



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**“IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Candida antarctica* B EM
QUITOSANA PARA OBTENÇÃO DE BIODIESEL POR
TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA”**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

AMÉRICO CRUZ JÚNIOR

Florianópolis, SC – 2007

**Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B em Quitosana para
Obtenção de Biodiesel por Transesterificação do Óleo de Mamona**

por

AMÉRICO CRUZ JÚNIOR

Dissertação julgada para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área e concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Agenor Furigo Junior, D.Sc.

Orientador

Prof. Agenor Furigo Junior, D.Sc.

Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química

Banca Examinadora:

Prof. Agenor Furigo Junior, D.Sc. (EQA-UFSC) – Presidente

Prof. Evilazio da Silva Andrade, D.Sc. – Membro Externo

Profa. Denise Esteves Moritz, Dr.Eng. – Membro Externo

Prof. Ayres Ferreira Morgado, D.Sc. – Membro Interno

Florianópolis, 18 de julho de 2007

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Agenor Furigo Júnior pela orientação, confiança, companheirismo, incentivo e pela grande amizade.

A grande amiga MSc. Sabrina Moro Villela Pacheco pela grande amizade, companheirismo, incentivo e pela ajuda nos experimentos.

A UFSC pela liberação parcial para realização do meu trabalho de mestrado.

Ao Prof. Dr. João de Deus Medeiros do Departamento de Botânica e ex-diretor do CCB-UFSC pelo incentivo e apoio durante a sua administração.

Ao Químico MSc. Ângelo Adolfo Ruzza - Departamento de Química – Central de Análises/UFSC, pela ajuda com a realização das análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H^1) e pela valorosa amizade e companheirismo.

Ao Químico MSc. João Renato Mendonça Strelau - Departamento de Química (Central de Análises/UFSC), pela ajuda na realização das Análises Espectroscópicas de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e pela valorosa amizade e companheirismo.

Ao amigo e Prof. Dr. Evilazio da Silva Andrade pela amizade e ajuda das interpretações das análises de RMN H^1 .

Aos Engenheiros de alimentos MSc. Franciello Vendruscolo e MSc. Bruno Mattar Carciofi pela amizade, companheirismo e auxílio nos experimentos de reologia.

Ao técnico administrativo Sandro Santos Souza, pelo incentivo, companheirismo e amizade.

Ao biólogo MSc. Jefferson Luiz Franco e ao Prof. Dr. Alcir Dafré do Laboratório de Defesas Celulares Antioxidantes do Sistema Nervoso Central – UFSC, pelo uso do espectrofotômetro e no auxílio com as análises de proteínas totais.

Ao amigo e Químico MSc. Francisco de Paula Moreira pela ajuda nas interpretações das análises de RMN H¹ e das interpretações das Análises Espectroscópicas de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e pela valorosa amizade e companheirismo.

Ao amigo e Engenheiro Químico MSc. Claudimir A. Carminatti pelo incentivo, pelo companheirismo e pela grande ajuda na estruturação do texto da dissertação.

Ao Secretário da Pós-Graduação em Engenharia Química/UFSC servidor Técnico-administrativo Edevilson Silva pelo incentivo pelo companheirismo e pela valorosa amizade.

Ao Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira/ URI- ERECHIM pela ajuda nas análises de Cromatografia Gasosa e pela valorosa amizade.

Ao Doutorando em Química Humberto Fajardo do LABOCATH/CFM- Departamento de Química-UFSC na ajuda e colaboração das análises de BET das esferas de quitosana imobilizadas e das microesferas de Lipase Novozym 435.

A ABOISSA Óleos Vegetais Ltda por ter gentilmente cedido o óleo de mamona.

A Novozymes Latin America Ltda–Araucária/PR–Brasil por ter gentilmente cedido as enzimas lipases.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica-ENGEBIO-EQA-UFSC, pela colaboração e incentivo.

E a todos, que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

DEDICATÓRIA

“A minha querida mãe Maria Madalena da Cruz (*in memorian*), por não estar aqui em vida, mas está a todo instante ao meu lado iluminando o meu caminho”.

“Ao meu querido irmão Wellington da Cruz (*in memorian*), grande pai e Prof. Dr. de Física Quântica. Muito obrigado meu querido irmão, aonde você estiver continue me incentivando”.

“Ao meu querido irmão Edmilson da Cruz (*in memorian*), pelo amor que tenho por você e que será eterno. Deus te ilumine”.

“Aos meus queridos filhos Carlos Henrique da Cruz e Bruno da Cruz”

“Ao meu querido pai Américo da Cruz pelo amor dedicado a nossa família, muito obrigado pelo incentivo nos momentos mais difíceis de minha vida.”

“Ao Criador por ter me dado essa “garra”, sede de viver, de conhecimento e também de ser um guerreiro”.

"Deus não joga dados".

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral.....	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Produção de Biodiesel por Catálise Homogênea/Heterogênea em Meio Alcalino ...	5
3.2. Transesterificação Enzimática de Óleos e Gorduras	6
3.3. A Enzima Lipase.....	6
3.3.1. Determinação da atividade enzimática frente a solventes.....	13
3.3.1.1. Efeitos dos solventes orgânicos.....	13
3.3.1.2. Influência da água	18
3.3.1.3. Estudos cinéticos	20
3.4. Métodos de Imobilização de Enzimas	23
3.5. Quitosana	24
3.5.1. Caracterização da quitosana.....	25
3.6. A Mamona e o Óleo de Mamona.....	26
3.6.1. Classificação botânica.....	27
3.6.2. Importância industrial	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Material Utilizado	31
4.2. Caracterização de Quitosana.....	31
4.2.1. Determinação do Grau de Desacetilação (GD).....	32

4.2.2. Determinação da massa molar média.....	32
4.2.3. Determinação da área superficial.....	34
4.2.4. Espectro de FT-IR.....	34
4.4. Funcionalização das Esferas de Quitosana com Glutaraldeído.....	36
4.5. Caracterização da Lipase Livre e Imobilizada.....	36
4.5.1. Determinação da atividade enzimática.....	36
4.5.2. Determinação do pH ótimo.....	37
4.5.3. Propriedades de termoestabilidade.....	38
4.5.4. Efeito do uso repetido sobre a atividade residual das enzimas imobilizadas... 38	
4.5.5. Efeito de vários solventes sobre a atividade residual da Lipase CALB L.....	39
4.6. Eficiência do Processo de Imobilização.....	39
4.7. Produção do Biodiesel a Partir do Óleo de Mamona.....	40
4.7.1. Síntese do biodiesel com a enzima CALB L imobilizada.....	40
4.7.2. Síntese do ricinoleato de etila com a enzima NOVOZYM 435.....	42
4.7.3. Análises de CG.....	43
4.7.4. Análises espectroscópicas de FT-IR.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1. Caracterização da Quitosana.....	44
5.1.1. Preparação das esferas de quitosana.....	44
5.1.2 Determinação do Grau de Desacetilação.....	44
5.1.3. Determinação da massa molar média.....	47
5.1.4. Determinação da Área de Superfície Específica.....	47
5.2. Funcionalização das Esferas de Quitosana com Glutaraldeído.....	51
5.2.1. Eficiência do processo de funcionalização das esferas de quitosana.....	51
5.2.2. Eficiência do processo de imobilização.....	56
5.5. Caracterização da Lipase.....	59
5.5.1. Determinação do pH ótimo para CALB L e Novozym 435.....	59
5.5.2. Determinação da temperatura ótima.....	59
5.5.3. Parâmetros cinéticos dos valores de K_M e V_M da Lipase CALB L.....	61
5.5.4. Efeito de vários solventes sobre a atividade da Lipase CALB L.....	61
5.6. Produção do Biodiesel a Partir do Óleo de Mamona.....	64
5.6.1. Síntese de biodiesel com a enzima CALB L imobilizada.....	65
5.6.2. Síntese do ricinoleato de etila com a enzima Novozym 435.....	66

5.6.3. Caracterização do biodiesel produzido com a CALB L imobilizada em esferas de Quitosana e Novozym 435	68
5.6.3.1. Análise de FT-IR do óleo de mamona e do ricinoleato de etila.....	71
5.6.3.2. Reologia do óleo de mamona e do biodiesel.....	73
5.6.3.3. Comportamento reológico do biodiesel	74
6. CONCLUSÕES	77
7. PROPOSTAS FUTURAS.....	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXOS	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Equação da reação de transesterificação de triacilglicerol com álcool com óleos vegetais /e ou gorduras animais.....	2
Figura 2 - Modelo em 3D da enzima lipase de <i>Candida antarctica</i> B.....	7
Figura 3 - Tríade catalítica ou Regra dos Três Pontos	9
Figura 4 - Mecanismo enzimático de lipase com álcool	22
Figura 5 - Métodos de imobilização de enzimas	24
Figura 6 - Estrutura química da quitosana.....	25
Figura 7 - Mamoneira.....	28
Figura 8 - Estrutura química do ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-9-octadecenóico). ...	30
Figura 9 - Estrutura química do componente principal do óleo de mamona.....	30
Figura 10 - Espectro de Infravermelho da quitosana em pastilha de KBr.....	35
Figura 11 - Confeção das esferas de quitosana por banho de precipitação.	36
Figura 12 - Reação de hidrólise enzimática do p-NPP.....	37
Figura 13 - Esferas de quitosana imobilizadas covalentemente com CALB L após reuso.....	39
Figura 14 - Reator tipo batelada com enzima imobilizada e temperatura controlada.	41
Figura 15 - Estrutura química do éster Ricinoleato de etila.	41
Figura 16 - Processo de separação do ricinoleato de etila em evaporador rotativo.	42
Figura 17 - Curva de titulação potenciométrica da solução de quitosana e ácido clorídrico (0,3 M).....	46
Figura 18 - Curva de viscosidade reduzida versus concentração da solução de quitosana.....	47
Figura 19 - (a) Isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K da quitosana; (b) Gráfico de BET da quitosana.	49
Figura 20 - (a) Gráfico da medida da área superficial BET da enzima lipase Novozym 435 e (b) Gráfico da isoterma da enzima lipase Novozym 435.....	50
Figura 21 - Influência da concentração de glutaraldeído na atividade enzimática residual e proteínas totais do sobrenadante.....	52

Figura 22 - Modificação da superfície das esferas de quitosana ativadas com soluções de diferentes porcentagens glutaraldeído em pH 9,0 e temperatura de 25 °C analisadas por MEV 10Kv 5.0 500X (a) 0% glutaraldeído; (b) 1% glutaraldeído; (c) 3% Glutaraldeído; (d) 5% glutaraldeído; (e) 7% glutaraldeído e (f) 9% glutaraldeído.....	54
Figura 23 - (a) Detalhe da superfície das esferas de quitosana com 3% glutaraldeído obtido através de MEV 100 Kv 5.0 20 X (b) Superfície das esferas de quitosana imobilizadas com lipase CALB L (c) Esferas de quitosana imobilizadas com CALB L com glutaraldeído 3% v/v.	55
Figura 24 - Ilustração esquemática das ligações cruzadas entre duas cadeias poliméricas de quitosana com o glutaraldeído.....	56
Figura 25 - Ilustração esquemática da enzima imobilizada sobre o suporte (esferas de quitosana) com auxílio do agente bifuncional (glutaraldeído)	57
Figura 26 - Mecanismo de ativação da quitosana com glutaraldeído através da formação do grupo imino pela reação entre os grupamentos amino da quitosana e os grupamentos carbonila do agente ativante.	58
Figura 27 - Atividade enzimática das enzimas CALB L (■) e Novozym 435 (□) após incubação de 10 minutos das mesmas à temperatura ambiente com tampões tartarato (pH 3,5 a 5), tampões fosfato (pH 6 a 8) e tampões tris-HCl (pH 9 e 10).....	59
Figura 28 - Atividade enzimática das enzimas Novozym 435 (●) e (□) CALB L após incubação de 30 minutos das mesmas com tampões fosfato pH 9,0 em diferentes temperaturas.	60
Figura 29 - Gráfico de Michaelis-Menten V-(velocidade de reação) versus S- (concentração de p-NPP) para a formação de composto que absorve a 410 nm, catalisada pela lipase CALB L.	61
Figura 30 - Estudo do comportamento da atividade enzimática frente a solventes polares com concentração do solvente (% v/v) ■ metanol ● etanol ▲ butanol versus Velocidade de reação enzimática à temperatura ambiente.....	62
Figura 31 - Estudo do comportamento da atividade enzimática frente a solventes apolares com concentração de solventes apolares % (v/v) à temperatura ambiente ■ n-hexano e ● n-heptano.	62
Figura 32 - Conversão de ésteres versus número de ciclos da CALB L imobilizada nas esferas de quitosana ativadas com solução de glutaraldeído 3% (v/v).....	66

Figura 33 - Conversão de ésteres versus número de ciclos da Novozym 435 imobilizada comercialmente em resina macroporosa.....	67
Figura 34 - Conversão de ésteres versus Números de ciclos da Novozym 435.....	67
Figura 35 - Espectro de RMN H1 do óleo de mamona referentes aos sinais de hidrogênios “glicéricos” entre 4,0-4,4 ppm.	69
Figura 36 - Espectro de RMN H1 de óleo de mamona.	70
Figura 37 - Espectro de RMN H ¹ de ricinoleato de etila (biodiesel) em 4,10 ppm, em forma de quarteto correspondente aos hidrogênios metilênicos ligados ao oxigênio do éster.	71
Figura 38 - Espectro de FT-IR onde se observa uma banda nítida e intensa na região de 1750-1450 cm ⁻¹ referente à frequência de estiramento do grupo carbonila (CO) característicos dos ésteres (biodiesel).....	72
Figura 39 - Espectro de FT-IR de uma banda de absorção nítida na região de 3417 cm ⁻¹ , referente à deformação axial do grupo O-H, característico do ácido ricinoleico, principal componente do biodiesel da mamona.....	73
Figura 40 - Determinação da viscosidade do óleo de mamona a 25°C e 35°C.....	75
Figura 41 - Comportamento reológico do biodiesel e do óleo de mamona a diferentes temperaturas.	76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção de biodiesel.....	7
Tabela 2 - Rendimentos dos ésteres (%) obtidos através da reação de transesterificação enzimática do óleo de girassol com e sem solvente.	11
Tabela 3 - Rendimentos dos ésteres (%) obtidos através da reação de transesterificação enzimática de triglicerídeos com álcoois primário e secundário.....	12
Tabela 4 - Log P de alguns solventes orgânicos.....	16
Tabela 5 - Algumas aplicações da quitosana.....	26
Tabela 6 - Aplicação industrial de derivados de óleo de mamona	29
Tabela 7 - Percentuais de ácidos graxos para o óleo de soja e mamona (Aboissa).....	29
Tabela 8 - Características físico-químicas do óleo de mamona.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
MM	Massa Molar
MM m	Massa Molar Média
K m	Constante de Michaelis-Menten
V $máx$	Velocidade máxima de uma reação enzimática
kDa	Unidade de massa molar
U	Unidade internacional de atividade enzimática
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
CG	Cromatografia em fase gasosa
GD	Grau de Desacetilação
BET	Brunauer, Emmett e Teller
[η]	Viscosidade intrínseca
RMN-H ¹	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GLUTAL	Glutaraldeído
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Abs	Absorbância
p-NNP	p-nitrofenilpalmitato

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal estudar a imobilização de lipase comercial (Lipozyme CALB L) em esferas de quitosana funcionalizadas com várias concentrações de glutaraldeído e avaliar a melhor concentração para posterior imobilização. Constatou-se que a concentração de 3% (v/v) foi a que proporcionou a enzima maior estabilidade e conferiu a mesma maior atividade residual. A atividade enzimática da CALB L também foi determinada em vários valores de pH (3,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0) e de temperaturas (30 a 100°C), onde foi possível observar que o melhor pH foi o valor de pH 9,0 tanto para a CALB L imobilizada covalentemente em esferas de quitosana e de Novozym 435 imobilizada em resina macroporosa. A temperatura que conferiu a CALB L e Novozym 435 maior atividade enzimática foi a de 90°C. A segunda etapa do trabalho envolveu o uso das enzimas caracterizadas na transesterificação enzimática do óleo de mamona comercial com álcool etílico 95°GL, onde foram realizados ensaios em que se avaliaram a reação com razão molar de 3:1 (álcool etílico: óleo de mamona), com 3% de enzima imobilizada, sem a presença de solvente orgânico, obtendo-se valores de conversão de ésteres etílicos superiores a 90%. Dessa forma, foi possível verificar que existe a viabilidade do uso de enzimas imobilizadas na produção de biodiesel de mamona sem o uso de solventes orgânicos derivados do petróleo.

Palavras-chaves: Lipase, biodiesel, transesterificação, imobilização, óleo de mamona.

ABSTRACT

This work had as main objective to study the commercial immobilization of lipase (Lipozyme CALB L) in spheres of chitosan with different glutaraldehyde concentrations and evaluate the best concentration for posterior immobilization. The results suggested that the concentration of 3% (v/v) was the one that afforded the highest enzyme stability and also conferred greater residual activity. The enzymatic activity of CALB L was also determined in different pH values (3.0; 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0 and 10.0) and temperatures (30 to 100°C), where was observed that the best pH value was 9.0, both for immobilized CALB L with crosslinking in chitosan spheres and immobilized Novozym 435 in macroporous resin. The temperature that conferred both CALB L and Novozym 435 the greater enzymatic activity was 100°C. The second phase of the work involved the use of enzymes characterized at the enzymatic transesterification of the commercial castor oil with ethylic alcohol 95°GL, where the assays had been carried out evaluating the reaction with molar ratio of 3:1 (alcohol: castor oil), with 3% of immobilized enzyme, at the absence of the organic solvent, obtaining values of ethylic esters conversion up to 90%. In this way, it was possible to verify the viability for the use of immobilized enzyme in the production of biodiesel from castor oil without the use of organic solvents derived from petroleum.

Keywords: Lipase, biodiesel, transesterification, immobilization, castor oil.

1. INTRODUÇÃO

O mundo está passando por um processo de conscientização ambiental, onde os processos industriais estão afetando a vida do planeta, principalmente o problema causado pela liberação de gases do efeito estufa CO_2 , CH_4 , NO_x e SO_x . As atividades industriais e antropogênicas estão aumentando a cada ano o aquecimento global, fazendo que toda biosfera sofra as conseqüências das mudanças climáticas. O setor petroquímico tem um papel crucial aos danos ao meio ambiente, pois toda a economia está voltada para a esse combustível fóssil, desde o transporte, a indústria do petróleo e petroquímica com a geração de resíduos, efluentes líquidos e gasosos recalcitrantes ao meio ambiente, bem como o consumo de combustíveis e o descarte de produtos não renováveis.

Desde o fórum ambiental Rio-92 que a preocupação com o meio ambiente vem alertando para que os países mais desenvolvidos façam ações para a diminuição de lançamento de gases que provocam o efeito estufa na atmosfera. Neste fórum foi ratificado o Protocolo de Quioto, que foi assinado por 93 países que vem tentando mobilizar a comunidade internacional para que promova uma ação conjunta com o objetivo de estabilizar na atmosfera a concentração dos gases causadores do efeito estufa e, assim, limitar a interferência do homem sobre o sistema climático global.

O uso de combustíveis derivados de biomassa, como o bioetanol e biodiesel, para fins energéticos pode minimizar o crescimento do efeito estufa. Estes biocombustíveis são renováveis ao contrário dos combustíveis fósseis, como o petróleo e o carvão mineral. O etanol já é uma realidade como biocombustível no Brasil, sendo usado em veículos tanto puro ou adicionado à gasolina e o biodiesel vem sendo bastante incentivado pelos órgãos governamentais.

O biodiesel, que é o sucedâneo do diesel, é definido pela “National Biodiesel Board” (EUA) como o derivado mono-alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores de ciclo diesel). A transesterificação de um óleo com monoálcoois (alcoólise), especificamente metanol ou etanol, promove a quebra da molécula dos triglicerídeos,

gerando mistura de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos correspondentes, liberando glicerina como subproduto (Figura 1). A massa molecular desses monoésteres é próximo ao do diesel derivado de petróleo.

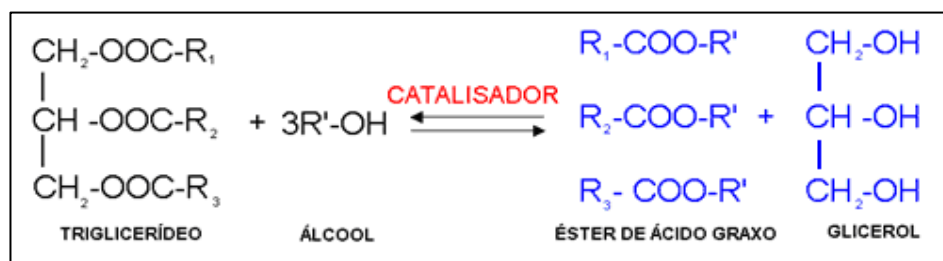


Figura 1 - Equação da reação de transesterificação de triacilglicerol com álcool com óleos vegetais /e ou gorduras animais.

Neste trabalho procurou-se investigar a síntese enzimática do ricinoleato de etila, a partir do óleo de mamona, sem a presença de solvente orgânico que normalmente é utilizado nesse tipo de reação. A escolha de não usar um solvente orgânico deu-se pelo fato da toxicidade associada a esses solventes, bem como por razões econômicas em processos industriais.

Pela sua constituição química muito peculiar, o óleo de mamona é muito miscível em álcool etílico devido à presença de grupos hidroxilas nas moléculas de triacilgliceróis constituintes desse óleo, situação esta que não acontece na maioria dos óleos vegetais. Este fato foi um fator determinante na escolha da síntese enzimática do biodiesel a partir do óleo de mamona.

O uso do etanol neste trabalho foi devido ser o mesmo de fácil obtenção, pois o etanol é um álcool produzido no Brasil em abundância e de baixo custo. O metanol por ser um álcool derivado do petróleo e bastante tóxico não foi usado neste trabalho.

A transesterificação do óleo de mamona para obtenção de biodiesel foi realizada com enzima lipase CALB L imobilizada em esferas de quitosana e de lipase Novozym 435, imobilizada em matriz polimérica tipo acrilato.

A utilização de lipases imobilizadas facilita o desenvolvimento de processos contínuos, em escala comercial, ao contrário de operações em pequena escala, que geralmente empregam enzimas livres. O uso de reatores com lipase imobilizada também

conduz a um decréscimo no potencial para a contaminação do produto com lipase residual. Isto permite a reutilização da lipase, resultando em processos mais econômicos. A imobilização geralmente aumenta a estabilidade térmica e química da lipase, podendo aumentar a resistência aos efeitos desnaturantes de vários solventes orgânicos, permitindo um melhor controle do processo e da qualidade do produto (MALCATA et al., 1990). Além disso, facilita a separação do biocatalisador do sistema de reação para posterior reutilização (ILLANES, 1994 e CASTRO, 1995).

A aplicação de enzimas imobilizadas como catalisadores de reações envolvendo triglicerídeos apresenta, desta forma, uma série de vantagens, tais como: maior estabilidade, necessidade de baixos teores de água e possibilidade de reutilização das enzimas em processos contínuos ou em batelada (NOVO NORDISK, 1992).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização.

Na literatura, inúmeros métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações. Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil.

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (NETO, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma rota alternativa de produção de biodiesel, a partir do óleo de mamona, através da alcoólise enzimática sem a presença de solventes hidrofóbicos, utilizando a lipase de *Candida antarctica* B, imobilizada em esferas de quitosana, e a lipase comercial Novozym 435.

2.2. Objetivos Específicos

- Promover a caracterização da quitosana utilizada para confeccionar as esferas para imobilização da enzima, avaliando os parâmetros como: massa molecular média, grau de desacetilação, área superficial e análise dos grupos funcionais;
- Caracterizar as esferas de quitosana ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído no que diz respeito às características de superfície utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Determinar a concentração de glutaraldeído necessária para promover a imobilização da enzima CALB L em esferas de quitosana.
- Promover a caracterização da enzima através da medida da atividade enzimática da mesma livre e imobilizada, frente a diferentes temperaturas e pH(s). Além disso, determinar os parâmetros cinéticos (K_M e V_M) em relação ao substrato p-nitrofenilpalmitato;
- Comparar o efeito do uso repetido sobre a atividade residual da enzima imobilizada;
- Sintetizar o ricinoleato de etila (componente majoritário do biodiesel de óleo de mamona), utilizando a enzima CALB L imobilizada em esferas de quitosana e comparando com a NOVOZYM 453.
- Promover a caracterização físico-química do biodiesel obtido com auxílio das técnicas de RMN- H^1 , análise Espectroscópica de FT-IR e CG (cromatografia em fase gasosa). Além disso, verificar as propriedades reológicas do óleo de mamona e do biodiesel.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção de Biodiesel por Catálise Homogênea/Heterogênea em Meio Alcalino

Os processos de obtenção de biodiesel comumente utilizados mundialmente são com óleos vegetais e gorduras animais por catálise homogênea em meio básico ou meio ácido com álcool metílico ou etílico, este processo é chamado de transesterificação ou alcoólise, sendo o metanol o mais utilizado por ter melhor rendimento na reação. No Brasil a melhor alternativa econômica, é o uso do etanol por ser um biocombustível já produzido em larga escala e utilizado na mistura na gasolina. O álcool terá uma importância crucial neste contexto, tanto no Brasil e mundialmente, pois é um combustível produzido por biomassa renovável e não derivado do petróleo.

Os processos catalíticos em meio básico ou ácido geram muitos problemas quanto aos equipamentos ocasionando sérios problemas de corrosão. Geram também efluentes líquidos, pois no processo além do éster como produto principal é também produzido o glicerol, que será separado posteriormente que terá um destino nobre na indústria farmacêutica e o catalisador básico ou ácido é separado por lavagens sucessivas para retirá-lo do meio reacional, ocasionando uma grande quantidade de efluentes líquidos. Para resolver este problema, é utilizado atualmente em processos de produção de biodiesel, catalisadores heterogêneos, cerca de 90% dos processos catalíticos são utilizados na indústria química com vantagens significativas: a) menor contaminação dos produtos; b) facilidade de separação do catalisador do meio reacional; c) possibilidade de reaproveitamento do catalisador; d) diminuição dos problemas de corrosão.

Outros processos estão reportados na literatura para produção de biodiesel e um destes é o da transesterificação utilizando fluidos supercríticos. Estes processos utilizam condições de temperatura à 350 °C e relação molar de 42:1 entre metanol e óleo, são requeridas pressões altíssimas de 45 MPa além de grandes quantidades de metanol (SAKA e KUSDIANA, 2001).

E a transesterificação enzimática que é o objetivo deste trabalho que utiliza lipases, está ficando mais atrativa pois o glicerol produzido como subproduto pode ser facilmente separado e recuperado para outros fins e o processo de purificação dos ésteres é mais simples. NELSON e colaboradores (1996) foram os primeiros a estudar a alcoólise enzimática de triglicerídeos com o objetivo de produzir biodiesel.

3.2. Transesterificação Enzimática de Óleos e Gorduras

Atualmente, o processo de obtenção comercial de biodiesel é realizado por via química, mas a enzimática tem despertado o interesse da comunidade científica. O aspecto comum desses estudos consiste na otimização das condições de reação, para estabelecer características que as tornam disponíveis para aplicações industriais. Entretanto, uma vez otimizado o processo enzimático, este poderá apresentar algumas vantagens em relação ao químico. A Tabela 1 apresenta as vantagens e desvantagens dos processos de obtenção de biodiesel por via química e enzimática.

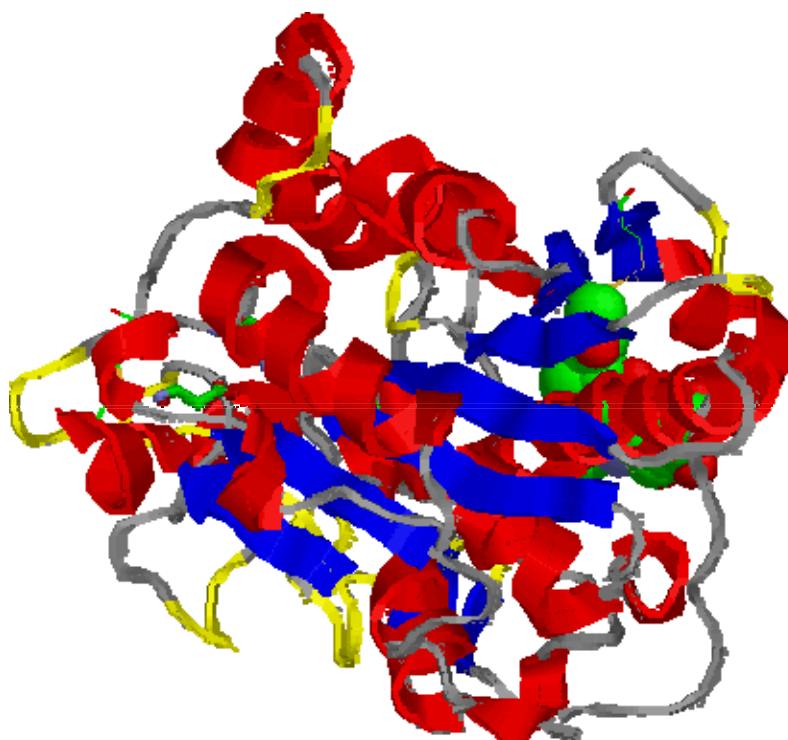
3.3. A Enzima Lipase

As lipases (triglicerol acil-hidrolases. EC 3.1.1.3) (Figura 2) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases. A diferenciação entre uma lipase e uma esterase (EC 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis.

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção de biodiesel.

Processos	Vantagens	Desvantagens
Químico	Simplicidade	Dificuldade de separação do catalisador.
	Alto rendimento	Impossibilidade de reutilização do catalisador.
	Curto tempo de reação	Dificuldade de utilização de etanol hidratado
Obtenção de produtos com menor grau de pureza		
Enzimático	Facilidade de separação do catalisador (suporte)	Longo tempo de reação

Fonte: COSTA, 2002.

**Figura 2** - Modelo em 3D da enzima lipase de *Candida antarctica* B (www.rcsb.org/pdb/home/home.do).

Entretanto, a diferenciação entre lipases e esterases ainda não está completamente definida. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética, que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo esses autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água.

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais como os fungos *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum sp*, por leveduras de *Torulopsis sp* e *Candida sp* e bactérias como *Pseudomonas sp*, *Achromobacter sp* e *Staphylococcus sp*. Do ponto de vista econômico e industrial, os microrganismos são preferíveis do que as lipases de fontes animais e plantas, devido ao alto custo do seu isolamento.

Entre as lipases, as de *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas glumae*, *Candida rugosa* (anteriormente denominada *Candida cylindracea*), *Candida antarctica*, *Chromobacterium viscosum*, lipase pancreática equina, lipase pancreática humana e lipase pancreática bovina têm sua estrutura determinada. A massa molecular destas enzimas varia de 20-75 kDa. Seu ponto isoelétrico varia em uma faixa de 3,6 e 7,6, sendo majoritariamente acídicas, com pI entre 4 e 5.

O sítio catalítico é formado pela tríade catalítico Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas e é frequentemente protegido na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid” que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases. Estudos de raios-X realizados por Uppenberg e colaboradores (1995) com a lipase da *Candida antarctica* revelou a existência de uma “tampa” similar recobrando a tríade catalítica Ser-His-Asp.

Recentemente, entretanto, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, sendo que as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B, que apresentam a “tampa” em suas estruturas, não sofrem ativação interfacial. Por outro lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a “tampa” e sendo assim não precisam da ativação interfacial para exercer a atividade hidrolítica. (ZANIN e MORAES, 2004).

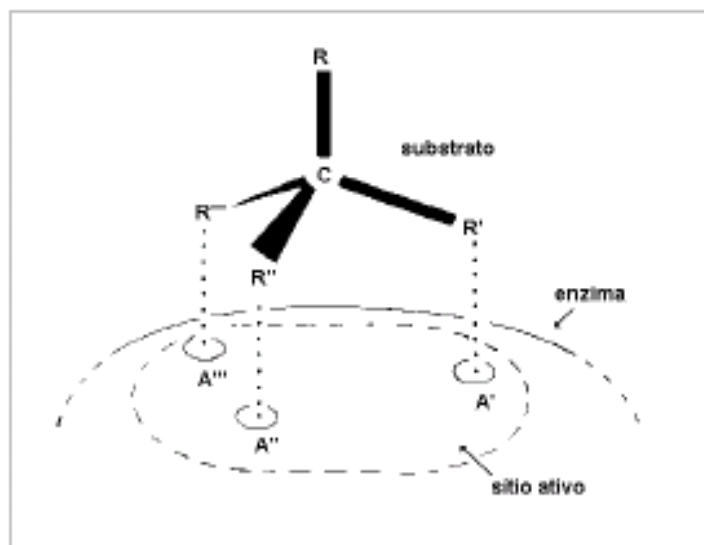


Figura 3 - Tríade catalítica ou Regra dos Três Pontos (COSTA, 2002).

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis neste meio, apresentam especificidade, regioselectividade, quimiosselectividade, e enantiosselectividade. Possuem a habilidade de catalisar reações de esterificação, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcóolise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade. O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional. As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, mais recentemente, para aplicações industriais.

Segundo BONN e PEREIRA, 1999, o potencial de aplicações das enzimas na indústria de óleos e gorduras ainda não está suficientemente difundido. As enzimas podem ser empregadas tanto para resolver problemas industriais, como para produzir novos tipos de óleos e gorduras. Embora a maior parte da produção destine-se ao setor alimentício, é crescente o interesse na obtenção de produtos químicos de maior valor agregado a partir dessas matérias-primas. As propriedades de uma gordura dependem dos ácidos graxos de óleos e gorduras são modificadas pela mistura com diferentes triglicerídeos naturais, ou por modificação química como a hidrogenação catalítica, ou ainda pelo rearranjo da molécula (interesterificação). Atualmente, as transformações de óleos e gorduras baseiam-se predominantemente em processos químicos convencionais. A obtenção de produtos derivados de óleos vegetais, a partir da modificação por interesterificação com lipases tem sido largamente estudada, e nesses trabalhos incluem-se dados de rendimentos, estudos cinéticos e estabilidade oxidativa.

FACIOLI e GONÇALVES (1998) reportaram a modificação de óleo de pequi por via enzimática. Nesse trabalho foi estudada a reação de interesterificação do óleo de polpa de pequi com ácido esteárico, utilizando a lipase específica 1,3 de *Mucor mihei* (Lipozyme). As condições ideais de interesterificação em micro-escala foram estabelecidas. Monoglicerídeos são largamente usados como emulsificantes pra produtos de padaria, e sua obtenção tem sido estudada através de lipases. A lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme) foi também usada por PECNIK e colaboradores (1992) para obtenção do glicerol 1,2-isopropilideno-3-oleil, a partir da condensação do glicerol com acetona, seguido de esterificação com ácido oléico.

A utilização de lipases para a remoção de gorduras aderidas a tripas de bovinos em abatedouro, com o propósito de limpeza, mostrou ser um processo simples, rápido e de baixo custo (BURIN e FONTOURA, 1994).

Embora os processos de transesterificação enzimática para obtenção de biodiesel, ainda não sejam comercialmente desenvolvidos, novos resultados têm sido reportados em artigos e patentes (SERCHEL e VARGAS, 1996). De um modo geral, estes estudos consistem na otimização das condições de reação (solvente, temperatura, pH, tipo de microrganismo que gera a enzima, etc), a fim de estabelecer as características para

aplicações industriais. Contudo, tanto o rendimento como o tempo de reação, ainda é desfavorável em comparação com o sistema por catálise básica.

A alcoólise do óleo de girassol com as lipases de *Pseudomonas fluorescens* (livre), *Mucor miehei* e *Candida sp*, foi investigada com o propósito de aperfeiçoar condições para obtenção de ésteres metílicos e etílicos (MITTELBAACH, 1990). Nesse estudo, foi verificada a eficiência da alcoólise com metanol, etanol, n-propanol, n-butanol e n-pentanol, em diferentes condições. Foi investigada a importância da presença do solvente e da adição de água na reação. O melhor rendimento (99%) foi obtido na reação de transesterificação com lipase de *Pseudomonas ssp* com etanol, a 45°C. Os demais resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Rendimentos dos ésteres (%) obtidos através da reação de transesterificação enzimática do óleo de girassol com e sem solvente.

	Álcoois	Lipase <i>fluorescens</i>	Lipase <i>Mucor miehei</i>	Lipase <i>Candida sp</i>
Com solvente	MeOH	79	25	53
	EtOH (96%)	99	82	79
	n-PrOH	81	80	29
Sem solvente	MeOH	3	-	-
	EtOH(anidro)	70	-	-
	EtOH(96%)	82	-	-
	n-ButOH	76	-	-

Fonte: MITTELBAACH, 1990.

Na alcoólise do óleo de girassol com etanol sem solvente, MITTELBAACH (1990) obteve o melhor rendimento (82%) com a lipase de *Pseudomonas sp*. A ausência de solvente foi considerada por facilitar aplicações técnicas, mas em função da viscosidade do óleo, foi necessária vigorosa agitação e um longo de tempo de reação (14 h).

A produção de biodiesel a partir de sebo bovino e de óleos de colza, oliva e soja foi investigada por NELSON e colaboradores (1996) utilizando as enzimas imobilizadas de *Mucor miehei* (Lipozyme) e *Candida antarctica* (SP-435), além das de *Geotrichum*

candidum, *Pseudomonas cepacia* e *Rhizopus delemar* na forma livre. A reação de transesterificação foi feita com álcoois de cadeias curtas, em hexano sob agitação constante, e os produtos foram analisados por cromatografia gasosa. A reação com metanol, etanol, propanol e isobutanol foi realizada por 5 horas, nas temperaturas entre 35^oC e 55^oC. Rendimentos acima de 90% foram obtidos com o sebo e todos os álcoois citados com a lipase de *Mucor miehei*. Além deste, os óleos de soja e colza apresentaram resultados satisfatórios conforme ilustrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Rendimentos dos ésteres (%) obtidos através da reação de transesterificação enzimática de triglicerídeos com álcoois primário e secundário.

	Álcoois	Lipase <i>M. miehei</i>	Lipase <i>C. antarctica</i>	Lipase <i>P. cepacia</i>
	MeOH	94,8	25,7	13,9
	EtOH (95%)	98,3	–	13,7
Sebo	EtOH (anidro)	68,0	–	–
	1-PrOH	24,3	61,2	44,1
	2-BuOH	19,6	83,8	41,0
Soja	MeOH	75,4	–	14,5
	EtOH	97,4	–	–
Colza	MeOH	77,3	–	–

Fonte: NELSON et al., 1996.

Lipases têm sido extensivamente utilizadas em tecnologia de triglicerídeos, sendo aplicadas, principalmente, na biotransformação de óleos e gorduras. Entre os processos mais promissores para a modificação de lipídios estão as reações de hidrólise, síntese de ésteres e interesterificação destes materiais na presença de lipases. A reação de hidrólise envolve ataque na ligação éster do triglicerídio na presença de moléculas de água para produzir glicerol e ácidos graxos. A reação de esterificação entre álcoois polihídricos e ácidos graxos livres é, em sua essência, a reação inversa da hidrólise do glicerídio correspondente. O termo interesterificação refere-se à troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise) ou um éster e outro éster (transesterificação). Nestas reações, o triglicerídio reage com um ácido graxo, um álcool

ou outro éster, resultando em um rearranjo dos grupos de ácidos graxos o triglicerídio de forma a produzir-se um novo triglicerídio. O rearranjo é o resultado de reações concorrentes de hidrólise e esterificação (OLIVEIRA, 1999). Estes ácidos obtidos a partir de álcoois e ácidos graxos possuem muitas aplicações e, aqueles obtidos a partir de ácidos de cadeia longa (12-20 átomos de carbono) e álcoois de cadeia curta (3-8 átomos de carbono) têm sido largamente utilizados em indústrias de alimentos, detergentes, cosméticas e farmacêuticas (CARTA et al., 1995). Para estas aplicações, ésteres naturais, tais como aqueles derivados do óleo de baleia, cera de carnaúba e óleo de jojoba vêm sendo utilizados. No entanto, esses óleos são caros e não estão disponíveis em grandes quantidades. Desta forma, é desejável desenvolver métodos para a produção de tais ésteres a partir de matérias-primas mais baratas e mais largamente disponíveis (MARTINEZ et al., 1998).

Estudos recentes têm mostrado a possibilidade de uso de um método alternativo para a produção de ésteres pelo uso de enzimas, tais como lipases, como catalisadores (ABRAMOWICZ, E KEESE, 1989; BARZANA et al., 1989; DORDICK, 1989; OLIVEIRA e ALVES, 2000).

3.3.1. Determinação da atividade enzimática frente a solventes

3.3.1.1. Efeitos dos solventes orgânicos

A catálise enzimática era considerada um processo viável somente em fase aquosa. No entanto, pesquisas recentes demonstraram que as enzimas podem ser ativas em solventes orgânicos, solventes gasosos e fluídos supercríticos (ILLANES, 1994).

O estudo de enzimas em meio orgânico evoluiu significativamente nos últimos vinte anos. Tais estudos começaram com a investigação do comportamento das enzimas em sistemas predominantemente aquosos contendo pequenas quantidades de solventes orgânicos miscíveis em água. Posteriormente, desenvolveram-se sistemas enzimáticos para misturas de duas fases (aquosa/orgânica) e, em seguida, em meio orgânico contendo uma fase aquosa dispersa (microemulsões). Atualmente, observa-se um grande número de aplicações utilizando suspensões enzimáticas em solventes orgânicos praticamente anidros (OLIVEIRA, 1999).

Uma das principais vantagens da catálise enzimática em meio orgânico é a possibilidade de efetuar reações que utilizam substratos pouco solúveis em água. Além disso, é possível deslocar o equilíbrio termodinâmico de reações que não ocorreriam em meio aquoso, através da extração dos substratos e/ou produtos para a fase aquosa e/ou orgânica ou através da diminuição da quantidade de água do meio reacional. Desta forma, reações como esterificação e a interesterificação tornam-se viáveis industrialmente. Segundo MONOT (1994), a catálise enzimática em meio orgânico apresenta como principais vantagens:

- Aumento da disponibilidade de substratos pouco solúveis em água;
- Deslocamento do equilíbrio das reações;
- Diminuição do número de reações indesejáveis;
- Simplicidade dos procedimentos de recuperação do produto e do biocatalisador;
- Controle da estereoseletividade das reações enzimáticas;
- Redução de eventuais inibições por substratos e produtos;
- Aumento da estabilidade da enzima.

Por outro lado, estes atualmente, que as enzimas são cataliticamente ativas em meio orgânico porque elas permanecem na sua conformação original. A incapacidade da proteína de se desdobrar em meio não aquoso deve-se em parte, ao fato das interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima serem aumentadas em solventes orgânicos, devido à baixa constante dielétrica da maioria dos solventes e também ao aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares. A integridade estrutural das proteínas em meio não aquoso tem sido verificada através de experimentos incluindo ressonância nuclear magnética do estado sólido e cristalografia de raios X (YANG e RUSSEL, 1996).

DOSSAT et al. (2002) analisaram a transesterificação realizada em sistemas usando solvente e sem solvente. Utilizaram como substratos o ácido oléico (óleo de girassol) e butanol e lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei*. Concluíram que no sistema livre de solvente somente 60 % do ácido oléico foi convertido em éster, já no sistema com n-hexano 95 % foi convertido.

A natureza do solvente orgânico é um fator importante a ser considerado na catálise enzimática em meio não aquoso, pois o solvente não apenas afeta a atividade e a estabilidade da enzima, como também modifica a sua especificidade.

Os solventes menos nocivos às enzimas são aqueles mais hidrofóbicos, pois interagem menos com a água necessária para o funcionamento da enzima.

Solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contêm maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar ligações de hidrogênio, tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática.

ZAKS e KLIBANOV (1985) constataram que as enzimas suspensas em solventes hidrofóbicos requerem uma quantidade de água substancialmente menor para obtenção de sua atividade máxima quando comparados àquelas suspensas em solventes hidrofílicos. De acordo com resultados experimentais, pôde-se concluir que a atividade enzimática em meio orgânico é primeiramente influenciada, não pelas interações do solvente com a enzima propriamente dita, mas pelas interações com a água ligada à enzima. Para uma dada quantidade de água presente no solvente, a atividade enzimática nos solventes hidrofóbicos é muito maior que nos seus correspondentes hidrofílicos (KLIBANOV, 1997).

Os critérios para a determinação da hidrofobicidade de um solvente estão sujeitos a controvérsias. Os mais importantes indicadores de hidrofobicidade são: o parâmetro de Hildebrand (δ), a constante dielétrica (Σ), o momento dipolar (μ) e o coeficiente de partição (P) (ILLANES, 1994). A melhor classificação proposta foi baseada no $\log P$, sendo P o coeficiente de partição do solvente em uma mistura octanol/água. O coeficiente de partição (P) de um composto é usualmente como a razão entre as suas concentrações na fase orgânica e aquosa. Para obter elevadas concentrações de produto é essencial utilizar um solvente orgânico no qual o coeficiente de partição do produto seja alto. Isto implica em uma eficiente extração do produto para a fase orgânica, o que produz uma conversão mais elevada. Os solventes mais adequados são os que apresentam $\log P$ maior que 2. Segundo CARTA et al.,(1995), a biocatálise de reações de síntese, tais como esterificações, é geralmente considerada possível em solventes imiscíveis em água que apresentam $\log P$ maior que 4. Exemplos de $\log P$ de alguns solventes orgânicos estão ilustrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Log P de alguns solventes orgânicos.

SOLVENTE	Log P	SOLVENTE	Log P
Triglima	-1,9	Clorofórmio	2,0
Diglima	-1,3	2-4-dimetil-3-pentanol	2,3
N-N-Dimetilformamida	-1,0	3-etil-3-pentanol	2,3
Monoglima	-0,75	2-metil-2-hexanol	2,3
4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	-0,34	Tolueno	2,5
Acetonitrila	-0,33	Trifluorotricloroetano	2,8
Acetona	-0,23	Butiléter	2,9
1-metil-2-pirrolidona	-0,20	2,6-dimetil-4-heptanol	3,4
2-butanona	0,28	Hexano	3,5
Diclorometano	0,60	Pentiléter	3,9
2-metil-2-propanol	0,79	Isoamiléter	4,0
2-pentanona	0,80	1-octeno	4,2
3-pentanona	0,80	Feniléter	4,3
Etiléter	0,85	Isooctano	4,5
1,2-dicloetano	1,2	1-noneno	4,7
2-metil-butanol	1,3	Hexiléter	5,0
4-metil-2-pentanona	1,3	Nonano	5,1
Tert-butilmetiléter	1,4	Decano	5,6
2-metil-2-pentanol	1,8	1-dodecano	6,2
3-metil-3-pentanol	1,8	Dodecano	6,6
Isopropiléter	1,9		

Fonte: JANSSEN et al., 1993.

Contudo, esta classificação não pode ser aplicada para todas as enzimas, tendo em vista que ela não considera as interações específicas entre a enzima e o solvente, que são da constante dielétrica do solvente. Admite-se que a diminuição da constante dielétrica do solvente permite o aumento das interações eletrostáticas entre os resíduos ionizáveis da molécula de enzima, o que pode causar uma redução da flexibilidade interna da proteína. Considerando que a mobilidade molecular é essencial para a atividade catalítica da enzima, uma redução na sua flexibilidade é normalmente acompanhada por uma diminuição da atividade enzimática. A modificação do valor da constante dielétrica também altera o valor de pKa dos resíduos ionizáveis da superfície da proteína. Se essa modificação ocorrer no

sítio ativo ou próximo a ele, pode haver a alteração da ligação e/ou da conversão dos substratos e, quando a mudança na constante dielétrica é drástica, a estrutura tridimensional da enzima pode ser afetada. É importante ressaltar que a adição de substratos e a formação de produtos ao longo da reação podem modificar a hidrofobicidade do meio e, conseqüentemente, o teor de água ao redor da enzima (MONOT, 1994).

Além do efeito dos solventes na atividade, na estabilidade e na especificidade da enzima ou nas suas relações com a água, deve-se também considerar o efeito do solvente na constante de equilíbrio das reações. A condição de equilíbrio será determinada pelas interações entre os reagentes, os produtos e o solvente; a natureza e o comportamento de qualquer catalisador influenciarão apenas a velocidade com que o sistema atinge o equilíbrio (HALLING, 1990-a).

É possível prever o efeito do solvente sobre o equilíbrio utilizando dados sobre a distribuição dos componentes nas fases do sistema líquido-líquido (HALLING, 190-b). Em um sistema bifásico, substratos e produtos irão se dividir entre as duas fases (aquosa-orgânica).

JANSSEN (1993) estudou a esterificação do glicerol e ácido decanóico em vários solventes, incluindo hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, éteres, cetonas, aldeídos, álcoois terciários e hidrocarboretos halogenados.

KUO e PARKIN (1996) também observaram que a predominância do produto formado em misturas de reação de multiprodutos, como na reação entre o glicerol e o ácido undecanóico, está relacionada com a similaridade da polaridade do solvente usado. Assim sendo, a produção de monoglicéridos ($\log P = 2,5$) é favorecida em meio polar, enquanto que a de triglicérideo ($\log P = 13,7$) em meio apolar.

No entanto, segundo JANSSEN (1993), $\log P$ não é o único parâmetro que controla a distribuição do produto. A solubilidade da água no solvente também é um parâmetro útil para a seleção do solvente. Como a solubilidade não era conhecida para todos os solventes utilizados, os autores a estimaram através do método de contribuição de grupos UNIFAC, que calcula os coeficientes de atividade nas duas fases. Observou-se, então, que há uma razoável correlação entre o $\log P$ e a solubilidade da água no solvente. A adição de um solvente polar (solvente com uma alta solubilidade em água) resultou em uma elevada

concentração de monoacilglicerol, enquanto que solventes apolares apresentaram maiores frações molares dos di e triglicerídios.

O estudo da catálise em meio orgânico evidenciou que a quantidade de água realmente necessária para propiciar a atividade enzimática é muito pequena. Portanto, a existência de uma fase aquosa definida, mesmo que em pequena proporção, não é um pré-requisito para a eficiência da catálise. Sendo assim, seria tecnologicamente mais atrativo dispensar o uso de solventes orgânicos e realizar a reação enzimática apenas com a mistura de substratos (óleo vegetal e álcool). Esta possibilidade, se viável, combina a precisão da catálise biológica com os altos níveis de produtividade alcançados nos melhores métodos convencionais. Entre algumas das vantagens deste sistema pode-se citar: evita problemas de separação, de toxicidade e de inflamabilidade dos solventes orgânicos, diminui os custos inicial do produto e permite a recuperação do produto sem as etapas de purificação ou evaporação e a utilização dos substratos em altas concentrações (SELMI et al., 1997). Geralmente, pode-se prever algumas dificuldades imediatas para implementação de um sistema livre de solvente: minimização da resistência a transferência de massa, homogeneidade do meio reacional, pois a mistura reacional deve ser e permanecer líquida durante o curso do processo e deve estar presente uma ação que desloque o equilíbrio no sentido do término da reação.

3.3.1.2. Influência da água

Um fato bem estabelecido em todos os estudos sobre utilização de enzimas em meio orgânico é que a quantidade de água ligada à enzima é o fator determinante para a expressão de suas propriedades, como por exemplo, a atividade, a estabilidade e a especificidade. Embora a atividade de água em um sistema enzimático típico em meio orgânico seja muito baixa (em torno de 0,01% p/v), pequenas variações no conteúdo de água podem provocar grandes modificações na atividade enzimática. As enzimas são praticamente inativas em sistemas completamente anidros. A água, quando adicionada a estes sistemas, distribui-se entre o solvente e a enzima. A atividade enzimática é dependente da quantidade de água associada à enzima e em menor grau ao conteúdo total de água existente no sistema. Contanto que uma quantidade mínima essencial esteja ligada à enzima, sua atividade é mantida.

Admite-se que a enzima requer uma pequena camada de água, que atua como componente primário do microambiente da mesma, atuando como um tampão entre a superfície da enzima e o seio reacional. Assim sendo, a biocatálise em fase orgânica é possível, desde que se conserve esta pequena quantidade de água indispensável à enzima. A quantidade de água requerida para a catálise orgânica depende da enzima utilizada. Segundo ILLANES (1994), cada enzima em particular deve ser examinada a vários níveis de hidratação em solventes orgânicos e é muito provável que enzimas que não exibiram atividade em determinado solvente, tenham sido empregadas em níveis sub-ótimos de hidratação.

A adição de água a preparações enzimáticas sólidas em solventes orgânicos pode aumentar a atividade enzimática através do aumento da polaridade e da flexibilidade do sítio ativo da enzima. No entanto, excesso de água facilita a agregação da enzima e pode provocar um decréscimo de sua atividade. O mecanismo de agregação da enzima, induzido pela água, em solvente orgânico, ainda não está totalmente esclarecido; acredita-se que a formação de ligações dissulfeto intermoleculares seja uma das causas deste processo. A quantidade de água necessária para a manutenção da estrutura enzimática varia com a natureza da enzima (YANG e RUSSEL, 1996).

As propriedades físico-químicas exibidas por uma enzima estão relacionadas direta ou indiretamente ao papel da água nas interações não covalentes (eletrostáticas, pontes de hidrogênio, van der Waals e hidrofóbicas), as quais ajudam a manter a conformação cataliticamente ativa da enzima (ILLANES, 1994).

A hidratação dos grupos carregados e polares das moléculas de enzima parece ser um pré-requisito para a catálise enzimática. É possível que na ausência de água, esses grupos interajam produzindo uma conformação estrutural inativa. A função da água na manutenção da atividade enzimática em meio não aquoso parece estar relacionada com a sua capacidade de formar ligações de hidrogênio com esses grupos funcionais, protegendo, portanto, dielectricamente as interações eletrostáticas entre os grupos ionizados e neutralizando as interações dipolo-dipolo entre unidades peptídicas e grupos vizinhos polares da proteína (LANGONE, 1998).

As interações eletrostáticas como pontes salinas e interações dipolo-dipolo, podem ser preponderantes no controle do comportamento catalítico das enzimas em solvente orgânico. Essa hipótese é sustentada pela verificação do aumento da atividade enzimática após a adição de várias substâncias formadoras de ligações de hidrogênio, tais como glicerol, etileno glicol e formamida, ao solvente. Foi constatado que solventes contendo poliálcoois, diminuem a tendência de ruptura das ligações de hidrogênio, que desempenham um importante papel na manutenção da estrutura terciária da lipase (MALCATA et al., 1990). Neste contexto, vários estudos visando a estabilização de lipases através da adição de glicerol são encontrados na literatura. Sais de cálcio também têm sido empregados na estabilização de várias lipases, devido a sua capacidade de formar ligações iônicas com dois resíduos diferentes de aminoácidos da cadeia protéica. A maior desvantagem na adição de sais de cálcio ao meio reacional é a formação de sabões insolúveis com os ácidos graxos livres.

É previsível que a estabilidade da proteína em ambiente não aquoso deva ser sensivelmente diferente daquela em água. Desde que as moléculas de água que circundam uma enzima em solução aquosa contribuem para as principais forças intermoleculares que estabilizam a conformação terciária, incluindo interações do tipo Van der Waals, pontes salinas e ligações de hidrogênio, a remoção dessa água pode alterar a estabilidade da enzima.

3.3.1.3. Estudos cinéticos

O estudo cinético de reações catalisadas por lipases é dificultado pela não afinidade entre o substrato e a fase aquosa. Normalmente, uma emulsão do substrato em uma fase aquosa contínua é utilizada e, alguns fatores irão afetar as propriedades interfaciais, influenciando as constantes cinéticas encontradas. A análise de uma cinética enzimática, geralmente, é realizada para a enzima e os substratos dissolvidos de forma homogênea. No caso das reações catalisadas por lipases este tratamento deve considerar a interação entre a enzima e o substrato insolúvel na interface. A concentração efetiva de substrato é difícil de ser determinada, pois somente aquelas moléculas que estão na interface estão disponíveis para a enzima (OLIVEIRA, 1999).

STAMATIS e colaboradores (1993), estudando a cinética da reação de esterificação entre ácido láurico e (-) mentol catalisada por lipase de *Penicillium simplicissimum* em um sistema de micela reversa formado por AOT/isooctano, propuseram o mecanismo cinético do tipo *Ping-Pong bi-bi*, sendo que os parâmetros cinéticos obtidos são aparentes visto que a determinação de parâmetros cinéticos verdadeiros deve levar em consideração a concentração real dos substratos.

CHULALAKSANANUKUL e colaboradores (1993) estudaram o mecanismo cinético da reação de esterificação catalisada por lipase de *Mucor miehei* imobilizada em resina aniônica (lipozyme IM) tendo o ácido oléico e etanol como substratos e hexano como solvente. Os autores propuseram também o mecanismo *Ping-pong bi-bi*, mas com inibição por excesso de etanol (CYGLER et al., 1994) (Figura 4).

Na Figura 4 está representado o mecanismo geral de reações de transesterificação via enzimática de lipases de um álcool e um éster, que pode ser um triglicerídeo. Observa-se a formação de dois estados de transição diferentes no rearranjo das ligações que ocorrem durante o processo catalítico: Na etapa (a), em efeito cooperativo, os resíduos de aminoácidos do centro ativo da lipase polarizam o doador acila, formando o intermediário tetraédrico (b), o qual é o primeiro estado de transição gerado durante a transformação do complexo de Michaelis-Menten entre a enzima e o doador acila em uma espécie intermediária denominada acil-enzima (c). Na etapa (d), o complexo acil-enzima é clivado pelo álcool R_3OH , originando o segundo estado de transição (e), a partir do qual se forma outro éster como produto (f), enquanto o sítio ativo é regenerado. Nos dois estados de transição, a carga negativa gerada sobre o oxigênio após o ataque nucleofílico é estabilizada através de ligação de hidrogênio pelos resíduos do centro ativo que formam o bolsão de oxianion na lipase.

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis neste meio, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Possuem a habilidade de catalisar reações de esterificações, transesterificação (acidólise, interesterificação e alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade. O deslocamento do equilíbrio na reação, no

sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional. As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, mais recentemente, para aplicações industriais.

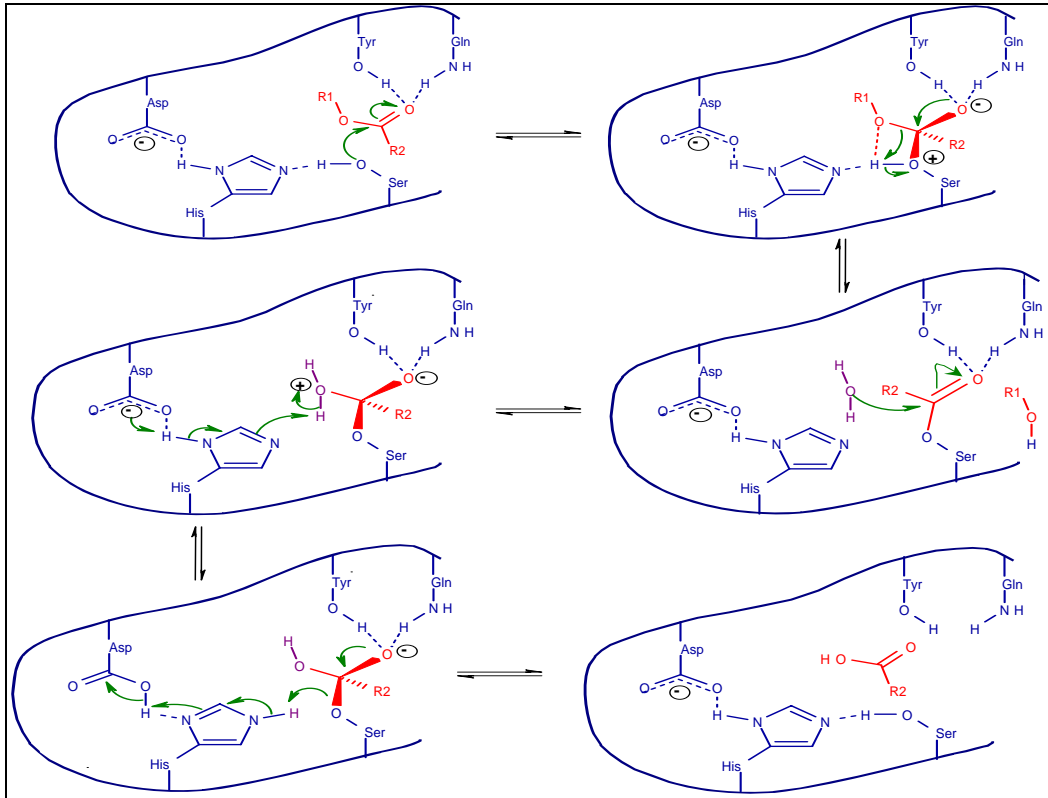


Figura 4 - Mecanismo enzimático de lipase com álcool (CYGLER et al., 1994).

Nos últimos anos, com o intuito de aumentar a atividade catalítica de lipases, foram apresentados na literatura vários procedimentos de imobilização ou modificações na estrutura nativa, sendo que estes processos envolvem diferentes graus de complexidade e eficiência.

Os métodos de imobilização requerem uma interação fraca ou a formação de ligações covalentes entre a lipase e o suporte. A engenharia genética de lipases envolve a modificação do gene que codifica para enzima. Esta tecnologia inclui a habilidade de isolar e expressar os genes de interesse e modificar algum aminoácido que ocupe um sítio importante para atividade catalítica da enzima.

3.4. Métodos de Imobilização de Enzimas

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitarem a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros.

Na literatura, inúmeros métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações. Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil.

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica. A Figura 5 ilustra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas.

O aumento do uso de biocatalisadores vem ocorrendo devido às suas propriedades favoráveis de reação tais como condições amenas e ambientalmente compatíveis e sua alta especificidade, tem resultado num aumento do uso de enzimas imobilizadas. Essas propriedades ocorrem devido a interações entre o suporte e a enzima, podendo alterar favoravelmente as propriedades físicas e químicas da enzima e, geralmente, uma nova propriedade é gerada, que pode ser explorada para propostas industriais (BASRI et al., 1996).

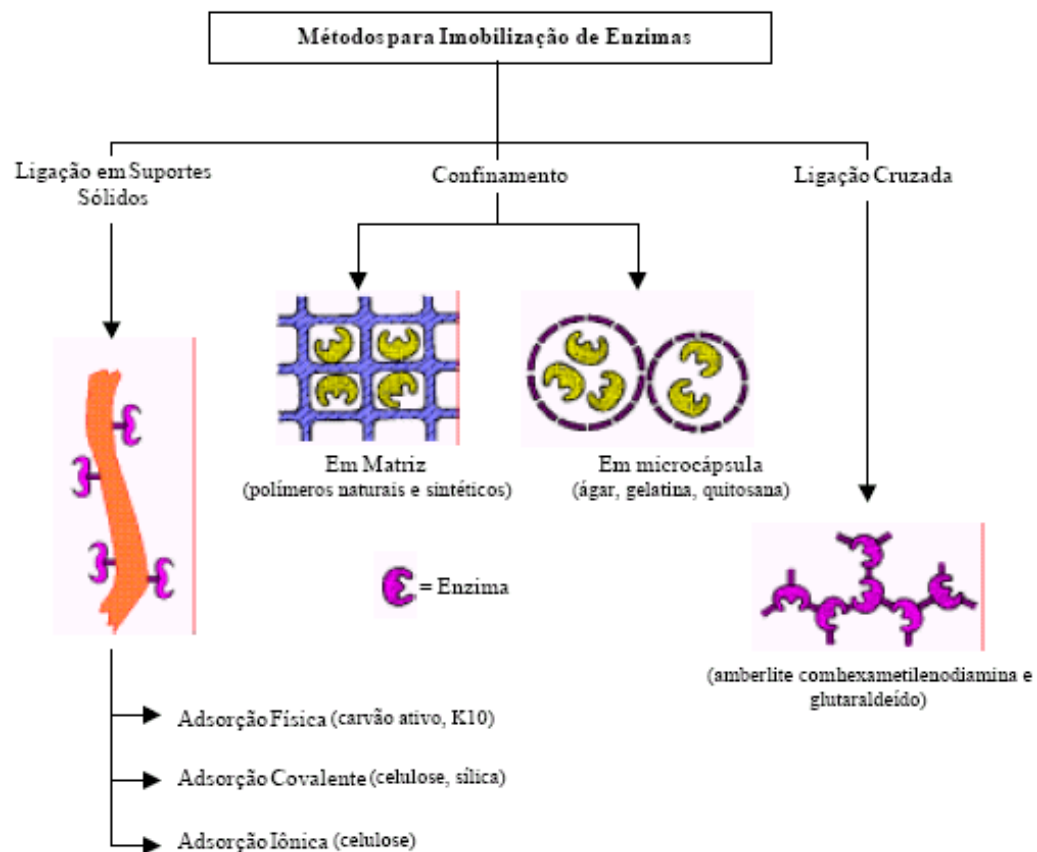


Figura 5 - Métodos de imobilização de enzimas (COSTA, 2002).

3.5. Quitosana

A quitina é um polissacarídeo extremamente abundante na natureza, perdendo somente para a celulose em disponibilidade. Pode ser encontrada em diversos organismos como em insetos e crustáceos, sendo o principal constituinte das cascas de camarão e das carapaças de caranguejo. A quitosana também é um polissacarídeo que ocorre naturalmente em alguns fungos, mas que geralmente é obtido pela desacetilação da quitina, uma reação que pode ser executada em diferentes condições empregando diferentes álcalis. Entretanto, a execução da reação de desacetilação de quitina em temperaturas elevadas e empregando soluções de NaOH é o mais usual para a obtenção de quitosana (CAMPANA E DESBRIÈRES, 2000).

A quitosana pode ser definida como um copolímero de 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, de composição variável em função do grau residual de acetilação, cujas

unidades também estão unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) (Figura 6). O termo quitosana é usado para identificar 60% de unidades desacetiladas, enquanto a quitina corresponde a produtos muito mais acetilados. Como consequência de seus diferentes conteúdos de unidades acetiladas, quitina e quitosana possuem diferentes graus de solubilidade, sendo que ambas são insolúveis em água.

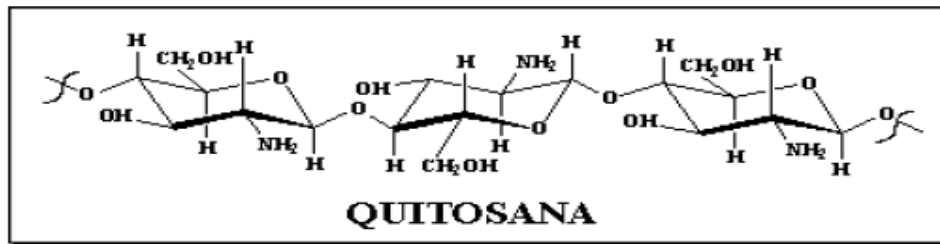


Figura 6 - Estrutura química da quitosana.

3.5.1. Caracterização da quitosana

A produção industrial e o uso de quitina e seus derivados, principalmente a quitosana, encontra-se em constante crescimento. Os principais fatores para este interesse podem ser atribuídos a: i) abundância de matéria-prima; ii) possibilidade de utilização de rejeitos fartos e de baixo custo oriundos da indústria pesqueira e iii) volume de pesquisas confirmando e ampliando continuamente o potencial de aplicação desses materiais. A Tabela 5 exemplifica de forma sucinta algumas áreas nas quais a quitosana têm sido aplicada, sendo a medicina e biotecnologia os campos mais investigados.

A quitosana pode ser aplicada em muitas áreas sendo que a versatilidade desse polímero se deve as suas características físicas, químicas e biológicas tais como: habilidade de quelar metais, resistência de tensão, capacidade para formar filmes e atividade bactericida (THARANATHAN; KITHUR, 2003, MATHUR; NARANG, 1990). Essas características são fortemente influenciadas pelo grau de desacetilação (GD), massa molar média (MMm) e área específica, o que justifica a análise desses parâmetros.

Tabela 5 - Algumas aplicações da quitosana.

Aplicações	Exemplos
Tratamento de água	Na remoção de íons metálicos através da quelação; como agente floculante para a eliminação de substâncias como proteínas, corantes e herbicidas; clarificação e filtração a partir de membranas a base de quitosana.
Polpa de Papel	No tratamento de superfícies celulósicas com a finalidade de aumentar a dureza sem alteração do brilho; na obtenção de papel isolante resistente ao envelhecimento; no uso em papel fotográfico para elevar as propriedades antiestáticas.
Medicina e biotecnologia	Em formulações contendo quitosana contra o colesterol; no combate de células cancerígenas, como no tratamento da leucemia; na preparação de lentes de contato; na produção de membranas para diálise; Como agente anticoagulante sanguíneo; na produção de curativos inteligentes e na fabricação de microesferas para liberação controlada de drogas.
Cosméticos	Na remoção de sobras de goma em xampu; em cremes de limpeza e demais compostos de tratamentos de pele e cabelo.
Agricultura e processamento de alimentos	No tratamento na superfície da semente para a inibição de fungos; na remoção de corantes em sucos cítricos; na remoção de sólidos, β -caroteno e substâncias ácidas de sucos de maçã e de cenoura; na clarificação de vinhos e em coberturas comestíveis protetoras para frutos.

Fonte: SANDFORD, 1998, LARANJEIRA, 1995; JAMELA, 1995; GRUPTA, 2000; ASSIS et al., 2003.

3.6. A Mamona e o Óleo de Mamona

A mamona é uma euphorbiácea, cuja origem é dada ora asiática, ora como africana e, até mesmo, como planta nativa da América. De qualquer forma, menção dela é feita desde a mais remota antiguidade, pois segundo autores clássicos já era conhecida à época dos antigos egípcios que a apreciavam como planta milagrosa, sendo igualmente utilizada na Índia desde os tempos imemoriais para os mais diversos fins. No Brasil a mamona é

conhecida desde a era colonial quando dela se extraía o óleo para lubrificar as engrenagens e os mancais dos inúmeros engenhos de cana.

3.6.1. Classificação botânica

A mamoeira, cientificamente denominada *Ricinus comunis* L., é uma planta da família das euphorbiáceas. No Brasil, conhece-se a mamona sob as denominações de mamoneira, rícino, carrapateira e palma-criste; na Inglaterra e Estados Unidos, pelo nome de ‘‘castor beans’’ e ‘‘castor seed’’.

3.6.2. Importância industrial

A cultura da mamoneira reveste-se de importância pelas várias aplicações que seu óleo encontra no mundo moderno.

O óleo é empregado, depois de desidratado, como óleo secativo na fabricação de tintas e protetores e isolantes.

Serve como lubrificante, na aeronáutica, sendo o melhor óleo na lubrificação de motores a jato, e como fluido nas instalações hidráulicas. É usado também como base na manufatura da maioria dos cosméticos e de muitos tipos de drogas farmacêuticas. O óleo de mamona é utilizado em vários processos como a fabricação de corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, óleos lubrificantes de baixa temperatura, colas e aderentes em geral; para a manufatura de fungicidas, inseticidas (como base), tintas de impressão e escrever e tintas e vernizes. Uma das aplicações de grande valor econômico do óleo de mamona é na fabricação de nylon e matéria plástica onde seu emprego é importantíssimo. Na fabricação de espumas plásticas o óleo de mamona confere ao material e texturas variáveis desde a macia e esponjosa até a dura e rígida.

As fábricas de óleo de mamona atualmente industrializam toda a produção, obtendo-se o óleo de mamona como produto principal e como subproduto a torta de mamona, de grande capacidade de restauração das terras esgotadas.

Em vista das inúmeras aplicações do óleo de mamona, o seu consumo interno aumentou consideravelmente nestes últimos anos, daí a necessidade de aumento da área de plantio, e consolidar e consolidar o maior produtor mundial de mamona. A consecução

desse objetivo destaca-se as medidas à produção agrícola, principalmente pelos métodos racionais de cultivo, e evolução técnica pelo maior emprego de máquinas e plantio de variedades produtivas e de melhor rendimento em óleo (OGUNNIYI et al., 2006).

A distribuição geográfica da mamoneira é extensa, sendo encontrada em estado espontâneo ou cultivada, em quase todas as zonas tropicais e subtropicais do mundo.

Os principais produtores de mamona são: Brasil e a Índia, sendo esta, produtora milenar da oleaginosa, absorvendo no seu consumo interno 50% da produção.



Figura 7 - Mamoneira (Produção Agroecologia Mamona, 2006).

Tabela 6 - Aplicação industrial de derivados de óleo de mamona (www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Mamona/Mamona.htm)

Sítio de Reação Química	Derivado	Aplicação
Ligação Éster	Metilricinoleato	Nylon-11(Fios, Tubos, Indústria Automobilística, Aeronáutica.)
Dupla Ligação	Óleo Hidrogenado	Ceras, lubrificantes, Cosméticos, Plásticos.
	Óleo Oxidado	Plasticizante, Protetores, Tintas, Adesivos.
	Óleo Desidratado	Secativo
	Óleo Sulfonado	Indústria Têxtil
	Ácido Sebácico	Lubrificantes, Nylon 6 -10
Grupo Hidroxila	Óleo Etoxilado	Cosméticos, Detergentes, Lubrificantes de Superfície, Óleo de Corte, Fluido Hidráulico, Indústria Têxtil.
	Poliuretanos	Telecomunicações, Materiais Elétricos, Produtos Biomédicos, Filtros Industriais.
	Transesterificação	Biodiesel

Tabela 7 - Percentuais de ácidos graxos para o óleo de soja e mamona (Aboissa)

Ácidos Graxos	Composição (%m/m)	
	Óleo de Soja	Óleo de mamona
Palmítico	11,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2
Esteárico	3,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2
Oléico	23,6 ± 0,1	3,5 ± 0,2
Linoléico	54,7 ± 0,1	4,9 ± 0,2
Linolênico	6,9 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Ricínoléico	—	88,9 ± 1,4

Fonte: SCHNEIDER, 2003.



Figura 8 - Estrutura química do ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi-9-octadecenóico).

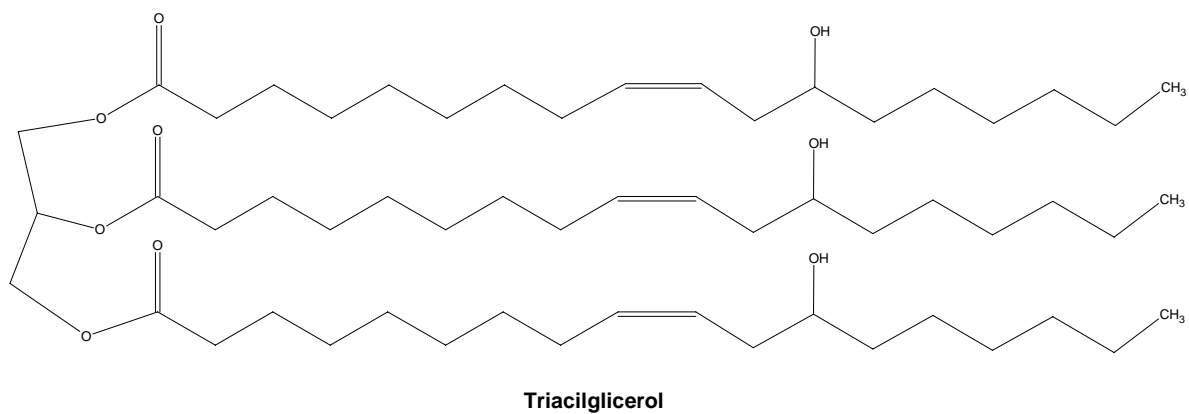


Figura 9 - Estrutura química do componente principal do óleo de mamona.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Utilizado

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados os seguintes reagentes:

- Lipase Lipozyme CALB L
- Lipase Novozym 435
- Glutaraldeído 25% P.A. - Vetec
- Óleo de Mamona comercial
- p-NPP (p-nitrofenil palmitato) -Sigma
- Metil palmitato P.A. – Sigma
- Ricinoleato de etila P.A-Sigma
- Hidróxido de Sódio P.A. – Nuclear
- Bicarbonato de Sódio P.A.- Nuclear
- Álcool etílico 95 GL P.A. – Nuclear
- Tampão Tartarato (pH 3,0;4,0; 5,0)
- Tampão Fosfato (pH 6,0; 7,0; 8,0)
- Tampão Tris-HCl 9,0- Synth
- Ácido acético Glacial P.A.- Nuclear

A quitosana em pó e a enzima lipase de *Candida antarctica B* (LIPOZYME CALB L) e lipase imobilizada comercialmente (NOVOZYM 435) foram doadas, respectivamente, pelo Laboratório QUITTECH - Departamento de Química (UFSC) e Novozymes Latin America Ltda – Araucária-PR/Brasil. O óleo de mamona foi doado pela Aboissa – Óleos Vegetais Ltda.

4.2. Caracterização de Quitosana

As amostras de quitosana foram caracterizadas por determinação do grau de desacetilação, massa molar média, área superficial e por espectro de infravermelho.

4.2.1. Determinação do Grau de Desacetilação (GD)

Para a quantificação dos grupamentos amino presentes na estrutura da quitosana, foi realizada uma titulação potenciométrica, onde uma solução de 0,2 g de quitosana diluída em 20 mL de ácido clorídrico 0,3 M e 200 mL de água destilada foi titulada com uma solução de NaOH 0,2 M. Foram adicionadas alíquotas de 0,5 mL da solução titulante até seu volume final de 80 mL. A porcentagem dos grupamentos amino foi calculada de acordo com a equação (1):

$$GD = \frac{M(V_2 - V_1)K}{W} \quad (1)$$

Onde:

V_1 = volume de NaOH (mL) correspondente à neutralização do excesso de HCl na solução;

V_2 = volume de NaOH (mL) correspondente à neutralização dos grupamentos amino presentes no polímero;

M = Molariade da solução de NaOH - 0,2 M;

W = massa da amostra de quitosana em (g).

O valor $K=161$ (g /g mol) corresponde à massa molar equivalente a um monômero do polímero (BROUSSIGNAC, 1970).

4.2.2. Determinação da massa molar média

A massa molar média foi determinada pelo método viscosimétrico, onde foram utilizadas soluções de 1.10^{-4} a 5.10^{-4} g/mL de quitosana, que foram posteriormente filtradas em uma membrana de porosidade 0,45 μ m. Para o preparo das soluções citadas, foi utilizado como solvente uma solução de tampão (ácido acético 0,3 M / acetato de sódio 0,2 M, pH \sim 4,5). Os tempos de escoamento obtidos correspondem à média de três determinações que foram realizadas em um viscosímetro \varnothing 0,54 mm AVS-350, acoplado a um banho termostatizado CT52 regulado em 25° C, ambos da Schott-Geräte.

As viscosidades relativa (η_{rel}), específica (η_{esp}) e reduzida (η_{red}) foram determinadas utilizando as equações (2), (3) e (4), respectivamente. A viscosidade intrínseca $[\eta]$ foi determinada pela extrapolação dos dados de viscosidade reduzida à diluição infinita (coeficiente linear de η_{rel} versus concentração da solução de quitosana).

$$\eta_{rel.} = \frac{t}{t_0} \quad (2)$$

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 \quad (3)$$

$$\eta_{red.} = \frac{\eta_{esp.}}{c} \quad (4)$$

Onde:

t_0 = tempo de escoamento do solvente (s);

t = tempo de escoamento da solução (s);

C = concentração de quitosana (g/mL).

Para o cálculo da massa molar média foi utilizada a equação (5), proposta por Rinaudo, Milas e Le Dung (1993).

$$\eta = KMMm^a \quad (5)$$

Onde:

η = viscosidade intrínseca do polímero (mL/g);

MMm = massa molar média do polímero (g /g mol);

K e a = constantes características do sistema polímero-solvente.

4.2.3. Determinação da área superficial

A determinação da área superficial da quitosana foi realizada através da isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K, usando o aparelho Quantachrome Corporation, modelo Autosorb 1 MP, do Laboratório de Físico-Química Experimental (UFSC). Foi utilizado 26,8 mg de quitosana e um tempo de análise de 230,6 minutos. A área superficial do suporte foi determinada pelo método BET.

4.2.4. Espectro de FT-IR

As análises espectroscópicas FT-IR foram realizadas em um espectrofotômetro PERKIM & ELMER 16 PC do Departamento de Química - Central de Análises/UFSC.

A espectroscopia de infravermelho fornece informações estruturais sobre o material de interesse. Observando o espectro de infravermelho da quitosana (Figura 10), é possível notar que as principais bandas são: banda de estiramento axial de OH a $3.371,17\text{ cm}^{-1}$, a qual aparece sobreposta à banda de estiramento N-H; banda de estiramento C-H a $2.879,38\text{ cm}^{-1}$; deformação axial de C=O de amida I a $1.656,66\text{ cm}^{-1}$; deformação angular de N-H de amina primária a $1.378,94\text{ cm}^{-1}$; banda de estiramento C-O de álcool primário a $1.081,94\text{ cm}^{-1}$, e bandas de estruturas polissacarídicas na região de $890 - 1156\text{ cm}^{-1}$ (SILVERTEIN, 1991). Todas as bandas observadas são muito semelhantes às bandas descritas por SHIGEMASA et al., 1996. Além disso, a comparação do espectro obtido (Figura 10) com outras amostras comerciais de quitosana investigadas por Santos e colaboradores (2003), demonstra que todas apresentaram basicamente os mesmos grupos funcionais.

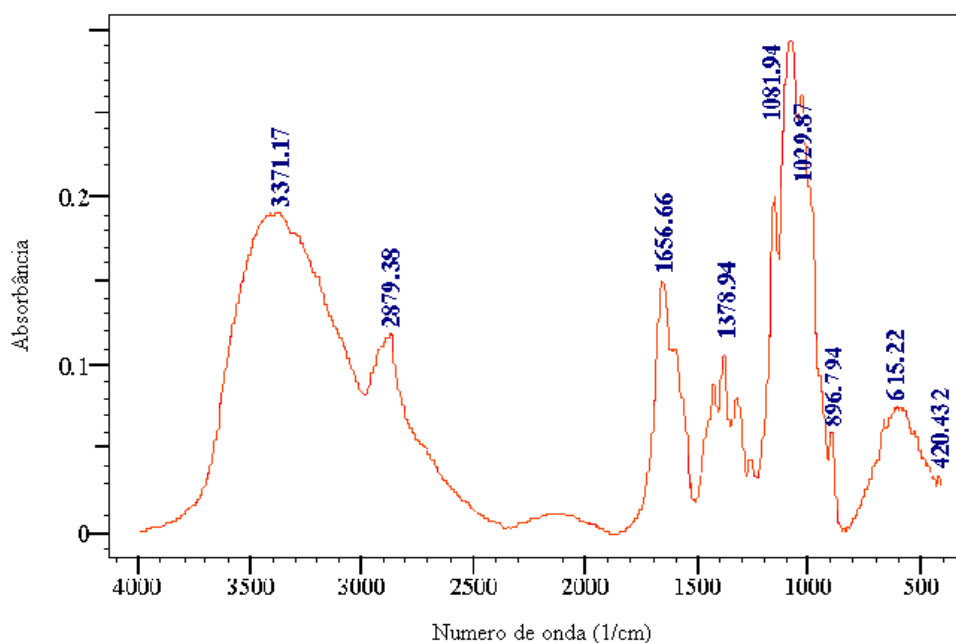


Figura 10 - Espectro de Infravermelho da quitosana em pastilha de KBr.

4.3. Preparação das Esferas de Quitosana

Para a produção das esferas, foram pesadas cerca de 1g de quitosana em pó e foram diluídas em 30 mL de ácido acético 5%. As soluções obtidas foram gotejadas em uma solução de NaOH 1 M.

O gotejamento foi realizado com auxílio de uma bomba peristáltica Spetec Modelo Perimax 12, com uma vazão de 0,25 mL/min, com o uso de mangueira de Tygon com Ø 2 mm de diâmetro interno, como é ilustrado na Figura 11. Logo após, as esferas obtidas permaneceram no banho de precipitação por 12 horas. Na seqüência, as mesmas foram lavadas com água deionizada até o pH da solução resultante ter atingido um valor próximo a pH 8,0 (GOY, ASSIS, CAMPANA-FILHO, 2004).



Figura 11 - Confeção das esferas de quitosana por banho de precipitação.

4.4. Funcionalização das Esferas de Quitosana com Glutaraldeído

O processo de funcionalização ou ativação das esferas foi realizado adicionando-se 10 esferas de quitosana em um erlenmeyer 125 mL juntamente com 5 mL de tampão Tris-HCl pH 9,0, 10 mL de soluções de glutaraldeído 0 ; 1; 3; 5; 7 e 9 %, em um shaker a 25° C e 150 rpm. O período de contato entre as esferas e as soluções de glutaraldeído foi de 24 horas. As soluções de glutaraldeído foram preparadas utilizando como solvente o tampão fosfato pH 8,0 (ADRIANO et al., 2003). Após o tempo de reação, as esferas foram lavadas com água destilada. Para avaliar as características estruturais da superfície das esferas ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas.

4.5. Caracterização da Lipase Livre e Imobilizada

4.5.1. Determinação da atividade enzimática

Para a enzima livre e imobilizada, foram realizadas as determinações enzimáticas utilizando-se o método de CHIOU e colaboradores (2004). Esse método baseia-se na hidrólise do p-nitrofenilpalmitato para o p-nitrofenol, que apresenta absorção a 410 nm ($\epsilon = 15.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, como coeficiente de extinção molar (Figura 12).

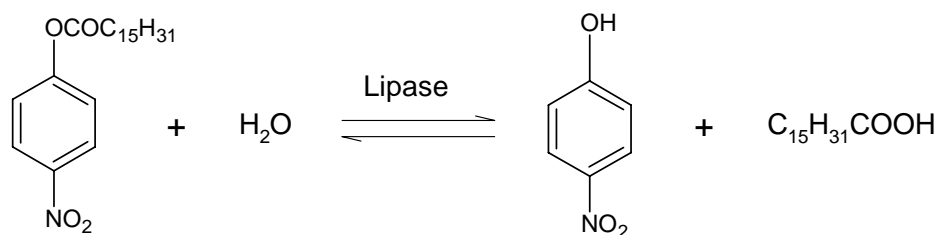


Figura 12 - Reação de hidrólise enzimática do p-NPP.

Os dados foram obtidos com o auxílio de um espectrofotômetro UV-VIS Varian Cary 50. Preparou-se uma solução de p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) dissolvendo-se 0,5 g em 100 mL de álcool etílico absoluto. Para determinação da atividade enzimática foram utilizados: 100 µL de lipase livre, 1000 µL de solução p-NPP e 1000 µL de tampão Tris pH 9,0. A solução resultante foi incubada a 30° C por 5 minutos em banho-maria. A reação de hidrólise enzimática do p-NPP foi encerrada através da adição de 2000 µL de uma de solução 0,5 N de carbonato de sódio. Foram retirados 2000 µL desta solução e adicionado em ependorf e centrifugados por 10 minutos em 10.000 rpm. O sobrenadante foi diluído em 200 µL de água destilada e submetido à análise espectrofotométrica.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima livre ou imobilizada necessária para hidrolisar 1 µmol de p-NPP por minuto.

Para a enzima imobilizada Novozym 435 foi realizado análise de atividade enzimática residual do sobrenadante com a mesma metodologia descrita de CHIOU e col. (2004) com uma solução de 200 mg em 100 mL em água deionizada depois de solubilizado em agitador magnético.

4.5.2. Determinação do pH ótimo

A reação de hidrólise do item 4.5.1, foi acompanhada à temperatura de 30°C em tampões tartarato (0,1 M) pH 3,0/ 4,0 e 5,0 e em tampões fosfato (0,1 M) pH 6,0/ 7,0/ 8,0/ e tampão Tris pH 9,0 e 10,0 com o objetivo de determinar o pH no qual a enzima livre (CALB L) e imobilizada (NOVOZYM 435) apresenta a maior atividade enzimática.

Os parâmetros cinéticos K_M e V_{MAX} da enzima CALB L foram obtidos da relação de Michaelis-Menten com auxílio do software ENZFITTER (1987, Biosoft, USA), para a reação de hidrólise enzimática.

4.5.3. Propriedades de termoestabilidade

As enzimas, livre e imobilizada foram adicionadas em tampão Tris-HCl pH 9,0 e pré-incubadas a temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C. As análises de atividade enzimática (item 4.5.1) residual foram realizadas nas alíquotas retiradas em 10 minutos de incubação. A determinação da atividade enzimática residual foi calculada de acordo com a equação 6.

$$A.E = \frac{U_f}{U_i} \quad (6)$$

Onde:

$A.E$ = atividade enzimática (U/mL)

U_f = atividade enzimática após o período de incubação (U/mL) e

U_i = atividade enzimática antes do período de incubação (U/mL).

4.5.4. Efeito do uso repetido sobre a atividade residual das enzimas imobilizadas

As esferas (5 unidades) de quitosana imobilizadas foram adicionadas a um tubo de ensaio juntamente a 1000 μ L de tampão Tris-HCl pH 9,0 e 1000 μ L de p-NNP. Após completa hidrólise do substrato, por 5 minutos, as esferas foram lavadas com água destilada e o mesmo procedimento foi repetido três vezes. Dessa forma, a possibilidade de reuso da enzima imobilizada nas esferas de quitosana foi determinada através das medidas de atividade enzimática (item 4.5.1) residual em sete ciclos consecutivos de hidrólise do p-NNP.

A possibilidade de reuso das enzimas também foi determinada utilizando como substrato o óleo de mamona. Neste caso, as esferas com a enzima imobilizada foram incubadas com o óleo de mamona por 24 h e na seqüência lavadas com álcool etílico 95° GL PA e novamente reutilizadas, como é ilustrado na Figura 13. Esse procedimento foi repetido por sete vezes, sendo realizado com as esferas de quitosana e com a lipase imobilizada comercialmente (Novozym 435). O produto final da reação foi analisado por RMN-H¹, FT-IR, CG e reologia.



Figura 13 - Esferas de quitosana imobilizadas covalentemente com CALB L após reuso.

4.5.5. Efeito de vários solventes sobre a atividade residual da Lipase CALB L

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o mesmo procedimento citado no item 3.5.1. No entanto, frações de diferentes solventes (Etanol, Metanol, Butanol, Hexano e n-Heptano) foram adicionadas no meio reacional. As frações utilizadas foram de 0, 25, 50, 75 e 100 % dos respectivos solventes em água destilada em ependorff e foi medida a atividade enzimática segundo o procedimento do item 4.5.1.

4.6. Eficiência do Processo de Imobilização

A enzima foi imobilizada em esferas de quitosana ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído de 0; 1; 3; 5; 7 e 9 %, conforme descrito no item 4.4. Após o processo de imobilização, a atividade enzimática do sobrenadante do sistema (esferas e solução enzimática) foi mensurada segundo a metodologia do item 4.5.1, com o objetivo de se conhecer a concentração de lipase CALB L ligadas covalentemente ao glutaraldeído e, portanto, imobilizadas nas esferas de quitosana. Quanto menor a atividade enzimática do sobrenadante, maior a eficiência de imobilização.

As análises das esferas de quitosana imobilizadas e das microesferas imobilizadas em resina acrílica macroporosa (Novozym 435) foram realizadas por MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) no equipamento XL30 marca PHILIPS do Departamento de Engenharia Mecânica/UFSC.

4.7. Produção do Biodiesel a Partir do Óleo de Mamona

O óleo de mamona utilizado no processo de produção enzimática do biodiesel apresentou as seguintes características físico-químicas:

Tabela 8 - Características físico-químicas do óleo de mamona.

Análises	Especificações
Umidade/impurezas	0,375% máximo
Acidez-ácido oleico	1% máximo
Massa específica – 25°C	0,945-0,965 g/mL
Índice de saponificação – mg KOH/g	176 a 187
Índice de refração – 25°C	1473-1477
Índice de hidroxila	157 a 170
Cor Gardner	4,5 – ASTM D-55T

Fonte: Laudo de Análise da Aboissa Óleos Vegetais Ltda.

4.7.1. Síntese do biodiesel com a enzima CALB L imobilizada

Os experimentos consistiram na síntese de ricinoleato de etila através da transesterificação enzimática ou alcoólise enzimática do óleo de mamona com lipase (CALB L) em esferas de quitosana previamente imobilizada covalentemente com agente funcionalizante (glutaraldeído) em 50g de óleo de mamona comercial e 126 g de álcool etílico 95°GL PA. Considerando que o óleo de mamona contém cerca de 90% de ácido ricinoléico e que sua massa molecular é de 298,5 g/gmol, calculou-se que a reação obedeceria a razão molar de 3:1(álcool/óleo), com 5,4 g (equivalente a 3% m/m) de esferas de quitosana imobilizada. Segundo Mittelbach (1997) é recomendada para a reação um excesso de álcool na razão molar de 3:1.

A reação foi realizada em reator tipo batelada como é mostrado na Figura 14, com temperatura controlada em banho termostatizado com circulação externa de água. Foram realizados ensaios a 40 e 50° C e pH 9,0, utilizando 10 mL de tampão Tris-HCl. O tempo de reação foi de 24 horas, sendo que a síntese enzimática foi acompanhada pelas técnicas de RMN H^1 , de FT-IR e CG após o término das reações, para a determinação do principal produto da síntese enzimática, o ricinoleato de etila (Figura 15).



Figura 14 - Reator tipo batelada com enzima imobilizada e temperatura controlada.

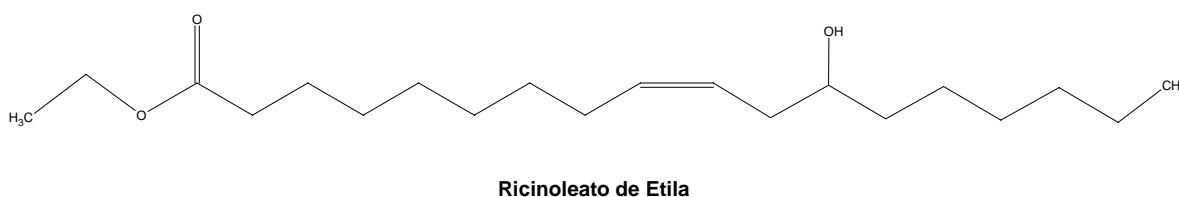


Figura 15 - Estrutura química do éster Ricinoleato de etila.

Foram realizados 12 ensaios seqüenciais com o reuso da enzima imobilizada CALB L em esferas de quitosana no tempo de 24 horas para cada ensaio.

Após os ensaios, as esferas de quitosana eram recuperadas por filtração e o produto era separado em duas fases por decantação, em funil de separação. A fase mais pesada era constituída de glicerol, água e triglicerídios não reagidos. A fase mais leve, constituída de biodiesel, álcool e água, foi destilada em evaporador rotatório a 80°C para eliminar o álcool e a água presentes na fase. O biodiesel produzido foi, então, caracterizado por técnicas de RMN H^1 , FT-IR, CG e Reologia.



Figura 16 - Processo de separação do ricinoleato de etila em evaporador rotativo.

4.7.2. Síntese do ricinoleato de etila com a enzima NOVOZYM 435

O mesmo procedimento do item 4.7.1 foi realizado para a obtenção do ricinoleato de etila utilizando a enzima lipase imobilizada em resina macroporosa NOVOZYM 435.

Esta reação foi realizada com 5,4 g da enzima NOVOZYM 435, cerca de 3% m/m em relação à massa total de reagentes. Também utilizou-se 10 mL de tampão Tris pH 9,0, sendo a temperatura controlada em 40 e 50°C em banho termostaticado com circulação externa de água. O tempo de reação foi de 24 horas para garantir uma alta conversão da reação de transesterificação.

Foram realizados 15 ensaios nas condições experimentais descritas para a lipase imobilizada NOVOZYM 435. Após os experimentos em reator tipo batelada, a separação do ricinoleato de etila procedeu-se como descrito para os ensaios com lipase CALB L imobilizada em esferas de quitosana, e, também, o mesmo procedimento analítico foi realizado para a identificação do produto formado da reação de síntese enzimática com óleo de mamona (item 4.7.1).

4.7.3. Análises de CG

O biodiesel produzido por transesterificação enzimática foi analisado também por cromatografia em fase gasosa, para a identificação do principal produto (ricinoleato de etila) e principalmente para a quantificação desse produto.

Primeiramente realizou-se uma curva de calibração como padrão interno metil palmitato. A concentração utilizada para injeção das amostras foi de 300 ppm. A amostra com padrão interno foi injetada em triplicata em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG/DIC Varian modelo STAR 3400 CX), acoplado com uma coluna capilar apolar modelo DB5 (5% de fenil metil silicone), com as seguintes condições: temperatura inicial da coluna de 150 °C permanecendo por 1 min, taxa de aquecimento de 15 °C/min até 180 °C. Uma segunda rampa foi programada até 210°C com uma taxa de aquecimento de 4 °C/min e a terceira rampa com temperatura final da coluna de 250°C com uma taxa de aquecimento de 15 °C/min. As temperaturas do injetor e detector permaneceram em 300 °C. O tempo total da análise foi de 14,16 min. A quantidade de amostra injetada foi de 2 µL. Esta metodologia foi utilizada em estudo recente por FACCIO, 2004.

4.7.4. Análises espectroscópicas de FT-IR

As análises espectroscópicas FT-IR foram realizadas em um espectrofotômetro PERKIM & ELMER 16 PC do Departamento de Química-Central de Análises/UFSC

As análises de FT-IR foram realizadas colocando-se o líquido entre placas de sal de KBr com espaçadores. Pressionando-se levemente a amostra líquida entre as placas planas produz-se um filme de espessura de 0,01 mm ou menos. As placas foram mantidas juntas por capilaridade, onde foi utilizado aproximadamente 0,5 mg de amostra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da Quitosana

A quitosana possui características químicas, físicas e biológicas que a tornam interessante para a aplicação em diversas áreas. Tais características são diretamente influenciadas por fatores como o grau de desacetilação, massa molar média e a área superficial.

5.1.1. Preparação das esferas de quitosana

A metodologia descrita mostrou-se muito eficiente para a produção das esferas, pois, foi possível controlar a vazão da solução de gel de quitosana, com uma formação homogênea de esferas de quitosana. Além disso, foi possível constatar por inspeção visual que as esferas possuíam boa resistência mecânica para serem submetidas ao processo de agitação durante os ensaios de imobilização.

5.1.2 Determinação do Grau de Desacetilação

O grau de desacetilação (GD) é um parâmetro que define a fração de unidades desacetiladas existentes na cadeia polimérica (DUARTE et al., 2001). Esse parâmetro define se o polímero é quitina ou quitosana. Arbitrariamente quando o $GD \geq 40\%$ o polímero é definido como quitosana (TAN et al., 1998). O GD influencia a solubilidade da quitosana, pois quanto maior a quantidade dos grupos amino, maior é a repulsão eletrostática entre as cadeias e, conseqüentemente, maior é a solvatação em água.

Além de modificar as características de solubilidade da quitosana, o GD é um parâmetro importante, pois está diretamente relacionado ao rendimento de imobilização enzimática. Essa afirmativa pode ser confirmada pelo estudo de Rodrigues e colaboradores (2005), os quais otimizaram a imobilização da lipase em microesferas de quitosana com diferentes GDs. Os resultados revelaram que o rendimento de imobilização e estabilidade da enzima imobilizada frente a diversos fatores físicos foi significativamente maior utilizando a quitosana com maior GD. A influência do GD em relação à quantidade de enzima acoplada também foi um parâmetro estudado por ALSARRA e colaboradores

(2002), os quais observaram maior atividade enzimática e quantidade de proteínas encapsuladas em esferas confeccionadas com quitosana de maior GD. As observações citadas evidenciam que a quitosana com maior GD possui maior número de grupos amino, que por sua vez, poderia formar maior número de ligações com o agente bifuncional (glutaraldeído), ou assim se tornarem disponíveis para formar mais ligações iônicas com as moléculas de enzimas.

Vários métodos vêm sendo descritos na literatura para determinação do GD, dentre eles destacam-se, a titulação potenciométrica (BROUSSIGNAC, 1970), espectroscopia UV (TAN et al., 1998), espectroscopia de infravermelho (SHIGEMASA et al., 1996, DUARTE, et al., 2002), espectroscopia de massa (DUARTE et al., 2001) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (LAVERTU et al., 2003). No entanto, o melhor método para a determinação do GD ainda tem sido motivo de muitas investigações.

A titulação potenciométrica foi o método escolhido neste trabalho em função de sua simplicidade e precisão. A Figura 17 ilustra o perfil da curva obtida através da titulação potenciométrica da solução de quitosana utilizada. Foi possível observar que a curva apresenta dois pontos de inflexão, sendo o primeiro relacionado à neutralização do excesso de HCl na solução e o segundo ponto referente à neutralização dos grupos amino protonados. O GD calculado por este método foi de 72,5 %, sendo que este valor representa a média de três determinações.

A efeito de comparação com a literatura, vários valores de GDs para a quitosana foram encontrados, variando de 50,0 a 92,3 % (LIN et al., 2002, MARTINO et al., 1996, JIANG et al., 2005, YANG; WANG; TAN, 2004, ADAMIEC e MODRZEJEWAKA, 2004). Dessa forma, a quitosana utilizada neste trabalho possui um GD dentro da faixa de valores encontrados na literatura, utilizados para promover imobilização enzimática.

O grau de desacetilação obtido indica que o método escolhido foi eficiente, pois o valor encontrado foi 72,5%, estando dentro da faixa de GDs encontrados na literatura. Assim, esta quitosana possui muitos grupos desacetilados e isto implica uma maior eficiência na funcionalização com glutaraldeído que fará ligação covalente com a enzima lipase.

Através da curva de titulação foi possível determinar o pKa do polímero quitosana. Considerando a equação de Henderson-Hasselbalch (Equação 7), e sabendo que no ponto estequiométrico da curva de titulação existe praticamente a mesma concentração molar de ácido e base, é possível determinar o pKa do polímero através do pH do segundo ponto de inflexão, sendo igual a 8,0.

$$pH = pKa - \log \frac{[ácido]}{[base]} \quad (7)$$

Teoricamente, o pKa da quitosana é de aproximadamente 6,5 (KRAJEWSKA, 2004). No entanto, como em todos os polieletrólitos, a constante de dissociação da quitosana depende de vários fatores, dentre eles o GD e a densidade de carga do polímero.

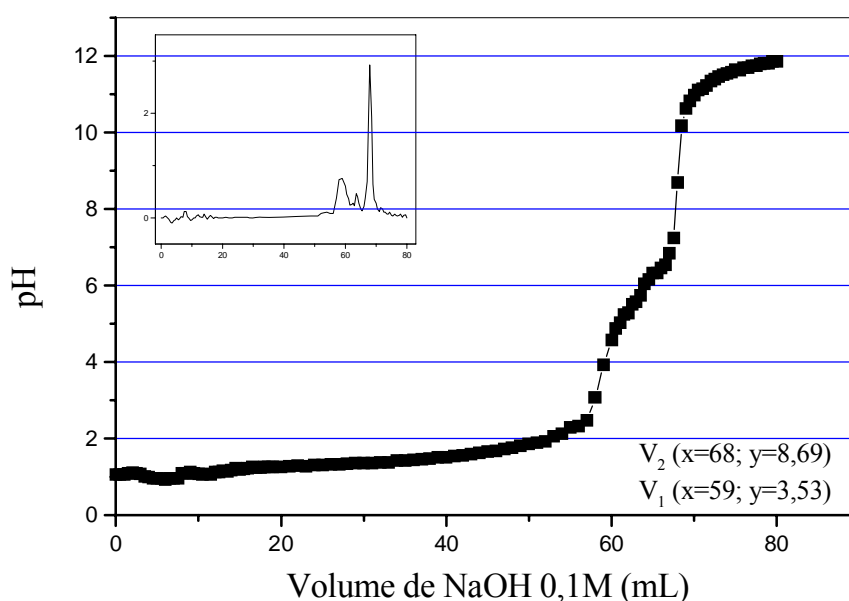


Figura 17 - Curva de titulação potenciométrica da solução de quitosana e ácido clorídrico (0,3 M). Os pontos representam a média de três determinações. O quadro menor ilustra a derivada primeira da curva de titulação, onde os pontos máximos representam os pontos de inflexão.

5.1.3. Determinação da massa molar média

Através da Figura 18, que ilustra a curva de viscosidade reduzida versus concentração da solução de quitosana, verifica-se que a viscosidade intrínseca η foi determinada pela extrapolação dos dados de viscosidade à diluição infinita. Considerando isso, o valor obtido para η foi igual a 419.

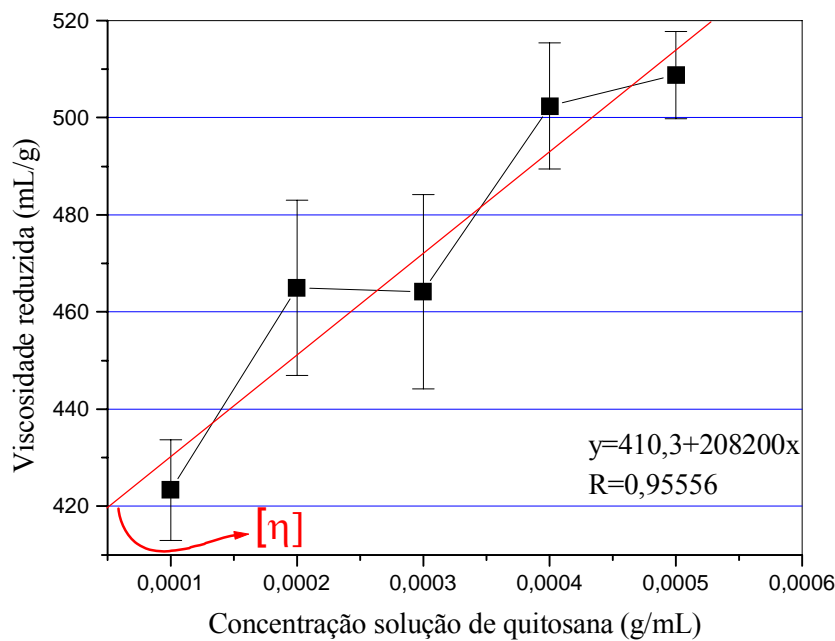


Figura 18 - Curva de viscosidade reduzida versus concentração da solução de quitosana.

Utilizando-se a equação 5, e empregando valores para $K = 0,076$ mg/L unidades e $a = 0,76$ (cte) (item 3.2.1) em solvente composto por acetato de sódio 0,2 M e ácido acético 0,3 M, a (MM_m) massa molar média da quitosana utilizada neste trabalho foi determinada em 83,79 kDa este valor está dentro da média reportada na literatura (RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, 1993).

5.1.4. Determinação da Área de Superfície Específica

A área superficial de adsorventes microporosos é freqüentemente utilizada como medida pra descrever o desenvolvimento dos poros.

Um dos meios mais comuns na determinação da área específica de um sólido baseia-se na determinação da quantidade de um adsorbato necessária para recobrir com uma monocamada a superfície de um adsorvente. Os adsorbatos normalmente usados para esse fim são os gases. Quando um sólido é exposto a um gás ou vapor, em um sistema fechado à temperatura constante, o sólido passa a adsorver o gás, ocorrendo assim um aumento da massa do sólido e um decréscimo da pressão do gás. Após um determinado tempo, a massa do sólido e a pressão do gás assumem um valor constante. A quantidade de gás adsorvido pode ser calculada pela diminuição da pressão por meio da aplicação das leis dos gases ou pela massa de gás adsorvida pelo sólido. A quantidade de gás adsorvida é a função da interação entre o gás e o sólido, sendo, portanto dependente da natureza dessas espécies (COUTINHO et al., 2001).

O modelo utilizado neste trabalho foi o de Brunauer, Emmett e Teller (BET). A Figura 19 (a) ilustra a isoterma de adsorção obtida em esferas de quitosana, onde é possível observar que seu formato é característico de sólidos não porosos. Além disso, através das informações obtidas com auxílio da isoterma e do modelo citado, foi possível obter um gráfico de BET da quitosana Figura 19 (b)), onde a área calculada foi de $4,86 \text{ m}^2/\text{g}$. Esse é um valor baixo se comparado com outros materiais também utilizados para promover a imobilização de enzimas, tais como a sílica mesoporosa, que possui uma área de aproximadamente $300 \text{ m}^2/\text{g}$ (BLANCO et al., 2004), sílica gel com $422 \text{ m}^2/\text{g}$ (PERALTA-ZAMORA et al., 2003) e vidro de porosidade controlada com $87 \text{ m}^2/\text{g}$ (ROGALSKI et al., 1995). Segundo ZANIN e MORAES (2004), para que um determinado suporte adquira um número significativo de moléculas de enzima por adsorção física, o mesmo deve possuir uma área específica mínima de $10 \text{ m}^2/\text{g}$. Dessa forma, é possível inferir que apenas uma fração desprezível de moléculas da enzima deva sofrer apenas adsorção física durante o processo de imobilização.

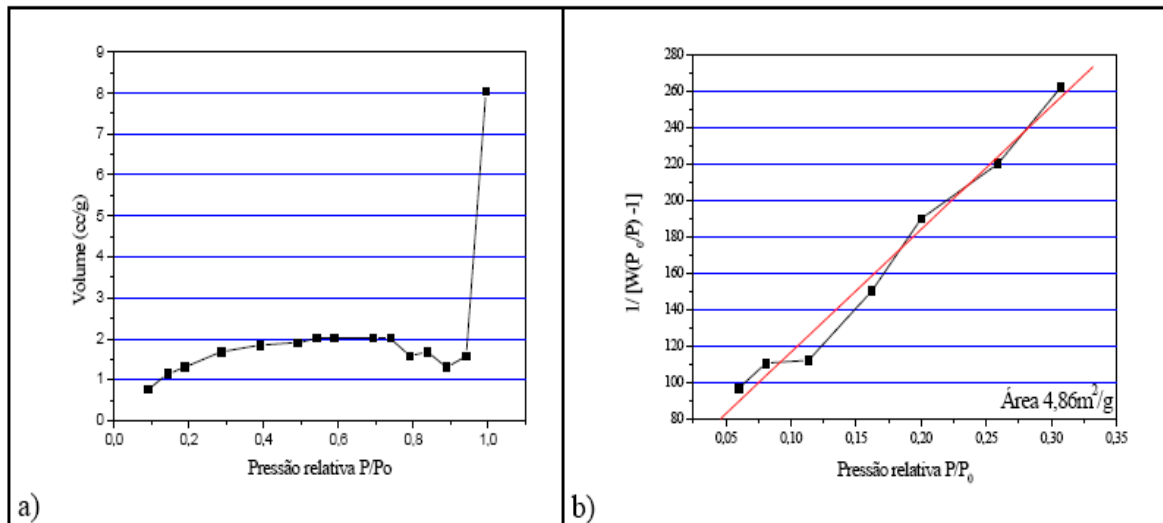
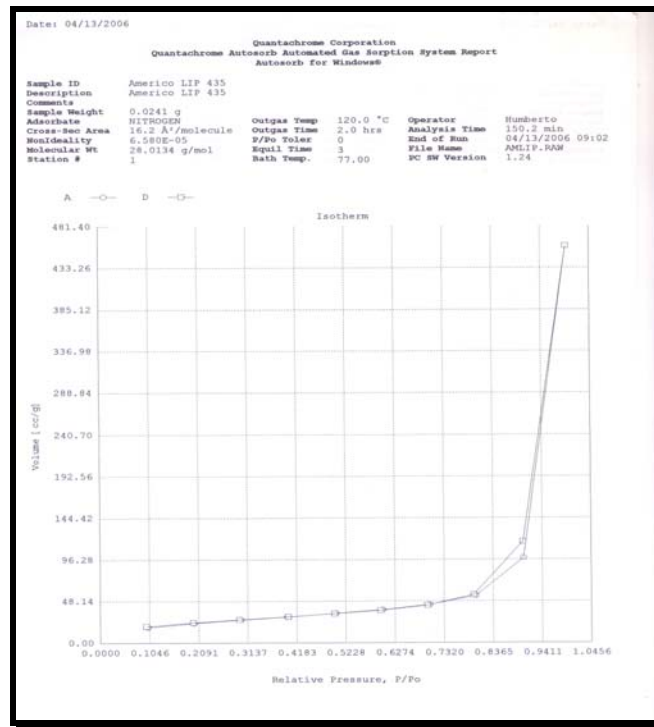
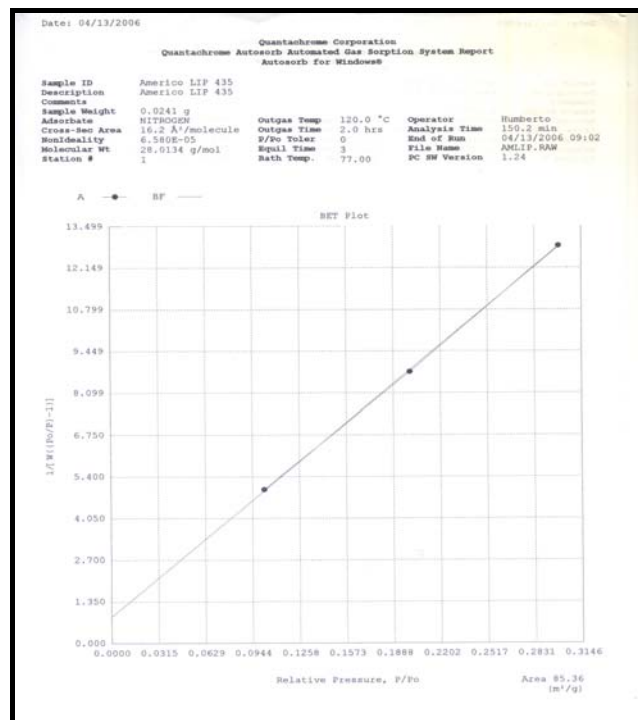


Figura 19 - (a) Isotherma de adsorção de nitrogênio a 77 K da quitosana; (b) Gráfico de BET da quitosana.

Neste trabalho avaliou-se também a área superficial por BET da lipase Novozym 435 em microesferas de resina macroporosa, obtendo-se um valor de 85,36 m²/g que é um valor equivalente ao vidro de porosidade controlada (ROGALSKI et al., 1995), como está ilustrado na Figura 20(b).



(a)



(b)

Figura 20 - (a) Gráfico da medida da área superficial BET da enzima lipase Novozym 435 e (b) Gráfico da isoterma da enzima lipase Novozym 435.

5.2. Funcionalização das Esferas de Quitosana com Glutaraldeído

A funcionalização das esferas de quitosana foi realizada seguindo o procedimento descrito no item 4.4, que visou a reação do glutaraldeído como agente funcionalizante, fazendo com que grupos carbonilas se liguem às esferas de quitosana e posterior imobilização covalente com a lipase CALB L.

A ativação das esferas de quitosana foi realizada com várias concentrações de glutaraldeído. Dentro deste contexto, foram avaliadas as possíveis modificações causadas sobre a morfologia das esferas de quitosana.

5.2.1. Eficiência do processo de funcionalização das esferas de quitosana

A concentração de proteínas foi determinada com o auxílio de espectrofotômetro UV-VIS Varian Cary 50 a 595 nm com Coomassie Blue (BRADFORD, 1976). O conteúdo de proteína foi calibrado com soluções de albumina bovina, de concentrações que variaram de 0 a 20 µg/µL. O coeficiente de regressão linear (r^2) foi de 0,9980.

Foi realizado um estudo com a atividade enzimática do sobrenadante e também análise de proteínas totais (BRADFORD,1976), onde foi adicionado 10 esferas de quitosana em erlenmeyers de 125 mL, com concentrações de 0 a 9% de glutaraldeído, 5 mL de tampão Tris-HCl pH 9,0 e 10 mL de solução enzimática de CALB L em Shaker a 25 °C e 150 rpm no tempo de 12 horas. Após o experimento foi retirado o sobrenadante e medido sua atividade enzimática e proteínas totais. Os resultados experimentais são apresentados na Figura 21. Pode-se verificar que com o aumento da concentração de glutaraldeído, houve um aumento da atividade enzimática do sobrenadante. Isto significa que para as concentrações de glutaraldeído menores (1 e 3 %) há uma melhor eficiência da ligação covalente da enzima lipase CALB L nas esferas de quitosana. Este comportamento é apresentado na Figura 21.

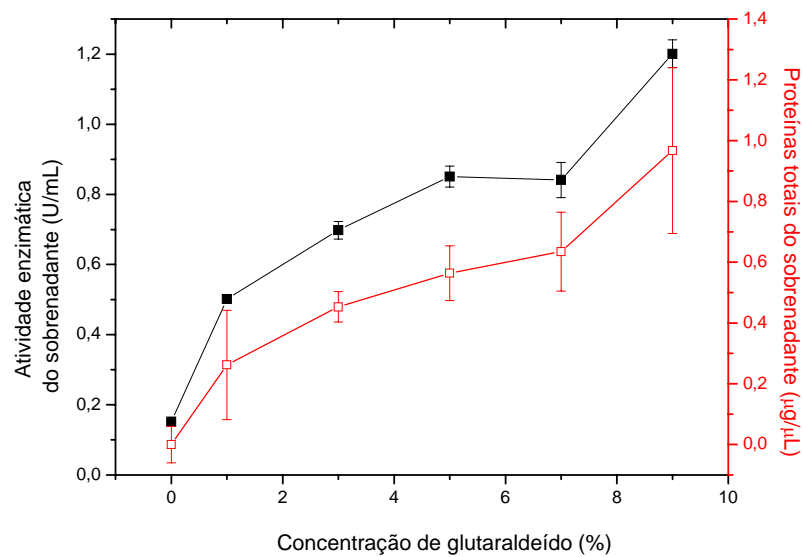


Figura 21 - Influência da concentração de glutaraldeído na atividade enzimática residual e proteínas totais do sobrenadante.

Existem vários métodos utilizados para a imobilização das enzimas, tais como: imobilização covalente, imobilização iônica, na forma de micelas reversas ou através de ligações covalentes entre as moléculas das enzimas com um agente entrecruzante. Nesse trabalho foi utilizado o método da ligação covalente em um suporte sólido, a quitosana. A quitosana possui grupamentos amino em sua superfície e que podem se ligar à enzima através de um agente entrecruzante, o glutaraldeído. A importância em se otimizar a concentração de glutaraldeído utilizada para ativar as esferas de quitosana está relacionada ao impedimento estérico que um excesso de glutaraldeído pode causar à molécula que se pretende imobilizar, nesse caso a lipase.

Durante o processo de imobilização, ocorre o envolvimento de vários resíduos contendo grupos amino da enzima, que por sua vez, podem influenciar nas características físicas e químicas da enzima de forma benéfica ou não. Quando a molécula da enzima está ligada a um suporte, a mesma precisa conservar suas distâncias intermoleculares, o que torna sua conformação mais rígida. Dessa forma, a molécula torna-se mais resistente a mudanças conformacionais induzidas por agentes desnaturantes. No entanto, quando a concentração de glutaraldeído é muito alta, uma quantidade maior de grupos aldeídos reage com um número maior de resíduos da enzima tornando sua estrutura muito rígida, com conseqüente distorção de sua conformação, causando a perda de atividade (ADRIANO et al, 2005; SERCHEL e VARGAS, 1996). Isto justifica a necessidade da otimização do

processo de imobilização da enzima nas esferas de quitosana, pois o objetivo é utilizar uma concentração que envolva um número ideal de resíduos da enzima (ADRIANO et al., 2005).

A possibilidade de se envolver vários resíduos da enzima, nos processos de imobilização covalente, sobre o suporte previamente ativado com grupos aldeídos, pode influenciar benéficamente a estabilidade das moléculas de enzima imobilizadas. Todos os resíduos, ao se unirem a uma grande superfície do suporte, através de braços espaçadores muito pequenos, estarão obrigados a conservar suas distâncias relativas durante qualquer mudança conformacional, tornando a região da enzima imobilizada muito mais rígida que a mesma região da enzima nativa. Em consequência, toda a molécula de enzima se torna muito mais resistente a mudanças conformacionais induzidas por agentes desnaturantes (GUISÁN et al., 1991). Por outro lado, uma alta concentração de grupos aldeídos na superfície do suporte, poderá originar muitos enlaces covalentes multipontuais com a enzima, gerando uma alta rigidez na sua molécula, com conseqüente distorção em sua estrutura tridimensional, e no próprio centro ativo. Torna-se importante promover a formação de muitos enlaces enzima-suporte de modo a se obter uma rigidez na estrutura da enzima favorecendo uma alta estabilidade e uma alta atividade intrínseca do derivado. No entanto, é necessário um rigoroso controle da estabilização sem, contudo, promover a distorção da estrutura terciária da enzima e, conseqüentemente, do seu centro ativo, quando não desejada (itens 5.3 e 5.4).

A caracterização morfológica das esferas de quitosana ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído foi realizada por MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) no equipamento XL30 marca PHILIPS do Departamento de Engenharia de Mecânica/UFSC, esta caracterização pode ser visualizada na Figura 22.

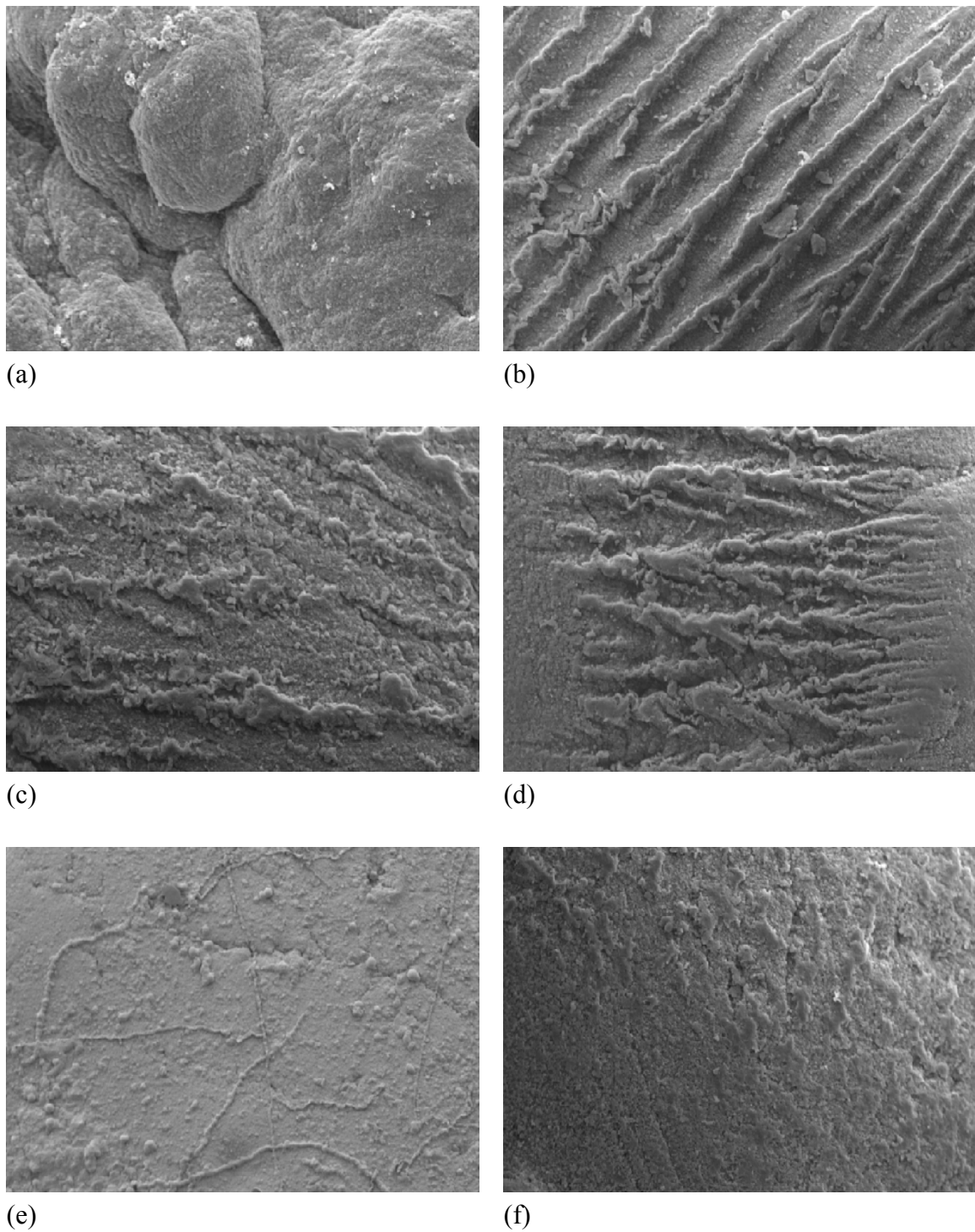


Figura 22 - Modificação da superfície das esferas de quitosana ativadas com soluções de diferentes porcentagens glutaraldeído em pH 9,0 e temperatura de 25 °C analisadas por MEV 10Kv 5.0 500X (a) 0% glutaraldeído; (b) 1% glutaraldeído; (c) 3% Glutaraldeído; (d) 5% glutaraldeído; (e) 7% glutaraldeído e (f) 9% glutaraldeído.

As micrografias obtidas através da técnica de MEV também revelaram uma aparente diminuição de porosidade com o aumento da concentração do agente entrecruzante (Figura 22 e Figura 23). Observou-se que na superfície das esferas de quitosana com 3% de glutaraldeído, e que houve uma modificação superficial com a funcionalização e posterior reação com a lipase CALB L, com um grande acúmulo de enzima lipase, revestindo as esferas e conseqüentemente fazendo ligação covalente nas esferas de quitosana, esses resultados estão ilustrados na Figura 23. Os resultados obtidos corroboram com estudo realizado por (ADRIANO et al., 2005) que por sua vez, utilizou o mesmo material como suporte .

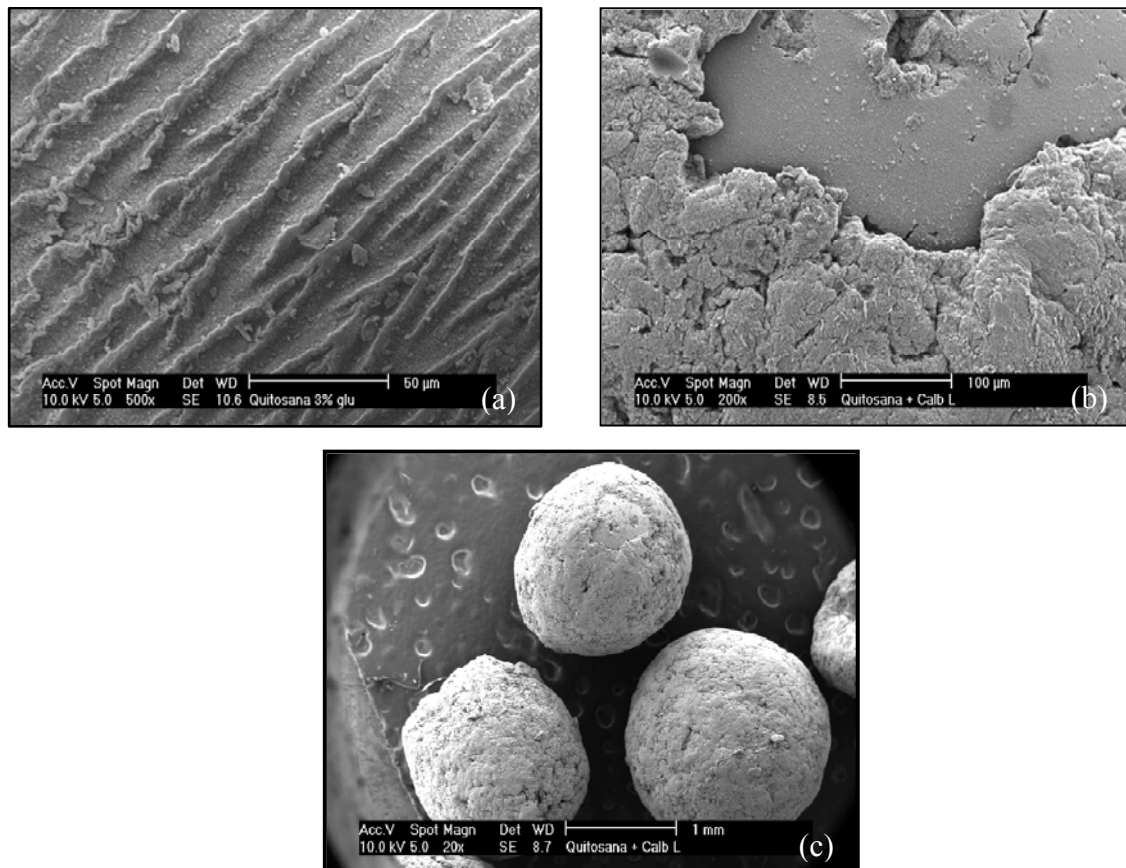


Figura 23 - (a) Detalhe da superfície das esferas de quitosana com 3% glutaraldeído obtido através de MEV 100 Kv 5.0 20 X (b) Superfície das esferas de quitosana imobilizadas com lipase CALB L (c) Esferas de quitosana imobilizadas com CALB L com glutaraldeído 3% v/v.

Foi possível observar que as esferas submetidas à ativação com soluções de glutaraldeído com porcentagem acima de 7%, tornaram-se menos resistentes e mais quebradiças. Essa observação sugere que o uso das soluções de 7 e 9 % de glutaraldeído provocam uma severa desidratação das esferas. Por outro lado, foi observado que esferas ativadas com porcentagens baixas de glutaraldeído (1,0 %) apresentavam-se mais frágeis e gelatinosas. Esse resultado corrobora as observações de SISO e colaboradores (1997) que obtiveram esferas de quitosana mais frágeis quando ativadas com soluções de glutaraldeído de baixa porcentagem (0,5 %). Além disso, o trabalho citado também abordou mudanças semelhantes geradas nas esferas de quitosana. Esse comportamento está relacionado com as espécies de ligações que são formadas entre as moléculas de quitosana quando, as mesmas são submetidas à ativação com soluções de glutaraldeído mais concentradas (Figura 25).

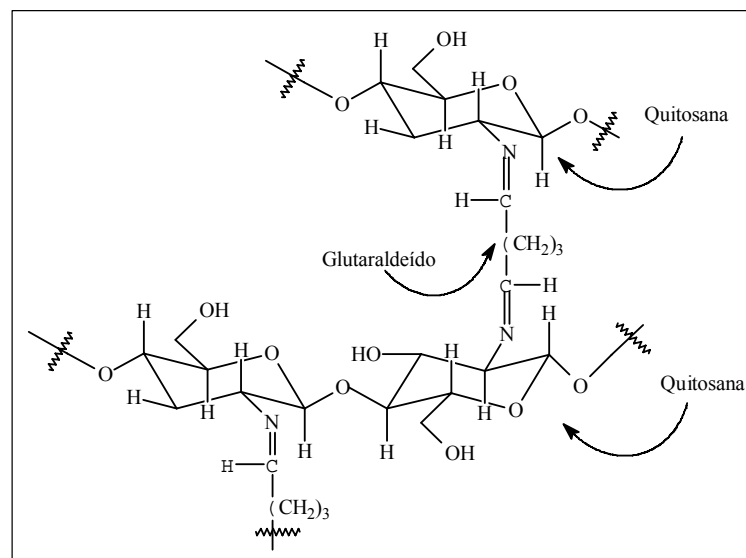


Figura 24 - Ilustração esquemática das ligações cruzadas entre duas cadeias poliméricas de quitosana com o glutaraldeído.

5.2.2. Eficiência do processo de imobilização

Durante o processo de imobilização, ocorre o envolvimento de vários resíduos contendo grupos amino da enzima, que por sua vez, podem influenciar nas características físicas e químicas da enzima de forma benéfica ou não. Quando a molécula da enzima está ligada a um suporte, a mesma precisa conservar suas distâncias intermoleculares, o que torna sua conformação mais rígida. Dessa forma, a molécula torna-se mais resistente a

mudanças conformacionais induzidas por agentes desnaturantes. No entanto, quando a concentração de glutaraldeído é muito alta, uma quantidade maior de grupos aldeídos reage com um número maior de resíduos da enzima tornando sua estrutura muito rígida, com conseqüente distorção de sua conformação, causando a perda de atividade (JIANG et al., 2005). Isto justifica a necessidade da otimização do processo de imobilização da enzima nas esferas de quitosana, pois o objetivo é utilizar uma concentração que envolva um número ideal de resíduos da enzima, proporcionando a mesma uma melhor estabilidade frente a fatores físicos e químicos como: elevada temperatura, pH muito alcalino e tempo de armazenamento (itens 4.4.6; 4.4.7; 4.4.9).

Conforme citado no item 4.3.2, o processo de ativação das esferas com as soluções de glutaraldeído foi realizado em pH 9,0, pois durante o processo de entrecruzamento, o grupo aldeído reage com grupo amino da quitosana para formar o grupo imino ($\text{CH}=\text{N}$) (item 5.4). A formação do grupo imino ocorre preferencialmente em pH alcalino, onde os grupos amino encontram-se desprotonados. Neste caso, a formação desse grupo deve ocorrer preferencialmente em $\text{pH} \geq 8,0$, conforme ilustrado na Figura 26, onde os grupos amino do polímero devem estar completamente desprotonados. O grupo amino desprotonado é um nucleófilo mais eficiente que o mesmo na forma protonada, devido ao menor compartilhamento do par de elétrons do nitrogênio. O mecanismo da reação de formação do grupo imino pode ser visualizado na Figura 27 (MORRISON e BOYD, 1996).

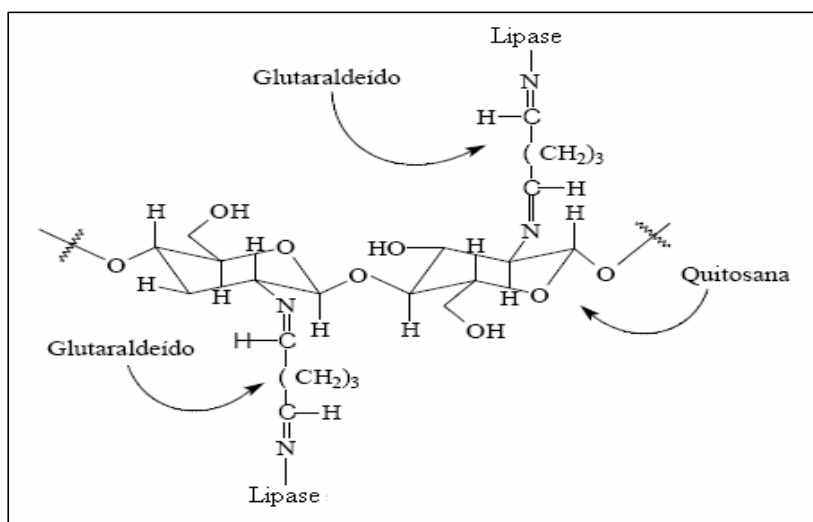


Figura 25 - Ilustração esquemática da enzima imobilizada sobre o suporte (esferas de quitosana) com auxílio do agente bifuncional (glutaraldeído) (JIANG et al., 2005).

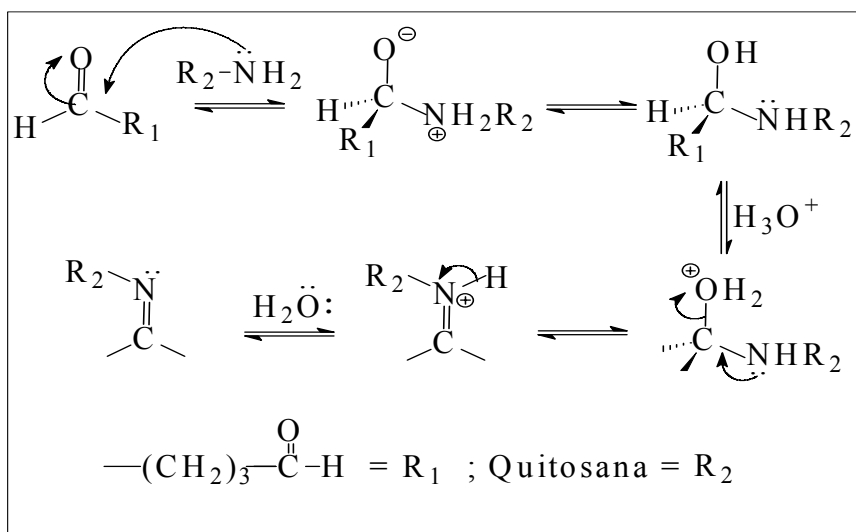


Figura 26 - Mecanismo de ativação da quitosana com glutaraldeído através da formação do grupo imino pela reação entre os grupamentos amino da quitosana e os grupamentos carbonila do agente ativante.

Embora o mecanismo ilustrado seja o mais aceito, propostas alternativas vêm sendo estudadas. O trabalho de OYRTON, MONTEIRO e AIROLDI (1999) revelaram, com auxílio de técnicas como RMN C^{13} e Espectroscopia Raman, que a estabilização da ligação ocorre através do envolvimento de duplas ligações etilênicas conjugadas. Essa idéia ganha muito apoio pela estabilidade desta interação, que, por sua vez, é irreversível e bastante resistente a variações de pH e temperatura, o que normalmente não é observado por interações que envolvem simplesmente a formação das ligações imino. O trabalho de JÚNIOR (1999) ilustra um estudo de caracterização do conjugado quitosana-glutaraldeído com espectros de FT-IR. Seu estudo revelou o surgimento de uma banda em torno de 1562 cm^{-1} que pode ser associada à ligação etilênica no conjugado quitosana-glutaraldeído quando comparado ao espectro da quitosana pura. Essa observação sugere que no polímero existe a presença de ligação imina conjugada com ligação dupla etilênica. Esses resultados evidenciam que, além da formação dos grupos imino (bases de Schiff), existe a formação de ligação imina conjugada com dupla etilênica durante interação da quitosana com glutaraldeído.

5.5. Caracterização da Lipase

5.5.1. Determinação do pH ótimo para CALB L e Novozym 435

A lipase livre foi avaliada quanto à sua atividade enzimática com solução tampão de vários pHs Tartarato (3,0; 4,0; 5,0), Tampão Fosfato (6,0; 7,0; 8,0) e Tampão Tris-HCl 9,0. Os testes foram realizados à temperatura ambiente. Na Figura 27 estão apresentados esses resultados e pode-se constatar que o melhor valor de pH para enzima *Candida antarctica* B (CALB L) e Novozym 435 foi 9,0. Nesse pH obteve-se um valor de atividade de 110,00 U/mL para a enzima livre CALB L e 5,3 U/g para a lipase imobilizada Novozym 435, este comportamento é apresentado na Figura 27.

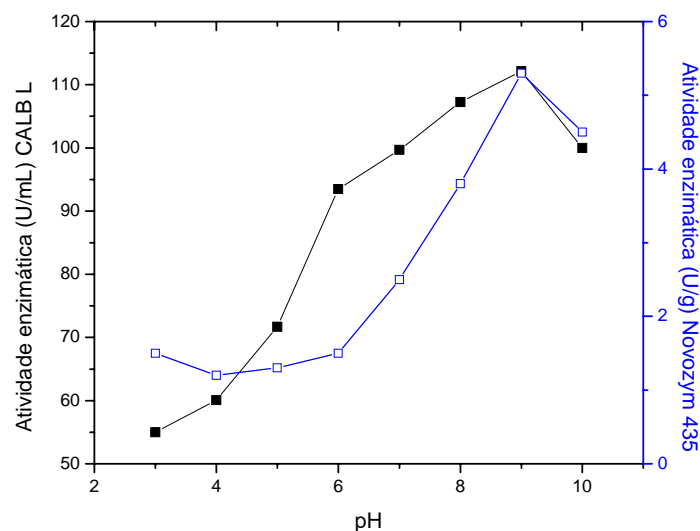


Figura 27 - Atividade enzimática das enzimas CALB L (■) e Novozym 435 (□) após incubação de 10 minutos das mesmas à temperatura ambiente com tampões tartarato (pH 3,5 a 5), tampões fosfato (pH 6 a 8) e tampões tris-HCl (pH 9 e 10).

5.5.2. Determinação da temperatura ótima

Para a determinação da temperatura ótima para atividade das enzimas estudadas, foram realizados testes experimentais variando-se a temperatura para pH 9, considerado o pH ótimo de acordo com os resultados do item 5.5.1. Os resultados são apresentados na Figura 28.

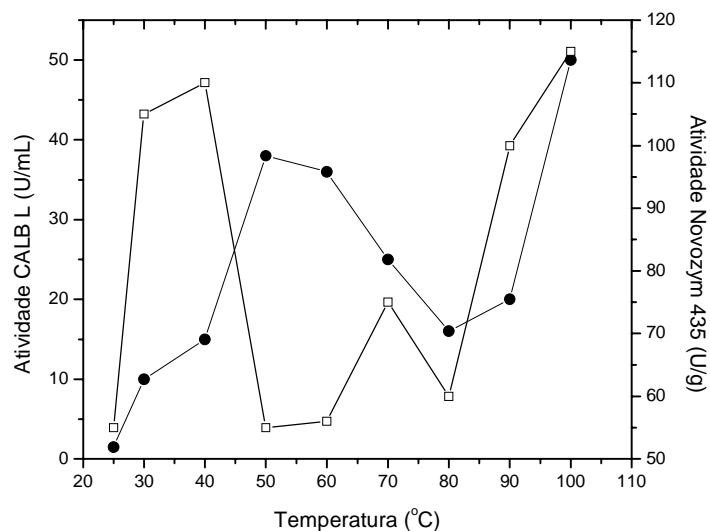


Figura 28 - Atividade enzimática das enzimas Novozym 435 (●) e (□) CALB L após incubação de 30 minutos das mesmas com tampões fosfato pH 9,0 em diferentes temperaturas.

Os resultados revelaram que tanto a CALB L quanto a Novozym 435 apresentaram os melhores valores de atividade à temperatura de 100 °C (Figura 28). Esses resultados comprovam a termoestabilidade da enzima e corroboram com outros trabalhos (Klibanov, 1997). A explicação fornecida para este fato está relacionada com a origem do microrganismo que produz a enzima *Candida antarctica*. Sabe-se que esse microrganismo foi descoberto no Continente Antártico e dessa forma produz enzimas que possuem grande estabilidade quando submetidas a baixas temperaturas. No entanto, curiosamente, as enzimas produzidas por esses microrganismos também possuem grande estabilidade quando submetidas a elevadas temperaturas. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato dos mecanismos envolvidos na resistência das enzimas a temperaturas extremas serem semelhantes. Nesse caso a termoestabilidade representa uma importante vantagem para o uso prático dessa enzima (KLIBANOV, 1997).

As enzimas estudadas se comportaram com uma termoestabilidade com temperaturas superiores a 90 °C isto é relatado na literatura (MARIA et al., 2005), onde os autores utilizaram a lipase de *Candida antarctica* A e B em síntese enzimática na obtenção de amino ésteres.

5.5.3. Parâmetros cinéticos dos valores de K_M e V_M da Lipase CALB L

Conforme descrito na seção 4.5 Material e Métodos, 4.5.1, foram realizados ensaios de velocidade inicial para diversas concentrações de substrato para a reação de hidrólise do pNPP. Os resultados experimentais são apresentados na Figura 30, onde observa-se um comportamento tipo Michaelis-Menten da velocidade da reação enzimática frente ao substrato pNPP. Através de estimativa dos parâmetros, utilizando o método do software *Statística*, obteve-se os valores estimados calculados para enzima lipase CALB L de $V_M = 807,72 \mu\text{mol/s}$ e $K_M = 242,63 \mu\text{M}$. O modelo michaeliano ajustou-se bem aos dados experimentais como pode ser observado na Figura 29.

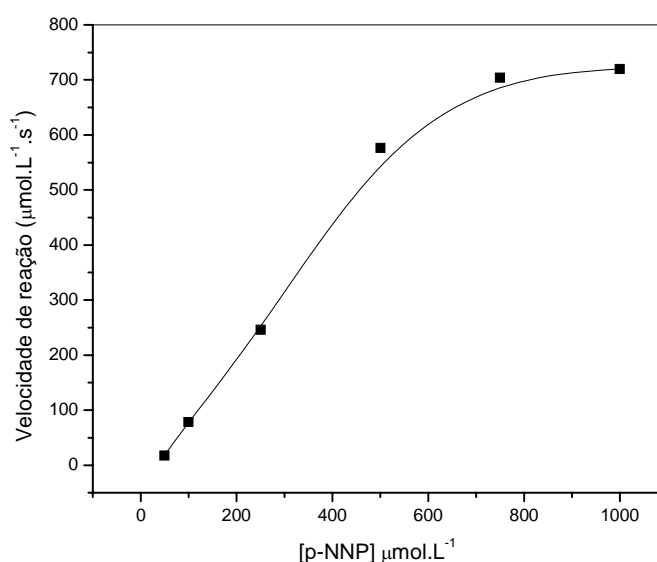


Figura 29 - Gráfico de Michaelis-Menten V-(velocidade de reação) versus S-(concentração de p-NPP) para a formação de composto que absorve a 410 nm, catalisada pela lipase CALB L.

5.5.4. Efeito de vários solventes sobre a atividade da Lipase CALB L

Estudou-se o comportamento cinético da hidrólise do pNPP catalisada pela enzima *Lipozyme CALB L* utilizando cinco solventes: metanol, etanol, butanol, n-hexano e n-heptano. Este estudo visou verificar como a lipase CALB L reage a várias concentrações de solventes em água (0 a 100 %). Os resultados para os solventes polares e apolares estão graficados nas Figura 30 e Figura 31, respectivamente.

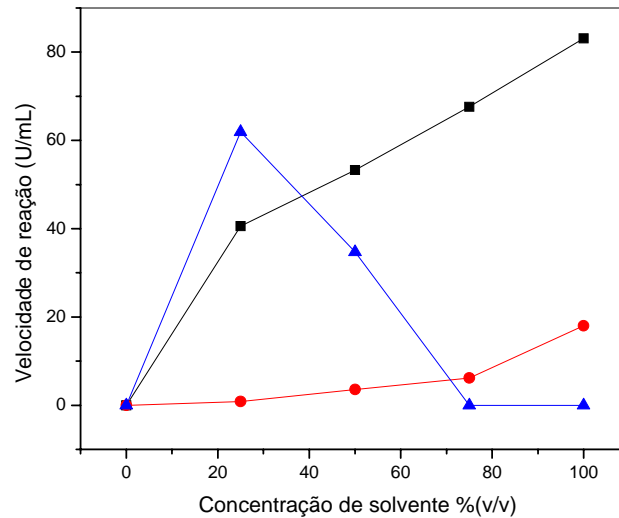


Figura 30 - Estudo do comportamento da atividade enzimática frente a solventes polares com concentração do solvente (% v/v) ■ metanol ● etanol ▲ butanol versus Velocidade de reação enzimática à temperatura ambiente.

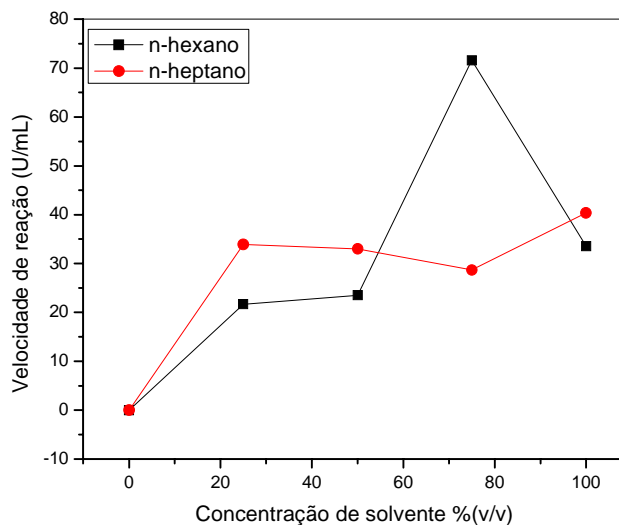


Figura 31 - Estudo do comportamento da atividade enzimática frente a solventes apolares com concentração de solventes apolares % (v/v) à temperatura ambiente ■ n-hexano e ● n-heptano.

O objetivo do experimento realizado no item 5.5.4, foi de verificar o efeito de vários solventes sobre a atividade residual da lipase (CALB L), e investigar qual o comportamento da atividade enzimática residual da CALB L após 30 minutos de incubação com solventes de características diferentes e de razões molares que variaram de 0 a 100 %). Com base nos resultados obtidos foi possível observar que para o metanol

houve um aumento da atividade enzimática residual para aproximadamente 100 % (Figura 30). Esse fato pode ser explicado pelo metanol ser um solvente hidrofílico, ou seja, que contém maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar ligações de hidrogênio. Dessa forma, tende a reter a água essencial das proximidades da enzima, acarretando o aumento da atividade enzimática. Para os solventes mais apolares, pode-se observar que de modo geral ocorre um aumento da atividade enzimática residual da enzima quando incubada quando esses solventes a uma razão molar de solvente e água de 50%. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato das lipases, quando suspensas em solventes hidrofóbicos necessitarem de uma quantidade mínima de água para a sua atividade. De acordo com resultados experimentais, pôde-se visualizar que a atividade enzimática em meio orgânico é primeiramente influenciada, não pelas interações do solvente com a enzima, mas pelas interações com a água ligada à enzima. Para uma dada quantidade de água presente no solvente, a atividade enzimática nos solventes hidrofóbicos é muito maior que nos seus correspondentes hidrofílicos (KLIBANOV, 1997).

Para o etanol houve um incremento da atividade enzimática aproximando a 100% (v/v) solvente, isto é explicado por ser o etanol um solvente hidrofílico, ou seja, solvente que contém maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar ligações de hidrogênio, tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática.

Para o metanol houve uma maior atividade enzimática em relação a todos os 5 solventes estudados, evidenciando que o melhor solvente é o metanol por ter obtido uma maior atividade enzimática residual (Figura 30 e Figura 31).

Para os solventes apolares (n-hexano e n-heptano) o comportamento frente a suas atividades enzimáticas com lipases, teve um comportamento para o n-hexano um incremento de sua atividade enzimática residual próximo de 80% do solvente para o n-heptano um incremento de sua atividade enzimática residual próximo a 100% do solvente isto é explicado na literatura, pelos autores ZAKS e KLIBANOV (1985) constataram que as enzimas suspensas em solventes hidrofóbicos requerem uma quantidade de água substancialmente menor para obtenção de sua atividade máxima quando comparados àquelas suspensas em solventes hidrofílicos. De acordo com resultados experimentais, pôde-se concluir que a atividade enzimática em meio orgânico é primeiramente

influenciada, não pelas interações do solvente com a enzima propriamente dita, mas pelas interações com a água ligada à enzima. Para uma dada quantidade de água presente no solvente, a atividade enzimática nos solventes hidrofóbicos é muito maior que nos seus correspondentes hidrofílicos (KLIBANOV, 1997), este comportamento está ilustrado na (Figura 30).

O comportamento dos solventes polares e apolares pode ser explicado pelo coeficiente de partição dos solventes com a água ou Log P. O coeficiente de partição (P) de um composto é usualmente dado como a razão entre as suas concentrações na fase orgânica e aquosa. Para obter elevadas concentrações de produto é essencial utilizar um solvente orgânico no qual o coeficiente de partição do produto seja alto. Isto implica em uma eficiente extração do produto para a fase orgânica, o que produz uma conversão mais elevada. Os solventes mais adequados são os que apresentam log P maior que 2. Segundo CARTA et al., (1995), a biocatálise de reações de síntese, tais como esterificações, é geralmente considerada possível em solventes imiscíveis em água que apresentam log P maior que 4. Para o estudo neste trabalho procurou-se não usar nenhum solvente apolar na reação de síntese, pois estes são derivados do petróleo e também são muito tóxicos, devido a este fato somente foi utilizado o etanol que é um combustível renovável.

Curiosamente, o etanol acarretou os menores valores de atividade enzimática residual. No entanto, esse fato pode ser compensado pelo baixo custo desse solvente se comparado aos demais e, por ser produzido a partir de matérias primas oriundas de fontes renováveis (30).

5.6. Produção do Biodiesel a Partir do Óleo de Mamona

A obtenção do biodiesel através da transesterificação enzimática do óleo de mamona sem a presença de solvente hidrofóbico (n-hexano) mostrou-se eficiente, com rendimentos superiores a 90% de conversão, tanto com o uso da Novozym 435 e também da CALB L imobilizada em esferas de quitosana como é mostrado nas Figura 32, Figura 33 e 34.

Neste trabalho obtiveram-se excelentes rendimentos comparados aos resultados da literatura (FACCIO, 2004), que obteve uma conversão de 98,0 % de ésteres empregando a

enzima Lipozyme IM e de 73,0% de conversão com Novozym 435 utilizando-se de n-hexano como co-solvente na reação de transesterificação.

O n-hexano não foi utilizado como co-solvente na reação de transesterificação devido à sua elevada toxicidade e não foi o objetivo neste trabalho. O óleo de mamona é muito miscível em álcool etílico, isto é; consequência da presença de grupos hidroxilas em sua constituição química. Este fato não acontece com outros óleos vegetais, pois, o óleo de mamona é o único óleo vegetal que possui hidroxilas em sua estrutura química. Este fato foi um fator determinante na escolha da síntese enzimática do ricinoleato de etila a partir do óleo de mamona.

Em estudo realizado recentemente, envolvendo a alcoólise enzimática do óleo de mamona, na presença de solvente orgânico (n-hexano), (FACCIO, 2004) obteve uma conversão de 98,0 % de ésteres empregando a enzima Lipozyme IM e de 73,0% de conversão com Novozym 435. Este estudo levou em consideração a influência da água, razão molar, temperatura e concentração da enzima na reação.

Os resultados obtidos neste trabalho foram bastante promissores em relação ao uso de enzimas imobilizadas na obtenção de biodiesel de óleo de mamona com a utilização do álcool etílico como reagente da síntese enzimática.

5.6.1. Síntese de biodiesel com a enzima CALB L imobilizada

A síntese de biodiesel com a enzima CALB L imobilizada em esferas de quitosana e o seu reuso foi realizado por 12 ciclos, após cada ciclo as esferas de quitosana eram lavadas com álcool etílico 95 °G.L e utilizadas novamente em outra reação de síntese para a obtenção de biodiesel. Os resultados experimentais de conversão de biodiesel utilizando as esferas de quitosana imobilizadas com CALB L podem ser visualizados na Figura 32.

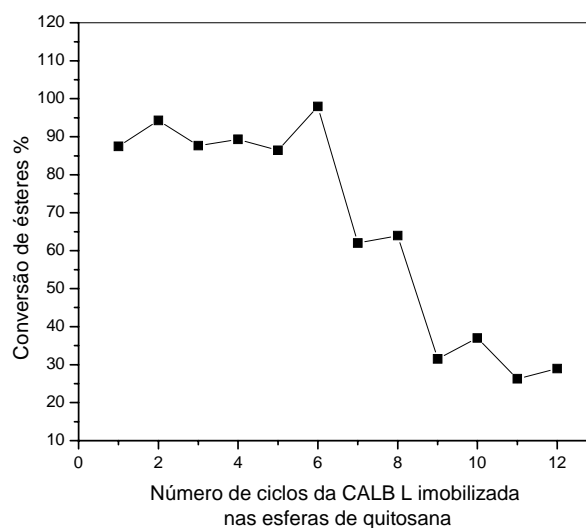


Figura 32 - Conversão de ésteres versus número de ciclos da CALB L imobilizada nas esferas de quitosana ativadas com solução de glutaraldeído 3% (v/v).

Quanto a conversão de ésteres com esferas de quitosana imobilizadas covalentemente com CALB L, houve uma conversão superior a 90% em 6 reusos em 12 ensaios nas condições reacionais descritas anteriormente, mas o seu reuso fica prejudicado com a baixa resistência mecânica das esferas de quitosana, devido a agitação das esferas provocando a quebra das mesmas, isto é constatado com um declínio da atividade enzimática e conseqüentemente da conversão de biodiesel como é mostrado na Figura 33.

5.6.2. Síntese do ricinoleato de etila com a enzima Novozym 435

Foram também realizados experimentos para avaliar a conversão e a possibilidade de reuso da enzima comercial imobilizada. Os experimentos de avaliação de reuso da enzima consistiram em conduzir a reação de transesterificação em um reator tipo batelada. Na seqüência as enzimas foram recuperadas através de um processo de decantação e lavadas com álcool etílico. O mesmo processo foi realizado nos primeiros ensaios por 7 vezes e na segunda etapa de síntese por 14 vezes. O uso da enzima Novozym 435 na produção de ésteres (biodiesel) foi superior a 90% de conversão comparados com resultados obtidos por SHIMADA et al., 1999 e SAMUKAWA et al., 2000 (Figura 33 e 34).

BLANCO e colaboradores fizeram estudo com Novozym 435 em síntese enzimática e esta permaneceu ativa por 15 ciclos com rendimento de 100 % a temperatura de 40 °C.

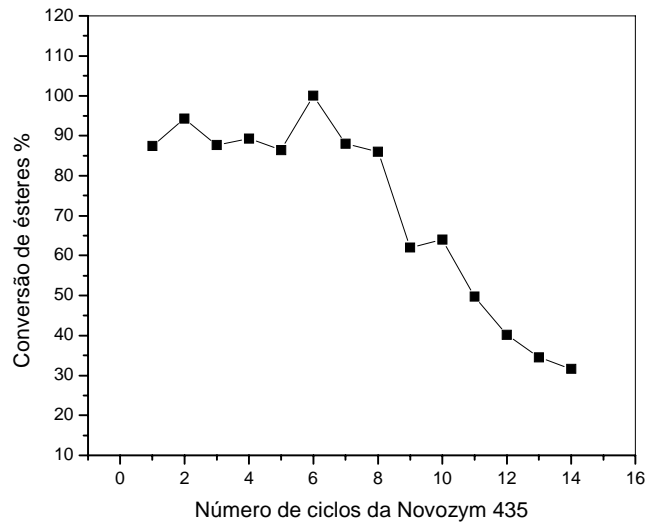


Figura 33 - Conversão de ésteres versus número de ciclos da Novozym 435 imobilizada comercialmente em resina macroporosa.

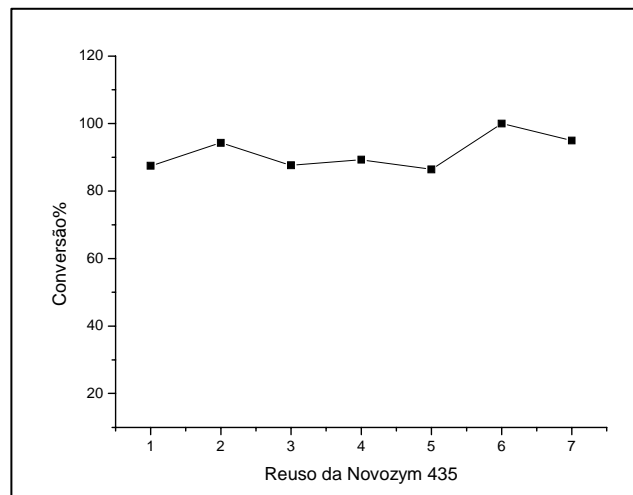


Figura 34 - Conversão de ésteres versus Números de ciclos da Novozym 435.

Em relação ao reuso ou ciclos das esferas de quitosana imobilizadas observou-se que as mesmas não têm uma resistência mecânica muito boa em comparação com a enzima Novozym 435 em microesferas de resina macroporosa. Devido a quebra das esferas de quitosana a com a agitação magnética em reator tipo batelada, houve uma queda substancial da conversão de ésteres e este fato é visualizado na Figura 32. Quanto ao

rendimento da conversão em ésteres as duas enzimas imobilizadas tiveram um comportamento bem parecido nos primeiros 7 ciclos de utilização, obtendo-se valores de 90% de conversão.

Comparando a eficiência da Novozym 435 imobilizada fisicamente em resina macroporosa e da lipase CALB L imobilizada covalentemente em esferas de quitosana, constatou-se que as duas enzimas tiveram um comportamento semelhante quanto ao rendimento para a conversão em ésteres. No número de ciclos ou reusos, a Novozym 435 obteve 14 ciclos e a CALB L imobilizada covalentemente em esferas de quitosana obteve 12 ciclos consecutivos em reator tipo batelada. A explicação para a queda do rendimento está na agitação magnética, fazendo com que o biocatalisador se quebrasse com o atrito entre as mesmas no reator. Na literatura têm reportado que reações em 24 h com óleo de soja na presença de enzima imobilizada de *Candida antarctica*, obteve-se rendimentos de ésteres com rendimentos acima de 90% usando metanol e com reuso de mais de 100 ciclos (WATANABE et.,al 2006).

Neste trabalho foi utilizado o álcool etílico ou etanol como reagente na alcoólise enzimática do óleo de mamona por ser o mesmo abundante como biocombustível no Brasil e não optou-se no uso do metanol por ser muito tóxico e também ser derivado do petróleo. O fato do maior rendimento no número de ciclos no estudo de WATANABE et.,al 2006, está na maior atividade do metanol na presença da enzima lipase e que reação foi realizada em shaker em agitação orbital de 100 rpm.

Neste trabalho foi experimentalmente constatado que as atividades enzimáticas com solventes hidrofílicos, foram menores com etanol, quando comparadas com o uso de com o metanol e butanol. Estes resultados estão reportados na seção 5.5.4 e Figura 30.

5.6.3. Caracterização do biodiesel produzido com a CALB L imobilizada em esferas de Quitosana e Novozym 435

A identificação do produto formado e a conversão dos ésteres foram realizadas por RMN H^1 e cromatografia em fase gasosa e espectroscopia de infravermelho. A conversão de ésteres, por RMN H^1 foi realizado utilizando a metodologia segundo MEHER, SAGAR e NAIK (2004) como é mostrado pela equação 8 adaptada.

$$C = \frac{(A_{EE} + A_{CH_2})}{A_{CH_2}} \quad (8)$$

Onde C , é a conversão de triglicerídeos (TAG) para o correspondente éster etílico; A_{EE} , valor da integração de prótons dos ésteres etílicos (o singlete forte); A_{CH_2} , valor da integração do próton metilênico (carbono metilênico).

No espectro de RMN H^1 do óleo de mamona, se observa entre 4,0 – 4,4 ppm os sinais correspondentes aos hidrogênios ligados aos carbonos “glicerídicos” do triacilglicerol (óleo de mamona) que é ilustrado pelas **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e Figura 36 (TRÄN et al., 1996).

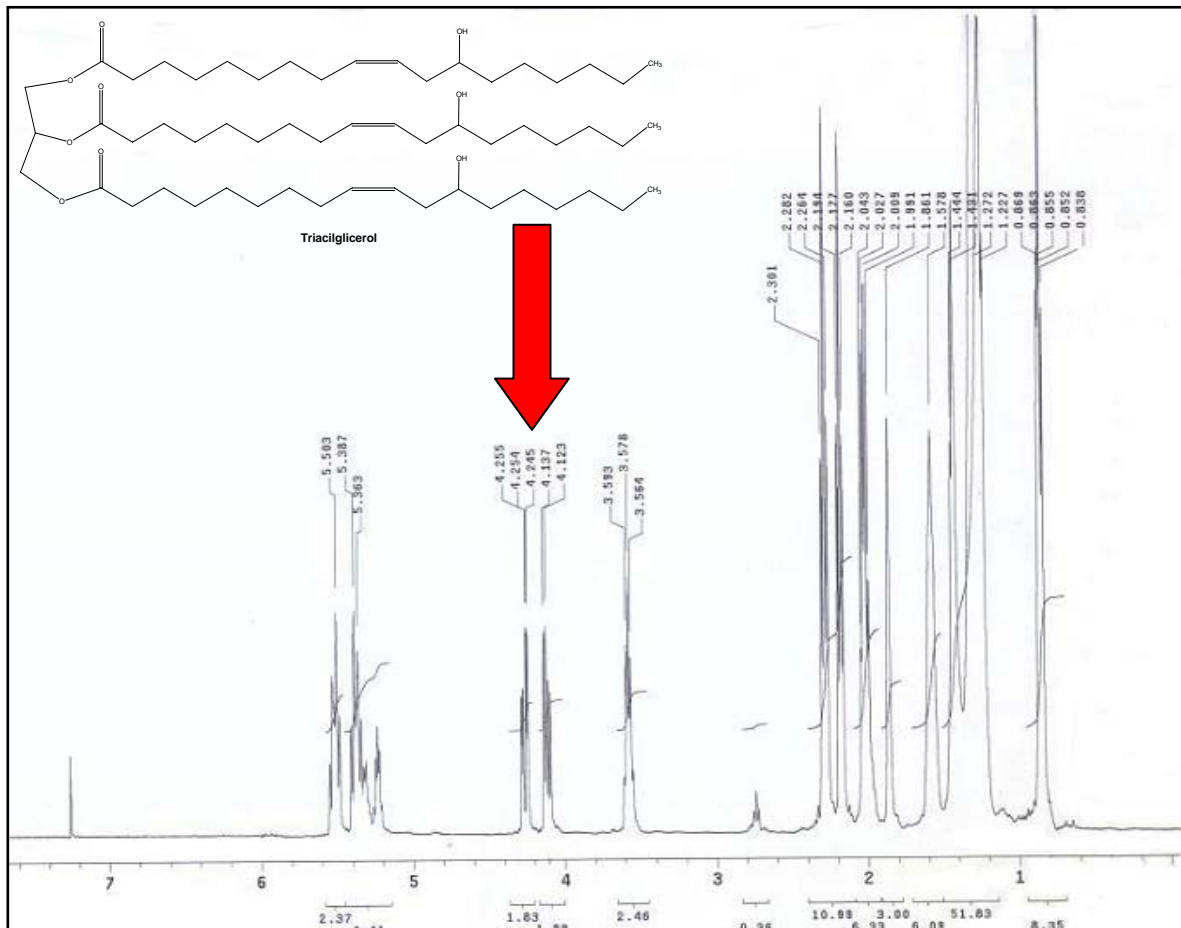


Figura 35 - Espectro de RMN H^1 do óleo de mamona referentes aos sinais de hidrogênios “glicerídicos” entre 4,0-4,4 ppm.

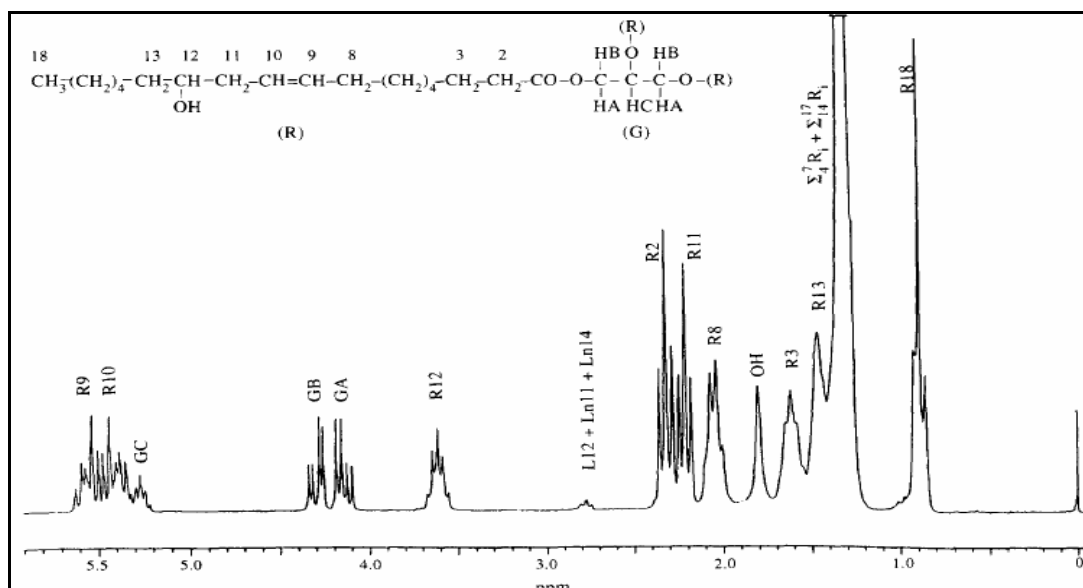


Figura 36 - Espectro de RMN H¹ de óleo de mamona (TRĂN et al., 1996).

Na Figura 36 também foi identificado por RMN H¹ que possui 6 hidrogênios vinílicos e que apresentam como sinal um multiplete na região 5,36 e 5,50 ppm; 3 hidrogênios metílicos, que se apresentam como multiplete na região de 3,56 e 3,59 ppm.

Quanto aos deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos, pode-se observar um duplo dublete em 4,12 e em 4,13 ppm e um duplo dublete em 4,254 e 4,255 ppm. Na Figura 40 é observado um quadripeto em 4,07-4,12 ppm, além dos sinais anteriores identificados para a triricinoleína. Este sinal corresponde a hidrogênio 19 (4,07-4,125 ppm) da etila ligada ao grupamento éster. Pela análise dos espectros verifica-se que a conversão de triricinoleína em ricinoleato de etila. Os hidrogênios metilênicos apresentam como deslocamento um multiplete entre 2,014 e 2,280 ppm. Na região entre 1,196 até 1,589 ppm, observa-se um multiplete atribuídos aos hidrogênios metilênicos, os hidrogênios metilênicos apresentam um tripleto na região de 0,86 ppm.

Na Figura 37 observa-se o espectro de RMN H¹ do ricinoleato de etila, onde na região citada acima, observa-se apenas um sinal em 4,10 ppm, em forma de quarteto correspondentes aos hidrogênios metilênicos ligados ao oxigênio do éster. Este sinal é a principal diferença entre os espectros do reagente de partida (triacilglicerol) e do produto

formado (ricinoleato de etila) caracterizando a formação dos ésteres. Abaixo estão representados os principais deslocamentos químicos para o ricinoleato de etila :

RMN H^1 ($CDCl_3$, 400 MHz, TMS) δ : 0,90 (t, 3H, $-CH_3$); 1,20 (t, 3H, $-CH_3$); 1,30 - 2,4 (m, 24H, $-CH_2$); 3,55 (t, 2H $-C(=O)-CH_2-$); 3,69 (m, 1H, $-CH(OH)-$); 4,10 (q, 2H, $-C(=O)-O-CH_2-$); 5,50 (2d, 2H, $-HC=CH-$).

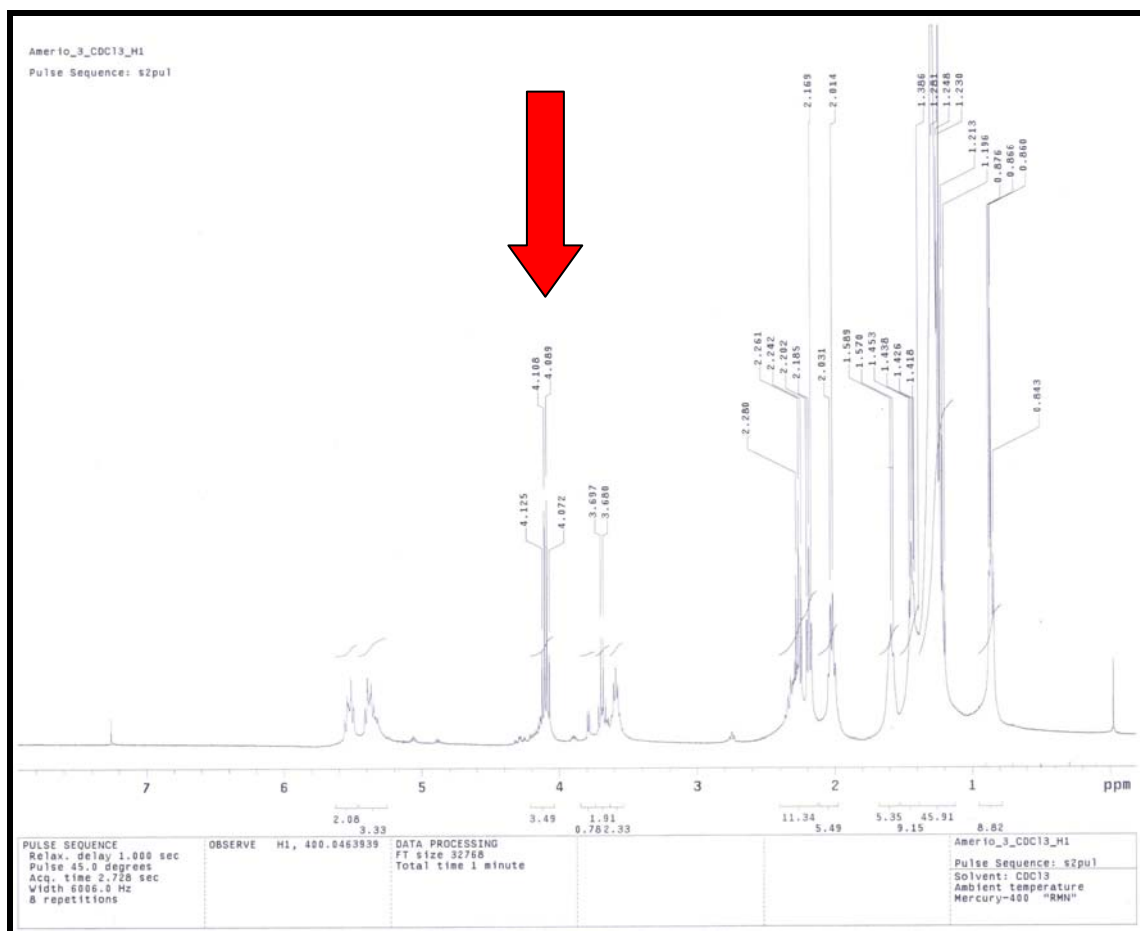


Figura 37 - Espectro de RMN H^1 de ricinoleato de etila (biodiesel) em 4,10 ppm, em forma de quarteto correspondente aos hidrogênios metilênicos ligados ao oxigênio do éster.

5.6.3.1. Análise de FT-IR do óleo de mamona e do ricinoleato de etila

Os espectros de FT-IR indicaram uma banda nítida e intensa na região de (1750-1450) cm^{-1} referente à frequência de estiramento do grupo carbonila (CO) característicos dos ésteres (Figura 38). Nos espectros do produto da reação há uma outra banda de

absorção nítida no comprimento de onda de 3410 cm^{-1} , referente à deformação axial do grupo O-H, característico dos ácidos graxos como é ilustrado na Figura 39.

E também que esta banda é muito intensa no espectro estiramento de carbono alifático $\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH}$ na região ($3000\text{-}2830\text{ cm}^{-1}$); 1460 cm^{-1} referente a deformação axial de C-C; 1243 cm^{-1} referente a deformação angular no plano de C-O-H; 1180 cm^{-1} referente a deformação angular simétrica fora do plano de O-H; 725 cm^{-1} referente a deformação angular assimétrica no plano do metileno.

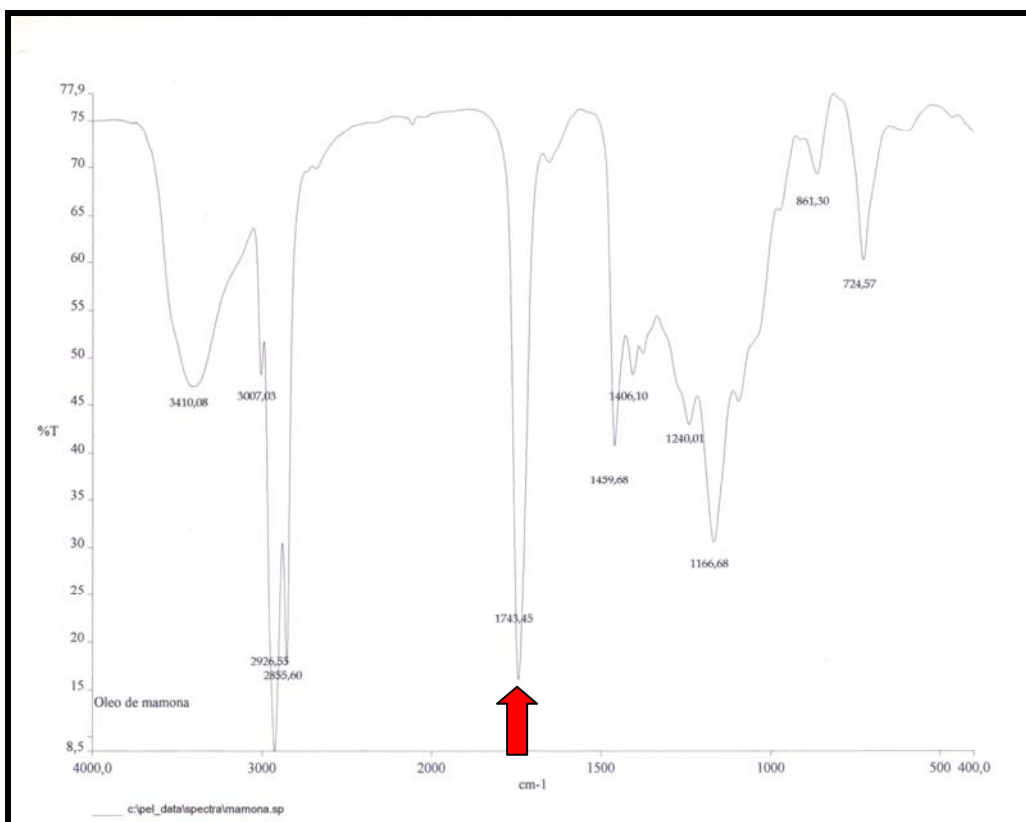


Figura 38 - Espectro de FT-IR onde se observa uma banda nítida e intensa na região de $1750\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ referente à frequência de estiramento do grupo carbonila (CO) característicos dos ésteres (biodiesel).

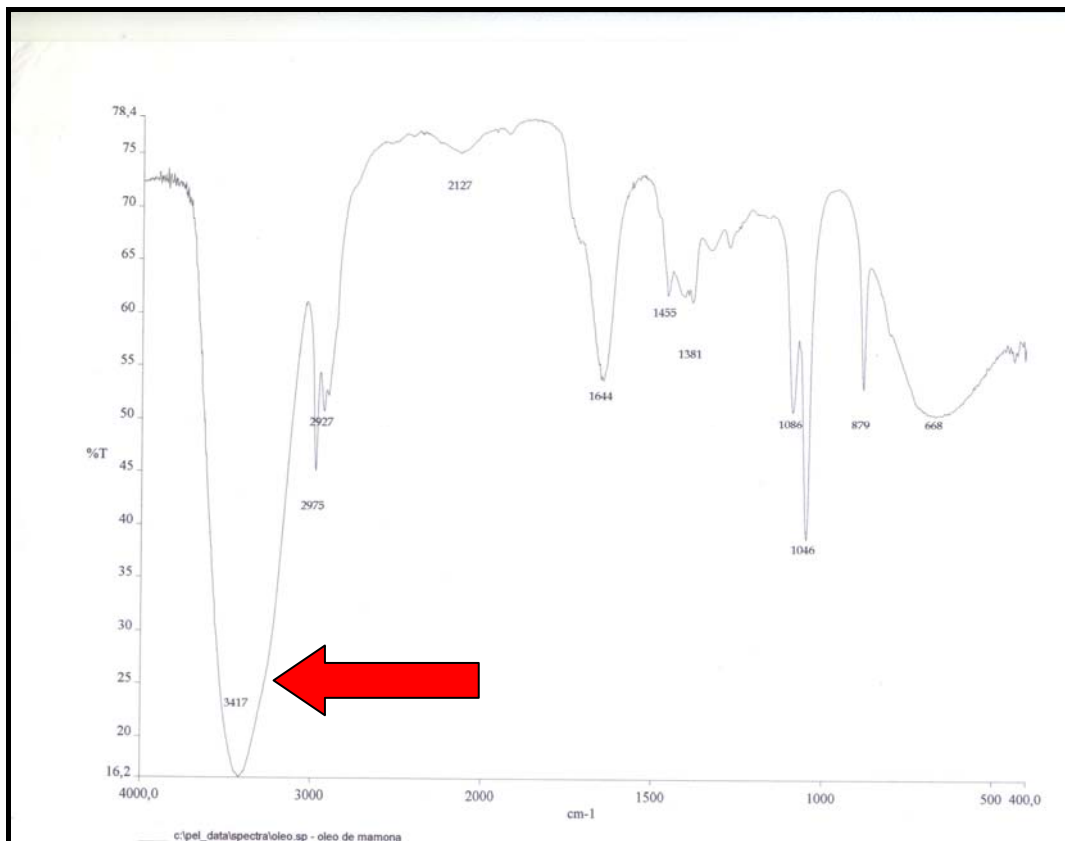


Figura 39 - Espectro de FT-IR de uma banda de absorção nítida na região de 3417 cm^{-1} , referente à deformação axial do grupo O-H, característico do ácido ricinoleico, principal componente do biodiesel da mamona.

Em relação aos resultados obtidos com o uso de RMN ^1H para a caracterização dos ésteres e principalmente na quantificação, esta técnica analítica mostrou-se muito eficiente para quantificação na conversão dos ésteres do biodiesel etílico de óleo de mamona. A técnica de FT-IR só foi usada neste trabalho para análise qualitativa na identificação dos principais grupos funcionais do produto.

5.6.3.2. Reologia do óleo de mamona e do biodiesel

A reologia é denominada de *rheo-deformação* e *logya-ciência*, ou seja, reologia é definida como ciência que estuda o modo pelo qual a matéria se deforma ou escoar, quando submetidas a forças externas (MACHADO, 1996). Conforme TOLEDO (1991), é a ciência que estuda a resposta de um material à aplicação de uma tensão ou deformação. A variação contínua da taxa ou grau de deformação em função das forças ou tensões aplicadas, caracteriza um escoamento (MACHADO, 1996).

Nos últimos tempos, a reologia tem ganhado um importante significado, em consequência da elevação da concorrência e dos custos que fazem com que as indústrias busquem métodos de controle de qualidade no processamento, e se possível, predizer as qualidades dos novos produtos, já durante seu desenvolvimento.

Assim, o conhecimento reológico dos produtos é essencial para várias aplicações, entre as quais projetos e avaliação e controle de qualidade. Este comportamento poderá, ainda dimensionamento de uma bomba, filtros e tubulações.

Segundo MORETO e FETT (1998) a viscosidade aumenta com o comprimento das cadeias dos ácidos graxos dos triglicerídeos e diminui quando aumenta a insaturação; é portanto, função das dimensões das moléculas e de sua orientação, ou seja, aumenta a hidrogenação.

A viscosidade relativamente alta dos óleos, superior ao da água, se deve às atrações intermoleculares das grandes cadeias dos ácidos graxos, que constituem os triglicerídeos. Em geral as viscosidades dos óleos decrescem ligeiramente com o aumento da insaturação, pois a hidrogenação provoca um pequeno aumento da viscosidade. Conforme COSTA NETO et al., (2000) em estudos de especificações de alguns óleos vegetais “in natura” encontraram viscosidade de 296,87 mPa.s para o óleo de mamona a uma temperatura de 37,8 °C, maior viscosidade encontrada quando comparadas aos óleos de babaçu, dendê e pequi, característica atribuída a presença de um maior teor de hidróxi-ácidos no óleo de mamona. Comparados com os resultados de TICIANA (2006) e COSTA NETO et al., (2000) o óleo de mamona comercial da Aboissa Óleos Vegetais Ltda tiveram resultados parecidos a 35 °C, com valor de 262,0 mPa.s.

Os óleos que contêm ácidos graxos de baixa massa molecular são ligeiramente menos viscosos que os com alta massa molecular, mas como em outros líquidos, nos óleos, também a viscosidade diminui com o aumento da temperatura, havendo uma relação linear entre o logaritmo da viscosidade e o da temperatura.

5.6.3.3. Comportamento reológico do biodiesel

Foi realizada uma análise de reologia para a determinação da viscosidade cinemática do óleo de mamona comercial e do biodiesel produzido. Amostras contendo

diferentes quantidades do éster foram submetidas à análise da viscosidade em um reômetro Rheotest 2.1 em diferentes temperaturas visando estabelecer uma relação da quantidade de éster com a viscosidade e a temperatura. A 20 °C, as viscosidades do óleo puro de mamona e do biodiesel com 90% de ésteres foram de 945 mPa.s e 739 mPa.s, respectivamente. O comportamento da viscosidade do óleo de mamona e do biodiesel diminuíram diretamente proporcional ao inverso da temperatura, apresentando um valor de R^2 de 0,9976. Esta técnica mostrou-se eficiente e relativamente rápida e de baixo custo na avaliação do rendimento da reação de esterificação.

A Figura 40 apresenta o comportamento reológico do óleo de mamona a temperatura de 25°C e o modelo da lei da potência foi ajustado para determinação do índice de consistência (k) e índice de comportamento de escoamento (n).

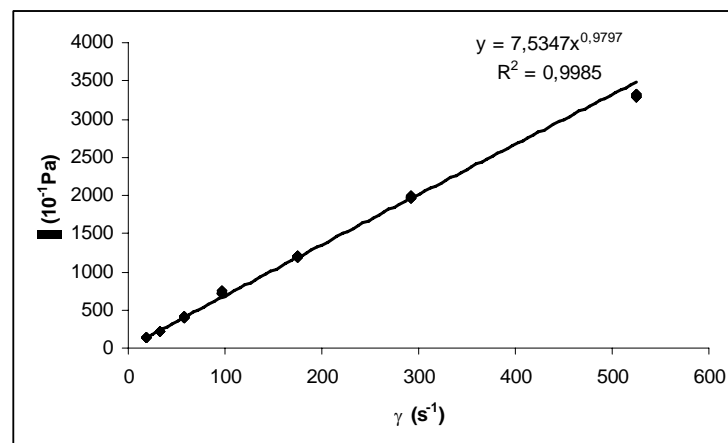


Figura 40 - Determinação da viscosidade do óleo de mamona a 25°C e 35°C.

Através da Figura 40 pode-se verificar que a viscosidade do óleo de mamona a 25°C foi de 629,74 mPa.s. Os valores para o índice de consistência foi de 75,347 Pa.sⁿ e o índice de comportamento de 0,9797, demonstrando comportamento Newtoniano, uma vez que a viscosidade não sofreu variação com o gradiente de velocidade aplicado sobre a amostra do óleo de mamona. Com base nestes resultados, foi determinado o comportamento do biodiesel e do óleo de mamona a diferentes temperaturas, conforme apresentado na Figura 41.

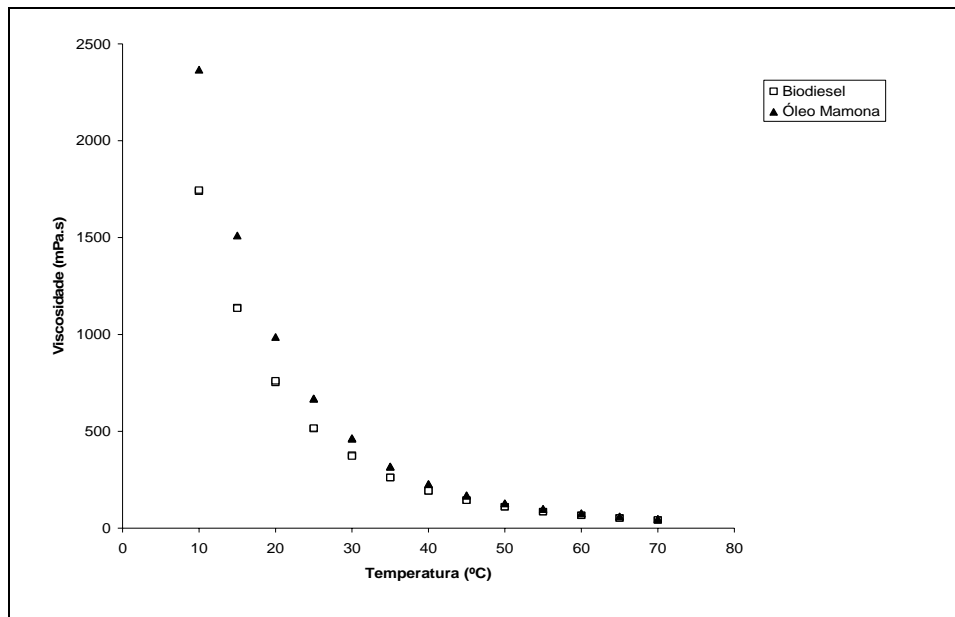


Figura 41 - Comportamento reológico do biodiesel e do óleo de mamona a diferentes temperaturas.

Pode-se verificar através da Figura 41 que para todas as temperaturas o biodiesel apresentou valores de viscosidade menores que o óleo de mamona, como era esperado, uma vez que o biodiesel é produzido através da reação do óleo de mamona com álcool etílico. Verifica-se também, através dos resultados obtidos que a viscosidade apresenta variação linearmente com o inverso da temperatura tanto para o biodiesel quanto para o óleo de mamona. A temperatura de 25°C a viscosidade do biodiesel foi de 516 e do óleo de mamona foi de 630 mPa.s.

A presença de um maior teor de hidroxiácidos no óleo de mamona se reflete nas suas propriedades coligativas, como a viscosidade. O biodiesel de mamona apresenta calor de combustão comparável ao diesel mineral e alta viscosidade. A mistura de biodiesel de mamona com diesel mineral corrigirá a viscosidade. Além disso, reduzirá o consumo de derivados de petróleo e minimizará os efeitos ambientais.

6. CONCLUSÕES

A metodologia utilizada para confecção das esferas de quitosana por banho de precipitação mostrou-se eficiente, porém alguns problemas de resistência mecânica ocorreram antes e após a funcionalização com glutaraldeído. Com o aumento da concentração de glutaraldeído as esferas de quitosana mostraram-se mais resistentes porém mais quebradiças.

Na determinação da massa molecular média o método viscosimétrico foi eficiente encontrando um valor de 83,59 KDa. O grau de desacetilação foi avaliado pelo método titulométrico com o valor de 72,45 %. Para a análise dos grupos funcionais da quitosana, foi utilizado o método de FT-IR, onde foi constatado os principais grupamentos funcionais. Na análise de BET, área superficial específica obteve um valor de 4,86 m²/g. Para as microesferas macroporosas de Novozym 435 obteve-se um valor de área superficial específica (BET) de 85,36 m² /g que é um valor equivalente ao vidro de porosidade controlada (ROGALSKI et al., 1995) e sua isoterma tem comportamento tipo Langmuir.

Na Caracterização das esferas de quitosana ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído no que diz respeito às características de superfície utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível constatar por esta técnica que houve um recobrimento da superfície das esferas de quitosana pela enzima lipase CALB L, através da funcionalização com glutaraldeído a 3% (v/v) e subsequente ligação covalente.

No estudo da imobilização da enzima Lipozyme CALB L em esferas de quitosana com agente funcionalizante (glutaraldeído), constatou-se que a melhor concentração obtida foi de 1 e 3% (v/v) isto significa que para as concentrações de glutaraldeído menores (1 e 3%) há uma melhor eficiência da ligação covalente da enzima lipase CALB L nas esferas de quitosasa, isto foi avaliado através de análise de atividade enzimática residual do sobrenadante e também pelo método de proteínas totais (BRADFORD,1976). Isto significa que para as concentrações de glutaraldeído menores (1 e 3%) há uma melhor eficiência da ligação covalente da enzima lipase CALB L nas esferas de quitosasa. Este comportamento é apresentado na Figura 21.

Quanto à eficiência de imobilização covalente das enzimas nas esferas de quitosana imobilizadas covalentemente com glutaraldeído, são ótimas por possuírem em sua constituição química grupos amino ($-\text{NH}_2$), isto confere a este suporte uma excelente funcionalização com a enzima. Em relação à resistência mecânica é baixa e também observou-se em relação a enzima suportada em resina macroporosa (Novozym 435), que a resistência mecânica no seu reuso também ocasiona uma quebra entre as mesmas devido ao atrito com agitação magnética no reator.

Estudou-se também o comportamento da lipase CALB L frente a valores de pHs de temperaturas (30 a 100°C) e concluiu-se que o melhor valor de pH foi o valor de pH 9,0 tanto para a CALB L imobilizada covalentemente em esferas de quitosana e de Novozym 435 imobilizada em resina macroporosa. Quanto à temperatura, concluiu-se que as lipases Lipozyme CALB L e Novozym 435 são muito termoestáveis a temperaturas superiores a 90°C . Mas verificou-se também que houve uma boa faixa de temperatura para as duas enzimas estudadas.

Para os solventes apolares (n-hexano e n-heptano) o comportamento frente a suas atividades enzimáticas com lipases, teve um comportamento para o n-hexano um incremento de sua atividade enzimática residual próximo de 80% do solvente para o n-heptano um incremento de sua atividade enzimática residual próximo a 100%.

Quanto a cinética foram realizados ensaios para a lipase livre CALB L com o substrato p-NPP e obteve-se valores de $K_M = 242,63 \mu\text{M}$ e $V_M = 807,72 \mu\text{mol/s}$ e observou-se um comportamento tipo Michaelis-Menten da velocidade da reação enzimática frente ao substrato p-NPP.

Estudou-se o comportamento cinético da hidrólise do p-NPP catalisada pela enzima Lipozyme CALB L utilizando cinco solventes: metanol, etanol, butanol, n-hexano e n-heptano. Para os solventes hidrofílicos, metanol, etanol e butanol o comportamento cinético observado que o metanol obteve valores melhores de atividade enzimática. Curiosamente, o etanol acarretou os menores valores de atividade enzimática residual. No entanto, esse fato pode ser compensado pelo baixo custo desse solvente se comparado aos demais e, por ser produzido a partir de matérias-primas oriundas de fontes renováveis (Figura 31).

Avaliou-se os efeitos do uso repetido sobre a atividade residual das duas enzimas imobilizadas que foram bastante promissoras, pois realizou-se o reúso da CALB L imobilizada em esferas de quitosana por 12 vezes e que houve um decréscimo da conversão em ésteres, devido a quebra das mesmas por atrito no reator, mas valores excelentes de conversão de biodiesel maiores de 90%. Para a enzima lipase Novozym 435, as microesferas também sofreram a quebra em 14 reúsos, devido ao atrito da agitação magnética no reator, conseqüentemente um esfarelamento das mesmas e com o decréscimo da sua atividade enzimática. Os valores de conversão de biodiesel foram excelentes com valores superiores à 90% de conversão.

Na caracterização do óleo de mamona e dos ésteres formados utilizaram-se as técnicas instrumentais de RMN H^1 , FT-IR, (CG) cromatografia em fase gasosa e de reologia. Em relação aos resultados obtidos com o uso de RMN H^1 para a caracterização dos ésteres e principalmente na quantificação, esta técnica analítica mostrou-se muito eficiente para quantificação na conversão dos ésteres do biodiesel etílico de óleo de mamona. A técnica de FT-IR só foi usada neste trabalho para análise qualitativa na identificação dos principais grupos funcionais dos ésteres (biodiesel).

Essas técnicas foram muito eficazes para o acompanhamento dos ésteres formados. Vale a pena ressaltar que, uma das particularidades desse trabalho foi o fato do mesmo não utilizar qualquer espécie de solvente apolar. Dessa forma, os resultados obtidos indicam que existe grande viabilidade no uso de enzimas imobilizadas na produção obtenção de biodiesel de mamona sem solventes orgânicos apolares, levando-se em consideração seu baixo custo e alto rendimento de biodiesel obtido.

No estudo da reologia do óleo de mamona e do biodiesel etílico de óleo de mamona, observou-se um comportamento Newtoniano. Verifica-se também, através dos resultados obtidos que a viscosidade apresenta variação linearmente com o inverso da temperatura tanto para o biodiesel quanto para o óleo de mamona. A temperatura de 25°C a viscosidade do biodiesel foi de 516 e do óleo de mamona foi de 630 mPa.s.

A presença de um maior teor de hidroxiácidos no óleo de mamona se reflete nas suas propriedades coligativas, como a viscosidade. O biodiesel de mamona apresenta calor de combustão comparável ao diesel mineral e alta viscosidade. A mistura de biodiesel de

mamona com diesel mineral corrigirá a viscosidade. Além disso, reduzirá o consumo de derivados de petróleo e minimizará os efeitos ambientais.

A viabilidade do uso de enzimas imobilizadas na produção de biodiesel de mamona sem solventes orgânicos é promissora, tendo em vista, o grau de desenvolvimento em que se encontra a produção de lipases geneticamente modificadas para o uso em síntese orgânica.

7. PROPOSTAS FUTURAS

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, algumas sugestões para trabalhos futuros podem ser apontadas em relação a uma maior exploração na condução do processo de alcoólise enzimática:

- Imobilização física e química de lipases em suportes inorgânicos.
- Estudo de um suporte inorgânico com uma maior área superficial, visando ter uma melhor qualidade mecânica do material empregado.
- Uso de reator contínuo com enzima imobilizada para produção de biodiesel;
- Produção enzimática de ésteres em solvente orgânico:
- Uso de vários solventes orgânicos e da quantidade ao meio reacional para a conversão de biodiesel;
- Uso de vários óleos vegetais na alcoólise enzimática;
- Avaliação do número de ciclos em que a enzima imobilizada possa ser utilizada sem perda considerável da atividade;
- Modelagem cinética dos dados experimentais obtidos;
- Controle cinético no desenvolvimento da reação enzimática;
- Criação de uma metodologia analítica por meio de reologia do produto formado quanto a conversão (%) de biodiesel;
- Avaliação do biodiesel obtido quanto às especificações que regulamentam o uso do produto como aditivo ao óleo diesel;
- Avaliação do biodiesel produzido em um motor de ciclo diesel quanto: a) desempenho do motor; b) análise da composição dos gases;
- Uso da análise estatística no estudo do comportamento de variáveis como: concentração de enzima, concentração de água adicionada, temperatura e razão molar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMIEC, J., MODRZEJEWSKA, Z. Sorptivity and structural characteristics of spray-dried chitosan microparticles. In: **Proceedings of the 14th International Drying Symposium**. São Paulo, Brazil, 22-25 August 2004, vol B, p. 1510-1517.

ADRIANO, W.S. et al. Stabilization of penicilium g acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v.22, p.529-538, 2005.

ALSARRA, I.A. et al. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. **Biomaterials**, New York, v.23, p.3637-3644, 2002.

AMORIM, R.V.S. et al. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, New York, v.89, p.35-39, 2003.

ANDERS MAGNUSSON, **Rational redesign of *Candida antarctica* lipase B**, Doctoral dissertation from the School of Biotechnology, Department of Biochemistry, Royal Institute of Technology, KTH, Alba Nova University Center, Stockholm, Sweden, May 2005.

BELL, G., JANSSEN, A.E.M., HALLING, P. Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 20, p.471-477, 1996.

BERGAMASCO, R. et al. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v.17, p.4-7, 2000.

BLANCO, R.M. et al. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization characterization of the support and the catalysts. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, New York, v.30, p.83-93, 2004.

BONN, E.P.S e PEREIRA JR, N. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro; Fundação Biblioteca Nacional; 113 p.;1999.

BROUSSIGNAC, J. Un hault polymere natural per connum dans l'industrie le chitosan, **Chimie et Industrie-Genie Chimique**, Paris, v.99, p.1241-1249, 1972.

BURIN, A. M. e FONTOURA, P. S. G. Extração da Gordura Intestinal de Bovinos por Meio Enzimático; **Bol. CEPPA**. V. 12; n.2; 89-94;1994.

CAMPANA, S.P.; DESBRIÈRES, J. Chitin, Chitosan and Derivatives. **Natural Polymers and Agrofibers Composites**; E. Frollini; A.L Leão; L.H.C. Mattoso eds. USP; UNESP; EMBRAPA. P..41-71, 2000.

Caracterização do biodiesel de óleo de Rícino Produzido por Biocatálise com Enzima Lipozyme IM, II Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, óleos, gorduras e Biodiesel.

CARTA, G.; GAINER, J. L e ZAIDI, A. Fatty acid esterification using nylon immobilized lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, pp. 601-605, 1995.

CASA, R. et al. Reduction of the phenolic components on olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum Desf.*) germinability. **Chemosphere**, London, v.50, p.959-966, 2003.

CETINUS, S.A., ÖZTOP, H.N. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v.32, p.889-894, 2003.

CETINUS, S.A., ÖZTOP, H.N. Immobilization of catalase on chitosan film. **Enzyme and Microbiol Technology**, New York, v.26, p.497-501, 2000.

CHIBATA, I. **Immobilized enzymes**. New York, Interscience Publishers, 1972.

CHIOU, S., WU, W. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, New York, v.25, p.197-204, 2004.

CHULALAKSANANUKUL, W., CONDORET, J. S. e COMBES, D. Geranyl acetate synthesis by lipase catalized transesterification in supercritical carbon dioxide. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 15, pp. 691, 1993.

COSTA NETO, P. R. **Estudos Preliminares sobre Alterações e Purificação do Óleo de Soja Usado em Frituras Múltiplas**. Curitiba, 114 p. Dissertação de Mestrado; Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química da Universidade Federal do Paraná; 1993.

COSTA, L.T. **Características Físicas e Físico-químicas do óleo de duas Cultivares de Mamona**, Ticiania Leite Costa, Dissertação de mestrado em Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, 2006.

CYGLER, M.; GROCHULSKI, P.; KAZLAUSKAS, R. J.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; RUBIN, B.; SERREQUI, A. N.; GUPTA, A. K.; A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases, **Journal American Chemical Society**, v. 116, p. 3180-3186, 1994.

D.L.PAVIA, G.M.LAMPMAN AND G.S.KRIZ, Jr., **Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry**, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1979.

D'ANNIBALE, A. et al. Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. **Process Biochemistry**, New York, v.34, p.697-706, 1999.

DALANOY, G., LI, Q., YU, J. Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, London, v.35, p.89-95, 2005.

DALLA-VECCIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. **Química Nova**. v. 27, n. 4, 2004. 623 – 630.

D'ANNIBALE, A. et al. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. **Journal of Biotechnology**, New York, v.77, p.265-273, 2000.

DELANOY, G., LI, Q., YU, J. Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, London, v.35, p.89-95, 2005.

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

DUARTE, M.L. et al. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR espectroscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, London, v.31, p.1-8, 2002.

DUARTE, M.L. et al. Determination of the degree of acetylation of chitin materials by ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy. **Biological Macromolecules**, New York, v.28, p. 359-363, 2001.

FACCIO, C. **Estudo da Produção de Ésteres Etílicos a partir da Alcoólise de Óleos Vegetais**, Dissertação de mestrado, Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, URI -Erechim, RS, 2004.

FACCIO, C.; DALLA ROSA, C.; BENDER, J.P; LIPKE, N.;MENOCIN, S.; AMROGINSK,C; OLIVEIRA, D; DI LUCCIO, M. E OLIVEIRA, J.V.; **Utilização de Óleo de mamona como Substrato para a Produção enzimática de Biodiesel em n-hexano**, SINAFERM 2002-Florianópolis-SC.

FACIOLI, N. L. e GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via enzimática da Composição Triglicerídica do Óleo de Pequi; **Química Nova**; 21(1); 16-19; 1998.

GOY, R.C.; ASSIS, O.B.G.; CAMPANA-FILHO, S.P. Produção de esferas de quitosana. **Revista Brasileira de Biotecnologia**, São Paulo, v.33, p.30-34, 2004.

HALLING, P. J. High-Affinity Of Water By Proteins Is Similar In Air And In Organic Solvents”. **Biochemistry Biophysics Acta**, V. 1040, PP.225, 1990-a.

HALLING, P. J. Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: predictions of effects on equilibrium position. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, n.7, pp. 691-701, 1990 – b.

HUNG, T. et al. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, New York, v.26, p.69-78, 2003.

ILLANES, A. **Biotecnologia de enzimas**. Ediciones Universitárias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 1994.

JESUS, P.C. **Enzimas imobilizadas em Crisotila e Organo-Gel: aplicação na resolução de ácidos racêmicos**, Tese. 1998. 125f. (Doutorado em química)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

JÚNIOR, O.A.C.M. **Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana**. 1999. 113f. Tese (Doutorado em química) - Universidade Estadual de Campinas - Campinas.

KLIBANOV, A. M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water ? **Trends in Biochemical Science**, v. 15, p.97-101, 1997.

KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. **Trends in Biochemical Science**, v. 14, pp. 141-144, 1989.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.35, p.126-139, 2004.

LANGONE, M. A. P.**Síntese de triglicerídeos catalisada por lipase**. Tese de D. Sc. COPPE /UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,1998.

LAVERTU, M. et al. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York , v.32, p.1149-1158, 2003.

LIN, H. et al. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.31, p.588-592, 2002.

MAMORU ISO, BAOXUE CHEN, MASASHI EGUCHI, TAKASHI KUDO, SUREKHA SHRESTHA. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.16, p. 53-58, 2001.

MARÍA, D. P.; OERLEMANS, C. C.; TUIN, B.; BARGEMAN, G.; DER MEER, V. A.; GEMERT, V. R. **Biothechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. Review** . Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 37 (2005) 36-46.

MARTINEZ, M.; TORRANO, E. e ARACIL, J. Na Analogue of jojoba oil. A statistical approach. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 27, pp. 2179-2182, 1988.

MATHUR, N.K., NARANG, C.K. Chitin and Chitosan, versatile polysaccharides from Marine Animals. **Journal of Chemical Education**, New York, n.11, v.67, (1990) p. 938-942.

MATHUR, N.K., NARANG, C.K. Chitin and Chitosan, versatile polysaccharides from Marine Animals. **Journal of Chemical Education**, New York, n.11, v.67, (1990) p. 938-942.

MEHER, L.C. et al. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v.10, p. 248-268, 2006.

MITTELBACH M. Lipase Catalysed Alcoholyses of Sunflower Oil, **Journal American Oil Chemical Society**. V.67; n.3; 168 -170; 1990.

MITTELBACH M. Lipase Catalysed Alcoholyses of Sunflower Oil, **Journal American Oil Chemical Society** , v.67; n.3; 168 -170; 1990.

MITTELBACH, M.; In: Commercialization of Biodiesel: producing a Quality Fuel; Conference Proceedings; Boise, Idaho,USA; 09 a 10 de Julho 1997; p.125.

MITTELBACH, M.; In: Commercialization of Biodiesel: producing a Quality Fuel; Conference Proceedings; Boise, Idaho,USA; 09 a 10 de Julho 1997; p.125.

MONOT, F. La catalyse enzymatique in milieu organique. **Revue de L' institute Français du Pétrole**, v. 49, n.2, pp.187-208, 1994.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.W.V. **Manual de soluções, reagentes e solventes.** Padronização, preparação e purificação. Ed. Edgard Blüchner Ltda, São Paulo, SP, p.627,1995.

MORRISON, Robert; BOYD, Robert. **Química Orgânica.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

National Biodiesel Board; In: Anais do Congresso Internacional de Biocombustíveis Líquidos; Instituto de Tecnologia do Paraná; Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Curitiba, PR, Brasil; 19 a 22 de Julho,1998; p.42.

NELSON, L. A., FOGLIA, T. A.; and MARMER, W.N. Lipase-Catalysed Production of Biodiesel; **Journal American Oil Chemical Society.** v. 73; n.8; 1191-1195;1996.

NODA, T., FURUTA, S., SUDA, I. Sweet potato beta-amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuous production of maltose. **Carbohydrate polymers,** New York, v.44, p.189-195, 2001.

Obtenção de Ésteres Alquílicos (Biodiesel) por Via Enzimática a Partir do Óleo de Soja, Pedro Ramos da Costa Neto, Tese de Doutorado em Química, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSC, 2002.

OGUNNIYI, S.D., Review Paper, Castor oil: A vital industrial raw material. **Bioresource Technology,** v.97, p.1086-1091, 2006.

OLIVEIRA, D. **Estudo comparative da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solvente orgânico e CO₂ supercrítico.** Tese de D. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro-COPPE, RJ, Brasil,1999.

OLIVEIRA, D.; ALVES, T.L.M. A kinetic study of lipase catalysed alcoholysis of palm kernel oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 84-86, pp. 59-68, 2000.

OLIVEIRA, D.; ALVES, T.L.M. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oils. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 77-79, pp. 835-844, 1999.

OLIVEIRA, D. ; OLIVEIRA, J. V. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexano and SCO₂. **The Journal of Supercritical Fluids,** v. 19, pp. 141-148, 2001.

OYRTON, A.C., MONTEIRO, Jr., AIROLDI. C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal Biological Macromoleculas**, New York, v.26, 119-128, 1999.

PECNIK, S. AND KNEZ, Z. ENZIMATIC FATTY ESTER SYNTHESIS; **Journal American Oil Chemical Society**.V.69; N.3; 261-265; 1992.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHEM, H. M. Biodiesel. Um projeto de Sustentabilidade Econômica e Sócio-ambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.31, Julho/Dezembro, 2003. 28 – 37.

Regeneration of Immobilized *Candida antarctica* Lipase for Transesterification, JECH-WEI and WEN-TENG WU, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.95, p.466-469, 2003.

REVIEW: Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils, HIDEKI FUKUDA, AKIHIRO KONDO, HIDEO NODA, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, V.92, No.5, p.405-416, 2001.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal Biological Macromoleculas**, New York, v.15, p. 281–285, 1993.

RODRIGUES, D.S. et al. Imobilização covalente da Lipase de *Candida antarctica B* em quitosana-glioxil. . In: **XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Recife. **Anais**. Recife. UFPE, 2005. 1 CD-ROM.

ROMERO, D.M et al. A kinetic study isoamy acetate synthesys by immobilized lipase-catalysed acetylation in n-hexane. **Journal Biothechnology** , v.127 p. 269-277, 2007.

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

SANDFORD, P.A.; HUTCHINGS, G.P. **Chitosan-a natural cationic biopolymer: commercial applications. Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/ Proper Relations and Applications.** Amsterdam: Elsevier Science, 1987.

SANTOS, J.E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, São Paulo, v.13, p.8-12, 2003.

SCHNEIDER, R.C.S. **Extração, caracterização e transformação do óleo de rícino.** Tese de doutorado, UFRGS/Instituto de Química, Porto Alegre, RS, Brasil, 2003.

SELMİ, B.; GONTIER, E.; ERGAN, F. e THOMAS, D. Enzymatic synthesis of tricaprylin in a solvent-free system: Lipase regioespecificity as controlled by glycerol adsorption on silica gel. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 8, p. 543-547, 1997.

SERCHEL, R. and VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review, **Journal Brazilian. Chemical Society**, v. 73; n.8 ; p.1191-1195, 1996.

SHIGEMASA, Y. et al. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **International Biological Macromoléculas**, New York, v.18, p.237-242, 1996.

SHIMADA, Y., WATANABE, Y., SAMUKAWA, T., FUKUDA, H., and TOMINAGA, Y.; Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal American Oil Chemical Society**, v.76, p.789-793, 1999.

SILVERSTEIN, G.C. BASSLET AND T.C. MORRIL, Spectrometric Identification of Organic Compuunds, 3 rd ed., J. Wiley ed., J. Wiley and Son, inc., New york, 1974.

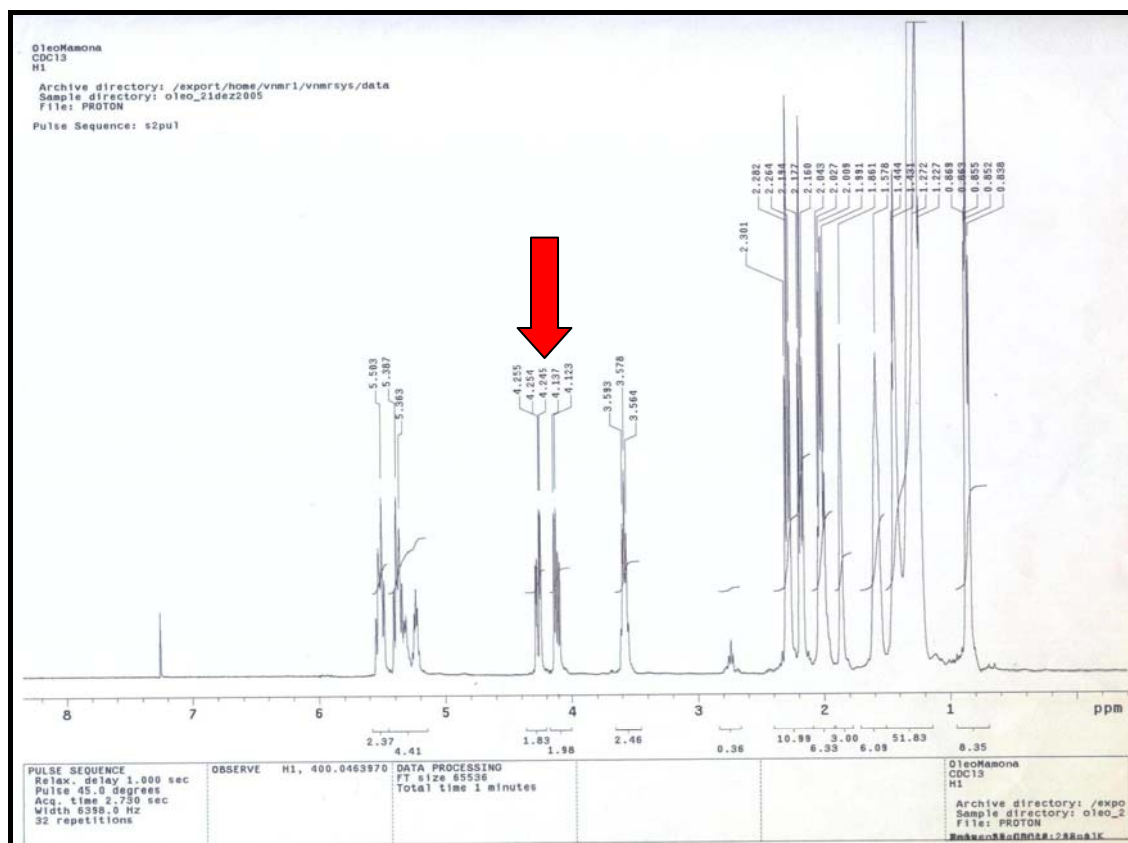
SISO, M.I.G. et al. Enzyme encapsulation on chitosan microbeads. **Process Biochemistry**, v. 32, p.211-216, 1997.

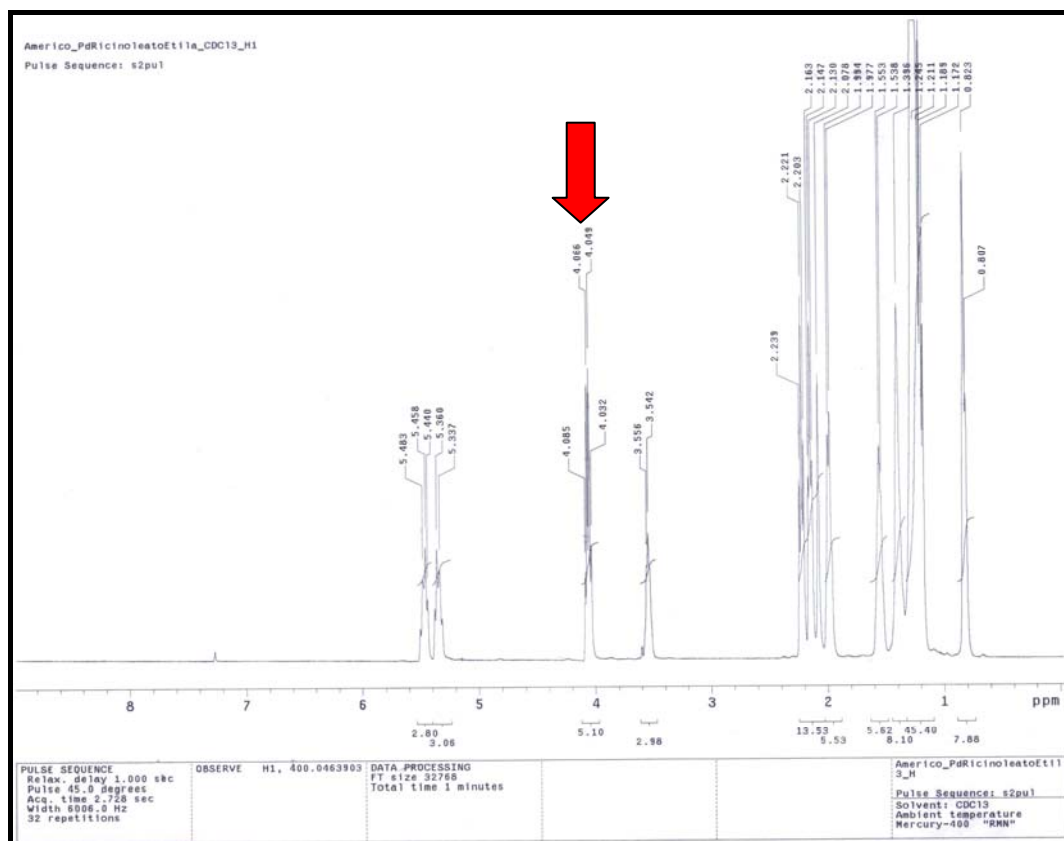
SKAUGRUD, O. et al. Biomedical and Pharmaceutical Applications of alginate ans chitosan. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.16, p.23-41, 1998.

STAMATIS, H.; XENATIS, A.;BORNSCHEVER, V.; SCHEVER, T.; MENGE, U. e KOLISIS, F.N. “ *Pseudomonas cepacia* lipase: Esterification reactions in AOT microemulsion systems”, **Biotechnology Letters**, v.15, n.7, p.703-708, 1993.

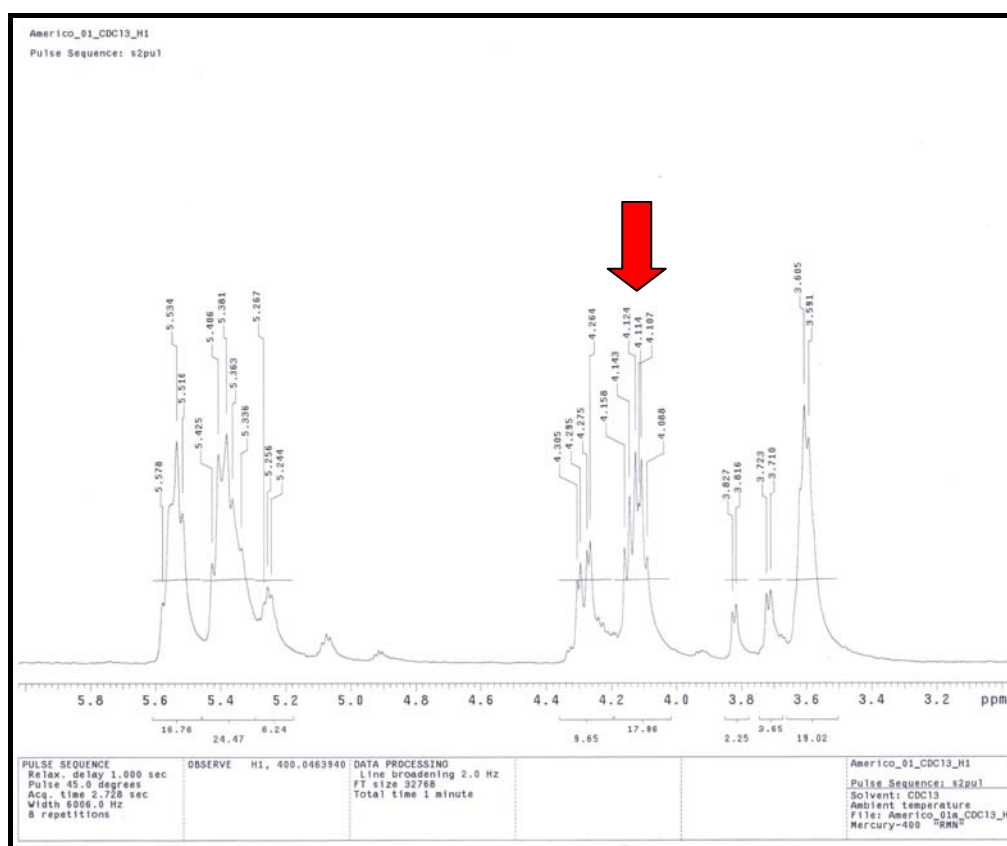
- TAN, C.S., KHOR, E., TAN, T.K, WONG, S.M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivate UV-spectrophotometry method of determination, **Talanta**, v.45, p.713-719, 1998.
- THARANATHAN, R.N; KITTUR, F.S. Chitin-The undisputed biomolecule of Great potencial, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v1, p.61-87, 2003.
- TRÄN, B. N; VIALLE, J; PHAN, T.Q. Castor Oil-based polyurethanes: 1. Structural characterization of castor oil - nature of intact glycerides and distribution of hydroxyl groups, **Polymer v.38 no.10 p. 2467-2473, 1997.**
- UPPENBERG J, HANSEN MT, PARKTAR S, JONES TA. Crystallographic and molecular modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecific pocket for secondary alcohols. **Biochemistry**, v.34, p.16838-16851, 1995.
- UPPENBERG J, HANSEN MT, PARKTAR S, JONES TA. The sequence and crystal structure determination of two forms of lipase B from *Candida Antarctica*. *Struture*, v. 2, p. 293-308, 1994.
- WANG, S., CHIO, S. Reversible immobilization of chitinase via coupling to reversibly soluble polymer. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.634-640, 1998.
- YANG, Y.M., WANG, J.W., TAN, R.X. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-SiO₂ gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p.126-131, 2004.
- YANG, Z. E RUSSEL, A. J. Fundamentals of non-aqueous enzymology. IN: KOSKINEN, A. M. D. E KLIBANOV, A. M. (EDS), **Enzymatic Reactions in Organic Media**, 1^a ed., London, Blackie Academic & Professional, 1996.
- ZAKS, A. e KLIBANOV, A. M. Enzyme catalyzed processes in organic solvents. **Proceedings of Nacional Academy Science**, v. 82, p.3192, 1985.
- ZANIN, Gisella M.; MORAES, Flávio. Faria. Enzimas imobilizadas. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p.35-85, 2004.

ANEXOS

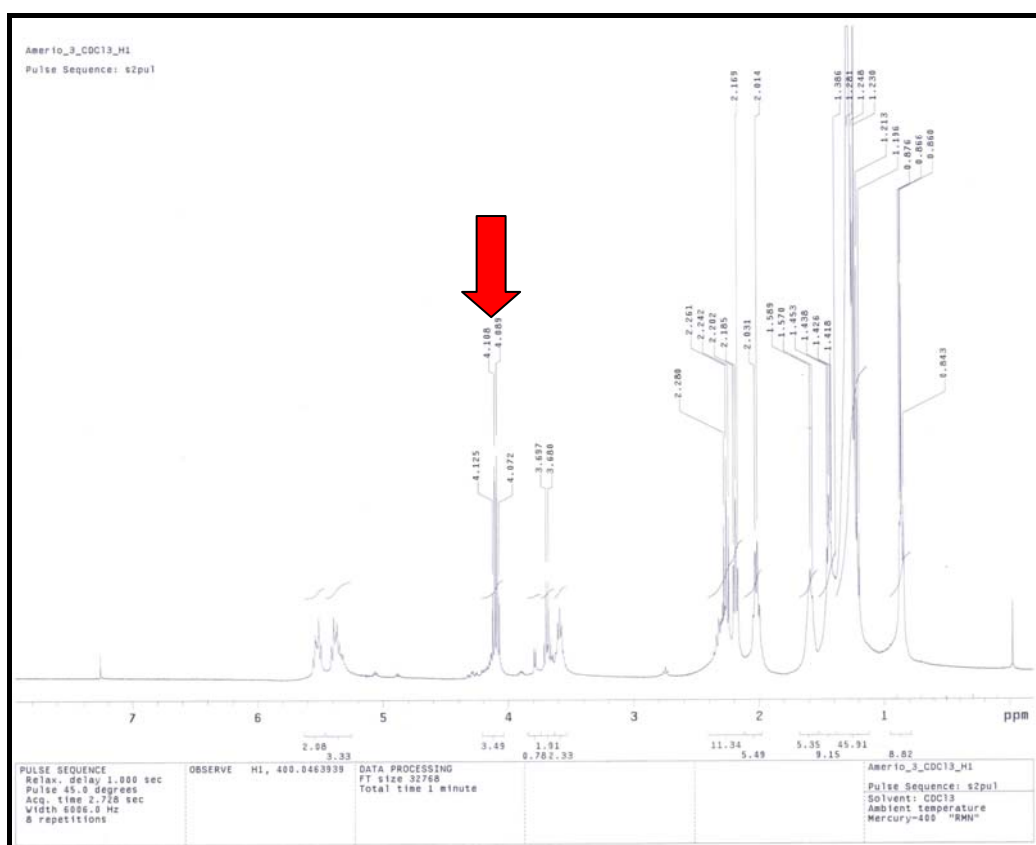
ANEXO 1: Espectro de RMN H¹ de óleo de mamona da Aboissa – Óleos Vegetais Ltda.

ANEXO 2 : Espectro de RMN H¹ de Ricinoleato de metila de amostra padrão da Sigma.

ANEXO 3 : Espectro de RMN H^1 do produto da alcoólise enzimática, mostrando a região de 4,0 - 4,4 típica de ésteres de ricinoleato de etila.



ANEXO 4 : Espectro de RMN H¹ de ésteres de ricinoleato de etila produto da reação enzimática de alcoólise enzimática com lipase CALB L imobilizada covalentemente em esferas de quitosana.



ANEXO 5 : Cálculo de conversão de ésteres etílicos.

Área do sinal (A_{EE}) (valor da integração de prótons dos ésteres etílicos) + (A_{CH_2}) -----100%

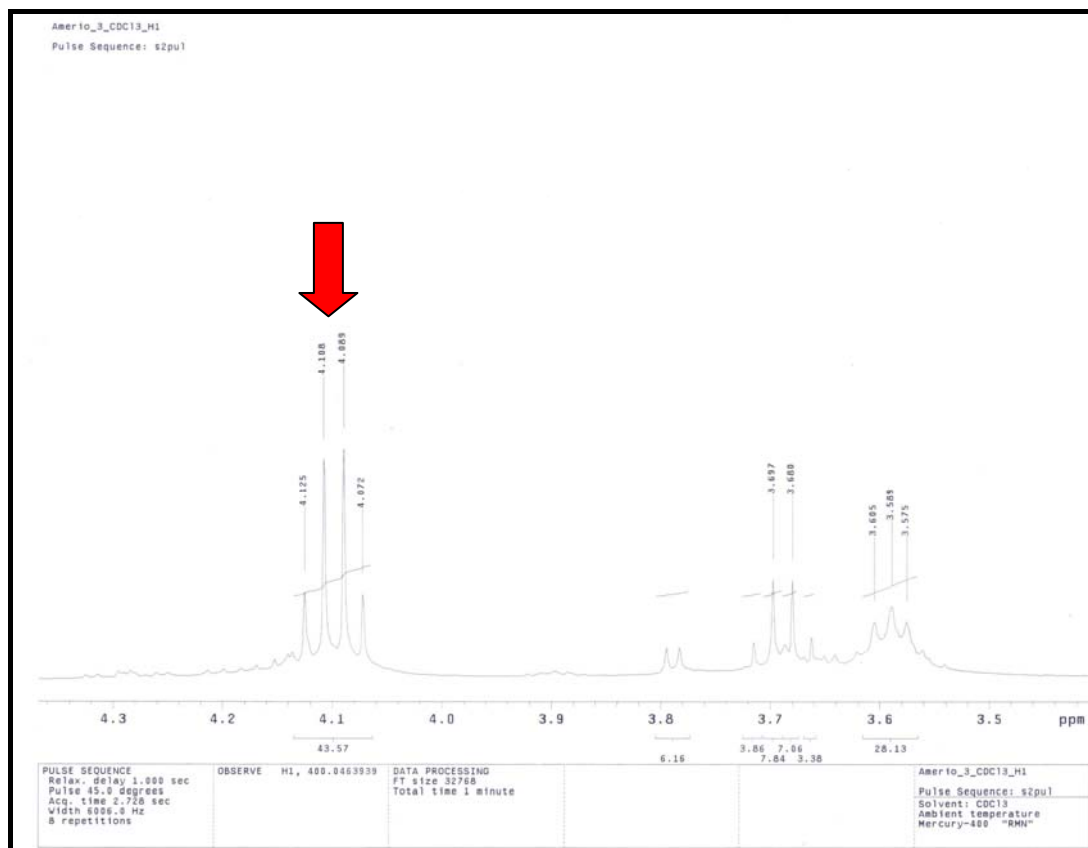
Área do sinal (A_{CH_2}) (valor da integração do próton metilênico do TAG) ----- C

17,96 A_{EE} + 2,25 A_{CH_2} do TAG-----100%

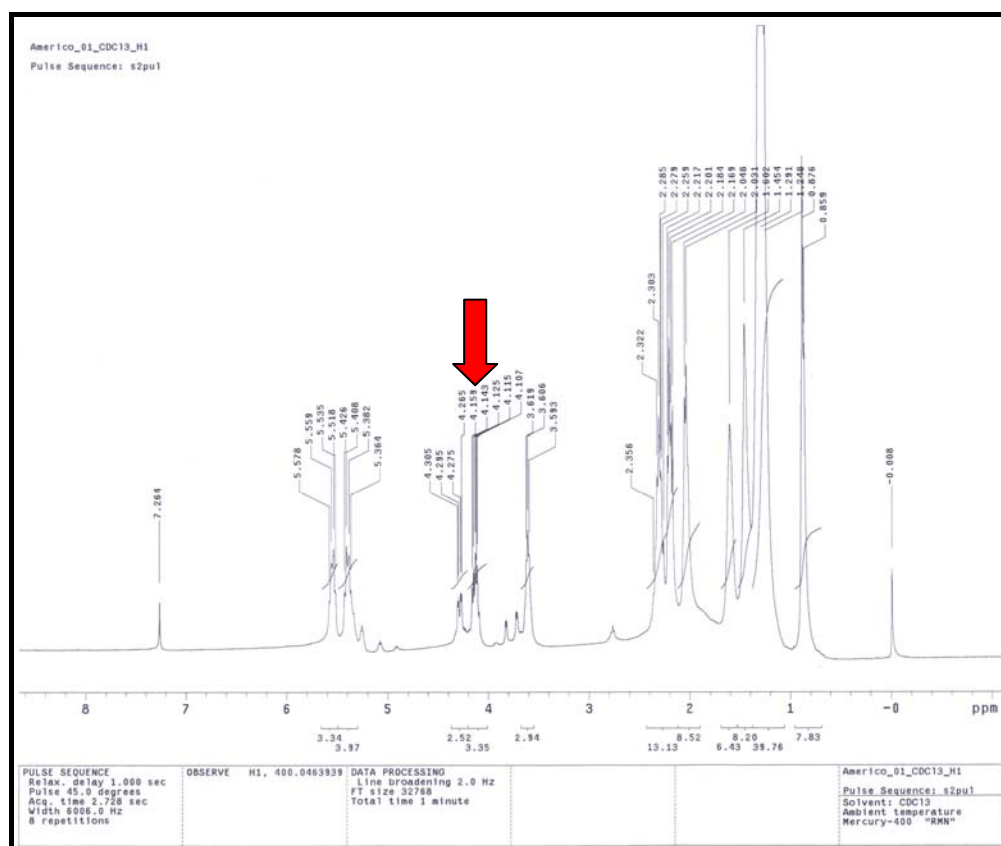
2,25 A_{CH_2} do TAG-----C

C= 11,13 % e Y= 88,87 % de conversão de ésteres.

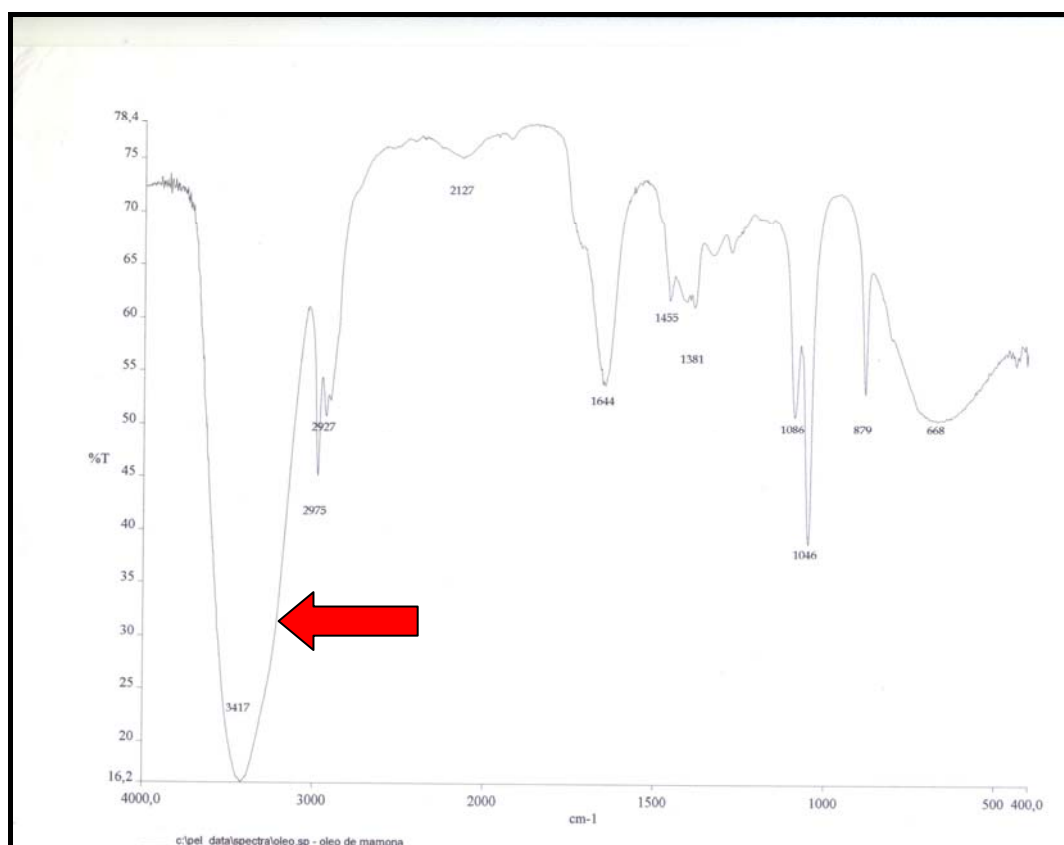
ANEXO 6 : Espectro de RMN H^1 de ésteres de ricinoleato de etila onde se vê um sinal em 4,10 ppm, em forma de quarteto correspondentes aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono.



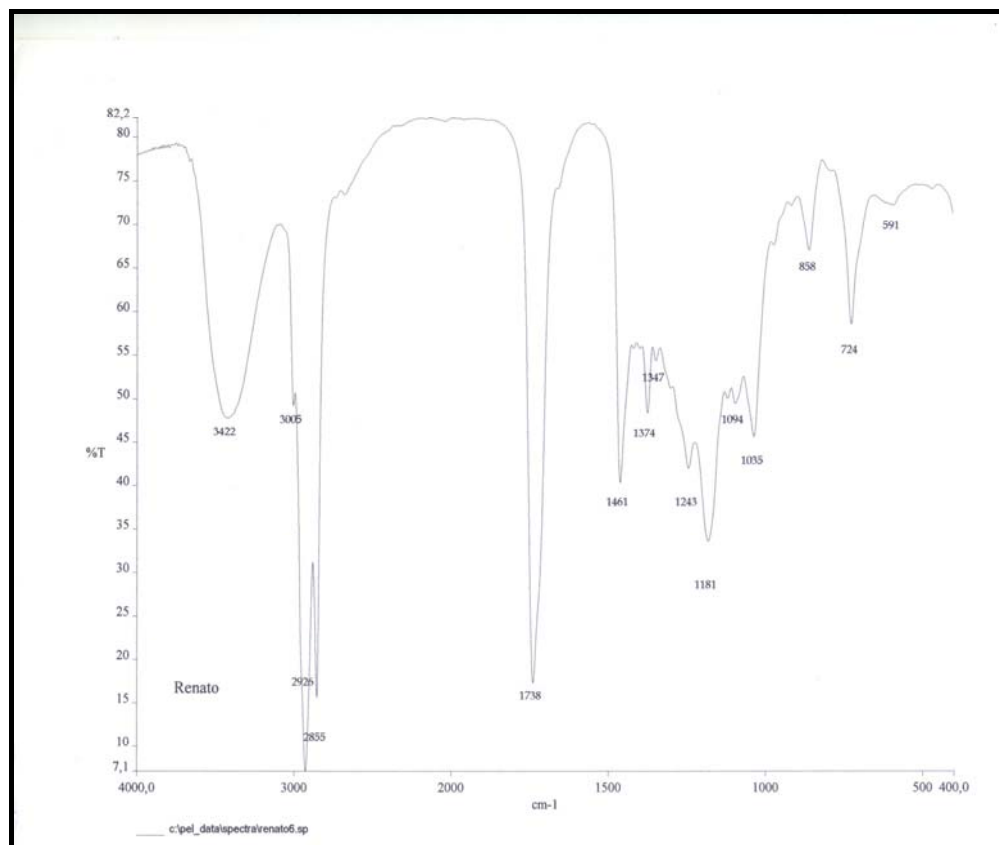
ANEXO 7 : Espectro de RMN H¹ de ésteres de ricinoleato de etila produto da alcoólise enzimática com CALB L imobilizada em esferas de quitosana.



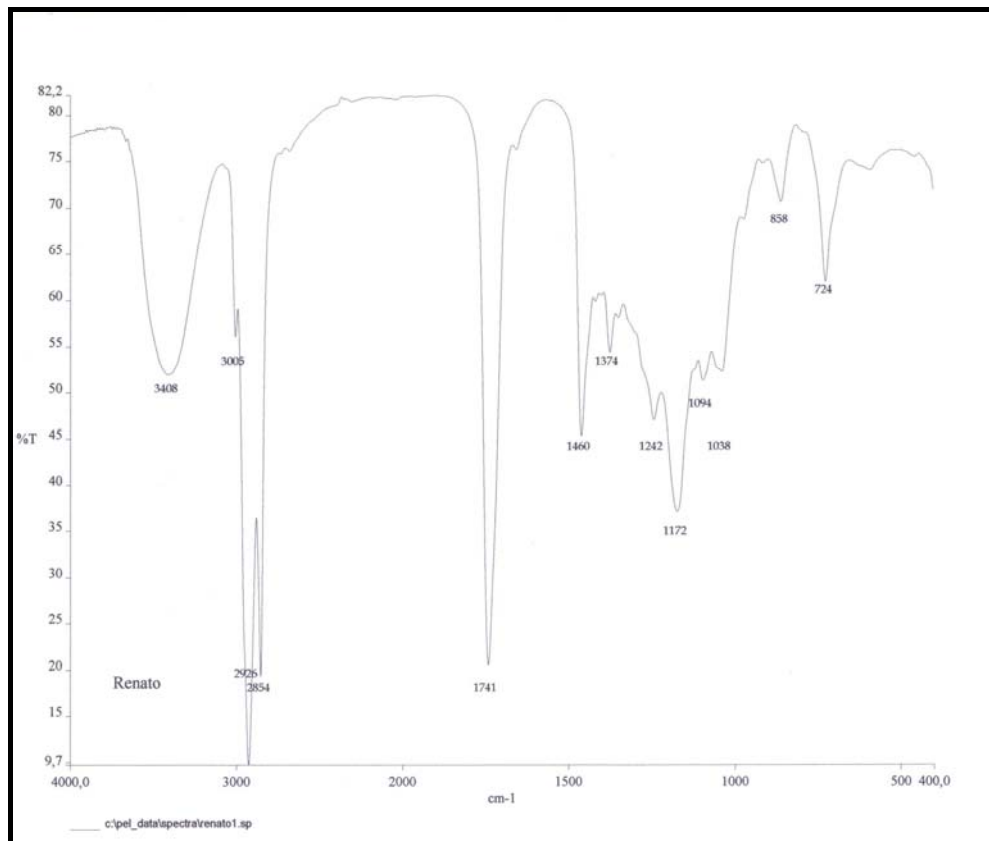
ANEXO 8 : Espectro de FT-IR de óleo de mamona da Aboissa – óleos Vegetais Ltda. onde se vê uma banda muito larga em 3417 cm^{-1} , referente à deformação axial do grupo O-H, característico do ácido ricinoleico (óleo de mamona).



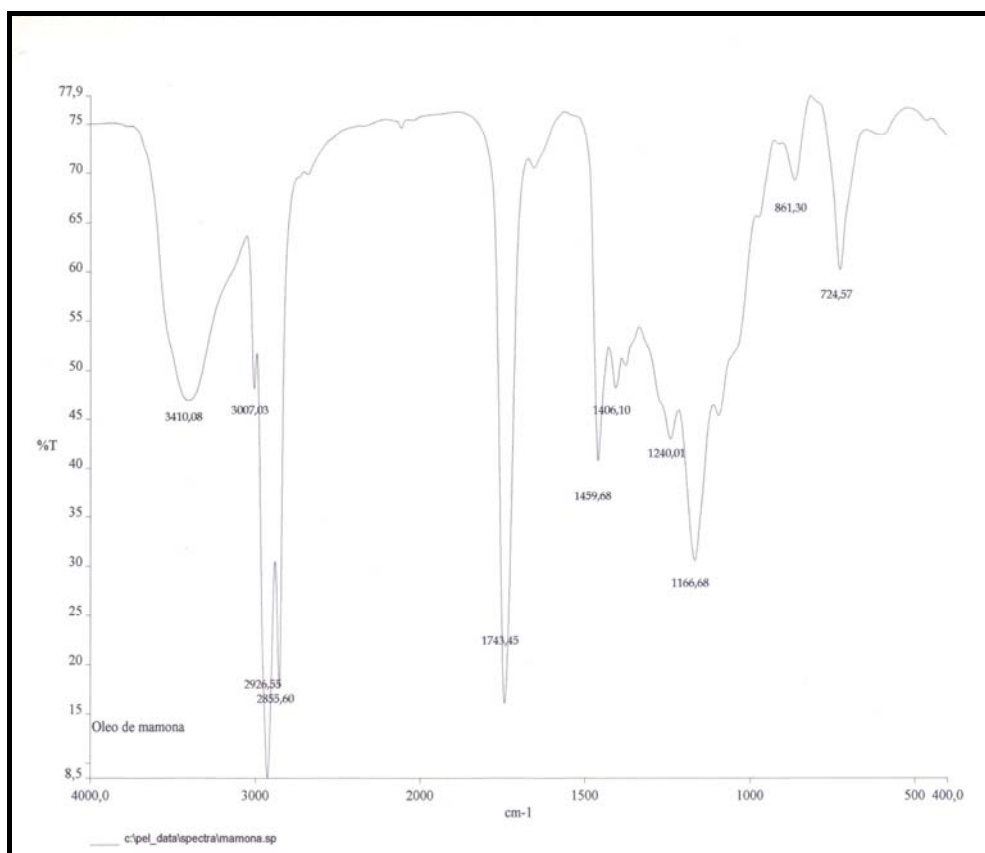
ANEXO 9 : Espectro de FT-IR de amostra de biodiesel de óleo de mamona, produto da alcoólise enzimática com óleo de mamona com lipase Novozym 435.



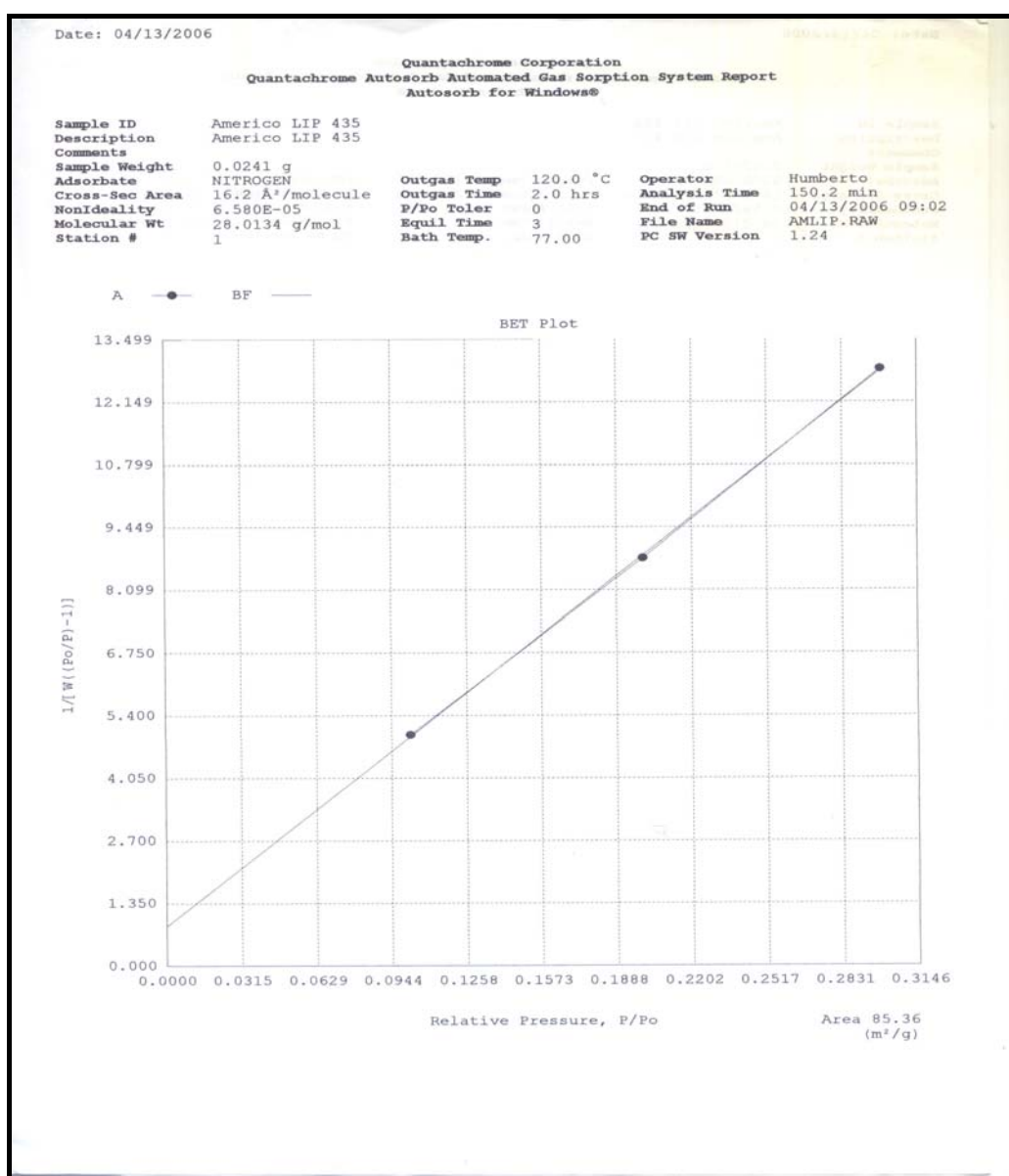
ANEXO 10 : Espectro de FT-IR de amostra de biodiesel de óleo de mamona, produto da alcoólise enzimática com óleo de mamona com lipase Novozym 435.



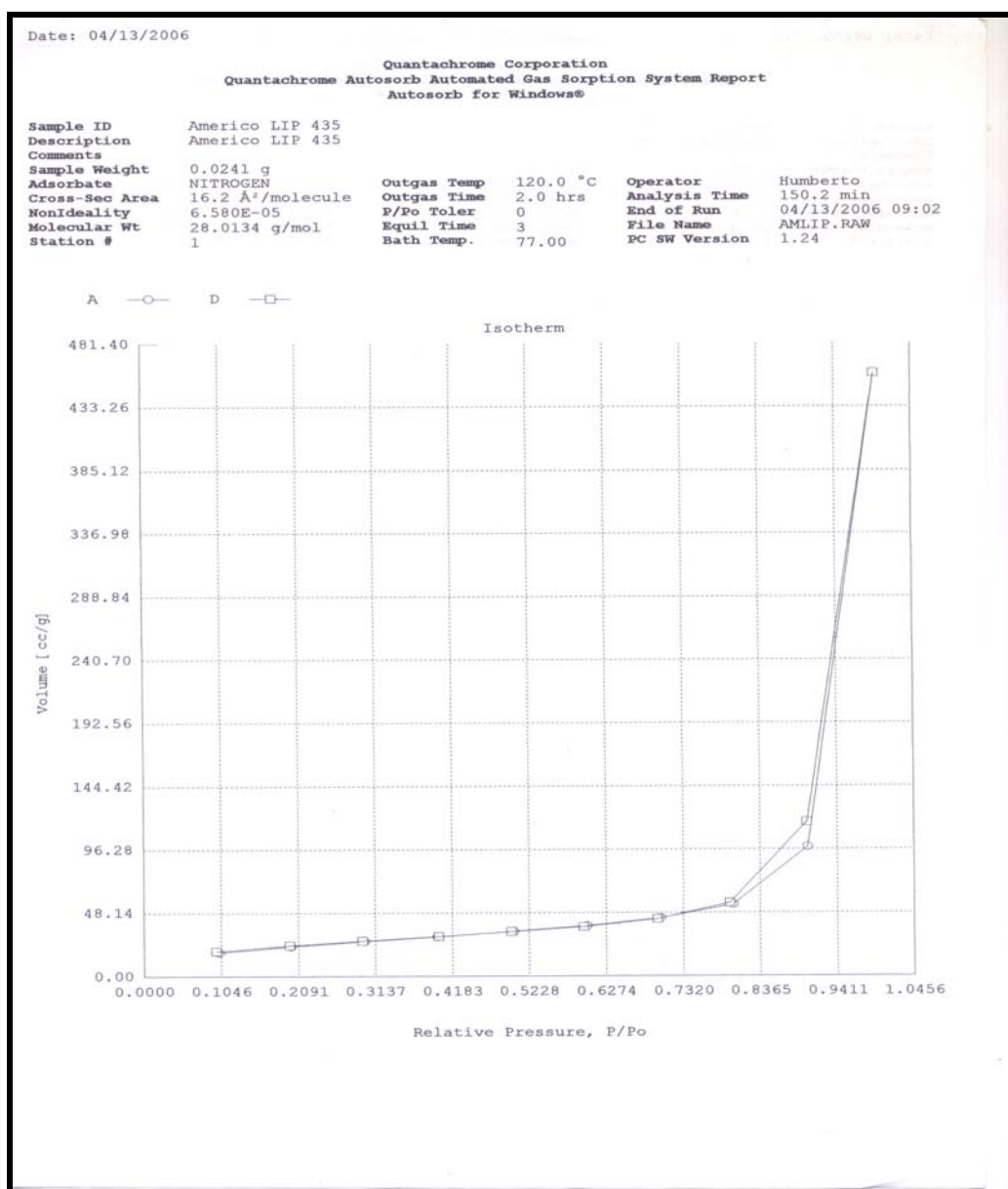
ANEXO 11 : Espectro de FT-IR de amostra de biodiesel de óleo de mamona, produto da alcoólise enzimática com óleo de mamona com lipase Novozym 435.



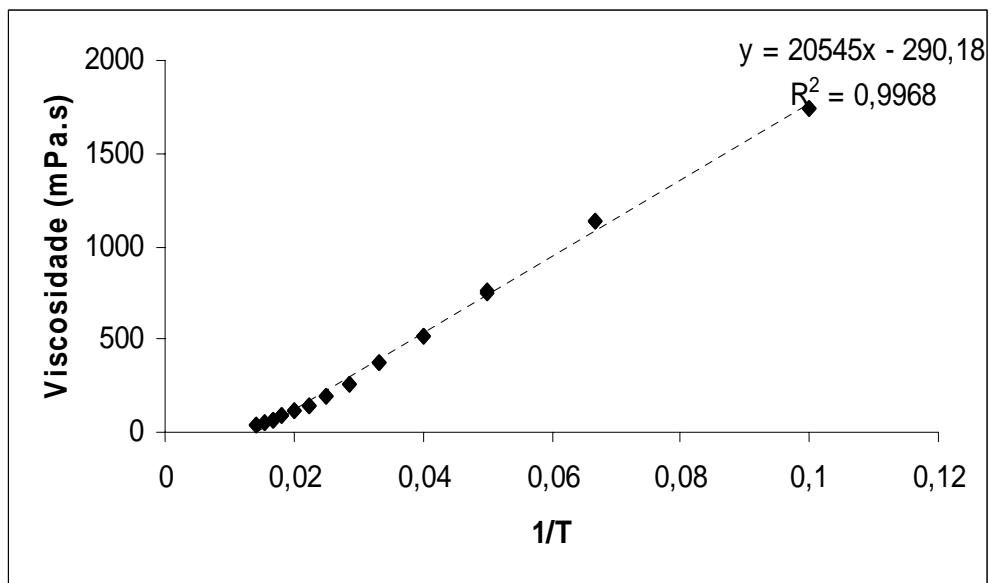
ANEXO 12 : Gráfico da Área Superficial (BET) da lipase Novozym 435.



ANEXO 13 : Gráfico da Isotherma tipo Langmuir da lipase Novozym 435.



ANEXO 14 : Gráfico da Reologia do biodiesel de óleo de mamona (viscosidade x temperatura).



ANEXO 15 : Gráfico da curva padrão de BSA (Proteínas Totais – Método de Bradford).

