluir que a maior taxa de reação para a síntese de ésteres será obtido com os seguintes níveis: razão molar álcool:óleo -0,22, quantidade de enzima +1,68 e quantidade de água 0,22. Sob estas condições, o valor predito pelo programa para a taxa inicial de reação é de $54 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Foram realizados novos experimentos para a síntese de biodiesel metílico com as condições otimizadas experimentalmente, exploradas com base no DCCR. A massa de óleo, a agitação e a temperatura de operação continuaram mantendo-se constantes em 1 g, 180 rpm e 30 °C respectivamente. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Resultados da otimização das variáveis de reação para enzima CALB-435.

Codificada			Decodificada*			Taxa inicial de reação ($\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
X_1	X_2	X_3	RM	% ENZ	% ÁGUA	
-0,22	1,68	-0,22	5,6:1	25	5,44	51,47

* RM = Razão molar álcool:óleo; % ENZ = quantidade de enzima; % ÁGUA = quantidade de água.

De acordo com as condições otimizadas, foi obtida uma taxa inicial de reação de $51,47 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabela 4.3), próximo ao valor predito pelo modelo, confirmando os dados de otimização fornecidos pela Metodologia de Superfície de Resposta. Dessa forma, os experimentos seguintes para o estudo do melhor tempo de reação, bem como os ciclos de reuso da enzima foram desenvolvidos nessas condições otimizadas.

4.1.3 Otimização das condições reacionais para a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em suporte hidrofóbico MCI GEL CHP20P (CALB-MCI)

A maior taxa inicial de reação com a enzima CALB-MCI foi de 47,68 mmol L⁻¹ h⁻¹, obtido no experimento 12 nas seguintes condições de processamento: Razão molar álcool:óleo 6:1, 25 % de enzima e 5 % de água (Tabela 4.1 – Seção 4.1). A partir dos dados apresentados na referida Tabela, e com auxílio do software Statistica 7.0 foi analisado o efeito de cada um dos parâmetros da reação.

Os mesmos procedimentos de otimização desenvolvidos para a CALB-435 foram delineados para CALB-MCI, onde a Tabela 4.4 apresenta os coeficientes de cada variável estudada, assim como os valores dos efeitos, p-valor e seus respectivos erros padrões.

Tabela 4.4 - Análise estatística do DCCR para CALB-MCI

Variáveis	Efeito	Coefficiente de regressão	Erro padrão do coeficiente	p-valor
Média*	23,514	23,514	0,985	0,002
Linear				
X ₁ *	-6,995	-3,497	0,925	0,017
X ₂ *	19,364	9,682	0,925	0,002
X ₃ *	-12,367	-6,183	0,925	0,006
Quadrático				
X ₁ X ₁	-2,729	-1,365	1,020	0,116
X ₂ X ₂	-2,062	-1,031	1,020	0,181
X ₃ X ₃	-2,812	-1,406	1,020	0,110
Interações				
X ₁ X ₂	-0,630	-0,315	1,209	0,654
X ₁ X ₃	-0,830	-0,415	1,209	0,563
X ₂ X ₃	-0,489	-0,244	1,209	0,725

* Estatisticamente significativo a 95 % de confiança. X₁ - Razão molar álcool:óleo; X₂ - Quantidade de enzima; X₃ - Quantidade de água.

Pela Tabela 4.4 acima, é possível verificar que o efeito linear da quantidade de enzima (X₂) foi positivo e significativo, indicando que as maiores taxas de reação foram obtidos nos níveis mais elevados desta variável. As variáveis lineares quantidade de água (X₃) e razão molar (X₁) também foram estatisticamente significativas, mas nesse caso apresentaram influência negativa, onde o aumento dessas variáveis ocasionou uma diminuição na taxa de reação (resultados correspondentes são apresentados na Figura B1 do Apêndice B).

Os dados experimentais da conversão foram ajustados pelo modelo de regressão considerando apenas as variáveis que possuem efeito significativo. O modelo matemático obtido para a taxa inicial de reação é descrito pela Equação 4.2, sendo estatisticamente validado:

$$Y = 23,51 - 3,49 X_1 + 9,68 X_2 - 6,18 X_3 \quad (4.2)$$

A análise de variância (ANOVA) para o modelo foi realizada com um nível de confiança de 95 % para $p = 0,0317$, e a avaliação da qualidade estatística do modelo foi determinada pelo teste de Fisher, mostrando valores de F calculado de 4,40. A modelagem mostrou-se adequada com o valor de R^2 de 0,78.

De forma análoga a CALB-435, plotou-se as curvas de contorno para as variáveis estatisticamente significativas para a enzima CALB-MCI, demonstrado na Figura 4.2.

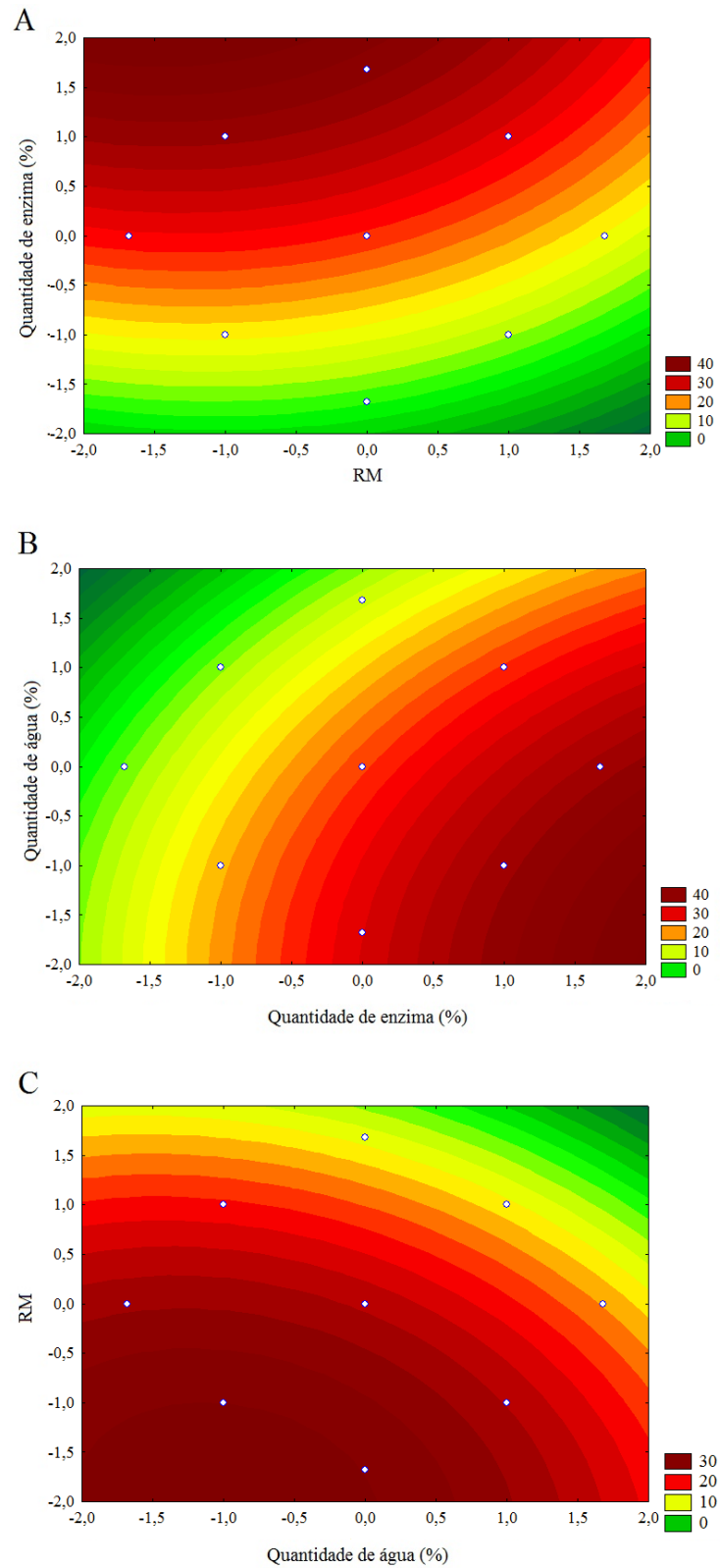


Figura 4.2 – Curvas de contorno para CALB-MCI em função da taxa inicial de reação de síntese de ésteres metílicos para (a) Razão molar *versus* quantidade de enzima; (b) quantidade de água *versus* quantidade de enzima; (c) Razão molar *versus* quantidade de água. Os menores valores na escala correspondem aos menores níveis da variável, enquanto que os valores maiores representam os níveis mais elevados da mesma.

Na Figura 4.2 (A) está representado o efeito da interação entre as variáveis quantidade de enzima e razão molar sob a taxa inicial de reação, com a variável quantidade de água mantida constante no ponto central. Observa-se que os maiores valores da taxa de reação será alcançado com os maiores níveis de quantidade de enzima, desde que, seja utilizado os menores níveis de razão molar. A Figura 4.2 (B) indica o efeito das variáveis quantidade de enzima e quantidade de água, com a variável razão molar fixada no ponto central. Nesta figura, a maior taxa inicial de reação será obtida no maior nível de quantidade de enzima, com um menor nível de quantidade de água. Na Figura 4.2 (C) é representado o efeito de interação entre as variáveis razão molar e quantidade de água sob a taxa inicial de reação, mantendo a variável quantidade de enzima fixada no nível 0. Ambas devem situar-se nos menores níveis para se obter as maiores taxas de reação (resultados complementares são apresentados nas Figuras B3) B, B4) B e B5) B, no Apêndice B).

A partir do efeito de cada uma das variáveis, pode-se concluir que a maior taxa inicial de reação será obtido com os seguintes níveis: razão molar -1,68, quantidade de enzima +1,68 e quantidade de água -1,28. Sob estas condições, o valor predito pelo modelo para se obter a maior taxa inicial de reação é de $47,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Novos experimentos foram realizados com o derivado CALB-MCI para a síntese de biodiesel metílico com as condições otimizadas experimentalmente, exploradas com base no DCCR. A massa de óleo, a agitação e a temperatura de operação foram constantes em 1 g, 180 rpm e $30 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Resultados da otimização das variáveis de reação para enzima CALB-MCI.

Codificada			Decodificada*			Taxa inicial de reação ($\text{mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
X_1	X_2	X_3	RM	% ENZ	% ÁGUA	
-1,68	+1,68	-1,28	3:1	25	1,18	57,0

* RM = Razão molar álcool:óleo; % ENZ = quantidade de enzima; % ÁGUA = quantidade de água.

Uma taxa inicial de reação de $57 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ foi alcançada (Tabela 4.5) após a otimização das variáveis. Este valor foi um pouco superior ao predito pelo modelo, entretanto, aprova os dados de otimização fornecidos pela Metodologia de Superfície de Resposta. Os experimentos seguintes de análise do tempo de reação e reuso da enzima foram conduzidos sob estas novas condições otimizadas.

Numa análise geral de comparação entre as duas formas imobilizadas da enzima de *Candida antarctica*, em praticamente todos os experimentos a CALB-MCI apresentou as

maiores taxas iniciais de reação. Constatou-se que tanto para CALB-435 como para CALB-MCI, a quantidade de enzima foi a variável que apresentou a maior influência na taxa inicial de reação, onde os maiores níveis das variáveis forneceram os melhores resultados, tal como já foi reportado em outros estudos (CHANG *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2006; RAHMAN *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2009; KUO *et al.*, 2012).

Devido ao custo elevado das enzimas, é importante determinar a quantidade adequada a ser usada, a fim de se obter altas conversões. O acréscimo de enzima na reação favorece o aumento da velocidade de reação, implicando no maior número de sítios ativos no meio reacional, promovendo assim maiores taxas de conversão de ésteres metílicos (HA *et al.*, 2007). Entretanto, de acordo com Rodwell e Kennnnelly (2003), apenas as moléculas de substrato que são combinadas com a enzima podem ser transformadas em produto, e dessa forma, há um limite onde o aumento na quantidade de enzimas não afeta a formação do produto e velocidade da reação mantém-se constante (KRISHNA *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2009c). No presente trabalho, a formação de produto teve um aumento gradual com o acréscimo de enzima dentro do tempo estipulado para o estudo, não sendo possível observar uma taxa inicial de reação constante.

No caso da variável razão molar metanol:óleo, a presença de maiores quantidades de substrato, em geral, aumenta a probabilidade de colisões entre a enzima e o substrato, conduzindo a um aumento na taxa inicial de reação (GUNAWAN *et al.*, 2005). Sabe-se que a transesterificação, sendo uma reação de equilíbrio, o excesso de álcool em pelo menos 3 equivalentes molares irá deslocar o equilíbrio químico da reação em direção a formação dos ésteres, elevando a taxa de reação. Porém, o uso de um alto volume de álcool pode distorcer a camada de água essencial que estabiliza a enzima imobilizada, diminuindo a sua atividade catalítica, reduzindo o teor de ésteres metílicos (KÖSE *et al.*, 2002). Com isso, o efeito negativo da razão molar já era esperado, uma vez que quantidades muito elevadas de álcool tendem a formar uma camada na superfície da enzima que bloqueia o acesso do substrato ao sítio ativo, inibindo ou até mesmo desnaturando a enzima, (YU *et al.*, 2007). Além disso, quando o conteúdo de metanol excede o limite de solubilidade, a enzima é inativada pelo metanol insolúvel presente nas gotas de óleo (AL-ZUHAIIR *et al.*, 2007).

Em um estudo desenvolvido por Talukder *et al.* (2009), 3:1 foi a razão molar descrita como sendo a ideal para reações de metanólise, confirmando os resultados obtidos no presente trabalho. Este grupo de autores avaliou a transesterificação do óleo de palma para a produção de biodiesel utilizando a lipase comercial de *Candida antarctica* (Novozym 435), por meio de

três diferentes métodos de reação. Num sistema livre de solvente, e com sucessivas adições de metanol, o grupo concluiu que 3:1 é a proporção mais adequada para se obter as maiores taxas de conversão, e conseqüentemente, em um maior rendimento de ésteres metílicos de 92 % após 24 h de reação.

Para Samukawa *et al.* (2000), o aumento da proporção molar metanol:óleo afetou negativamente o rendimento da metanólise do óleo de soja com a lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435), previamente tratada com oleato de metila e óleo de soja. O conteúdo de metanol foi otimizado em 3:1 equivalentes molar, tendo sido adicionado em várias etapas. Dessa forma foi possível obter uma alta taxa inicial de reação, com um rendimento de conversão de 97 % em 24 h de reação.

Do mesmo modo, Nie *et al.* (2006) realizaram reações de metanólise com a lipase de *Candida sp.* 99-125 imobilizada em uma membrana têxtil, utilizando n-hexano como solvente na reação. Um rendimento de ésteres de 96 % foi alcançado em 30 h de reação. Entretanto, de acordo com Iso *et al.* (2001), não é desejável o uso de solvente na reação, isto porque após o término da reação o solvente deve ser removido por destilação, extração ou outro método, necessitando operações unitárias e energia adicionais.

A quantidade de água utilizada nas reações desenvolvidas neste trabalho foi outra variável que apresentou um efeito negativo na taxa inicial da reação. Sabe-se que o nível de água é um parâmetro crucial para a manutenção da conformação tridimensional da enzima. No entanto, a quantidade de água não deve ultrapassar o limite necessário para manter a atividade enzimática, pois taxas mais elevadas de água no meio tendem a deslocar o equilíbrio da reação no sentido da hidrólise (NIE *et al.*, 2006; ANTCZAK *et al.*, 2009; SINGH e SINGH, 2010).

Como as lipases possuem como característica única de atuar na interface entre a fase orgânica e a fase aquosa, a sua atividade geralmente depende da área interfacial. Dessa forma, a água facilita o aumento da área interfacial disponível, auxiliando na atividade da lipase. Além disso, água atua como um “lubrificante”, aumentando a flexibilidade interna da estrutura da enzima (NOUREDDINI *et al.*, 2005), agindo também como um regulador alostérico da lipase, induzindo uma alteração conformacional que expõe o sítio ativo da enzima para os substratos, alterando assim a taxa de reação (CHESTERFIELD *et al.*, 2012).

Contudo, existe um nível máximo de água que promove o aumento da atividade catalítica, quando este limite é ultrapassado, isto é, aumentando excessivamente a quantidade de água, a reação de transesterificação torna-se prejudicada (SALIS *et al.*, 2005). Segundo

Ognjanovic *et al.* (2009), a lipase comercial de *Candida antactica* (Novozym 435) é menos ativa na presença de excesso de água, e isso se deve ao fato de que a água preenche os poros do suporte (resina acrílica macroporosa), impedindo o acesso de substratos hidrófobos ao sítio ativo da enzima (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009).

Dessa forma, diversos trabalhos relatam que o excesso no conteúdo de água compromete o rendimento da reação, mas que uma pequena fração é necessária para manter a estrutura terciária da enzima ativa (ISO *et al.*, 2001; NIE *et al.*, 2006; FORESTI *et al.*, 2007). Tal como ocorreu no presente trabalho, Su e Wei (2008) também reportam que a uma baixa concentração de água é necessária quando se utiliza a lipase de *Candida antarctica* em reações de síntese de biodiesel. Os autores relataram que menos do que 0,75 % de água (em relação a massa de óleo) foi necessária para manter a atividade catalítica da enzima, e quando este valor aumentou, a taxa inicial de reação decaiu e, com isso, o rendimento da reação diminuiu significativamente.

Resultados semelhantes a estes também foram descritos por Zheng *et al.* (2009), que realizaram reações de metanólise com óleo de soja catalisada pela mesma lipase (Novozym 435). Em um sistema utilizando tert-amil como solvente, com uma razão molar álcool:óleo de 3:1, apenas 2 % de água foi requerida para se obter 97 % de conversão, em um tempo de reação de 15 h.

Quantidades um pouco maiores de água podem ainda ser aceitáveis em reações de metanólise de óleo de soja com a Novozym 435. Rodrigues *et al.* (2008a) utilizaram 4 % de água, 15 % de enzima e uma proporção molar de 5:1 metanol:óleo e puderam obter um rendimento de conversão de ésteres metílicos de 45 %. Cabe ressaltar que este resultado foi referente a uma reação de apenas 6 h, tal como foi descrito na atual pesquisa.

4.2 Cinética da reação de transesterificação

Na etapa do planejamento experimental (Seção 4.1), os resultados analisados foram apresentados em termos de taxa inicial de reação, dada em $\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$. Contudo, nas próximas etapas deste trabalho, optou-se por demonstrar os resultados sob a forma de rendimento de conversão de ésteres metílicos (%), buscando atingir o máximo rendimento possível.

Conforme mostrado no item anterior, todas as reações desenvolvidas no planejamento experimental foram realizadas com duração máxima de 6 h. Entretanto, havia a necessidade de estudar a cinética de conversão da enzima, uma vez que o tempo de reação é considerado

um importante parâmetro para a síntese de biodiesel, sendo um indicador de eficácia e de desempenho econômico.

As amostras foram retiradas em diferentes intervalos de tempo durante 72 h, e as reações foram conduzidas com as condições otimizadas na seção 4.1, sendo elas: 25 % de enzima, razão molar metanol:óleo 5,76:1 e 5,52 % de água (para CALB-435); e 25 % de enzima, razão molar metanol:óleo 3:1 e 1,18 % de água (para CALB-MCI).

Na Figura 4.3 abaixo, se encontra o resultado da conversão de ésteres metílicos, nos diferentes tempos de reação, promovida pelos derivados CALB-435 e CALB-MCI. Para efeito de comparação e melhor apresentação, o teor de ésteres para as duas enzimas estão apresentados no mesmo gráfico.

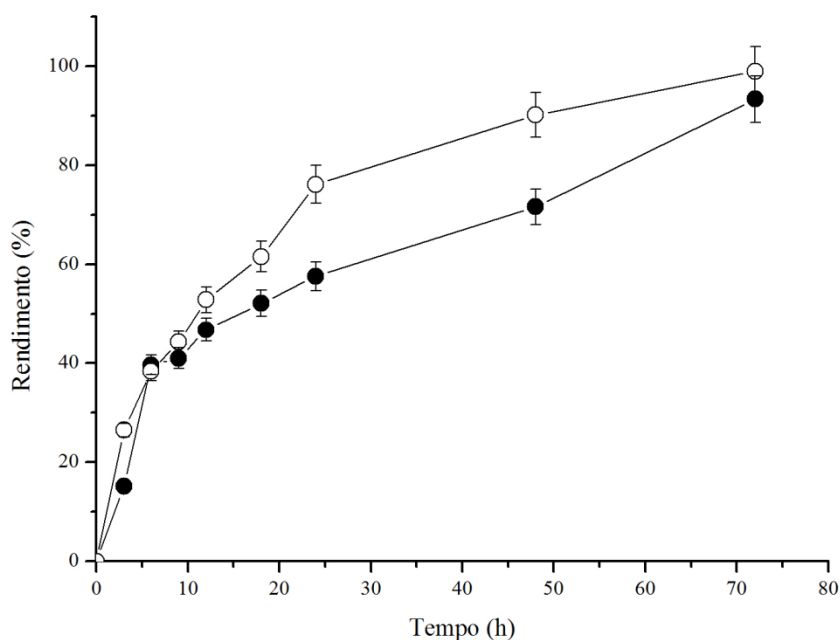


Figura 4.3 – Cinética de síntese de metil ésteres sob as condições otimizadas. (—●—) CALB-435; (—○—) CALB-MCI.

Analisando a Figura 4.3 é possível verificar que o maior teor de ésteres metílicos foi obtido no tempo de 72 h, tanto para a enzima imobilizada comercialmente (CALB-435) quanto para a imobilizada neste trabalho (CALB-MCI). Nota-se também que a maior diferença no rendimento obtido entre os dois derivados foi nos tempos de 24 h e 48 h (resultados correspondente são apresentados na Tabela A1 no Apêndice A).

Diversos trabalhos descrevem a boa eficiência catalítica do derivado comercial CALB-435 (Novozyme 435) em reações de síntese de biodiesel (ROYON *et al.*, 2007; SU e WEI,

2008; TALUKDER *et al.*, 2009; ZHENG *et al.*, 2009), tal como foi citado neste estudo. Entretanto, como indicado na Figura 4.3, o suporte de imobilização MCI GEL CHP20P mostrou-se mais eficiente em promover a ação catalítica da lipase.

Essa diferença do teor de ésteres apresentada pode ser explicada pelo tipo de suporte empregado na imobilização. Neste trabalho, os dois suportes eram hidrofóbicos, o que é uma característica requerida pela lipase de *Candida antarctica*. No entanto, o suporte MCI GEL CHP20P é ainda mais hidrofóbico que o suporte usado na imobilização comercial da lipase, o que demonstra conferir alguma melhoria nas propriedades na enzima (HERNANDEZ *et al.*, 2011).

Após o procedimento de imobilização, o sítio ativo da lipase permanece em contato estreito com o suporte, o que irá promover um ambiente hidrofóbico. Assim, características do suporte como hidrofobicidade e morfologia interna, podem alterar a intensidade da adsorção da lipase sobre o suporte, induzindo alterações no ambiente do sítio ativo e, portanto, modificando as características catalíticas finais da lipase (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2008). É provável que a imobilização da enzima no suporte MCI GEL CHP20P possa ter ocorrido de maneira a favorecer a interação enzima-substrato, diminuindo os efeitos difusionais e aumentando a taxa inicial da reação (PETKAR *et al.*, 2006). Além disso, de acordo com Graebin *et al.* (2012), o suporte MCI GEL CHP20P impede a acumulação de moléculas hidrofílicas no ambiente da enzima que poderiam provocar uma redução na ação catalítica da lipase.

De acordo com CABRERA *et al.* (2009), mesmo que se imobilize a mesma lipase, em suportes que apresentem características semelhantes, as condições de imobilização podem determinar as propriedades catalíticas finais da lipase imobilizada, principalmente, se o protocolo de imobilização puder induzir a estabilidade da estrutura enzimática.

Recentemente, Graebin *et al.* (2012) realizaram um estudo de comparação da atividade catalítica desses dois derivados imobilizados de *Candida antactica* (CALB-435 e CALB-MCI) empregados na síntese de butil acetato. As preparações imobilizadas foram fervidas em SDS para promover a dessorção das enzimas a partir do suporte, e a massa de enzima dos sobrenadantes foram comparadas semiquantitativamente e analisadas em SDS-PAGE. Os autores relataram que havia uma maior quantidade de enzima dessorvida na preparação CALB-435 do que em CALB-MCI (Figura 4.4), indicando que a imobilização da enzima sob o suporte MCI GEL CHP20P promoveu um aumento significativo na atividade da enzima.

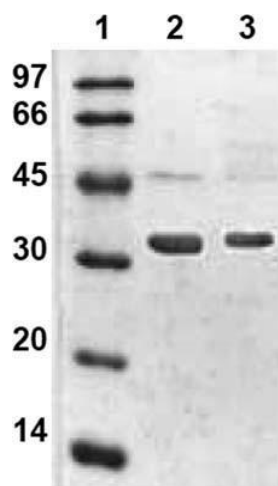


Figura 4.4 – SDS-PAGE de diferentes derivados de CALB.
 Linha 1: marcador de peso molecular (kDa);
 linha 2: CALB-435; linha 3: CALB-MCI.
 (Fonte: adaptado de Graebin *et al.* 2012).

Dessa forma, com o aumento da atividade enzimática, a ação catalítica da lipase torna-se mais efetiva, fornecendo maiores rendimentos na reação, tal qual reportado no presente trabalho.

Outro fator que pode ter provocado a diferença no rendimento das reações tem a ver com a área superficial da partícula do suporte de imobilização, bem como o diâmetro do poro. Segundo Forde *et al.* (2010), a enzima CALB tem uma certa preferência por suportes com diâmetro de poro superior: eles não apenas permitem o fácil acesso da enzima como também permitem um maior espaço para a entrada de substrato, facilitando o andamento da reação. Como indicado anteriormente, o suporte utilizado na imobilização comercial de CALB (resina macroporosa metacrilato de metil-co-divinilbenzeno) possui poros com diâmetro de 150 Å (CHEN *et al.*, 2008), já o suporte MCI GEL CHP20P (estireno-divinilbenzeno) apresenta poros com diâmetro de 500 Å (HERNANDEZ *et al.*, 2011). De acordo com Hernandez *et al.* (2011), suportes com diâmetro de poro muito pequeno podem ter seus poros bloqueados após a imobilização, deixando uma larga porcentagem de superfície interna inacessível para a enzima, o que pode ter contribuído para a menor eficiência catalítica do derivado imobilizado de CALB-435.

4.3 Reuso da enzima

Com intuito de testar a melhor maneira de recuperar os biocatalisadores após terem sido utilizados na síntese de biodiesel, oito ciclos de reutilização foram desenvolvidos, e as

condições reacionais utilizadas foram de acordo com a otimização descrita na Seção 4.1. Nesta etapa, optou-se por conduzir a reação por 24 h, pois através desse tempo foi possível obter um bom teor de ésteres metílicos, com um gasto menor de energia.

Após a secagem, o peso da enzima foi medido para se ter conhecimento das perdas geradas em cada etapa. Contudo, as enzimas que passaram pelo tratamento sem lavagem não puderam ter seus pesos avaliados devido à alta quantidade de resíduos que ficaram aderidos na superfície do suporte de imobilização, provocando um aumento na massa real dos mesmos.

Dessa forma, para o tratamento sem lavagem, foi considerado o peso do tratamento com lavagem. Assim, as condições reacionais foram mantidas fixas, reduzindo proporcionalmente a quantidade de substrato nas reações subsequentes a fim de não alterar as proporções.

Tabela 4.6 detalha as perdas acumuladas de enzima ocorridas em cada ciclo, apenas para o tratamento com hexano.

Tabela 4.6 - Dados de perda de massa de enzima nos ciclos com tratamento com hexano.

	CALB-435		CALB-MCI	
	Massa de enzima (g)	Perda (%)	Massa de enzima (g)	Perda (%)
Ciclo 1	0,75	-	0,75	-
Ciclo 2	0,71	5,53	0,697	7
Ciclo 3	0,69	8	0,68	9,3
Ciclo 4	0,62	17,3	0,57	24
Ciclo 5	0,59	21,33	0,49	34
Ciclo 6	0,57	23	0,44	40
Ciclo 7	0,53	29	0,37	49
Ciclo 8	0,49	33	0,34	53

De acordo com a Tabela 4.6, a CALB-435 apresentou uma perda total de apenas 33 %. O mesmo não ocorreu com a CALB-MCI, que teve uma redução total de 53 %. Essa perda de massa está relacionada com a característica física do suporte MCI GEL CHP20P (pó), onde no processo de filtração, o material ficou muito aderido ao filtro de vidro sinterizado, facilitando a perda durante seu processamento.

Após a recuperação, as enzimas que não receberam nenhum tratamento, apresentaram aspecto úmido, com a formação de aglomerados. Por outro lado, as enzimas submetidas às lavagens com hexano tornaram ao aspecto original, eliminando traços de substratos que

ficaram ao redor do suporte. Na Figura 4.4 é possível fazer uma comparação visual do aspecto físico das enzimas submetidas ao tratamento com hexano (a e b); e sem tratamento (c e d).

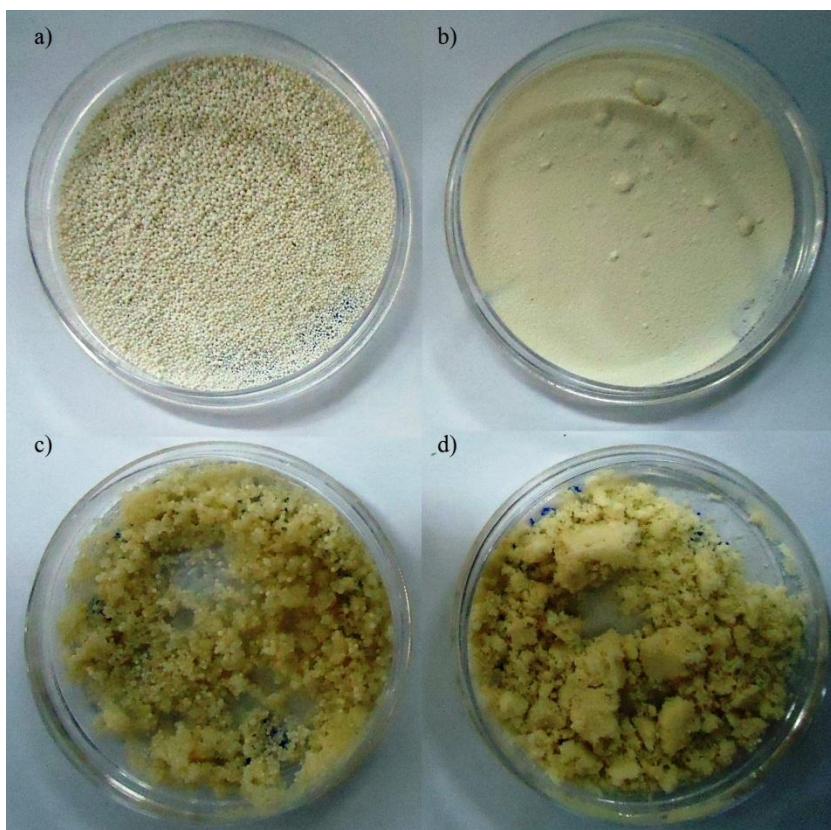


Figura 4.5 – Enzimas recuperadas após o 1º ciclo reacional.
Tratamento com hexano: a) CALB-435 e b) CALB-MCI;
Tratamento sem lavagem: c) CALB-435 e d) CALB-MCI.

De acordo com MARTINS *et al.* (2011), a secagem do biocatalisador tem um efeito importante e positivo sobre a estabilidade da enzima, sendo um procedimento conveniente antes da sua reutilização. Quando o biocatalisador foi seco, alguns dos resíduos voláteis (substratos, produtos, solventes) que poderiam afetar a reação foram removidos a partir da matriz de suporte, mantendo a atividade da enzima e contribuindo para manter a sua ação catalítica.

A seguir, na Figura 4.5 encontram-se os dados referentes ao teor de ésteres metílicos obtidos em cada ciclo de reuso, em termos de atividade relativa (%) onde o primeiro ciclo foi considerado como sendo 100 %.

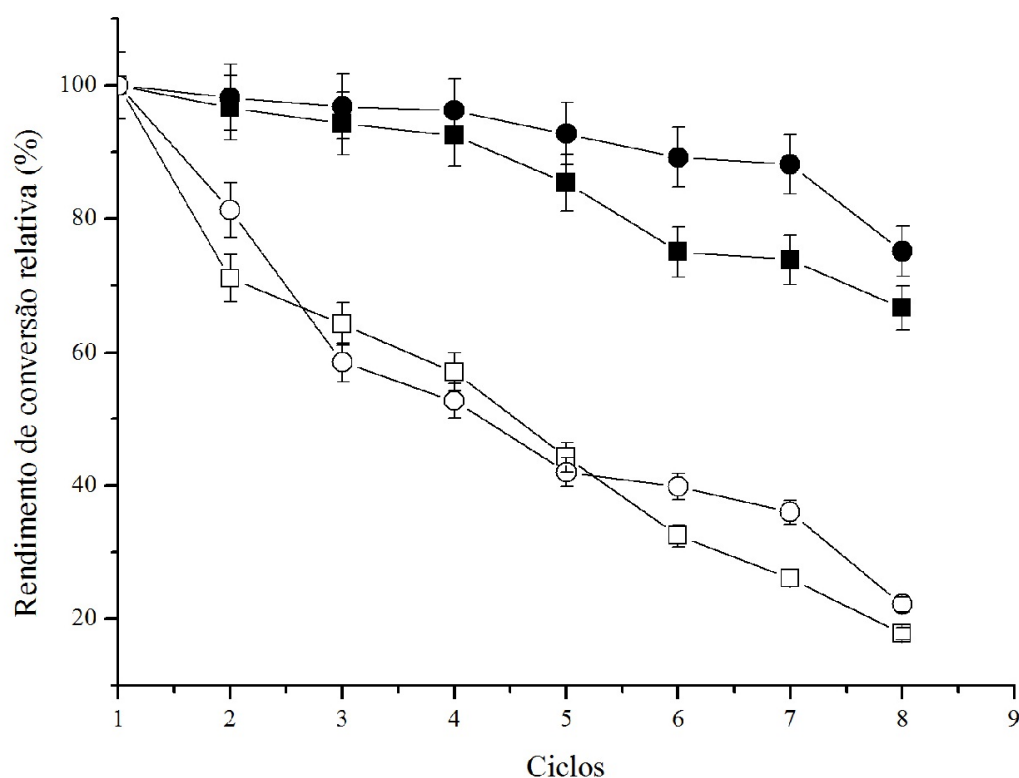


Figura 4.6 – Estabilidade operacional dos biocatalisadores em 8 ciclos de reuso. (—○—) CALB-MCI; (—□—) CALB-435. Símbolos fechados: tratamento com hexano; Símbolos abertos: sem tratamento. Todas as reações foram desenvolvidas sob as condições otimizadas com duração de 24 h.

Observa-se na Figura 4.5 que a lavagem com hexano foi um ótimo tratamento, tanto para CALB-435 quanto a CALB-MCI, mantendo a atividade da enzima em cerca de 70 %, mesmo após 8 ciclos de reuso (resultados complementares são apresentados na Tabela A2 do Apêndice A). De acordo com Rodrigues *et al.* (2008a), o hexano proporciona uma maior retenção na atividade da lipase. Este solvente apolar promove a remoção da camada óleo/biodiesel formado em torno na enzima que provoca a perda da atividade e limita a difusão de substrato e produto. Além disso, remove quaisquer resíduos de substratos ou produtos que fluem para dentro do suporte poroso, que poderiam inativar ou inibir a atividade da lipase (HSU *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2011; FRIEDRICH *et al.*, 2012).

Assim como foi demonstrado neste estudo, diversos outros trabalhos são citados na literatura que indicam a lavagem com hexano como sendo um método adequado e eficiente para manter a atividade operacional da enzima, proporcionando dessa forma a reutilização do biocatalisador (RODRIGUES *et al.*, 2008b; RODRIGUES *et al.*, 2009c; TALUKDER *et al.*, 2010; FRIEDRICH *et al.*, 2012; GRAEBIN *et al.*, 2012).

Para as reações que não receberam tratamento com hexano, a atividade enzimática teve uma queda de 80 % para ambos derivados. Isso provavelmente aconteceu devido a acumulação de glicerol e outros resíduos que ficaram aglomerados em torno das partículas do suporte, impedindo a ação catalítica da lipase. Conforme Du *et al.* (2003), moléculas de glicerol quando aderem-se na superfície do suporte, formam um revestimento hidrofílico na enzima que torna-as inacessíveis às moléculas de substratos hidrofóbicos, como o óleo, reduzindo drasticamente o rendimento da reação.

CAPÍTULO 5

Conclusões

Neste trabalho, estudou-se o processo de síntese de ésteres metílicos (biodiesel) a partir da transesterificação do óleo de soja, sendo a reação catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em suportes hidrofóbicos. Foram utilizados dois derivados imobilizados da enzima: CALB-MCI (lipase imobilizada em suporte MCI GEL CHP20P) e CALB-435 (lipase imobilizada comercialmente denominada Novozym 435).

A partir de um delineamento composto central rotacional (DCCR), verificou-se que os dois derivados imobilizados apresentaram a maior taxa inicial de reação na seguinte condição experimental: 25 % de enzima, razão molar metanol:óleo 6:1 e 5 % de água. Nessas condições, as taxas de reação foram de 50,07 mmol L⁻¹ h⁻¹ para CALB-435 e 47,68 mmol L⁻¹ h⁻¹ para CALB-MCI. Para ambos derivados, a variável linear quantidade de enzima (X₂) apresentou um efeito estatisticamente positivo, onde um aumento de nível proporcionou uma maior taxa de reação. Para CALB-435, nenhuma outra variável linear foi estatisticamente significativa. Para CALB-MCI, as variáveis lineares razão molar (X₁) e quantidade de água (X₃) apresentaram um efeito estatisticamente negativo, onde quanto menor o nível destas variáveis, maior foi a taxa inicial de reação obtida.

Através da realização do processo de otimização das reações, aliada a Metodologia de superfície de resposta (MSR), foi possível obter os níveis ideais para alcançar as maiores taxas inicial de reação. Para CALB-435, os níveis encontrados foram: razão molar metanol:óleo -0,22, quantidade de enzima +1,68 e quantidade de água 0,22. O valor da taxa inicial de reação predito pelo programa foi de 54 mmol L⁻¹ h⁻¹, e o obtido experimentalmente foi de 51, 47 mmol L⁻¹ h⁻¹. Com a CALB-MCI foi possível obter valores de taxa inicial de

reação superiores aos obtidos com a CALB-435, e os níveis fornecidos pelo programa foram: razão molar -1,68, quantidade de enzima +1,68 e quantidade de água -1,28. Sob estas condições, o valor predito pelo programa para a maior taxa inicial de reação foi de 47,6 mmol L⁻¹ h⁻¹, e o obtido experimentalmente foi de 57 mmol L⁻¹ h⁻¹.

Quanto ao estudo dos tempos de reação, verificou-se que o maior teor de ésteres metílicos foi obtido no tempo de 72 h, para ambos derivados de CALB, sendo 93,4 % para CALB-435 e 99 % para CALB-MCI. Entretanto, no tempo de 24 h, boas conversões também puderam ser obtidas (57,6 % para CALB-435 e 76,2 % para CALB-MCI), com um gasto menor de energia. Foi de acordo com este tempo que os estudos de reuso da enzima foram desenvolvidos.

Os resultados obtidos de reuso da enzima imobilizada mostraram que elas puderam ser reutilizadas por 8 ciclos de reação, quando submetidas ao tratamento com lavagem com hexano. Tanto CALB-435 quanto CALB-MCI apresentaram cerca de 70 % de atividade relativa no último ciclo testado, indicando que este processo pode ser realizado sem maiores perdas no rendimento da reação, uma vez que o hexano aumentou a vida útil do biocatalisador. Quando não foi realizado nenhum tratamento de lavagem das enzimas, ambas tiveram a atividade reduzida a 20 % no último ciclo.

Analisando os resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que a lipase de *Candida antarctica* imobilizada nos dois diferentes suportes mostrou ser eficiente como catalisadora nas reações de síntese de biodiesel. O derivado CALB-MCI apresentou alta versatilidade no sentido de proporcionar a realização eficiente da transesterificação, principalmente por ser uma combinação catalítica de menor custo do que a comercial Novozym 435.

Fatores ligados a estabilidade da enzima que limitam a utilização desses biocatalisadores puderam ser superados neste trabalho, uma vez que a atividade dos dois derivados imobilizados manteve-se relativamente alta nos 8 ciclos de reuso testados. Nesse sentido, os objetivos propostos nesse estudo puderam ser alcançados, contribuindo para que o uso efetivo dos processos enzimáticos possa vir a tornar-se mais econômico e competitivo frente aos processos químicos utilizados atualmente pela indústria de biocombustíveis.

Perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a eficiência catalítica da lipase B de *Candida antarctica* no processo de síntese de ésteres metílicos, abrindo perspectivas de utilização desta enzima em processos biocatalíticos. Portanto, sugerem-se como estudos futuros:

- aperfeiçoar as condições de imobilização da enzima sobre o suporte MCI GEL CHP20P;
- obter dados experimentais avaliando as demais espécies (triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol, álcool e glicerol formado), ao longo do tempo para a transesterificação enzimática do óleo de soja;
- aprimorar as análises cromatográficas para se obter um resultado mais detalhado dos produtos formados nas reações;
- aperfeiçoar o estudo das condições da reação de transesterificação para produção de biodiesel, tais como a temperatura e o uso de solvente na reação;
- realizar um estudo da modelagem cinética dos dados experimentais obtidos para se ter um maior entendimento das reações enzimáticas.

Referencias Bibliográficas

AGENCIA NACIONAL DE PETROLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTIVEIS - ANP. Resolução ANP nº 7, de 19.3.2008 – DOU 20.3.2008. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$q=\\$x=\\$nc=8430](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$q=$x=$nc=8430)>. Acessado em 09 de agosto de 2012.

AKOH, C. C.; CHANG, S.-W.; LEE, G.-C.; SHAW, J.-F. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8995-9005, 2007.

AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 951-960, 2007.

ALBERTON, D.; MITCHELL, A. M.; CÓRDOVA, J.; ZAMORA, P. P.; KRIEGER, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 28-35, 2010.

ANDERSON, E. M.; LARSSON, K. M.; KIRK, O. One biocatalyst—many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 16, n. 3, p. 181-204, 1998.

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

BARNWAL, B. K.; SHARMA, M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 9, n. 4, p. 363-378, 2005.

BETSY, T.; KEOGH, J. **Microbiology demystified**. Chicago: Mc. Graw-Hill, 2005. 288 p.

BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. A comparative study of the production of ethyl esters from vegetable oils as a biodiesel fuel optimization by factorial design. **Chemical Engineering Journal**, v. 134, n. 1-3, p. 93-99, 2007.

BOUSQUET-DUBOUCH, M.-P.; GRABER, M.; SOUSA, N.; LAMARE, S.; LEGOY, M.-D. Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping

- Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1550, n. 1, p. 90-99, 2001.
- CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUIBAN, J. M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 171-176, 2009.
- CAIXETA, G. Estudo de cenário de produção de biodiesel. 2009. 139 p. (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- CASTRO, H. F. D.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. D.; AGUIAR, C. L. D. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.
- CHANG, H.-M.; LIAO, H.-F.; LEE, C.-C.; SHIEH, C.-J. Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 307-312, 2005.
- CHAVES, A. T. C. A. Otimização do processo de produção de biodiesel etílico do óleo de girassol (*Helianthus annuus*) aplicando um delineamento composto central rotacional (DCCR). 2008. 67 p. (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- CHEN, B.; HU, J.; MILLER, E. M.; XIE, W.; CAI, M.; GROSS, R. A. *Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: Catalysts for polyester synthesis. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 2, p. 463-471, 2008.
- CHESTERFIELD, D. M.; ROGERS, P. L.; AL-ZAINI, E. O.; ADESINA, A. A. Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilised lipase. **Chemical Engineering Journal**, v. 207-208, n. 0, p. 701-710, 2012.
- COPLEY, S. D. Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 265-272, 2003.
- CORSINI, M. D. S.; JORGE, N.; MIGUEL, A. M. R. D. O.; VICENTE, E. Perfil de ácidos graxos e avaliação da alteração em óleos de fritura. **Química Nova**, v. 31, p. 956-961, 2008.
- DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, p. 776-792, 2009.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.
- DEMIRBAS, A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. **Energy Conversion and Management**, v. 49, n. 1, p. 125-130, 2008.

DEREWENDA, U.; BRZOZOWSKI, A. M.; LAWSON, D. M.; DEREWENDA, Z. S. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1532-1541, 1992.

DEVANESAN, M. G.; VIRUTHAGIRI, T.; SUGUMAR, N. Transesterification of Jatropha oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6 p. 2497-2501, 2007.

DIJKSTRA, Z. J. The potential of enzymatic catalysis in supercritical fluids. 2006. 126 p. (PhD thesis). Departamento de Processos, Universidade Técnica de Eindhoven, Eindhoven.

DIZGE, N.; KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1274-1278, 2008.

DORADO, M. P.; BALLESTEROS, E.; ARNAL, J. M.; GÓMEZ, J.; LÓPEZ GIMÉNEZ, F. J. Testing waste olive oil methyl ester as a fuel in a diesel engine. **Energy & Fuels**, v. 17, n. 6, p. 1560-1565, 2003.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 1, p. 90-94, 2002.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D. Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 103-106, 2003.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; RODRÍGUEZ, J. J.; TEJEDOR, A. Biodiesel fuels from vegetable oils: Transesterification of *Cynara cardunculus* L. Oils with ethanol. **Energy & Fuels**, v. 16, n. 2, p. 443-450, 2002.

FALCÃO, P. W. C. Produção de biodiesel em meio supercrítico. 2011. 305 p. (Tese de doutorado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FARBER, L. **Estatística aplicada**. 4 ed. São Paulo: 2010. 640 p.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; CABRERA, Z.; GODOY, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUIBAN, J. M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1061-1067, 2008.

FORESTI, M. L.; PEDERNEIRA, M.; BUCALÁ, V.; FERREIRA, M. L. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 1-2, p. 62-70, 2007.

FORDE, J.; VAKUROV, A.; GIBSON, T. D.; MILLNER, P.; WHELEHAN, M.; MARISON, I. W.; Ó'FÁGÁIN, C. Chemical modification and immobilisation of lipase B from *Candida antarctica* onto mesoporous silicates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 203-209, 2010.

- FRIEDRICH, J. L. R.; PEÑA, F. P.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2012.
- FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.
- GAGNON, M. D.; VASUDEVAN, P. T. Effects of Solvent and Enzyme Source on Transesterification Activity. **Energy Fuels**, v. 25, n. 10, p. 4669-4674, 2011.
- GANDHI, N. N.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B. Studies on the lipozyme-catalyzed synthesis of butyl laurate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, n. 1, p. 1-12, 1995.
- GERIS, R.; SANTOS, N. A. C. D.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. D. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, v. 30, p. 1369-1373, 2007.
- GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1097-1107, 2005.
- GHESTI, G. F.; MACEDO, J. L. D.; DIAS, J. A.; DIAS, S. C. L. Produção de biodiesel via transesterificação etúlica com zeólitas básicas. **Química Nova**, v. 35, p. 119-123, 2012.
- GRAEBIN, N. G.; MARTINS, A. B.; LORENZONI, A. S. G.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis. **Biotechnology Progress**, v. 28, n. 2, p. 406-412, 2012.
- GUNAWAN, E. R.; BASRI, M.; RAHMAN, M. B. A.; SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. A. Study on response surface methodology (RSM) of lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 7, p. 739-744, 2005.
- HA, S. H.; LAN, M. N.; LEE, S. H.; HWANG, S. M.; KOO, Y.-M. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 4, p. 480-483, 2007.
- HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.
- HAO, L.; SHANGDE, S.; YANLAN, B.; GUOLONG, Y. Enzymatic epoxidation of biodiesel optimized by response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 59, p. 12356-12363, 2012.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- HE, H.; WANG, T.; ZHU, S. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process. **Fuel**, v. 86, n. 3, p. 442-447, 2007.

HERNANDEZ, K.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 1, p. 72-78, 2011.

HSU, A.-F.; JONES, K.; FOGLIA, T.; MARMER, W. Continuous production of ethyl esters of grease using an immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 8, p. 749-752, 2004.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 550-563, 2012.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.

JAEGER, K.-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

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

KNOTHE, G. Analyzing Biodiesel: Standards and Other Methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, p. 823-833, 2006.

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

KRISHNA, H. S.; MANOHAR, B.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor miehei* by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 131-136, 2000.

KRISHNA, H. S.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 193-201, 2001.

KUO, C.-H.; CHEN, H.-H.; CHEN, J.-H.; LIU, Y.-C.; SHIEH, C.-J. High yield of wax ester synthesized from cetyl alcohol and octanoic acid by Lipozyme RMIM and Novozym 435. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, p. 11694-11704, 2012.

- KWON, C. H.; SHIN, D. Y.; LEE, J. H.; KIM, S. W. Molecular modeling and its experimental verification for the catalytic mechanism of *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 1098-1105, 2007.
- LECA, M.; TCACENCO, L.; MICUTZ, M.; STAICU, T. Optimization of biodiesel production by transesterification of vegetable oils using lipases. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, p. 5618-5630, 2010.
- LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, 2010.
- LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 58-62, 2006.
- LI, W.; DU, W.; LIU, D. *Rhizopus oryzae* whole-cell-catalyzed biodiesel production from oleic acid in tert-butanol medium. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 1, p. 155-158, 2007.
- LIU, Y.; TAN, H.; ZHANG, X.; YAN, Y.; HAMEED, B. H. Effect of monohydric alcohols on enzymatic transesterification for biodiesel production. **Chemical Engineering Journal**, v. 157, n. 1, p. 223-229, 2010.
- LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. D. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, p. 1596-1608, 2009.
- LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D. A.; GOODWIN, J. G. Synthesis of biodiesel via acid catalysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 14, p. 5353-5363, 2005/07/01 2005.
- MACARIO, A.; GIORDANO, G.; FRONTERA, P.; CREA, F.; SETTI, L. Hydrolysis of alkyl ester on lipase/silicalite-1 catalyst. **Catalysis Letters**, v. 122, n. 1, p. 43-52, 2008.
- MARDER, F.; CELIN, M. M.; MAZUIM, M. D. S.; SCHNEIDER, R. D. C. D. S.; MACAGNAN, M. T.; CORBELLINI, V. A. Produção de biodiesel por biocatálise utilizando método alternativo de imobilização da lipase em hidrogel. **TECNO-LÓGICA**, v. 12, p. 56-64, 2008.
- MARTINS, A. B.; GRAEBIN, N. G.; LORENZONI, A. S. G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2311-2316, 2011.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.
- MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum Technology**, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

- MEHER, L. C.; VIDYA, S. D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. D.; CASTRO, H. F. D.; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.
- MORENO-PIRAJÀN, J. C.; GIRALDO, L. Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 55-62, 2011.
- NETO, P. R. C.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 3, p. 531-538, 2000.
- NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 142-147, 2006.
- NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 7, p. 769-777, 2005.
- OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5146-5154, 2009.
- OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 742-756, 2009.
- PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19–20, n. 0, p. 279-286, 2002.
- PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447-454, 2005.
- PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; SEGURA, R. L.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Purification, immobilization, hyperactivation, and stabilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. In: GUISÁN, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology**. 2nd ed. Totowa: Humana Press, v.22, 2006. p.143–152.
- PARENTE, E. J. D. S. **Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza: Tecbio, 2003. 68 p.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L. D.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, p. 106-110, 2005.

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002.

PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1-4, p. 83-90, 2006.

RACT, J. N. R.; GIOIELLI, L. A. Lipídios modificados obtidos a partir de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis para aplicação em spreads. **Química Nova**, v. 31, p. 1960-1965, 2008.

RAHMAN, A. M. B.; ZAIDAN, U. H.; BASRI, M.; HUSSEIN, M. Z.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B. Enzymatic synthesis of methyl adipate ester using lipase from *Candida rugosa* immobilised on Mg, Zn and Ni of layered double hydroxides (LDHs). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 50, n. 1, p. 33-39, 2008.

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

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M. D.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-16, 2011.

ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 398-408, 2009.

RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z.; WADA, K. Lipase-catalyzed ethanolysis of soybean oil in a solvent-free system using central composite design and response surface methodology. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 6, p. 849-854, 2008a.

RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; WADA, K.; AYUB, M. Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 10, p. 925-930, 2008b.

RODRIGUES, R. C. Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. 2009. 183 p. (Tese de doutorado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RODRIGUES, R. C.; BOLIVAR, J. M.; PALAU-ORS, A.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Positive effects of the multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from

Thermomyces lanuginosus. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6-7, p. 386-393, 2009a.

RODRIGUES, R. C.; GODOY, C. A.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 963-968, 2009b.

RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; WADA, K.; ZÁCHIA AYUB, M. Improved enzyme stability in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n. 3, p. 394-404, 2009c.

RODRIGUES, R. C.; PESSELA, B. C. C.; VOLPATO, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M.; AYUB, M. A. Z. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized–stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1268-1273, 2010.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 682-688, 2011.

RODWELL, V. W.; KENNELLY, P. J. Enzymes: Mechanism of Action. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K., *et al* (Ed.). **Harper's Illustrated Biochemistry**. 26 ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2003. cap. 7, p.49-60

ROSSET, I. G.; TAVARES, M. C. H.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ¹H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, n. 1-2, p. 136-142, 2011.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technol.**, v. 98, n. 3, p. 648-653, 2007.

SAAD, E. B. Etanolise de Óleo de Milho Empregando Catálise Alcalina e Enzimática. 2005. 99 p. (Dissertação de mestrado). Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SALIS, A.; SOLINAS, V.; MONDUZZI, M. Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilised lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, n. 4-6, p. 167-174, 2003.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 3, p. 291-299, 2005.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 1-2, p. 19-26, 2008.

SAMUKAWA, T.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; BAN, K.; KONDO, A.; SHIMADA, Y.; NODA, H.; FUKUDA, H. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 2, p. 180-183, 2000.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513-521, 1958.

SECUNDO, F.; MIEHÉ-BRENDLÉ, J.; CHELARU, C.; FERRANDI, E. E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, n. 1-3, p. 350-361, 2008.

SHAO, P.; MENG, X.; HE, J.; SUN, P. Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock. **Food Bioprod. Process.**, v. 86, n. 4, p. 283-289, 2008.

SHARMA, R.; CHIST, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases: Research review paper. **Biotechnology Advances**, v. 35, p. 627-662, 2001.

SHIEH, C. J.; LIAO, H. F.; LEE, C. C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 2, p. 103-106, 2003.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 7, p. 789-793, 1999.

SILVA, G. D. S.; INOUE, D. Y.; DORS, G.; FURIGO, A. J.; CASTRO, H. F. Desempenho de diferentes lipases imobilizadas na síntese de biodiesel de óleo de palma. **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, p. 197-203, 2011.

SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 200-216, 2010.

SOUZA, L. T. A. Síntese enzimática do biodiesel de *Jatropha curcas* pela rota etílica. 2010. 118 p. (Dissertação de mestrado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

SU, E.; WEI, D. Improvement in lipase-catalyzed methanolysis of triacylglycerols for biodiesel production using a solvent engineering method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 55, n. 3-4, p. 118-125, 2008.

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

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; VAN NGUYEN, T. B.; FEN, N. M.; MELISSA, Y. L. S. Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of

methanolysis methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, n. 3-4, p. 106-112, 2009.

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; FEN, N. M.; MELISSA, Y. L. S. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 207-212, 2010.

TING, W. J.; TUNG, K. Y.; GIRIDHAR, R.; WU, W. T. Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 1-2, p. 32-38, 2006.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293-308, 1994.

UPPENBERG J; OHRNER N; NORIN M; HULT K; KLEYWEGT G. J; PATKAR S; WAAGEN V; ANTHONSEN T; A., J. T. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. **Biochemistry**, v. 34, p. 16838-16851, 1995.

VILLENEUVE, P.; BAROUH, N.; BARÉA, B.; PIOMBO, G.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; TURON, F.; PINA, M.; LAGO, R. Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols with conjugated linoleic acids (CLA) in central position. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1443-1452, 2007.

WANG, Y.; WU, H.; ZONG, M. H. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 7232-7237, 2008.

XIAO, M. A. N.; MATHEW, S.; OBBARD, J. P. Biodiesel fuel production via transesterification of oils using lipase biocatalyst. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 2, p. 115-125, 2009.

XIAO, M. A. N.; QI, C.; OBBARD, J. P. Biodiesel production using *Aspergillus niger* as a whole-cell biocatalyst in a packed-bed reactor. **GCB Bioenergy**, v. 3, n. 4, p. 293-298, 2011.

YANG, F.; RUSSELL, A. J. The role of hydration in enzyme activity and stability: 1. Water adsorption by alcohol dehydrogenase in a continuous gas phase reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 6, p. 700-708, 1996.

YU, D.; WANG, Z.; ZHAO, L.; CHENG, Y.; CAO, S. Resolution of 2-octanol by SBA-15 immobilized *Pseudomonas sp.* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, n. 3-4, p. 64-69, 2007.

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

ZHANG, Y.; DUBÉ, M. A.; MCLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 1-16, 2003.

ZHENG, Y.; QUAN, J.; NING, X.; ZHU, L.-M.; JIANG, B.; HE, Z.-Y. Lipase-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production in amyl alcohol. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 41-46, 2009.

Apêndice A

Tabela A1 referente à Figura 4.3.

Tabela A1 – Teor de ésteres metílicos produzido pelas lipases estudadas

Tempo (h)	Teor em ésteres metílicos (%)	
	CALB-435	CALB-MCI
3	15,1	26,5
6	39,6	38,4
9	41,02	44,4
12	46,8	52,8
18	52,2	61,6
24	57,6	76,2
48	71,6	90,2
72	93,38	99,0

Tabela A2 referente à Figura 4.5.

Tabela A2 – Estabilidade operacional dos biocatalisadores em 8 ciclos de reuso

Ciclos	CALB-435		CALB-MCI	
	com hexano	sem lavagem	com hexano	sem lavagem
	Atividade relativa (%)		Atividade relativa (%)	
1	100,00	100,00	100,00	100,00
2	96,61	71,10	98,23	81,34
3	94,29	64,24	96,86	58,52
4	92,48	57,06	96,26	52,72
5	85,47	44,24	92,77	42,03
6	75,05	32,48	89,23	39,86
7	73,88	26,11	88,21	36,02
8	66,63	17,74	75,19	22,16

Apêndice B

O Gráfico de Pareto (Figuras B1e B2) mostra a estimativa dos efeitos lineares, quadráticos e a interação das variáveis independentes para as condições reacionais dos derivados CALB-435 e CALB-MCI, onde o efeito é tão significativo quanto mais à direita da linha vermelha ele estiver. Figuras referentes às Tabelas 4.2 e 4.4 respectivamente.

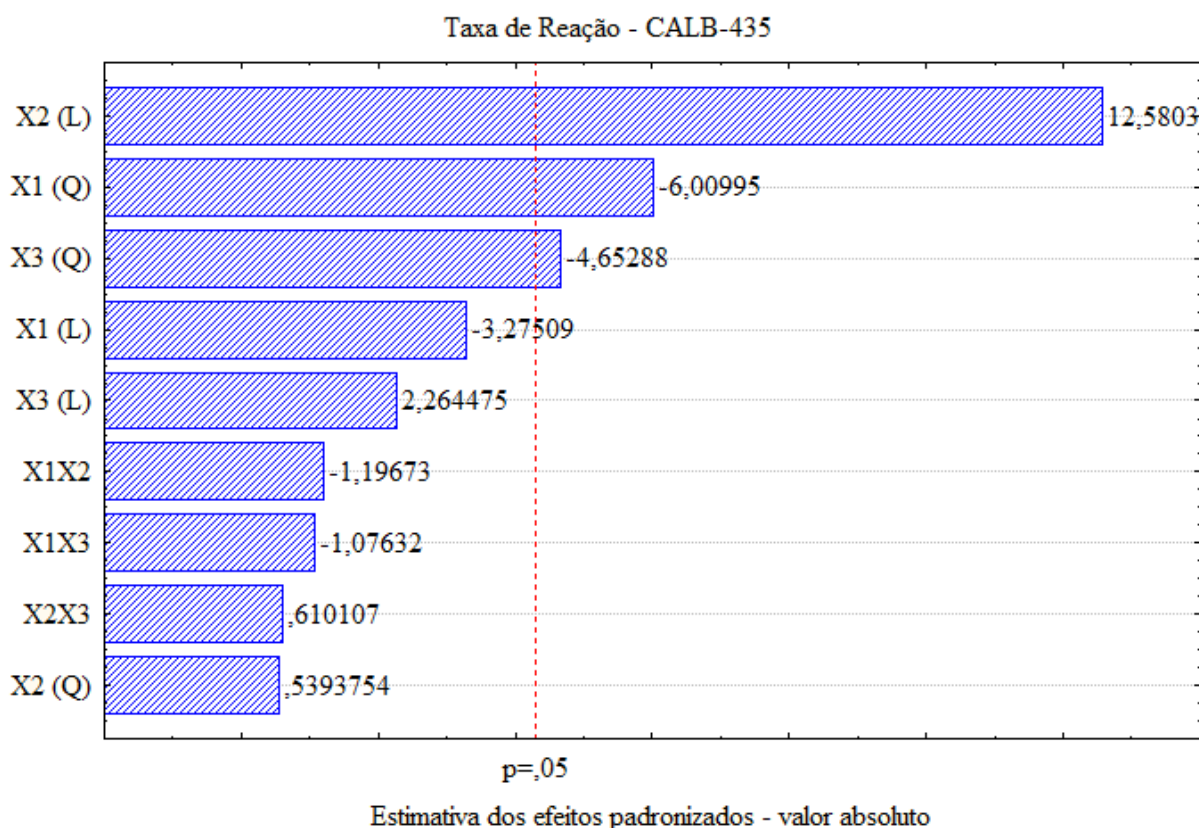


Figura B1 – Diagrama de Pareto obtido a partir do DCCR para a enzima CALB-435, tendo como variável resposta taxa inicial de reação de síntese de ésteres metílicos.

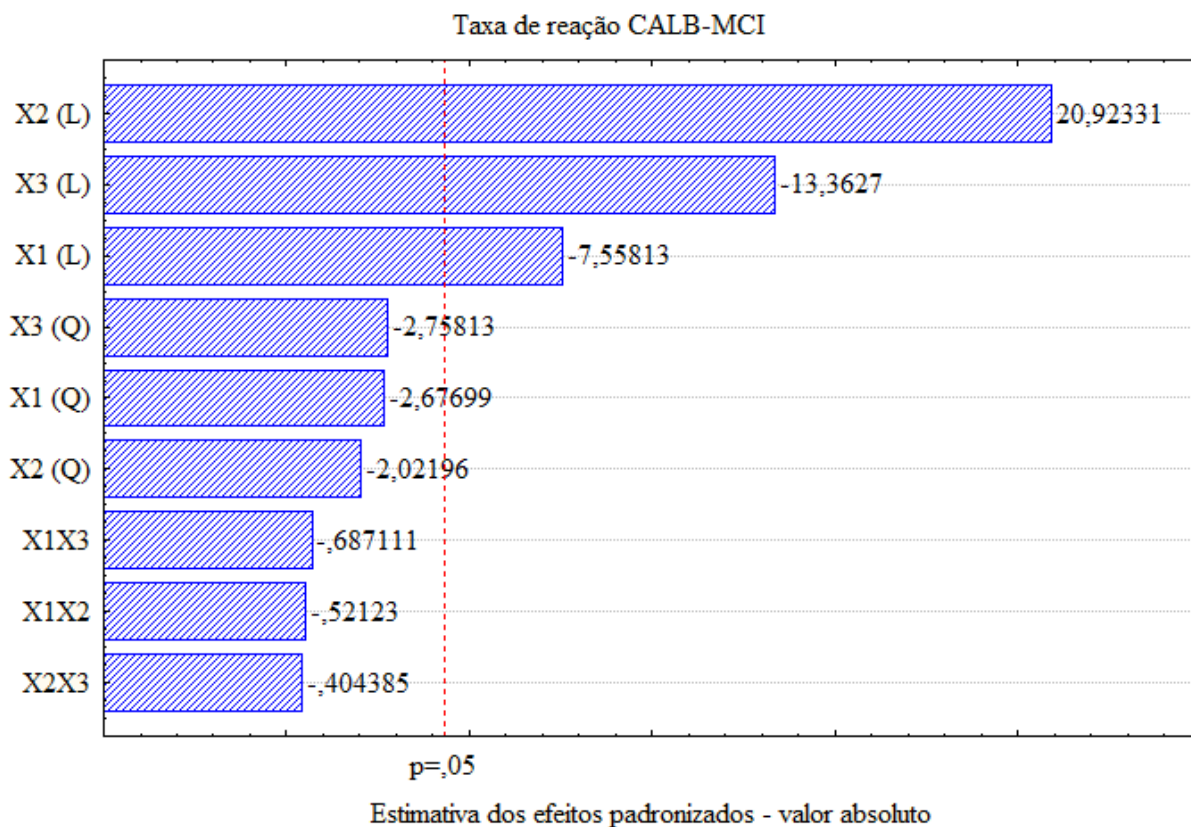


Figura B2 – Diagrama de Pareto obtido a partir do DCCR para a enzima CALB-MCI, tendo como variável resposta taxa inicial de reação de síntese de ésteres metílicos.

As Figuras B3, B4 e B5 a seguir, são superfícies de resposta em função da taxa inicial de reação ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) para CALB-435 e CALB-MCI. A inclinação da curva permite a avaliação do efeito da variável sobre a taxa inicial de reação de síntese de ésteres metílicos. São dados complementares referentes às Figuras 4.1 e 4.2.

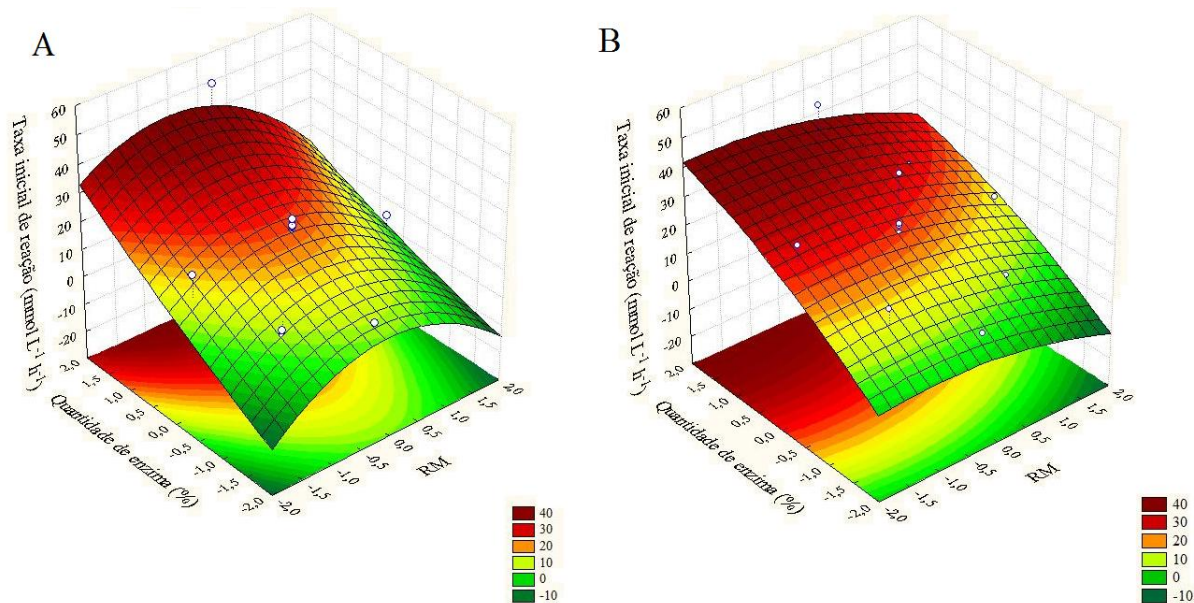


Figura B3 – Superfície de resposta em função da taxa inicial de reação (mmol L⁻¹ h⁻¹) correspondente ao efeito das variáveis quantidade de enzima *versus* razão molar álcool:óleo. A) CALB-435; B) CALB-MCI.

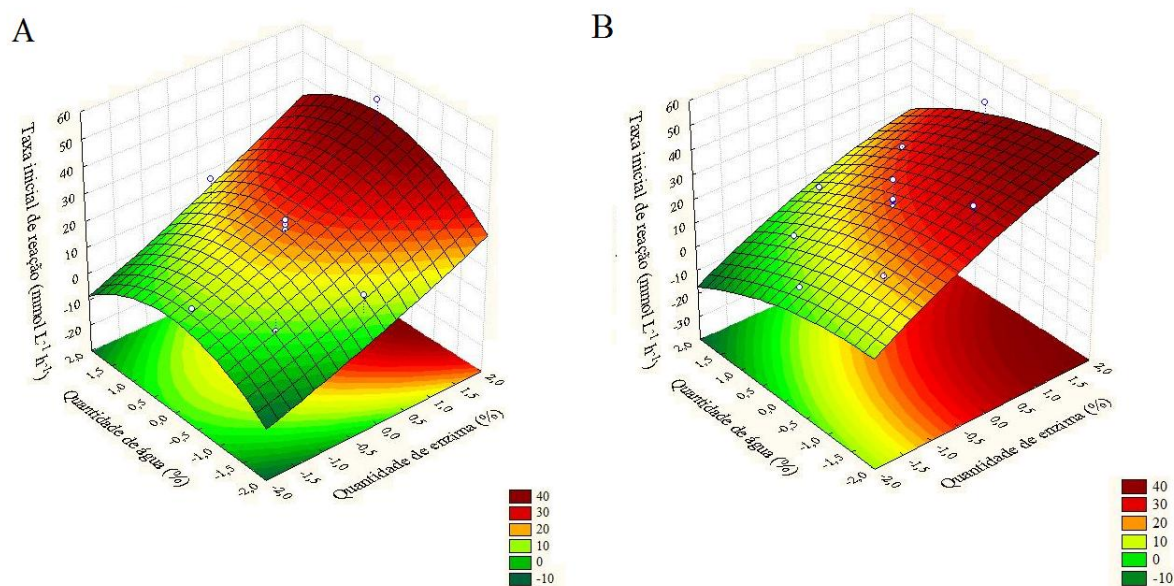


Figura B4 – Superfície de resposta em função da taxa inicial de reação (mmol L⁻¹ h⁻¹) correspondente ao efeito das variáveis quantidade de água *versus* quantidade de enzima. A) CALB-435; B) CALB-MCI.

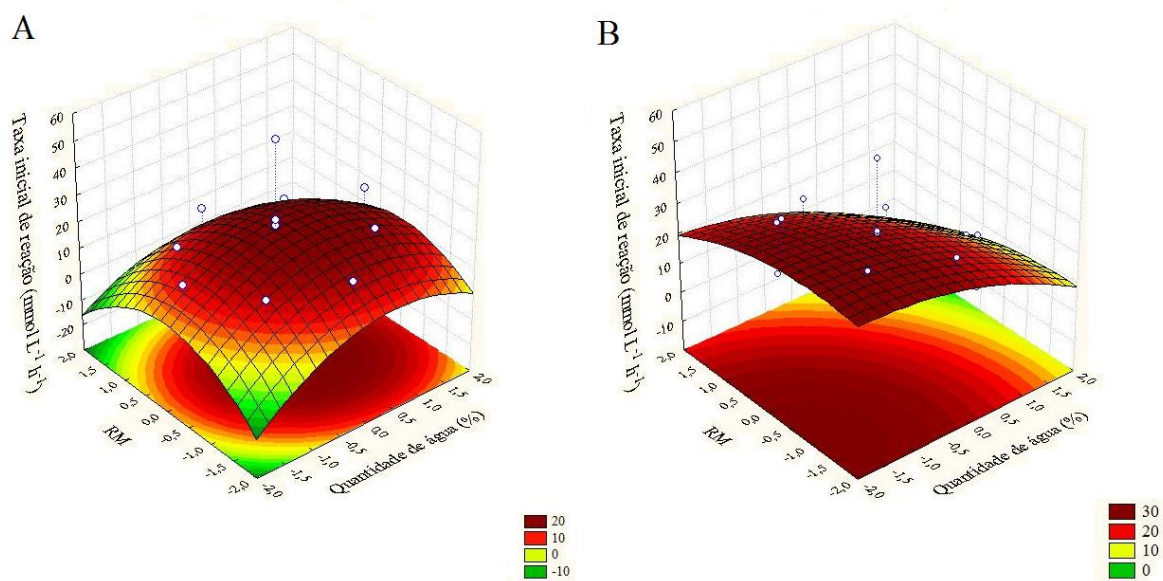


Figura B5 – Superfície de resposta em função da taxa inicial de reação ($\text{mmol L}^{-1} \text{h}^{-1}$) correspondente ao efeito das variáveis quantidade de enzima *versus* razão molar. A) CALB-435; B) CALB-MCI.