

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ANA BEATRIZ RAMOS MOREIRA

**SELEÇÃO DE FONTE DE LIPASE PARA SÍNTESE DE BIODIESEL POR
TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE PALMA COM ETANOL**

LORENA
Maio - 2007

ANA BEATRIZ RAMOS MOREIRA

**SELEÇÃO DE FONTE DE LIPASE PARA SÍNTESE DE BIODIESEL POR
TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE PALMA COM ETANOL**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Química.

Área de concentração: Processos Catalíticos e
Biocatalíticos

Orientadora: Profa. Dra. Heizir F. de Castro

**LORENA
2007**

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

Catálogo na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Moreira, Ana Beatriz Ramos

Seleção de fonte de lipase para síntese de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palma com etanol / Ana Beatriz Ramos Moreira; orientadora Heizir Ferreira de Castro. -- 2007

120 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Lipase imobilizada 2. Biodiesel 3. Óleo de Palma 4. Etanol. I. Título.

577.152.9 - CDU

Dedico este trabalho às pessoas que mais me incentivaram e ajudaram a concluir esta importante etapa de minha vida:

A meus pais (Vilma e Cândido) pela boa educação, constante apoio e respeito em minhas escolhas.

A minha irmã Juliana, pelos conselhos e compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Denis pela paciência, pelo suporte e companheirismo.

A minha amiga Ariela pela generosidade e presteza no desenvolvimento deste projeto.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar-me sempre em meus caminhos e permitir-me conseguir chegar até aqui.

A Prof^a Dra. Heizir Ferreira de Castro pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela ótima orientação, dedicação, atenção, pelos ensinamentos e valiosos conselhos que contribuíram significativamente para o aprimoramento deste trabalho.

Aos meus pais e minha irmã Juliana, pelo amor, respeito, paciência e compreensão nas horas mais difíceis.

Ao Denis de Sousa Pinheiro, meu namorado, pelo carinho, incentivo e apoio incondicional em minha vida profissional ao longo de nossa convivência.

A Dr^a Jayne Carlos de Souza Barboza pela amizade, pelo acolhimento e disponibilidade durante minha vida acadêmica sempre que solicitada.

Aos Doutores: Júlio César dos Santos e Victor Heber Perez, pelos conselhos e incessante ajuda nas principais dificuldades encontradas neste trabalho.

A Profa Dr^a Gisella M. Zanin pela participação no exame de qualificação e também na defesa da dissertação.

Aos amigos do laboratório de biocatálise: Ariela, Larissa, Gisele, Matheus, Luiza (IC), Caio, Patrícia (IC), Grazielle, Cláudia e Alessandra pela boa convivência, amizade e suporte na execução deste projeto.

As minhas amigas de república: Vanessa, Nelize e Patrícia, pelo incentivo, apoio e companheirismo.

A Escola de Engenharia de Lorena incluindo todos os colegas, professores e seus funcionários que contribuíram de forma direta e indiretamente em minha formação durante estes anos.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

“...Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos os meus caminhos, diz o Senhor. Porque, assim como o céu é mais alto que a Terra, assim são os meus caminhos mais altos que os vossos caminhos, e os meus pensamentos mais altos que os vossos pensamentos....”

A BÍBLIA SAGRADA - ISAÍAS 55:8-9

RESUMO

Moreira, A. B. R. **Seleção de fonte de lipase para síntese de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palma com etanol**. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2007.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a reação de transesterificação enzimática do óleo de palma com etanol visando a utilização do produto resultante (biodiesel) como combustível alternativo ao diesel convencional. O desempenho de diferentes fontes de lipases, incluindo *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase), *Candida antarctica* B (CALB L), *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), *Burkholderia cepacia* (Lipase PS), *Penicillium camembertii* (Lipase G) e lipase de células animais (pâncreas de porco, Tipo II) imobilizadas em polissiloxano álcool polivinílico (POS-PVA) ativado com glutaraldeído foi avaliado na reação de etanolise do óleo de palma em condições fixas de temperatura (40 °C) e razão molar etanol/óleo (18). Entre as lipases testadas, a lipase de *Pseudomonas fluorescens* teve um desempenho destacado com relação atividade de transesterificação, convertendo 90,98% do óleo de palma nos ésteres etílicos correspondentes em 72h, o que forneceu uma produtividade de 6,40 mg biodiesel/g.h.

Experimentos posteriores foram realizados visando verificar a influência da forma de utilização da lipase selecionada (livre ou imobilizada), bem como avaliar se o tipo de agente de ativação do suporte poderia modificar sua ligação com a enzima, alterando as propriedades da fonte de lipase selecionada, gerando conseqüentemente rendimentos de transesterificação mais elevados. Os resultados obtidos confirmaram que a lipase livre foi menos eficiente que a lipase imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído ou epícloridrina. Entre os dois agentes de ativação testados, epícloridrina forneceu o derivado imobilizado mais ativo e estável em meio orgânico, possibilitando incrementos tanto no rendimento de transesterificação (99,40%) como na produtividade do processo (8,16 mg/g.h). A superioridade desse derivado imobilizado foi também confirmada por meio da caracterização de suas propriedades bioquímicas, cinéticas e morfológicas, revelando uma fixação adequada da enzima no suporte, bem como uma elevada estabilidade operacional (tempo de meia-vida de 163 h).

Nas condições operacionais estabelecidas (temperatura 58 °C e razão molar óleo/etanol de 1:18) a lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em POS-PVA ativado com epícloridrina foi considerado o biocatalisador mais eficiente para efetuar a transesterificação do óleo de palma, alcançando uma conversão praticamente total em ésteres de etila em 24h, correspondendo uma produtividade de 23,87 mg/g.h.

O produto purificado (biodiesel) era essencialmente inodor e de aspecto translúcido de coloração amarelo palha. Pureza dos ésteres etílicos foi elevada e isenta de glicerina ligada como verificado por RMN¹³C (APT - Attached Proton Test). Adicionalmente, as outras propriedades como baixo teor de umidade (0,02%), densidade (0,8 g/cm³) e viscosidade (4,34cSt) atendem as especificações exigidas pela Agência Nacional de Petróleo (ANP) para uso como biocombustível.

Palavras-chave: Biodiesel, Etanol, Óleo de Palma, Lipase Imobilizada.

ABSTRACT

Moreira, A. B. R. **Selection of lipase source for the synthesis of biodiesel by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol**. 2007. 120 f. Dissertation (Master of Science in Chemical Engineering) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2007.

The objective of this work was to study the enzymatic transesterification reaction of palm oil with ethanol aiming at utilizing the resultant product (biodiesel) as alternative fuel to the conventional diesel. The performance of different lipase sources, including *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase), *Candida antarctica* B (CALB L), *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), *Burkholderia cepacia* (Lipase PS), *Penicillium camembertii* (Lipase G) and Porcine Pancreatic Lipase (PPL, type II) immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol (POS-PVA) hybrid composite activated with glutaraldehyde was evaluated in the ethanolysis reaction under fixed conditions of temperature (40 °C) and molar ratio ethanol/oil (18). Among the tested lipases, the *Pseudomonas fluorescens* lipase had outstanding performance in relation to the transesterification activity, converting 90.98% of palm oil in the corresponding ethyl esters in 72 h which gave a productivity of 6.40 mg biodiesel/g.h.

Further studies were carried out to verify the effect of other functional activating agent (epichloridrin) for the support upon the immobilization procedure. In this set of experiments, free lipase AK was also used for comparative purpose. It is expected that the modification in the linkage between the enzyme and support, could alter the properties of this lipase preparation in the immobilized form and consequently improve the transesterification. Results confirmed that the free lipase was less efficient than the lipase immobilized on POS-PVA activated with either glutaraldehyde or epichloridrin. Between the tested activating agents, epichloridrin was found to give the most stable and active immobilized derivative in organic medium, resulting in enhanced transesterification yield (99.40%) and reaction productivity (8.16 mg/g.h). These results were also confirmed by the characterization of the biochemical, kinetic and morphological properties of this biocatalyst that revealed an appropriate fixation of the enzyme on the support, as well as high operational stability (half-life time = 163 h).

Under the established operational conditions (58 °C and molar ratio ethanol/oil = 18) the immobilized *Pseudomonas fluorescens* lipase on POS-PVA activated with epichloridrin was found to be the most efficient biocatalyst to be used in the transesterification of the palm oil with ethanol, allowing almost total conversion in ethyl ester to be achieved in 24 h, corresponding to a productivity of 23.87 mg/g h.

The purified product (biodiesel) was of straw yellow in color and essentially odorless. Purity of the fatty acid ethyl ester was found to be high having no glycerol bound as verified by NMR ¹³C (APT- Attached Proton Test). In addition, the other properties such as low water content (0.02%), specific gravity (0.8 g/cm³) and viscosity (4.34 cSt) are in accordance with specifications recommended by the Brazilian Petroleum Agency (ANP) to be used as biofuel.

Keywords: Biodiesel, Ethanol, Palm Oil, Immobilized Lipase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Considerações iniciais	18
2.2. Biodiesel	18
2.3. Comparação das propriedades do biodiesel com o diesel	20
2.4. Uso do biodiesel no mundo e no Brasil	22
2.5. Matérias-primas para produção de biodiesel	23
2.5.1. Óleos vegetais	24
2.6. Métodos de modificação de óleos vegetais para uso como biocombustíveis	28
2.7. Reação de transesterificação para produção de biodiesel	30
2.8. Transesterificação enzimática	33
2.9. Lipases	36
2.10. Imobilização de lipases	39
2.11. Exemplos de transesterificação enzimática de óleos e gorduras visando a síntese de biodiesel	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Materiais	45
3.1.1. Enzimas	45
3.1.2. Materiais de partida	45
3.1.3. Suporte de imobilização	45
3.1.4. Outros Reagentes	45
3.2. Equipamentos	46
3.3. Metodologia Experimental	46
3.3.1. Síntese do Suporte	46
3.3.2. Ativação do suporte	47
3.3.3. Imobilização das lipases	47
3.3.4. Síntese de biodiesel	48
3.3.5. Caracterização morfológica, bioquímica e cinética do derivado imobilizado mais eficiente para síntese de biodiesel	51
3.4. Métodos de Análise	53
3.4.1. Determinação da atividade hidrolítica	53
3.4.2. Determinação da atividade sintética	53
3.4.3. Análise de viscosidade do óleo vegetal e biodiesel	54
3.4.4. Determinação do teor de umidade	54
3.4.5. Determinação da densidade do óleo vegetal e biodiesel	54
3.4.6. Dosagem dos ésteres etílicos	55
3.4.7. Caracterização do óleo de palma e biodiesel por RMN ¹³ C (CDC1 ₃)	56

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. Características das amostras de óleo de palma	58
4.1.1. Composição química e propriedades do óleo refinado	58
4.1.2. Viscosidade do óleo de palma	59
4.2. Caracterização do suporte de imobilização	60
4.3. Síntese de biodiesel	62
4.3.1. Seleção da fonte de lipase	62
4.3.2. Testes de obtenção de biodiesel com a fonte de lipase selecionada	65
4.4. Propriedades biocatalíticas da lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i> livre e imobilizada em POS-PVA ativado com diferentes compostos	67
4.4.1. Influência do agente de ativação na recuperação de lipase no suporte	67
4.4.2. Influência do agente de ativação do suporte nas propriedades bioquímicas e cinéticas dos derivados imobilizados	71
4.4.3. Parâmetros cinéticos da lipase AK livre e imobilizada em POS-PVA	78
4.4.4. Influência do agente de ativação do suporte nas propriedades morfológicas da lipase AK imobilizada em POS-PVA	80
4.6. Estabilidade operacional do sistema imobilizado	86
4.7. Reação nas condições operacionais estabelecidas	88
5. CONCLUSÕES	93
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	95
REFERÊNCIAS	96
APÊNDICES	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Comparação das estruturas do hexadecano (diesel) (a) e do palmitato de etila (biodiesel) (b)	20
Figura 2.2. Estrutura de uma molécula de triglicerídeos.....	25
Figura 2.3. Fluxograma do processamento do óleo de palma.	28
Figura 2.4. Comparação dos valores de viscosidade óleo vegetal x biodiesel na reação de transesterificação (a). Comparação dos valores de ponto névoa óleo vegetal x biodiesel na reação de transesterificação (b).	30
Figura 2.5. Transesterificação de triglicerídeos com álcool. (a) Equação geral; (b) Três reações consecutivas e reversíveis. R1, R2, R3 e R', representam os grupos alquila.	31
Figura 2.6. Fluxograma do processo de produção de biodiesel	32
Figura 2.7. Comparação da produção de biodiesel usando-se catalisador alcalino e lipases.	36
Figura 2.8. Reações catalisadas por lipases.....	37
Figura 2.9. Estrutura da matriz polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA).....	41
Figura 3.1. Esquema do procedimento de imobilização das lipases em matriz híbrida POS-PVA.	47
Figura 3.2. Reator batelada utilizado para a produção de biodiesel.	49
Figura 3.3. Decantação da glicerina e do biodiesel.	50
Figura 3.4. Curva de calibração dos ésteres de etila de acordo com a composição de cada ácido graxo presente no óleo de palma.....	55
Figura 4.1. Fluxograma geral das etapas desenvolvidas no trabalho experimental.	57
Figura 4.2. Viscosidade absoluta em função da taxa de deformação do óleo de palma refinado (40 °C).	59
Figura 4.3. Tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação do óleo de palma refinado (40 °C).	59
Figura 4.4. Difratoograma obtido na análise de raio-X do suporte POS-PVA (a) suporte POS-PVA ativado com glutaraldeído (b).....	60
Figura 4.5. Microscopia eletrônica de varredura: (a) suporte POS-PVA puro; (b) suporte POS-PVA ativado com glutaraldeído.....	61
Figura 4.6. Perfil da curva de DSC do suporte POS-PVA.	62
Figura 4.7. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo na reação de etanolise do óleo de palma catalisada por diferentes lipases imobilizadas em POS-PVA. a) Lipolase, b) Lipase AK, c) Lipase PS; d) Lipase G; e) Lipase Calb L; f) Lipase pancreática.	64

Figura 4.8. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo na reação de etanolise do óleo de palma catalisada pela lipase AK livre (○) e imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (▲) e epicloridrina (■).....	66
Figura 4.9. Mecanismo de ativação do suporte e imobilização da enzima empregando diferentes agentes de ativação: (a) glutaraldeído e (b) epicloridrina.....	69
Figura 4.10. Espectros no infravermelho obtidos para as amostras do suporte POS-PVA antes e após a ativação (a) e da lipase livre e imobilizada (b).....	70
Figura 4.11. Superfícies de resposta e curvas de nível para a atividade da lipase AK livre (a), imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (b) e epicloridrina (c) em função do pH e da temperatura.....	76
Figura 4.12. Atividades hidrolíticas da lipase livre (a) e imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (b) e epicloridrina (c) em função da concentração de substrato (expressa em conteúdo total de ácidos graxos contidos em emulsões azeite de oliva/ água) nas condições previamente estabelecidas.	78
Figura 4.14. Micrografias obtidas pelo modo elétrons secundários referentes ao suporte ativado com glutaraldeído (a), da lipase AK imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (b), do suporte ativado com epicloridrina (c) e da lipase AK imobilizada em POS-PVA, ativado com epicloridrina (d).....	81
Figura 4.15. Curvas características obtidas por DSC para a lipase livre (a) e imobilizada em suporte POS-PVA ativado com glutaraldeído (b) e epicloridrina (c).....	83
Figura 4.16. Influência da razão molar álcool/óleo no rendimento de transesterificação do óleo de palma com etanol (temperatura de reação 40°C).....	84
Figura 4.17. Rendimento de reação de transesterificação do óleo de palma com etanol catalisada por lipase AK imobilizada (razão molar óleo/ etanol 1:18) sob diferentes temperaturas (40 e 58°C).....	85
Figura 4.18. Porcentagem mássica total de ésteres de etila em função do número de ciclos.	87
Figura 4.19. Estabilidade operacional da lipase AK imobilizada em POS-PVA, em bateladas consecutivas, na transesterificação do óleo de palma com etanol a 40 °C.	88
Figura 4.20. Perfil da reação de transesterificação do óleo de palma com etanol nas condições estabelecidas (razão molar etanol/óleo = 18, temperatura 58°C).	89
Figura 4.21. Viscosidade x Rendimento em ésteres de etila na transesterificação enzimática do óleo de palma.....	89
Figura 4.22. Amostras do óleo de palma e do biodiesel obtido por trnasensterificação enzimática.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Especificações de alguns óleos vegetais in natura e do óleo diesel.....	21
Tabela 2.2. Características físico-químicas do biodiesel (ésteres etílicos) de várias espécies vegetais e do óleo diesel convencional.....	22
Tabela 2.3. Composição de ácidos graxos dos principais óleos vegetais.....	25
Tabela 2.4. Características de algumas culturas oleaginosas com potencial de uso energético.	26
Tabela 2.5. Dados levantados em relação às características da transesterificação química e enzimática.....	35
Tabela 2.6. Transesterificação enzimática de óleos vegetais com álcoois para a síntese de biodiesel empregando diferentes tipos de lipases.....	43
Tabela 3.1. Tipo de análise e equipamentos utilizados nos ensaios	46
Tabela 3.2 Níveis reais e codificados para as variáveis temperatura e pH avaliadas segundo planejamento experimental estrela rotacional	51
Tabela 3.3. Condições para determinação da formação de ésteres de etila.....	55
Tabela 4.1. Características do óleo de palma fornecido pela Agropalma.	58
Tabela 4.2. Composição em ácidos graxos do óleo de palma refinado fornecido pela Agropalma.	58
Tabela 4.3. Coeficiente de ajuste dos dados a lei de potência $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$	59
Tabela 4.4. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) da área do suporte puro e ativado com glutaraldeído.	61
Tabela 4.5. Valores das atividades hidrolítica e sintética dos derivados imobilizados testados	63
Tabela 4.6. Resumo dos experimentos realizados utilizando diferentes lipases imobilizadas.....	65
Tabela 4.7. Resumo dos experimentos realizados utilizando lipase AK livre e imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído e epícloridrina.....	67
Tabela 4.8. Rendimento de imobilização da lipase AK no suporte POS-PVA ativado com glutaraldeído e epícloridrina.....	67
Tabela 4.9. Resultados obtidos no planejamento experimental para avaliação do efeito das variáveis temperatura e pH na atividade hidrolítica da lipase AK livre e imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (GA) e epícloridrina (EP).	72
Tabela 4.11. Análise de variância (ANOVA) para lipase livre	75

Tabela 4.12. Análise de variância (ANOVA) para lipase imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído	75
Tabela 4.13. Análise de variância (ANOVA) para lipase imobilizada em POS-PVA ativado com epícloridrina	75
Tabela 4.14. Experimentos de confirmação dos modelos estatísticos para atividade hidrolítica em função da temperatura e do pH.....	77
Tabela 4.15. Parâmetros cinéticos da enzima livre e dos sistemas imobilizados	79
Tabela 4.16. Composição elementar da varredura da área da lipase AK imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído e epícloridrina por EDS.	82
Tabela 4.17. Valores de viscosidade e rendimento obtidos nos ensaios realizados com a lipase AK imobilizada em POS-PVA ativado com epícloridrina.	86
Tabela 4.18. Propriedades do biodiesel obtido e as especificações da ANP	90

LISTA DE SIGLAS

ANP: Agência Nacional do Petróleo

GA: Glutaraldeído

EP: Epicloridrina

O/A: óleo/ álcool

POS-PVA: Polissilioxano - álcool polivinílico

AK: Lipase de *Pseudomonas fluorescens*

G: Lipase de *Penicilium camembertii*

LPP: Lipase de pâncreas de porco

CALB L: Lipase de *Candida antarctica*

PS: Lipase de *Burkholderia cepacia*

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS: Energia Dispersiva de Raio-X

DSC: Calorimetria Diferencial de Varredura

MCT: Ministério da Ciência e Tecnologia

CDCL₃ :Clorofórmio Deutereado

RMN ¹³C : Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a produção de biodiesel constitui um desenvolvimento prioritário mundialmente, devido principalmente a problemas ambientais causados pela emissão de gases que contribuem para o aquecimento global. Neste sentido, estudos relacionados a combustíveis alternativos que sejam economicamente competitivos, ambientalmente aceitáveis e prontamente disponíveis como o biodiesel tornam-se imprescindíveis.

O biodiesel é um combustível renovável formado por monoésteres de ácidos graxos atóxicos e biodegradáveis. Comparado ao diesel, seu uso provoca significativa redução da emissão de gases, como partículas de carbono, monóxidos de carbono e gases sulfurados (FELIZARDO, 2003) e permite que se estabeleça um ciclo fechado de carbono no qual o CO₂ liberado na combustão é reabsorvido no crescimento da massa vegetal (FERRARI, 2005). No aspecto econômico este combustível possibilita a redução de importações de petróleo e diesel refinado, além de gerar trabalho, principalmente no setor primário, pelo cultivo de oleaginosas (FELIZARDO, 2003). Dentre os óleos vegetais com potencial à obtenção de biodiesel, destaca-se o óleo de palma, por ser o segundo óleo mais abundante no mundo e por ser a palma caracterizada pela produtividade superior entre todas as oleaginosas (KUEN SOON, 2001).

Contudo, para a utilização dos óleos vegetais em motores de combustão, é necessário efetuar modificações na molécula do triglicerídeo, devido principalmente a sua elevada viscosidade (NASCIMENTO; COSTA NETO; MAZZUCO, 2001). Diferentes alternativas vêm sendo propostas para a modificação destes óleos, tais como: pirólise, microemulsificação e a transesterificação (PINTO et al, 2005).

A tecnologia estabelecida para a produção industrial de biodiesel é baseada na transformação química (alcoólise) de óleos vegetais com metanol, usando catalisadores ácidos ou básicos, para promover a quebra das moléculas de triglicerídeos e gerar uma mistura de ésteres de ácidos graxos (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007). Apesar do elevado rendimento obtido por esta via, o metanol constitui um produto também fóssil (obtido do petróleo) e o uso dos catalisadores químicos gera problemas ao meio ambiente e requer inúmeras etapas de recuperação e purificação do produto final. Devido a estes problemas, várias alternativas estão sendo pesquisadas, como a substituição do metanol pelo etanol de origem vegetal, menos poluente e a utilização de catalisadores bioquímicos que apresentam alta seletividade e requerem condições brandas de operação.

A síntese de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos vegetais significa

oportunidade concreta de recuperação do catalisador, elimina os problemas de separação, índice de acidez e teor de sódio verificados no processo industrial tradicional. Além disso, é uma alternativa que atende aos apelos atuais da Química Verde, reduzindo o impacto ambiental pela minimização dos resíduos gerados no processo. Esta rota de processo vem sendo estudada no país, testando tanto lipases imobilizadas disponíveis comercialmente (OLIVEIRA; ALVES, 1999) como lipases solúveis previamente imobilizadas em suportes diversos (NASCIMENTO; COSTA NETO; MAZZUCO, 2001; COSTA NETO, 2002).

Em 2003 o Grupo de Biocatálise do DEQUI/ FAENQUIL iniciou estudos nessa área de pesquisa, visando testar derivados imobilizados de lipase alternativos aos sistemas imobilizados disponíveis comercialmente para síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu e butanol (URIESTE, 2004). Resultados promissores foram alcançados empregando a lipase pancreática (LPP) imobilizada covalentemente em suporte híbrido constituído de polissiloxano e álcool polivinílico (POS-PVA), com rendimento de transesterificação similar aos alcançados pela atuação de lipases imobilizadas disponíveis comercialmente, particularmente Lipozyme IM²⁰. Entretanto, essa preparação de lipase não foi tão adequada como anteriormente constatado quando butanol foi substituído por etanol, provavelmente devido ao elevado grau de polaridade do sistema reacional óleo e etanol. Mesmo com adição do solvente, os rendimentos obtidos foram inferiores a 20% (MOREIRA et al, 2006).

Para dar seqüência a essa linha de pesquisa, propõe-se no presente trabalho o aprimoramento da síntese de ésteres de etila, empregando como modelo de estudo o sistema óleo de palma e etanol, testando-se lipases de diferentes fontes imobilizadas em suporte híbrido (POS-PVA). Como parâmetros de avaliação foram considerados os seguintes parâmetros: velocidade de formação dos diversos ésteres, rendimento global da reação, produtividade e viscosidade. As condições de síntese em termos de temperatura de reação e razão molar óleo/etanol foram estabelecidas empregando o sistema imobilizado selecionado. O produto transesterificado foi analisado e suas propriedades comparadas com as especificações exigidas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações iniciais

A demanda elevada de energia no mundo industrializado e os problemas de poluição causados devido ao uso difundido de combustíveis fósseis levam a necessidade do desenvolvimento de fontes de energia renováveis e de menor impacto ambiental que as tradicionais. Isto estimulou o interesse recente em fontes alternativas para a substituição dos combustíveis oriundos do petróleo. Nessa perspectiva surgem os óleos vegetais, por serem fontes de energia renováveis e inesgotáveis, além de possuírem um conteúdo energético próximo ao diesel (RAMOS et al., 2003; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

Apesar de ser favorável do ponto de vista energético, a utilização direta de óleos vegetais em motores a diesel é muito problemática. Estudos efetuados em diversos óleos vegetais mostraram que a sua combustão direta conduz à carbonização na cabeça do injetor, resistência à injeção nos segmentos dos êmbolos, diluição do óleo do Carter, contaminação do óleo lubrificante, entre outros problemas. As causas destes problemas foram atribuídas à polimerização dos triglicerídeos, por meio de suas duplas ligações, que conduzem à formação de depósitos, assim como à baixa volatilidade e a elevada viscosidade dos óleos vegetais geram problemas na atomização do combustível (COSTA NETO et al., 2000; RAMOS et al., 2003). Conseqüentemente, vários estudos estão sendo realizados para desenvolver derivados de óleos vegetais, cujas propriedades e desempenho se aproximam do óleo diesel. Um combustível alternativo deve ter uma técnica praticável, ser economicamente competitivo, ambientalmente aceitável e prontamente disponível (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006).

2.2. Biodiesel

Tecnicamente, o biodiesel é definido como ésteres alquílicos de ácidos graxos, obtidos na reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo (óleos e gorduras vegetais ou animais) com álcool de cadeia curta (PINTO et al., 2005).

O biodiesel pode ser utilizado como combustível puro, na forma de mistura, como complemento ao diesel extraído de petróleo, ou em baixas proporções como aditivo. Uma das grandes vantagens do biodiesel é sua adaptabilidade aos motores do ciclo diesel. Enquanto o uso de outros combustíveis limpos, como o gás natural ou biogás, requer adaptação dos motores, a combustão de biodiesel pode dispensá-la, configurando-se em uma alternativa

técnica capaz de atender a frota movida a diesel (RAMOS et al., 2003; PINTO et al., 2005). Portanto o biodiesel é um combustível renovável sendo uma alternativa aos combustíveis tradicionais, obtidos a partir do petróleo. Sua utilização traz uma série de vantagens econômicas, ambientais, e sociais.

Do ponto de vista econômico, a viabilidade do biodiesel está relacionada com o estabelecimento de um equilíbrio favorável na balança comercial brasileira, visto que o diesel é o derivado de petróleo mais consumido no Brasil, e que uma fração crescente desse produto vem sendo importada anualmente. Segundo estatísticas da Agência Nacional do Petróleo (ANP), cada 5% de biodiesel misturado ao óleo diesel consumido no País representa uma economia de divisas de cerca de US\$ 350 milhões/ ano.

No aspecto ambiental, as vantagens da utilização do biodiesel são muito significativas. O biodiesel apresenta baixa toxicidade, é biodegradável, não contém enxofre e compostos aromáticos e ainda reduz significativamente a emissão de gases, como o monóxido de carbono (RAMOS et al., 2003). A ausência total de enxofre em sua composição química confere ao biodiesel uma grande vantagem, pois não há emissões de gases sulfurados (SO_x), característicos em motores movidos a derivados de petróleo. Dessa forma, há uma contribuição efetiva para a minimização do fenômeno da chuva ácida (CHANG et al., 1996). Além disso, diferentemente do combustível fóssil, o CO₂ liberado na queima do biodiesel é reciclado por absorção durante o crescimento da massa vegetal (fotossíntese) (SHEEHAN et al. 1998). Assim, a produção do biodiesel está inserida em um processo cíclico que auxilia na minimização do efeito estufa, pois há um equilíbrio entre a massa de carbono fixada e aquela liberada. Adicionalmente, quando se utiliza álcool de origem mineral na produção de biodiesel (rota metilica) somente 78% do CO₂ é reabsorvido; por outro lado quando se utiliza álcool de origem vegetal (rota etilica) a reabsorção ocorre na íntegra (BIOCOMBUSTÍVEL..., 2007).

Segundo Oliveira e Costa (2001), a implantação de um programa energético com biodiesel abre oportunidades para grandes benefícios sociais decorrentes do alto índice de geração de emprego por capital investido, culminando com valorização do campo e a promoção do trabalhador rural, além das demandas por mão de obra qualificada para o processamento.

Desta forma, o biodiesel pode ser considerado como um combustível ambientalmente correto, economicamente viável e um produto com características técnicas semelhantes as do diesel.

2.3. Comparação das propriedades do biodiesel com o diesel

O diesel é um produto oriundo do petróleo, sendo constituído de hidrocarbonetos com número médio de carbonos em torno de 14. Por outro lado, o biodiesel é obtido pela transesterificação de óleos vegetais, que são triésteres de glicerina, cujas cadeias laterais de ácidos graxos têm números de carbono variando entre 10 e 18. Além da presença do grupamento funcional do tipo de éster, os óleos vegetais possuem massa molar cerca de três vezes maior que o diesel que lhe conferem características que dificultam a sua utilização diretamente em motores do ciclo diesel (OLIVEIRA; COSTA, 2001).

A Figura 2.1 (KUCEK, 2004) apresenta uma comparação entre as estruturas do palmitato de etila e o hexadecano que em última análise, representam os componentes de referência para o biodiesel e para o diesel de petróleo, respectivamente. Por meio dessas estruturas, pode-se observar facilmente a diferença entre a composição química de ambos compostos, com uma pequena vantagem para o éster (biodiesel), que por ser um composto oxigenado, apresenta melhor comportamento frente ao processo de combustão (ANASTOPOULOS et al., 2005).

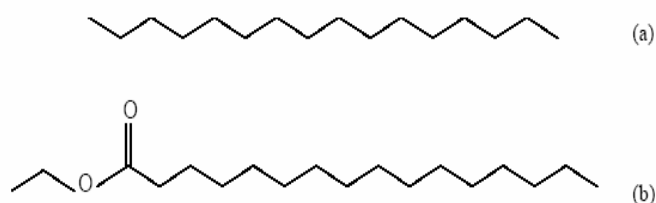


Figura 2.1. Comparação das estruturas do hexadecano (diesel) (a) e do palmitato de etila (biodiesel) (b)

Propriedades como densidade, faixa de destilação, poder calorífico, viscosidade, ponto de fluidez e número de cetano, são influenciadas por variações na composição química dos óleos (CAMPOS, 2003). A potência máxima ser atingida pelo motor em operação depende do poder calorífico do combustível. O índice de cetano define o poder de autoinflamação e combustão do óleo e seu valor condiciona o desempenho global do motor, refletindo na partida a frio, ruído e gradiente de pressão (COSTA NETO et al., 2000). O ponto de névoa corresponde à temperatura inicial de cristalização do óleo e a viscosidade a medida da resistência interna ao escoamento de um líquido. Estas constituem propriedades intrínsecas dos fluidos. A Tabela 2.1 apresenta as principais características dos óleos vegetais e do óleo diesel.

Tabela 2.1. Especificações de alguns óleos vegetais *in natura* e do óleo diesel

Características	Tipo de óleo					Óleo diesel
	mamona	babaçu	palma	soja	piqui	
Poder calorífico (kcal/kg)	8913	9049	8946	9421	9330	10950
Ponto de névoa (°C)	10	26	31	13	26	0
Índice de cetano	nd	38	38-40	36-39	38	40
Densidade a 25°C	0,956	0,914	0,912	nd	0,910	0,850
Viscosidade a 37,8°C (cSt)	285	30,3	36,8	36,8	47,0	2,0-4,3
Destilação a 90% (°C)	nd	349	359	370	nd	338
Teor de cinzas (%)	nd	0,03	0,01	nd	0,01	0,014
Cor (ASTM)	1,0	0,5	1,0	nd	2,0	2,0
Resíduos de carbono Conradson sobre 10% do resíduo seco (%)	nd	0,28	0,54	0,54	nd	0,35

Fonte: COSTA NETO et al, (2000).

nd= não determinado

Como observado na Tabela 2.1, os óleos vegetais apresentam poder calorífico e índice de cetano próximos ao diesel. Todavia os altos valores do ponto de névoa e da viscosidade inviabilizam o uso direto em motores do ciclo diesel. O ponto de névoa influencia negativamente o sistema de alimentação do motor, bem como o filtro de combustível, sobretudo quando o motor é acionado sob condições de baixas temperaturas (comum em regiões de clima temperado). Os óleos vegetais até hoje investigados apresentam ponto de névoa superior ao do óleo diesel convencional. Além disso, os valores elevados de viscosidade dificultam principalmente o estágio inicial da combustão, ou seja, o processo de atomização do combustível nos bicos injetores, de cuja eficiência dependerá a potência máxima a ser desenvolvida pelo motor (ALLEN et al. 1999). No entanto, a modificação química destes óleos gera produtos com propriedades fluidodinâmicas semelhantes as do diesel (Tabela 2.2).

Verifica-se na Tabela 2.2 que as propriedades do biodiesel, independentemente de sua origem assemelham-se ao do diesel mineral, eliminando principalmente os problemas referentes aos elevados valores de viscosidade e ponto de névoa apresentados pelos óleos vegetais. Assim, é possível sua utilização sem qualquer adaptação ou investimentos tecnológicos no desenvolvimento de motores. Adicionalmente a estas vantagens, o biodiesel apresenta, ainda, uma série de características favoráveis de ordem técnica, como por exemplo, o baixo risco de explosão, que lhe confere grande facilidade de transporte e armazenagem, pois necessita de uma fonte de calor superior a 1500 °C. Todas estas características

possibilitam que o biodiesel atenda à maior parte da frota de veículos a diesel já existentes no mercado mundial (OLIVEIRA; COSTA, 2001).

Tabela 2.2. Características físico-químicas do biodiesel (ésteres etílicos) de várias espécies vegetais e do óleo diesel convencional.

Características	Origem do Biodiesel					Óleo diesel
	Mamona	Babaçu	Palma	Soja	Pequi	
Poder Calorífico (kcal/kg)	9046	9440	9530	9449	9590	10824
Ponto de névoa (° C)	-6	-6	6	1	8	1
Índice de Cetano	ne	65	ne	45	60	45,8
Densidade (20 °C)	0,9190	0,8865	0,8597	0,885	0,8650	0,8497
Viscosidade a 37,8 °C (cSt)	21,6	3,9	6,4	4,5	5,2	3,04
Inflamibilidade (° C)	208	ne	ne	178	186	55
Ponto de fluidez (°C)	-30	ne	ne	-7	5	ne
Teor de cinzas (%)	0,01	0,03	0,01	0,006	0,01	0,014
Cor (ASTM)	1	0	0,5	2	1,0	2,0
Resíduo de Carbono	0,09	0,03	0,02	0,14	0,01	0,35

Fonte: COSTA NETO et al., 2000.

ne= não especificado

2.4. Uso do biodiesel no mundo e no Brasil

Os governos de diferentes países, em parceria com a iniciativa privada e centros de pesquisa, vêm desenvolvendo e testando biocombustíveis. A União Européia decidiu mudar o curso da política energética do bloco dos países para combater as mudanças climáticas que ameaçam o planeta. Seus 27 países estabeleceram o objetivo unilateral de aumentar o uso de fontes de energia renovável para 20% até 2020 (CHIARANDA et al, 2005).

Países como Argentina, Estados Unidos, Malásia, Alemanha, França e Itália já estão produzindo o biodiesel comercial. No mercado internacional, este biocombustível tem sido utilizado em veículos de passeio, frotas cativas, transporte público e geração de eletricidade. (MEIRELLES, 2003). Na Europa o biodiesel é utilizado tanto como aditivo ao óleo diesel, como acontece na França e na Suécia, quanto para colocar um motor em marcha como na Alemanha, Áustria e Itália.

A Alemanha é o maior produtor de biodiesel e apresenta um consumo de 300 mil toneladas anuais. O sistema de produção praticado no país baseia-se na utilização do óleo de colza e o biodiesel obtido é distribuído de forma pura (B100), isento de qualquer mistura ou aditivação, por meio de uma grande rede de abastecimento de combustíveis, composta por aproximadamente 1.000 postos (MEIRELLES, 2003).

No Brasil em maio de 2002, o PROBIODIESEL (Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel) foi anunciado com o objetivo de estabelecer um arcabouço regulatório para o desenvolvimento e a produção nacional de biodiesel (KNOTHE et al., 2006). Baseado neste programa, o governo brasileiro em 13 de janeiro de 2005 publicou a Lei 11.097 que estabelece o uso obrigatório comercial de misturas com 2% de biodiesel e 98% de óleo diesel (mistura B2) para início de 2008, esperando-se para 2013 o aumento da participação do biodiesel para 5% (B5) (ANDRADE, 2005). Esta iniciativa tem estimulado a produção nacional de biodiesel, que segundo estimativa da Agência Nacional do Petróleo (ANP), alcançou 76 milhões de litros anuais em 2006.

O consumo do diesel no Brasil pode ser dividido em três grandes setores: o de transportes, representando mais de 75% do total consumido; o agropecuário, representando cerca de 16% do consumo; e o de transformação, que utiliza o produto na geração de energia elétrica e corresponde à cerca de 5% do consumo total de diesel. O biodiesel entra fortemente como combustível substituto nos três setores, podendo ser utilizado puro (B100) no setor de transformação, em geradores, e agropecuário, em tratores. Pode ser utilizado como aditivo no setor de maior consumo de óleo diesel, o de transportes.

No País, já existem algumas empresas habilitadas a produzir biodiesel a partir do uso da soja (MT, SP e MG), como a ECOMAT, que tem suprido o CERBIO/ TECPAR com um combustível que já está sendo testado na frota do transporte coletivo de Curitiba. (ANDRADE, 2005). No final de novembro de 2006, foi registrada a inauguração da primeira usina brasileira de produção integrada de biodiesel, açúcar e álcool, no município de Barra do Bugres (MT), com expectativa de produção de 57 milhões de litros de biodiesel por ano (BRASIL é..., 2007). Atualmente, existem 11 usinas em operação no país, com capacidade anual de 640 milhões de litros de biodiesel, outras 13 usinas estão em fase final de construção, já com pedidos de autorização de funcionamento junto à ANP (BRASIL deve..., 2007).

2.5. Matérias-primas para produção de biodiesel

As matérias primas para a produção de biodiesel podem ser de diferentes origens: óleos vegetais, gorduras de animais e óleos e gorduras residuais. Os óleos e gorduras reagem com álcool, formando ésteres de ácidos graxos que constituem o biodiesel (CAMPOS, 2003). Podem se transformar em biodiesel, todos os óleos vegetais, enquadrados na categoria de óleos fixos ou triglicerídeos, como: grão de amendoim, polpa do dendê, amêndoa do côco de dendê, amêndoa do côco da praia, caroço de algodão, amêndoa do côco de babaçu, semente

de girassol, baga de mamona, semente de colza, semente de maracujá, polpa de abacate, caroço de oiticica, semente de linhaça, semente de tomate, entre muitos outros vegetais em forma de sementes, amêndoas ou polpas (RAMOS et al, 2003).

De uma forma geral, pode-se afirmar que monoalquil-ésteres de ácidos graxos podem ser produzidos a partir de qualquer tipo de óleo vegetal, mas nem todo óleo vegetal pode (ou deve) ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel. Isso porque alguns óleos vegetais apresentam propriedades não ideais, como alta viscosidade ou alto número de iodo, que são transferidas para o biocombustível e que o tornam inadequado para uso direto em motores do ciclo diesel (PYAPORN; JEYASHOKE; KANIT, 1996; RAMOS et al., 2003).

Somente álcoois simples, tais como metanol, etanol, propanol, butanol e pentanol, têm sido usados na produção do biodiesel. O metanol e o etanol são os mais frequentemente utilizados por razões de natureza física e química (cadeia curta e polaridade) (COSTA NETO et al., 2000).

A tecnologia de produção de biodiesel pela rota metílica é totalmente dominada. Ressalta-se, no entanto, que o metanol tem uma toxicidade muito elevada à saúde humana, podendo causar, inclusive, cegueira e câncer. Por outro lado, o etanol apresenta a vantagem de não ser tóxico, ser biodegradável e ser produzido a partir de fontes renováveis. Destaca-se ainda que o Brasil produz anualmente cerca de 17 bilhões de litros de etanol a partir da cana-de-açúcar e que tem uma capacidade ociosa de mais de 2 bilhões de litros por ano (VEIGA FILHO, 2007).

2.5.1. Óleos vegetais

Os óleos vegetais são produtos naturais constituídos por uma mistura de ésteres resultantes da condensação de uma molécula de glicerol (triacilgliceróis ou triglicerídeos) com três moléculas de ácidos graxos (Figura 2.2) (SRIVASTAVA; PRASAD, 2000). São constituída de ácidos graxos de cadeias curtas ou longas, cujo grau de saturação ou insaturação, é função da origem e tipo de semente (SONNTAG, 1979).

Os ácidos graxos mais comumente encontrados nos óleos apresentam cadeias de 16 e 18 átomos de carbono. Essas cadeias podem ser saturadas (sem duplas ligações) ou insaturadas (com duplas ligações) (SONNTAG, 1979). A Tabela 2.3 apresenta a composição de ácidos graxos dos principais óleos vegetais.

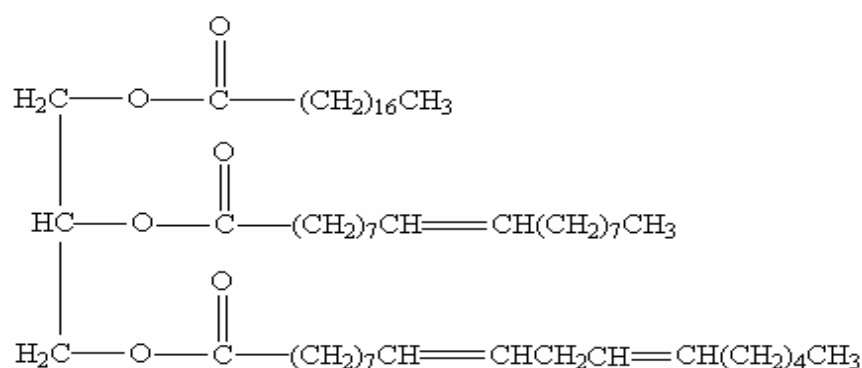


Figura 2.2. Estrutura de uma molécula de triglicerídeos.

Tabela 2.3. Composição de ácidos graxos dos principais óleos vegetais

Óleo ou gordura	Composição em ácidos graxos (% m/m)									
	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C22:0	C24:0
Amendoim	-	-	7-12	1,5-5	64-86	4-15	0,5-1	<1,5	2-4	1-2
Banha	<0,5	<1,5	24-30	12-18	36-52	10-12	<1	<0,5	-	-
Coco	41-46	18-21	9-12	2-4	5-9	0,5-3	Vest.	Vest.	Vest.	-
Colza	Vest.	Vest.	2-4	1-2	52-66	17-25	8-11	0,5-1	0,5-2,0	0,5
Girassol	Vest.	Vest.	5,5-8	2-6,5	14-34	55-73	<0,4	<0,5	0,5-1	<0,5
Milho	Vest.	Vest.	9-12	1-3	25-35	40-60	<1	<0,5	<0,5	<0,5
Palma	Vest.	1-2	41-46	4-6,5	37-42	8-12	<0,5	<0,5	-	-
Sebo	Vest.	2-4	23-29	20-35	26-45	2-6	<1	<0,5	Vest.	-
Algodão	Vest.	0,5-2	21-27	2-3	14-21	45-58	<0,2	<0,5	Vest.	Vest.
Soja	-	<0,5	8-12	3-5	18-25	49-57	6-11	<0,5	Vest	-

Fonte: Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry

Os óleos produzidos nacionalmente possuem reduzida concentração de ácidos poliinsaturados, gomas e fosfolipídeos e não necessitam da implantação de uma unidade de refino, o que torna atrativo a sua aplicação em reações de síntese de biodiesel. No entanto, a viabilidade de cada matéria-prima dependerá de suas respectivas competitividades técnica, econômica e sócio-ambiental, passando inclusive por importantes aspectos agronômicos, tais como (a) o teor em óleos vegetais; (b) a produtividade por unidade de área; (c) o equilíbrio agronômico e demais aspectos relacionados ao ciclo de vida da planta; (d) a atenção aos diferentes sistemas produtivos; (e) o ciclo da planta (sazonalidade); e (f) sua adaptação territorial, que deve ser tão ampla quanto possível, atendendo às diferentes condições edafoclimáticas (KUČEK, 2004).

Na Tabela 2.4. são apresentadas algumas características de culturas oleaginosas com potencial de uso para fins energéticos (produtividade, ciclo econômico e rendimento de óleo).

Tabela 2.4. Características de algumas culturas oleaginosas com potencial de uso energético.

Espécie	Origem do Óleo	Conteúdo de Óleo (%)	Ciclo de Máxima Eficiência (anos)	Meses de Colheita	Rendimento (tonelada óleo/ha)/ano
Palma	Amêndoa	20,00	8	12	3-6
Abacate	Fruto	7-35	7	12	1,3-1,5
Coco	Fruto	55-60	7	12	1,3-1,9
Babaçu	Amêndoa	66	7	12	0,1-0,3
Girassol	Grão	38-48	Anual	3	0,5-1,9
Colza/ Canola	Grão	40-48	Anual	3	0,5-0,9
Mamona	Grão	43-45	Anual	3	0,5-0,9
Amendoim	Grão	40-43	Anual	3	0,6-0,8
Soja	Grão	17	Anual	3	0,2-0,4
Algodão	Grão	15	Anual	3	0,1-0,2

Fonte: MEIRELLES, 2003.

Para o desenvolvimento do presente projeto optou-se pela utilização do óleo de palma, pois o biodiesel originário de palmáceas apresenta uma qualidade superior aos das demais oleaginosas, devido ao maior teor de ácidos graxos de baixa massa molecular e com alto nível de saturação (MACEDO; MACEDO, 2004). Além disso, é proveniente de uma cultura de colheita durante o ano todo, sem entressafras. A cultura é de ciclo de vida longa (25 a 30 anos) e para a variedade *tenera* é de alta produtividade, 25 t de cachos de frutos por hectare ano, equivalendo à cerca de 4 a 6 t/óleo.ha.ano. Essa eficiência de extração de óleo é cerca de dez vezes superior a obtida da soja, o dobro do coco, quatro vezes maior que o produzido pela cultura do amendoim. Mesmo a palma sendo caracterizada pela sua produtividade superior a outras oleaginosas ainda é pouco explorada no país, devido ao fato de necessitar de investimentos por vários anos, com retorno em longo prazo, já que a palmeira inicia sua produção somente quatro anos após seu plantio e a produtividade plena, só acontece após oito anos (TORRES, 2000).

O óleo de palma pertence ao grupo do ácido oleico-linoleico, por apresentar uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados, oléico e linoleico (D'AGOSTINI, 2001). O óleo extraído do coco do dendê pode ser obtido da polpa e das amêndoas. O óleo da polpa, denominado de óleo de dendê, é o tradicional óleo da culinária baiana, de cor vermelha, com

sabor e odor característicos, sendo comercializado internacionalmente com a designação *palm oil*. Seu preço varia na faixa de 300 a 400 dólares/ tonelada. O óleo obtido das amêndoas, denominado de óleo de palmiste, é comercializado no mercado internacional com preços superiores 500 dólares a tonelada (LIMA, 2005).

O óleo de palma é utilizado em muitos produtos consumidos no dia-a-dia como sabonetes, barras de chocolate, sorvetes, refeições prontas congeladas e margarina. Pode também ser usado para a produção de biocombustíveis (MAMAT et al., 2005).

O fracionamento tira proveito das características do óleo de palma quando da fusão de triglicerídeos, produzindo oleína de palma e frações de estearinas sólidas (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2006).

Na atividade industrial, o processamento do óleo de palma começa com a esterilização, em que o cacho do dendê após o corte e transporte é cozido a temperatura de 100 °C e baixa pressão do vapor. Depois de cozido o fruto é separado do cacho com um debulhador mecânico acionado por um motor de combustão interno ou elétrico. A polpa obtida vai para a digestão, que a finalidade é seu esmagamento sem afetar a semente ou o óleo de palma. O produto obtido da digestão (amêndoas e polpa) é submetido a uma prensa hidráulica para extração do óleo, gerando farelo e fibras como resíduos sólidos. Por fim, o óleo bruto obtido na etapa anterior deverá ser processado separando o óleo de palma da borra. Esta separação é realizada com o aquecimento do óleo bruto com vapor de baixa pressão. As etapas do processamento para obtenção do óleo de palma como matéria-prima são mostradas na Figura 2.3 (TORRES, 2000).

Para cada 100 toneladas de frutos processados obtém-se em média 30 toneladas de óleo. Cerca de 20% do óleo é descartado no rejeito do tanque de clarificação (borra) e cerca de 7% perdido na fibra. Os efluentes não são tóxicos, pois somente a água é adicionada durante o processo de extração (FREITAS et al., 1998). Sob o ponto de vista do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o plantio racional da palma africana (dendeeiro) para a utilização do óleo de palma, como combustível substituto ou componente de óleo diesel na Amazônia, é a melhor opção, quando não se tem uma fonte confiável de oleaginosas nativas, pelas seguintes razões:

- Propriedades físico-químicas do óleo similares ao óleo diesel.
- Alta produtividade e potencial comprovado para produção em larga escala.
- Produz o ano inteiro, o que permite menores volumes de estocagem e instalações industriais de menor porte.

- O Brasil, após 30 anos de pesquisa e plantio, tem tecnologia apropriada para aumentar a área plantada dessa cultura perene, que produz até 5 toneladas de óleo/hectare/ano (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO).

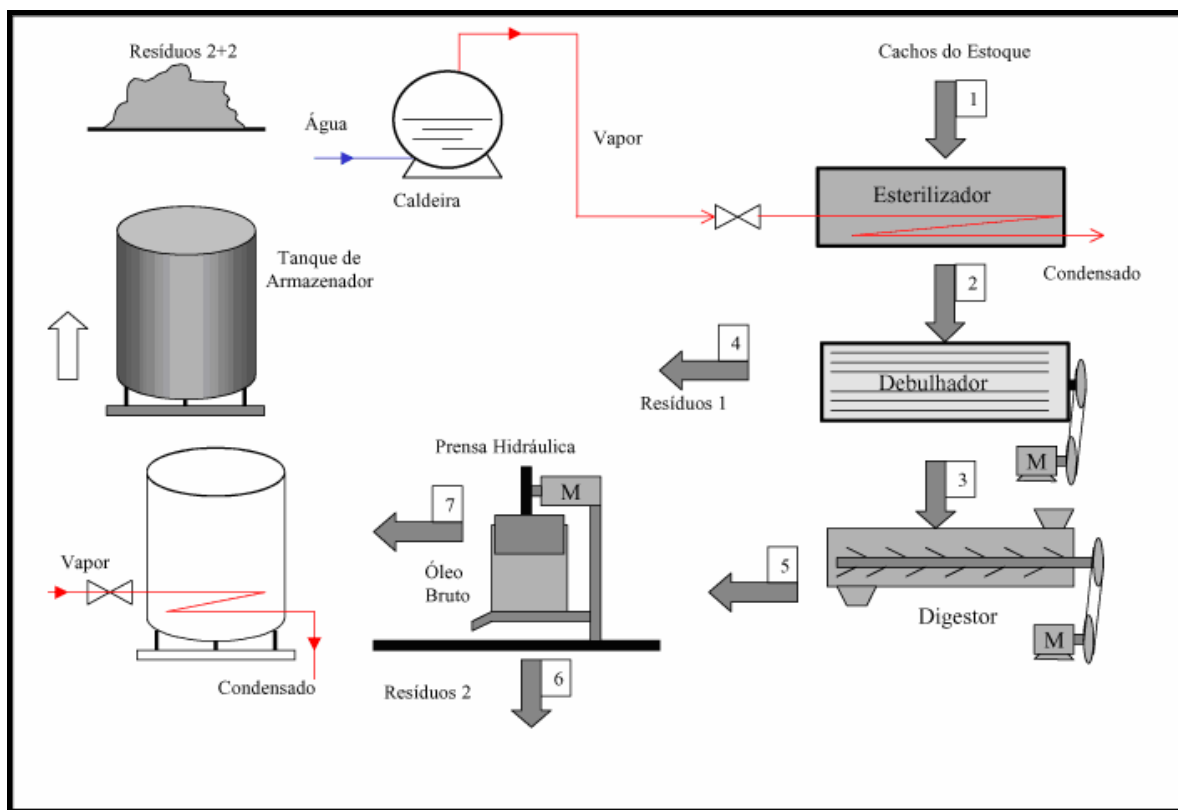


Figura 2.3. Fluxograma do processamento do óleo de palma.

2.6. Métodos de modificação de óleos vegetais para uso como biocombustíveis

Como anteriormente descrito, os problemas críticos da utilização dos óleos vegetais *in natura* estão diretamente relacionados com a sua alta viscosidade, baixa volatilidade e caráter poliinsaturado. Alguns processos são investigados com intuito de resolver esses problemas, entre eles: o craqueamento (conversão química causada pela energia térmica em presença de nitrogênio), a diluição dos óleos em diesel fóssil, a microemulsificação e a transesterificação (formação de ésteres mono-alquílicos, a partir de óleos e álcoois) (SRIVASTAVA; PRASAD, 2000).

A *pirólise* ou decomposição térmica envolve o aquecimento de uma substância em temperaturas entre 450-850°C na ausência de oxigênio. Neste processo, consegue-se provocar a quebra das moléculas dos triglicerídeos em moléculas menores. Muitos estudos foram realizados com a pirólise de triglicerídeos com o objetivo de obter produtos adequados aos

motores diesel (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). A decomposição térmica dos triglicerídeos produz diferentes tipos de compostos, incluindo alcanos, alcenos, alcadienos, ácidos carboxílicos e aromáticos, dependendo da fonte do óleo vegetal decomposto. Contudo, apesar dos óleos vegetais pirolisados possuírem satisfatórias concentrações de enxofre, água, sedimentos e cobre, são inaceitáveis os níveis de cinzas, resíduos de carbono e ponto de ignição alcançado. Embora o produto da pirólise seja quimicamente similar ao diesel proveniente do petróleo, a remoção do oxigênio durante o processo térmico elimina qualquer benefício ambiental do produto (MACEDO; MACEDO, 2004).

A *diluição de óleos vegetais em diesel fóssil* foi uma das soluções estudadas para resolver o problema da viscosidade dos óleos vegetais. Apesar de alguns testes fornecerem resultados satisfatórios, na maioria dos casos a utilização de diluições de óleos vegetais conduz ao espessamento do óleo lubrificante do motor. Este espessamento é provocado pela oxidação e polimerização do óleo vegetal dissolvido no óleo lubrificante (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

As *microemulsões* são formadas por três tipos de componentes: óleo, álcool e um composto anfifílico. Os compostos anfifílicos são selecionados principalmente por sua capacidade de solubilizar as misturas de óleo/ álcool, mas sua estrutura também contribui nas propriedades finais do combustível formulado. A formulação de um combustível híbrido, tal como a microemulsão são geralmente mais baratas de se preparar do que o biodiesel, uma vez que se usa a simples tecnologia de misturar os componentes em temperatura ambiente. Todavia, apesar das microemulsões apresentarem boas características no que diz respeito aos padrões de atomização, verificou-se que em longo prazo provocam a deposição de carbono no motor, a combustão incompleta e o aumento da viscosidade dos óleos lubrificantes (KNOTHE et al., 2006).

A *transesterificação* é a mais comum e considerada a melhor rota para a utilização dos óleos vegetais como alternativa ao diesel fóssil, pois confere ao produto (biodiesel) características como viscosidade, índice de cetano muito próximas das do diesel. As Figuras 2.4a e 2.4b demonstram a variação da viscosidade e do ponto de névoa, respectivamente, em relação ao processo de transesterificação de alguns óleos vegetais. Como ilustrado, os óleos vegetais quando submetidos ao processo transesterificação sofrem quedas bruscas nos valores do ponto de névoa e viscosidade, podendo assim o combustível obtido ser queimado diretamente em motores diesel sem a necessidade de adaptação (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

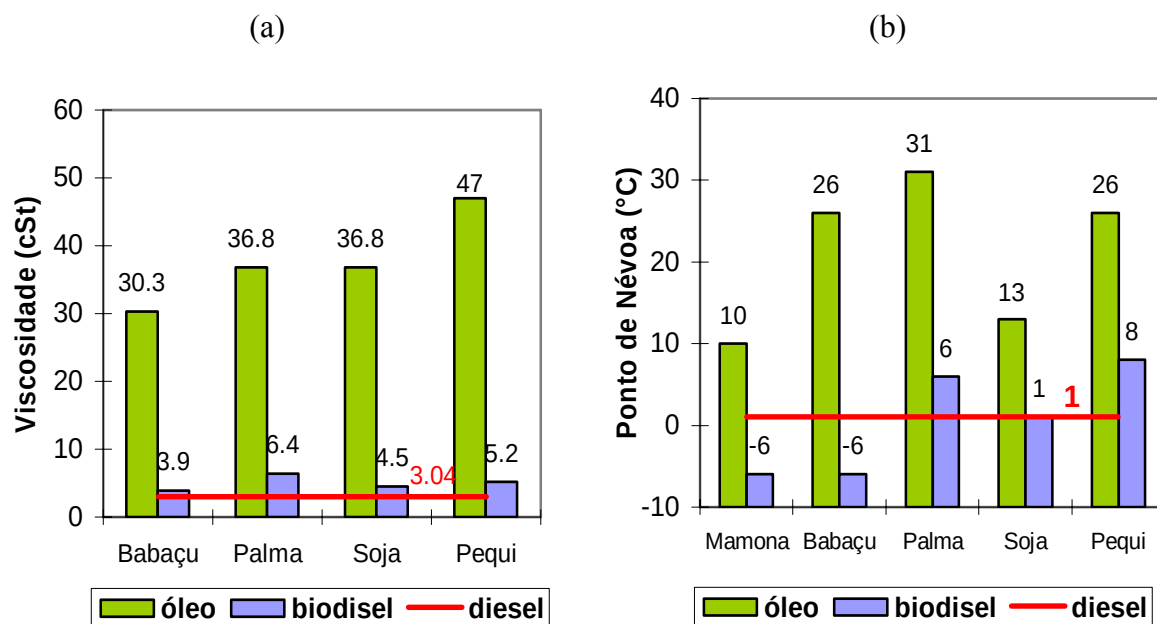


Figura 2.4. Comparação dos valores de viscosidade óleo vegetal x biodiesel na reação de transesterificação (a). Comparação dos valores de ponto névoa óleo vegetal x biodiesel na reação de transesterificação (b).

2.7. Reação de transesterificação para produção de biodiesel

De modo geral, denomina-se transesterificação a reação em que ocorre a transposição de radicais alquílicos entre um triglicerídeo e um éster ou um ácido ou ainda, um álcool na presença de um catalisador (ácidos, básicos ou enzimáticos). Neste último caso, a reação é denominada alcóolise, e é utilizada para produção de biodiesel, obtendo-se glicerol como subproduto (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). Os álcoois que podem ser utilizados são o metanol, etanol, propanol, butanol e pentanol, principalmente pelo custo e suas propriedades físico-químicas (menor cadeia carbônica) (MACEDO; MACEDO, 2004).

A reação de transesterificação com álcool pode ser representada pela equação geral ilustrada na Figura 2.5 (a). Para que ocorra a reação é importante monitorar as três etapas consecutivas e a reversibilidade da reação, como mostrado na Figura 2.5(b) (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). Na primeira etapa ocorre a conversão do triglicerídeo para diglicerídeos, seguido pela conversão do diglicerídeos para monoglicerídeo, e do monoglicerídeo para glicerol, fornecendo uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada etapa (FREEDMAN; BUTTERFIELD; PRYDE, 1986; NOUREDDINI; ZHU, 1997). Alguns parâmetros que se deve levar em conta em uma reação de transesterificação, são: o efeito da razão molar, temperatura e tempo de reação e o tipo de catalisador. Para a realização da

transesterificação, é necessário utilizar um excesso de álcool a fim de aumentar a eficiência do processo, excesso esse que pode ser recuperado posteriormente. Nessa etapa se formam duas fases: a glicerina e o biodiesel. Após a separação entre as fases, o biodiesel deve ser purificado antes de sua utilização em motores. A glicerina pode ser recuperada e aumenta a lucratividade desse processo, pois tem um alto valor agregado (PARENTE, 2003).

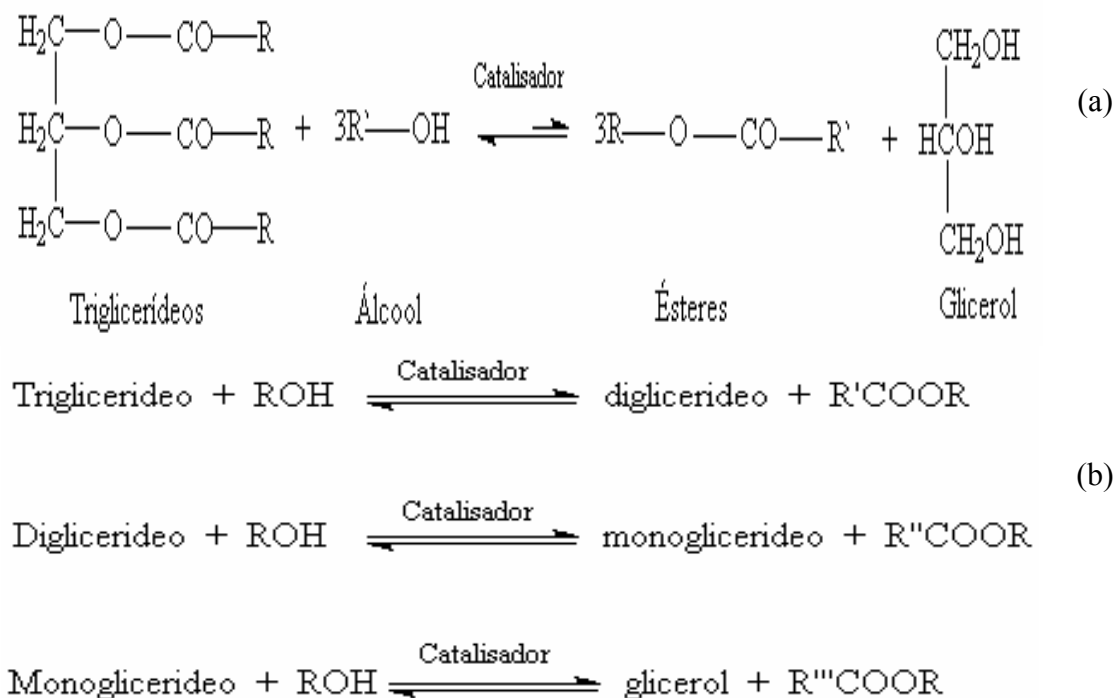


Figura 2.5. Transesterificação de triglicerídeos com álcool. (a) Equação geral; (b) Três reações consecutivas e reversíveis. R1, R2, R3 e R', representam os grupos alquila.

Com relação a estequiometria da reação, a razão molar entre triglicerídeos e álcool é de 3:1; no entanto, um excesso de álcool geralmente de 6:1 se faz necessário para elevar o rendimento de conversão de triglicerídeos em éster, bem como melhorar a eficiência da etapa de separação entre biodiesel e glicerol (MACEDO; MACEDO, 2004).

O processo de produção de biodiesel por transesterificação, partindo de uma matéria-prima graxa qualquer, envolve as etapas operacionais mostradas na Figura 2.6 e a seguir comentadas (PARENTE 2003).

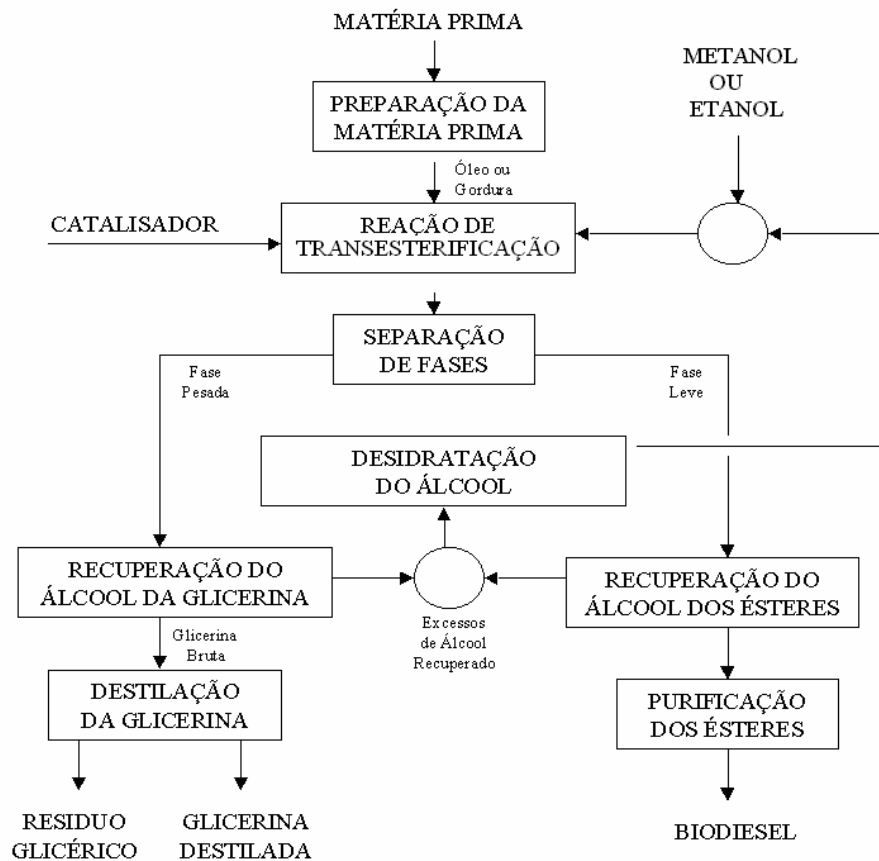


Figura 2.6. Fluxograma do processo de produção de biodiesel

Preparação da matéria prima

É necessário que a matéria prima tenha o mínimo de umidade e de acidez, o que é possível submetendo-a a um processo de neutralização, por meio de uma lavagem com solução alcalina de hidróxido de sódio ou de potássio, seguida de uma operação de secagem ou desumidificação. A especificidade do tratamento depende da natureza e condições da matéria graxa empregada como matéria-prima.

Reação de transesterificação

A reação de transesterificação é a etapa da conversão, propriamente dita, do óleo ou gordura na presença de catalisador, em ésteres metílicos ou etílicos, de ácidos graxos, que constitui o biodiesel. Na reação de transesterificação podem ser usados catalisadores alcalinos, básicos ou enzimáticos. Porém, atualmente no processo industrial para produção de biodiesel, são utilizados catalisadores alcalinos comumente o hidróxido de potássio e sódio, devido ao maior rendimento em ésteres em menor tempo de reação. A maior parte do

biodiesel atualmente produzido no mundo é derivado óleo de soja, utilizando metanol, todos os óleos vegetais, enquadrados na categoria de óleos fixos ou triglicerídeos, e o etanol também podem ser transformados em biodiesel (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2004). Todavia, este processo apresenta alguns problemas, como reação de saponificação ocasionada pela presença de água na matéria prima e ácidos graxos livres. A catálise ácida, apesar de ser mais lenta que a alcalina foi mais efetiva utilizando-se óleos com maior teor de ácidos graxos livres e água, como demonstrado em estudos realizados por Freedman, Butterfield e Pryde (1984). No entanto, esta via possui o inconveniente de promover a corrosão de equipamentos pelos catalisadores utilizados. Neste sentido a catálise enzimática aparece como promissora para minimizar os problemas das vias anteriores.

Separação de fases

Após a reação de transesterificação, a massa reacional final é constituída de duas fases, separáveis por decantação e/ou por centrifugação. A fase mais pesada é composta de glicerina bruta, impregnada dos excessos utilizados de álcool, de água, e de impurezas inerentes à matéria-prima. A fase menos densa é constituída de uma mistura de ésteres, conforme a natureza do álcool originalmente adotado, também impregnado de excessos reacionais de álcool e de impurezas.

Recuperação do álcool da glicerina

A fase pesada, contendo água e álcool, é submetida a um processo de evaporação, eliminando-se da glicerina bruta esses constituintes voláteis, cujos vapores são liquefeitos num condensador apropriado.

Desidratação do álcool

O excesso residual de álcool, após os processos de recuperação, contém quantidades significativas de água, necessitando de uma separação. A desidratação do álcool é feita normalmente por destilação.

2.8. Transesterificação enzimática

O processo de transesterificação enzimática consiste no processo de modificação lipídica realizado pelas lipases, enzimas derivadas predominantemente de bactérias, leveduras e fungos. O processo, se otimizado, oferece inúmeras vantagens ao processo químico, pois permite maior controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final,

devido à seletividade e regioespecificidade das lipases (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998; De CASTRO et al., 2004).

As lipases são conhecidas por terem a propensão a atuar mais efetivamente em moléculas de cadeia carbônica longa do que de cadeia carbônica curta (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998). Assim, de modo geral, a eficiência da transesterificação dos triglicerídeos com metanol parece ser muito menos favorecida do que com etanol, tanto em sistemas com ou sem solventes orgânicos (MACEDO; MACEDO, 2004).

A transesterificação enzimática tem a vantagem de permitir maior controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases. A tecnologia da interesterificação enzimática é uma realidade comercial, sendo utilizada na Holanda para valorização de óleos de baixo custo (De CASTRO et al., 2004). As aplicações atuais são reservadas a produtos de alto valor agregado, mas o desenvolvimento de processos mais econômicos tornará possível o emprego em produtos de maior consumo. Além disso, vem sendo muito utilizada em pesquisas científicas, para explorar as relações entre estrutura e função de triacilgliceróis, levando ao desenvolvimento de novos produtos (De CASTRO et al., 2004).

Entretanto, as dificuldades associadas ao controle do processo e ao aumento de escala, bem como ao elevado custo das lipases, têm reduzido a aplicação industrial desses catalisadores para modificação de óleos e gorduras. Todavia o procedimento de imobilização da lipase, possibilitando uma posterior reutilização do biocatalisador pode tornar o processo viável sob os pontos de vista comercial e econômico (VILLENEUVE et al., 2000).

Embora a transesterificação por catálise alcalina, resulte em altas taxas de conversão de triglicerídeos em seus respectivos ésteres, existem alguns inconvenientes que devem ser considerados: elevados gastos energéticos; recuperação do glicerol difícil e demorada; necessidade de remoção do catalisador; requer o tratamento da água alcalina residual; requer o emprego de substratos e reagentes com baixa concentração de água e ácidos graxos livres.

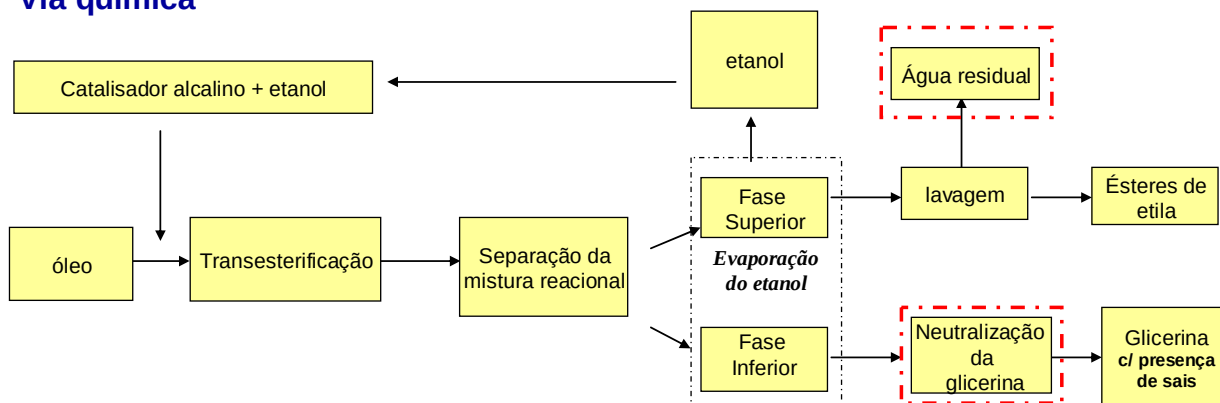
Uma comparação das características do substrato e dos produtos obtidos na catálise química (vias alcalina e ácida) e enzimática é apresentada na Tabela 2.5. Em particular, deve ser observado que o subproduto glicerol pode ser facilmente recuperado, sem processos complexos, e os ácidos graxos livres nos óleos também são convertidos em seus ésteres correspondentes. Por outro lado, o custo das lipases é significativamente maior que dos catalisadores químicos.

Tabela 2.5. Dados levantados em relação às características da transesterificação química e enzimática.

Características do processo	Via Química		Via Enzimática	Referências
	Alcalina	Ácida		
Catalisador utilizado	NaOH, KOH	H ₂ SO ₄ , H ₂ PO ₄	Lipases	MARCHETTI, 2007; MEHER, 2006.
Tempo de reação (p/ conversão de 99%)	3min-4h	3-50 h	3,5-144h	PINTO et al, 2005; URIOSTE, 2004.
% de catalisador no meio reacional	0,5-1%	0,5-3,5%	4-30%	PINTO et al, 2005
Purificação do produto	Neutralização Filtração / Centrifugação	Neutralização Filtração / Centrifugação	Filtração / Centrifugação	MARCHETTI, 2007; MEHER, 2006
Temperatura de reação	40-70 °C	55-120°C	30-40 °C	PINTO et al, 2005; MARCHETTI, 2007
Sub-produtos	glicerina, sais e sabões	glicerina	glicerina	MARCHETTI, 2007 MEHER, 2006
Recuperação do catalisador	Não	Não	95%	MARCHETTI, 2007 MEHER, 2006

Verifica-se na Tabela 2.5 que a via enzimática substitui os agressivos produtos usados como catalisadores na via química, propicia a reciclagem do catalisador, evita contaminação do biodiesel facilitando assim o processo de purificação e ainda torna mais brandas as condições de trabalho. Neste sentido, diversos estudos têm sido reportados em artigos e patentes, o aspecto comum destes consiste na otimização das condições de reação (solvente, temperatura, pH, enzima, entre outros), visando estabelecer as características operacionais para aplicações industriais. A Figura 2.7 ilustra a comparação entre o processo industrial químico e uma proposta industrial com o uso da lipase.

Via química



Via enzimática

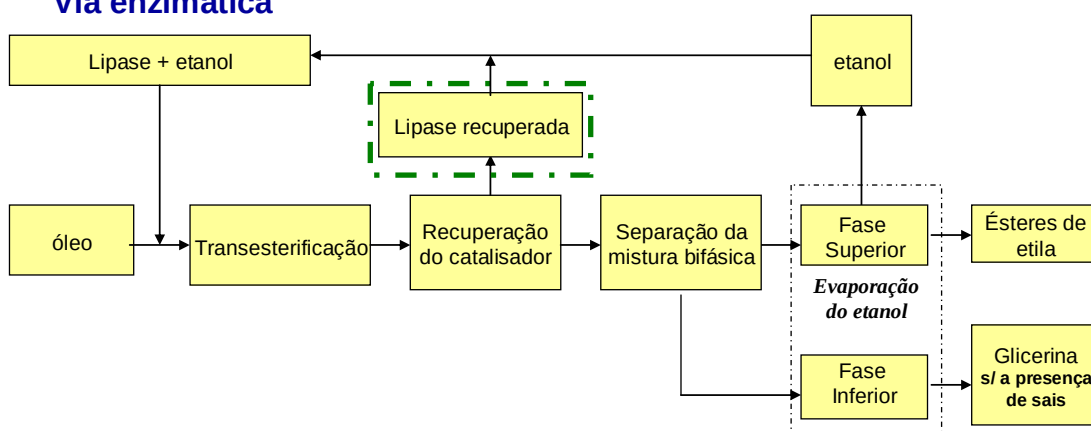


Figura 2.7. Comparação da produção de biodiesel usando-se catalisador alcalino e lipases.

2.9. Lipases

As lipases (glicerol éster hidrolases E.C.3.1.1.3) fazem parte de um grupo de enzimas hidrolíticas, com cerca de 300 resíduos de aminoácidos, que catalisam a quebra e ligações ésteres de acil gliceróis. Elas não requerem cofatores, são regioespecíficas, atuam em uma larga faixa de pH (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Além da hidrólise, as lipases também são capazes de catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização, sendo a quantidade de água do meio reacional um dos fatores determinantes para cada tipo de reação (Figura 2.8) (PAQUES; MACEDO, 2005).

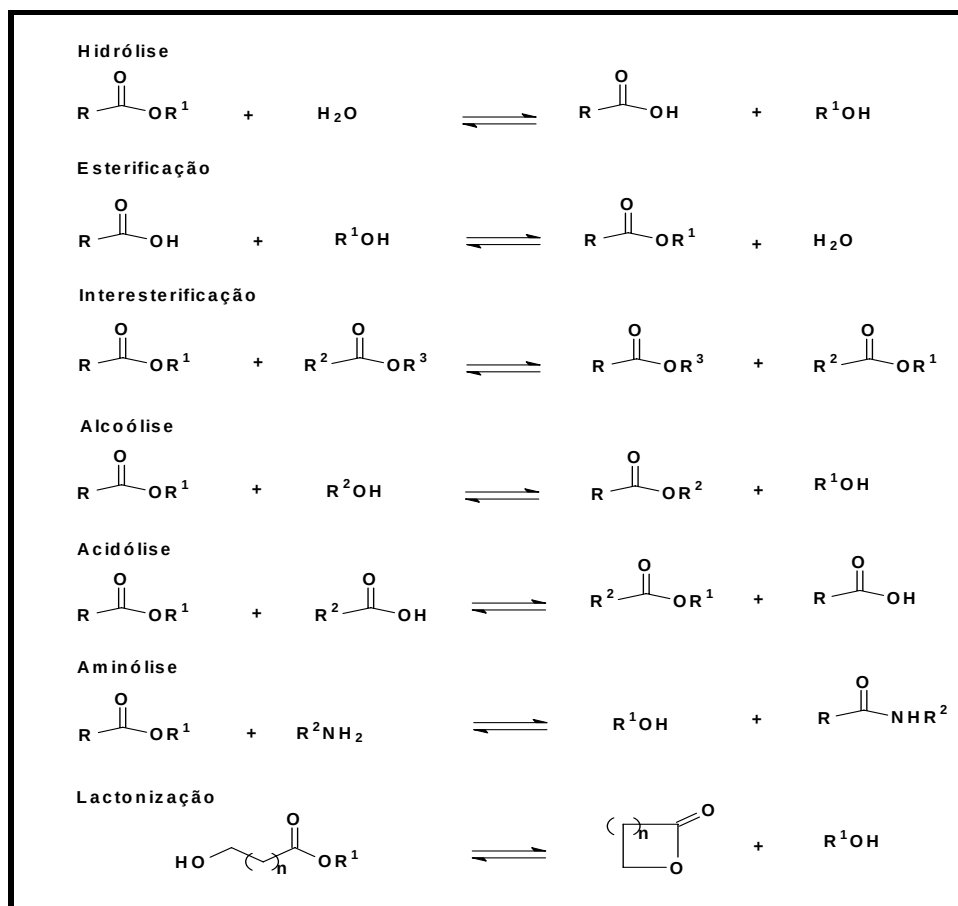


Figura 2.8. Reações catalisadas por lipases.

As lipases encontram-se largamente distribuídas na natureza em animais, vegetais e microrganismos (SHAHANI, 1975). De origem animal, podem ser citadas as lipases lácteas e lipase pancreática (PAQUES; MACEDO, 2005). As de origem vegetal são extraídas da soja, do centeio e do algodão. As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente porque além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento a partir do caldo fermentativo são, geralmente, mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes. São em sua maioria extracelulares, favorecendo sua extração, isolamento e purificação (BROCKMAN, 1984). As lipases microbianas podem ser produzidas por leveduras dos gêneros *Candida* e *Torulopsis* (BENZONAN; ESPÓSITO, 1971), por fungos filamentosos *Rhizopus*, *Geotrichum* (IWAI; OKUMURA; TSUJISAKA, 1975) e *Humicola* (IBRAIM; HAYASHI; NAGAI, 1987) e por bactérias do gênero *Pseudomonas* (SUGIURA et al., 1977) e *Staphylococcus* (ALFORD; SUGGS; PIERCE, 1964). Entre as lipases disponíveis comercialmente, selecionou-se para o desenvolvimento do presente trabalho, preparações indicadas na literatura para modificação de óleos e gorduras, incluindo lipase pancreática (pâncreas de porco) e lipases microbianas (*Rhizomucor miehei*

(LRM), *Candida antarctica* (CAL B), *Pseudomonas* sp. (LPC); *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase), *Pseudomonas fluorescens* (AK) e *Burkholderia cepacia* (PS). Algumas características dessas lipases são a seguir descritas.

Lipase de Pâncreas de Porco (LPP)

Lipases pancreáticas têm massa molar de 50 kDa e são normalmente isoladas de pâncreas ou biles de animais. Por esse motivo, de todas as lipases usadas para síntese, a LPP é a menos pura. A lipase pancreática fornecida pela Sigma contém cerca de 8-20% de proteína (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998). Preparações brutas de lipases pancreáticas contêm um número significativo de outras hidrolases (impurezas), além da “verdadeira LPP”. LPP está disponibilizada a um alto custo numa forma semi-purificada e a preparação mais usada para biotransformações é denominada de “pancreatina” que contém menos do que 5% de proteína. As principais hidrolases contaminantes são: α -quimotripsina, carboxipeptidase B, proteases, fosfolipases e colesterol esterases. Entre as hidrolases contaminantes, apenas a α -quimotripsina e a colesterol esterase são consideradas como inibidores potenciais da reação de hidrólise de ésteres (FABER, 1997). Entretanto, essas limitações podem ser superadas pela adição de diversas substâncias, entre as quais podem ser citados íons cálcio e sódio (VERGER, 1997).

Lipase de Candida antarctica (CAL B)

Cal B tem massa molecular de 33 kDa e cerca de 16-51% de proteína, é produzida por fermentação submersa de um microorganismo geneticamente modificado (*Aspergillus oryzae*). Cal B apresenta pouca ou nenhuma ativação interfacial e catalisa muito lentamente a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa. Por esta razão, é classificada por alguns autores como uma esterase. Demonstra elevada atividade e alta enantiosseletividade para uma extensa variedade de álcoois. Esta enantiosseletividade é baixa para ácidos carboxílicos (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998).

Lipase de Thermomyces lanuginosus (Lipolase)

Lipolase é uma lipase de *Thermomyces lanuginosus* também produzida por fermentação submersa de um microorganismo geneticamente modificado (*Aspergillus oryzae*), comercializada pela Novozymes. Devido à sua elevada estabilidade em pH alcalino é mais utilizada na formulação de detergentes, entretanto, alguns trabalhos têm relatado sua

aplicabilidade na síntese de biodiesel e ésteres (COSTA NETO, 2002; SHINTRE; GHADGE; SAWANT, 2002).

Lipase de Pseudomonas fluorescens (AK)

Lipase AK “AMANO” 20 é uma preparação enzimática produzida por um único processo de fermentação de uma linhagem selecionada de *Pseudomonas fluorescens*. Como a maioria das lipases microbianas, as preparações comerciais disponíveis destas lipases possuem preferência estereoquímica para hidrólise de ésteres de álcoois secundários. (FABER, 1997). A lipase AK “AMANO” 20 tem uma elevada atividade lipolítica e estabilidade térmica (AMANO ENZYME, 2006).

Lipase de Burkholderia cepacia (PS)

Lipase PS é uma nova preparação enzimática lipolítica desenvolvida pela AMANO ENZYME INC, contém cerca de 1-25% de proteína, tão bem quanto, diatomáceas, dextrinas e CaCl_2 . Esta enzima é manufaturada por uma cultura submersa de uma linhagem selecionada proveniente de *Burkholderia cepacia*. A enzima é purificada com etanol e possui uma elevada atividade lipolítica (AMANO ENZYME, 2006).

Lipase de Penicillium camembertii (G)

Lipase G é uma preparação enzimática lipolítica desenvolvida pela Amano Enzyme Inc, e é manufaturada por uma cultura submersa de uma linhagem selecionada proveniente de *Penicillium camembertii*. O fato desta lipase hidrolisar mono e diglicerol, produzindo glicerol e ácidos graxos, mas não triglicerídeos, melhora a qualidade de alguns óleos, que por apresentarem elevados níveis de mono e diglicerídeos sofrem redução em sua qualidade reduzida. Esta enzima possui alta atividade de esterificação (AMANO ENZYME, 2006).

2.10. Imobilização de lipases

O adequado uso de técnicas e suportes de imobilização é fundamental para a utilização plena das vantagens de biocatalisadores em processos, incluindo a facilidade de recuperação, reutilização da enzima e a melhoria das propriedades desejáveis como estabilidade frente às condições reacionais e seletividade relativa a substratos não naturais (VILLENEUVE et al., 2000; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Em função dessas vantagens, o uso de enzimas imobilizadas em bioprocessos tem sido pesquisado ao longo das últimas

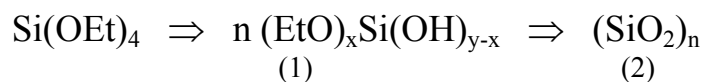
décadas (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; VILLENEUVE et al., 2000; ZANIN; MORAES, 2004), com especial destaque para as lipases (triacil glicerol hidrolases, E.C.3.1.1.3) que são excelentes biocatalisadores em estágios intermediários de processos químicos convencionais e na catálise de reações químicas que envolvam substratos insolúveis em meio aquoso (GOMES et al, 2006). Além disso, as suas características de químio, régio e/ou de estereosseletividade, tornam esta classe de enzima a mais utilizada na síntese em química orgânica (FABER, 1997).

Apesar da existência de inúmeros suportes comerciais, a utilização de lipases imobilizadas em processos tem exigido a elaboração de matrizes específicas para essa finalidade, que resultem em preparados imobilizados com elevadas atividades e características hidrodinâmicas adequadas ao uso em reatores (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; ZANIN; MORAES, 2004).

As mais recentes tecnologias requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas nos materiais convencionais. Materiais híbridos orgânico-inorgânico são preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos e constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações (GILL; BALLESTEROS, 1998). Independentemente da estratégia utilizada para preparar uma matriz híbrida o processo sol-gel é, indiscutivelmente, o mais empregado (GILL; BALLESTEROS, 1998). O processo sol-gel envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, entre outros (REETZ et al., 1998; KEELING-TUCKER et al., 2000). Estas variáveis determinam as características finais dos materiais, incluindo a porcentagem de hidrólise e condensação de grupos reativos, densidade de reticulação e homogeneidade do produto. Além disso, aditivos químicos podem ser usados para melhorar o processo e obter materiais com melhores propriedades o que possibilita modificações nas propriedades mecânicas, controle de porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/ hidrofóbico (REETZ et al., 1998).

Materiais sol-gel têm sido empregados como suporte para a imobilização de enzimas tanto por encapsulação (REETZ et al., 1998; KEELING-TUCKER et al., 2000) como por ligação covalente (BRUNO et al., 2004; FREITAS, 2006).

A reação química envolvida num processo sol-gel convencional, baseado em derivados alcóxidos, é mostrada abaixo. A etapa (1) corresponde a hidrólise, enquanto a (2) corresponde á policondensação do silano.



Recentemente foi testada com sucesso uma matriz híbrida constituída de polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) para imobilização de diferentes fontes de lipase: *Mucor miehei* (BRUNO et al., 2004), pancreática (PAULA et al., 2007) e *Candida antarctica* (FREITAS, 2006). Essa matriz combina os atributos físico-químicos de materiais inorgânicos e orgânicos, permitindo a manipulação da hidrofiliicidade e hidrofobicidade, condutividade elétrica, carga iônica, porosidade e propriedades mecânicas em geral (LIMA BARROS et al. (2002) bem como elevada atividade e estabilidade. A estrutura geral do suporte híbrido POS-PVA é ilustrada na Figura 2.9.

Em função desses resultados promissores, selecionou-se este suporte para imobilização das preparações de lipase a serem testadas no presente trabalho. É importante destacar que na maioria dos trabalhos acima descritos foi utilizada a técnica de imobilização por ligação covalente empregando a matriz POS-PVA previamente ativada com glutaraldeído. Entretanto, sabe-se que o uso de diferentes agentes de ativação pode resultar em maior estabilidade do biocatalisador. Os agentes de ativação são compostos alteram a afinidade da enzima pelo suporte, modificando assim as características do derivado imobilizado obtido (PEREZ et al., 2007). Quando convenientemente escolhidos e empregados, resultam em sistemas mais estáveis frente às condições reacionais e operacionais. Desta forma, no presente trabalho foi também avaliada a influência do uso de diferentes reagentes químicos, particularmente glutaraldeído e epícloridrina, na ativação da matriz híbrida polissiloxano-álcool polivinílico com relação a seu emprego como suporte de imobilização da lipase mais efetiva para síntese de biodiesel.

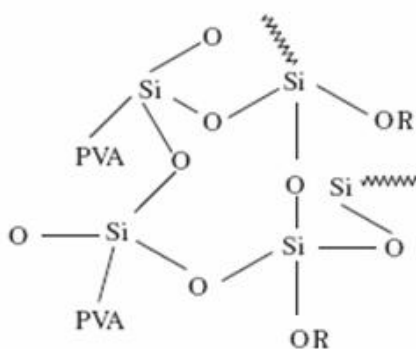


Figura 2.9. Estrutura da matriz polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA).

2.11. Exemplos de transesterificação enzimática de óleos e gorduras visando a síntese de biodiesel

A Tabela 2.6 relaciona alguns processos de obtenção de biodiesel por catálise enzimática, na qual pode ser verificado que o processo é dependente de diversas variáveis, incluindo: sistema reacional (tipo de óleo e álcool), preparação enzimática, tipo de suporte de imobilização, entre outras.

Entre os trabalhos pesquisados, verifica-se uma tendência ao uso dos óleos de soja ou palma, de preparações de lipases imobilizadas disponíveis comercialmente (Lipozyme e/ou Novozym 435) e o metanol como doador do grupo acila. Devido à elevada polaridade desse álcool (ISO et al., 2001) as reações são efetuadas em meio contendo solvente orgânico, com clorofórmio, 1-4-dioxano e benzeno em proporções geralmente elevada da ordem de 50- 90% em relação à massa total de reagentes envolvidos. Para emprego de outros álcoois (etanol, propanol e butanol) não é necessária a adição de solventes orgânicos no meio reacional, o que viabiliza o processo de obtenção de biodiesel com redução de custos como solvente (normalmente tóxicos, alta inflamabilidade e alto custo) e etapas de destilação, o que reduz o consumo de energia (ISO et al., 2001). Nos trabalhos desenvolvidos no Brasil, preferencialmente tem sido usado etanol como doador do grupo acila, por ser proveniente de biomassa tornando o processo totalmente independente do petróleo.

Nelson, Foglia e Marmer (1996), foram os pioneiros no estudo da transesterificação enzimática de triglicerídeos com o objetivo de produzir biodiesel. Esses autores investigaram a reação de transesterificação de alguns óleos vegetais e sebo bovino, utilizando álcoois primários, secundários e diversas lipases. Os melhores resultados foram obtidos na alcoólise do sebo com metanol ou etanol com a lipase de *Mucor miehei*. Os rendimentos obtidos com etanol hidratado foram superiores ao do anidro. Utilizando-se álcoois secundários, a lipase de *Candida antarctica* foi a mais eficiente nesse estudo.

A alcoólise de óleo de girassol, na presença ou ausência de solvente (éter de petróleo) foi investigada por Mittelbach (1990), utilizando três lipases obtidas de diferentes fontes. Os melhores rendimentos foram obtidos com a lipase de *Pseudomonas* sp. e etanol hidratado. Por outro lado, na ausência de solvente, o rendimento foi menor e o tempo de reação maior.

A otimização da reação de transesterificação de óleo de soja e colza com metanol, utilizando-se lipase de *Candida antarctica* imobilizada em cerâmica, foi estudada por Shimada et al. (1999). Nessa reação, necessita-se de três equivalentes de metanol para um de óleo; foi observado que o equivalente molar de metanol, superior a 1,5, provocou a inativação da enzima. Portanto, a reação foi conduzida com a adição do álcool em etapas. Na primeira, a

reação foi conduzida com um equivalente de MeOH, por 10 h. Após a conversão de 95% do metanol colocado inicialmente, foi acrescentado mais um equivalente por um período de 14 h. O terceiro equivalente foi finalmente adicionado e a reação continuou por mais 24 h, obtendo-se rendimento total de ésteres de 98,4%. A estabilidade da lipase usada nas três etapas da metanólise foi verificada pela repetição de sua aplicação em novos substratos, que em cinquenta ciclos de reutilização apresentou rendimentos superiores a 95%.

Tabela 2.6. Transesterificação enzimática de óleos vegetais com álcoois para a síntese de biodiesel empregando diferentes tipos de lipases.

Óleo	Lipases	Álcool	Solvente	Conversão (%)	Referência Bibliográfica
algodão	Novozym 435	metanol	Isento	91,5	KOSE et al., 2002.
palma	<i>Candida cylindracea</i>	metanol butanol	n-hexano	78-84 96	LARA; PARK, 2004.
girassol	Lipozyme IM20	etanol	Isento	83	SELM; THOMAS, 1998.
			n-hexano	80	
girassol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> e Lipozyme IM20	metanol	éter de petróleo	80	SOUMANOU; BORNSCHEUER, 2003.
			Isento	90	
soja degomado	<i>Candida rugosa</i>	metanol	clorofórmio	93,8	WATANABE et al., 2002.
babaçu	pâncreas de porco imobilizada	butanol	Isento	95	URIOSTE, 2004
palma	Lipozyme e pancreatica imobilizada	butanol	Isento	54,30 50,81	SILVA; VIEIRA; CASTRO, 2005
peixe	<i>Candida antarctica</i>	etanol	Isento	83	BREIVIK; HARALDSSON; KRISTINSSON, 1997.
girassol	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	metanol etanol	Isento	3 82	MITTELBAACH, 1990.

Um novo enfoque para reduzir o efeito negativo do metanol na atividade da enzima foi estudado por Du et al. (2004). Esses autores avaliaram a substituição do metanol por acetato de metila como doador do grupo acila e obtiveram rendimentos superiores a 92% em ésteres

metílicos, numa razão molar de acetato: óleo de 12:1. A principal vantagem desse processo foi a eliminação da formação do glicerol como subproduto.

No estudo efetuado por Wu et al. (1999) foi empregada a metodologia de superfície de resposta para otimizar parâmetros da reação de transesterificação de banha usada em restaurantes com etanol hidratado, utilizando as lipases de *P. cepacia* e *C. antarctica*. O rendimento mais elevado (96%) foi obtido nas reações catalisadas simultaneamente pelas duas lipases.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Enzimas

Os experimentos foram realizados com preparações comerciais de lipases de células microbianas como: *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase) e *Candida antarctica* B (CALB L) gentilmente doadas pela Novozymes (Araucária, Paraná), *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), *Burkholderia cepacia* (Lipase PS) e *Penicillium camembertii* (Lipase G) manufaturadas pela Amano (Japão) e lipase de células animais (pâncreas de porco, Tipo II) adquirida da Sigma.

3.1.2. Materiais de partida

Como materiais de partida foram utilizados: etanol anidro (98%, Vetec) e amostras de óleo de palma refinado fornecidas gentilmente pela AGROPALMA (Pará, Brasil).

3.1.3. Suporte de imobilização

Como suporte foi utilizada uma matriz híbrida constituída de polissiloxano álcool polivinílico (POS-PVA) preparada pela técnica sol-gel, empregando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich (EUA).

3.1.4. Outros Reagentes

Outros reagentes utilizados foram: solventes (acetona - Synth, etanol – Nuclear, hexano – Quimex), peneira molecular 0,32 cm diâmetro (Silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X-BHD Chemicals; hidróxido de potássio (Merck), indicador ácido-base (fenolftaleína - Coleman), álcool polivinílico (MM 72.000, Reagen), HCl (mínimo 36%, Isofar), glutaraldeído 25% (Nuclear), epícloridrina (Sigma), polietilenoglicol (MM 1500, Synth), tetraetilortossilicato (Sigma – Aldrich), goma arábica em pó pura (Sinthy) e óleo de oliva comercial baixo teor de acidez (Carbonell). Padrões cromatográficos sintetizados por via química de acordo com metodologia previamente estabelecida por URIOSTE (2004).

3.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Tipo de análise e equipamentos utilizados nos ensaios

Tipo de análise e/ou ensaio	Equipamento	Modelo/ fabricante
Medidas de pH	Potenciômetro	Modelo TEC2, Tecnal
Dosagem de monoésteres	Cromatógrafo a gás	Modelo GC-3800, Varian
Pesagem de materiais	Balança analítica	Modelo AY220, Shimadzu
Agitação de reações	Placa de agitação magnética e temperatura controlada	Modelo 752A, Fisatom
Purificação do produto	Rota evaporador	Modelo 801, Fisatom
Medidas de viscosidade	Viscosímetro	Modelo LVDVIII-CP-520, Brookfield
Análise de microestruturas	Microscópio de varredura	Modelo 1450 VP, LEO
Análise qualitativa	Espectrômetro no infravermelho	Spectrun One, Perkin Elmer
Análise de raio-X	Difratômetro	Tipo XRD6000, Shimadzu
Estabilidade térmica	Analizador térmico	Modelo SDT 2960-Q10, TA Instruments
Análise elementar de superfície	Sistema EDS	Oxford Inca Energy, LEO Electron Microscopy Ltd
Atividade hidrolítica	Bureta digital (50mL)	Hirshmann Techcolor
Teor de umidade	Balança analítica	ID 50, Marte
	Karl Fischer	Mettler DL18, Titrator

3.3. Metodologia Experimental

3.3.1. Síntese do Suporte

O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico foi inicialmente sintetizado conforme metodologia descrita por Bruno et al. (2005), pela mistura de 5 mL de tetraetilortosilicato (TEOS), 5mL de etanol e 6mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (m/v). Essa mistura foi aquecida a 60° C, sob agitação, com adição de duas a três gotas de HCl concentrado e a agitação foi mantida nesta temperatura por mais 40 min. A mistura foi vertida em moldes de silicone e mantida à temperatura ambiente por 48h (aproximadamente) para completa solidificação (formação da rede interpenetrada de

polissiloxano-álcool polivinílico – POS-PVA). O composto foi então triturado até a obtenção de partículas que passam por uma peneira (série Tyler de peneiras padrões) de 80 MESH, correspondendo a partículas com diâmetro menor que 0,175 mm.

3.3.2. Ativação do suporte

O suporte foi embebido em solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5) contendo 2,5% (v/v) do agente de ativação (glutaraldeído ou epícloridrina) na proporção sólido: líquido de 1:10, sendo mantido sob agitação magnética branda (50 rpm) por 1 h. Após este período, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada e solução tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 8,0) e em seguida levado a secagem em estufa (60 °C/ 24 h).

3.3.3. Imobilização das lipases

O suporte ativado foi embebido em hexano numa relação sólido: líquido de 1:10 e mantido sob agitação branda por 2 h. Após este período, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 250 mg das preparações de lipase na forma livre e 100 µL de solução aquosa contendo 5 mg/mL de polietilenoglicol (PEG-1500). O sistema foi mantido sob agitação até a completa evaporação do hexano. Na Figura 3.1 é mostrado o esquema do procedimento de imobilização.

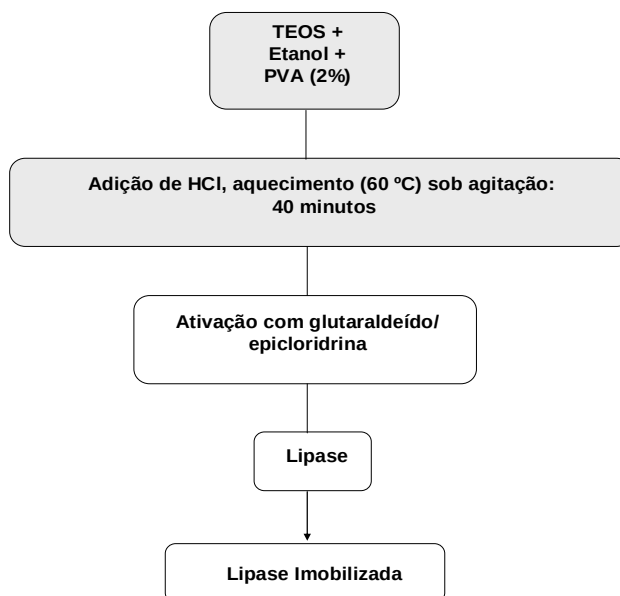


Figura 3.1. Esquema do procedimento de imobilização das lipases em matriz híbrida POS-PVA.

A atividade hidrolítica do derivado imobilizado foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al, 1999). O rendimento de imobilização ($\eta\%$) foi calculado pela equação 3.1:

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

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

3.3.4. Síntese de biodiesel

3.3.4.1. Seleção da preparação enzimática

Nesta série de experimentos, as reações de síntese do biodiesel foram realizados em balões de vidro (25 mL) hermeticamente fechados, utilizando-se agitação magnética. Os meios reacionais continham misturas de óleo de palma e etanol numa razão molar fixa de 1:18, incubados com as diversas preparações de lipase imobilizada numa proporção fixa de 20% (m/m) em relação à massa total de reagentes. Todos os experimentos foram realizados numa temperatura de 40° C, sob agitação constante de 150 rpm, por um período máximo de 96 h. As reações foram monitoradas pela retirada de alíquotas em intervalos de 24 h para dosagem dos ésteres etílicos formados.

O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (M_t) em relação a massa teórica esperada de ésteres de etila (M_e). M_e foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial do óleo de palma (M_0), da massa molecular correspondente a cada ácido (MM_a) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela Equação 3.2.a, em que M_0 corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (C_a), com a massa inicial de óleo utilizada (M_i) (Equação 3.2.b). O rendimento foi calculado utilizando a massa total de ésteres obtida pela análise por cromatografia gasosa (M_t) pela massa teórica de ésteres de etila (M_e), conforme mostrado na Equação 3.2.c. Uma exemplificação desses cálculos para os valores de ácidos graxos e ésteres de etila, partindo de uma massa inicial de óleo de palma igual a 6 gramas é demonstrada no Apêndice 1.

$$Me = \frac{(Mo.MMe)}{MMa} \quad (a) \qquad Mo = Ca.Mi \quad (b) \qquad (c) \quad R = \frac{Mt}{Me} \times 100 \quad (3.2)$$

3.3.4.2. Estabelecimento das condições experimentais empregando a lipase selecionada

Após a seleção do biocatalisador mais efetivo, foram efetuados testes adicionais visando verificar a influência de algumas variáveis no rendimento global de transesterificação. Inicialmente, verificou-se a influência do agente de ativação na obtenção do sistema imobilizado, testando-se epícloridrina em substituição ao glutaraldeído. O derivado imobilizado resultante foi avaliado na síntese de biodiesel sob diferentes condições experimentais, incluindo variação da temperatura de incubação (40 e 58° C) e razão molar entre os materiais de partida (1:18 e 1:9).

Esses ensaios foram realizados em balões de vidro (25 mL) hermeticamente fechados, com agitação magnética por um período máximo de 72 h. Nesta série de experimentos foi ainda testada a habilidade de síntese da lipase selecionada na sua forma livre.

3.3.4.3. Síntese de biodiesel nas condições estabelecidas em reator de mistura

As condições estabelecidas em termos de derivado imobilizado, razão molar entre óleo/etanol e temperatura foram utilizadas para efetuar teste em escala ampliada utilizando um reator batelada com agitação magnética (150 rpm), tendo as seguintes dimensões: altura de 90 mm e diâmetro de 57,5 mm e capacidade volumétrica total de 100 mL (Figura 3.2).



Figura 3.2. Reator batelada utilizado para a produção de biodiesel.

No reator foram adicionados 25 gramas de óleo de palma e 25 gramas de etanol e reação iniciada com a adição de 10 gramas de lipase imobilizada (atividade = 927 U/mg). A temperatura foi controlada em 58° C por meio de aquecimento em placa. Este experimento foi monitorado quanto á formação de ésteres de etila em função da viscosidade, em intervalos de 4 h por um período total de reação de 24 h.

3.3.4.4. Separação dos ésteres (recuperação do glicerol)

Para a separação da glicerina liberada na síntese do biodiesel, o meio reacional foi submetido a uma etapa de purificação, constituída basicamente de uma lavagem com água destilada. O volume da amostra recolhido foi medido e em seguida adicionado o mesmo volume de água destilada. A mistura foi transferida para um funil de decantação (Figura 3.3), efetuando-se uma agitação e deixando a mistura em repouso por 30 min para a separação das fases.

A fase superior era composta pelos ésteres de etila (biodiesel) e a fase inferior por glicerol e água de lavagem. A fase inferior foi descartada e a fase superior submetida à evaporação em rota-evaporador. A amostra de biodiesel purificado foi submetida análise de viscosidade, conforme descrito em 3.4.3.



Figura 3.3. Decantação da glicerina e do biodiesel.

3.3.5. Caracterização morfológica, bioquímica e cinética do derivado imobilizado mais eficiente para síntese de biodiesel

3.3.5.1. Propriedades bioquímicas

A influência do pH e da temperatura na atividade hidrolítica da lipase livre e dos sistemas imobilizados foi avaliada em experimentos realizados segundo um planejamento experimental 2^2 estrela rotacional com sete replicatas no ponto central. Os níveis reais e codificados das variáveis em estudo estão apresentados na Tabela 3.2. Os resultados obtidos foram analisados com auxílio dos softwares Statistica versão 5 (StatSoft Inc., USA) e Design-Expert 6.0 (Stat-Ease Corporation, USA). Este último software foi também empregado para determinação dos valores máximos de atividade possíveis de serem obtidos dentro da faixa de valores estudados. Neste caso, o software executa um algoritmo de otimização numérica baseado na função de desejabilidade, como descrito por Myers e Montgomery (1995).

Tabela 3.2 Níveis reais e codificados para as variáveis temperatura e pH avaliadas segundo planejamento experimental estrela rotacional

Variáveis		Níveis				
Valores Reais	Valores Codificados	- α	-1	0	1	+ α
Temperatura (°C)	X ₁	35	40	53	65	70
pH	X ₂	6,1	6,5	7,5	8,5	8,9

3.3.5.2. Parâmetros cinéticos

A influência da concentração de substrato foi avaliada nas condições ótimas de pH e temperatura pré-determinadas pelo planejamento experimental. Foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variando entre 186-1860 mM, obtidos a partir de emulsões preparadas em diferentes proporções de azeite de oliva (5 – 50%) e solução aquosa de goma arábica (7% m/v). As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisadas pelas preparações de lipase livre e imobilizadas foram determinadas de acordo com item 3.4.1 e as constantes cinéticas K_m e V_{max} foram determinadas pelo Programa Enzyme Fitter.

3.3.5.3. Microscopia eletrônica de varredura

Para a geração de micrografias das superfícies do suporte ativado e do sistema

imobilizado, as amostras foram polvilhadas sobre fitas de carbono dupla-face, metalizadas com uma fina camada de ouro, previamente dispostas no porta-amostras. O microscópio foi operado na modalidade elétrons secundários e utilizando-se baixo vácuo.

3.3.5.4. Composição elemental superficial (EDS)

As áreas das superfícies do suporte ativado e do sistema imobilizado foram analisadas com relação à composição elemental superficial por espectroscopia de energia dispersiva de raios X. O aparelho utilizado foi de marca Oxford Inca Energy.

3.3.5.5. Difração de raio- X

Para a análise de raios-X as amostras foram colocadas sobre suporte de alumínio. As análises foram efetuadas em intervalo angular de 5 a 80 graus e tempo de contagem de 1 segundo. Foi utilizado difratômetro XRD 6000, Shimadzu.

3.3.5.6. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As curvas DSC foram obtidas em um analisador térmico (modelo SDT 2960-Q10, TA Instruments), utilizando-se uma razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C. min}^{-1}$, no intervalo de -10°C a 450°C .

3.3.5.7. Análise por espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

As amostras do suporte (puro e ativado com glutaraldeído ou epiclorigrina), bem como os derivados imobilizados foram submetidos à análise na região do infravermelho. Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . O Espectrômetro utilizado foi modelo Spectrun One, Perkin Elmer.

3.3.5.8. Avaliação da estabilidade operacional da lipase imobilizada

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi verificada em reações de transesterificação do óleo de palma com etanol em regime de bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado, segundo metodologia descrita por Gomes et al. (2006).

As reações de transesterificação foram realizadas utilizando-se $2,5\text{ g}$ de lipase imobilizada (massa seca) e 12 g de substrato contendo óleo de palma (6 g) e etanol (6 g) em bateladas consecutivas (24 h numa temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$), monitoradas no tempo inicial e final. A recuperação do biocatalisador foi realizada por filtração ou alternativamente a enzima

imobilizada foi acondicionada em uma cesta construída em tela de aço inox, malha 100 (0,147 mm) com altura de 65 mm e diâmetro de 12 mm, a qual era colocada na parte superior do reator batelada e retirada do reator ao final da reação. Entre as bateladas, em ambos casos, a lipase imobilizada foi lavada com uma mistura de hexano para a remoção dos reagentes e/ou produtos eventualmente retidos no suporte. Após uma hora, tempo necessário para a evaporação do solvente, a lipase imobilizada era reutilizada em uma outra reação com um novo substrato na mesma concentração do utilizado na reação anterior. Ao final de cada ciclo, foi analisado o teor dos ésteres formados por cromatografia de fase gasosa.

3.4. Métodos de Análise

3.4.1. Determinação da atividade hidrolítica

A atividade enzimática da lipase nas formas livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 20 mM, utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera em 1 μ mol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em (μ moles/mg.min) (U), sendo que miligrama refere-se à massa de suporte seco para lipase imobilizada.

3.4.2. Determinação da atividade sintética

A atividade sintética das preparações de lipase imobilizada foi quantificada pelo consumo do ácido láurico na reação de esterificação do laurato de glicerila empregando substrato numa razão molar ácido-álcool de 3:1 a 60 °C e incubando com concentração enzimática de 5% (m/m), em relação à massa de reagentes de partida, mantida sob agitação por 40 min. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator de vidro aberto com capacidade de 20 mL provido de agitação mecânica e conectado a um banho termostatizado. Aliquotas de 200 μ L, em duplicata, foram retiradas do meio reacional nos tempos inicial e após 40 min de reação e diluídas em 10mL de solução de acetona-etanol (1:1) com a finalidade de cessar a reação e de extração dos ácidos restantes. A quantidade de ácido carboxílico consumido foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,02 M. Uma unidade de atividade foi definida pela concentração de enzima necessária para esterificar 1 μ mol de ácido/min, nas condições experimentais adotadas. A atividade sintética foi calculada pela equação 3.3.

$$\text{Atividade sin tética (U / g de suporte)} = \frac{(V_0 - V_{40}) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot me} \quad (3.3)$$

Em que: M é concentração molar da solução de NaOH (0,02 M); V_0 é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL); V_{40} é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra após 40 min de reação (mL); me é a massa de preparação enzimática utilizada na reação (g); t é o tempo de reação (min).

3.4.3. Análise de viscosidade do óleo vegetal e biodiesel

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas em duplicata a 40 °C no caso do óleo vegetal e a 25°C para o biodiesel, empregando 0,5 mL de fluido. Os dados obtidos (viscosidade, taxa de deformação e tensão de cisalhamento) foram ajustados de acordo com a lei de potência (equação 3.4), conforme descrito por Freitas et al. (1998).

$$T = K\gamma^n \quad (3.4)$$

Em que: T é a tensão de cisalhamento, γ é a taxa de deformação aplicada, n é o valor do coeficiente angular e K é o índice de consistência.

3.4.4. Determinação do teor de umidade

Os teores de água nos suportes puro e ativado, bem como nos sistemas imobilizados foram medidos diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho e a análise de teor de água no biodiesel foi realizada em aparelho de Karl Fischer.

3.4.5. Determinação da densidade do óleo vegetal e biodiesel

Para a determinação da densidade do óleo vegetal e do biodiesel, foram medidos diversos volumes de amostras destes compostos em pipeta volumétrica, pesando-se as massas correspondentes. As medições foram realizadas na temperatura de 40 °C para o óleo de palma e a 25 °C para o biodiesel. Os valores de densidade foram obtidos por regressão linear dos dados experimentais (Apêndice 2), correspondendo ao coeficiente angular da reta.

3.4.6. Dosagem dos ésteres etílicos

Os ésteres de etila formados foram quantificados por cromatografia de fase gasosa (Cromatógrafo a gás, Varian 3800), com detector de ionização de chama e uma coluna de aço inoxidável 5% DEGS em Chromosorb WHP, 80/100 mesh (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA). Nitrogênio foi usado como gás de arraste num fluxo de 30 mL/min. A Tabela 3.3 indica as condições para dosagem dos ésteres de etila. A Figura 3.4 apresenta uma curva de calibração obtida em triplicata de corridas, com os referentes padrões utilizados para o método de análise.

Tabela 3.3. Condições para determinação da formação de ésteres de etila.

Padrão interno	Hexanol (16,26 g/L)	
Temperaturas	Coluna: 120 °C por 10 min e 170 °C por 13 min a uma taxa de 25 °C/ min, totalizando 25 min de análise.	
	Ionizador e detector: 190 °C	
Gás de arraste	Nitrogênio	
Atenuação do cromatógrafo	A, B e C = 16	
Tempos de retenção dos Monoésteres de etila	Padrão interno	1,13
	C12 EtOH	6,80
	C14 EtOH	11,92
	C16 EtOH	14,43
	C18 EtOH	18,16
	C18: 1 EtOH	19,05
	C18:2 EtOH	20,96

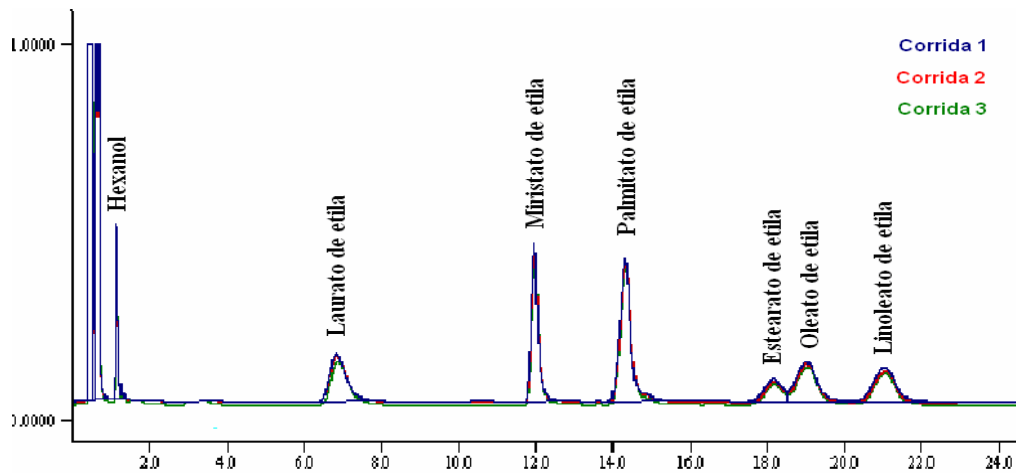


Figura 3.4. Curva de calibração dos ésteres de etila de acordo com a composição de cada ácido graxo presente no óleo de palma.

3.4.7. Caracterização do óleo de palma e biodiesel por RMN ^{13}C (CDCl_3)

Os ácidos presentes no óleo de palma e os monoésteres de etila presentes no biodiesel foram identificados por RMN ^{13}C . Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono foram obtidos no aparelho Varian modelo Mercury 300MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelo sinal TMS (Tetra-metil-silano- $\delta=0$) em solvente CDCl_3 .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são discutidos os resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho. Os experimentos foram realizados de acordo com o esquema da Figura 4.1, que orienta o leitor sobre a sequência de apresentação e discussão dos resultados obtidos.

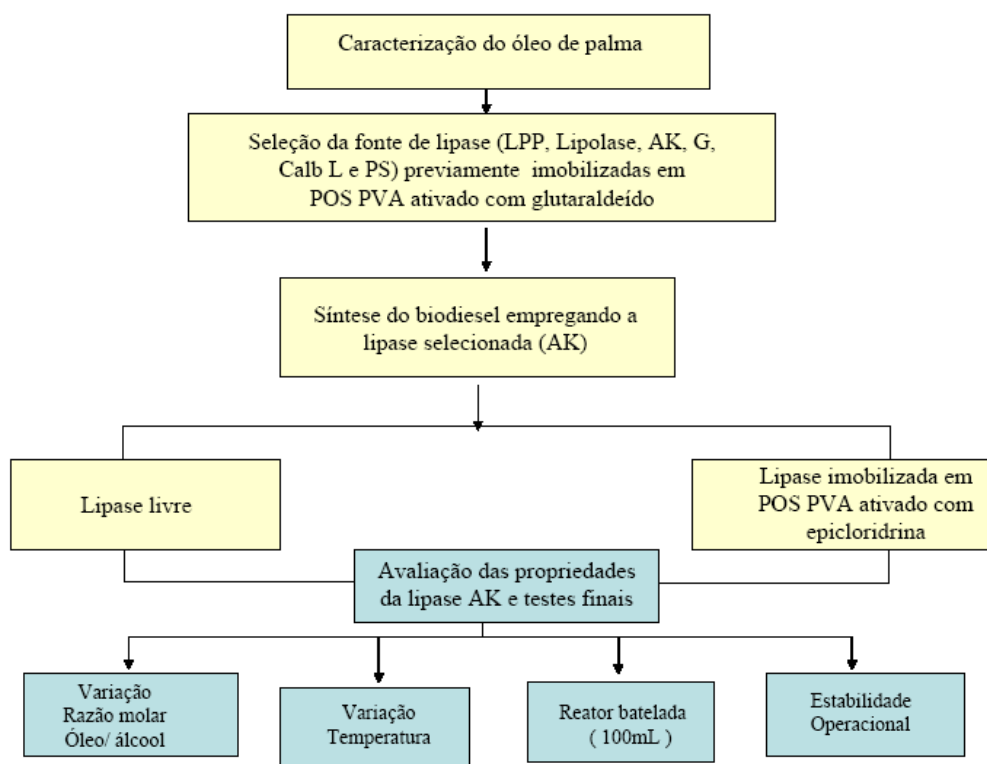


Figura 4.1. Fluxograma geral das etapas desenvolvidas no trabalho experimental.

4.1. Características das amostras de óleo de palma

4.1.1. Composição química e propriedades do óleo refinado

Independente do tipo de catalisador selecionado, a qualidade do óleo utilizado na reação de transesterificação é de fundamental importância, tendo em vista que venenos ou inibidores catalíticos podem reduzir o rendimento da reação. Essa qualidade está relacionada com os teores de ácidos graxos livres, índice de peróxido, umidade e sabões (FELIZARDO, 2003). De acordo com os laudos técnicos fornecidos pela empresa Agropalma, a amostra de óleo de palma empregada no desenvolvimento desse projeto atende o grau de pureza exigido. Os resultados fornecidos pela empresa são mostrados na Tabela 4.1 e a Tabela 4.2. mostra a composição em ácidos graxos do óleo de palma refinado.

Tabela 4.1. Características do óleo de palma fornecido pela Agropalma.

Atributos	AGROPALMA	Limites *(AOCS)
Acidez (% Palmítico)	0,033	≤ 0,05
Índice de Peróxidos (mEq/kg)	0	≤ 1,0
Cor Lovibond Red 5 ¼	3,5	≤ 4,0
Ponto de Fusão (° C)	36	34 - 38
Índice de Iodo (Wijjs)	52,69	51 - 55
Fósforo (ppm)	0	≤ 3,0
Rancimat 130 ° C, 20 l/h	11,80	≥ 6
Sabor / Odor	9	≥ 8

* AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY

Tabela 4.2. Composição em ácidos graxos do óleo de palma refinado fornecido pela Agropalma.

Ácido graxo % (m/m)	% (m/m)
C12:0 – Láurico	0,10
C14:0 - Mirístico	1,20
C16:0- Palmítico	46,80
C18:0- Esteárico	3,80
C18:1- Oléico	37,60
C18:2- Linoleico	10,50
Saturados	51,90
Insaturados	48,10

4.1.2. Viscosidade do óleo de palma

Para a otimização do processo de produção de biodiesel, um dos parâmetros relevantes é o estudo da viscosidade. Além de que, o estudo reológico de óleos vegetais é necessário para o dimensionamento de equipamentos e obtenção de melhores características do biocombustível em relação ao diesel.

A Figura 4.2, mostra a variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o estudo do comportamento da viscosidade absoluta do óleo de palma a 40 °C, na qual observa-se que com o aumento da taxa de deformação, a viscosidade diminui proporcionalmente; isto é, um comportamento de líquido não newtoniano. Com a análise do comportamento da curva, demonstrado na Figura 4.3. percebe-se que a variação é linear indicando que o fluido segue a lei da potência indicada pela equação 3.4.

Na Tabela 4.3 são apresentados os coeficientes de ajuste dos dados $\log T \times \log \gamma$. O valor do coeficiente angular é menor que 1, o que caracteriza o fluido como pseudoplástico, em que a viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento.

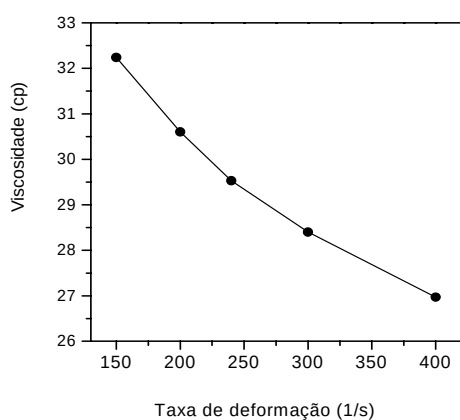


Figura 4.2. Viscosidade absoluta em função da taxa de deformação do óleo de palma refinado (40 °C).

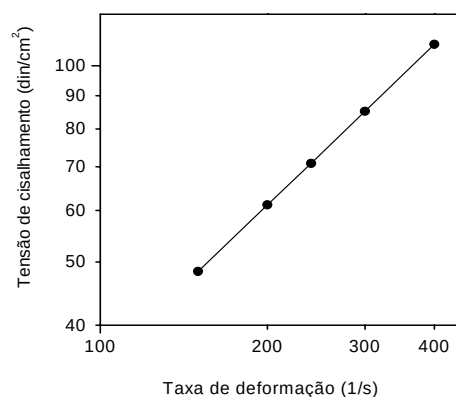


Figura 4.3. Tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação do óleo de palma refinado (40 °C).

Tabela 4.3. Coeficiente de ajuste dos dados a lei de potência T= 40 °C.

Parâmetros	Valor
K (cP)	80,3
N	0,82

Foi ainda verificado que o óleo de palma refinado na faixa de taxa de deformação entre 150 a 200 s⁻¹ apresentou viscosidade absoluta média de 29,5 cP. Com base neste valor pode-se calcular um valor aproximado da viscosidade cinemática do óleo que foi de 39,33cSt, sendo este valor coerente ao apresentado na literatura que é de 36,8 cSt.

4.2. Caracterização do suporte de imobilização

O suporte híbrido foi inicialmente sintetizado e ativado com glutaraldeído, conforme metodologia descrita em 3.3.2 e a seguir algumas de suas propriedades foram avaliadas adotando diferentes técnicas como: análise de Raio-X, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

Os dados de difração de Raio-X fornecem informações importantes sobre a estrutura de qualquer material. Trata-se de uma técnica não destrutiva, que apresenta, entre outras vantagens: realização de determinações multi-elementares simultâneas e possibilidade de análise qualitativa e quantitativa (NAGATA et al., 2001). O difratograma obtido a partir do suporte POS-PVA puro (Figura 4.4a), apresenta picos de baixa intensidade e com expressiva largura, indicando uma estrutura predominantemente amorfa do composto híbrido. Na Figura 4.4 b apresenta-se o difratograma do suporte ativado com glutaraldeído, na qual verifica-se o surgimento de picos característicos de materiais cristalinos, provavelmente ocasionados pela presença do agente de ativação.

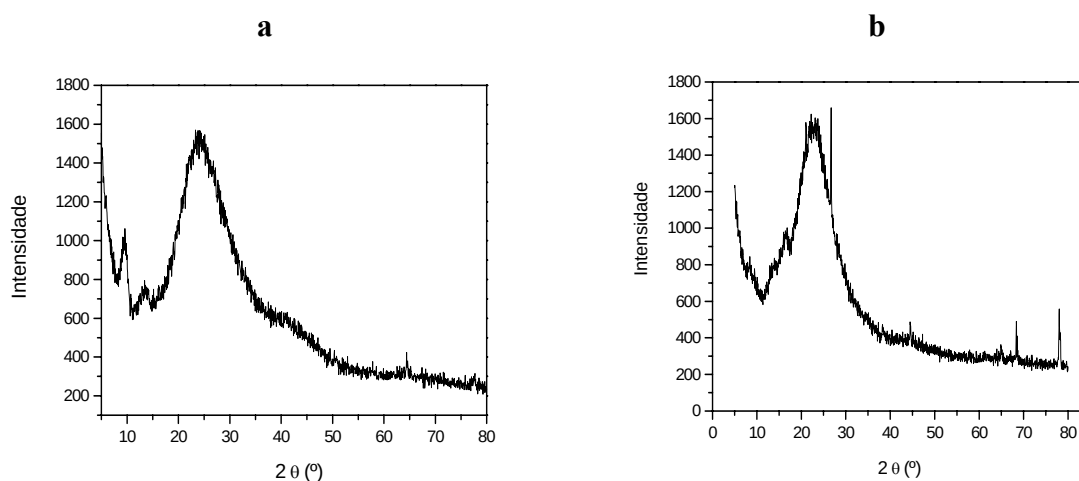


Figura 4.4. Difratograma obtido na análise de raio-X do suporte POS-PVA (a) suporte POS-PVA ativado com glutaraldeído (b).

As imagens micrografadas do suporte híbrido puro e ativado com glutaraldeído são mostradas nas Figuras 4.5 (a, b). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu verificar as diferenças morfológicas entre a matriz no estado puro e ativado com glutaraldeído.

Para o suporte puro, uma superfície plana típica de material amorfo com diferentes formas geométricas foi observada (Figura 4.5 a). Após a ativação com glutaraldeído, pequenas fissuras foram verificadas, o que pode facilitar a fixação da enzima no suporte (Figura 4.5 b). Essas modificações superficiais do suporte foram confirmadas por espectroscopia de energia dispersiva (Tabela 4.4), indicando uma similaridade no teor de silício para ambos suportes (puro e ativado) e um incremento de aproximadamente duas vezes do percentual de carbono para o suporte ativado em relação ao suporte puro. Esses resultados sugerem que a ativação da matriz com glutaraldeído foi alcançada de forma eficiente, tendo em vista que os grupos aldeídos presentes na extremidade da cadeia desse agente de ativação foram ligados ao oxigênio da superfície do suporte, contribuindo para reduzir a proporção do oxigênio na superfície do suporte ativado.

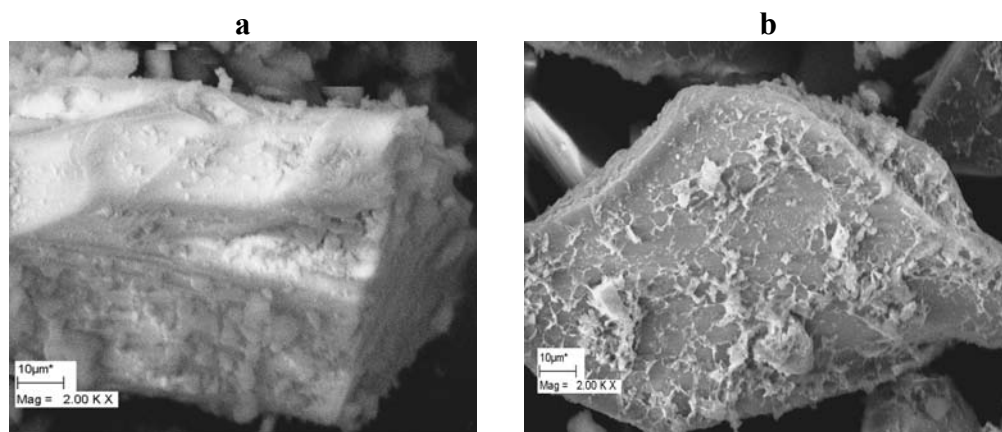


Figura 4.5. Microscopia eletrônica de varredura: (a) suporte POS-PVA puro; (b) suporte POS-PVA ativado com glutaraldeído.

Tabela 4.4. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) da área do suporte puro e ativado com glutaraldeído.

Elemento	Suporte POS-PVA puro % (massa)	Suporte POS-PVA ativado % (massa)
Carbono	6,72	16,42
Oxigênio	54,88	46,50
Silício	38,40	36,37

Com relação ao perfil de estabilidade térmica do suporte puro (Figura 4.6), verifica-se um pico endotérmico em torno de 121°C, característico da vaporização da água residual presente no suporte. Na faixa de temperatura estudada não foram observados picos endotérmicos, indicativos de degradação do material, sugerindo que trata-se de material termicamente estável até 400 °C.

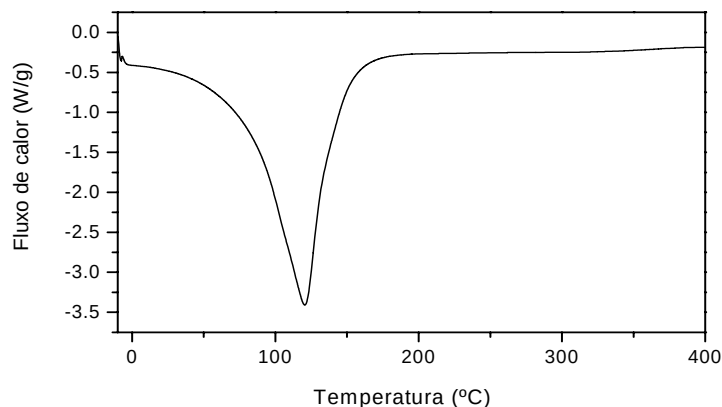


Figura 4.6. Perfil da curva de DSC do suporte POS-PVA.

4.3. Síntese de biodiesel

4.3.1. Seleção da fonte de lipase

O suporte POS-PVA previamente ativado com glutaraldeído foi utilizado para imobilizar diferentes preparações de lipases, tais como: *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase), *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), *Burkholderia cepacia* (Lipase PS), *Penicillium camembertii* (Lipase G), *Candida antarctica* B (Calb L) e pâncreas de porco (LPP), obtendo-se derivados imobilizados com elevada atividade catalítica, como mostrado na Tabela 4.5. Para evitar problemas de reversibilidade da reação, cuidado especial foi tomado para obter derivados imobilizados com teor de água inferior a 20%.

Os ensaios foram efetuados nas condições descritas em 3.3.4.1 e os resultados obtidos em termos de formação de monoésteres de etila (biodiesel) em função do tempo são apresentados nas Figuras 4.9 (a-f). Os rendimentos em ésteres e produtividades alcançados para cada preparação de lipase testada são mostrados na Tabela 4.6.

Tabela 4.5. Valores das atividades hidrolítica e sintética dos derivados imobilizados testados

Lipase	Atividade hidrolítica (U/mg)	Atividade sintética (μM/g.min)
Lipolase	723 $\pm$ 7,07	35,83
Lipase AK	765 $\pm$ 43,21	26,32
Lipase PS	949 $\pm$ 54,44	29,50
Lipase G	45,61 $\pm$ 8,26	39,83
Lipase CALB L	47,84 $\pm$ 10,38	27,33
Lipase pancreática	276 $\pm$ 7,72	21,00

A observação das Figuras 4.7 (a-f) indica que todas as lipases testadas foram capazes de formar os principais ésteres de ácidos graxos presentes no óleo de palma. Entretanto, tanto a velocidade de reação como o rendimento em ésteres foi dependente da fonte de lipase utilizada. Os valores máximos obtidos em concentração mássica de ésteres de etila variaram entre 4 a 46% m/m, correspondendo a rendimentos de 8 a 91%.

Os desempenhos mais elevados na reação de etanolise foram alcançados pela atuação das lipases AK e PS, atingindo concentrações da ordem de 46,13 e 34,52 m/m em 72 h de reação, respectivamente. Esses valores correspondem a rendimentos de 90,86 e 78,23%.

Desempenhos inferiores foram obtidos pelas preparações de Lipolase e lipase pancreática com formação total em ésteres de etila de 25,30 e 8,71 % m/m, correspondendo a rendimentos de 57,10 e 19,74%, respectivamente.

Menores valores de rendimento foram obtidos pelas preparações de lipase CALB L e G, atingido concentrações em monoésteres menores 5% m/m. Desta forma, ambas preparações foram consideradas inadequadas para a reação proposta. Este fato pode ser atribuído às características biocatalíticas destas enzimas. A lipase CALB L apresenta pouca ou nenhuma ativação interfacial e age muito lentamente em catálise de triglicerídeos de cadeia longa. A lipase G pode hidrolisar mono e diglicerol, produzindo glicerol e ácidos graxos, entretanto não atua na hidrólise de triglicerídeos. Resultados reportados por Freitas (2006) demonstraram a eficiência dessas lipases para síntese de monoglicerídeos por esterificação direta do glicerol com ácidos graxos. A aplicação dessas mesmas preparações de lipases na reação de glicerólise mostrou-se também inadequada, similarmente aos resultados obtidos no presente trabalho.

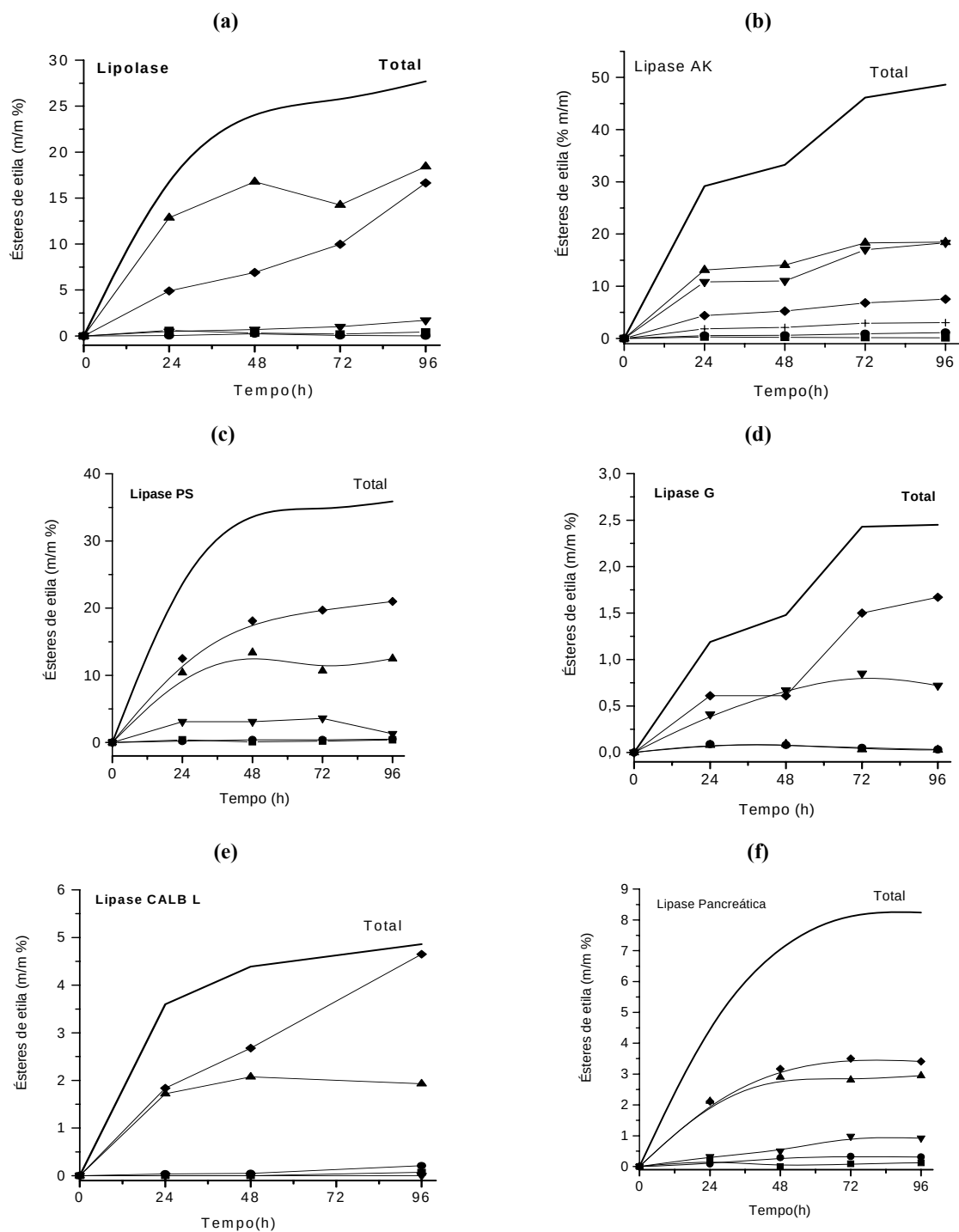


Figura 4.7. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C12; -●-C14, -▲--C16, -▼-C18, -◆-C18:1,-×-C18:2) em função do tempo na reação de etanolise do óleo de palma catalisada por diferentes lipases imobilizadas em POS-PVA. a) Lipolase, b) Lipase AK, c) Lipase PS; d) Lipase G; e) Lipase Calb L; f) Lipase pancreática. Todos os ensaios foram realizados a 40°C, sob agitação magnética (150 rpm). O valor total em ésteres de etila formado está indicado por uma linha cheia.

Tabela 4.6. Resumo dos experimentos realizados utilizando diferentes lipases imobilizadas

Lipases	Rendimento de transesterificação (%)	Produtividade (mg/g.h)
Lipolase	55,01	3,51
Lipase AK	90,98	6,40
Lipase PS	75,10	4,83
Lipase CALB L	10,10	0,66
Lipase G	7,08	0,47
Lipase pancreática	18,57	1,20

É importante destacar que em todos os sistemas reacionais foi observada uma boa dispersão do biocatalisador no substrato e facilidade de separação do produto (biodiesel) ao final da reação.

De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que a lipase AK foi o biocatalisador que forneceu rendimento e produtividade mais elevados na transesterificação do óleo de palma com etanol, sendo, portanto selecionado para os testes subseqüentes.

4. 3.2. Testes de obtenção de biodiesel com a fonte de lipase selecionada

Tendo selecionado a fonte de lipase mais adequada para síntese de biodiesel a partir do óleo de palma e etanol, estudos adicionais foram realizados visando verificar a influência da forma de utilização dessa fonte de enzima (livre ou imobilizada), bem como avaliar se o tipo de agente de ativação do suporte poderia modificar sua ligação com a enzima, alterando as propriedades da fonte de lipase selecionada, gerando, conseqüentemente rendimentos de transesterificação mais elevados.

Adotando as condições operacionais descritas anteriormente (razão molar óleo/ etanol 1:18 e temperatura de 40°C), foram efetuadas reações de transesterificação empregando lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*) na forma livre e imobilizada em POS-PVA previamente ativado com glutaraldeído ou epícloridrina. A Figura 4.8 apresenta o perfil dessas reações de transesterificação em termos de concentração total de ésteres de etila em função do tempo.

Analisando-se os resultados apresentados na Figura 4.8 e sumarizados na Tabela 4.27, verifica-se que o desempenho da lipase AK na forma livre forneceu os valores mais baixos de rendimento global de transesterificação (38,40%) em relação aos valores alcançados pela atuação das preparações de lipase imobilizadas em POS-PVA (rendimento > 91%).

Esses resultados já eram esperados, em função das alterações que podem ocorrer na

conformação nativa da enzima tanto na estrutura terciária como nas mais proeminentes estruturas secundárias (α -hélice e a conformação β) quando a água é substituída por um solvente orgânico. Portanto, para assegurar uma conformação enzimática cataliticamente ativa em meio orgânico, a molécula de enzima deve ter uma camada de hidratação definida, separando o solvente do contato com a superfície da proteína. Isso pode ser facilmente alcançado por meio da imobilização da enzima em suportes sólidos. Portanto, a imobilização da enzima tem um efeito benéfico em sua estabilidade, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima. A imobilização, também auxilia na dispersão homogênea da enzima no meio orgânico, o que é essencial, para a condução de reações enzimáticas.

Os resultados obtidos nessa série de experimentos confirmam que a lipase na forma imobilizada foi mais eficiente que a lipase livre. Entre os agentes de ativação do suporte testados, epicloridrina, aparentemente forneceu o derivado imobilizado mais ativo e estável em meio orgânico, possibilitando incrementos expressivos em relação atuação da lipase imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído. Constatou-se um aumento em oito pontos percentuais no rendimento de transesterificação (99,40%) e um acréscimo na produtividade de 2 mg/g.h.

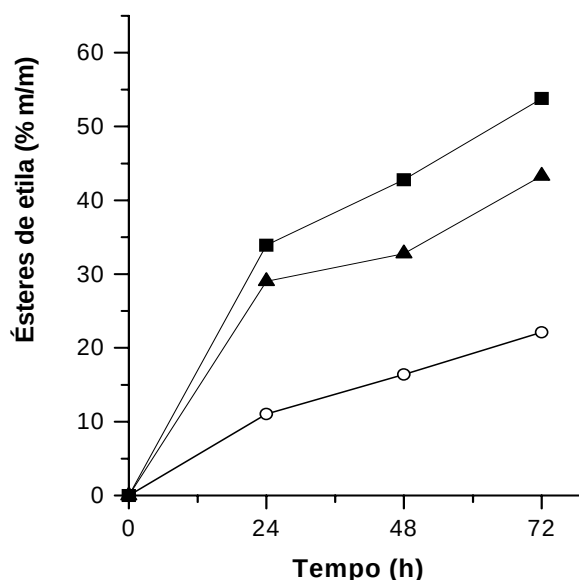


Figura 4.8. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo na reação de etanolise do óleo de palma catalisada pela lipase AK livre (O) e imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (▲) e epicloridrina (■). Razão molar óleo/etanol (1:18) a 40°C.

Tabela 4.7. Resumo dos experimentos realizados utilizando lipase AK livre e imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído e epícloridrina.

Lipase AK	Rendimento de transesterificação (%)	Produtividade (mg/g.h)
Livre	38,40	2,85
Imobilizada em POS-PVA ativado com GA	90,98	6,40
Imobilizada em POS-PVA ativado com EP	99,40	8,16

4.4. Propriedades biocatalíticas da lipase de *Pseudomonas fluorescens* livre e imobilizada em POS-PVA ativado com diferentes compostos

Os resultados promissores descritos na seção anterior despertaram o interesse em realizar um estudo mais detalhado sobre a influência dos agentes de ativação glutaraldeído e epícloridrina no rendimento de imobilização da lipase AK em POS-PVA, bem como determinar as propriedades catalíticas e morfológicas dos derivados imobilizados resultantes.

4.4.1. Influência do agente de ativação na recuperação de lipase no suporte

Na Tabela 4.8 são apresentados os rendimentos de imobilização obtidos no procedimento de imobilização da lipase AK em POS-PVA previamente ativado com glutaraldeído e epícloridrina. Nesses experimentos empregou-se um carregamento de enzima de 0,2 g de lipase por grama de suporte. Os rendimentos de imobilização foram calculados com base na atividade hidrolítica recuperada no suporte em relação à atividade de lipase livre oferecida no procedimento de imobilização.

Tabela 4.8. Rendimento de imobilização da lipase AK no suporte POS-PVA ativado com glutaraldeído e epícloridrina

Agente de Ativação	Atividade (U/mg)	Rendimento de imobilização (%)
Glutaraldeído	370,32	16,40
Epícloridrina	740,18	32,37

T = 35°C / pH = 7,5

Verifica-se que o rendimento de imobilização obtido quando epícloridrina foi empregada como agente de ativação foi cerca de 2 vezes superior ao obtido com o uso de glutaraldeído. Este comportamento pode estar relacionado à modificação química realizada na superfície do POS-PVA por cada um dos agentes de ativação testados (Figura 4.9 a,b). No caso do glutaraldeído, a reação mais provável ocorre entre os grupos hidroxila do álcool polivinílico e uma extremidade aldeído da molécula de glutaraldeído via mecanismo acetal, conforme proposto por Araújo et al. (1997) e esquematizado na Figura 4.9a. Neste caso, são necessários dois grupamentos hidroxila para reagir com uma extremidade aldeído de cada molécula de glutaraldeído inserida na superfície do suporte, sendo que a outra extremidade aldeído deste composto bifuncional fica livre para reagir com um grupamento $-NH_2$ da enzima.

Por outro lado, empregando-se a epícloridrina, grupos epóxi são formados na superfície do suporte, conforme mecanismo proposto por Porath e Fornestedt (1970) e ilustrado na Figura 4.9 b. Assim, neste tipo de ativação apenas um grupamento hidroxila da superfície do suporte é utilizado na reação, comparado aos dois grupamentos usados na reação com glutaraldeído.

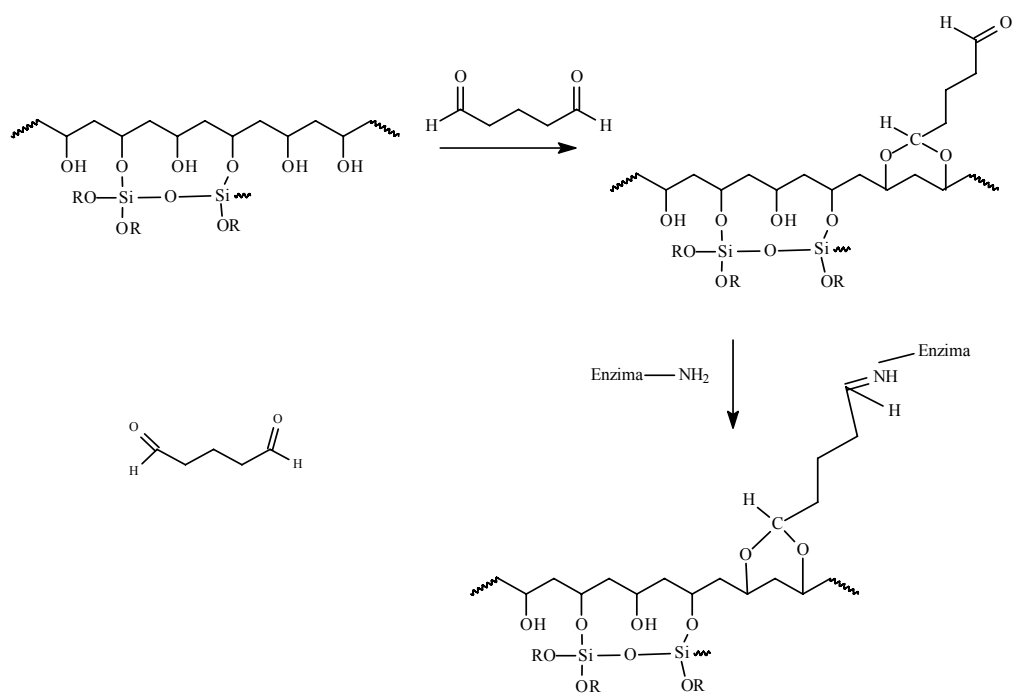
Em função disto, um maior número de sítios de ligações enzima-suporte estaria disponível na superfície do POS-PVA, o que, associado à maior reatividade dos grupos epóxi, pode explicar a maior eficiência de imobilização obtida quando este composto foi empregado. Esta hipótese pode ser confirmada pela análise dos espectros obtidos na região do infravermelho (Figuras 4.10 a, b).

Verifica-se na Figura 4.10a, que o pico correspondente às hidroxilas ($3200-3600\text{ cm}^{-1}$) originalmente presente no POS-PVA diminui após a ativação, sendo esta redução de intensidade maior quando epícloridrina foi empregado como agente de ativação. Os espectros na região do infravermelho apresentados nas Figuras 4.10 (a,b) revelam ainda outras informações sobre estrutura química dos sistemas estudados.

Com relação ao suporte POS-PVA (Figura 4.10a), a banda correspondente à região $1000-1110\text{ cm}^{-1}$ evidencia estiramento assimétrico Si-O-R, tendo sido obtidas também outras bandas características em 950 (Si-O-Si deformação axial), 810 (Si-O-Si deformação axial) e 600 (Si-O-Si deformação angular) cm^{-1} (RAMOS et al, 1998, ASSIS, 2003).

A enzima livre apresentou espectro típico de proteínas (Figura 4.10b), com bandas associadas ao grupo amida característico (CONH). Neste caso, entre a faixa de número de ondas de $1600-1700\text{ cm}^{-1}$, há uma banda amida I, devida ao estiramento da dupla ligação CO e da ligação CN, além da flexão da ligação NH (STUART; GEORGE; MCINTYRE, 1996).

a



b

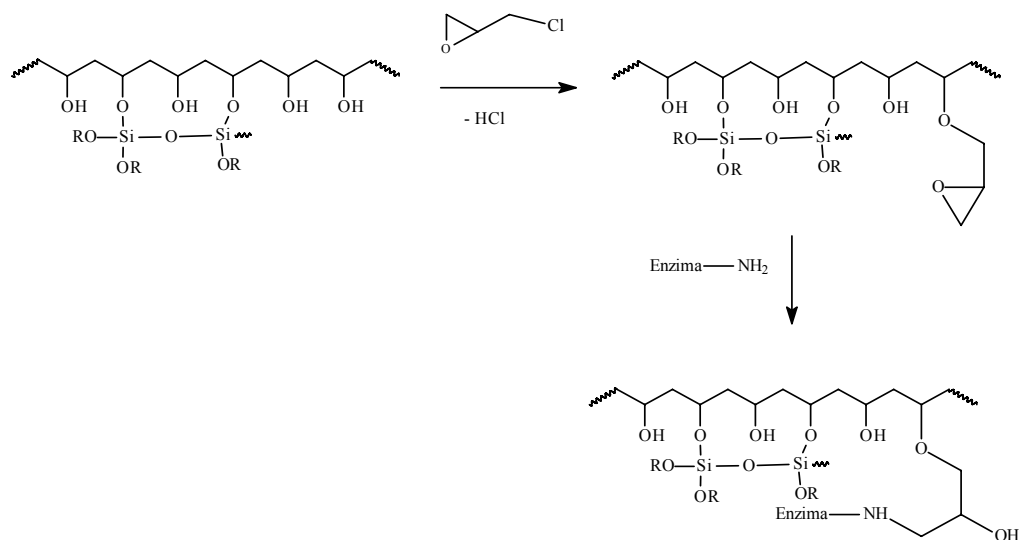


Figura 4.9. Mecanismo de ativação do suporte e imobilização da enzima empregando diferentes agentes de ativação: (a) glutaraldeído e (b) epícloridrina.

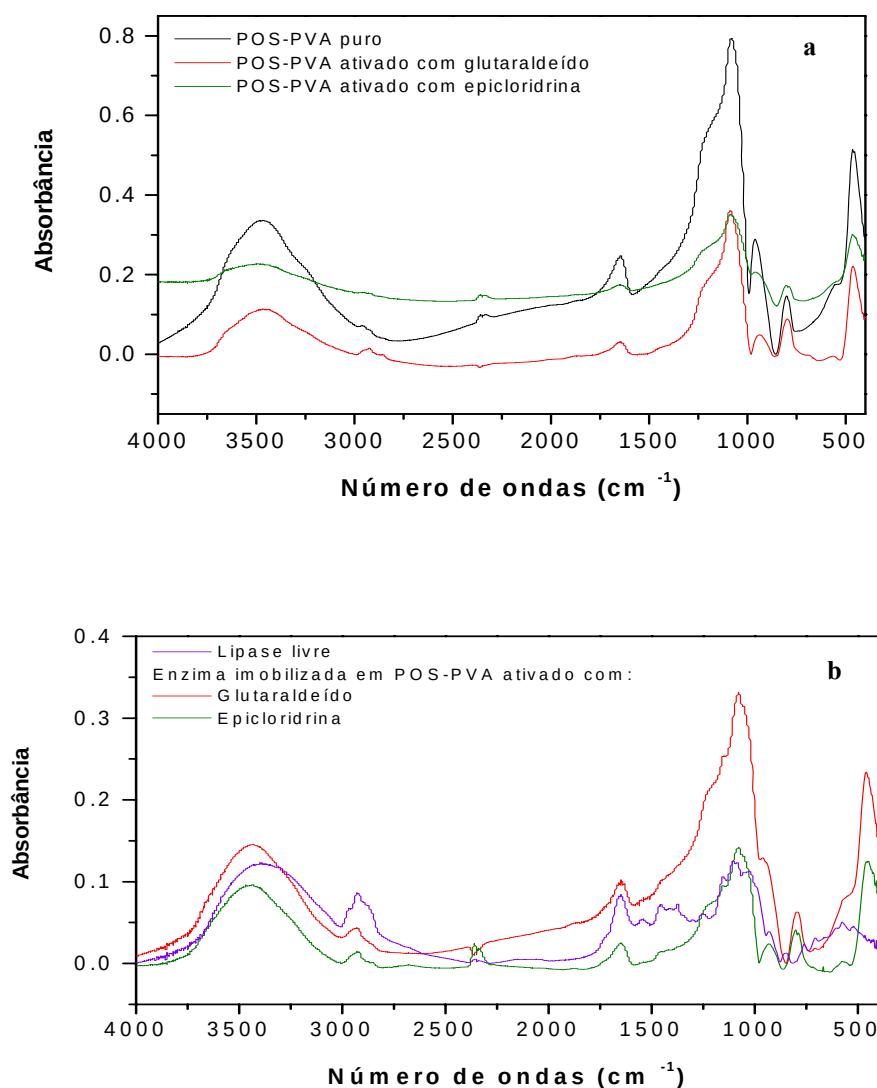


Figura 4.10. Espectros no infravermelho obtidos para as amostras do suporte POS-PVA antes e após a ativação (a) e da lipase livre e imobilizada (b)

Verifica-se ainda que, com relação aos sistemas imobilizados (Figura 4.10b), quase nenhum pico adicional foi claramente observado no espectro, indicando que as ligações enzima-suporte foram de natureza similar ou apresentaram bandas sobrepostas às já existentes no POS-PVA ou na proteína. Podem-se fazer, entretanto, algumas observações na Figura 4.10 que comprovam a incorporação da enzima na matriz do suporte. Quando se compara, por exemplo, o espectro dos suportes ativados com os dos sistemas imobilizados, verifica-se alargamento dos picos na região de 900-1100 cm^{-1} para a lipase imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído e na região de 1400-1500 cm^{-1} para a enzima imobilizada no suporte ativado com epicloridrina. Em ambos casos, este alargamento de pico corresponde a regiões com existência de bandas no espectro da lipase livre.

4.4.2. Influência do agente de ativação do suporte nas propriedades bioquímicas e cinéticas dos derivados imobilizados

Esta seção teve como objetivo determinar as propriedades biocatalíticas da lipase de *Pseudomonas fluorescens* livre e imobilizada em POS-PVA, utilizando-se glutaraldeído e epícloridrina como agente de ativação do suporte. Esta caracterização foi realizada com o auxílio da metodologia de superfície de resposta, uma coleção de técnicas estatísticas e matemáticas, que tem se mostrado útil no desenvolvimento e otimização de diversos processos (SANTOS; CASTRO, 2006). Permite ainda a obtenção de modelos matemáticos que, apesar de empíricos, possibilitam o levantamento e a comprovação de hipóteses científicas que buscam explicar relações de causa e efeito entre os resultados experimentais e as variáveis em estudo. Apesar de amplamente utilizada nas últimas décadas, a metodologia de superfície de resposta foi apenas nos últimos anos empregada para estudos associados à cinética enzimática (MAYERHOFF *et al.*, 2006; BOYACI, 2005; ANDERSON e ADLERCREUTZ, 1999), sendo este tipo de trabalho ainda pouco relatado na literatura.

Para o propósito deste trabalho, foi adotado um planejamento estrela rotacional com sete replicatas no ponto central, considerando a atividade hidrolítica das preparações de lipase como variável resposta. A matriz experimental e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.9. Os resultados foram avaliados utilizando-se o programa Design-Expert 6.0 (Stat-Ease Corporation, USA). Verifica-se que a atividade hidrolítica foi dependente das variáveis temperatura e pH, sendo esta dependência diferente para cada sistema enzimático. Este fato é constatado pelo teste de significância para os efeitos das variáveis independentes (pH e temperatura) sobre a atividade hidrolítica dos sistemas enzimáticos (Tabela 4.10). Considerando-se um nível de significância de 90%, o efeito quadrático da variável temperatura foi significativo tanto para a enzima livre (nível de confiança de 90%) quanto para os derivados imobilizados (nível de confiança de 95%).

Com relação à variável pH, ambos efeitos (linear e quadrático) foram significativos ao nível de 95% de confiança para a enzima livre e imobilizada em POS-PVA ativado com epícloridrina. Além disso, a interação entre as variáveis estudadas apresentou efeito significativo para ambos derivados imobilizados (nível de confiança de 95%).

Tabela 4.9. Resultados obtidos no planejamento experimental para avaliação do efeito das variáveis temperatura e pH na atividade hidrolítica da lipase AK livre e imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (GA) e epícloridrina (EP).

Ensaio	Variáveis codificadas		Atividade (U/mg)		
	X ₁	X ₂	AK livre	AK POS-PVA (GA)	AK POS-PVA (EP)
1	-1,0	-1,0	12138	406	1104
2	-1,0	1,0	17766	320	722
3	1,0	-1,0	10290	277	874
4	1,0	1,0	18606	418	775
5	0,0	0,0	16632	418	744
6	0,0	-1,4	9282	404	1109
7	0,0	1,4	17934	352	917
8	-1,4	0,0	13398	331	658
9	1,4	0,0	18564	313	646
10	0,0	0,0	17136	402	785
11	0,0	0,0	17640	370	798
12	0,0	0,0	18648	381	834
13	0,0	0,0	19320	384	873
14	0,0	0,0	19488	376	885
15	0,0	0,0	16296	411	905

A partir dos resultados da Tabela 4.10, foi possível compor os modelos estatísticos incluindo os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos. Os coeficientes relativos aos efeitos não significativos foram excluídos dos modelos, com exceção daqueles necessários para manutenção da hierarquia (NELDER, 1998). Os modelos obtidos são apresentados nas equações 4.1 a 4.3.

$$A_1(\text{U/mg}) = 17850 + 786.X_1 + 3290.X_2 - 958.X_1^2 - 2184.X_2^2 \quad (4.1)$$

$$R^2=0,87$$

$$A_2(\text{U/mg}) = 389 - 7,16.X_1 - 3,34.X_2 - 34,06.X_1^2 + 56,19.X_1.X_2 \quad (4.2)$$

$$R^2=0,82$$

$$A_3(\text{U/mg}) = 833 - 24,63.X_1 - 96,27.X_2 - 83,07.X_1^2 + 101,74.X_2^2 + 71,85.X_1.X_2 \quad (4.3)$$

$$R^2=0,88$$

Em que:

A₁...atividade da lipase AK livre (U/mg); A₂...atividade da lipase AK imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (U/mg); A₃...atividade da lipase AK imobilizada em POS-PVA ativado com epícloridrina (U/mg); X₁...valor codificado da variável temperatura e X₂...valor codificado da variável pH.

Tabela 4.10. Estimativas dos efeitos das variáveis temperatura e pH, erros padrão e valores de “*p*” para a atividade hidrolítica da lipase AK livre e imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (GA) e epícloridrina (EP) segundo os resultados do planejamento estrela rotacional

Variáveis	Efeitos			Erros-padrão			<i>p</i>		
	Livre	GA	EP	Livre	GA	EP	Livre	GA	EP
Média	17880,07	391,61	831,74	± 548,12	± 8,19	± 22,58	0*	0*	0*
Temperatura (°C) (L)	1574,49	-14,24	-48,45	± 512,69	± 15,32	± 42,23	0,16	0,37	0,28
Temperatura (°C) (Q)	-1939,41	-67,00	-161,87	± 521,67	± 15,59	± 42,97	0,09	0*	0*
pH (L)	6555,33	-4,55	-188,85	± 513,48	± 15,34	± 42,30	0*	0,77	0*
pH (Q)	- 4338,99	-10,83	200,49	± 524,13	± 15,66	± 43,18	0*	0,50	0*
Interação	1344,00	113,73	141,78	± 725,10	± 21,67	± 59,73	0,38	0*	0,04*
R ²	0,8768	0,8400	0,8764						

*p: Teste estatístico para estimativa do intervalo de confiança do modelo (efeitos significativos para valores de $p < 0,05$)

O teste F (Tabelas 4.11 a 4.13) indicou significância estatística ao nível de 99% de confiança, não sendo constatado falta de ajuste para nenhum dos modelos (nível de confiança de 90%). Verifica-se ainda, pelo valor de R^2 que todas as equações ajustadas foram capazes de explicar mais de 80% da variabilidade dos valores experimentais. Desta forma, considerou-se que os modelos estatísticos obtidos foram adequados para descrever a atividade hidrolítica em função da temperatura e do pH, obtendo-se as superfícies de resposta e curvas de nível apresentadas nas Figuras 4.11 (a-c).

A superfície de resposta referente à lipase AK livre (Figura 4.11 a) apresentou um “topo”, ou seja, um valor de temperatura (58 °C) e pH (8,3) para o qual a atividade hidrolítica foi máxima. Esse ponto máximo foi próximo ao relatado por Angkawidjaja e Kanaya (2006) para lipases de diferentes espécies de *Pseudomonas fluorescens*, porém com uma temperatura ótima levemente superior às citadas por estes autores. A existência de um ponto máximo de atividade de uma enzima livre em função do pH e da temperatura é comum e a determinação dos valores ótimos normalmente é realizada por metodologias de análise tradicionais, ou seja, univariadas. Neste caso, o uso de planejamento experimental pode ser vantajoso, resultando na redução do número de experimentos necessários para a otimização e a verificação da possibilidade de interação entre a temperatura e o pH.

As superfícies traçadas para as enzimas imobilizadas apresentaram “forma de sela”, como mostrado nas Figuras 4.11 (b, c). Este tipo de superfície de resposta é complexo e apresenta valores máximos e mínimos para várias combinações das variáveis independentes (GACULA Jr.; SINGH, 1984). A superfície correspondente à enzima imobilizada no suporte tratado com glutaraldeído (Figura 4.11b) ilustra a contribuição do efeito quadrático da temperatura e da interação entre as variáveis estudadas na atividade do biocatalisador. A superfície referente ao sistema imobilizado obtido a partir do POS-PVA ativado com epícloridrina mostra somente a contribuição do efeito quadrático do pH na variável resposta (Figura 4.11c).

Normalmente, quando enzimas são imobilizadas em suportes sólidos, há deslocamento da temperatura ótima para valores mais elevados, uma vez que ocorrem interações entre a enzima e o suporte. Como resultado, são obtidas moléculas protéicas mais rígidas, e biocatalisadores mais estáveis termicamente (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; VILLENEUVE et al., 2000). Este deslocamento da temperatura ótima pode ser observado nas Figuras 4.11 (b, c) para ambos derivados imobilizados, especialmente em valores mais

alcalinos de pH. Neste caso, fica bem evidenciado o efeito de interação entre o pH e a temperatura. Empregando-se glutaraldeído como agente de ativação (Figura 4.11.b), é possível obter elevadas atividades hidrolíticas tanto em pH alcalino, quanto em valores mais baixos de pH. Neste último caso, entretanto, a temperatura ótima foi deslocada para valores mais baixos. O efeito de interação entre as variáveis estudadas é também evidenciado para o sistema imobilizado no suporte ativado com epícloridrina (Figura 4.11 c), que forneceu regiões de elevada atividade tanto em pH alcalino, como ácido.

Empregando-se o programa Design-Expert 6.0, procedeu-se à busca dos valores máximos de atividade hidrolítica da lipase AK imobilizada dentro da região estudada. Em função da possibilidade de uso de temperaturas mais elevadas sob condições mais alcalinas para o sistema ativado com glutaraldeído, optou-se pela solução numérica obtida pelo software em pH mais elevado, que possibilitou trabalhar em temperatura mais alta. Para fins de comparação, no caso do sistema ativado com epícloridrina, foram buscadas as atividades máximas também na faixa de pH alcalino. Desta forma, novos experimentos foram executados nas condições estabelecidas, o que permitiu a confirmação dos valores preditos pelos modelos estatísticos. As condições experimentais e os resultados preditos pelos modelos e os obtidos experimentalmente estão apresentados na Tabela 4.14. Conforme pode ser observado, os resultados obtidos estão de acordo com o previsto pelo modelo, dentro de um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4.11. Análise de variância (ANOVA) para lipase livre

Variáveis	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Valores F	Prob > F
Modelo	1,33E+08	4	33225233	16,0078	0,0002
X₁	4957829	1	4957829	2,3886	0,1533
X₂	85672582	1	85672582	41,2766	0,0001
X₁²	7314544	1	7314544	3,5241	0,0899
X₂²	36025226	1	36025226	17,3568	0,0019
Erro residual	20755700	10	2075570		
Falta de ajuste	10828916	4	2707229	1,6363	0,2806
Erro puro	9926784	6	1654464		
R²	0,8649				

Tabela 4.12. Análise de variância (ANOVA) para lipase imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído

Variáveis	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Valores F	Prob > F
Modelo	21974,11	4	5493,53	12,34	0,0007
X₁	405,79	1	405,79	0,91	0,3622
X₂	42,20	1	42,20	0,095	0,7645
X₁²	8590,47	1	8590,47	19,30	0,0014
X₁X₂	12935,65	1	12935,65	29,06	0,0003
Erro residual	4451,86	10	445,19		
Falta de ajuste	2321,50	4	580,38	1,63	0,2810
Erro puro	2130,36	6	355,06		
R²	0,8315				

Tabela 4.13. Análise de variância (ANOVA) para lipase imobilizada em POS-PVA ativado com epícloridrina

Variáveis	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Valores F	Prob > F
Modelo	227581	5	45516,2	12,6989	0,0007
X₁	4696,868	1	4696,868	1,3104	0,2819
X₂	71058	1	71058	19,8247	0,0016
X₁²	50427,87	1	50427,87	14,0690	0,0045
X₂²	76848,25	1	76848,25	21,4401	0,0012
X₁X₂	20100,15	1	20100,15	5,6078	0,0420
Erro residual	32258,93	9	3584,325		
Falta de ajuste	11334,51	3	3778,171	1,0834	0,4248
Erro puro	20924,41	6	3487,402		
R²	0,8759				

X₁ = TemperaturaX₂ = pH

F: Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

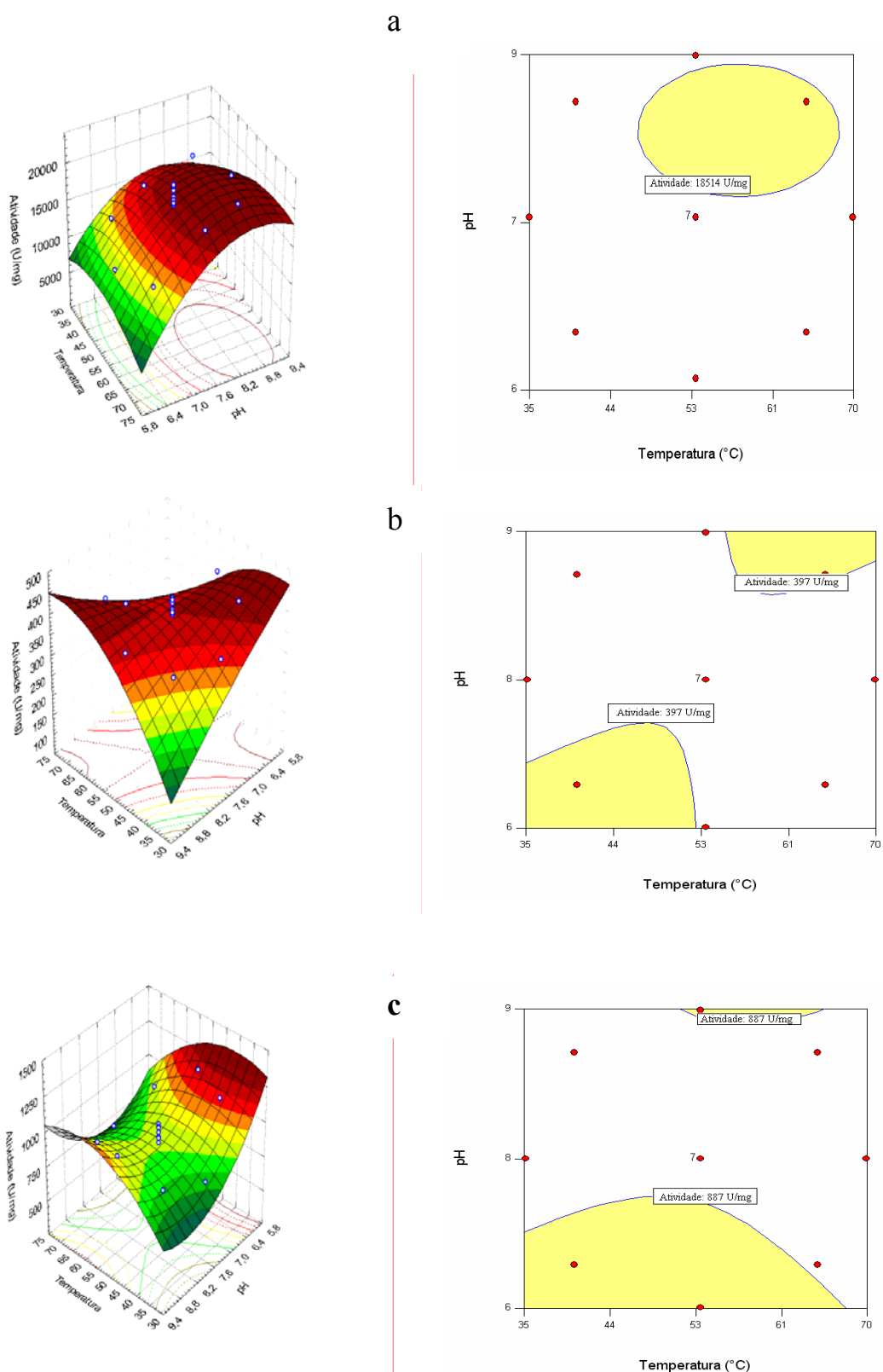


Figura 4.11. Superfícies de resposta e curvas de nível para a atividade da lipase AK livre (a), imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (b) e epicloridrina (c) em função do pH e da temperatura.

Tabela 4.14. Experimentos de confirmação dos modelos estatísticos para atividade hidrolítica em função da temperatura e do pH

Sistemas	Condições Experimentais		Atividade (U/mg)			
	pH	Temperatura (°C)	Valor predito pelo modelo	Limite Inferior*	Limite Superior*	Valor experimental obtido**
Lipase livre	8,3	58	19245	17865	20625	19236
Lipase imobilizada em POS-PVA ativado GA	8,8	65,0	416,5	372,1	461,0	453,9
Lipase imobilizada em POS-PVA ativado EP	8,9	58,0	914,6	802,4	1026,9	968,0

*limites relativos ao intervalo de confiança de 95%

**Média de resultados de experimentos feitos em duplicata

4.4.3. Parâmetros cinéticos da lipase AK livre e imobilizada em POS-PVA

Nas condições estabelecidas para cada sistema enzimático estudado, foram realizados experimentos para determinação dos parâmetros cinéticos. Para tanto, determinou-se a atividade hidrolítica da enzima em função da concentração da concentração de ácidos graxos presentes na emulsão óleo e água, contendo diferentes proporções de azeite de oliva (10-50% m/v).

Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 4.12 (a-c) e sugerem que a atividade de todas as preparações de lipase em função da concentração de substrato seguiu uma cinética do tipo Michaelis-Menten. Verifica-se ainda que, na faixa de concentrações estudada, não foi constatado qualquer evidência de inibição pelos produtos da reação (glicerol e ácidos graxos livres).

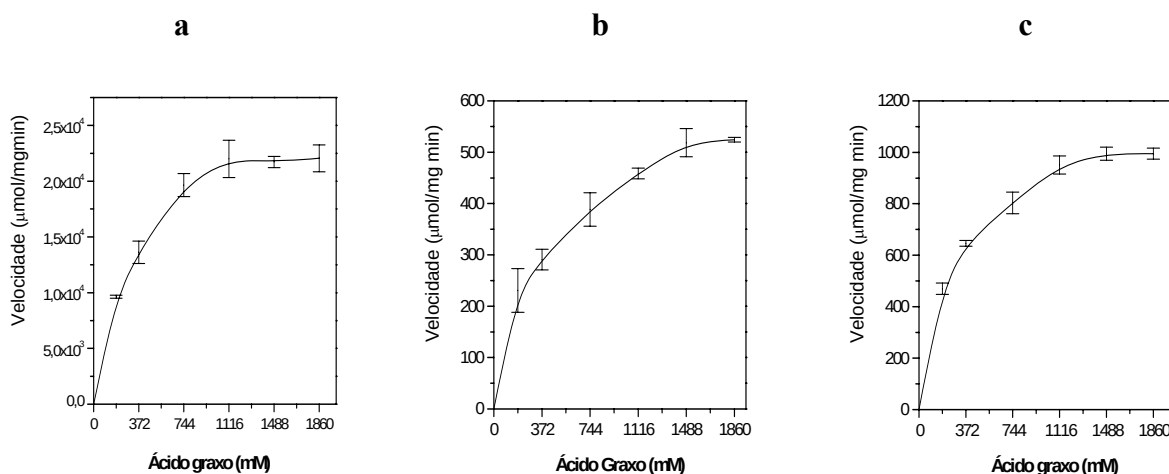


Figura 4.12. Atividades hidrolíticas da lipase livre (a) e imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (b) e epicloridrina (c) em função da concentração de substrato (expressa em conteúdo total de ácidos graxos contidos em emulsões azeite de oliva/ água) nas condições previamente estabelecidas.

Tomando-se por base os resultados apresentados nas Figuras 4.12 e empregando-se a equação de Michaelis-Menten, foram determinados os parâmetros cinéticos correspondentes a cada preparação enzimática (Tabela 4.15). A análise dos dados indica a influência do agente de ativação do suporte na cinética da hidrólise do azeite de oliva catalisada pelos sistemas estudados. Os resultados revelam que a imobilização da lipase *Pseudomonas fluorescens* no suporte ativado com glutaraldeído resultou em uma redução da afinidade enzima-substrato (maior valor de K_m), enquanto que este efeito não foi verificado na imobilização da enzima

no suporte ativado com epícloridrina. Este comportamento pode estar relacionado com as diferentes interações enzima-suporte para cada um dos sistemas imobilizados, conforme já discutido nas seções anteriores. Segundo Georgio e Hubbell (1993), as características cinéticas da enzima imobilizada são afetadas por efeitos que dependem do processo de imobilização. Ainda segundo estes autores, três formas de interação podem ser distingüidas: (1) a ligação da proteína na matriz pode resultar em mudanças conformacionais que afetam a função catalítica; (2) o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima pode ser afetado por impedimento estérico do suporte e; (3) as propriedades do suporte, como sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, ou a presença de cargas fixas que afetam o modo de ação da enzima.

Tabela 4.15. Parâmetros cinéticos da enzima livre e dos sistemas imobilizados

Enzima	<i>K_m</i> (mM)	<i>V_{max}</i> (μmol/mg min)
Livre	328,8	26965,6
Imobilizada (GA)	400,9	633,1
Imobilizada (EP)	293,1	1169,2

Os dados obtidos nesta seção permitiram definir as características bioquímicas e cinéticas da lipase de AK imobilizada em POS-PVA. O conjunto de ferramentas estatísticas e matemáticas denominado “superfície de resposta” foi bastante útil para efetuar esse estudo, permitindo ainda que se façam inferências sobre a influência de variáveis importantes que afetam a atividade biocatalítica da enzima. Os modelos estatísticos compostos foram capazes de explicar a variação na atividade da lipase *Pseudomonas fluorescens* em função das variáveis estudadas. Pela análise dos modelos obtidos, as condições estabelecidas para cada sistema foram: a) enzima livre – pH 8,3 e 58°C; b) enzima imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído – pH 8,8 e 65°C; c) enzima imobilizada em POS-PVA ativado com epícloridrina – pH 8,9 e 58°C.

O comportamento cinético da enzima livre e dos derivados imobilizados foi explicado pela equação de Michaelis-Menten. O uso de epícloridrina como agente de ativação do suporte POS-PVA resultou em um sistema imobilizado com maior afinidade pelo substrato quando comparado com a enzima livre ou imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído.

4.4.4. Influência do agente de ativação do suporte nas propriedades morfológicas da lipase AK imobilizada em POS-PVA

4.4.4.1. Raio-X

Da literatura, sabe-se que as proteínas apresentam regularidade no sequenciamento de suas moléculas, o que permite associá-las a materiais cristalinos (KARLSON, 1970). Várias enzimas têm sido obtidas na sua forma cristalina e a sequência de aminoácidos, bem como a estrutura tridimensional determinadas por cristalografia de raio-X (DALLA VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Os difratogramas da lipase livre e dos derivados imobilizados são apresentados nas Figuras 4.13 (a-c).

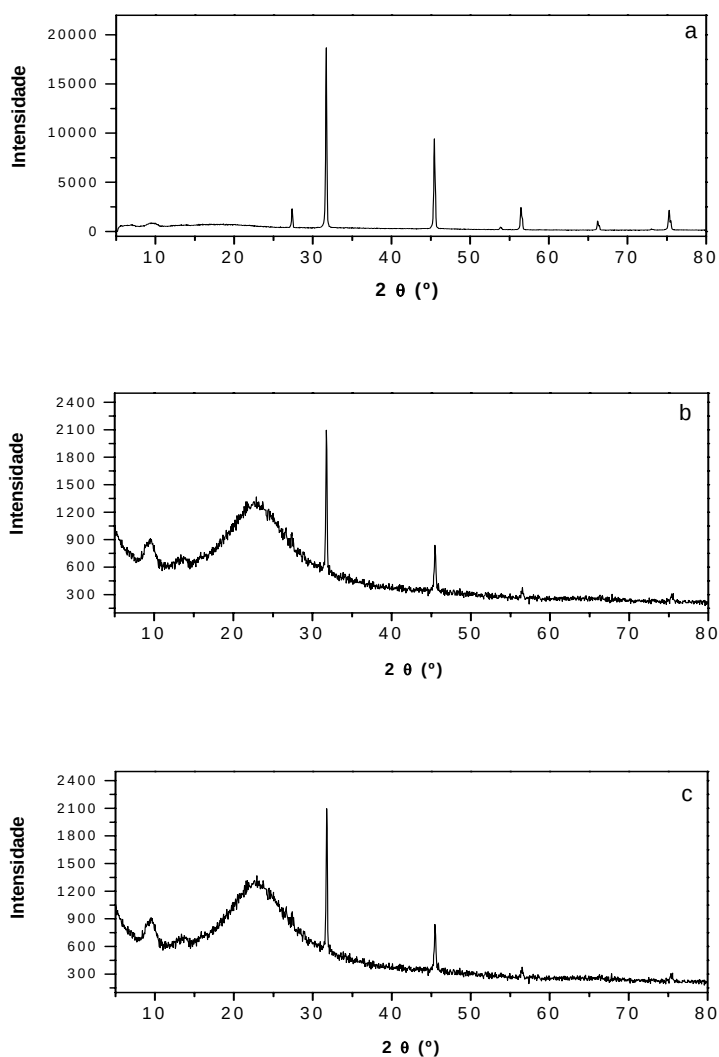


Figura 4.13. Difratogramas referentes a lipase AK livre (a) e lipase imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (b) e epicloridrina (c).

Pode-se observar que a lipase AK livre apresentou um difratograma característico de material cristalino (Figura 4.13a) pela existência de picos estreitos e definidos (NAGATA et al., 2001). Com relação aos difratogramas obtidos para os sistemas imobilizados (Figuras 4.13 b, c), destaca-se que, os picos característicos da lipase aparecem em ambos os casos, sendo mais intensos quando a epícloridrina foi empregada para modificar a superfície do suporte, sugerindo uma melhor eficiência deste agente de ativação no processo de imobilização. Além disso, os picos observados no sistema ativado com glutaraldeído (Figura 4.13b) não são mais identificados no derivado imobilizado, provavelmente devido à ligação covalente entre enzima e o grupo proveniente do agente de ativação.

4.4.4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As Figuras 4.14 (a-d) mostram as micrografias dos suportes ativado e derivados imobilizados com ampliação em torno de 500 vezes.

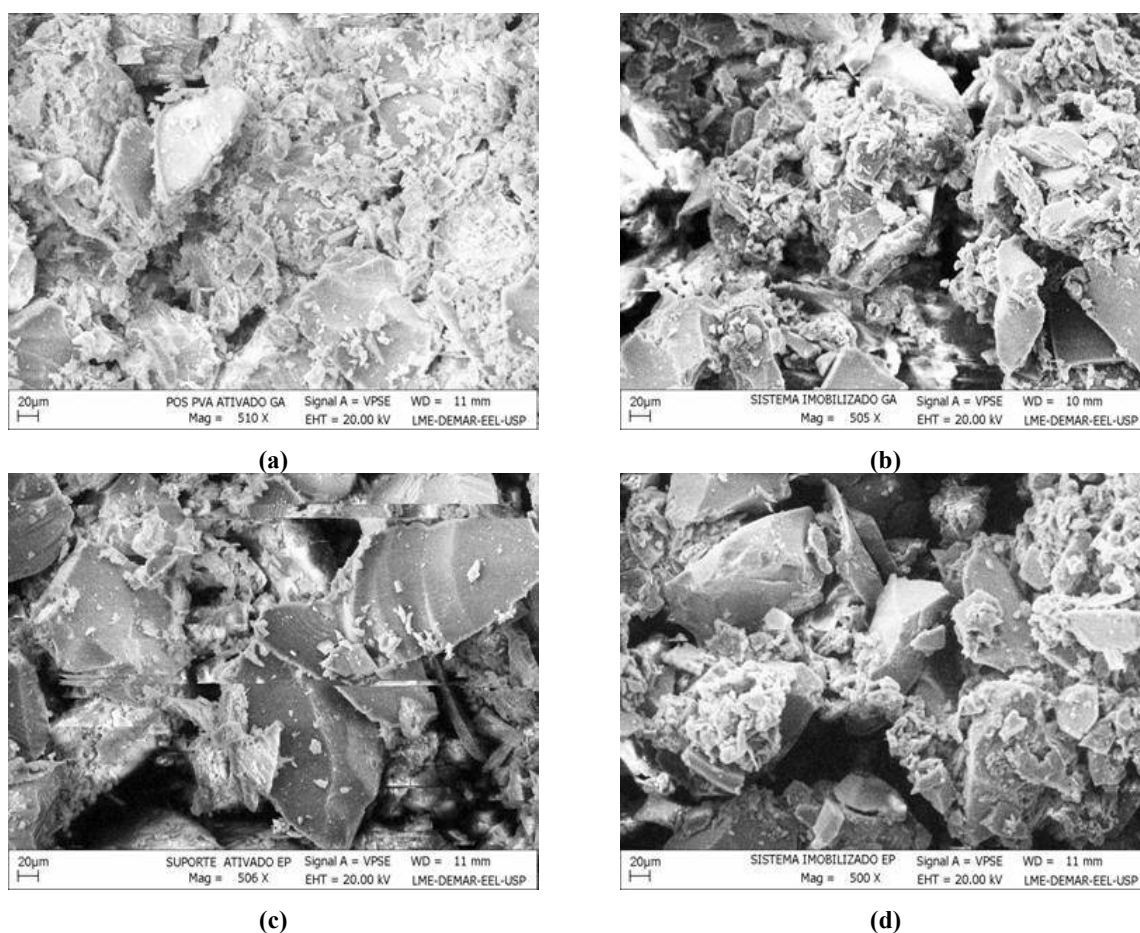


Figura 4.14. Micrografias obtidas pelo modo elétrons secundários referentes ao suporte ativado com glutaraldeído (a), da lipase AK imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído (b), do suporte ativado com epícloridrina (c) e da lipase AK imobilizada em POS-PVA, ativado com epícloridrina (d).

As imagens geradas por MEV apontam para aglomerados da lipase sobre a superfície do suporte, não sendo possível verificar diferenças visuais de recobrimento para cada sistema imobilizado, sugerindo que independente do tipo de agente de ativação usado, a ligação da lipase AK com o suporte ocorreu de forma eficiente.

Os resultados obtidos por MEV referentes aos sistemas imobilizados foram complementados por espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (EDS) obtendo-se, desta forma, informações de composições atômicas de elementos que compõe os materiais. Neste sentido, para cada amostra selecionaram-se regiões com o intuito de identificar diferenças elementais entre a lipase livre e a lipase imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído e epícloridrina. Na Tabela 4.16 é mostrada a composição mássica elementar da lipase livre, bem como dos derivados imobilizados.

Tabela 4.16. Composição elementar da varredura da área da lipase AK imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído e epícloridrina por EDS.

Elemento	Lipase AK livre		Lipase AK imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído		Lipase AK imobilizada em POS-PVA ativado com epícloridrina	
	Porcentagem (%)		Porcentagem (%)		Porcentagem (%)	
	Mássica	Atômica	Mássica	Atômica	Mássica	Atômica
O	18,86	30,93	43,27	57,60	41,32	55,65
Na	21,23	24,22	4,15	3,85	2,88	2,70
Al	0,91	0,89	-	-	-	-
Si	2,02	1,89	44,31	33,59	48,50	37,21
Cl	55,78	41,27	8,27	4,97	7,29	4,43
K	0,61	0,41	-	-	-	-
Ca	0,59	0,38	-	-	-	-
Total	100,00		100,00		100,00	

Os resultados obtidos por EDS indicam que o percentual de silício para os derivados imobilizados foi maior quando comparado com a lipase livre, devido à presença do suporte na área analisada. Tratando-se de uma técnica de análise superficial, o aumento do teor de silício e oxigênio sugere que houve a ligação suporte/ enzima.

4.4.4.3. Estabilidade Térmica

Visando-se verificar a estabilidade térmica dos sistemas imobilizados em relação à enzima livre, procedeu-se à análise dos sistemas enzimáticos por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e as curvas obtidas são apresentadas nas Figuras 4.15 (a-c). A curva

correspondente à enzima (Figura 4.15 a) apresenta dois picos endotérmicos: um em 120°C e outro em 208°C. Enquanto o primeiro pico corresponde à perda de água, tanto livre como ligada à enzima, o segundo pico corresponde à desnaturação da proteína. De fato, sabe-se que a desnaturação das proteínas corresponde à transição de um estado altamente ordenado para outro menos ordenado. Trata-se de um processo fortemente endotérmico no qual, de forma análoga à fusão, há destruição da estrutura cristalina do material, com a quebra das ligações de valência secundária, que estabilizam a proteína em sua conformação primitiva (KARLSON, 1970). Na curva representativa da enzima livre identifica-se ainda um pico exotérmico a 270,04° C, que caracteriza o rompimento das ligações químicas da molécula da enzima.

Com relação aos derivados imobilizados (Figuras 4.15 b,c), as curvas obtidas mostram que houve um deslocamento dos picos endotérmicos correspondentes à desnaturação da enzima para temperaturas mais elevadas (aproximadamente 253°C) em relação com a enzima livre, o que demonstra que o procedimento de imobilização conferiu à lipase maior estabilidade térmica. Nota-se também que o aumento na temperatura de desnaturação foi similar para ambos sistemas imobilizados estudados (POS-PVA ativado com glutaraldeído e epícloridrina), indicando que o aumento da estabilidade térmica da enzima foi independente do agente de ativação empregado.

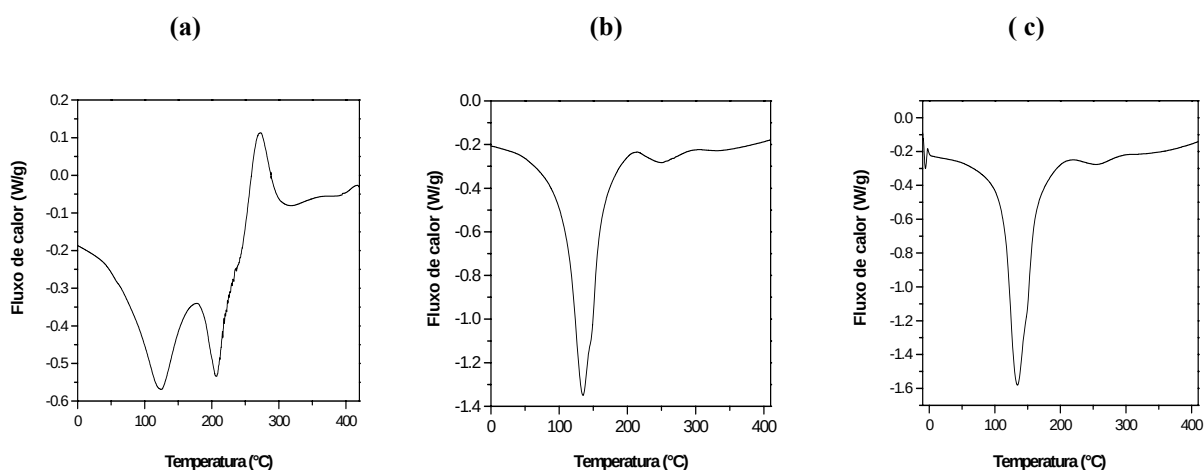


Figura 4.15. Curvas características obtidas por DSC para a lipase livre (a) e imobilizada em suporte POS-PVA ativado com glutaraldeído (b) e epícloridrina (c).

4.5. Influência da razão molar óleo/ etanol e temperatura na síntese de biodiesel utilizando a lipase AK imobilizada em POS-PVA

Utilizando-se a lipase AK imobilizada em POS-PVA ativado com epícloridrina foram realizados ensaios visando estabelecer condições operacionais adequadas para obtenção de rendimentos e produtividades mais elevados na síntese de biodiesel. Os experimentos foram realizados empregando uma massa fixa de derivado imobilizado, reduzindo-se a razão molar óleo/ etanol de 1:18 para 1:9 e aumentando-se a temperatura de 40 para 58°C. As reações foram conduzidas por um período máximo de 72 h.

As Figuras 4.16 e 4.17 apresentam os valores de rendimento de transesterificação em função do tempo de reação para os ensaios realizados.

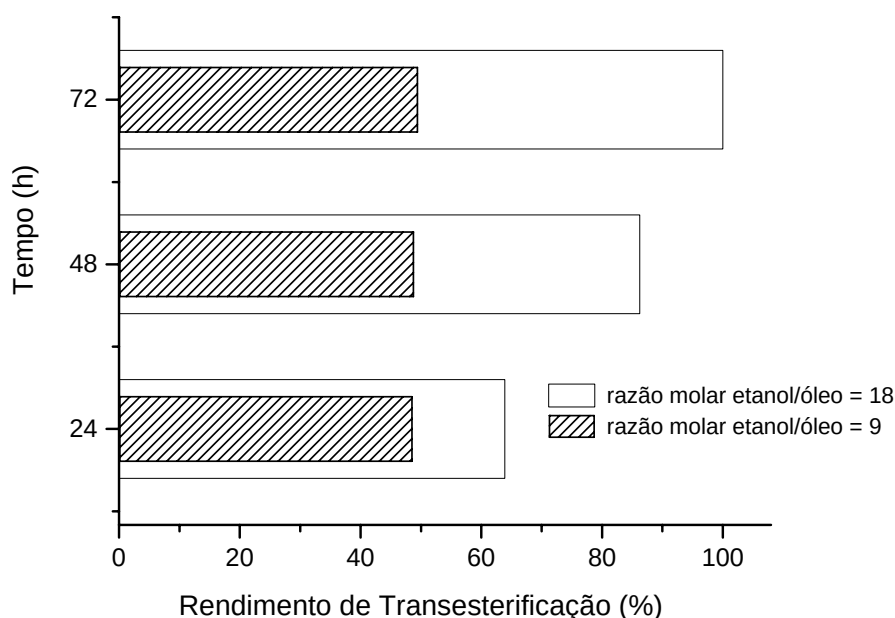


Figura 4.16. Influência da razão molar álcool/óleo no rendimento de transesterificação do óleo de palma com etanol (temperatura de reação 40°C)

A redução da razão molar óleo/etanol promoveu um decréscimo na concentração de monoésteres no meio reacional. O valor total em porcentagem mássica dos ésteres obtidos em 24 h foi da ordem de 28,62% correspondendo a um rendimento de transesterificação de 48,61%. Esses valores ficaram praticamente inalterados até ao final da reação (72 h), indicando uma interrupção da reação, provavelmente devido a limitação de etanol no meio reacional. Comparando-se este resultado ao obtido na reação efetuada com o substrato na razão molar de etanol/óleo =18, verifica-se que o excesso de etanol duplicou o rendimento de

transesterificação. Esses resultados também revelam que o sistema imobilizado utilizado não foi tão suscetível aos efeitos de inibição normalmente observados para lipases de diferentes fontes em meios altamente polares, como os meios reacionais constituídos por etanol (URIESTE, 2004; MOREIRA et al, 2006).

Por outro lado, o aumento da temperatura de reação de 40 para 58°C foi altamente benéfico ao processo, correspondendo a um aumento da velocidade de reação por unidade de enzima. A Figura 4.17 apresenta os rendimentos de transesterificação obtidos em função do tempo de reação catalisada pela lipase AK imobilizada em diferentes temperaturas de incubação. A análise dessa figura revela que o aumento de temperatura forneceu maior conversão de ésteres de etila em menor tempo de reação. Utilizando-se a temperatura de 40°C, foram necessárias 72h para atingir o mesmo rendimento (98,40%) obtido a 58 °C, em 24h de reação.

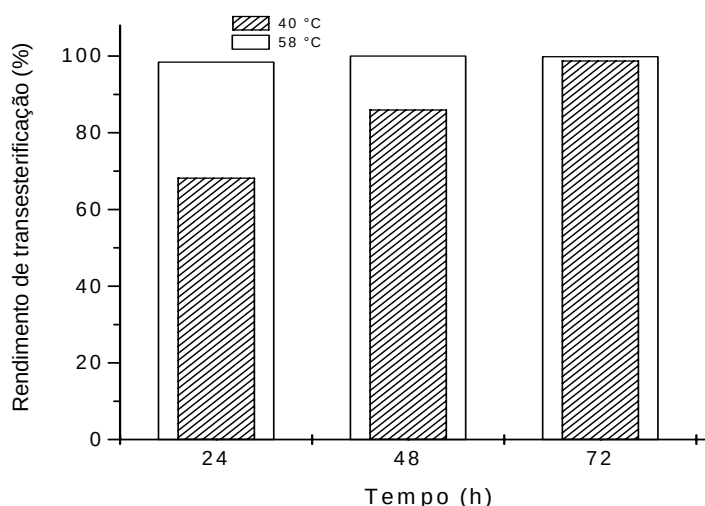


Figura 4.17. Rendimento de reação de transesterificação do óleo de palma com etanol catalisada por lipase AK imobilizada (razão molar óleo/ etanol 1:18) sob diferentes temperaturas (40 e 58°C).

Complementando as informações obtidas nessa série de experimentos, foram também analisadas as viscosidades dos produtos obtidos após a etapa de purificação. A Tabela 4.17 aponta os valores de rendimento e viscosidade do produto final. Verifica-se que os valores de viscosidade cinemática obtidos estão coerentes com os respectivos valores de rendimento de transesterificação. Sabe-se que maiores conversões correspondem a menores viscosidades (COSTA NETO, 2002).

Tabela 4.17. Valores de viscosidade e rendimento obtidos nos ensaios realizados com a lipase AK imobilizada em POS-PVA ativado com epícloridrina.

Temperatura °C	Razão Molar (óleo: etanol)	Rendimento de transesterificação (%)	Viscosidade Cinemática (25 °C, cSt)
40*	1:18	99,40	8,52 ± 0,65
40*	1:9	48,30	14,80 ± 0,98
58**	1:18	97,95	8,50 ± 0,12

* cálculo efetuado em 72 h de reação

** cálculo efetuado em 24 h de reação

Desta forma, confirma-se que a composição do meio reacional (óleo de palma e etanol) na razão molar 1:9 não foi eficiente para obtenção de biodiesel, apresentando o menor rendimento (48,30%) e valores elevados de viscosidade do produto purificado (14,80 cSt).

As viscosidades dos produtos obtidos nas reações conduzidas em meios compostos numa razão molar óleo/etanol (1:18) foram similares da ordem de 8,50 cSt, independente da temperatura de incubação, confirmando a direta proporcionalidade entre conversão em ésteres e viscosidade.

4.6. Estabilidade operacional do sistema imobilizado

No desenvolvimento de processos com enzimas imobilizadas, um dos parâmetros de fundamental importância é a estabilidade operacional. Os processos com enzimas imobilizadas somente serão mais econômicos que o com enzima imobilizada e outros, desde que se consiga um tempo de meia vida suficientemente longo para a enzima imobilizada. Neste caso, haveria uma redução no custo operacional do processo advindo do menor consumo de enzima e a possibilidade de reutilização do biocatalisador (ZANIN, MORAES, 2004).

O estudo da estabilidade operacional da lipase AK imobilizada em POS-POS-PVA foi realizado em regime de bateladas consecutivas (24h, 40 °C, 150 rpm), conforme metodologia descrita no item 3.3.5.8. A atividade de transesterificação do derivado imobilizado de lipase foi determinada pela formação dos ésteres de etila a partir da reação do óleo de palma (6g) com etanol (6 g) a 40°C, com massa seca de enzima de 2,5 g. As concentrações mássicas dos ésteres formados ao final de cada reciclo é mostrada na Figura 4.18.

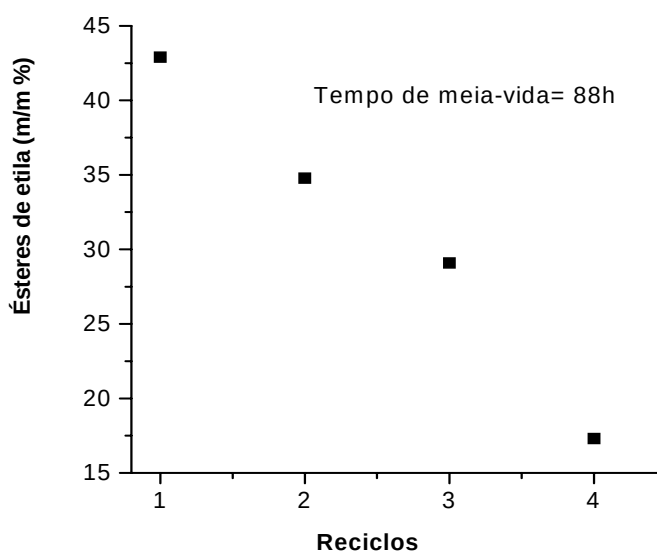


Figura 4.18. Porcentagem mássica total de ésteres de etila em função do número de ciclos.

No final do primeiro ciclo, a concentração mássica dos ésteres no meio reacional foi de 43,94%, o que correspondeu a um rendimento de transesterificação de 85%. Nas bateladas seguintes, a produção de ésteres foi gradativamente reduzida atingindo uma concentração mássica de 28,47% (rendimento= 55,07%) ao final do terceiro reciclo (72h), revelando um tempo de meio-vida do biocatalisador de 88 h. Esse fato foi associado a perda significativa de massa (40%) do sistema imobilizado entre bateladas consecutivas.

Para superar esse problema, um novo experimento foi realizado adotando um reator provido de uma cesta construída em tela de aço inox, malha 100 (0,147 mm), com altura de 65 mm e diâmetro de 12 mm, a qual foi colocada na parte superior do reator batelada. Entre as bateladas, a lipase imobilizada foi lavada com hexano, para a remoção dos reagentes e/ou produtos eventualmente retidos no suporte. Após uma hora, tempo necessário para evaporação do solvente, a lipase imobilizada foi reutilizada em uma outra reação com um novo substrato, na mesma concentração do utilizado na reação anterior. Ao final de cada ciclo, foi analisado o teor de produto formado.

Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4.19 em termos de atividade de transesterificação ao final de cada reciclo. Nessas novas condições, verificou-se que a lipase imobilizada manteve sua atividade original por 48 h (2 ciclos de 24 h). Após este período, uma redução média de 25 % na porcentagem de conversão dos reagentes, revelando um tempo de meia-vida do biocatalisador de 163 h. Esses resultados são similares aos obtidos para outras fontes de lipases imobilizadas nesse tipo de suporte e indicam a viabilidade do biocatalisador para a síntese proposta (BRAGA; De CASTRO, 2005).

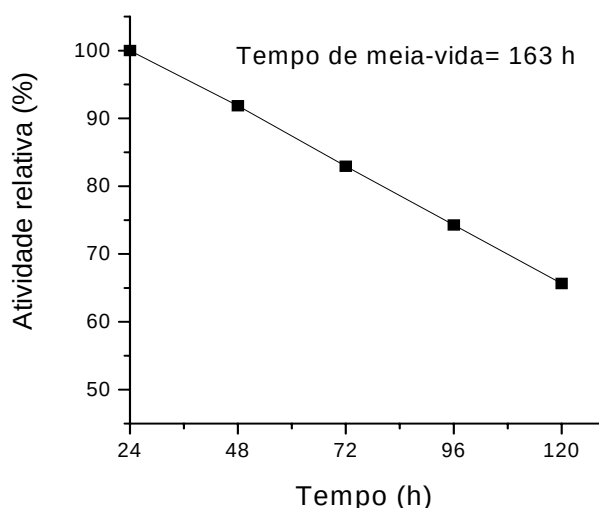


Figura 4.19. Estabilidade operacional da lipase AK imobilizada em POS-PVA, em bateladas consecutivas, na transesterificação do óleo de palma com etanol a 40 °C.

4.7. Reação nas condições operacionais estabelecidas

Com base nos resultados obtidos, foram estabelecidas as condições mais adequadas para a síntese de biodiesel a partir do óleo de palma e etanol, das quais se destacam:

- Razão molar: etanol/ óleo = 18
- Biocatalisador: Lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*) imobilizada em POS-PVA ativado com epicloridrina
- Temperatura: 58 °C

Adotando essas condições, foram ainda realizados testes catalíticos visando determinar comportamento do biocatalisador selecionado em um reator com mesma geometria, porém com maior volume útil de trabalho.

Esse ensaio foi efetuado com uma massa total de reagentes de 50 g nas condições anteriormente descritas (item 3.3.4.3). O monitoramento dessa reação foi efetuado pela determinação dos ésteres etílicos formados (Figura 4.20) e viscosidade cinemática (Figura 4.21) em amostras retiradas em intervalos de 4 h por um período máximo de 24 h.

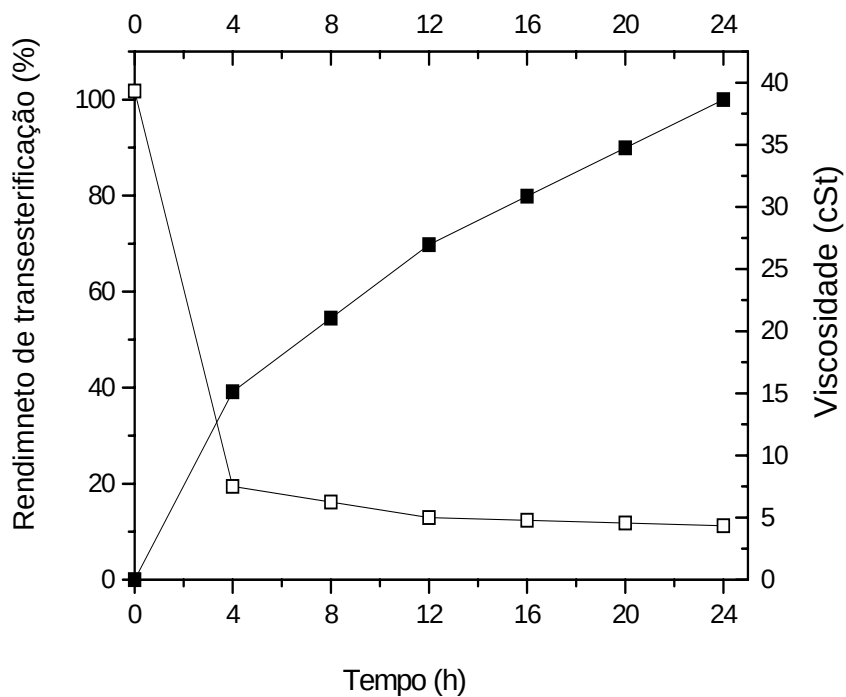


Figura 4.20. Perfil da reação de transesterificação do óleo de palma com etanol nas condições estabelecidas (razão molar etanol/óleo = 18, temperatura 58°C).

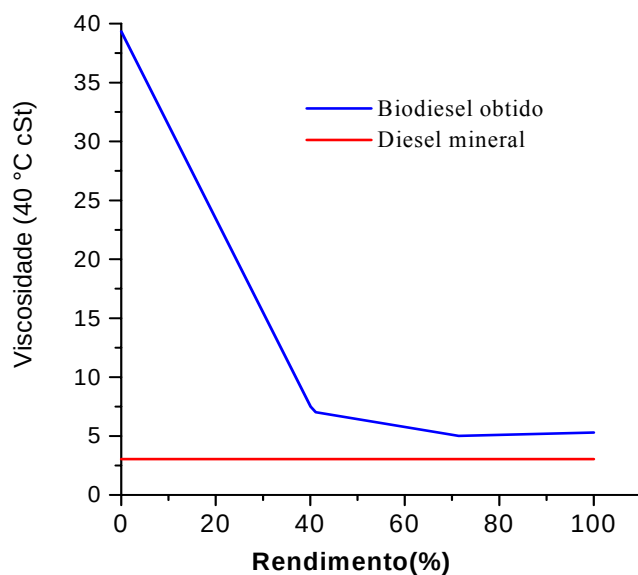


Figura 4.21. Viscosidade x Rendimento em ésteres de etila na transesterificação enzimática do óleo de palma.

Avaliando-se os dados obtidos (Figuras 4.20 e 4.21), observa-se que o aumento do volume do reator não interferiu no desempenho do sistema imobilizado. Verifica-se ainda que tanto a viscosidade como o rendimento, atingiram valores altamente satisfatórios para o uso do produto final como combustível.

A Figura 4.22 ilustra fotografias das amostras do óleo de palma e do biodiesel após a etapa de purificação, respectivamente. Visualmente, podem ser observadas as modificações nas propriedades do óleo vegetal após a transesterificação enzimática.

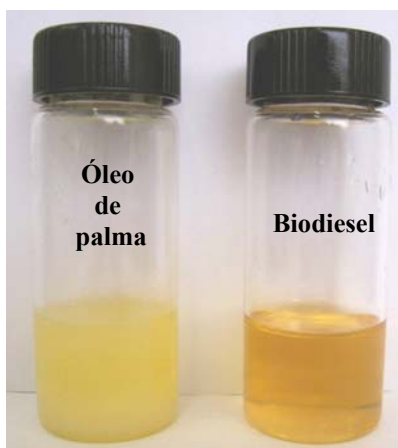


Figura 4.22. Amostras do óleo de palma e do biodiesel obtido por transesterificação enzimática.

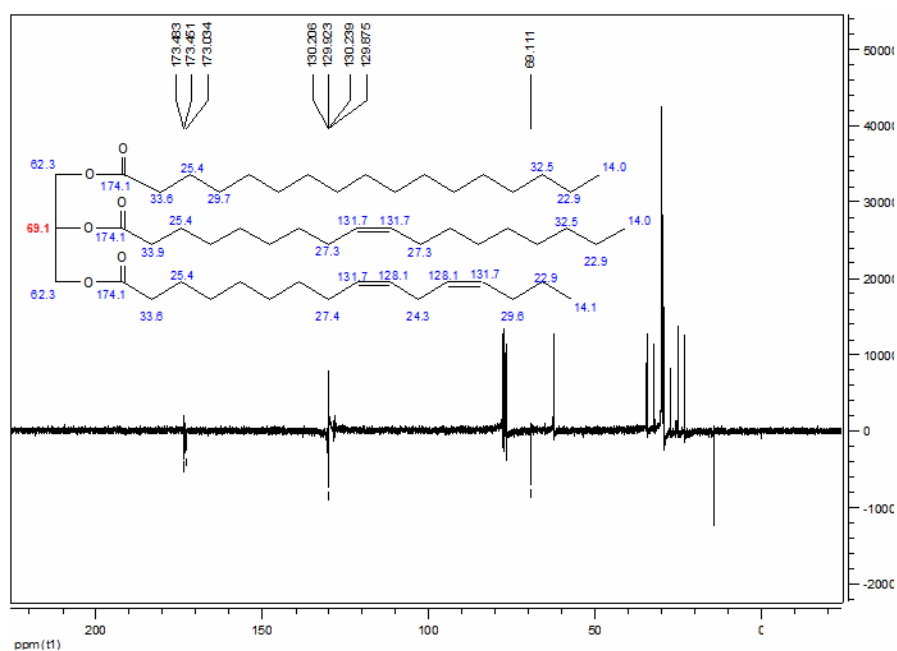
As propriedades do biodiesel como viscosidade cinemática, o rendimento global, a densidade e umidade foram determinadas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.18, que também apresenta as especificações dadas Agência Nacional de Petróleo (ANP) para o uso do biodiesel como combustível. Verifica-se que as propriedades avaliadas estão dentro da faixa especificadas pela ANP. Estes resultados indicam a potencialidade de produção do biodiesel pelo processo proposto neste trabalho. Além disso, a possibilidade de recuperação do biocatalisador para uso em bateladas consecutivas, pode tornar o processo atrativo economicamente.

Tabela 4.18. Propriedades do biodiesel obtido e as especificações da ANP

Propriedades	Especificações ANP	Biodiesel obtido
Viscosidade (40°C cSt)	3,9- 5,6	4,34
Rendimento global	94,3	96,5
Densidade (25°C)	0,8-0,95	0,80
Umidade (%)	0,05	0,02

Para a complementação deste trabalho foram ainda realizadas as análises de RMN ^{13}C , que confirmaram a eficiência dos processos de transesterificação enzimática e de purificação do produto (remoção do glicerol). Os espectros referentes ao óleo de palma e biodiesel obtido são mostrados nas Figuras 4.23 (a,b).

a)



b)

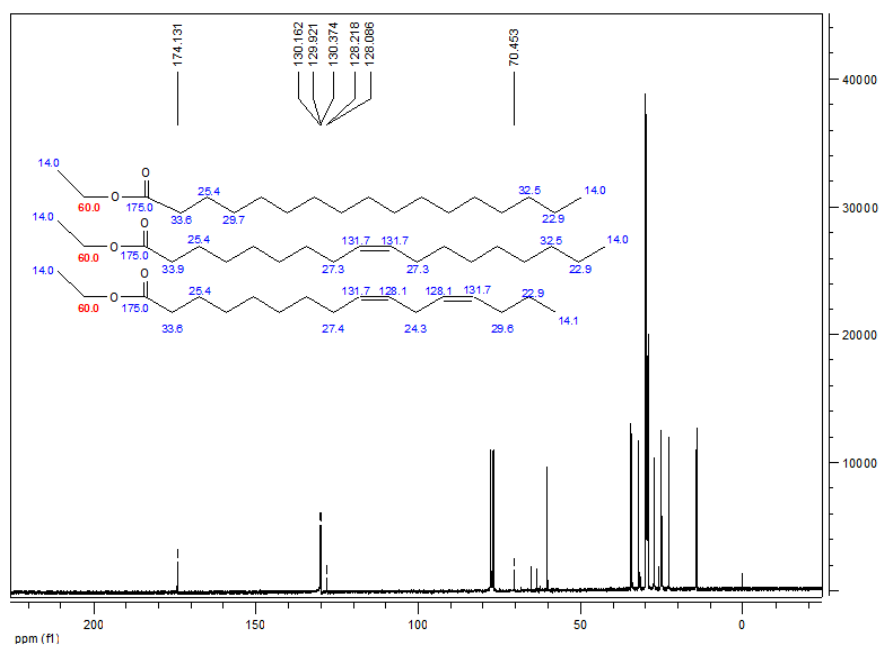


Figura 4.23. Espectros de RMN ^{13}C (0-200 ppm) do óleo de palma (a) e biodiesel (b).

O deslocamento químico 69,1 ppm registrado no espectro do óleo, revela a presença do grupamento (CH) do glicerol nas moléculas de triglicerídeo confirmado por RMN ^{13}C (APT- Attached Proton Test). A ausência deste pico no espectro do biodiesel evidencia a formação dos respectivos ésteres. Os picos registrados em $\cong 173\text{ppm}$, são característicos de carbonilas de ésteres; os deslocamentos químicos na faixa de 128-130 ppm correspondentes às insaturações presentes nas cadeias dos ésteres dos correspondentes ácidos graxos; o pico em 60.3 ppm é característico dos $-\text{CH}_2$ do grupo etoxila.

5. CONCLUSÕES

O biodiesel é um combustível renovável obtido pela mistura de óleos ou gorduras vegetais ou animais com os álcoois de cadeia curta (metanol ou etanol). Uma das vantagens do biodiesel em relação ao diesel tradicional é que ele é praticamente livre de enxofre. Além de representar o desenvolvimento de um novo mercado para os óleos vegetais e gorduras, a produção do biodiesel irá impulsionar o setor de álcool etílico (rota tecnológica utilizada para a produção de biodiesel neste trabalho).

A transesterificação química utilizando álcalis dos óleos vegetais é o processo mais utilizado mundialmente. Entretanto, a transesterificação enzimática de óleos vegetais utilizando lipases, já demonstra o potencial desta tecnologia na produção do biodiesel.

Nesse contexto, o principal objetivo deste trabalho, foi selecionar o melhor biocatalisador para ser utilizado na produção do biodiesel. O processo foi baseado na transesterificação do óleo de palma e etanol, utilizando diferentes fontes de lipases. Os resultados foram altamente satisfatórios e permitiram as seguintes conclusões:

- De um universo de seis preparações de lipases de diferentes fontes, a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (lipase AK) imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído teve um desempenho destacado com relação a atividade de transesterificação convertendo 90,90% do óleo de palma em ésteres etílicos em 72 h de reação, o que correspondeu a uma produtividade de 6,40 mg de biodiesel/g.h.
- O desempenho da lipase selecionada foi fortemente influenciado pelo tipo de modificação química efetuado no suporte de imobilização. O uso de epícloridrina como agente de ativação do suporte, forneceu o derivado imobilizado mais ativo e estável em meio orgânico, possibilitando incrementos expressivos em relação atuação da lipase imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído. Constatou-se um aumento em oito pontos percentuais no rendimento de transesterificação (99,40%) e um acréscimo na produtividade de 2 mg/g.h. O uso da enzima na forma livre forneceu as menores concentrações de ésteres etílicos, confirmando a necessidade da utilização da enzima na sua forma imobilizada.
- Um estudo das características bioquímicas (pH e temperatura) da lipase AK na forma livre e imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído ou epícloridrina possibilitou estabelecer de acordo com os modelos estatísticos as condições otimizadas

para cada sistema enzimático, conforme a seguir descrito: a) enzima livre – pH 8,3 e 58°C; b) enzima imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído – pH 8,8 e 65°C; c) enzima imobilizada em POS-PVA ativado com epicloridrina – pH 8,9 e 58°C. O comportamento cinético da enzima livre e dos derivados imobilizados foi explicado pela equação de Michaelis-Menten. O uso de epicloridrina como agente de ativação resultou em um sistema imobilizado com maior afinidade pelo substrato quando comparado à enzima livre ou imobilizada em POS-PVA ativado com glutaraldeído.

- A imobilização da lipase *Pseudomonas fluorescens* no suporte ativado com glutaraldeído e epicloridrina foi confirmada pelo emprego de técnicas de espectroscopia de infravermelho, difratometria de raio-X, microscopia eletrônica de varredura e calorimetria diferencial de varredura. Essas técnicas também possibilitaram a aquisição de resultados que apoiaram hipóteses sobre a ativação do suporte, permitindo verificar a formação de maior quantidade de sítios de ligação enzima-suporte ativado com epicloridrina. Explicando desta forma a maior eficiência de imobilização obtida quando este composto foi usado para modificar quimicamente POS-PVA.
- A reação de transesterificação foi fortemente influenciada pela razão molar etanol/óleo e temperatura, e de acordo com os resultados foram estabelecidas as seguintes condições de reação: razão molar etanol/óleo = 18 e temperatura de 58°C. Nessas condições obteve-se um rendimento de transesterificação praticamente total (98,9%) em 24 h de reação e uma produtividade da ordem de 23,87 g de biodiesel/g.h. Foi ainda observada uma nítida correlação entre a conversão do óleo em biodiesel e redução da viscosidade do meio reacional.
- A estabilidade operacional da lipase AK imobilizada em POS-PVA ativado com epicloridrina na síntese de biodiesel em bateladas consecutivas revelou um tempo de meia-vida de 163h.
- O produto transesterificado após separação e purificação apresentou viscosidade de 4,34 cSp, teor de umidade de 0,02% e densidade de 0,8 g/mL que estão dentro das especificações exigidas pela ANP.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para complementação e aperfeiçoamento deste trabalho, algumas propostas para estudos futuros são sugeridas:

- 1- Avaliar o desempenho do sistema reacional, em termos de conversão, em outros modelos de reatores, tais como: reatores de coluna de leito fixo e reações assistidas por microondas.
- 2- Estabelecer método de análise para quantificação dos ácidos graxos totais e livres e das frações triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos presentes no produto transesterificado.
- 3- Analisar a qualidade da glicerina obtida como subproduto da reação, avaliando-se sua utilização como produto com valor agregado.
- 4- Verificar a estabilidade térmica e oxidativa do biodiesel obtido.
- 5- Efetuar um estudo econômico da produção de biodiesel por via enzimática, adotando o processo aqui proposto.

REFERÊNCIAS

- ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: <http://www.Aboissa.com.br/palma/palma5.htm>. Acesso em: 21 de jan. 2006.
- ALFORD, J. A.; SUGGS, F. G.; PIERCE, D. A. Activity of microbial lipases on natural fats and synthetic triglycerides. **Journal of Lipid Research**, v.5, n. 3, p. 390, 1964.
- ALLEN, C.A. et al. Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition. **Fuel**, v.78, p.1319-1326, 1999.
- AMANO ENZYME Inc, 2006, Disponível em: www.amano-enzyme.co.jp. Acessado em: 12 maio. 2006.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 4.ed. Champaign, 1990.
- ANASTOPOULOS, G. et al. Impact of oxygen and nitrogen compounds on the lubrication properties of low sulfur diesel fuel. **Energy**, v. 30, p. 415-426, 2005.
- ANDRADE, E. B. Seminário de Biodiesel do Paraná, 1. 2005. Disponível em <http://www.tecpar.br>. Acesso em 20/10/2005.
- ANGKAWIDJAJA, C., KANAYA, S. Family I.3 lipase: Bacterial lipases secreted by the type I secretion system. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.63, p.2804-2817, 2006.
- ARAÚJO, A. M. et al. Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as a support for protein immobilisation. **Biotechnology Techniques**, v.11, n.2, p.67-70, 1997.
- ASSIS, O.B.G., Scanning electron microscopy study of protein immobilized on SiO₂ Sol-gel surfaces. **Brazilian Journal Chemical Engineering**, v.20, p.339-342, 2003.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F.X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art, **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, n.6, p.392-416, 1996.
- BENZONAN, G., ESPOSITO, S. Positional and chain specificities of *Candida cylindracea* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 231, n. 1, p. 15-22, 1971.
- BIOCOMBUSTÍVEL aspectos ambientais. Disponível em <http://www.ambientebrasil.com.br/> Acesso em 15 març. 2007.
- BRAGA, L. P.; De CASTRO, H. F. Uso E Reutilização Da Lipase De *Candida Rugosa* Imobilizada em Suportes Híbridos Obtidos pela Técnica Sol-Gel. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia de Iniciação Científica, 6º Campinas-SP, 2005**. Cadernos de Programação e Resumos. Campinas-SP: 2005. v. 1, p. 3.
- BRASIL é um dos maiores produtores mundiais de biocombustíveis. Estado de São Paulo, 2006. Disponível em: <http://www.biodieselbrasil.com.br/clip2006/marco/clipping237bb-300306.html>.> Acesso em: 15 abr. 2006.

BRASIL deve ter capacidade para produzir 1,3 bilhões de litros de biodiesel. **Folha online**, 2007. Disponível em: < <http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u114712.shtml> > Acesso em: 15 març. 2007.

BREIVIK, H.; HARALDSSON, G. G.; KRISTINSSON, B. Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, p. 425-442, 1997.

BROCKMAN, H. L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: Borgstrom, B.; Brockman, H.L. (Eds.). **Lipases**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 1- 46, 1984.

BRUNO, L. M. et al. Ester synthesis catalyzed by *Mucor miehe* immobilized onto polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113/117, p. 189-200, 2004.

BRUNO, L. M. et al. Characterization of *Mucor miehe* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles, **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p.189-192, 2005.

CAMPOS, I. **Biodiesel e biomassa**: Duas fontes para o Brasil. Revista de ecologia do século 21, v 80, Julho, 2003. Disponível: <<http://www.eco21.com.br>. Acesso em 21 de março. 2006.

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

CHANG, Y. Z. D. et al. Fuel properties and emissions of soybean oil esters as diesel fuel. **Journal of American Oil Chemical Society**, v.73, p.1549-1555, 1996.

CHIARANDA, M.; ANDRADE, A. M. J.; OLIVEIRA, G.T. **A Produção de Biodiesel no Brasil e aspectos do PNPB**. Grupo de estudos e extensão em desenvolvimento econômico e social. Departamento de economia e administração e sociologia. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2005.

COSTA NETO, P.R. **Obtenção de ésteres alquílicos por via enzimática a partir do óleo de soja**. 2002, 152 f. Tese (Doutorado em Química). Departamento de Química –Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

COSTA NETO, P. R. et al. Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

D'AGOSTINI, D. **Obtenção de lipídeos estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa**. 2001, 185 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Química Nova**, vol. 27, n.4, p.623-630, 2004.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; SENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p 125-129, 2004.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: A Textbook**. 3rd Ed Gesellschaft, Berlin. Springer Produktions- 1997, cap1,2 e 3,

FELIZARDO, P. M. G. **Produção de biodiesel a partir de óleos usados de frituras** – Lisboa: Centro de Informação de Resíduos, Instituto Superior Técnico, Departamento de Engenharia Química, 2003.127p. (Relatório de estágio).

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V. D.; SCABIO, A. Biodiesel de soja-Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v.28, n.1, p.19-23, 2005.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H.. Transesterification kinetics of soybean oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v.63, n. 10 p.1375-1380, 1986.

FREITAS, L. **Seleção de rota enzimática para produção de monoglicerídeos empregando lipase imobilizada em matriz obtida pela técnica sol-gel**. 2006. 122f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, FAENQUIL, Lorena-SP, 2006.

FREITAS, S. P.; SILVA F.C.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Efeito de enzimas hidrolíticas no comportamento reológico do óleo de palma cru. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.1, p.127-130, 1998.

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

GACULA JR., M. C., SINGH, J. Response surface designs and analysis, Statistical Methods in Food and Consumer Research. **Food Science and Technology. A Series of Monographs**, Academic Press, 1984.

GEORGIO, G., HUBBELL, J. A. Protein Engineering. In-**Encyclopedia of Chemical Processing and Design**, Ed. J. J. MCKETTA. New York: Marcel Dekker, 1993.v.45, p.142-176.

GILL, I.; BALLESTEROS A. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: An efficient and generic approach. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 34, p. 8587-8598, 1998.

GOMES, F. M. et al. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v.29, p. 710-718, 2006.

ISO, M. et al. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 53–58, 2001.

IWAI, M.; OKUMURA, S.; TSUJISAKA, Y. Comparison of properties of two lipases from *Penicillium cyclopium* westring. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 1063-1070, 1975.

KARLSON, P. **Bioquímica**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara, 1970. p. 176-203

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Biotransformation with lipases, In: A Multi-Volume Comprehensive Treatise in Biotechnology, (ed.) Rehm, H.J., Pihler G., Stadler, A., Kelly, P. J.W. New York: Wiley VCH Verlag, v. 8, 1998. p. 37-192

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

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

KNOTHE, G. et al. **Manual do Biodiesel**, 1^a ed., São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KUCEK, T. K. **Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino**. 2004. 123 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KUEN SOON, T. An overview of the Asean olechemical market. **Malasyan Oil Science and Technology**, v. 10, p-59-71, 2001.

LARA, P. V.; PARK, E. Y. Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 270–277, 2004.

LIMA-BARROS, A. et al. Polysiloxane/PVA-glutaradehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 459-463, 2002.

LIMA, P. C. R. Biodiesel: **Um Novo Combustível para o Brasil**. Brasília: Consultoria Legislativa, 2005. Disponível em http://www2.camara.gov.br/publicacoes/estnottec/tema3/2005_177.pdf. Acesso em 06. Març .2005.

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Biociência e Desenvolvimento**, n. 32, p. 38-46, 2004.

MAMAT, H. et al. Physicochemical characteristics of palm oil and sunflower oil blends fractionated at different temperatures. **Food Chemistry**, v.91, n.4, p.p 731-736, 2005.

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

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

MEIRELLES, S. F. **Viabilidade e utilização de óleo vegetal - Biodiesel**. Brasília, 2003. Disponível em: < <http://www.faespsenar.com.br>> Acesso em: 23 fev. 2006.

MITTELBACH, M. Lipase catalyzed alcoholyses of sunflower oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 67, n. 3, p. 168-170, 1990.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 23/03/2006.

MOREIRA, A. B.R. et al. Evaluation of porcine pancreas lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol in the ethanolysis of palm oil. In: CHISA 2006 - CD ROM OF FULL TEXTS (CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING), 17, 2006.

MYERS, R.H., MONTGOMERY, D.C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiment**, New York: John & Sons, 1995.

NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Mathematical methods to correct spectral interferences and interelemental effects in x-ray fluorescence quantitative analysis. **Química Nova**, v.24, n. 4, p. 531-539, 2001.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R; MAZZUCO, L. M. . Biotransformação de óleos e gorduras. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 17, p. 28-31, 2001.

NELDER, J. A. The Selection of Terms in Response Surface Models – How Strong is the Weak Heredity Principle. **The American Statistician**, n.52, p. 315-318, 1998.

NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 9, p. 1191-1195, 1996.

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

OLIVEIRA, L. B.; COSTA, A. O. **O Biodiesel uma proposta de desenvolvimento sustentável**, 2001. Disponível em: <http://www.ivig.coppe.ufrj.br/doc/biodiesel.pdf>. Acesso em: 03/02/ 2006.

OLIVEIRA, D.; ALVES, T. L. M. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oils- Optimization by statistical methods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77, n.9, p.835-844, 1999.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, vol.29, no. 1, p.93-99, 2005.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel**: Uma aventura tecnológica num país engraçado, 2003. expedito@tecbio.com.br – acesso em 30/10/2005.

PEREZ, V. H. et al. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, 636 -639, 2007.

PETROBRAS Petróleo Brasileiro S.A. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br>>. Acesso em 11/03/2006.

PAULA, A. V. et al. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane- polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology e Biotechnology**, 2007, v. 82, n.3, p.281-288, 2007.

PORATH, J., FORNSTEDT, N., Group fractionation of plasma proteins on dipolar ion exchangers. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 497-489, 1970.

PINTO, A. C. et al. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6., p. 1313-1330, 2005.

PIYAPORN, K., JEYASHOKE, N.; KANIT, K. Survey of seed oils for use as diesel fuels. **Journal of American Oil Chemical Society**, v.73, p.471-474, 1996.

Portaria nº. 702 do MCT, de 30 de outubro de 2002. Disponível em. http://www.mct.gov.br/legis/portarias/702_2002. Acesso em 15/09/2005.

RAMOS, L. P. et al. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biocnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v.31, p.28-37, 2003.

RAMOS, M. A. et al. Physical and chemical characterisation of some silicas and silica derivatives. **Powder Technology**, v. 99, p.79-85, 1998.

REETZ, M. T. et al. Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: Magnetic separation of heterogeneous biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v.134, p. 251-258, 1998.

SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Optimization of Lipase-catalyzed Synthesis of Butyl Butyrate Using a Factorial Design. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n.10, p. 1007-1011, 2006.

SELMİ, B.; THOMAS, D. Immobilized lipase-catalysed ethanolysis of sunflower oil in solvent-free medium. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, p. 691-695, 1998.

SHAHANI, K.M. Lipases and Esterases, In: Reead, G (Ed). **Enzymes in Food Processing**, , 2ªed. New York: Academic Press, 1975. p. 182-214.

SHIMADA, Y. et al. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 7, p. 789-793, 1999

SHEEHAN, J. et al. Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 286 p, 1998.

SHINTRE, M. S.; GHADGE, R. S.; SAWANT, S. B. Lipolase catalysed synthesis of benzyl esters of fatty acids, **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 131-141, 2002.

SONNTAG, N. O. V. Structure and composition of fats and oils. Bailey's industrial oil and fat products. 4th ed. New York, 1979. John Wiley and Sons, v. 1, p. 1-343.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 97-103, 2003.

SILVA, G. S.; VIEIRA, F. C. V.; CASTRO, H. F. Transformação enzimática do óleo de palma visando a obtenção de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6^o, 2005, Campinas-SP. **Cadernos de Programação e Resumos**. Campinas-SP: 2005. v. 1, p. 34, 2005.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77/79, p. 745-757, 1999.

SRISVASTAVA, A.; PRASAD. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.4, n. 2, p.111-133, 2000.

STUART, B., GEORGE, W. O., MCINTYRE, P.S. In: MODERN INFRARED SPECTROSCOPY, ed. D. J. Ando. England: John Wiley & Sons, 1996. p. 117-119

SUGIURA, M. et al. Purification, crystallization and properties of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas fluorescens*. **Biochemical Biophysics Acta**. v. 488,1977. p.353-358

TORRES, E. A. Avaliação de um motor do ciclo diesel operando com óleo de dendê para suprimento energético em comunidades rurais. In Anais do 3. ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 3; 2000, Campinas. Disponível em: <<http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php>. Acesso em 12/01/2006.

URIOSTE, D. **Produção de biodiesel por catálise enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta**. 2004. 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, FAENQUIL, Lorena-SP, 2004.

VEIGA FILHO, A. A. Novociclo do Proálcool: Problemas derivados do aumento da produção do etanol. **Revista eletrônica de Jornalismo Científico**, 2007. Disponível em: <http://www.comciencia.br/comciencia/?sectionedição=23&id=257>. Acesso em 25/04/2007.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts, **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

VILLLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9 n.4-6, p.113-148, 2000.

WATANABE, Y. et al. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 151-155, 2002.

WU, W. H. et al. Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 4, p. 517-521, 1999.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. cap.4, p.35-85.

APÊNDICES

1. Fórmulas

1.1. Rendimento em ésteres

$Me = \frac{(Mo.MMe)}{MMa} \quad (a)$	$Mo = Ca.Mi \quad (b)$	$R = \frac{Mt}{Me} \times 100 \quad (c)$
Equações utilizadas para o cálculo de rendimento das reações.		

Tabela 8.1. Valores referentes aos ácidos graxos analisados e ésteres correspondentes, em relação a composição do óleo de palma

Ácidos Graxos	Óleo de palma (%)	Massa molecular Ácidos graxos (MM _a)	Massa molecular dos ésteres de etila (MM _e)	Massa de ácido presente em 6 g de óleo (M ₀)	Massa total ésteres de etila esperada
C12	0,10	200,32	229,32	0,005	0,006
C14	1,20	228,37	257,37	0,070	0,079
C16	46,80	256,42	285,42	2,752	3,053
C18	3,80	284,47	313,47	0,223	0,245
C18:1	37,60	280,44	309,44	2,211	2,430
C18:2	10	280,44	308,44	0,58	0,64
Total	89,5	310,5	339,5	5,197	5,815

Cálculo baseado em massa inicial de óleo de palma igual a 6 gramas.

1.2. Rendimento global de reação

$$\eta = \frac{Mb}{Mo} \times 100$$

Mb- massa da fase biodiesel em gramas.

Mo- massa de óleo utilizada em gramas.

1.3. Produtividade

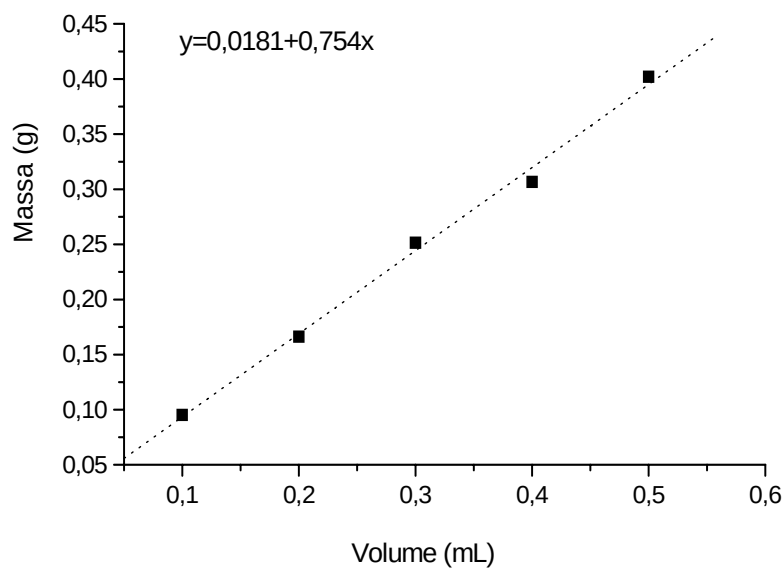
$$P = \frac{Ce}{t}$$

Ce- Concentração mássica em ésteres de etila, mg/g.

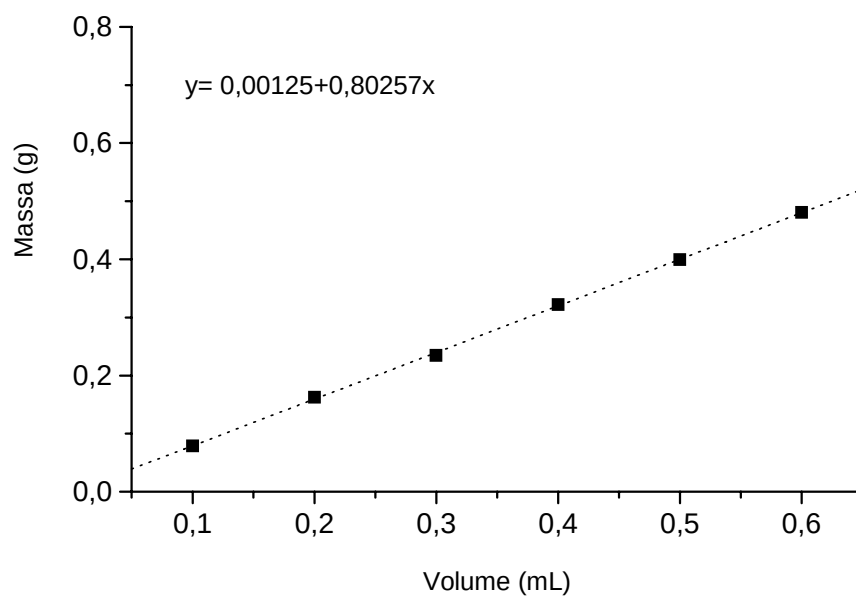
t- Tempo em horas.

2. Dados da determinação da densidade

a) óleo de palma



b) biodiesel (temperatura 25°C)



3. Dados referentes aos testes de etanólise do óleo de palma empregando lipase pancreática

Materiais:

-6,17g de etanol

-6,14 g de óleo de palma

-2,53 g LPP imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 15%

Atividade enzimática = 282,24 U/g

Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)			
	24h	48h	72h	96h
Láurico C12	0,01	0,07	0,08	0,14
Mirístico C14	0,48	0,14	0,252	0,25
Palmítico C16	2,39	4,48	4,16	4,38
Estearico C18	0,36	0,41	0,47	0,50
Oleico C18:1	1,84	3,46	3,75	3,83
Total	5,08	8,56	8,71	9,1
Rendimento	11,71	19,39	19,74	20,62

Materiais:

-6,02g de etanol

-6,03 g de óleo de palma

-2,74 g de LPP imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 16%

Atividade enzimática = 271,31 U/g

Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)			
	24h	48h	72h	96h
Láurico C12	0,21	0,00	0,09	0,12
Mirístico C14	0,09	0,29	0,33	0,31
Palmítico C16	2,12	2,90	2,81	2,95
Estearico C18	0,32	0,50	0,98	0,92
Oleico C18:1	2,11	3,17	3,50	3,41
Total	4,85	6,86	7,71	7,71
Rendimento	10,95	15,49	17,41	17,41

4. Dados referentes aos testes de etanólise do óleo palma empregando Lipolase

Materiais:

6,03 g de etanol

6,05 g de óleo de palma

2,57 g de Lipolase imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 12%

Atividade enzimática = 728,12 U/mg

Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (% m/m)			
	24h	48h	72h	96h
Láurico C12	0,60	0,30	0,20	0,40
Mirístico C14	0,00	0,20	0,00	0,00
Palmítico C16	12,80	16,70	14,20	15,60
Estearico C18	0,50	0,70	1,00	1,70
Oléico C18:1	4,90	6,90	9,90	10,00
Total	18,80	24,80	25,30	27,70
Rendimento	42,42	55,96	57,09	62,50

Materiais:

-6,01g de etanol

-6,00g de óleo de palma

-2,58 g de Lipolase POS PVA (massa seca), umidade 16%

Atividade enzimática = 718,43 U/g

Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácido graxos	Ésteres de etila (m/m %)			
	24h	48h	72h	96h
Láurico C12	0,70	0,40	0,30	0,40
Mirístico C14	0,00	0,00	0,00	0,00
Palmítico C16	12,70	13,70	17,60	18,10
Estearico C18	0,60	0,70	0,50	0,60
Oleico C18:1	5,90	7,40	5,00	6,40
Total	20,00	22,50	23,40	25,50
Rendimento	45,01	50,22	52,93	57,68

5. Dados referentes aos testes de etanólise do óleo palma empregando Lipase AK.

Materiais:

6,21g de etanol

6,27 g de óleo de palma

2,9 g de AK imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 16%

Atividade enzimática = 764,80 U/g

Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)			
	24h	48h	72h	96h
Láurico C12	0,00	0,20	0,10	0,20
Mirístico C14	0,20	0,10	0,40	0,40
Palmítico C16	13,40	15,40	21,10	21,30
Esteárico C18	1,10	1,30	1,60	1,80
Oleico C18:1	12,40	15,30	17,30	18,80
Total	27,09	32,30	40,48	42,50
Rendimento	60,73	72,65	91,10	95,60

Materiais:

6,4g de etanol

6,6g de óleo de palma

2,91g de AK imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 16%

Atividade enzimática = 801,57 U/g

Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)			
	24h	48h	72h	96h
Láurico C12	0,28	0,21	0,17	0,12
Mirístico C14	0,55	0,61	0,89	1,14
Palmítico C16	13,11	14,06	18,31	18,46
Esteárico C18	4,39	5,24	6,82	7,53
Oleico C18:1	10,84	11,03	17,00	18,35
Linoleato C18:2	1,85	2,12	2,94	3,03
Total	31,02	33,27	46,13	48,63
Rendimento	61,10	65,53	90,86	95,78

6. Dados referentes aos testes de etanólise do óleo palma empregando Lipase G.

Materiais:

-6,14g de etanol
 -6,11g de óleo de palma
 -2,41g de Lipase G imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 16%
 -Atividade enzimática = 51,45 U/g
 Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)			
	24h	48h	72h	96h
Láurico C12	0,09	0,08	0,05	0,032
Mirístico C14	0,08	0,09	0,032	0,029
Palmítico C16	0,61	0,59	1,5	1,67
Esteárico C18	0,01	0,01	0,01	0,01
Oleico C18:1	0,41	0,67	0,85	0,72
Total	1,20	1,44	3,43	3,45
Rendimento	2,72	3,26	7,78	7,82

Materiais:

-6,22g de etanol
 -6,25g de óleo de palma
 -2,71 g de Lipase G imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 16%
 -Atividade enzimática = 39,76 U/g
 Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)		
	24h	48h	72h
Láurico C12	0,00	0,00	0,00
Mirístico C14	0,01	0,05	0,05
Palmítico C16	0,43	0,69	0,99
Esteárico C18	0,00	0,00	0,00
Oleico C18:1	0,53	0,51	0,79
Linoleato C18:2	0,09	0,00	0,00
Total	0,97	1,25	1,82
Rendimento	2,19	2,82	6,38

7. Dados referentes aos testes de etanólise do óleo palma empregando Lipase CALB L.

Materiais:

-6,15 g de etanol
 -6,18g de óleo de palma
 -2,42 g de CALB L imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 13%
 -Atividade enzimática = 55,19 U/g
 Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m%)		
	24h	48h	72h
Láurico C12	0,00	0,00	0,07
Mirístico C14	0,04	0,048	0,21
Palmítico C16	1,72	2,076	1,93
Esteárico C18	0,00	0,00	0,00
Oleico C18:1	1,84	2,68	4,65
Total	3,6	4,80	6,87
Rendimento	8,12	10,83	10,96

Materiais:

-6,17 g de etanol
 -6,85 g de óleo de palma
 -2,75 g de CALB L imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 14%
 -Atividade enzimática = 47,84 U/g
 Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m%)		
	24h	48h	72h
Láurico C12	0,00	0,00	0,00
Mirístico C14	0,40	0,28	0,09
Palmítico C16	2,57	2,46	2,46
Esteárico C18	0,00	0,00	0,00
Oleico C18:1	0,26	0,79	2,85
Linoleato C18:2	0,56	1,37	0,55
Total	3,79	4,90	5,95
Rendimento	7,20	9,31	10,26

8. Dados referentes aos testes de etanólise do óleo palma empregando Lipase PS.

Materiais:

-6,21g de etanol
 -6,22g de óleo de palma
 -2,5 g de Lipase PS imobilizada POS PVA (massa seca), umidade 12%
 Atividade enzimática = 911 U/mg
 Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25 mL

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)			
	24h	48h	72h	96h
Láurico C12	0,40	0,1	0,20	0,40
Mirístico C14	0,20	0,40	0,40	0,50
Palmítico C16	10,40	13,40	10,70	12,50
Estearico C18	3,10	0,00	3,60	1,30
Oleico C18:1	12,50	18,10	19,70	21,00
Total	26,60	32,00	34,52	35,70
Rendimento	60,07	72,27	78,23	80,62

Materiais:

-6,00g de etanol
 -6,7 g de óleo de palma
 -2,5 g de PS imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 12%
 Atividade enzimática = 988 U/mg
 Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)			
	24h	48h	72h	96h
Láurico C12	0,00	0,00	0,20	0,10
Mirístico C14	0,20	0,20	0,30	1,20
Palmítico C16	9,50	13,50	10,20	9,90
Estearico C18	2,50	2,30	3,40	3,60
Oleico C18:1	11,40	14,20	16,00	19,10
Total	23,60	30,20	30,10	33,90
Rendimento	56,45	72,24	72,00	81,09

9. Dados referentes aos ensaios de etanolise do óleo de palma empregando lipase AK livre, razão molar 1:18.

Materiais:

-6,47 g de etanol
 -6,84 g de óleo de palma
 -0,32 g de AK livre (massa seca), umidade 7,31%
 Atividade enzimática = 6699 U/mg
 Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)		
	24h	48h	72h
Láurico C12	0,22	0,35	0,00
Mirístico C14	0,18	0,31	0,33
Palmítico C16	7,12	6,93	10,29
Esteárico C18	0,95	1,07	1,50
Oleico C18:1	3,97	4,14	5,93
Linoleico C 18:2	0,75	0,73	1,01
Total	13,19	13,53	19,06
Rendimento	25,66	26,33	35,12

Materiais:

-6,60 g de etanol
 -6,62 g de óleo de palma
 -0,36 g de AK livre (massa seca), umidade 8,57%, Atividade enzimática = 6148 U/mg
 Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)		
	24h	48h	72h
Láurico C12	0,11	0,19	0,18
Mirístico C14	0,48	0,09	0,52
Palmítico C16	5,77	7,95	10,54
Esteárico C18	0,00	4,37	5,34
Oleico C18:1	3,88	3,06	4,30
Linoleico C 18:2	0,80	9,79	1,22
Total	11,04	16,39	22,10
Rendimento	22,05	32,72	41,69

10. Dados referentes aos ensaios de etanólise do óleo de palma utilizando a lipase AK imobilizada em suporte ativado com epiclorigrina, razão molar 1:18.

Materiais:

-6,40 g de etanol
 -6,15 g de óleo de palma
 - 2,5 g de AK imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 3,6%.
 Atividade enzimática = 926,58 U/mg
 Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)		
	24h	48h	72h
Láurico C12	0,12	0,13	0,20
Mirístico C14	0,67	0,57	0,49
Palmítico C16	10,18	13,15	16,09
Estearico C18	3,62	6,07	6,82
Oleico C18:1	14,07	18,78	23,35
Total	28,66	38,70	46,95
Rendimento	63,89	82,27	98,82

Materiais:

-6,55 g de etanol
 -6,47 g de óleo de palma
 - 2,5 g de AK imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 2,5%.
 Atividade enzimática = 957,21 U/mg
 Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)		
	24h	48h	72h
Láurico C12	0,19	0,26	0,38
Mirístico C14	0,31	0,50	0,55
Palmítico C16	16,66	18,13	20,51
Estearico C18	4,36	4,15	4,27
Oleico C18:1	15,04	21,36	28,40
Linoleico C 18:2	2,36	3,37	4,67
Total	33,92	42,77	53,78
Rendimento	68,26	86,06	100

11. Dados referentes aos ensaios de etanolise do óleo de palma utilizando a lipase AK imobilizada em suporte ativado com epiclorigrina, razão molar óleo/etanol 1:9.

Materiais:

- 6 g de etanol
 - 12 g de óleo de palma
 - 3,65 g de AK imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 3,6%.
- Atividade enzimática = 879,51 U/mg
 Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)			
	24h	48h	72h	96h
Láurico C12	0,16	0,17	0,21	0,18
Mirístico C14	0,61	0,55	0,53	0,54
Palmítico C16	18,94	18,67	18,91	18,45
Estearico C18	2,35	2,49	2,54	2,67
Oleico C18:1	6,56	6,93	7,01	6,98
Total	28,62	28,81	29,07	28,82
Rendimento	48,61	48,84	49,50	48,85

Materiais:

- 3,20 g de etanol
 - 6,24 g de óleo de palma
 - 1,85 g de AK imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 2,5%.
- Atividade enzimática = 890,88 U/mg
 Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)			
	24h	48h	72h	96h
Láurico C12	0,09	0,11	0,16	0,14
Mirístico C14	0,26	0,29	0,92	0,87
Palmítico C16	16,22	15,79	17,96	17,42
Estearico C18	4,46	4,78	4,87	4,36
Oleico C18:1	6,94	7,14	7,23	7,12
Linoleico C 18:2	2,35	2,37	3,19	2,93
Total	30,32	30,48	34,33	32,84
Rendimento	45,87	46,11	47,11	45,25

12. Dados referentes aos ensaios de etanólise do óleo de palma em bateladas consecutivas

Materiais:

Biocatalisador: AK imobilizada em POSPVA ativado Epicloridrina

Massa = 1,35 g **umidade**= 5% **atividade**= 923,63 U/mg

Temperatura de 40 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

-24 h = 3,13g de etanol + 3,55g de óleo

- Reciclo 1 = 3,83g de etanol + 3,46g de óleo

- Reciclo 2 = 3,37g de etanol + 3,27g de óleo

- Reciclo 3 = 3,99g de etanol + 3,97g de óleo

- 24 h = 3,13g de etanol + 3,55g de óleo

- Reciclo 1 = 3,83g de etanol + 3,46g de óleo

- Reciclo 2 = 3,37g de etanol + 3,27g de óleo

Tempo (h)	Média de 2 bateladas		% Atividade relativa
	Ésteres de etila (m/m %)	Rendimento	
24	42,90±1,46	83,40±2,27	100
48	34,77±2,19	67,60±4,78	81,50
72	29,08±0,86	56,54±2,08	67,80
96	17,31±0,00	33,80±0,00	40,53

13. Dados referentes aos ensaios de etanólise do óleo de palma em bateladas consecutivas utilizando reator provido de cesta.

Materiais:

Biocatalisador: AK imobilizada em POSPVA ativado Epicloridrina

Massa = 1,87 g **umidade**= 4% **atividade** = 923,63 U/mg

Temperatura de 40 °C, agitação mecânica, reator de 25mL.

-24 h = 4,24g de etanol + 4,74g de óleo

- Reciclo 1 = 3,74g de etanol + 3,93g de óleo

- Reciclo 2 = 3,29g de etanol + 3,09g de óleo

- Reciclo 3 = 3,52g de etanol + 3,50g de óleo

- Reciclo 4= 3,17g de etanol + 4,19g de óleo

Tempo (h)	Ésteres de etila (m/m %)	Rendimento (%)	% Atividade relativa
24	49,56	98,03	100
48	49,43	90,06	91,87
72	40,25	81,29	82,93
96	33,32	72,68	74,28
120	28,43	64,34	65,64

14. Dados referentes aos ensaios de etanólise do óleo de palma (temperatura de 58 °C).

Materiais:

- 3,15 g de etanol
 - 3,50 g de óleo de palma
 - 1,40 g de AK imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 4,6%.
- Atividade enzimática = 979,51 U/mg
 Temperatura de 58 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)		
	24h	48h	72h
Láurico C12	0,25	0,31	0,30
Mirístico C14	1,19	0,96	0,07
Palmítico C16	25,82	23,20	20,87
Estearico C18	6,64	17,10	22,26
Oleico C18:1	23,39	17,55	14,61
Linoleico C 18:2	4,20	4,26	4,04
Total	57,29	59,13	58,12
Rendimento	98,40	100	99,82

Materiais:

- 6,67 g de etanol
 - 6,80 g de óleo de palma
 - 2,78 g de AK imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 4,6%.
- Atividade enzimática = 923,47 U/mg
 Temperatura de 58 °C, agitação magnética, reator de 25mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)		
	24h	48h	72h
Láurico C12	0,17	0,01	0,20
Mirístico C14	0,94	0,16	0,79
Palmítico C16	26,22	27,47	24,51
Estearico C18	5,99	6,16	6,36
Oleico C18:1	21,13	21,70	22,42
Linoleico C 18:2	2,86	11,45	25,03
Total	54,45	55,50	54,28
Rendimento	97,51	99,38	97,20

15. Dados referentes aos ensaios de etanólise do óleo de palma utilizando reator com maior volume

Materiais:

- 25,81g de etanol
 - 25,4 g de óleo de palma
 - 11,34 g de AK imobilizada em POS PVA (massa seca), umidade 4,6%.
- Atividade enzimática = 927,29 U/mg
 Temperatura de 58 °C, agitação magnética, reator de 100mL.

Ácidos graxos	Ésteres de etila (m/m %)			
	4h	8h	12h	24h
Láurico C12	0,00	0,13	0,11	0,18
Mirístico C14	0,14	0,00	1,17	1,05
Palmítico C16	12,73	12,61	20,11	30,35
Estearico C18	0,00	0,00	4,81	0,10
Oleico C18:1	8,61	9,35	12,10	28,18
Linoleato C18:2	1,43	1,49	1,98	3,27
Total	21,48	22,09	38,30	59,77
Rendimento	39,15	40,26	69,80	100

16. Estudo reológico no monitoramento do experimento utilizando maior volume de meio reacional

Tempo 4h:

Viscosidade Absoluta (CP)	Velocidade (RPM)	Torque (%)	Tensão de cisalhamento (D/cm²)	Taxa de cisalhamento (1/seg)
5,95	40,00	52,90	12,00	154,00
5,96	45,00	59,00	13,58	172,80
5,98	50,00	65,00	14,78	192,00
5,98	60,00	76,50	17,53	240,51

Tempo de 8 h:

Viscosidade Absoluta (CP)	Velocidade (RPM)	Torque (%)	Tensão de cisalhamento (D/cm²)	Taxa de cisalhamento (1/seg)
5,87	40,00	51,90	11,96	153,60
5,89	45,00	58,00	13,36	172,80
5,89	50,00	64,00	14,74	192,00
5,90	60,00	75,50	17,39	230,40

Tempo de 12h:

Viscosidade Absoluta (CP)	Velocidade (RPM)	Torque (%)	Tensão de cisalhamento (D/cm²)	Taxa de cisalhamento (1/seg)
3,95	40,00	33,30	7,67	40,00
3,97	45,00	38,20	8,80	45,00
3,97	50,00	41,60	9,58	50,00
3,98	60,00	50,60	11,66	60,00

Tempo de 24h:

Viscosidade Absoluta (CP)	Velocidade (RPM)	Torque (%)	Tensão de cisalhamento (D/cm²)	Taxa de cisalhamento (1/seg)
3,53	40,00	38,40	8,84	153,60
3,51	45,00	43,50	10,02	172,80
3,48	50,00	48,20	11,10	192,00
3,47	60,00	57,90	13,33	230,40

17. Valores de viscosidades absolutas do produto final purificado (biodiesel), temperatura de 40 °C.

Viscosidade Absoluta (CP)	Velocidade (RPM)	Torque (%)	Tensão de cisalhamento (D/cm²)	Taxa de cisalhamento (1/seg)
3,42	30,00	28,10	6,47	115,20
3,43	35,00	33,30	7,67	134,40
3,47	40,00	38,50	8,87	153,60
3,48	45,00	43,40	10,00	172,80
3,49	50,00	48,20	11,10	192,00
3,49	60,00	57,80	13,31	230,40