



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**OBTENÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS
(Biodiesel) POR VIA ENZIMÁTICA A PARTIR
DO ÓLEO DE SOJA**

Pedro Ramos da Costa Neto

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento

Florianópolis, Santa Catarina, Brasil
Junho/2002

**OBTENÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS (Biodiesel)
POR VIA ENZIMÁTICA A PARTIR DO ÓLEO DE SOJA**

**“OBTENÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS (Biodiesel) POR VIA ENZIMÁTICA
A PARTIR DO ÓLEO DE SOJA”**

Pedro Ramos da Costa Neto

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do grau de Doutor em Química, e aprovada em sua forma final pela orientadora e demais membros da banca examinadora.

Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Nascimento

Orientadora

Prof. Dr. Valdir Soldi

Coordenador

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Pedro Luiz O. Volpe

IQ-Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

DQ-Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Prof. Dr. Valdir Soldi

DQ-Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro

DQ-Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof^a. Dr^a. Haidi Dália Lentz Fiedler

DQ-Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

A esta tríade com carinho:

- ❖ Juliane Marien Saad da Costa
- ❖ Pedro Henrique Saad da Costa
- ❖ Cirene Lesniowski Delgobo

AGRADECIMENTOS

- ❖ À Profa. Maria da Graça pela orientação;
- ❖ Ao Eng. Décio Tily Mai da Bunge Alimentos pela doação do óleo degomado ;

- ❖ A Indústria Química Estearina em especial ao Emerson e a Assuan pelas análises dos índices de iodo;
- ❖ À UNICAMP pelas análises de porosidade dos adsorventes;
- ❖ À NOVOZYMES pela doação das lipases: Lipolase e Lipozyme;
- ❖ À Fábrica Brasileira de Catalisadores pela doação dos carvões ativados;
- ❖ À Filtroil pela doação da bauxita;
- ❖ À Universidade Federal de Santa Catarina;
- ❖ Ao CEFET/PR unidade de Curitiba e aos colegas do Departamento de Química pela minha liberação ;
- ❖ Ao Pedro Barreto pelas análises de viscosidade;
- ❖ Aos professores Miguel Balparado e Valdir Soldi pelas discussões sobre RMN ^1H e TGA;
- ❖ Ao pessoal da Central de Análises Marli, Eliane e Regis pela colaboração;
- ❖ À Lilian Mazzuco pela colaboração;
- ❖ À Fátima Bassetti pelas fotografias dos óleos;
- ❖ Aos colegas do Laboratório de Biocatálise Neide, Sandra, Pedro Luiz, Roberto, Marcelo, Flavia, Juliana, Mariana, Ricardo, Denise e Silvia pela amizade;
- ❖ Ao Adriano pelo uso do espectrofotômetro de UV-Vis;
- ❖ Ao Milton Fugimoto pelas discussões sobre a curva de calibração de RMN ^1H ;
- ❖ Ao pessoal da biblioteca e da Secretaria de Pós-Graduação Graça e Jadir ;
- ❖ Ao Cesar A. Tischer (Depto. Bioquímica-UFPR), pelas análise de RMN ^1H (400 MHz)
- ❖ À CAPES e ao CNPq.

INDICE GERAL

1.	INTRODUÇÃO	01
	1.1 Considerações Gerais	01

1.2	Importância da Oleoquímica	02
1.3	Constituintes dos Óleos Vegetais	04
1.4	Degradação de Gorduras e Óleos nos Processos de Frituras	06
1.5	Biodiesel	11
1.6	Considerações Gerais sobre as Enzimas	15
1.7	Transesterificação Enzimática de Óleos e Gorduras.....	22
1.8	Enzimas Imobilizadas.....	30
1.9	Justificativas.....	36
1.10	Objetivos.....	37
	1.10.1 Objetivo Geral.....	37
	1.10.2 Objetivos Específicos.....	37
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1	Materiais	39
	2.1.1 Óleos	39
	2.1.2 Enzimas.....	39
	2.1.3 Suportes.....	40
	2.1.4 Reagentes.....	41
	2.1.5 Equipamentos.....	41
2.2	Métodos	42
	2.2.1 Oxidação do Óleo de Soja Refinado.....	42
	2.2.2 Neutralização do Óleo de Soja Degomado.....	42
	2.2.3 Curvas de Calibração e Adsorção	43
	2.2.4 Saturação do Carvão de Coco	45
	2.2.5 Análises Termogravimétrica (TGA)	46
	2.2.6 Dessorção da CRL Imobilizada em Carvão de Coco.....	46
	2.2.7 Imobilização da CRL e Lipolase em Gel de Ágar.....	46
	2.2.8 Caracterização dos Óleos e Determinação do Conteúdo de Ésteres Etilícos Através das Medidas de Viscosidade.....	47
	2.2.9 Outras Análises (Índice de Iodo, Acidez e CCD).....	48
	2.2.10 Reação Padrão (Esterificação).....	49
	2.2.11 Síntese de Ésteres Usados como Padrões	50

2.2.11.1	Síntese Enzimática de Palmitato e Estearato de Etila.....	50
2.2.11.2	Síntese Química do Linoleato de Etila.....	50
2.2.12	Preparação do Padrão de Biodiesel por Via Química.....	51
2.2.13	Preparação do Biodiesel por Via Enzimática e Análise de RMN ¹ H	52
2.2.13.1	Determinação do Conteúdo de Ésteres Metílicos por RMN ¹ H.....	53
2.2.13.2	Determinação do Conteúdo de Ésteres Etílicos por RMN ¹ H	55
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1	Oxidação Térmica e Caracterização dos Óleos.....	59
3.2	Preparação dos Biocatalisadores.....	63
3.2.1	Adsorção.....	63
3.2.1.1	Tempo de Contato.....	65
3.2.1.2	Efeito do Tampão Fosfato de Sódio na Adsorção em Bauxita	66
3.2.1.3	Massa de Adsorvente.....	67
3.2.1.4	Isotermas de Adsorção	68
3.2.1.5	Dessorção da CRL Imobilizada em Carvão de Coco.....	69
3.2.1.6	Saturação do Carvão de Coco	70
3.2.2	Análises Termogravimétrica da CRL Adsorvida.....	71
3.2.3	Avaliação dos Biocatalisadores na Reação de Esterificação Padrão	77
3.2.4	Caracterização do Biodiesel	81
3.2.4.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	81
3.2.4.2	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	82
3.2.4.3	Espectro de RMN ¹ H da Mistura Óleo/Ésteres 50% 200 x 400 MHz)	85

3.2.4.4	Determinação dos Ésteres Através das Medidas de Viscosidade	86
3.2.4.4.1	Correlação das Determinações dos Ésteres Etilícos (RMN ¹ H x Medidas de Viscosidade)	87
3.2.5	Obtenção do Biodiesel por via Enzimática	88
3.2.5.1	Alcoólise do Óleo de Soja com a CRL	88
3.2.5.1.1	Influência do Suporte	88
3.2.5.1.2	Influência do Álcool	89
3.2.5.2	Alcoólise do Óleo de Soja com a Lipolase.....	91
3.2.5.2.1	Etanolise do Óleo de Soja com a Lipolase (Imobilizada vs. Livre).....	91
3.2.5.2.2	Influência da Massa de Lipolase Livre e Imobilizada em Gel de Ágar	92
3.2.5.2.3	Influência do Tempo de Aquecimento do Óleo	93
3.2.5.2.4	Reutilização da Lipolase Imobilizada em Gel de Ágar	94
3.2.5.2.5	Influência do Álcool	95
3.2.5.3	Transesterificação dos Óleos de Soja com a Lipozyme.....	96
3.2.5.3.1	Influência do Tempo de Reação.....	96
3.2.5.3.2	Influência da Massa de Lipozyme	97
3.2.5.3.3	Influência da Temperatura	98
3.2.5.3.4	Efeito da Acidez do Óleo na Etanolise com a Lipozyme	99
3.2.5.3.5	Influência do Álcool	100
3.2.5.3.6	Reutilização da Lipozyme	101
3.2.5.3.7	Efeito do Tempo de Aquecimento do Óleo..	102
3.2.6	Considerações Finais.....	103
3.2.7	Caracterização do Biodiesel Obtido por Via Enzimática.....	105
4.	CONCLUSÃO.....	107

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
--	------------

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Reação de transesterificação de triacilgliceróis.....	02
	R = Cadeia carbônica dos ácidos graxos ($R \geq 12 - 24$ C)	
	R' = Cadeia carbônica do álcool reagente ($R' = 1 - 2$ C)	
Figura 2.	Fluxograma de derivados da oleoquímica	03
Figura 3.	Obtenção de nylon-10 a partir do oleato de metila.....	04
Figura 4.	Constituintes dos óleos vegetais brutos, incluindo triacilgliceróis e compostos minoritários.....	05

Figura 5.	Tipos de alterações e produtos de degradação de óleos e gorduras usados em frituras.....	08
Figura 6.	Mecanismo da decomposição de óleos e gorduras no processo de frituras	09
Figura 7.	Dimerização do ácido linoléico a partir do óleo de soja.....	10
Figura 8.	Mecanismo da decomposição do óleo de soja à 250 – 350 °C.....	10
Figura 9.	Interações dos gases NO _x na atmosfera. A) Tipos de gases NO _x . B) Interações do gas N ₂ O. C) Interações dos gases NO e NO ₂	13
Figura 10.	Estrutura genérica de um polipeptídeo mostrando, a direita o resíduo C-terminal e a esquerda o N-terminal	15
Figura 11.	Diagramas hipotéticos de energia para reações catalisadas por enzimas e a correspondente não catalisada.....	19
Figura 12.	Modelos de interações do substrato com a enzima. (A) Modelo de chave e fechadura. (B) Modelo de encaixe induzido.....	20
Figura 13.	Tríade catalítica ou regra dos três pontos.....	23
Figura 14.	Estrutura tridimensional da lipase de <i>Mucor miehei</i> mostrando os resíduos aminoácidos do centro ativo.	24
Figura 15.	Reações catalisadas por lipases.....	24
Figura 16.	Representação do mecanismo de uma reação de transesterificação, por via enzimática.....	30
Figura 17.	Métodos mais comuns para imobilização de enzimas (adaptado da ref. 40).	31
Figura 18.	Estrutura da agarose, contendo o resíduo β-D-galactose ligados 1,3 (A) e o resíduo 3,6 anidro α-L-galactose ligado 1,4 (B). [R ₁ = H; R ₂ = SO ₃ ; R ₃ = 80% H, 20% SO ₃].....	34
Figura 19.	Suportes usados para a imobilização das lipases (a) bauxita ativada, (b) carvão ativo de pinus, (c) gel de ágar e (d) carvão ativo de casca de coco.....	40
Figura 20.	Curvas de calibração. (A) CRL, R = 0,9956. (B) Lipolase, R = 0,9930	44
Figura 21.	Metodologia utilizada para adsorção das lipases.....	45
	1. Massa de suporte + solução de lipase, agitação em temperatura controlada;	
	2. Filtração;	
	3. Centrifugação (4000 rpm por 15 min.);	
	4. Leituras das absorvância das soluções (258 ou 278 nm);	

5. Quantificação da adsorção, segundo Equações 2 e 3 ;
6. Estocagem em geladeira
7. Utilização do biocatalisador.

Figura 22.	Imobilização das lipases em gel de ágar	47
Figura 23.	Determinação da conversão de óleo de soja em ésteres etílicos através das medidas de viscosidade. (A) Curva de calibração. (B) Linearização da curva, $R = 0,9981$	48
Figura 24.	Espectro de RMN ^1H do laurato de n-pentila com conversão de 56 %, mostrando os sinais dos prótons metínicos do éster e do álcool. (CDCl_3 , 200 MHz).....	49
Figura 25.	Filtro contendo bauxita e amido pulverizado usado para purificação dos ésteres metílicos e etílicos obtidos a partir do óleo soja refinado.....	52
Figura 26.	Espectros de RMN ^1H do óleo de soja e ésteres metílicos. 1) Óleo puro; 2) Ésteres metílicos com conversão incompleta, mostrando sinais referente a presença dos hidrogênios metílicos do glicerol no óleo entre 4,05-4,40 ppm; 3) Ésteres metílicos com conversão 100 %. (a^1 e a^2 , são os sinais dos hidrogênios usados para a quantificação dos ésteres através da Equação 5) ¹⁰⁰	54
Figura 27.	Região do espectro de RMN ^1H de uma mistura óleo/ésteres 50% mostrando os sinais sobrepostos em 4,05-4,40 ppm. A_1 – área de parte dos sinais dos hidrogênios do glicerol. A_2 – quarteto dos hidrogênios etóxi dos ésteres sobrepostos aos sinais do glicerol [200 MHz (CDCl_3)]	55
Figura 28.	Região do espectro de RMN ^1H em 4,05-4,40 ppm, mostrando a sobreposição dos sinais ésteres etílicos e óleo em diferentes proporções. (a) Óleo de soja puro; (b,c,d,e) misturas de óleo/ésteres: 80/20; 60/40; 40/60; 20/80 e (f), ésteres etílicos puros. [200 MHz, CDCl_3].....	57
Figura 29.	Curva de calibração de RMN ^1H usada para determinação da conversão do óleo de soja em ésteres etílicos. (A_1 e A_2 – áreas dos sinais etóxi e metílicos do glicerol sobrepostos em 4,05-4,40 ppm; 200 MHz, CDCl_3).....	57
Figura 30.	Linearização da curva de calibração de RMN ^1H , mostrada na Figura 29. [$R = 0,9997$; $A = 11,33974$; $B = -28,07267$].....	58
Figura 31.	Fotografia mostrando a aparência dos óleos de soja não aquecido (0), do óleo aquecido por 2, 6, 10, 22, 34, 45 e 60 horas e dos óleos degomado (D) e usado em frituras (F).....	60

Figura 32.	Variações das características físicas e químicas do óleo de soja aquecido por 2, 6, 10, 22, 34, 45 e 60 horas.	60
Figura 33.	Fritadeira usada em restaurantes, mostrando o depósito de óleo em contato com a solução de NaCl à 10 %. As torneiras A e B, são respectivamente para as drenagens do óleo e da salmoura.....	62
Figura 34.	Indicação do comportamento Newtoniano dos óleos de soja, não aquecido (0h) e aquecido de 2 à 60 horas.....	63
Figura 35.	Perfil dos valores de absorvância da solução de CRL adsorvida preparada em água pura e tampão fosfato de sódio pH 7,2. [35 °C; conc. de CRL 5 g/L]	66
Figura 36.	Varição da adsorção (%) da CRL (5g/L), em função da massa do carvão de coco, de pinus e bauxita à 35 °C e 1 hora de contato	67
Figura 37.	Varição das porcentagens de adsorção da CRL (5 g/L) nos carvões de coco (A), de pinus (B), e da bauxita (C), em função da temperatura (20, 25, 30 e 35 °C).	68
Figura 38.	Varição da absorvância da CRL em função do número de lavagens do sistema carvão de coco/CRL com diferentes solventes, a 35 °C por 1 h de contato	70
Figura 39.	Avaliação da capacidade de readsorção da CRL em carvão de coco. [Lipase 5 g/L 4 % de suporte; 35 °C; 1 h de agitação].....	71
Figura 40.	Curvas de TG da CRL e dos suportes antes da imobilização.....	72
Figura 41.	Curvas de DTG da CRL e dos suportes antes da imobilização.....	73
Figura 42.	Derivadas da CRL e dos suportes após a imobilização. As depressões indicadas por A e B, referem-se as perdas de água e da CRL imobilizada respectivamente. (Neste caso a imobilização da CRL em bauxita foi com tampão fosfato de sódio pH 7,2).....	74
Figura 43.	Curvas de DTG do carvão de coco puro, e contendo a CRL imobilizada não usado e usado como biocatalisador em reações de esterificação.....	75
Figura 44.	Influência da massa de lipase livre e imobilizada no carvão de coco, no rendimento da reação da esterificação do ácido láurico com n-pentanol em 24 h, à 35 °C.....	79
Figura 45.	Espectros de RMN ¹ H dos ésteres (a) palmitato, (b) estearato e (c) linoleato de etila, mostrando os sinais dos hidrogênios do carbono etóxi na região de 4,05-4,20 ppm. (200 MHz, CDCl ₃).....	82

- Figura 46.** Espectros de RMN ^1H , mostrando os sinais na região de 0,50–5,50 ppm. A) Ésteres etílicos; B) Óleo de soja. [200 MHz, CDCl_3]. 83
- Figura 47.** Correlação das porcentagens das misturas óleo/ésteres etílicos, calculadas através da curva de RMN ^1H , pela equação da reta e equação exponencial de 1a. ordem..... 84
- Figura 48.** Espectros de RMN ^1H (4,05 - 4,40 ppm) da mistura óleo e ésteres etílicos (1:1), obtidos em espectrômetros de 200 e 400 MHz, CDCl_3 . (A_1) – Duplo dublete do glicerol não sobreposto; (A_2) – duplo dublete do glicerol sobreposto pelo quarteto do éster no espectro de 200 e separados em 400 MHz..... 85
- Figura 49.** Correlação entre os resultados do conteúdo dos ésteres etílicos e óleo (mistura 0 à 100 %, v/v), determinadas por medidas de viscosidade e RMN ^1H 87
- Figura 50.** Influência do suporte na etanólise do óleo de soja refinado com CRL livre (60 mg), imobilizada em carvão de coco (54mg/g) e em gel de ágar (60mg/0,4g). [1 mL óleo; 0,5 mL EtOH; 20 mL n-hexano; 24 h; 35 °C]..... 89
- Figura 51.** Influência do álcool na alcóólise do óleo de soja refinado com a CRL imobilizada em gel de ágar (25 mg/0,4g). [1 mL óleo; 0,5 mL álcool; 20 mL n-hexano; à 35°C]..... 90
- Figura 52.** Variação da conversão do óleo de soja refinado, em ésteres etílicos, em função da quantidade de Lipolase livre e imobilizada em gel de ágar. [1mL óleo; 0,5 mL EtOH; 20 mL n-hex.; 0,4 g ágar; 24h de reação à 35°C]..... 92
- Figura 53.** Variação do conteúdo de ésteres formados na etanólise do óleo de soja submetido a diferentes tempos de aquecimento, utilizando-se Lipolase imobilizada em gel de ágar (0,1mL/0,4g). [1 mL óleo; 0,5 mL EtOH; 20 mL n-hex.; 24 horas de reação à 35 °C]..... 93
- Figura 54.** Conversão (%) dos óleos de soja refinado , degomado e usado em frituras, em sucessivas reutilizações com a Lipolase imobilizada em gel de ágar (0,1mL/0,4g) e etanol hidratado. [1 mL óleo; 0,5 mL álcool; 20 mL n-hex.;24horas de reação à 35 °C]..... 94
- Figura 55.** Influência do álcool na conversão dos óleos de soja refinado, aquecido por 2 horas, degomado e usado em frituras usando metanol, etanol e Lipolase imobilizada em gel de ágar (0,1 mL/0,4 g). [1 mL óleo; 0,5 mL álcool; 20 mL n-hex.; 35 °C; tempo de reação: 24h c/ EtOH e 96h c/ MeOH]..... 96

Figura 56.	Varição da conversão dos óleos refinado, degomado, usado em frituras e aquecido por 60 horas em ésteres etílicos em função do tempo de reação, usando a Lipozyme. [1mL óleo; 0,5 mL EtOH; 20 mL n-hex.; 0,1 g Lipozyme; à 35 °C].....	97
Figura 57.	Influência da massa de Lipozyme por mL de óleo na conversão dos óleos de soja refinado, degomado, usado em frituras e aquecido em laboratório por 60 horas. [1mL óleo; 0,5mL EtOH; 20 mL n-hexano; 35 °C; 8 horas de reação].....	98
Figura 58.	Influência da temperatura e do tempo na reação de transesterificação do óleo de soja refinado, usando a Lipozyme (0,1 g / mL de óleo). [0,5 mL EtOH; 20 mL n-hexano].....	99
Figura 59.	Conversão (%) dos óleos de soja refinado, degomado e usado em frituras com a Lipozyme reutilizando-a por uma vez. [1 mL óleo; 0,5 mL EtOH; 20 mL n-hex.; 0,1 g Lipozyme; 35 °C; 24 horas].....	102
Figura 60.	Varição do conteúdo de ésteres formados na etanolise do óleo de soja, submetido a diferentes tempos de aquecimento utilizando a Lipozyme. [1 mL óleo; 0,5 mL EtOH; 20 mL n-hexano; 0,1 g de lipase; 48 horas de reação à 35 °C].....	103

INDICE DE TABELAS E ESQUEMAS

Tabela 1.	Composição de ácidos graxos do óleo de soja.....	06
Tabela 2.	Especificações dos ésteres etílicos de várias espécies vegetais e do óleo diesel	14
Tabela 3.	Classificação das enzimas segundo a IUBMB	21
Tabela 4.	Vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático na produção de biodiesel ⁴⁶	22
Tabela 5.	Rendimentos dos ésteres (%) obtidos através da reação de Transesterificação enzimática do óleo de girassol com e sem solvente	26

Tabela 6.	Rendimentos dos ésteres (%) obtidos através da reação de transesterificação enzimática de triglicerídeos com álcoois primário e secundário.....	27
Tabela 7.	Características físicas e químicas dos óleos de soja	39
Tabela 8.	Enzimas comerciais.....	40
Tabela 9.	Valores de viscosidade das misturas de óleo e ésteres etílicos em diferentes proporções.....	47
Tabela 10.	Relação das áreas dos sinais de RMN ¹ H sobrepostos em 4,05-4,40 ppm das misturas ésteres etílicos e óleo de soja refinado.....	56
Tabela 11..	Áreas superficiais e granulometrias dos suportes usadas para imobilização da CRL e Lipolase por processo de adsorção.....	63
Tabela 12.	Influência do tempo de contato na adsorção da CRL, utilizando-se bauxita e carvões de coco e pinus com granulometria 20-40 mesh, à 35 °C.	65
Tabela 13.	Perdas de massas da CRL e dos suportes antes da imobilização.....	73
Tabela 14.	Relação da massa de CRL adsorvida nos diferentes suportes por unidade de área.....	76
Tabela 15.	Influência do tempo na esterificação do ácido láurico com n-pentanol com a CRL livre e imobilizada em carvão de coco, pinus, bauxita e gel de ágar (35 °C).....	77
Tabela 16.	Valores dos Rfs e porcentagens de conversão do óleo de soja em ésteres etílicos, determinadas por RMN ¹ H.....	81
Tabela 17.	Porcentagens de ésteres formados e valores de Rf na etanólise do óleo de soja refinado com a Lipolase imobilizada em carvão de coco e livre.....	91
Tabela 18.	Influência da acidez na conversão dos óleos refinado e degomado em ésteres etílicos com a Lipozyme.....	100
Tabela 19.	Influência do álcool nas reações de transesterificação dos óleos refinado, degomado e usado em frituras com a Lipozyme.....	101
Tabela 20.	Médias das porcentagens de conversão das etanólises dos óleos de soja refinado, degomado e oxidado com as lipases imobilizadas CRL, Lipolase e Lipozyme.....	104

Tabela 21.	Caracterização dos ésteres etílicos obtidos por via enzimática com a Lipozyme, a partir dos óleos de soja refinado, degomado e oxidado termicamente.....	106
Esquema 1.	Neutralização do óleo de soja degomado com solução de NaOH (10 %).....	42
Esquema. 2	Condições experimentais usadas na alcoólise do óleo de soja	53
Esquema 3.	Etapas de apresentação dos resultados	59

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CRL	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
Óleo (R)	Óleo de soja refinado
Óleo (D)	Óleo de soja degomado
Óleo (0)	Óleo de soja refinado não aquecido
" (2h)	Óleo de soja refinado aquecido por 2 horas
" (6h)	" " " " " " 6 horas
" (10h)	" " " " " " 10 horas
" (22h)	" " " " " " 22 horas
" (34h)	" " " " " " 34 horas
" (45h)	" " " " " " 45 horas

“ (60h)	“ “ “ “ “ “ “ 60 horas
Óleo (F)	Óleo de soja usado em frituras
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
TGA	Análise termogravimétrica
RMN H ¹	Espectroscopia de ressonância nuclear de hidrogênio
ppm	Parte por milhão
δ	Deslocamento químico
CCD	Cromatografia de camada delgada
Ln	Logarítmo natural
His	Histidina
Ser	Serina
Asp	Ácido aspártico
Glu	Ácido glutâmico
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
KLU	Kilo Lipase Units
BAUN	Batch Acidolysis Units Novo
CCL	Lipase de <i>Candida cylindracea</i>
G	Energia Livre de Ativação

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a transformação do óleo de soja refinado, degomado e oxidado termicamente (usado em frituras e aquecido em laboratório), em ésteres alquílicos, biodiesel, através da reação de transesterificação enzimática usando lipases comerciais e álcoois de cadeias curtas, metanol e etanol hidratado.

As etapas do trabalho compreenderam a caracterização física e química dos óleos utilizados; imobilização das lipases de *Candida rugosa* (CRL) e Lipolase por adsorção em carvão ativo de casca de coco, de pinus, bauxita ativada, e por aprisionamento em gel de ágar. Foram também realizadas análises da decomposição térmica dos suportes e da CRL, através de análises termogravimétricas. A eficiência do biocatalisador (CRL imobilizada), antes da

utilização nas reações de transesterificação dos óleos, foi verificada na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, e os melhores resultados foram obtidos com o sistema CRL/gel. A transesterificação dos óleos com metanol e etanol foi realizada com a CRL e a Lipolase imobilizadas em carvão de coco e gel de ágar. Os resultados foram comparados com os obtidos com a Lipozyme imobilizada em resina aniônica, onde foi também, avaliada a reutilização dos biocatalisadores. As características dos ésteres obtidos por via enzimática, foram comparadas com as dos mesmos obtidos por via química, através de análises de RMN ^1H e medidas de viscosidade utilizando-se curvas de calibração.

Os resultados das reações de transesterificação dos óleos, mostraram que os suportes (carvão de coco, de pinus e bauxita), apesar de possuírem grandes áreas superficiais, não foram adequados para a imobilização das lipases. O gel de ágar foi um bom suporte, sendo que as conversões foram superiores aos obtidos com as lipases livres, especificamente com a Lipolase, incluindo a reutilização da mesma. Por outro lado, na reutilização da Lipozyme na etanólise dos óleos, os ésteres etílicos foram obtidos com conversão inferior a 5 %.

ABSTRACT

In this work, the transformation of the refined soybean oil, degummed and thermally oxidized (used in frying and heated in laboratory) in alkyl esters, biodiesel, through the enzymatic transesterification reactions by using commercial lipases and short chains alcohols like methanol and ethanol, was studied.

The stages of this work consisted of the physical and chemical characterization of used oils; the immobilization of the lipase of *Candida rugosa* (CRL) and Lipolase by adsorption in active coal of coconut shell, coal of pinus, activated bauxite and by inclusion process in agar gel. Analysis of thermal decomposition of the supports and of the CRL, also made was through thermogravimetric analysis. The efficiency of the biocatalyst (immobilized CRL), before the use in transesterification reactions of the oils, was examined in the reaction of the lauric acid with ethyl alcohol, and the best results were achieved

with the CRL/agar. The transesterification of the oils with methyl and ethyl alcohol was conducted with the CRL and the Lipolase immobilized in coconut coal and agar gel. The results were compared with the ones obtained with the Lipozyme immobilized in anionic resin. At this stage, the reutilization of the biocatalysts was also evaluated. The characteristics of the esters obtained enzymatic via, were compared with the characteristics of those obtained by chemical way, through the analysis of H^1 NMR and the measurements of viscosity, using calibration curves.

The results of the transesterification reactions of the oils, showed that the support (coconut coal, pinus coal and bauxite), in spite of having large superficial areas, were not adequate for the lipases immobilization. The agar gel was the best support because the conversions were higher than the ones obtained using free lipases, especially with Lipolase, including the reutilization in later reactions. In contrast, in the reuse of the Lipozyme in reactions of the ethanolys of oils, the conversion obtained in esters was lower than 5 %.

1. INTRODUÇÃO

Nesta introdução serão abordados o uso de óleos vegetais como carburantes em motores do ciclo diesel, a influência da oxidação dos mesmos, aplicações e métodos de imobilização de enzimas e os aspectos relevantes da importância e produção de biodiesel por via enzimática.

1.1 Considerações Gerais

A sociedade humana está vivenciando o alerta da degradação ambiental que urge mudanças significativas dos processos de produção de bens, diminuição do consumo energético e novas posturas em relação aos dogmas tradicionais da economia de mercado.¹

É bem conhecido que o setor petroquímico é responsável por grandes danos ambientais. A extração, transporte e os processos industriais de transformação do petróleo são responsáveis por derramamentos de óleo cru, pela geração de resíduos e efluentes tóxicos de difícil degradabilidade e pela

contaminação dos lençóis freáticos por gasolina e seus aditivos. Além disso, a queima de combustíveis derivados do petróleo resulta no acúmulo de dióxido de carbono na atmosfera, intensificando o efeito estufa. Finalmente, as atividades industriais baseadas no petróleo não são auto-sustentáveis e seus produtos não tem como característica principal a biodegradabilidade.²

Uma alternativa aos processos tradicionais da indústria química são os processos enzimáticos.^{3,4} Entre esses, a produção de combustíveis substitutos do óleo diesel a partir de óleos vegetais, se apresenta como uma nova aplicação de enzimas para a produção de biocombustíveis.

Nos tempos atuais, os problemas associados ao meio ambiente têm se agravado significativamente, tendo em vista o aumento desordenado da população e a subsequente geração de grande quantidade de resíduos, de reciclagem complexa e muitas vezes inviável. Atualmente, para garantir a sobrevivência no planeta deve-se concentrar o máximo esforço para reciclar a maior parte dos resíduos gerados, e dentre eles os óleos usados em frituras. Assim, esse material pode ser reaproveitado como combustível, através da sua transformação por reação de transesterificação, considerando que o óleo depois de sucessivas reutilizações em frituras, tem a sua composição de ácidos graxos alterada, bem como as características físico-químicas tornando-se inadequado para o processamento de alimentos mesmo quando submetido a purificação, Figura 1.¹

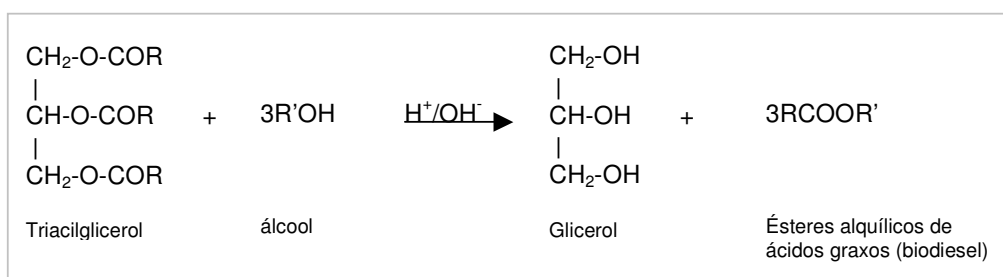


Figura 1. Reação de transesterificação de triacilglicerol.

R = Cadeia carbônica dos ácidos graxos (R = 12 – 24 C)

R' = Cadeia carbônica do álcool reagente (R' = 1 – 2 C).

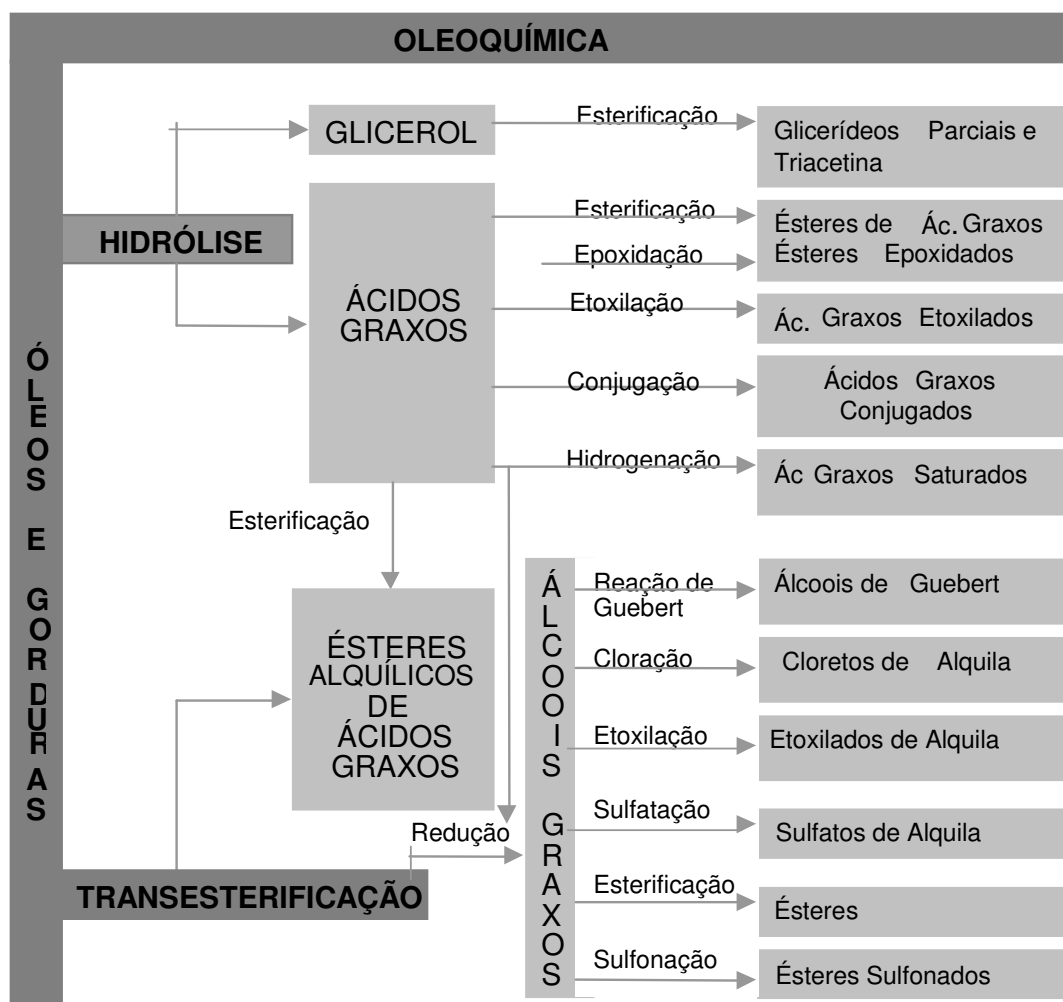
A partir de 1973, considerava-se que a agricultura poderia contribuir com a crise dos carburantes, que já é realidade na Comunidade Comum Européia, onde a mistura de biodiesel com diesel convencional é vendida em postos de combustíveis de diferentes países.⁵ Hoje, essa contribuição é reforçada pela

necessidade de defesa do meio ambiente e pela redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição atmosférica, a qual o biodiesel pode contribuir.

1.2 Importância da Oleoquímica

A indústria oleoquímica transforma boa parte da produção global de óleos e gorduras. As principais matérias-primas utilizadas por este seguimento industrial são o sebo, palmiste, óleo de palma e coco. Os produtos mais importantes, são ácidos graxos, ésteres metílicos, glicerol, álcoois e amins graxas. Estes são empregados nas indústrias de cosméticos, aromas, alimentos, perfumaria, lubrificantes, anticorrosivos, tintas, látex, borrachas, produtos de limpeza, laminação de alumínio, fabricação de pigmentos, auxiliares têxteis, sabões, sabonetes, creme de barbear entre outros.⁶

A Figura 2, mostra o fluxograma de processos e produtos da oleoquímica em que ácidos graxos e glicerol são intermediários importantes para as reações de esterificação, epoxidação, etoxilação, hidrogenação, conjugação etc.^{6,7}



Outra aplicação dos ácidos graxos, pode ser a substituição de poliamidas tradicionais por nylon-10. Este, pode ser obtido na metátese de ésteres metílicos de óleos vegetais e posterior adição anti-Markonikov de amônia no éster ω -decenóico, Figura 3.⁸

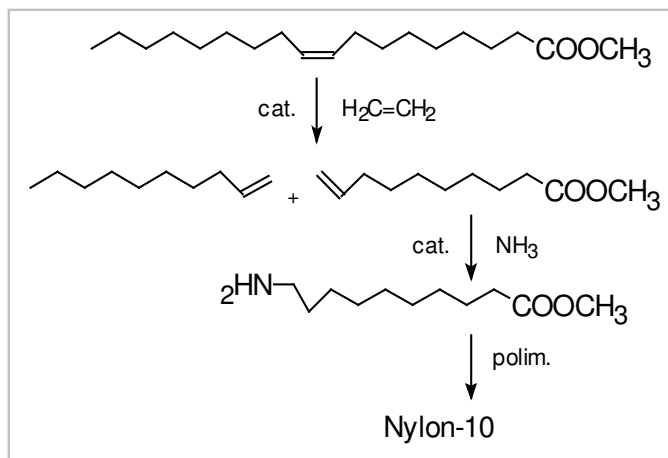


Figura 3. Obtenção de Nylon-10 a partir do oleato de metila.⁸

1.3 Constituintes dos Óleos Vegetais

Os óleos vegetais são constituídos predominantemente por triacilgliceróis, mas estão presentes em menor quantidade outros constituintes de grande interesse, chamados de componentes minoritários. Na Figura 4,

estão representados alguns desses compostos, onde a fosfatidil colina (lecitina) tem grande importância para a indústria de alimentos como emulsificante e o α -tocoferol constitui o principal antioxidante natural dos óleos vegetais. O óleo degomado é o óleo bruto que foi extraído somente os fosfolipídeos, por processo normalmente ácido.^{9,10}

Atualmente a soja domina os mercados mundiais de óleo e proteínas vegetais, apesar da competição com outras oleaginosas. As razões para tal domínio incluem fatores como as características agrônômicas favoráveis, retornos consideráveis ao produtor e processador, farelo com proteína de boa qualidade para ração animal, produtos comestíveis derivados do óleo de alta qualidade, e um mercado absorvente para toda matéria-prima produzida. A proteína e o óleo oferecem benefícios aos consumidores, a um custo bem menor do que pode ser obtido de qualquer outra oleaginosa. Além disso, a soja não contém gossipol, pigmento responsável pela cor escura do óleo e princípio tóxico do farelo de algodão e nem o ácido erúico e glucosinolatos presentes na colza, Figura 4.^{11,12}

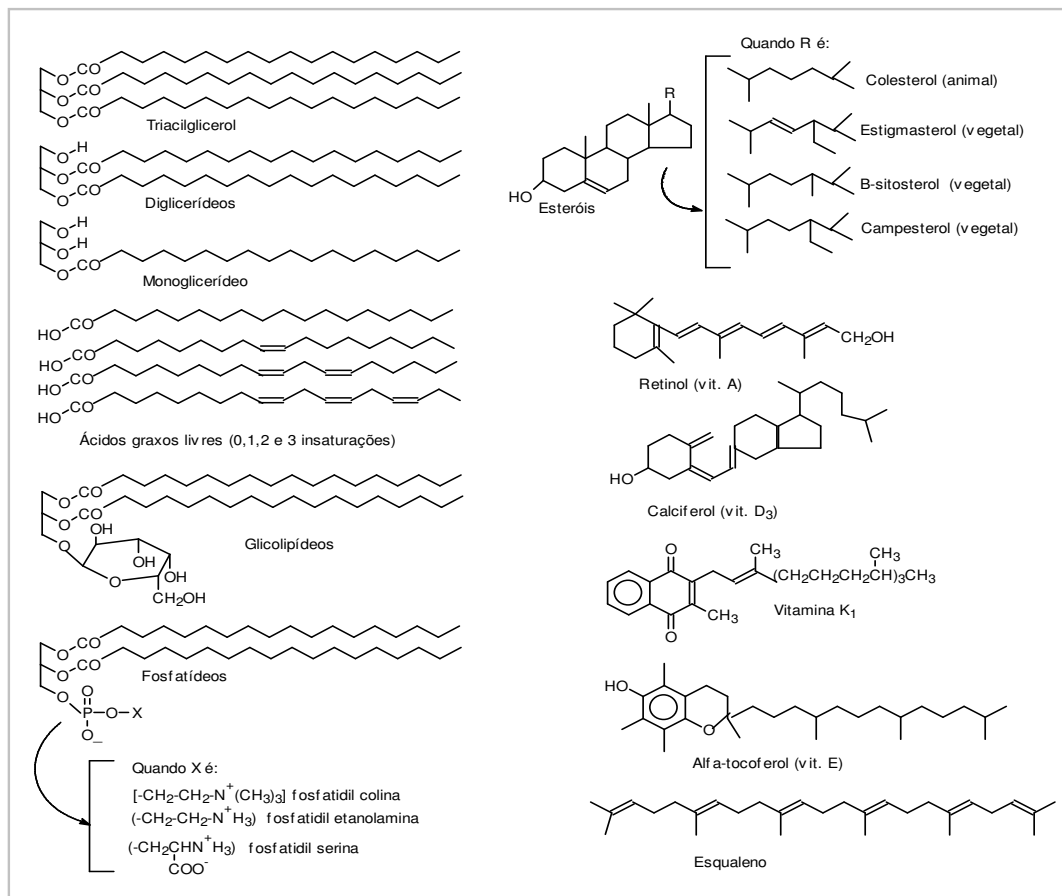


Figura 4. Constituintes dos óleos vegetais brutos, incluindo triacilgliceróis e compostos minoritários.

Como este trabalho trata da conversão de óleo de soja em biocombustível, ressalta-se que o mesmo tem composição média centrada em cinco ácidos graxos principais: palmítico (16:0), esteárico (18:0), oléico (18:1), linoléico (18:2) e linolénico (18:3). Estes compõem mais de 98% do teor de ácidos graxos do óleo. Esta característica, é relativamente constante para a maioria dos óleos comerciais disponíveis no mercado, Tabela 1.

Tabela 1. Composição de ácidos graxos no óleo de soja

No. de carbonos / insaturações	Ácidos graxos	Concentração (%)
C12:0	láurico	0,1 (máx.)
C14:0	mirístico	0,2 (máx.)
C16:0	palmítico	9,9 - 12,2
C16:1 (9)	palmitoleico	traços-0,2
C18:0	esteárico	3 - 5,4
C18:1 (9)	oléico	17,7 - 26
C18:2 (9,12)	linoléico	49,7 - 56,9
C18:3 (9,12,15)	linolénico	5,5 - 9,5
C20:0	araquídico	0,2 - 0,5
C20:1 (5)	gadoléico	0,1 - 0,3
C22:0	behénico	0,3 - 0,7
C22:1	erúcico	0,3 (máx.)
C24:0	lignocérico	0,4 (máx.)

1.4 Degradação de Gorduras e Óleos Vegetais nos Processos de Frituras

Neste estudo como também foi utilizado óleo de soja usado em frituras, faz-se necessário incluir algumas considerações sobre a degradação do mesmo durante o processo. Na fritura por imersão, utilizam-se óleos ou gorduras vegetais como meio de transferência de calor, para a produção de alimentos

em lanchonetes e restaurantes comerciais ou industriais. Em estabelecimentos comerciais, utilizam-se fritadeiras elétricas descontínuas com capacidades que variam de 15 à 350 litros, cujas operações normalmente atingem temperaturas entre 180–200 °C. Em indústrias alimentícias do setor de empanados e salgadinhos, o processo de frituras é normalmente contínuo e a capacidade das fritadeiras pode ultrapassar 1000 litros. O tempo de reutilização do óleo varia de um estabelecimento para outro, principalmente pela falta de legislação no nosso país para esse setor.¹

Por esta razão, considerando a grande diversidade de estabelecimentos que utilizam esses óleos, é difícil fazer um levantamento preciso da disponibilidade deste resíduo em grandes centros urbanos. Porém, o destino deste, normalmente inclui a produção de sabão, massa de vidraceiro, ração animal e boa parte é descartada diretamente na rede de águas pluviais e esgoto doméstico.¹³

O uso de óleos descartados de frituras como fonte de energia para ração animal deveria ser melhor avaliado pelos órgãos de saúde pública, pois foi previamente demonstrado que a ingestão de gorduras oxidadas por cobaias, dentre outras consequências, aumenta a peroxidação dos cromossomos. Além disto, o efeito acumulativo da ingestão contínua e prolongada de compostos de maior toxicidade, como monômeros cíclicos e hidrocarbonetos poliaromáticos formados durante a fritura por imersão, apresentam reconhecidas propriedades carcinogênicas.¹⁴

Os óleos e gorduras utilizados repetidamente em frituras sofrem degradações por reações hidrolíticas e oxidativas que os tornam inadequados para o processamento de alimentos. Neste caso, a oxidação, que é acelerada pela alta temperatura do processo, é a principal responsável pela modificação das características físico-químicas e organolépticas do óleo. O óleo torna-se escuro, viscoso, tem sua acidez aumentada e desenvolve odor desagradável comumente chamado de ranço. Embora possível, a purificação destes óleos com materiais adsorventes não é considerada viável do ponto de vista econômico.^{15,16}

A literatura científica está repleta de estudos que questionam a impropriedade do processamento de alimentos em óleos e gorduras aquecidas. Já está bem estabelecido que o aquecimento indeterminado de gorduras pode

acarretar a formação de compostos com propriedades antinutricionais. Entre eles, citam-se os inibidores enzimáticos, destruidores de vitaminas, produtos de oxidação de lipídios, irritantes gastrointestinais e agentes mutagênicos ou carcinogênicos.¹⁴ O óleo, depois de usado, torna-se um resíduo indesejado e sua reciclagem como biodiesel retiraria do meio ambiente um poluente e, permitiria a geração de uma fonte alternativa de energia. Assim, duas necessidades básicas seriam atendidas de uma só vez.

Durante o processo de fritura, o óleo está exposto contínua ou repetidamente à ação de vários agentes, os quais causam mudanças em sua estrutura. Destacam-se principalmente: a) a água proveniente do alimento ou da solução salina que fica sob o óleo em grande parte das fritadeiras, que leva a alterações hidrolíticas; b) o oxigênio atmosférico, que penetra no óleo desde a superfície da fritadeira causando alterações oxidativas; e c) finalmente, a temperatura em que o processo ocorre, resultando em alterações térmicas.¹⁷

A hidrólise ocorre principalmente no momento do aquecimento ou resfriamento do óleo (<100°C) e durante o armazenamento do mesmo, já que em temperaturas superiores a água é eliminada na forma de vapor. Entre os produtos de degradação formados nesse processo, o glicerol sofre desidratação e origina o propenaldeído (acroleína), composto cujo poder tóxico é reconhecido, Figura 5.^{17,18}

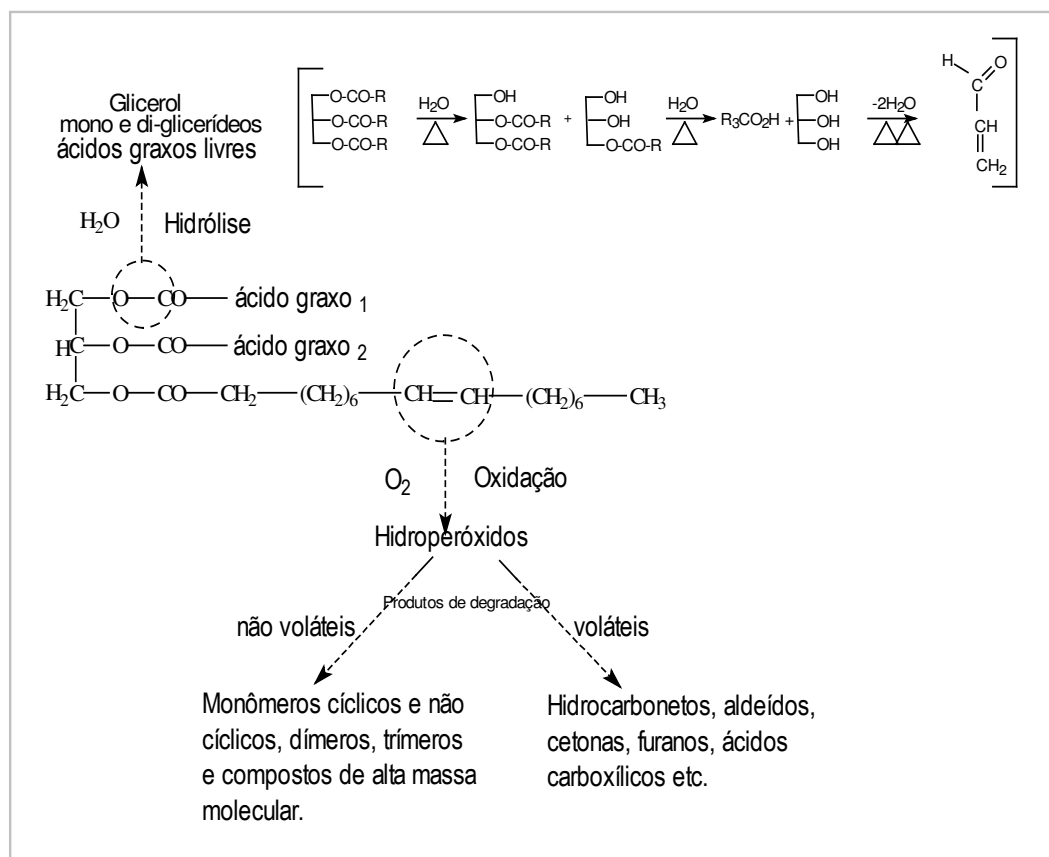


Figura 5. Tipos de alterações e produtos de degradação de óleos e gorduras usados em

As reações de oxidação nos óleos ocorrem basicamente nas insaturações dos seus ácidos graxos e envolvem três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação ocorre abstração de hidrogênio do grupo metileno adjacente a insaturação formando radicais livres. Estes, reagem com o oxigênio atmosférico originando peróxidos, os quais interagem com novas moléculas insaturadas formando hidroperóxidos, que se decompõem e formam compostos estáveis, Figuras 5 e 6.

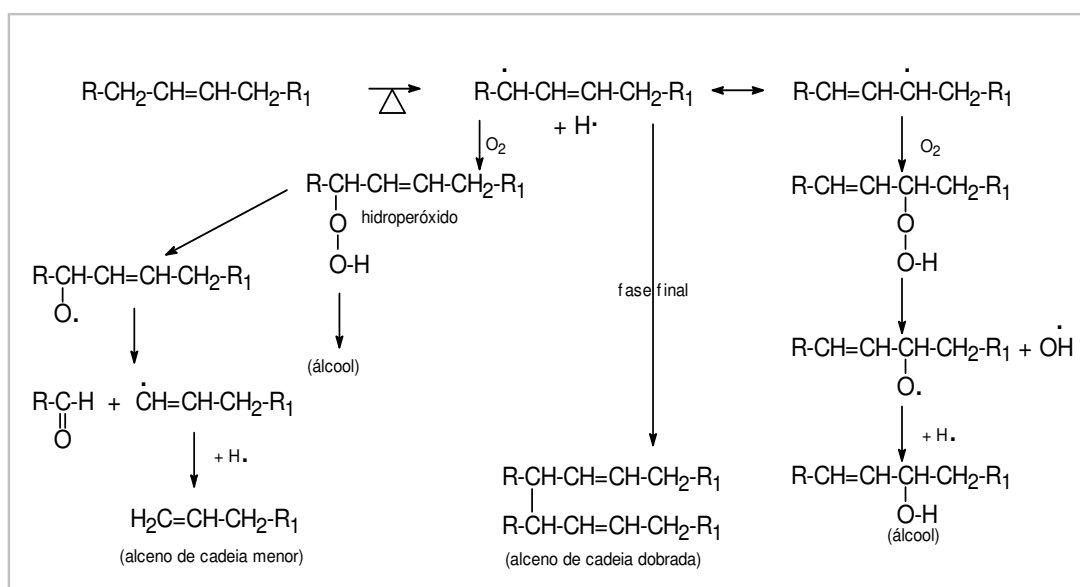


Figura 6. Mecanismo da decomposição de óleos e gorduras no processo de frituras.

Destaca-se que em baixas temperaturas, a velocidade de formação dos hidroperóxidos é maior que sua decomposição e, forma basicamente monômeros e triglicerídeos oxidados. Por outro lado, em altas temperaturas a decomposição destes é maior que sua formação e, os principais compostos formados são dímeros e polímeros. Mesmo assim, nos dois casos a formação de produtos ocorre via radicais livres.

Em temperaturas elevadas, a dimerização pode ser explicada através da reação de Diels-Alder, e a presença de ácidos graxos poliinsaturados é indispensável, bem como sua prévia conjugação. Porém, mediante estudos com o ácido oléico, foi demonstrado que a reação de adição de Diels-Alder não é o único mecanismo possível na polimerização, conforme

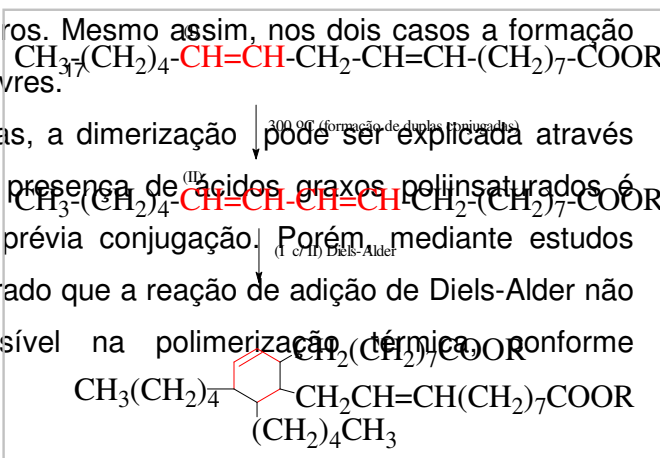


Figura 7. Dimerização do ácido linoléico a partir do óleo de soja.¹⁹

demonstrado na Figura 6. A obtenção de dímeros foi também explicada com base na formação e combinação de radicais alila, produzidos por perda de hidrogênio ativo adjacente a ligação dupla, Figura 7.^{17,19,20}

A decomposição de óleo de soja entre 250 – 350 °C, foi estudada por Shwab e col.²⁰ que obtiveram aproximadamente 75% dos produtos formados por alcanos, alcenos, aromáticos e ácidos carboxílicos com 4 à 20 átomos de carbono. O mecanismo da decomposição térmica é explicado pela teoria radicalar, com a formação de compostos aromáticos, suportada pela adição de Diels-Alder. A presença de hidrocarbonetos é justificada pela clivagem dos hidroperóxidos e subsequente perda de CO₂, Figura 8.

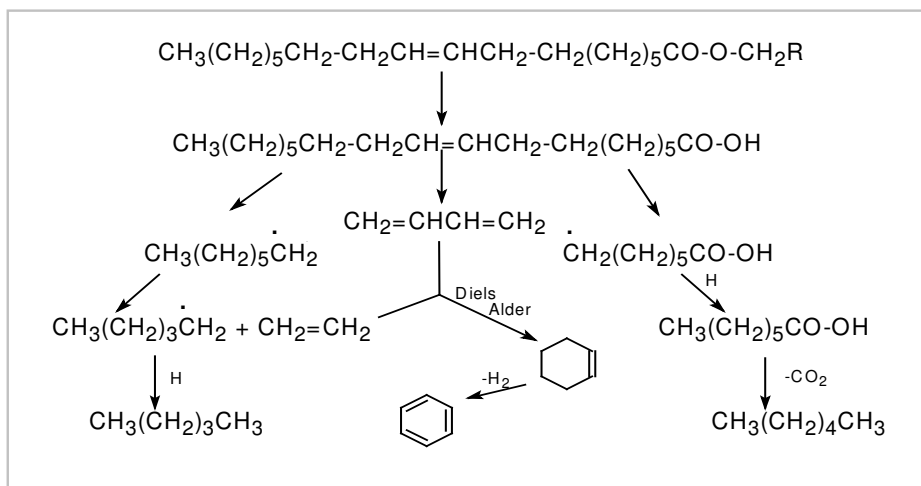


Figura 8. Mecanismo da decomposição do óleo de soja à 250 – 350 °C.²⁰

1.5 Biodiesel

De um modo geral, o biodiesel foi definido pela “National Biodiesel Board” dos Estados Unidos como o derivado mono-álquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores do ciclo Diesel).²¹

Enquanto produto, pode-se dizer que o biodiesel tem as seguintes características: é virtualmente livre de enxôfre e aromáticos; tem alto número de cetano; possui teor médio de oxigênio em torno de 11%; maior viscosidade e

ponto de fulgor que o diesel convencional, atinge mercado específico, diretamente associado à atividades agrícolas; tem preço de mercado relativamente superior ao diesel comercial; e, no caso do biodiesel de óleo de fritura, caracteriza-se por um grande apelo ambiental.^{13,22,23}

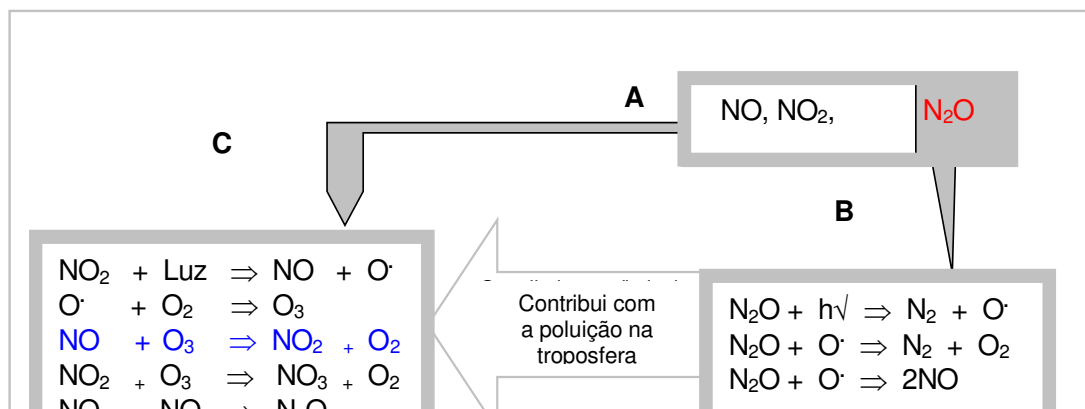
Com relação ao custo, se o processo de aproveitamento do principal subproduto (glicerina) e a recuperação do catalisador for otimizada, e se houverem incentivos fiscais por parte do governo, a produção de biodiesel poderá ser obtida a custo competitivo com o óleo diesel vendido nas bombas dos postos de abastecimento. Por outro lado, enquanto combustível, o biodiesel necessita de algumas características técnicas que podem ser consideradas imprescindíveis. A reação de transesterificação deve ser completa, acarretando ausência total de ácidos graxos remanescentes e o biocombustível deve ser de alta pureza, não deve conter nem traços de glicerina livre, de catalisador residual ou de álcool excedente da reação. Além disso, o biodiesel apresenta algumas características complementares, que são mostradas a seguir.¹³

- É livre de enxôfre e compostos aromáticos, apresenta alto número de cetanos, ponto de combustão apropriado, excelente lubricidade, não tóxico e biodegradável;
- Reduz sensivelmente as emissões de (a) partículas de carbono (fumaça), (b) monóxido de carbono, (c) óxidos sulfúricos e (d) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos;
- Complementa todas as novas tecnologias do diesel, com desempenho similar e sem a exigência da instalação de uma infraestrutura ou política de treinamento específico;
- O gás carbônico liberado é absorvido pelas oleaginosas durante o crescimento, o que equilibra o balanço negativo gerado pela emissão na atmosfera;
- Permite a valorização de sub-produtos de atividades agro-industriais, aumento na arrecadação regional de ICMS, aumento da fixação do homem no campo e de investimentos complementares em atividades rurais;
- Pequenas e médias plantas para produção de biodiesel, podem ser implantadas em diferentes regiões do país, aproveitando a matéria prima disponível em cada local.

Para a obtenção do biodiesel, a reação de transesterificação de óleos vegetais com álcoois de cadeias curtas, pode ser realizada tanto em meio ácido quanto em básico. O meio básico apresenta melhor rendimento e menor tempo de reação do que o ácido.²⁴ Entretanto, é necessário usar excesso de álcool devido ao caráter reversível da reação. A alcoólise com metanol é tecnicamente mais viável do que com etanol. O uso de etanol anidro na reação efetivamente minimiza este inconveniente, embora não implique em solução para o problema inerente à separação da glicerina do meio reacional, que no caso da síntese do éster metílico, pode ser facilmente obtida por simples decantação.^{25, 26}

Embora os primeiros testes da utilização de biodiesel como combustível alternativo sejam do início do século XX, sua comercialização ainda apresenta algumas dificuldades tecnológicas. Por exemplo, um dos principais problemas técnicos está relacionado com a qualidade de ignição em relação ao diesel convencional. Entretanto, aminas e amidas terciárias de ácidos graxos são mais eficientes que os ésteres e podem corrigir essa deficiência, quando utilizados como aditivos.²⁷ Outra dificuldade relacionada com o uso de biodiesel, refere-se a emissão de gases NO_x (NO, NO₂ e N₂O). A produção desses gases pela queima do biodiesel é superior aos emitidos pela queima do diesel convencional, em torno de 10%. Entretanto, com o uso de conversores catalíticos nos escapes dos veículos, este impacto poluente já pode ser amenizado. Os gases NO₂ e CO são transformados em N₂ e CO₂. Os gases NO_x estão relacionados com a formação de chuva ácida, ozônio troposférico (principal componente tóxico do smog fotoquímico), e o radical hidroxila (principal oxidante atmosférico responsável por inúmeras interações).^{28,29}

Na queima de combustíveis, além de energia produz-se vários compostos (material particulado, hidrocarbonetos, SO₂, SO₃, CO, CO₂ e NO_x). Entre os gases nitrogenados, o N₂O é pouco reativo mas também contribui com as reações dos gases NO_x e formação de chuva ácida, conforme mostra o ciclo de reações da Figura 9.



Segundo relatório preparado pelo Ministério da Indústria e Comércio do Governo Federal, foram desenvolvidos testes em território nacional com vários tipos de óleos vegetais transesterificados, puros ou misturados ao diesel na proporção de 30%. Nesses testes, foram percorridos mais de um milhão de quilômetros em caminhões, ônibus e tratores e os principais problemas apresentados foram associados a pequeno acúmulo de material nos bicos injetores e um leve decréscimo da viscosidade do óleo lubrificante.³⁰

Testes de desempenho de curta duração também foram realizados em bancada dinamométrica em plena carga, com motores de injeção indireta do tipo x8/29, previamente otimizados para a queima de óleo diesel puro. Uma série de ésteres etílicos de composição química e graus de insaturação variados foram testados. Os resultados indicaram que as propriedades dos ésteres foram semelhantes às do óleo diesel, exceto pelo ponto de inflamabilidade. Verificou-se, no entanto, que algumas características físicas do biodiesel de óleo de mamona foram totalmente diferentes das dos demais, particularmente em relação à viscosidade, Tabela 2.³⁰

Tabela 2. Especificações dos ésteres etílicos de várias espécies vegetais e do óleo diesel.³⁰

Características	Origem dos Ésteres				
	Mamona	Milho	Algodão	Piqui	Óleo Diesel
Densidade 20°C (g/cm ³)	0,9190	0,8760	0,8750	0,8650	0,8050-0,8650
Viscosidade (37,8° / cSt)	21,60	5,40	6,00	5,20	2,00-5,40
Inflamabilidade (°C)	208	196	184	186	55

Ponto de fluidez (°C)	-30	-9	-3	+5	-6
Destilação a 50% (°C)	326	341	340	336	250 (65%)
Destilação a 90% (°C)	334	343	342	346	350 (85%)
Corrosão	0	0	0	0	2
Teor de cinzas (%)	0	0	0	0	0,01
Teor de enxofre (%)	0	0	0	0	0,8
Índice diesel	39,0	57,0	57,5	60,0	53,0
Cor (ASTM)	2,0	1,5	1,0	0,5	2,5

No caso específico da utilização de ésteres etílicos do óleo de piqui, foi verificado que entre 3000 e 5000 rpm, a potência efetiva e o torque do motor foram pouco inferiores aos observados com o óleo diesel. No entanto, entre 1500 e 3000 rpm, os índices obtidos para ambos foram praticamente idênticos, o mesmo ocorreu com outros ésteres. Considerando-se que o motor utilizado nos testes não foi previamente modificado para o uso de biodiesel, a pequena diferença observada no desempenho a partir de 3000 rpm, não foi tecnicamente significativa.³⁰

1.6 Considerações Gerais sobre as Enzimas

As enzimas são, em geral, proteínas que atuam como catalisadores e aceleram a velocidade das reações. Atuam em sistemas biológicos com alta especificidade de reação e provavelmente sem a atuação enzimática a vida não existiria da forma como a conhecemos.³¹

Quimicamente, as enzimas são macromoléculas de alta massa molecular formadas por subunidades conhecidas por aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. Os resíduos de aminoácidos formam ligações covalentes entre si, pelo grupo amino de um aminoácido com o grupamento carboxílico de outro, constituindo cadeias polipeptídicas extensas, que assumem um arranjo espacial complexo sendo a sua forma estrutural difícil de ser determinada, Figura 10.^{31,32}

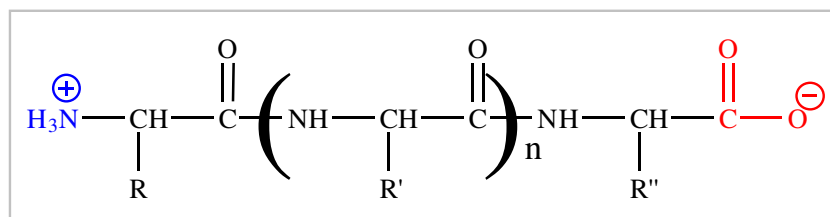


Figura 10. Estrutura genérica de um polipeptídeo mostrando, a direita o resíduo C-terminal e a esquerda o N-terminal.

Ainda que a maioria das enzimas envolvidas nas atividades metabólicas fundamentais das células tenham sido identificadas, muitos problemas permanecem sem solução, incluindo o controle genético das sínteses enzimáticas, os mecanismos de regulação das atividades enzimáticas e o papel das formas múltiplas de certas enzimas no desenvolvimento e diferenciação. Ainda não está totalmente esclarecido em termos moleculares, de que maneira elas catalisam as reações químicas com eficiência, precisão e especificidade tão elevada.³³

As enzimas, são altamente versáteis na catálise de vários tipos de reações, que ocorrem sob condições suaves, normalmente à temperatura ambiente e em pH próximo à neutralidade. As velocidades de algumas reações catalisadas por enzimas podem ser até 10^{12} vezes maiores do que as não catalisadas. Uma enzima geralmente catalisa uma única reação química ou um conjunto de reações intimamente relacionadas. Reações colaterais que levam ao desperdício de formação de produtos secundários raramente ocorrem. O grau de especificidade para o substrato é normalmente alto e, às vezes, absoluto.^{31,33} Por outro lado, a causa mais comum da inativação das enzimas é a temperatura elevada, com a perda da conformação secundária ou terciária. No entanto, segundo Turner e col.³⁴ a termodesnaturação é dependente da quantidade de água associada com a proteína.

Algumas enzimas dependem, para exercer sua atividade, somente da sua própria estrutura como proteína, enquanto outras requerem também um ou mais componentes não-proteicos chamados cofatores. O cofator pode ser um íon metálico ou uma molécula orgânica chamada de coenzima, sendo que algumas requerem ambos. Os cofatores são geralmente estáveis ao calor, enquanto que muitas enzimas perdem sua atividade pelo aquecimento.³¹

As coenzimas cooperam com as enzimas na catálise das reações químicas. Como já citado, são substâncias orgânicas de baixa massa molecular que não fazem parte da estrutura da enzima. Entre elas, citam-se a glutatona, ácido ascórbico, citocromos, coenzimas A e Q. Os grupos prostéticos atuam de

maneira semelhante às coenzimas e se encontram firmemente ligadas à molécula da enzima. Como exemplos tem-se as flavinas, piridoxinas, tiamina e os grupos “heme”.

As substâncias ativadoras são necessárias para a ocorrência de certas reações enzimáticas. As mais comuns são os íons Mg^{++} , Zn^{++} , Ca^{++} , Cl^- . Por outro lado, um grande número de substâncias inibem ou diminuem a atividade enzimática. Entre elas tem-se o HCN, H_2S , CO, ácido cloroacético, mercaptanas, e metais pesados (Hg^{++} , Cu^{++} , Ag^+ , Pb^{++}).³⁵

O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado de holoenzima. Quando o cofator é removido, a proteína remanescente, que é cataliticamente inativa recebe o nome de apoenzima. As coenzimas funcionam usualmente como transportadores intermediários dos grupos funcionais, de átomos específicos, ou de elétrons que são transferidos na reação enzimática. Outras características gerais das enzimas são mostradas abaixo:

- São proteínas que atuam como catalisadores;
- Quimicamente são polímeros formados por aminoácidos;
- Exibem sua mais alta atividade catalítica em água;
- Operam em condições suaves;
- São seletivas para substratos;
- São estereosseletivas em relação ao que catalisam;
- Possuem grupos COOH, OH, SH, CONH₂ (cataliticamente ativos).

A velocidade de uma reação enzimática é influenciada pela concentração do substrato, pH, concentração da enzima, temperatura e presença de ativadores ou inibidores. Esses fatores afetam a atividade e podem dificultar a conversão de reagentes em produtos.³³

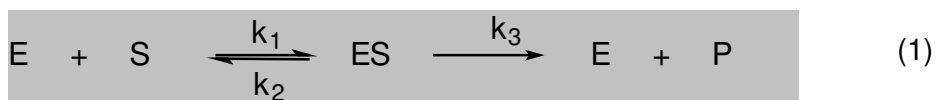
Nas reações enzimáticas, em concentrações muito baixas, a reação procede vagorosamente. Por outro lado, com o aumento da concentração do substrato, a velocidade aumenta proporcionalmente em função da frequência de colisões entre a enzima e as moléculas reagentes. Quando a enzima se aproxima da velocidade máxima em que ela pode combinar com o reagente e formar produtos, o efeito do aumento da concentração do substrato diminui. Nesse ponto, a enzima estabelece uma interação com o reagente que mesmo aumentando a concentração deste, ela não terá efeito na velocidade da reação e portanto estará saturada. Porém, para reações não catalisadas por enzimas, a velocidade é aumentada quase que indefinidamente com o aumento da

concentração dos reagentes. Tal como ocorre para a maioria das reações químicas, a velocidade das reações catalisadas por enzimas aumenta geralmente com a temperatura, dentro de certa faixa na qual ela é estável e mantém a sua atividade integral.³³

A mudança no pH pode também afetar a atividade da enzima. Cada uma tem um pH ótimo, que mantém a configuração normal no ambiente em que ela opera. Acima ou abaixo deste valor, a atividade da enzima se reduz. A estrutura terciária da proteína depende de interações tais como ligações de hidrogênio entre os grupos R. A mudança no pH pode alterar a ionização de grupos funcionais presentes na cadeia lateral e destruir a configuração normal, em alguns casos desnaturando a enzima. Quando desnaturada, ela não se combina com o substrato. O pH ótimo de uma enzima não é necessariamente idêntico ao do seu meio intracelular normal, que pode estar na parte ascendente ou descendente do seu perfil de atividade em função do pH. Isso sugere que a inter-relação pH-atividade pode ser um fator de controle intracelular da atividade enzimática.^{31,33,35}

Grande parte do poder catalítico das enzimas deve-se à capacidade delas em interagirem com o substrato em orientações favoráveis nos complexos enzima-substrato (ES). O substrato liga-se ao centro ativo da enzima e parte da especificidade catalítica da mesma depende em parte da natureza das ligações envolvidas.^{32,36}

Leonor Michaelis e Maud Menten, em 1913, propuseram um modelo para explicar as propriedades cinéticas de algumas enzimas, que pode ser resumido pela Equação (1).^{36,37}



Nesse modelo, uma enzima (E) combina-se com um substrato (S) formando um complexo (ES), que pode formar produto (P) ou dissociar-se em E e S. A velocidade (V) de formação de produto é fornecida pela Equação (2), de Michaelis-Menten;³⁶

$$V = V_{m\acute{a}x} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (2)$$

onde $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade quando a enzima está completamente saturada com o substrato, e K_M é a constante de Michaelis que representa a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é a metade da velocidade máxima.

Uma noção mais didática sobre catálise enzimática foi proposta por Haldane em 1930, e elaborada por Linus Pauling em 1946. Na ordem das reações catalisadas, uma enzima assume a conformação complementar ao estado de transição da reação. Neste caso, uma enzima hipotética “pinoase” é designada para catalisar a quebra de um pino de metal: a) antes do pino ser quebrado, ele é dobrado (estado de transição), ocorrendo em seguida a quebra do pino em duas partes (produtos). b) a enzima apesar de envolver o substrato (pino), estabiliza-o, de maneira que a interação magnética impede que o pino seja dobrado pela pinoase. c) a enzima então assume uma conformação complementar ao estado de transição da reação, o que desestabiliza a estrutura do substrato (pino), contribuindo para a formação dos produtos. Figura 11.³³

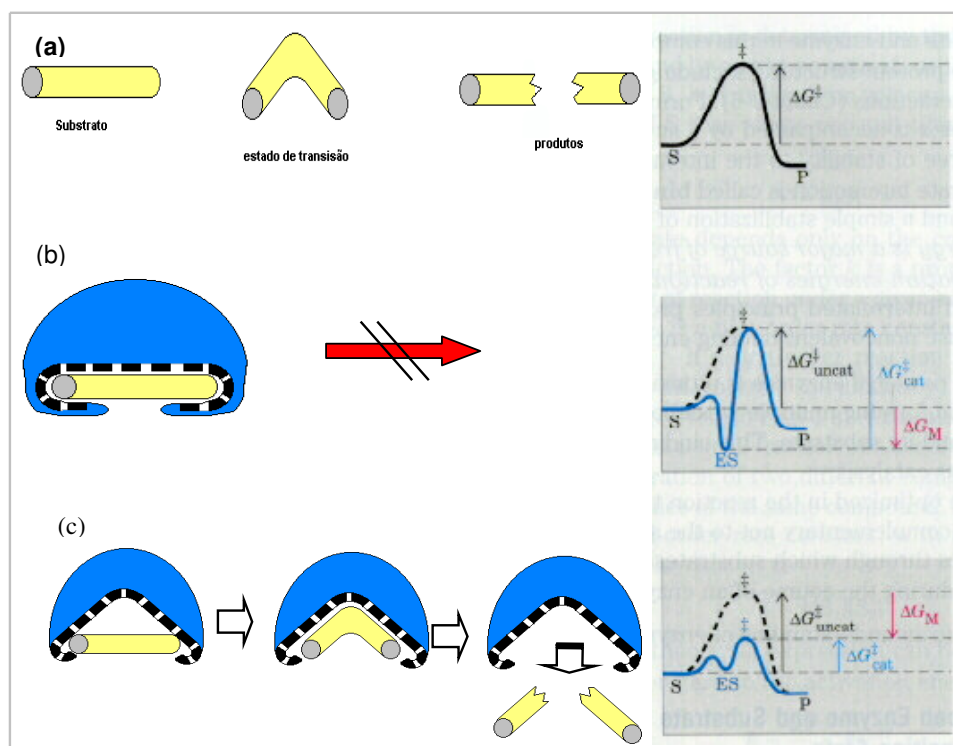


Figura 11. Diagramas hipotéticos de energia para reações catalisadas por enzimas e a correspondente não catalisada.³³

As enzimas possuem um “centro ativo”, onde se processam as reações químicas. Este é constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia da proteína que se encontram em íntima e mútua proximidade espacial. Acredita-se que os aminoácidos que constituem o centro ativo formam na superfície da enzima uma espécie de “fenda”, na qual o substrato pode ajustar-se. Esta fenda deve possuir um formato definitivo, que acomoda algumas moléculas, como os substratos e inibidores, mas rejeite outras espécies e impeça-os de entrar em contato ativo com a enzima. Esta é mais uma explicação para a especificidade enzimática e a razão por que as estruturas secundária e terciária são importantes para a atividade da enzima. Elas determinam a forma global da molécula, e em particular, geram o centro ativo, que de outra maneira seria uma fileira uniforme de resíduos de aminoácidos.^{33, 36, 38}

Para adaptar-se ao centro ativo, um substrato deve ter uma forma complementar a este. O modelo mais ilustrativo é o de Emil Fischer da chave e fechadura, reportado em 1890, Figura 12.^{31,36,38}

No entanto, é evidente que as formas dos centros ativos de algumas enzimas são altamente modificadas pela interação com o substrato, como foi postulado por Daniel E. Koshland Jr. em 1958. Os centros ativos dessas enzimas têm formas que são complementares à do substrato, mas somente depois de ligado. Esse processo de reconhecimento dinâmico é chamado de encaixe induzido, Figura 13.^{31, 36, 38}

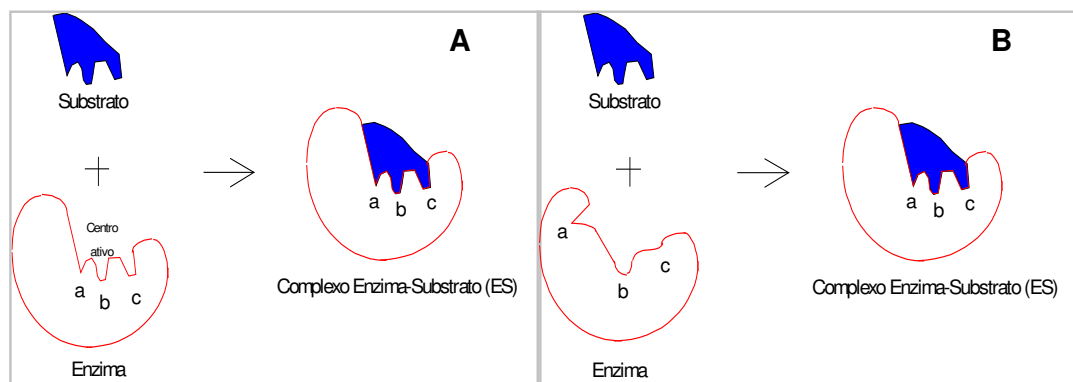


Figura 12. Modelos de interação do substrato com a enzima. (A) Modelo de chave e fechadura. (B) Modelo de encaixe induzido.

As enzimas não alteram o equilíbrio das reações, mas atuam reduzindo a energia livre de ativação (ΔG). Alguns inibidores combinam-se com estas através de grupos funcionais fora do centro ativo, dificultando o acesso do substrato, causando mudanças na conformação da proteína e reduzindo a habilidade em diminuir a energia de ativação. Estes efeitos não são revertidos pelo aumento da concentração do substrato.³³

Os nomes mais utilizados das enzimas tem o sufixo “ase” unido ao substrato da reação, por exemplo, a α -amilase hidrolisa o amido. Algumas enzimas retêm seus nomes comuns originais, que não fornecem indicação sobre a reação enzimática associada, como a tripsina, pepsina etc.

A nomenclatura sistemática foi estabelecida pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), na qual as enzimas são divididas em seis classes principais e várias subclasses: as Oxirredutases realizam oxidações e reduções; as Transferases fazem a transferência de um grupo entre substratos; as Hidrolases catalisam hidrólises; as Liasas realizam a eliminação de moléculas pequenas; as Isomerases promovem isomerizações; e as Ligases produzem a ligação de duas ou mais moléculas, Tabela 3.^{31,39,41}

Tabela 3. Classificação das enzimas segundo a IUBMB.

Classe de Enzimas	Algumas Subclasses	Tipos de Reações Catalisadas
Oxidoreductases	Desidrogenases Oxidases Redutases	Formação de ligação dupla por eliminação de H ₂ Oxidação Redução
Transferases	Quinase Transaminase	Transferência de um grupo fosfato Transferência de um grupo amino
Hidrolases	Nucleases Lipases Proteases	Hidrólise de um grupo fosfato Hidrólise de um grupo éster Hidrólise de um grupo amido
Liasas	Descarboxilases Desidrases	Eliminação de CO ₂ Eliminação de H ₂ O
Isomerases	Epimerases	Isomerização de um centro estereogênico

Ligases	Carboxilases Sintetases	Adição de CO ₂ Formação e clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C.
---------	----------------------------	--

Para sua identificação todas enzimas possuem um código EC do tipo A.B.C.D. Onde EC representa Enzyme Commission; A, denota o tipo principal de reação; B, indica a posição para o substrato ou da molécula transferida; C, indica a natureza do co-substrato; e D, é o número individual da enzima. Por exemplo, o código EC 3.1.1.3 corresponde à lipase de *Chromobacterium viscosum*. Neste caso, **3**, corresponde a classe das hidrolases; **3.1** atua sobre as ligações de ésteres; **3.1.1** indica que é hidrolases de ésteres carboxílicos e **3.1.1.3** é o número de série da enzima em sua subclasse.⁴²

1.7 Transesterificação Enzimática de Óleos e Gorduras

Atualmente, o processo de produção comercial de biodiesel é 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, Tabela 4.^{43,44,45,46}

Tabela 4. Vantagens e desvantagens dos processos químico e enzimático na produção de biodiesel.⁴⁶

Processos	Vantagens	Desvantagens
Químico	<ul style="list-style-type: none"> • Simplicidade • Alto rendimento • Curto tempo de reação 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade de separação do catalisador • Impossibilidade de reutilização do catalisador • Dificuldade de utilização de etanol hidratado • Obtenção de produtos com menor grau de pureza
Enzimático	<ul style="list-style-type: none"> • Facilidade de separação do catalisador (suporte) • Obtenção de produtos com maior grau de pureza • Possibilidade de utilizar etanol hidratado na reação 	<ul style="list-style-type: none"> • Longo tempo de reação • Custo das enzimas • Baixo rendimento

As enzimas hidrolíticas, entre elas as lipases, têm sido largamente aplicadas em síntese orgânica por nem sempre necessitarem de coenzimas, apresentarem relativa estabilidade e frequentemente tolerarem solventes orgânicos.^{47,48}

As lipases são dotadas de uma especificidade pelo substrato que supera a especificidade de todas as outras enzimas conhecidas.

Isto lhes confere uma potencial aplicação de fronteira. Elas podem ser empregadas na produção de fármacos, cosméticos, modificações de couros, detergentes, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos e de outros materiais orgânicos sintéticos.^{49,50,51,52}

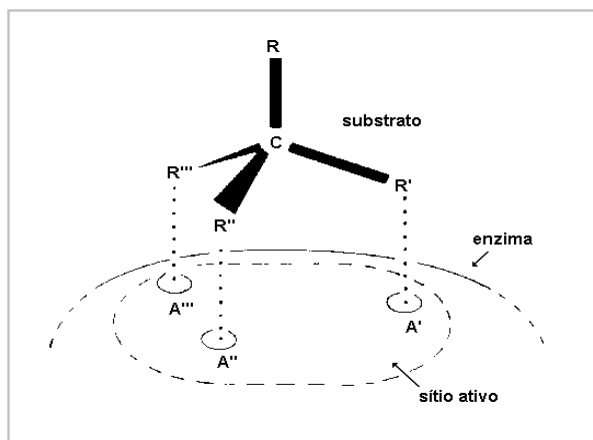


Figura 13. Tríade catalítica ou regra dos três pontos.³¹

Segundo A. G. Ogston, a estrutura cristalina da maioria das lipases, apresenta uma tríade no sítio catalítico, formada por Ser-His-Asp ou Ser-His-Glu, conhecida como regra dos três pontos ou “tríade catalítica” a qual explica a enantioselectividade das enzimas, Figura 13.⁴⁰

Atualmente, já se pode ter acesso a bancos de dados, na rede mundial de computadores (Internet), que armazenam uma grande quantidade de estruturas de proteínas determinadas por cristalografia de raios-X.⁵³

Apesar das enzimas possuírem centenas de aminoácidos, apenas alguns deles são diretamente responsáveis pela catálise. Porém, resíduos vizinhos podem contribuir para a estabilização de estados intermediários e desta forma auxiliar na catálise. A estrutura tridimensional da lipase de *Mucor miehei*, apresentando os resíduos de aminoácidos do centro ativo responsáveis pela catálise (His-257, Ser-144 e Asp-203), é mostrada na Figura 14.⁵³



As lipases (E.C.3.1.1.3.) fazem parte de um grupo de enzimas hidrolíticas que catalisam a quebra de ligações de ésteres carboxílicos de acil gliceróis para liberar ácidos graxos e glicerol. Além da hidrólise, podem também exercer sua atividade catalítica em reações de interesterificação, esterificação, transesterificação, acidólise e glicerólise, Figura 15.^{46,54,55}

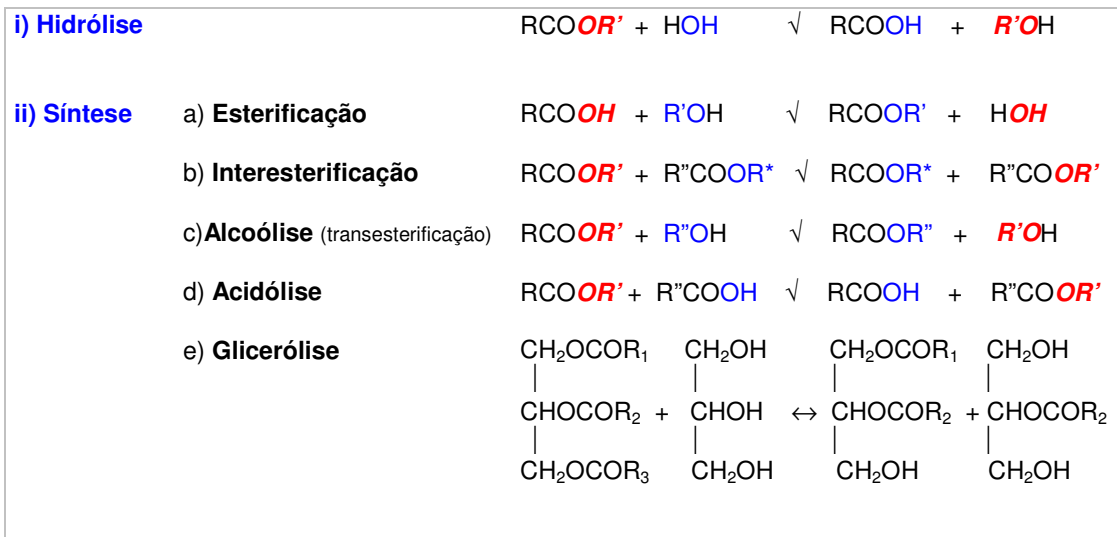


Figura 15. Reações catalisadas por lipases.

Segundo Bonn e Pereira,² 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 que ela contém. Normalmente a composição de ácidos graxos de óleos e gorduras é modificada 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.^{56,57,58,59,60}

Facioli e Gonçalves,⁴⁷ reportaram a modificação de óleo de piqui por via enzimática. Nesse trabalho foi estudada a reação de interesterificação do óleo de polpa de piqui com ácido esteárico, utilizando a lipase específica 1,3 de *Mucor miehei* (Lipozyme). As condições ideais de interesterificação em micro-escala foram estabelecidas. Monoglicerídeos são largamente usados como emulsificantes para produtos de padaria, e sua obtenção tem sido estudada através de lipases.⁶¹ A lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme) foi também usada por Pecnik e col.⁶² para obtenção do glicerol 1,2-isopropilideno-3-oleoil, a partir da condensação do glicerol com acetona, seguido de esterificação com ácido oléico.

A utilização de lipases para a remoção de gorduras aderidas à tripas de bovinos em abatedouro, com o propósito de limpeza, mostrou ser um processo simples, rápido e de baixo custo.⁶³

Embora os processos de transesterificação enzimática para obtenção de biodiesel, ainda não sejam comercialmente desenvolvidos, novos resultados tem sido reportados em artigos e patentes.⁶⁴ De um modo geral, estes estudos consistem na otimização das condições de reação (solvente, temperatura, pH, tipo de microorganismo que gera a enzima, etc), a fim de estabelecer as características para aplicações industriais. Contudo, tanto o rendimento como o

tempo de reação ainda são desfavoráveis em comparação com o sistema de reação 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 otimizar condições para obtenção de ésteres metílicos e etílicos.⁴⁵ Nesse estudo, foi verificada a eficiência da alcoólise com metanol, etanol, n-propanol, n-butanol e n-pentanol, em diferentes condições. Foi também 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 a lipase de *Pseudomonas sp* com etanol, à 45 °C. Os demais resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Rendimentos dos ésteres (%) obtidos através da reação de transesterificação enzimática do óleo de girassol com e sem solvente.⁴⁵

	Álcoois	Lipases		
		<i>P. fluorescens</i>	<i>Mucor miehei</i>	<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		

Na alcoólise do óleo de girassol com etanol sem solvente, Mittelbach⁴⁵ 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 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 col.⁶⁵ 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 e 55 °C. 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, Tabela 6.

Tabela 6. Rendimentos dos ésteres (%) obtidos através da reação de transesterificação enzimática de triglicerídeos com álcoois primário e secundário.⁶⁵

	Álcoois	Lipases		
		<i>M. miehei</i>	<i>C. antarctica</i>	<i>P. cepacia</i>
Sebo	MeOH	94,8	25,7	13,9
	EtOH (95%)	98,3	/	13,7
	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	/	/

A transesterificação do óleo de colza com 2-etil-1-hexanol com lipases na ausência de solvente orgânico foi estudada por Linko e col.⁶⁶, que testaram várias enzimas comerciais disponíveis e o melhor resultado foi obtido com lipase de *Candida rugosa* (CRL). A condição ótima de transesterificação foi com a razão molar de óleo/álcool (1:2,8), com 1% de adição de água, 14,6% de lipase e 1 hora de reação.

A estabilidade e dispersibilidade de lipases nativas em solvente orgânico é menor que em água. Para melhorar estes parâmetros, Murakami e col.⁶⁷

ligaram covalentemente o grupo acila p-dimetilsulfôniofeniléster ao grupo amino do resíduo da lisina da lipase de *Phycomyces nites*. A velocidade da reação de transesterificação em meio orgânico foi quase 40 vezes maior em relação à lipase nativa.

Segundo Osterberg e col.⁶⁸, a reação de transesterificação de uma série de triglicerídeos insaturados com ácido esteárico usando as lipases de *Rhizopus sp* e *Rhizopus delemar*, mostrou que a posição da ligação dupla, e não o grau de insaturação, é o fator decisivo na velocidade da reação. Por exemplo, a ligação dupla da posição γ do ácido linolénico inibe a reação.

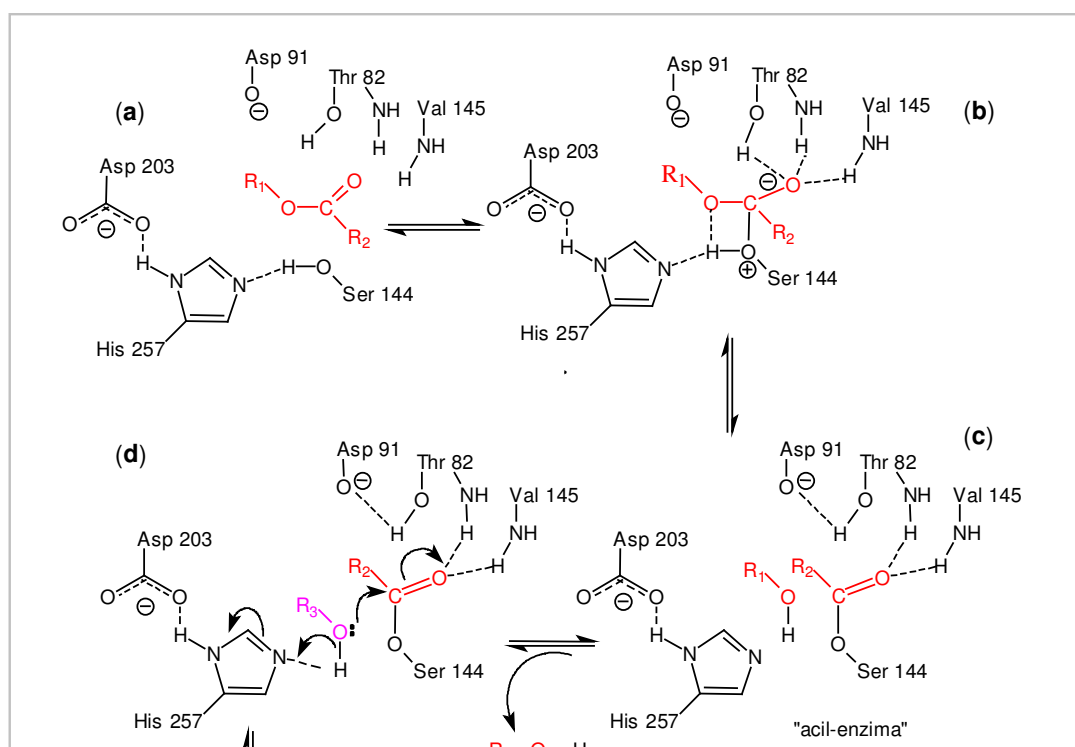
A síntese do butirato de citronelila e caproato de geranila por transesterificação com lipases de *Pseudomonas sp*, foi estudada por Yee e col.⁴⁹ Os parâmetros da reação investigados foram a quantidade de enzima, o efeito da concentração do substrato, a adição de água, temperatura, tempo de reação, solvente orgânico, pH e reutilização do biocatalisador. Os melhores rendimentos (96 à 99%), foram obtidos com o uso de 15% da enzima em relação aos reagentes. O aumento da concentração do álcool terpênico inibiu a atividade da lipase, enquanto que o acréscimo do grupo acil doador (triacilglicerol) aumentou a concentração do éster produzido. Os melhores rendimentos foram obtidos nas temperaturas entre 30 à 50 °C, após 24 horas de reação e em pH próximo a 7. A adição de quantidade superior a 2% de água, diminuiu o rendimento dos respectivos ésteres.

A relação das atividades hidrolíticas, esterificação e transesterificação foi investigada com nove lipases comerciais por Wu e col.⁶⁹ Usando óleo de oliva e de colza, os autores reportaram que há uma correlação direta entre estas atividades. Assim, de acordo com os resultados obtidos, a atividade hidrolítica da lipase pode ter pouco valor na predição da atividade sintética. Ao contrário, a lipase pode não exibir atividade sintética mas pode apresentar alta atividade hidrolítica.

Segundo Cernia e col.⁷⁰ a natureza do meio reacional, influencia a atividade de lipases microbianas em reações de esterificação e transesterificação, empregando substratos naturais e compostos sintéticos com relação a velocidade de reação e a enantiosseletividade. Dados experimentais obtidos, demonstraram que quando não há correlação substancial entre

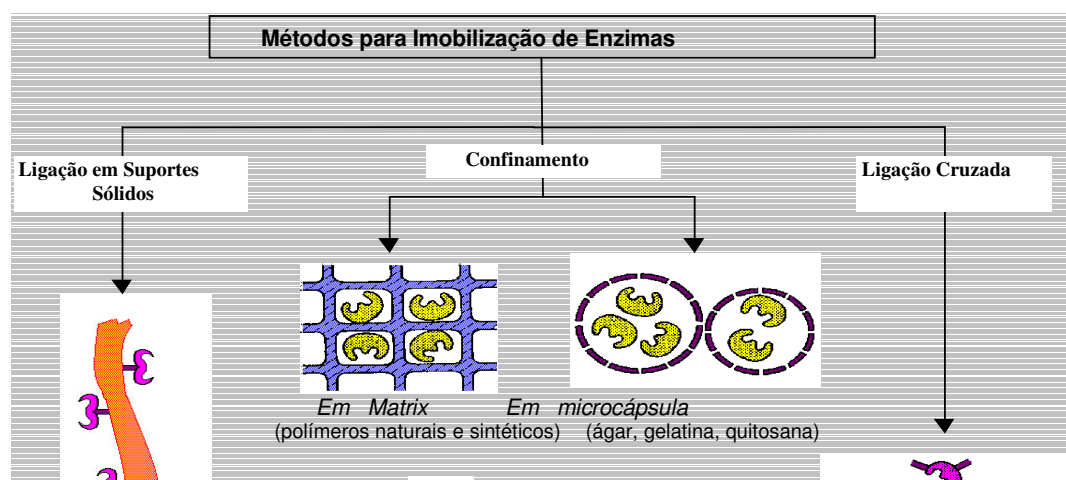
enantiosseletividade e algumas características físico-químicas do solvente, como hidrofobicidade e constante dielétrica, a polaridade e a hidrofobicidade são capazes de modular a atividade da lipase. De acordo com Costa e col.⁷¹, o efeito da hidrofobicidade de solventes sobre a enantiosseletividade de biotransformações tem sido analisado em termos de partição das moléculas de água presente nas cavidades do sítio ativo da enzima, ou dos grupos funcionais do substrato.

Apesar da especificidade catalítica das enzimas, o mecanismo das suas reações não difere das catalisadas por agentes químicos. Na Figura 16, está representado o mecanismo geral de reações de transesterificação via enzimática (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.^{31,71}



1.8 Enzimas Imobilizadas

A imobilização de enzimas consiste no confinamento das mesmas em um determinado material. Este processo pode ocorrer de diferentes maneiras. No caso de lipases, numerosos métodos de imobilização são viáveis, cada um envolvendo diferentes graus de complexidade e eficiência. Os vários métodos usados podem ser subdivididos em duas categorias principais: método químico quando ligações covalentes são formadas com a lipase, e o método físico, quando interações fracas ou retenção mecânica é utilizada. No método químico, a lipase é fixada no suporte por ligação covalente com formação de ligação cruzada. No método físico a lipase pode ficar retida ou microencapsulada no interior de um gel insolúvel, fibras porosas ou materiais adsorventes. A recuperação de lipases imobilizadas depende da meia vida da enzima, que após certo tempo precisa de purificação antes de ser reutilizada.^{54,55,57,72} Alguns sistemas mais utilizados são mostrados na Figura 17.



As enzimas liofilizadas são catalisadores convenientes para muitas aplicações sintéticas. O uso das preparações enzimáticas cresceu consideravelmente em numerosos setores, mas o custo elevado dos processos de extração e purificação das macromoléculas e sua instabilidade em solução, representam um obstáculo à recuperação do biocatalisador após sua utilização. Estes problemas podem ser minimizados pela imobilização da enzima sobre um suporte sólido, o qual, normalmente aumenta a estabilidade da enzima e facilita seu emprego por longos períodos sem renovação do catalisador.^{73, 74,75,76,77}

Segundo Bonn e Pereira,² este assunto começou a ser estudado no início do século XX, ao se observar que o carvão ativo ao qual havia sido adicionado uma preparação biológica com atividade invertásica mantinha a capacidade de hidrolisar sacarose mesmo após ser lavado. Entretanto, o assunto só foi novamente retomado após a segunda guerra mundial. Em 1948, o bioquímico americano James Batcheller Summner (1877-1955), ganhador do Prêmio Nobel de Química em 1946 pelo isolamento e cristalização da enzima urease com a subsequente identificação da sua estrutura protéica, reportou a sua imobilização.

Em 1954, pesquisadores alemães demonstraram que polímeros sintéticos e resinas diazotadas de poliaminoestireno poderiam ser usados para imobilizar proteínas com atividade biológica, tais como a pepsina, diastase, ribonuclease e carboxipeptidase.²

Outros trabalhos pioneiros subsequentes, incluíram a imobilização de catalase, tripsina, papaína, amilase e ribonuclease em gel de poli(acrilamida). A

demonstração do método de ligações cruzadas, utilizando-se carboxipeptidase com glutaraldeído também foi realizada. A microencapsulação da anidrase carbônica foi descrita em 1964 e a preparação de lipossomas contendo glicoamilase em 1971, sendo estas duas últimas preparações usadas com fins terapêuticos.²

A partir de 1960, houve um aumento muito grande no número de publicações sobre imobilização de enzimas, tendo em vista as vantagens econômicas e operacionais que a técnica oferece para a tecnologia enzimática.^{2,41,55}

A importância de processos industriais com enzimas imobilizadas motivou a organização da primeira Conferência em Engenharia Enzimática em 1971. Nela, estabeleceu-se o uso da terminologia "enzima imobilizada" para os biocatalisadores ligados a suportes insolúveis ou confinados a espaços físicos definidos, em contraposição ao uso de enzimas "fixadas" ou "ligadas a matrizes". Em 1985, houve um outro avanço significativo com o desenvolvimento em escala industrial de um processo em reator de membrana para produção de aminoácidos a partir de cetoácidos com duas enzimas imobilizadas e envolvendo a regeneração do cofator. Os principais usos em escala industrial de enzimas imobilizadas incluem atualmente a produção de milhões de toneladas de xaropes de frutose em bio-reatores. Milhares de toneladas de enzima imobilizada são produzidas por quase uma dezena de empresas espalhadas pelo mundo.²

Os sistemas de enzimas imobilizadas também tem espaço definido em metodologias analíticas, particularmente na obtenção de biosensores. As aplicações mais recentes de biocatalisadores imobilizados incluem, a produção de substâncias de alto valor agregado por bioconversão regioespecífica ou estereoespecífica, o tratamento seletivo de poluentes específicos para resolver problemas ambientais, a análise contínua com alta sensibilidade e especificidade de compostos de interesse, a conversão de energia em sistemas biológicos e, finalmente, em medicina na obtenção de órgãos artificiais e na formulação de drogas à base de enzimas.^{2,3}

A escolha do suporte é dependente de diversas características que são importantes para aplicações em processos industriais. Entre esses fatores estão a resistência microbiológica, estabilidade térmica, durabilidade química e

funcional, caráter hidrofóbico e hidrofílico, facilidade de regeneração, capacidade de carga e baixo custo.^{55,78}

Alguns dos suportes insolúveis comumente utilizados para a imobilização de enzimas são vidros porosos e seus derivados, terras diatomáceas, carvão ativo, duolita, celulose e derivados, caolin, alumina, titania, sílica e derivados, aço inoxidável, polietileno e derivados, polipropileno e derivados, poliestireno, óxido de polifenilparafenileno, copolímeros acrílicos, poli(acrilamida), poliamida, enzacril[®], poliuretana, sepharose[®] e derivados, sephadex[®], agarose[®] e derivados, gelatina, alginato, Dowex[®], colágeno, polietileno glicol fixado em magnetita, fragmentos de micela fungal ou paredes de células bacterianas.^{54,55,73,76,78,79} Materiais sintéticos para suportes tem sido manufaturados ou obtidos em grande variedade de formas incluindo membranas, fibras, grânulos e pós. Outros suportes citados na literatura são o nylon,⁸⁰ casca de arroz ativada,⁸¹ carbonato de cálcio,⁸² etc.

Entre os vários suportes que estão descritos na literatura, para imobilizar enzimas, deve-se mencionar o gel de ágar. A gelificação ocorre através de ligações de hidrogênio entre as moléculas do ágar, formando uma espécie de rede tridimensional que aprisiona moléculas de água, além da enzima que está sendo imobilizada.

O ágar é uma mistura complexa de polissacarídeos derivados de certas algas vermelhas. Apresenta massa molecular média em torno de 100000 Da, e é basicamente um polissacarídeo com repetições da molécula de galactose. O principal componente gelificante do ágar é a agarose que é um polímero neutro da galactose (sem sulfato) onde há resíduos alternados da 3,6-anidro-L-galactose e 3,6-anidro-D-galactose Figura 18.^{74,83}

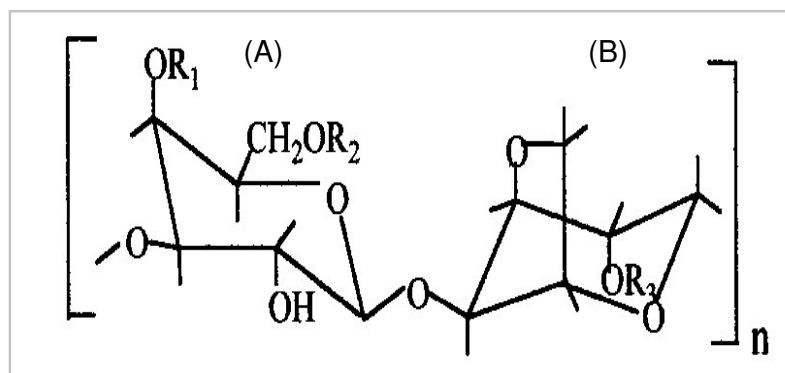


Figura 18. Estrutura da agarose, contendo o resíduo β -D-galactose ligados 1,3 (A) e 3,6 anidro α -L-galactose ligado 1,4 (B). IR₁ = H; R₂ = SO₂; R₃ = 80% H; 20% SO₂.

A agarose em função das suas propriedades, é muito usada na indústria de alimentos como agente gelificante e/ou espessante.⁸⁴ Os géis de agarose e de outros polissacarídeos tem sido freqüentemente usados para imobilização de enzimas em meio aquoso e em menor escala, em meio orgânico.^{74,85}

A adsorção física é um excelente procedimento de imobilização por ser de fácil preparação e baixo custo, apresenta estabilidade na especificidade do substrato e a regeneração é frequentemente possível após tratamento com detergente. A adsorção de uma enzima, por exemplo lipase, em suporte envolve duas etapas básicas. A primeira refere-se a massa de enzima adsorvida e a segunda, ao tempo de adsorção. Uma vez que o equilíbrio é alcançado, a quantidade de lipase adsorvida tem sido tradicionalmente correlacionada com a isoterma de Langmuir.⁷⁸

1.9 Justificativas

A obtenção de biodiesel pelo processo químico, apresenta algumas desvantagens. A primeira se refere ao catalisador que ao final do processo fica junto com o subproduto da reação (glicerina), dificultando a separação e purificação do mesmo e impossibilitando sua reutilização. Além disso, os ésteres e a glicerina necessitam de maiores operações na purificação, onerando ainda mais o custo final do biodiesel.

Outra desvantagem do processo químico está relacionada com o tipo de álcool utilizado, o qual devido ao equilíbrio da reação, deve ser anidro (de modo geral utiliza-se metanol). Nesse caso, a alcoólise enzimática com etanol hidratado apresenta as vantagens de menor preço e toxicidade. Como este produto é obtido através de biomassas, o processo de produção de biodiesel torna-se independente do petróleo.

A utilização de óleo de soja como substrato, é justificada em função da sua maior produção em relação a outros tipos de óleos. Isto faz com que este seja abundantemente usado na indústria de alimentos, gerando o óleo descartado de frituras. Este, além de ser um resíduo, merece atenção especial principalmente por que na literatura científica encontram-se poucos estudos sobre a reação de transesterificação enzimática com este tipo de óleo.

A utilização do óleo refinado, não é viável em função do ponto de vista econômico, mas como se trata de um substrato com relativo grau de pureza, foi necessária a sua utilização nos estudos de reação de transesterificação enzimática, para comparar com os resultados obtidos com os óleos degomado e de frituras. A transesterificação com o óleo de soja degomado por via enzimática a nível de bancada, tem importância, por se tratar de um substrato de valor competitivo para a obtenção de biodiesel em escala industrial. Por

outro lado, considerando a crise de energia elétrica atual no Brasil, o biodiesel procedente das matérias-primas aqui mencionadas, poderia ser utilizado imediatamente em geradores para a obtenção de energia elétrica, além de automotiva.

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como principal objetivo o estudo da transformação de óleos de soja refinado, degomado e oxidado termicamente (em laboratório e descartado de frituras) em combustível alternativo, biodiesel, através da reação de transesterificação enzimática com álcoois alifáticos e lipases, livres e imobilizadas.

1.10.2 Objetivos Específicos

- A. Estudar a imobilização das lipases (CRL, Lipolase e Lipozyme), através de técnicas de adsorção e aprisionamento em diferentes suportes, tais como carvão ativo de casca de coco, de pinus, bauxita ativada e gel de ágar;
- B. Avaliar inicialmente, a eficiência das lipases imobilizadas por adsorção nos carvões de coco e pinus e na bauxita, utilizando a reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol em hexano. Os melhores sistemas foram utilizados como biocatalisadores, nas reações de transesterificação dos óleos de soja;
- C. Caracterizar os óleos através de análises físicas e químicas (RMN ^1H , viscosidade, densidade, índice de iodo e acidez);
- D. Desenvolver metodologias de monitoramento e quantificação da conversão dos óleos de soja em ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos, através de RMN ^1H e por medidas de viscosidade;
- E. Avaliar, para cada reação, os seguintes parâmetros: quantidade de enzima, temperatura, tempo de reação para obter a máxima conversão

do óleo em ésteres, bem como a possibilidade de reutilização das lipases imobilizadas;

- F. Usar o óleo de soja rejeitado de frituras múltiplas (massas, carnes, peixes, vegetais etc), na obtenção de biodiesel por via enzimática e comparar estes resultados com os obtidos para os óleos refinado e degomado;
- G. Verificar a influência do grau de oxidação do óleo (efeito do tempo de aquecimento) na reação de transesterificação, por via enzimática;
- H. Determinar os rendimentos das reações de transesterificação dos óleos de soja refinado, degomado e oxidado com metanol e etanol 96 %, na presença de lipases livres e/ou imobilizadas, usando as metodologias citadas no item D.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Óleos

Neste trabalho foram utilizados três tipos de óleo de soja: a) óleo refinado, marca Soya adquirido no comércio local, o qual foi aquecido em laboratório durante 60 horas consecutivas e retirado diversas alíquotas; b) óleo degomado, cedido gentilmente pela empresa Bunge Alimentos, unidade de São Francisco do Sul e c) óleo usado em frituras múltiplas (massas, carnes, peixes, vegetais), pelo período de oito dias consecutivos, cedido pelo Restaurante Volantes de Florianópolis, Tabela 7.

Tabela 7. Características físicas e químicas dos óleos de soja

Tipo de Ó	Visc (rr	Ac (% ác.	Índic (
Óleo não aque	5	0,1	1
Óleo aquecido	5	0,1	1
Óleo aquecido	6	0,1	1
Óleo aquecido	7	0,1	1
Óleo aquecido	11	0,1	1
Óleo aquecido	21	0,1	1
Óleo aquecido	31	0,1	1
Óleo aquecido	41	0,1	1
Óleo Degor	5	1,1	1
Óleo de Frit	5	0,1	1

2.1.2 Enzimas

Foram utilizadas as seguintes lipases comerciais, a de *Candida rugosa* (CRL), Lipozyme RM IM imobilizada em resina aniônica e Lipolase 100 L, Tabela 8.

Tabela 8. Enzimas comerciais.

Lipase	Fornecedor	Atividade ^a	Fonte
CRL	Sigma	905 u/g	<i>Candida rugosa</i>
Lipolase 100 L	Novo Nordisk	100 KLU/g	<i>Thermomices lanuginosus</i>
Lipozyme RM IM	Novo Nordisk	5-6 BAUN/g	<i>Mucor miehei</i>

(a) A atividade catalítica, obtida pelos fornecedores das lipases, é definida para a CRL como a quantidade de enzima que libera um μmol de ácido graxo por minuto (u/g). Para a Lipolase a atividade é determinada sob condições padrões com tributirina a 30 °C e pH 7,0 e é expressa em KLU (Kilo Lipase Units). A atividade da Lipozyme é baseada em ensaios de hidrólise, é determinada medindo-se a quantidade de ácido decanóico incorporado nas posições 1,3 de triglicerídeos do ácido oléico do óleo de girassol e é expressa em BAUN/g (Batch Acidolysis Units Novo).

2.1.3 Suportes

Os suportes utilizados para imobilização por adsorção e aprisionamento das lipases, foram: bauxita ativada[♦] com granulometria 20-40 mesh, procedente da Mineração Curimbaba; carvão ativo de casca de coco e de pinus com granulometria de 20-40 mesh, fornecido pela Fábrica Brasileira de Catalisadores (FBC), localizada em Contenda – Pr; e ágar-ISO FAR (pH 6,8-7,5; ponto de gelificação 33-35 °C), Figura 19.

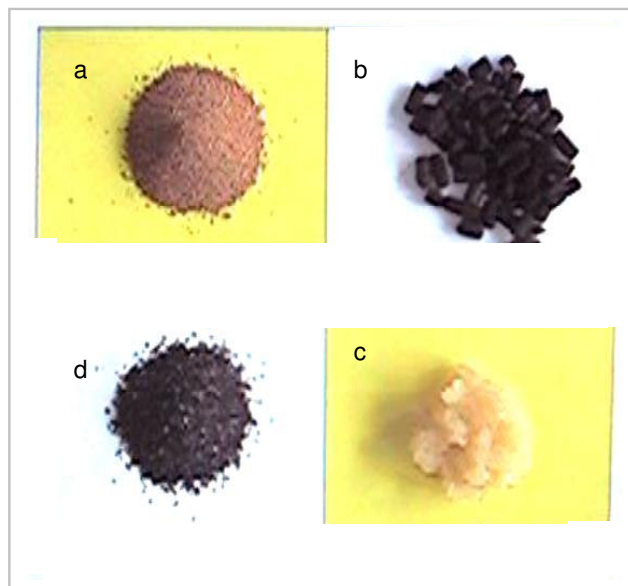


Figura 19. Suportes usados para a imobilização das lipases (a) bauxita ativada, (b) carvão ativo de pinus, (c) gel de ágar e (d) carvão ativo de casca de coco.

[♦] Constituída por 78% de Al_2O_3 , 8% de SiO_2 , 10% de Fe_2O_3 e 1% de TiO_2 .

2.1.4 Reagentes

Os álcoois, metanol e etanol 96 %, bem como, n-hexano, acetato de etila, tetracloreto de carbono, clorofórmio deuterado, e os ácidos graxos palmítico, esteárico e linoléico todos com grau PA, foram adquiridos do Grupo Química, Merck e Vetec.

2.1.5 Equipamentos

A imobilização das lipases por adsorção e as reações de transesterificação foram realizadas em banho-maria termostatizado tipo Dubnoff (Marconi TE 053). As concentrações das soluções das lipases, antes e após imobilização, foram determinadas por método espectrofotométrico no comprimento de onda de absorção máxima de cada uma delas em espectrofotômetro UV-Vis da HP modelo FT-8452 A. As áreas superficiais dos adsorventes foram determinadas por adsorção de nitrogênio em sistema BET-Micromeritics modelo Flow Sorb II 2300, no Instituto de Química da UNICAMP. As análises termogravimétricas da CRL adsorvida foram realizadas em sistema TGA-50 da Shimadzu e as medidas de viscosidade dos óleos puros e dos ésteres etílicos foram determinadas em viscosímetro Brookfield modelo LVDVIIIICP [CP 42 e 52]*, no Laboratório de Materiais Poliméricos (POLIMAT) da UFSC. As análises de RMN H^1 foram realizadas na Central de Análise da UFSC, em espectrômetro de 200 MHz (Bruker-200). Outros equipamentos tais como, balanças analíticas, agitadores magnéticos, rotaevaporador, centrífuga (Sigma 2-15), vidrarias e potenciômetro [Micronal B 374, aferido com solução tampão (acetato e fosfato de sódio) pH 4,00 e 6,86], foram utilizados no laboratório de Biocatálise da UFSC.

* Pequenos discos que giram em contato com o líquido e permite medir a tensão e velocidade de cisalhamento.

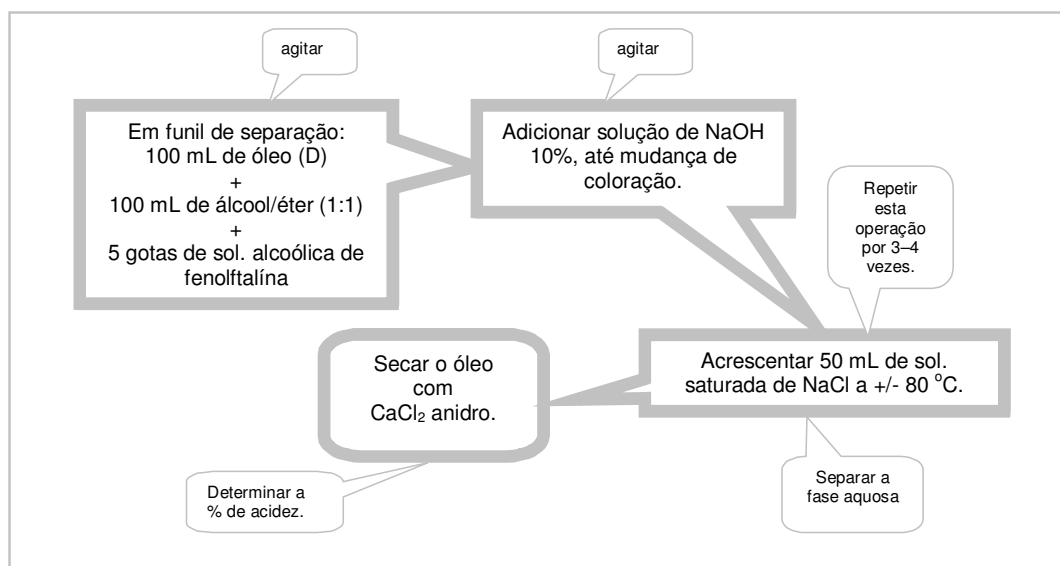
2.2 Métodos

2.2.1 Oxidação do Óleo de Soja Refinado

Na oxidação térmica do óleo de soja refinado, foram utilizados 2 litros de óleo marca Soya aquecido em recipiente de alumínio em aquecedor elétrico nas temperaturas de 180-190 °C, em presença de ar pelo tempo de 60 horas consecutivas. Neste período foram retiradas amostras de 50 mL, com os seguintes tempos de aquecimento 2; 6; 10; 22; 34; 45 e 60 horas.

2.2.2 Neutralização do Óleo Soja Degomado

A neutralização do óleo degomado com solução de NaOH à 10 %, foi realizada para verificar a influência da acidez do óleo, no resultado da transesterificação enzimática . Neste processo, o uso da solução álcool/éter (1:1) foi necessária para a diluição do óleo, e a fenolftaleína permitiu o monitoramento da neutralização. A solução saturada de NaCl à quente, dissolveu a emulsão formada durante a reação, Esquema 1.



2.2.3 Curva de Calibração e Adensação

Esquema 1. Neutralização do óleo de soja degomado (D), com solução de NaOH 10 %.

A adsorção das lipase de *Candida rugosa* (CRL) e Lipolase em carvões de coco, pinus e em bauxita, foram realizadas segundo Jesus⁸⁶ e Kang.⁸⁷

Inicialmente foram preparadas soluções das lipases em diversas concentrações (0,1 à 7 g/L para CRL e 0,5 à 45 mL/L para a Lipolase) em tampão fosfato de sódio pH 7,2. Os valores de absorvância destas soluções foram determinados em 258 e 278 nm (absorção máxima da CRL e Lipolase, respectivamente). A partir destes valores de absorvância em função das concentrações das referidas lipases, obteve-se as curvas de calibração obedecendo a Lei de Lambert-Beer, Figura 20.

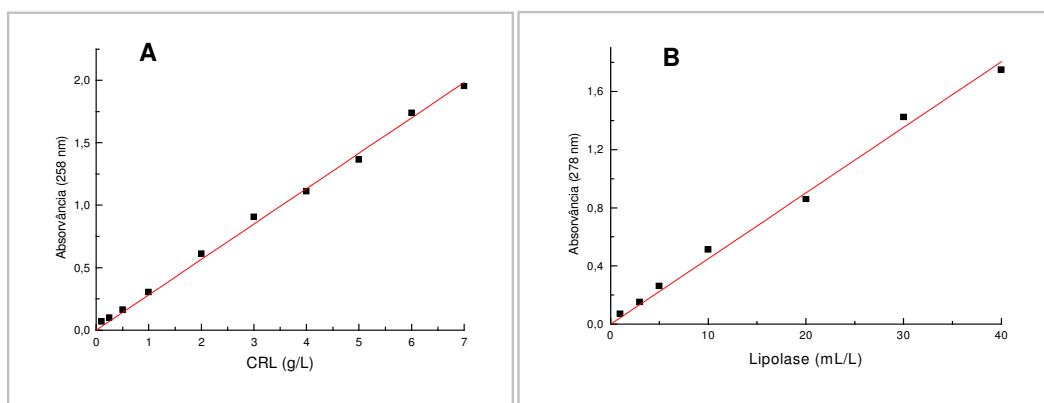


Figura 20. Curvas de calibração. (A) CRL, R = 0,9956. (B) Lipolase, R = 0,9930.

Os valores dos coeficientes linear e angular, foram utilizados para determinar as concentrações das soluções antes e depois da adsorção. A partir dos resultados obtidos concluiu-se que as concentrações adequadas das soluções para os estudos de imobilização foram de 5 g/L para CRL e 40 mL/L para Lipolase, pois até estes valores a lei de Lambert Beer é obedecida. Ressalta-se no entanto, que a Lipolase foi somente imobilizada em carvão de coco. A adsorção das lipases nos suportes consistiu basicamente das seguintes etapas:

- 1) Preparar uma solução das enzimas (CRL 5 g/L e Lipolase 40 mL/L), em tampão fosfato de sódio pH 7,2;
- 2) Adicionar o suporte (carvão ou bauxita), cujas proporções na solução variaram de 5 à 150 g/L;

- 3) Deixar a solução de lipase em contato com o adsorvente, sob agitação constante na temperatura pré-estabelecida (35 °C), pelo tempo pré-determinado de 1 hora;
- 4) Determinar a quantidade de lipase adsorvida, medindo-se a absorvância das soluções inicial (solução sem suporte) e final (solução após a adsorção), em 258 ou 278 nm para a CRL e Lipolase, respectivamente, Equação 1.

$$C = \frac{\text{abs} - A}{B} \quad (1)$$

C – concentração (g/L ou mL/L);
 abs - absorvância (258 ou 278 nm);
 A e B – coeficientes linear e angular da reta.

- 5) Determinar a eficiência dos adsorventes (%), utilizando a Equação 2.

$$E_f = \frac{(C_o - C_f) \times 100}{C_o} \quad (2)$$

E_f – eficiência (% da lipase adsorvida)
 C_o – concentração inicial da solução de lipase sem suporte (g/L ou mL/L)
 C_f – concentração final, depois da adsorção (g/L ou mL/L).

- 6) Determinar a quantidade de enzima retida no suporte, pela Equação 3.

$$L_a = \frac{(C_o - C_f) \times V}{P} \quad (3)$$

L_a – lipase adsorvida
 V – volume da solução usado nos experimentos (mL)
 P – peso do adsorvente usado (g).

A Figura 21, mostra esquematicamente a preparação e quantificação dos biocatalisadores por adsorção nos diferentes suportes.

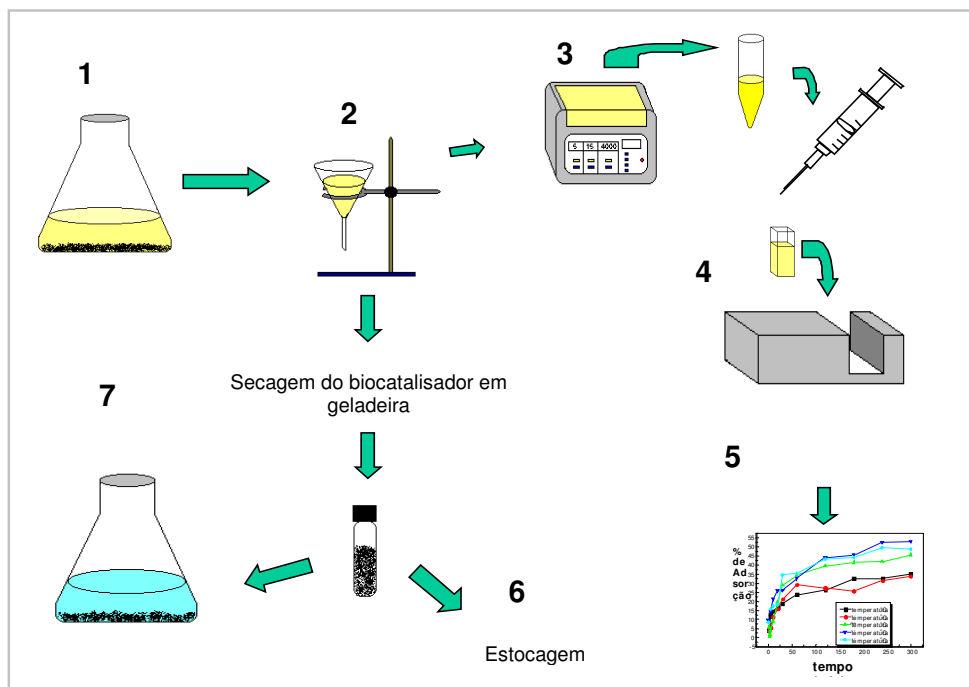


Figura 21. Metodologia utilizada para adsorção das lipases.

1. Massa de suporte + lipase em tampão fosfato de sódio pH 7.2, agitação em temperatura e tempo controlado;
2. Filtração;
3. Centrifugação (4000 rpm por 15 min.);
4. Leituras das absorvância das soluções (258 ou 278 nm);
5. Quantificação da adsorção, segundo Equações 2 e 3 ;
6. Estocagem em geladeira
7. Utilização do biocatalisador.

2.2.4 Saturação do Carvão de Coco

O estudo de saturação foi realizado com o carvão de coco e a CRL, fazendo-se sucessivas adsorções sobre a mesma massa de suporte e calculando-se a massa de lipase acumulada através da Equação 3.

2.2.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

A determinação da quantidade de CRL adsorvida em bauxita e nos carvões de coco e de pinus, foi também realizada por análise termogravimétrica com razão de aquecimento de 10 °C/min e intervalo de temperatura de 25 à 900 °C, em atmosfera de nitrogênio.

2.2.6 Dessorção da CRL Imobilizada em Carvão de Coco

Para verificar a ocorrência de dessorção da CRL immobilizada no carvão de coco, colocou-se 1 g do sistema (CRL/suporte) em erlenmeyer contendo 25 mL de solvente puro (água, n-hexano ou etanol/hexano), e a suspensão foi agitada durante uma hora à 35 °C. Após filtração e centrifugação, a absorvância do líquido residual foi lida em 258 nm e comparada com a do solvente, sem o suporte. Este procedimento foi repetido com a mesma massa do suporte por 5 vezes consecutivas, com cada um dos solventes puros.

2.2.7 Imobilização da CRL e Lipolase em Gel de Ágar

A imobilização das lipases CRL e Lipolase em gel de ágar foram realizadas segundo Queiroz.⁷⁴ O procedimento consistiu em colocar 0,4 – 0,6 g de ágar em um tubo de ensaio, adicionar 9 mL de água destilada (quente), agitar, aquecer em banho-maria até que o gel torne-se translúcido, esfriar até 35 °C para a CRL e 40 °C para a Lipolase, adicionar a quantidade de lipase desejada (27 – 100 mg para CRL e 0,1- 0,3 mL para Lipolase), e agitar manualmente e intensamente até resfriamento à temperatura ambiente. Obteve-se um gel consistente, e com auxílio de uma espátula, este foi passado por uma peneira fina (+/-12 mesh), obtendo-se pedaços pequenos de gel de ágar com enzima imobilizada com granulometria uniforme, Figura 22.

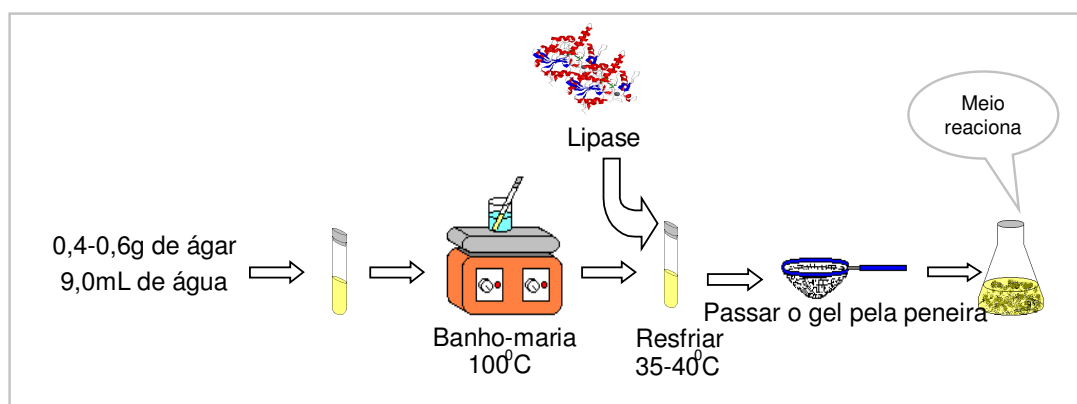


Figura 22. Imobilização das lipases em gel de ágar.

2.2.8 Caracterização dos Óleos e Determinação do Conteúdo de Ésteres Etilícos Através das Medidas de Viscosidade

As medidas de viscosidade tiveram dois objetivos. Inicialmente foram utilizadas para caracterizar as amostras de óleo a serem transesterificadas. Nestas medidas, foram usados volumes de óleo de 0,5 e 1 mL em discos CP 42 e 52, com temperatura controlada de 25 °C (+/- 0,5 °C).

Posteriormente, utilizou-se das medidas de viscosidade para quantificar a conversão do óleo de soja em ésteres etílicos. Foram preparadas 13 amostras de composições conhecidas de óleo e ésteres etílicos (0 – 100 %), expressos em porcentagem (v/v). Estas misturas apresentaram valores de viscosidade variando de 52,64 à 6,12 mPa.s, Tabela 9.

Tabela 9. Valores de viscosidade das misturas de óleo e ésteres etílicos em diferentes proporções.

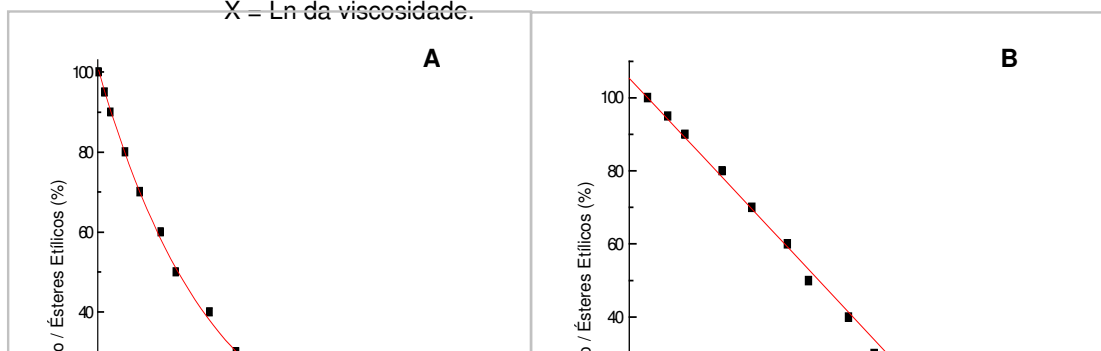
Ésteres Etílicos (%)	Óleo de Soja (%)	Viscosidade (mPa.s)
0	100	52,639
5	95	42,355
10	90	41,306
20	80	31,011
30	70	24,077
40	60	20,602
50	50	16,184
60	40	14,240
70	30	11,488
80	20	9,585
90	10	7,669
95	5	6,906
100	0	6,120

Os valores das viscosidades das misturas óleo/ésteres foram plotados no eixo (X), versus a porcentagem de ésteres nas misturas preestabelecidas (eixo Y), e obteve-se uma curva de calibração. A linearização desta curva, permitiu através da equação da reta, quantificar os ésteres etílicos obtidos tanto por via química como enzimática, Equação 4 e Figura 23.

$$Y = A + B.X$$

(4)

Y = Conteúdo de ésteres etílicos(%)
 A = 187,51225 (coef. linear)
 B = -48,32621 (coef. angular)
 X = Ln da viscosidade.



2.2.9 Outras Análises (Índice de Iodo, Acidez e CCD)

Os índices de iodo dos óleos de soja refinado, aquecido (2 à 60 h), degomado (D) e descartado de frituras (F), foram determinados na Indústria Química Estearina na cidade de Curitiba, pelo método Wijs (AOCS – official method CD-1-25). A acidez (% oléico), foi determinada por titulação com NaOH.⁸⁸

As reações de transesterificação foram acompanhadas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), usando placas de vidro (3 X 10 cm), impregnadas com sílica gel (28-200 mesh). Como fase móvel foi utilizado n-hexano / acetato de etila (9,8:0,2) e a revelação foi realizada com iodo.

2.2.10 Reação Padrão (Esterificação)

Neste estudo utilizou-se a CRL imobilizada em carvão de casca de coco e verificou-se a eficiência deste suporte na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol, em meio orgânico. Os resultados foram comparados com os obtidos para a enzima livre através dos seguintes parâmetros: tempo de reação para uma determinada massa de enzima atingir o rendimento máximo; massa de enzima suficiente para atingir o rendimento máximo no menor tempo possível; influência da quantidade de enzima adsorvida pelo carvão e

reutilização do suporte. Na reação de esterificação utilizou-se 0,005 mols do ácido láurico e n-pentanol em hexano (20 mL), com agitação constante à 35 °C. Os rendimentos das reações foram determinados por RMN ^1H (200 MHz), relacionando-se as áreas dos hidrogênios metínicos do álcool (3,7 ppm), com a área dos hidrogênios metilênicos α -carboxílico do éster (4,0-4,1 ppm), Figura 24.

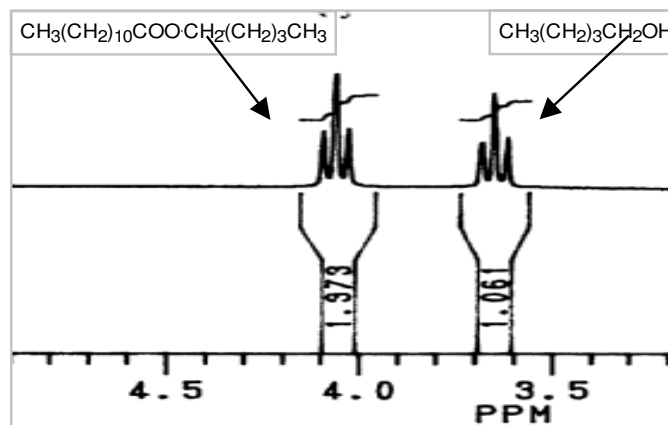


Figura 24. Espectro de RMN ^1H do laurato de n-pentila com conversão de 56 %, mostrando os sinais dos hidrogênios metínicos do álcool e metilênico α -carboxílico do éster (CDCl_3 , 200 MHz).

A obtenção dos ésteres palmitato, estearato e linoleato de etila foi realizada para comparar o deslocamento químico dos sinais referentes aos hidrogênios etóxi com os referidos deslocamentos dos ésteres obtidos nas reações de transesterificação do óleo de soja, realizadas posteriormente. Os compostos foram sintetizados a partir dos respectivos ácidos graxos por vias enzimática e química.

2.2.11.1 Síntese Enzimática de Palmitato e Estearato de Etila

Estes ésteres foram preparados utilizando-se 1g dos ácidos palmítico (3,9 mmol), ou esteárico (3,5 mmol), 2 mL de etanol (3,5 mmol) e 20 mL de n-hexano, com a CRL imobilizada em gel de ágar (60mg/0,6g de ágar). A mistura

reacional foi agitada à 35 °C por 24 horas e após purificação dos ésteres, obteve-se os rendimentos de 42 e 51 %, para o palmitato e estearato de etila respectivamente.

2.2.11.2 Síntese Química do Linoleato de Etila

Este éster foi sintetizado a partir de 1 mL de ácido linoléico (3,6 mmol) e 3 mL de etanol anidro (5,2 mmol) e 6 gotas de ácido sulfúrico. A mistura foi refluxada durante 4 horas. O linoleato de etila foi obtido com rendimento de 63 %, após purificação.

A purificação tanto do palmitato, estearato e do linoleato de etila, foi realizada fazendo-se a extração dos ésteres do meio reacional, com éter etílico (10 mL por 3 vezes consecutivas para cada éster) e neutralizado com solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase etérea, contendo os ésteres, foi seca com cloreto de cálcio anidro e o solvente evaporado em rotaevaporador. As reações foram monitoradas por CCD (n-hexano/acetato de etila 1:1, Rfs 0,65 – 0,69), e os produtos caracterizados por RMN ¹H.

2.2.12 Preparação do Padrão de Biodiesel por via Química

O procedimento geral da reação de transesterificação para obtenção de biodiesel a partir do óleo de soja refinado com metanol e etanol, para serem usados como ésteres padrões, foi realizado segundo Freedman,²⁴ Brasil,²⁵ e Zagonei⁸⁹. Na preparação dos ésteres metílicos, foram utilizados 100 mL de óleo, 25 mL de metanol e 2 g de NaOH previamente dissolvido no álcool. A mistura foi refluxada à 65 °C e agitada por uma hora em agitador magnético. A seguir, foi transferida para funil de separação e a glicerina decantada durante 3 horas.

Na preparação dos ésteres etílicos foram utilizados 100 mL de óleo de soja refinado, 50 mL de álcool anidro e 1g de NaOH, previamente dissolvido.* A mistura foi refluxada durante 8 horas à 78 °C e a glicerina decantada durante 24 horas. A reação de transesterificação foi monitorada por cromatografia de

* O NaOH deve ficar em contato com o etanol previamente por 24 horas.²⁵

camada delgada (n-hexano/acetato de etila 9,8:0,2), e os ésteres caracterizados e quantificados por RMN ^1H .

Na purificação dos ésteres tanto metílicos como etílicos, após a separação da glicerina por decantação, estes foram neutralizados com 3 gotas de ácido acético glacial usando papel de tornassol como indicador. Em seguida, foram lavados com solução saturada de NaCl (2x50 mL), secos com sulfato de magnésio anidro e filtrados em um filtro contendo bauxita granulada ativada (20-40 mesh), alternada com amido pulverizado (Maizena).

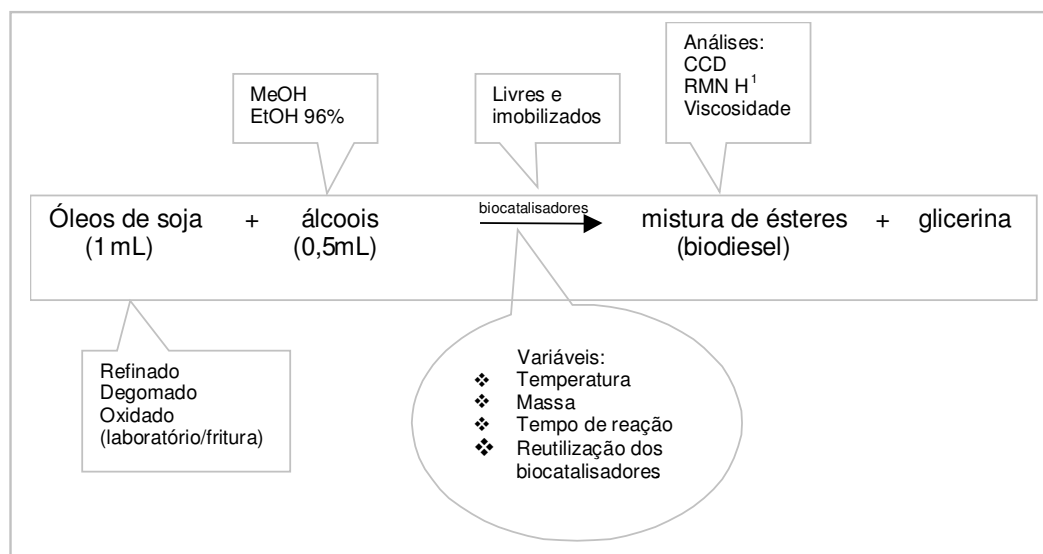
Segundo Yates e col.⁹⁰, o uso de filtros contendo alumina ativada na purificação de óleos vegetais, removem ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos. Portanto, neste caso como a bauxita é constituída por 78 % de óxido de alumínio, utilizou-se este adsorvente em granulometria de 20-40 mesh, em camadas alternadas com amido para remoção de mono e di-glicerídeos possivelmente presentes no biodiesel, Figura 25.



Figura 25. Filtro contendo bauxita e amido pulverizado usado para purificação dos ésteres metílicos e etílicos obtidos a partir do óleo soja refinado.

Na obtenção dos ésteres metílicos e etílicos utilizando-se as lipases livres e/ou imobilizadas, seguiu-se metodologia baseada em estudos realizados por Linko e col.⁶⁶; Wu e col.⁶⁹; Alcantara e col.⁹¹; Selmi e col.⁹²; Shimada e col.⁹³; Watanabe e col.⁹⁴; Canakci e col.⁹⁵; Kim e col.⁹⁶; Crabbe e col.⁹⁷; Mittelbach e

col.^{45,98} e Oliveira e col.⁹⁹. No procedimento geral, utilizou-se em cada experimento 1 mL de óleo; 0,5 mL de álcool (metanol ou etanol) e 15 mL de n-hexano. A quantidade de lipase, temperatura e tempo de reação para obter a máxima porcentagem de conversão foram diversificados. A mistura reacional foi agitada em banho-maria do tipo Dubnoff e o monitoramento das reações foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) e os ésteres foram caracterizados e quantificados por RMN ¹H. Na purificação dos ésteres para determinação das medidas de viscosidade, os mesmos foram lavados com solução saturada de NaCl por duas vezes e desidratados com CaCl₂ anidro. As condições gerais da reação de transesterificação enzimática, bem como suas variáveis, são apresentadas no Esquema 2.



Esquema 2. Condições experimentais usadas na alcoólise do óleo de soja.

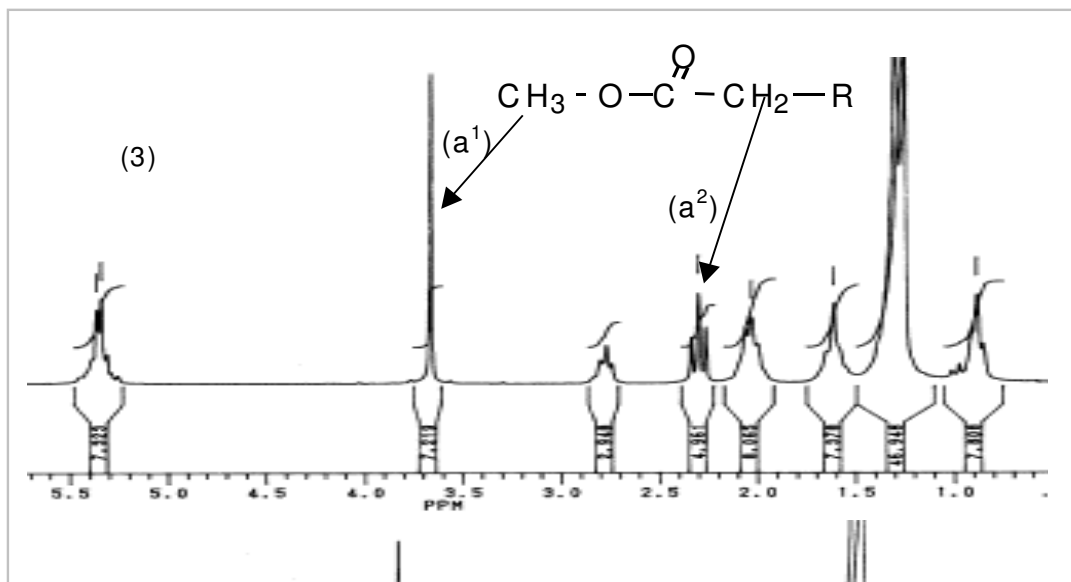
2.2.13.1 Determinação do Conteúdo de Ésteres Metílicos por RMN ¹H

A porcentagem de conversão do óleo em ésteres metílicos foi determinada por RMN ¹H, segundo Gelbard e col.¹⁰⁰ Para a quantificação dos ésteres, o método consistiu em relacionar diretamente as áreas (a^1 e a^2), dos sinais selecionados em 2,3 e 3,7 ppm (hidrogênios metilênicos α -carboxílico no óleo e metóxi nos ésteres, respectivamente), conforme a Equação 5 e Figura 26.

$$Y\% = 100. (2a^1/3a^2)$$

(5)

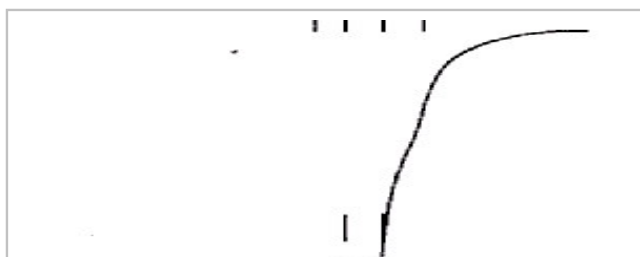
Onde: Y = porcentagem de conversão em ésteres metílicos,
 a^1 = área dos prótons metilênicos α -carboxílico no óleo (2,3 ppm),
 a^2 = área dos prótons metóxi dos ésteres (3,7 ppm).



2.2.13.2 Determinação do Conteúdo de Ésteres Etílicos por RMN ^1H

2.2.13.2 Determinação do Conteúdo de Ésteres Etílicos por RMN ^1H

Na quantificação dos éteres etílicos derivados de ácidos /graxos do óleo de soja por RMN ^1H , usando espectrômetro de baixa potência (200 MHz), ocorreu sobreposição dos sinais de hidrogênios etóxi dos ésteres com os metilênicos do glicerol no óleo (4,05-4,40 ppm). Figura 27.



Para quantificar os ésteres etílicos por análise de RMN ^1H , foi necessário fazer uma curva de calibração, utilizando misturas preparadas de óleo e ésteres etílicos em proporções de 0 – 100 %. Os ésteres, foram sintetizados a partir de óleo de soja refinado, com etanol anidro e hidróxido de sódio como catalisador. Em seguida foram purificados, constituída as misturas (óleo e ésteres), e realizada as análises de RMN ^1H . Os cálculos das relações das áreas dos sinais sobrepostos de cada mistura são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Relação das áreas dos sinais de RMN ^1H sobrepostos em 4,05-4,40 ppm das misturas ésteres etílicos e óleo de soja refinado.

Óleo de Soja (%)	Ésteres Etílicos (%)	Relação de Áreas (A_1/A_2)
0	100	0
5	95	0,0504
10	90	0,0924
20	80	0,1052
30	70	0,1500
40	60	0,2035
50	50	0,2838
60	40	0,3385
70	30	0,4835
80	20	0,5614
90	10	0,7657
95	5	0,8643
100	0	1

As relações das áreas, foram obtidas em cada mistura para viabilizar a quantificação dos ésteres etílicos por esta técnica. Foi determinada a relação das áreas dos hidrogênios sobrepostos, dividindo-se a área dos 4 hidrogênios metilênicos do glicerol (A_1), pela dos hidrogênios do carbono etóxi dos ésteres etílicos (A_2), Figura 27. No entanto, os valores 0 e 1, foram atribuídos para o óleo e os ésteres puros, respectivamente. Nos ésteres puros, A_1 é igual a zero, e no óleo puro, as áreas de A_1 e A_2 são equivalentes.

A Figura 28(a-f), mostra a região do espectro de RMN ^1H de algumas destas misturas (ésteres etílicos e óleo), onde evidencia-se a sobreposição dos sinais. Observa-se que os duplos dubletes referentes aos sinais do óleo puro, Figura 28(a), desaparecem nos ésteres puros, e no lugar destes reaparece um quarteto claramente definido, referente aos hidrogênios do carbono etóxi, Figura 28(f).

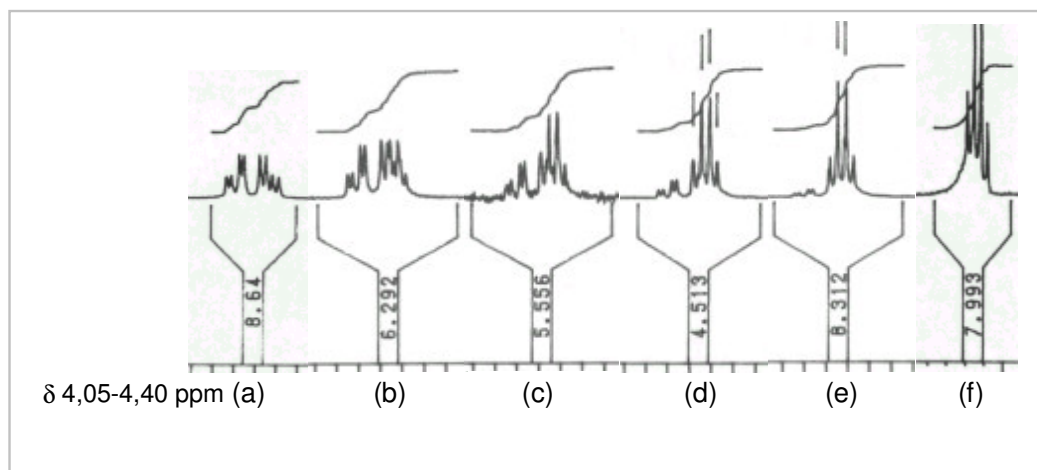


Figure 28. Região do espectro de RMN ^1H em 4,05-4,40 ppm, mostrando a sobreposição dos sinais ésteres etílicos e óleo em diferentes proporções. (a) Óleo de soja puro; (b,c,d,e) misturas de óleo/ésteres: 80/20; 60/40; 40/60; 20/80 e (f), ésteres etílicos puros. [200 MHz, CDCl_3].

Os valores das relações das áreas (A_1/A_2), foram plotados no eixo X, versus a concentração de ésteres etílicos nas misturas preestabelecidas, eixo Y. Desta maneira, obteve-se a curva de calibração mostrada na Figura 29.

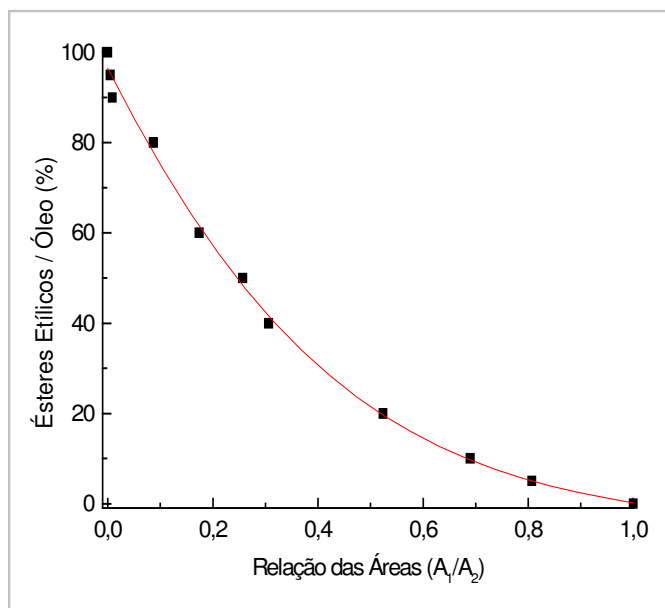


Figura 29. Curva de calibração de RMN ^1H usada para determinação da conversão de soja em ésteres etílicos. (A_1 e A_2 – áreas dos sinais etóxi e metile sobrepostos em 4,05-4,40 ppm; 200 MHz, CDCl_3).

A curva de calibração pode ser utilizada para quantificação dos ésteres etílicos obtidos na reação de transesterificação via enzimática ou química do óleo de soja. A partir das informações obtidas nos espectros de RMN ^1H , as relações das áreas (A_1/A_2) podem ser determinadas e com auxílio da curva, obtém-se a porcentagem de conversão.

Para simplificar a utilização desta curva, determinou-se a equação do decaimento exponencial de 1a. ordem e, através desta, calculou-se a porcentagem dos ésteres etílicos de maneira mais prática, Equação 6.

$$Y = A_1 \cdot E^{-X/t_1}$$

(6)

Onde:

Y - Ésteres etílicos (%);

A_1 e t_1 - constantes que dependem dos dados desta curva (107,36472 e 0,35203);

x - áreas dos prótons do glicerol e etóxi dos ésteres (A_1/A_2), usadas nos cálculos.

Outra maneira de calcular a porcentagem dos ésteres etílicos a partir da curva de calibração, é através da sua linearização, utilizando a equação da reta ($Y = A + BX$), onde A e B são os coeficientes linear e angular, e X é a relação de áreas dos sinais sobrepostos, Figura 30.

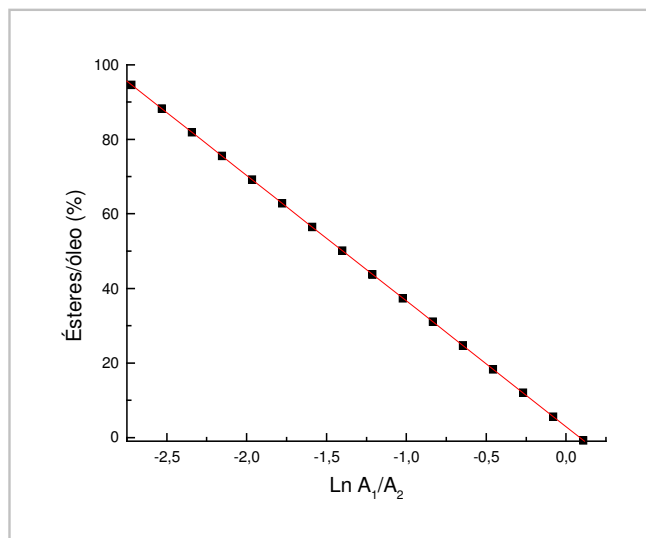


Figura 30. Linearização da curva de calibração de RMN ¹H, mostrada na Figura 29. [R = 0,9997; A = 11,33974; B = -28,07267].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho são apresentados em três etapas conforme o Esquema 3

1. Preparação e caracterização das amostras de óleo de soja (oxidação térmica e análises físicas e químicas).	2. Preparação e caracterização dos biocatalisadores (imobilização das lipases por adsorção e em gel de ágar, análises de TGA e reações de esterificação).
3. Transesterificação enzimática dos óleos de soja; acompanhamento das reações por CCD e RMN ¹ H; medidas de viscosidade; estudo das reações com as lipases: CRL, Lipolase e Lipozyme.	

Esquema 3. Etapas de apresentação dos resultados.

3.1 Oxidação Térmica e Caracterização dos Óleos

A oxidação térmica do óleo refinado, foi necessária para verificar a influência do óleo degradado na reação de transesterificação enzimática. Este estudo foi de grande importância para comparar as características do óleo oxidado em laboratório com as do óleo usado em frituras.

O óleo não aquecido (0), apresentou valor de acidez, densidade e índice de iodo concordantes com a legislação vigente para o óleo de soja refinado destinado ao consumo humano (Índice de iodo 120 -140; densidade 0,914 – 0,922 g/cm³ e acidez máxima de 0,1 % em ácido oléico).¹⁰¹ A medida que o óleo foi sendo aquecido, estes parâmetros foram modificados. Observou-se que quanto maior o tempo de aquecimento, mais intenso foi o escurecimento. A acidez, viscosidade e densidade foram mais altas e ao contrário, o índice de iodo diminuiu. Este comportamento também está de acordo com trabalhos citados na literatura.^{1, 102}

O escurecimento do óleo aquecido, se deve a formação de compostos polares,¹⁷ e o aumento da acidez está relacionado com a liberação de ácidos graxos livres e outros de cadeias curtas decorrentes da degradação.¹⁸ Os aumentos da viscosidade e densidade estão relacionados com a polimerização do óleo,¹⁶ e a diminuição do índice de iodo reflete a quebra de insaturações das cadeias dos ácidos graxos.¹⁰³ Estas modificações evidenciaram que depois de dez horas de aquecimento, o óleo mudou drasticamente suas características físicas e químicas, Figura 31.



Figura 31. Fotografia mostrando a aparências dos óleos de soja não aquecido (0), do óleo aquecido por 2, 6, 10, 22, 34, 45 e 60 horas e dos óleos, degomado (D) e usado (F)

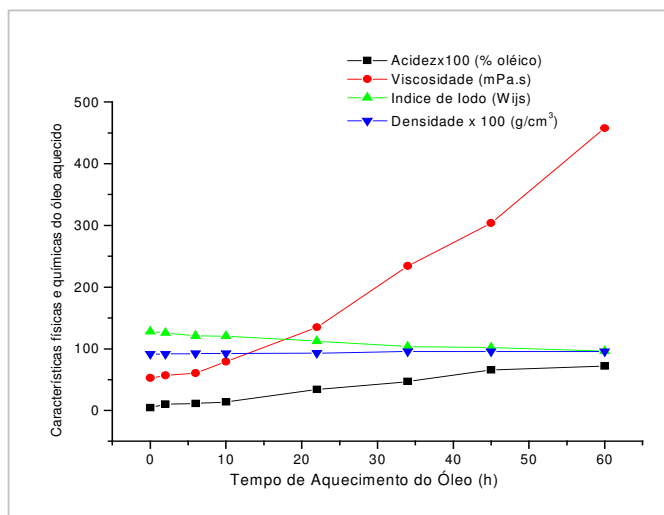


Figura 32. Variações das características físicas e químicas do óleo de soja aquecido por 2, 6, 10, 22, 34, 45 e 60 horas.

Comparando-se as características físicas e químicas dos óleos de soja refinado, aquecido (0 - 60 horas), degomado (D) e usado em frituras (F), verificou-se que o óleo degomado apresentou índice de iodo semelhante à do refinado (0) e a viscosidade um pouco superior, Figura 33. No entanto, o valor de acidez estava muito alto e isto era esperado considerando que a degomagem por ser a etapa inicial do refino, é normalmente realizada com o ácido fosfórico concentrado.¹⁰⁴ Com relação a aparência o óleo degomado estava mais escuro, devido a presença de componentes minoritários (esteróis, vitaminas etc Figura 4, item 1.3).⁶

O óleo descartado de frituras, apresentou aparência semelhante a do óleo aquecido por 60 horas mostrado na Figura 32. O índice de iodo e a acidez demonstraram que o óleo já estava inadequado para o processamento de alimentos, porém a viscosidade se apresentava relativamente baixa, e não condizente com o tempo de uso (\pm 50 horas segundo informações do fornecedor).

A baixa viscosidade apresentada pelo óleo de frituras provavelmente se deve ao tipo de fritadeira utilizada. Alguns tipos utilizam um volume de água e sal sob o óleo, que através de decantação recebe partículas de alimentos que se desprendem durante a fritura, juntamente com produtos polimerizados que se aglomeram e decantam quando o óleo esfria. Como em nosso país ainda não existe legislação que estabeleça a troca de óleo usado em processos de frituras em lanchonetes, restaurantes e indústrias de salgadinhos, alguns proprietários destes estabelecimentos reutilizam-o por várias semanas e em alguns casos por até três meses. O óleo neste tipo de fritadeira, em contato direto com a solução aquosa, deve favorecer a hidrólise dos triacilgliceróis e aumentar mais rapidamente a acidez. Outro fato que pode ter mantido a viscosidade baixa foi a reposição de óleo novo sobre o óleo em uso, que normalmente é realizada a medida que o volume da fritadeira diminui em função da operação de frituras. Este tipo de equipamento, normalmente funciona através de serpentina elétrica mergulhada no óleo. Segundo seus fabricantes, o depósito de água com sal sob o óleo, facilita a operação de frituras. A salmoura deve ser trocada uma vez por semana e ao óleo reutilizado é adicionado óleo novo, sempre que for necessário, Figura 33.

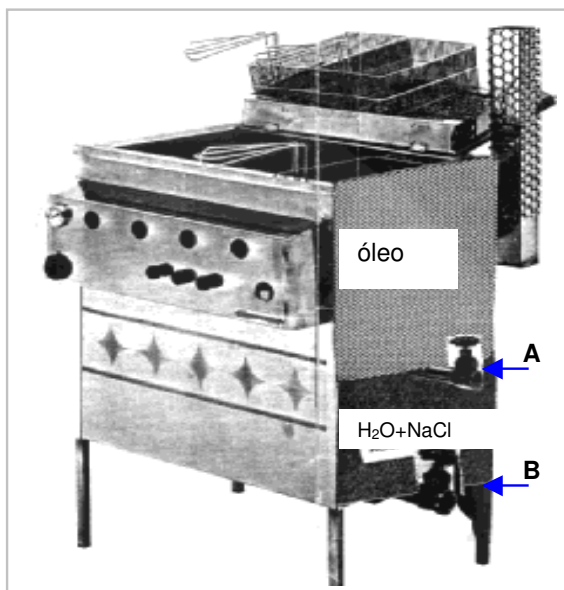


Figura 33. Fritadeira usada em restaurantes, mostrando o depósito de óleo em contato com a solução de NaCl à 10 %. As torneiras A e B, são respectivamente para drenagens do óleo e da salmoura.

A Figura 34, mostra a variação da tensão em função da velocidade de cisalhamento para os óleos de soja não aquecido (0) e aquecidos de 2 à 60 horas. Os óleos, apesar das alterações térmicas, não apresentaram mudanças nas características de líquido Newtoniano, isto é, a viscosidade independe da tensão de cisalhamento. O gráfico da tensão versus o gradiente da velocidade, é uma linha reta, onde todas estas linhas convergem para o ponto zero. Observa-se que o aumento da tensão de cisalhamento é diretamente proporcional ao aumento da viscosidade. A amostra de óleo não aquecida (0), apresentou a menor tensão, e as demais apresentaram aumentos de tensão gradativos em função do tempo de aquecimento do óleo. Ou seja, quanto maior a viscosidade do óleo maior foi a tensão e menor a velocidade de cisalhamento.

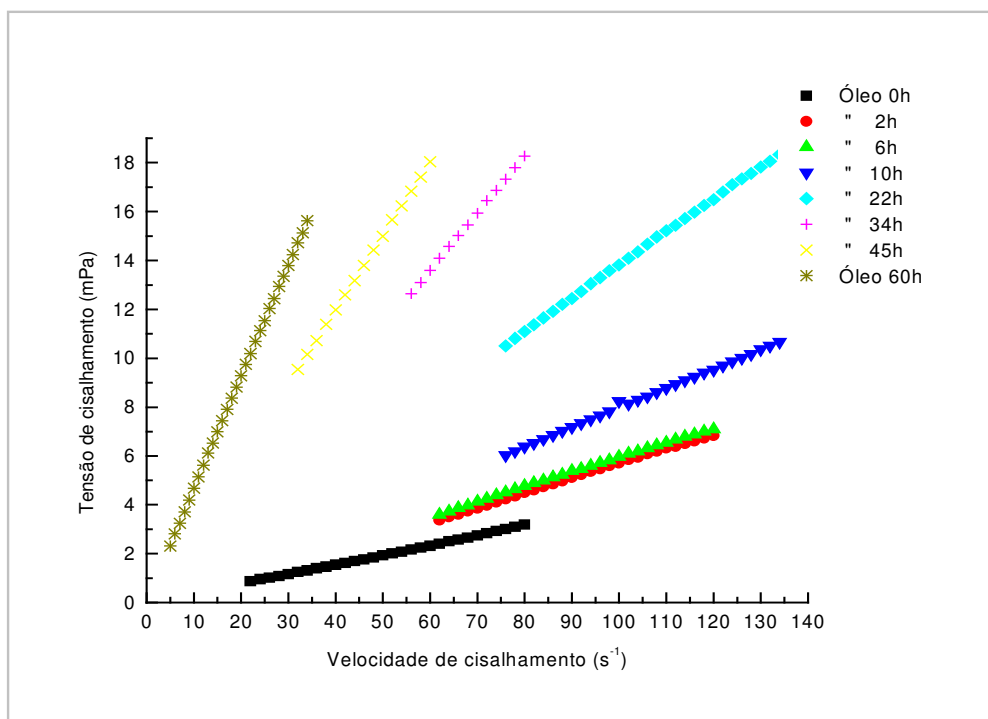


Figura 34. Indicação do comportamento Newtoniano dos óleos de soja, não aquecidos de 2 à 60 horas.

3.2 Preparação dos Biocatalisadores

3.2.1 Adsorção

Antes de iniciar os estudos de adsorção das lipases CRL e Lipolase, em carvão de casca de coco, de pinus e bauxita, foram determinadas as áreas superficiais destes suportes, Tabela 11.

Tabela 11. Áreas superficiais e granulometrias dos suportes usados para imobilização da CRL e Lipolase por processo de adsorção.

Suportes	Área superficial (m ² /g)	Granulometria (mesh)
Carvão de coco	854	20-40
Carvão de pinus	1038	20-40
Bauxita	100	20-40

As determinações das áreas superficiais foram realizadas por adsorção de nitrogênio e os resultados mostraram que os carvões apresentaram áreas entre 8 e 10 vezes superiores a da bauxita. Embora a ativação dos suportes tenha sido por processo físico (vapor superaquecido em sistemas de retortas), as áreas não diferiram de processos por ativação química. Nestes, utilizam-se agentes desidratantes e temperaturas mais baixas, geralmente inferior a 500 °C, ao contrário da ativação física, onde a temperatura variou de 800 – 1000 °C.^{105,106}

Quanto a porosidade dos carvões, segundo informações do fornecedor, o carvão de coco apresenta maior quantidade de microporos e o de pinus, de macroporos. Estas características contribuem para a seletividade dos carvões em processos de adsorção ou seja, a eficiência do carvão ativado independente da procedência, mas depende também da porosidade, a qual está diretamente relacionada com o tamanho das moléculas do adsorbato.¹⁰⁷ Outra informação concernente aos carvões ativados, refere-se a dureza do carvão de casca de coco, sendo mais ou menos 15 % superior ao de pinus. Esta é uma característica importante para a utilização deste material na imobilização de enzimas, considerando que quanto maior este valor, menor será a fragmentação durante o processo de imobilização e reutilização do suporte.

Na imobilização das lipases por adsorção, a CRL foi utilizada para caracterizar os suportes e ao mesmo tempo fornecer evidências para escolher aquele que apresentasse as melhores características de um bom sistema. A Lipolase foi imobilizada somente no carvão de coco, em condições experimentais pré-determinadas no estudo com a CRL.

As variáveis estudadas nos experimentos com a CRL foram: a) tempo de contato; b) efeito do tampão fosfato de sódio na adsorção com a bauxita; c) massa de adsorvente; d) isotermas de adsorção; e) saturação do carvão de coco; f) dessorção da CRL do carvão de coco e g) análises de TGA da enzima adsorvida nestes suportes.

As lipases estudadas apresentaram absorção máxima em 258 (CRL) e 278 nm (Lipolase), em tampão fosfato de sódio. A eficiência dos adsorventes, ou porcentagem de adsorção, foi determinada subtraindo-se a concentração inicial da concentração após a adsorção em tempos preestabelecidos. Nesta determinação, utilizaram-se as curvas de calibração da CRL e Lipolase (Figura 20, item 2.2.3). Este procedimento foi adotado em todos os experimentos relacionados aos estudos de adsorção.

3.2.1.1 Tempo de Contato

Os tempos de contato entre a CRL e os adsorventes (carvão ativo de casca de coco, de pinus e bauxita), foram verificados para se obter a maior porcentagem de adsorção da lipase. A reação foi realizada à 35 °C, no intervalo de 10 à 240 minutos, em tampão fosfato de sódio, exceto para a bauxita, na qual utilizou-se somente solução aquosa.

A Tabela 12, apresenta as porcentagens de adsorção da CRL nos suportes em diferentes tempos. Observa-se que para os três adsorventes, a partir de 60 minutos de contato a adsorção (%), não aumentou significativamente tendo inclusive diminuído ao final de 4 horas, possivelmente devido a ocorrência de dessorção da lipase ao longo do tempo. Através destes

resultados, concluiu-se que o tempo de 60 minutos foi suficiente para a adsorção da CRL nos suportes estudados*[♦]

Tabela 12. Influência do tempo de contato na adsorção da CRL, utilizando-se bauxita e carvões de coco e pinus com granulometria 20-40 mesh, à 35 °C.

Tempo (min)	Carvão de (%)	Carvão de pinus (%)	Bauxita (%)
10	48	47	28
30	56	53	28
60	70	70	44
120	68	83	43
180	73	73	46
240	46	56	42

3.2.1.2 Efeito do Tampão Fosfato de Sódio na Adsorção em Bauxita

Não foi possível determinar a quantidade de CRL adsorvida em bauxita, usando espectroscopia no UV, pois, quando a solução de lipase foi preparada em tampão fosfato de sódio pH 7.2, apresentou valor da absorvância superior ao da solução antes da adsorção. Nestes experimentos, foram tomadas todas as precauções em termos de filtração, centrifugação e repetição de experimentos para evitar a passagem de partículas finas e conseqüentemente, o espalhamento de luz. A solução apresentava-se límpida e transparente, mas o problema persistiu. Este resultado indicou alguma interferência do suporte com o tampão, pois ao realizar a adsorção na ausência do tampão, ou seja em água destilada, este problema não foi observado. O valor da absorvância da solução após adsorção foi inferior ao anterior à adsorção, mostrando, conforme esperado que a concentração da lipase diminuiu na solução.

A dificuldade de quantificação da bauxita adsorvida por espectroscopia de UV e a baixa resistência mecânica deste suporte, o qual se fragmenta pelo simples movimento de agitação durante a adsorção, foi suficiente para considerá-lo inadequado para a imobilização de enzimas.

* No intervalo de uma hora de contato, os carvões e a bauxita adsorveram respectivamente 70 e 44 % da CRL .

A Figura 35, mostra a variação da absorvância da CRL em função da massa de bauxita na presença e ausência de tampão fosfato de sódio. Observa-se que ao utilizar a solução preparada com o tampão, os valores das absorvâncias depois da adsorção não diminuíram, mesmo aumentando a massa de bauxita.

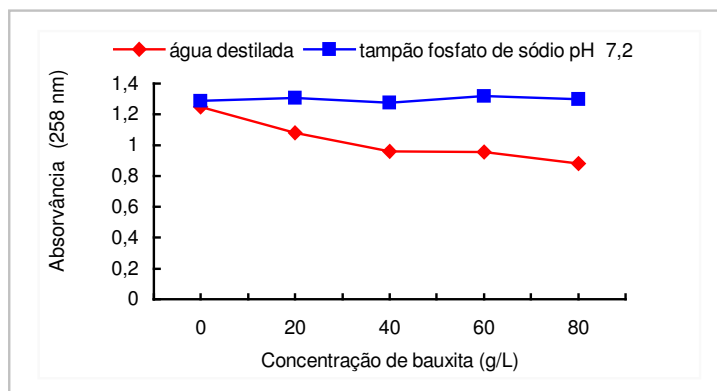
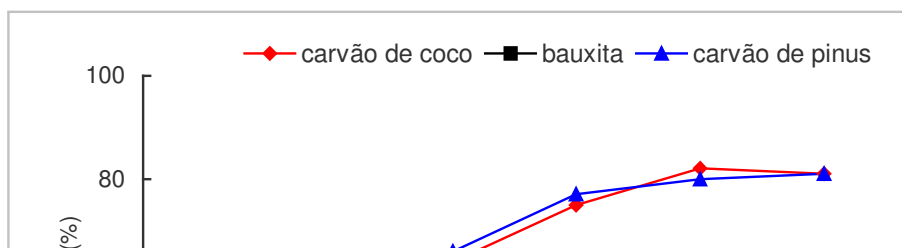


Figura 35. Perfil dos valores de absorvância da solução de CRL adsorvida em bauxita, preparada em água pura e tampão fosfato de sódio pH 7,2. [35 °C; conc. de CRL 5 g/L].

3.2.1.3 Influência da Massa de Adsorvente

Na adsorção da CRL nos suportes já citados, foi necessário verificar qual a massa de adsorvente que seria ideal para preparar os biocatalisadores imobilizados, tendo em vista a utilização dos mesmos posteriormente, nas reações de transesterificação dos óleos de soja. Ressalta-se que nestes experimentos, a adsorção da CRL na bauxita foi realizada em ausência de tampão fosfato de sódio.

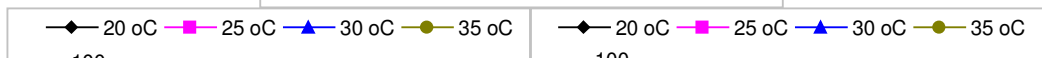
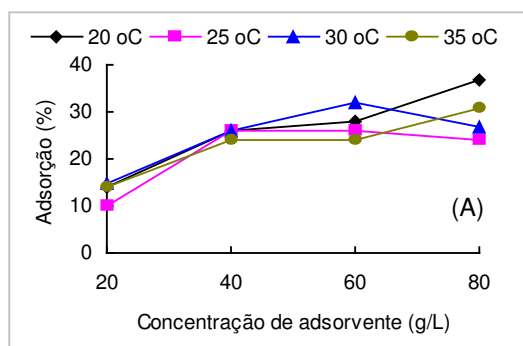
A adsorção da CRL em diferentes massas de suporte, indicou que a melhor quantidade de adsorvente para os carvões de coco e pinus correspondeu a adsorção de 80%, na concentração de 45 g de adsorvente por litro de solução de lipase com concentração de 5 g/L. A partir desta quantidade, a porcentagem de adsorção manteve-se praticamente constante, e não justificou utilizar maior quantidade de carvão. Apesar da maior área superficial do carvão de pinus em relação ao de coco, as quantidades adsorvidas não diferiram significativamente, possivelmente devido a natureza do adsorbato. Entretanto, a adsorção em bauxita foi relativamente inferior a dos carvões, mas este perfil poderá ser diferente para outras enzimas, Figura 36.



3.2.1.4 Isotermas de Adsorção

Em processos de adsorção a temperatura influencia significativamente na quantidade do material adsorvido. Neste estudo, verificou-se o perfil de adsorção da CRL nos carvões de coco, pinus e na bauxita, em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 35 °C). A solução de CRL (5g/L), foi preparada com tampão fosfato de sódio quando usada com os carvões, e sem tampão para a bauxita. Os adsorventes foram utilizados em proporções de 20 à 80 g/L.

A quantidade de CRL adsorvida pelos carvões de coco e pinus, em diferentes temperaturas foram semelhantes, e variaram em média de 60 à 90 %, dependendo da proporção de adsorvente utilizado. Entretanto, a variação da porcentagem de adsorção em função da temperatura foi pequena. A quantidade de CRL adsorvida foi maior nas temperaturas mais altas, e menor à 20 °C. Por outro lado, com a bauxita, a adsorção não ultrapassou 40 %, mesmo utilizando a máxima concentração de adsorvente. Ao contrário dos carvões, a adsorção da CRL em bauxita à 20 °C, foi levemente superior às obtidas a 30 e 35 °C. Estes resultados são mostradas na Figura 37.



Como citado anteriormente, a temperatura influenciou pouco na eficiência dos adsorventes. Em geral, a capacidade de adsorção de carvões ativados é aumentada em temperaturas mais altas, embora neste estudo não tenha sido possível utilizar temperaturas superiores devido a desnaturação da CRL, que ocorre a 37 °C.¹⁰⁸

3.2.1.5 Dessorção da CRL Imobilizada em Carvão de Coco

Em processos de adsorção é comum ocorrer dessorção do material adsorvido, quando colocado em contato com um meio que tenha afinidade com a substância adsorvida.

Como neste trabalho a finalidade foi manter o adsorbato (CRL) retido no suporte para posteriores reutilizações do biocatalisador, inicialmente verificou-se a ocorrência da dessorção neste sistema. Para isto, utilizou-se os solventes nos quais o biocatalisador entraria em contato durante os experimentos que envolveriam as reações de esterificação ou transesterificação, e o sistema CRL/carvão de coco. Os experimentos foram realizados conforme procedimento descrito no item 2.2.6, onde realizaram-se sucessivas lavagens com n-hexano, n-hexano/etanol 96 % e água.

A Figura 38 mostra os resultados de absorvância da CRL após sucessivas “lavagens”, realizadas nas mesmas condições de tempo e temperatura em que a CRL foi imobilizada. Os valores das absorvâncias dos

solventes antes e após as lavagens foram comparados, e verificou-se que somente as amostras lavadas com água apresentaram valores diferentes dos iniciais. Isto indicou que este solvente foi capaz de remover parte da lipase adsorvida. Este resultado já era esperado, considerando-se a alta solubilidade da CRL em meio aquoso. No entanto, após as sucessivas lavagens com água, a quantidade de lipase removida foi inferior a 10% da inicialmente adsorvida. Este foi um indicativo de que a utilização deste biocatalisador em reações em meio orgânico, não deverão ocorrer perdas da lipase para o meio reacional.

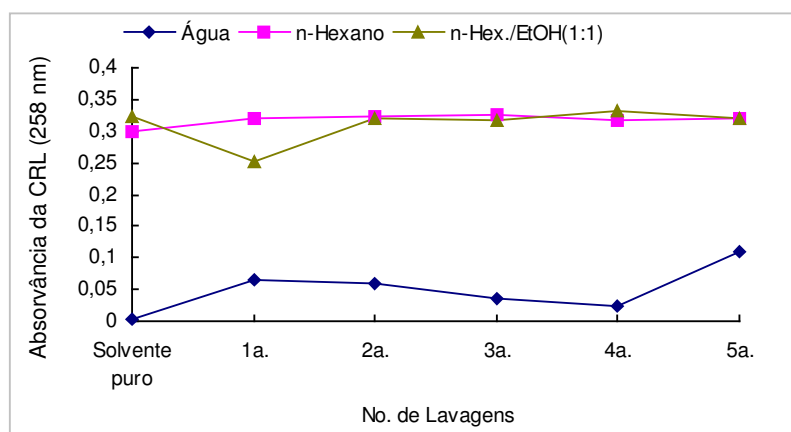


Figura 38. Variação da absorvância da CRL em função do número de lavagens do sistema carvão de coco/CRL com diferentes solventes, a 35 °C por 1 h de contato .

3.2.1.6 Saturação do Carvão de Coco

A saturação deste suporte com a CRL foi realizada com o propósito de avaliar a capacidade de readsorção do carvão, e ao mesmo tempo obter uma amostra do suporte com a maior quantidade possível de CRL adsorvida. Foi importante verificar se uma maior quantidade de lipase adsorvida, iria influenciar na biocatálise do óleo de soja.

O suporte não saturou-se com uma única adsorção. Neste caso, adicionou-se nova solução de CRL e a readsorção ocorreu em média por mais 10 vezes até ocorrer a dessorção. Isto foi visível pela turvação da solução, e o valor da absorvância após filtração, foi superior ao obtido antes da adsorção,

demonstrando que a concentração final da solução estava maior do que a inicial.

Os experimentos foram repetidos por três vezes consecutivas e interrompidos na décima primeira readsorção. De um modo geral esperava-se que a quantidade de material readsorvido posteriormente fosse diminuindo gradativamente e linearmente, mas isto não ocorreu. Segundo a literatura ocorre o processo de acomodação.¹⁰⁹ “Na adsorção física ocorrem interações de Van der Waals ou dipolo-dipolo entre o adsorbato e o adsorvente, e estas são de longo alcance, mas fracas. Uma molécula que se desloque sobre a superfície perde gradualmente energia e termina por ser adsorvida”. Na ocorrência da sobreposição da lipase nos poros do adsorvente em função das readsorções, as interações lipase/suporte tornam-se cada vez mais fracas, e a presença do meio aquoso favorece a remoção de boa parte da enzima adsorvida, a partir de uma determinada quantidade, resultando no processo de dessorção. Neste caso ocorreu em média após onze readsorções, cujos valores das porcentagens de material adsorvido são mostrados na Figura 39.

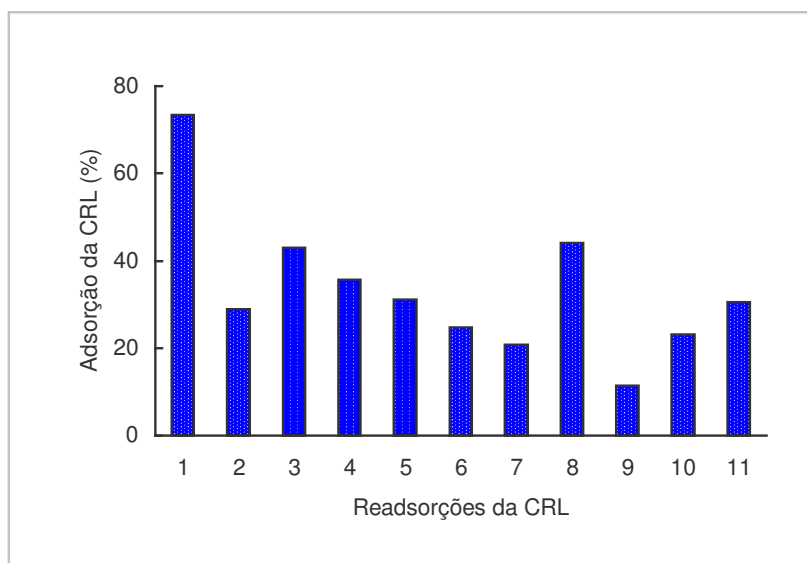
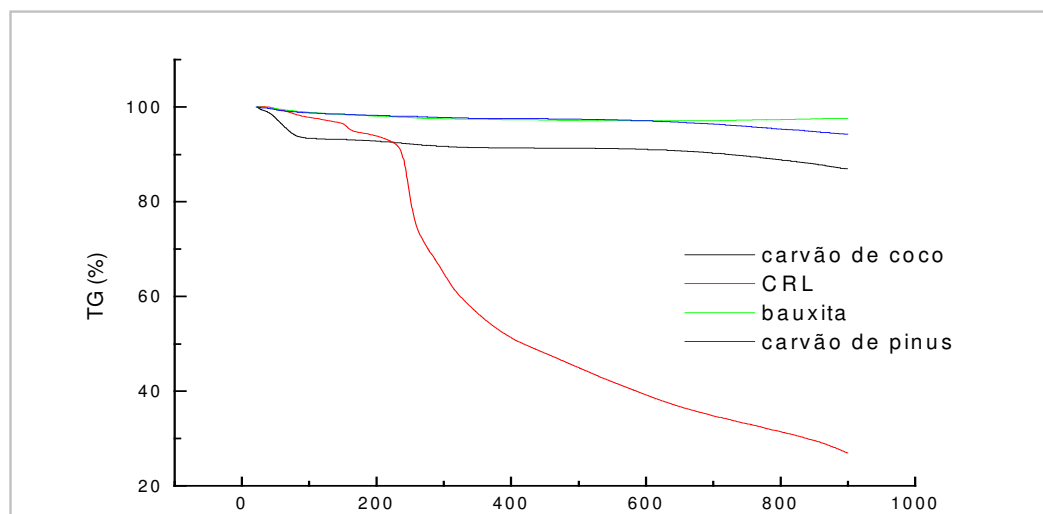


Figura 39. Avaliação da capacidade de readsorção da CRL em carvão de coco. [Lipase 5 g/L; 4 % de suporte; 35 °C; 1 h de agitação].

3.2.2 Análises Termogravimétricas da CRL Adsorvida

Entre as várias técnicas utilizadas para a caracterização e quantificação de enzimas imobilizadas, a análise termogravimétrica (TGA) permite avaliar o acompanhamento da perda de massa durante o processo. Nesse estudo foi utilizada a técnica de TGA para investigar a perda de massa da CRL imobilizada em carvão de casca de coco, de pinus e bauxita, com razão de aquecimento de 10 °C/min, no intervalo de temperatura de 25 à 900 °C. Segundo Turner e col.³⁴ a CRL em condições de baixa atividade de água (0,33) desnatura-se a 118 °C e em solução aquosa a 61 °C. Embora, segundo o catálogo da Sigma¹⁰⁸, a lipase de *Candida cylindracea* (CCL), atual *Candida rugosa* (CRL), desnatura-se à 37 °C. Por outro lado, a CCL imobilizada em casca de arroz ativada, melhorou significativamente a estabilidade térmica. A meia vida da CCL livre nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C foi de 16, 3 e <1 min. respectivamente e, aumentou para 45, 17 e 4 minutos com a lipase imobilizada.⁸¹

A Figura 40, mostra as curvas de TG para a CRL e suportes puros. Tanto a CRL como os suportes apresentaram perdas de massa inicial devido a presença de água (até aproximadamente 200 °C).¹¹⁰ Nas curvas de DTG, Figura 41, estas perdas correspondem aos picos de baixa intensidade observados até 200 °C. Em temperaturas superiores a 200 °C os suportes não apresentaram perdas de massa significativas (ausência de picos na curva de DTG). Por outro lado, a CRL perdeu cerca de 70 % da massa na faixa de temperatura de 200 – 400 °C ($\nabla_{\text{máx.}}$ 250 °C).



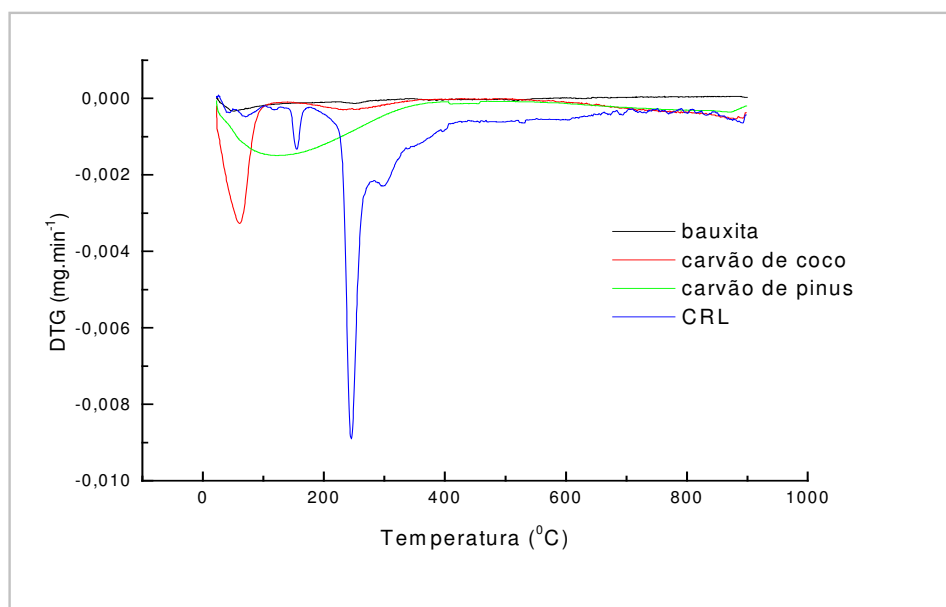


Figura 41. Curvas de DTG da CRL e dos suportes antes da imobilização.

Os percentuais de perdas de massa da CRL e dos suportes na faixa de temperatura analisada estão resumidos na Tabela 13. Os resultados indicam que os suportes são extremamente estáveis termicamente na faixa de temperatura estudada.

Tabela 13. Perdas de massas da CRL e dos suportes antes da imobilização.

Amostras	Intervalo de temperatura (°C)		
	31 – 163	230 – 280	650 – 900
CRL (%)	5,6	67,4	/
Coco (%)	6,6	/	4,3
Pinus (%)	2,5	/	3,2
Bauxita (%)	2,9	/	/

A Figura 42, mostra as derivadas das análises termogravimétricas da CRL immobilizada nos carvões de coco, pinus e bauxita. Os picos inferiores a 100 °C (A), referem-se a perda de água, enquanto os observados na faixa de 150 – 350 °C, correspondem a decomposição da CRL adsorvida.

Comparando-se a faixa de temperatura em que ocorreu esta decomposição com a observada para a CRL pura (230 – 280 °C), verificou-se que a estabilidade da CRL após a imobilização permanece inalterada.

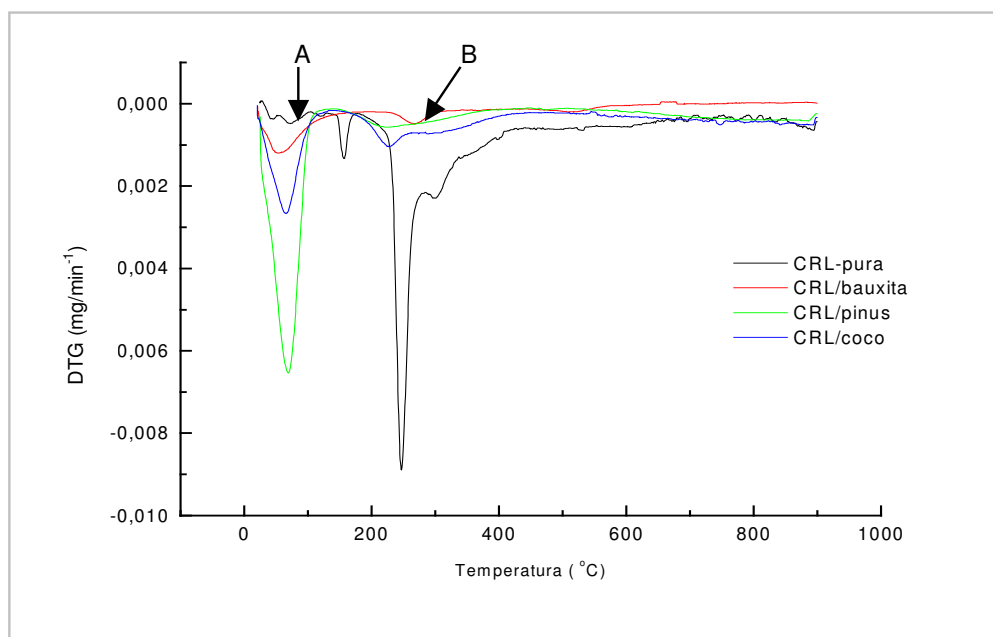


Figura 42. Derivadas da CRL e dos suportes após a imobilização. Os picos indicados por A e B, referem-se as perdas de água e da CRL immobilizada respectivamente. (Neste caso a imobilização da CRL em bauxita foi com tampão fosfato de sódio pH 7,2.

Através das análises de TGA, verificou-se a decomposição de uma amostra de carvão de coco contendo CRL adsorvida. Esta amostra havia sido usada como biocatalisador em reações de esterificação do ácido láurico com n-pentanol por três vezes consecutivas. A finalidade deste estudo foi verificar se havia diferença de perda de massa do suporte puro, e contendo a lipase antes e depois da sua utilização em reação de esterificação.

A perda de água do carvão de coco antes da imobilização da CRL, após esta e sucessivas reutilizações na reação de esterificação do ácido láurico com

n-pentanol é evidenciada pela DTG (Figura 41), em temperatura inferior a 100 °C como já citado anteriormente. Neste caso, verificou-se que o suporte depois de reutilizado como biocatalisador (linha vermelha, Figura 43), apresentou menos quantidade de água do que antes da imobilização. Provavelmente pode ter ocorrido migração da água da superfície do suporte para o meio reacional.

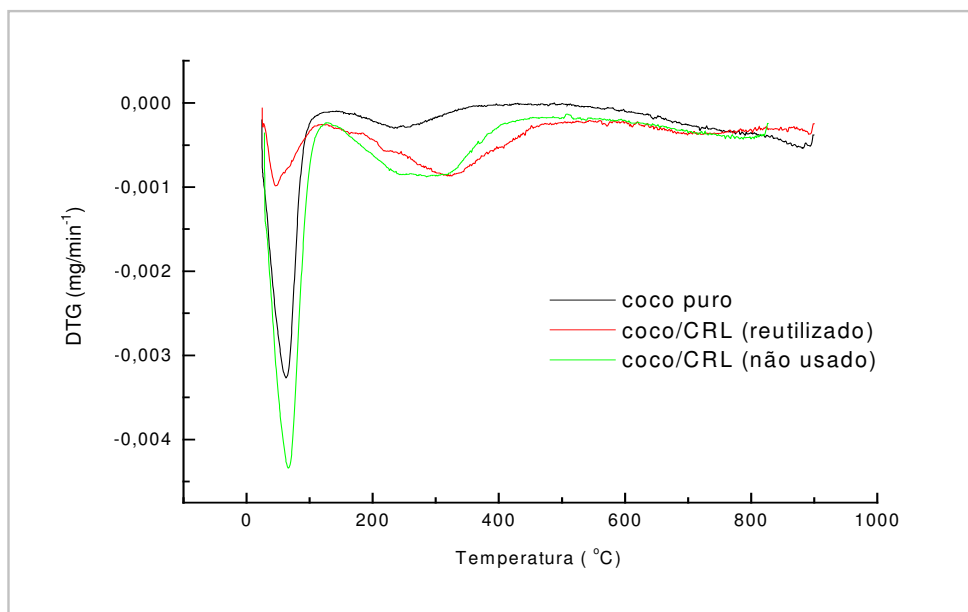


Figura 43. Curvas de DTG do carvão de coco puro, e contendo a CRL imobilizada não usado e usado, como biocatalisador em reações de esterificação.

No suporte puro foi observado uma pequena perda de massa ao redor de 200 °C, a qual possivelmente seja devido a água ligada. O suporte que já havia sido reutilizado por três vezes bem como o não usado, apresentaram perdas de massa equivalentes entre 200 – 400 °C. Como esta decomposição corresponde a perda de CRL, isto indica que o suporte reutilizado manteve a lipase adsorvida durante as reações de esterificação. Este resultado era esperado tendo em vista, que não ocorreu a dessorção em meio orgânico, conforme mostrado anteriormente na Figura 39, item 3.2.1.6.

Como já citado anteriormente, os suportes utilizados nestes estudos apresentam grandes áreas superficiais, carvão de coco (854 m²/g), carvão de pinus (1032 m²/g) e a bauxita (100 m²/g). Portanto, avaliando-se a quantidade

de lipase adsorvida nos três suportes, determinadas por TGA,[♦] verificou-se que os carvões obviamente adsorveram mais lipase que a bauxita. No entanto, dividindo-se as massas das lipases adsorvidas em cada suporte pelas suas respectivas áreas superficiais, observou-se que os carvões apesar de apresentarem área superficial superior, adsorveram menos enzima por unidade de área do que a bauxita, provavelmente devido a uma menor interação entre a lipase e os suportes, conforme os resultados mostrados na Tabela 14.

Tabela 14. Relação da massa de CRL adsorvida nos suportes por unidade de área.

Suportes	CRL adsorvida (mg/g)	Relação da massa de CRL por unidade de área (mg/m ²)
Carvão de coco	36,2	0,042
Carvão de pinus	45,0	0,043
Bauxita	13,4	0,134

- ❖ Na adsorção foi usado tampão fosfato de sódio, e as massas de lipase adsorvida foram determinadas por TGA.

Através da TGA, verificou-se a estabilidade térmica dos suportes e também foi possível determinar a quantidade de lipase adsorvida, através da perda de massa da lipase, na faixa de decomposição da mesma (200 – 400 °C). Esta técnica mostrou-se adequada para o estudo do adsorbato, tendo sido possível obter informações da quantidade e temperatura de decomposição da lipase adsorvida de maneira direta, ou seja, pelo método espectrofotométrico.¹¹¹

3.2.3 Avaliação dos Biocatalisadores na Reação de Esterificação Padrão

A eficiência dos biocatalisadores foi verificada na reação de esterificação do ácido láurico com n-pentanol (5,0 mmolar), em hexano (20 mL) à 35 °C. A quantificação dos ésteres (%), foi determinada por RMN¹H (200 MHz),

[♦] A determinação da massa de CRL através da TGA, foi avaliada a partir da % da massa decomposta na faixa de temperatura referente a perda da lipase.

relacionando as áreas dos picos do n-pentanol e do laurato de n-pentila em 3,7 e 4,1 ppm respectivamente, conforme mostrado na Figura 24, item 2.2.10.

Os resultados foram comparados com os obtidos para a enzima livre (método de Klibanov)⁴¹ através dos seguintes parâmetros: 1) tempo de reação; 2) massa de lipase para obter a conversão máxima no menor tempo possível; 3) influência da quantidade de CRL adsorvida pelo carvão de coco; 4) reutilização do suporte e 5) comparação dos resultados com os da CRL imobilizada em gel de ágar. A influência do tempo no rendimento da reação, com a enzima livre e imobilizada é mostrada na Tabela 15.

Tabela 15. Influência do tempo na esterificação do ácido láurico com n-pentanol com a CRL livre e imobilizada em carvão de coco, pinus, bauxita e gel de ágar (35 °C).

Tempo (h)	24	168	408
Lipase/suporte	Conversão (%)		
CRL/livre	23	100	/
CRL/ágar	100	/	/
CRL/coco	/	/	47
CRL/pinus	/	/	23
CRL/bauxita	/	/	14

Verificou-se que ao utilizar a lipase livre (27 mg) após 24 horas de reação, a conversão foi de 23%, e após 165 h o éster foi obtido quantitativamente. Ao utilizar a enzima imobilizada (27 mg/0,3g de suporte), as conversões foram de 47%, somente após 408 h de reação para o carvão de coco, 22 % para o de pinus e 15% para a bauxita. Entretanto, com a mesma quantidade de lipase imobilizada no gel de ágar (27mg/0,4g), nas mesmas condições experimentais, obteve-se o produto com conversão quantitativa em 24 horas de reação.

O resultado obtido na reação de esterificação com a CRL em gel de ágar, foi superior aos obtidos com esta lipase imobilizada nos demais suportes e na forma livre. Segundo trabalhos reportados na literatura, pode-se considerar que materiais hidrofóbicos são mais eficientes para a imobilização de lipases e podem melhorar a sua atividade e estabilidade.^{112,113} Este comportamento pode também estar associado a efeitos de partição dos substratos.⁴¹ De acordo com a literatura, a esterase imobilizada em octil-agarose apresenta grande aumento

da sua atividade, pois “na ausência da interface hidrofóbica, as lipases tem alguns elementos de estruturas secundárias (forma de tampa) que cobrem os sítios ativos, tornando-os inacessíveis para os substratos. Por outro lado, na presença de interface hidrofóbica, ocorre uma importante mudança conformacional e abre a estrutura da lipase. Esta mudança resulta na exposição da superfície hidrofóbica, passando a interagir com esta interface e conferindo maior funcionalidade para a enzima”.¹¹³

Considerando as dificuldades apresentadas anteriormente com o carvão de pinus e bauxita, entre elas a dureza dos materiais e a interferência do tampão fosfato de sódio para a bauxita, além dos baixos rendimentos e longo tempo na reação de esterificação, foi estabelecido que somente o carvão ativo de casca de coco contendo CRL imobilizada, continuaria sendo utilizado nos próximos experimentos, para verificação da eficiência do biocatalisador nas reações de transesterificação dos óleos.

Nesta etapa verificou-se qual a massa de CRL livre foi suficiente para obter a conversão quantitativa nas mesmas condições de reação. Estes dados foram comparados com os obtidos para a CRL imobilizada no carvão de coco.

A Figura 44, mostra que ao utilizar as massas de 27, 135 e 400 mg de CRL livre na esterificação de 0,005 moles de ácido láurico com n-pentanol por 24 horas, obteve-se os ésteres com conversões de 23, 48 e 100 %, respectivamente. Ao contrário, com a lipase imobilizada em carvão de coco e nas mesmas condições experimentais, não houve formação do produto. Isto demonstrou mais uma vez a ineficiência deste suporte para a imobilização desta lipase.



Na expectativa de melhorar o rendimento da reação de esterificação do ácido láurico, usando o sistema (CRL /carvão de coco), utilizou-se a seguir o biocatalisador contendo maior quantidade de lipase (saturado). Estes experimentos foram realizados com tempo de reação de 408 horas à 35 °C e a massa de lipase adsorvida foi de 80, 150 e 613 mg/g de suporte.* Verificou-se que com a menor massa de lipase imobilizada, obteve-se o éster com 23 % de conversão, e para 150 e 613 mg as conversões foram de 40 e 43%, respectivamente.

Estes resultados, indicaram que a utilização do suporte saturado não melhorou significativamente o rendimento da reação, ou seja, a quantidade de lipase adsorvida pelo suporte não teve grande influência na conversão do ácido láurico no correspondente éster.

A seguir, verificou-se a possibilidade de reutilização do carvão de coco contendo a CRL imobilizada na esterificação do ácido láurico com n-pentanol. Foi utilizado 0,24 g de suporte contendo 150 mg de lipase e 0,005 moles de ácido e do álcool. A reação foi realizada à 35 °C pelo tempo 408 horas por três

* As massas dos suportes para conter 80, 150 e 613 mg de CRL foram 131, 245 e 1000 mg, respectivamente.

vezes consecutivas com o mesmo biocatalisador. Os resultados indicaram que o rendimento do éster diminuiu com o número de reutilizações. Na primeira reação foi de 40 %, baixou para 18 % na segunda e após a terceira, o produto foi obtido com apenas 11%. Estes resultados mostraram que apesar dos baixos rendimentos e longo tempo de reação, a lipase imobilizada continuava ativa.

Através dos estudos com a CRL imobilizada nos diferentes suportes, foi possível avaliar algumas características dos biocatalisadores e principalmente, obter evidências da eficiência destes suportes para a imobilização de lipases.

Como já mencionado, a bauxita apresentou algumas dificuldades operacionais. Na presença de tampão fosfato de sódio, foi impossível determinar a quantidade de lipase adsorvida por espectroscopia de UV. Outro problema, foi a fragmentação da mesma com desprendimento de pó fino durante os experimentos, indicando a baixa resistência mecânica dos grãos e finalmente, o baixo rendimento obtido com este suporte na reação padrão de esterificação do ácido láurico com n-pentanol.

O carvão de pinus, apesar de possuir excelente área superficial, também apresentou o inconveniente da formação de “pó” durante a utilização, demonstrando fragmentação e, além disto, os rendimentos da reação de esterificação também foram muito baixos. Por outro lado, o carvão granulado de coco não demonstrou desgaste mecânico durante os experimentos. Mas, de modo análogo aos demais suportes, o rendimento na reação padrão de esterificação foi baixo (< 50 %). Portanto, estes resultados mostraram que a CRL não foi eficiente quando imobilizada por adsorção nos suportes citados. Os rendimentos dos ésteres foram inferiores e os tempos de reações superiores, quando comparados com a lipase livre. Nestas condições, os suportes não contribuíram para melhorar a atividade da CRL, possivelmente a sua natureza deve ter influenciado na difusão dos reagentes e produtos, ou nas interações da enzima com o suporte.

3.2.4 Caracterização do Biodiesel

As reações de transesterificação dos óleos de soja estudadas neste trabalho, foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada e a quantificação dos ésteres obtidos foram realizadas por RMN ^1H . Foi desenvolvido também, uma metodologia para quantificação dos ésteres através de medidas de viscosidade. No entanto, este método não foi aplicado no monitoramento das reações estudadas. Esta técnica foi utilizada somente para efeito de comparação com o método de RMN ^1H , com os ésteres preparados por via química.

3.2.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

No monitoramento das reações de transesterificação por CCD usou-se como fase móvel n-hexano e acetato de etila (9,8:0,2). Esta mistura de solventes permitiu evidenciar a formação dos ésteres, os quais apresentaram R_f na faixa de 0,60 à 0,70. Por outro lado, a presença do óleo se manifestou como uma mancha forte e alongada próximo à aplicação.

A Tabela 16, mostra os valores dos R_f s e as porcentagens de conversão do óleo de soja refinado. Observa-se, que mesmo com pequenas quantidades de ésteres (< 5 %), a mancha já é visivelmente detectada por CCD. Esta técnica, mostrou-se útil, rápida e eficiente para o monitoramento da alcoólise de óleo de soja.

Tabela 16. Valores dos R_f s e porcentagens de conversão do óleo de soja em ésteres etílicos, determinadas por RMN ^1H .

Amostras	R_f^a	Conversão ^b (%)
1	0,60	80
2	0,61	100
3	0,64	100
4	0,67	45

❖ [(a) n-hexano/acetato de etila 9,8:0,2; (b) 200 MHz, CDCl_3].

3.2.4.2 Reações de transesterificação

Um dos principais problemas no estudo ou aplicação industrial de processos de transesterificação de óleos vegetais, é a quantificação dos ésteres formados. A ressonância magnética nuclear (RMN), se apresenta como uma técnica promissora para estas e outras determinações.^{100,114,115,116,117}

Para fins comparativos de deslocamento químico, inicialmente foram sintetizados alguns ésteres isoladamente. Os ésteres palmitato e estearato de etila foram sintetizados por via enzimática com a CRL imobilizada em gel de ágar, e a conversão foi quantitativa. O mesmo não ocorreu na preparação do linoleato de etila, sendo que após vários dias de reação, o éster não foi obtido com conversão quantitativa. Então, este foi sintetizado por via química.

A Figura 45, mostra o deslocamento químico dos hidrogênios do grupo metileno dos ésteres palmitato, estearato e linoleato de etila. Os quais, apresentaram quartetos entre 4,05-4,20 ppm. Nesta região, também foram observados os quartetos dos ésteres (C₁₂-C₂₄), obtidos na etanolise do óleo de soja, como pode ser verificado na Figura 46 (B).

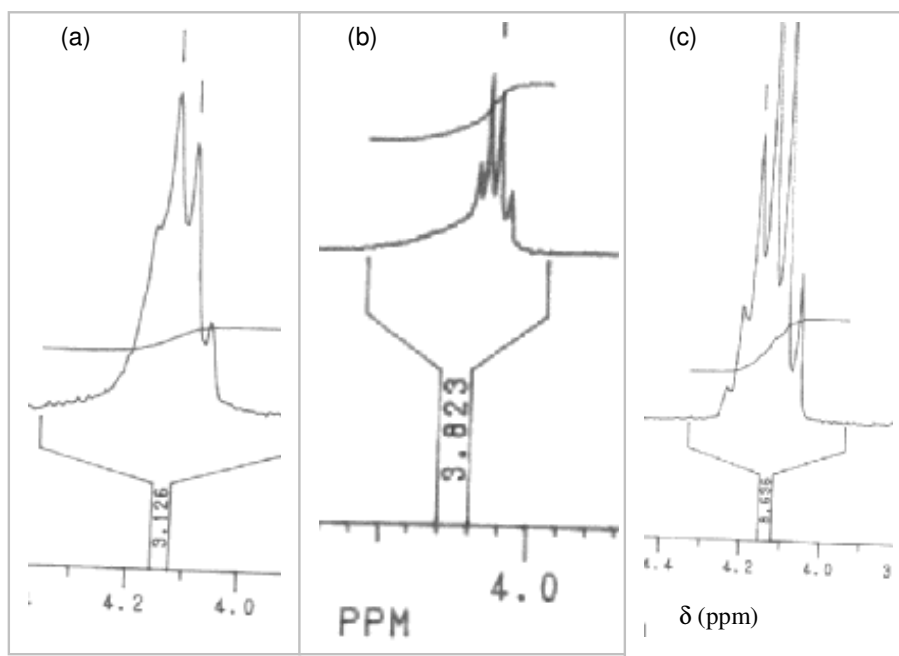


Figura 45. Espectros de RMN ¹H dos ésteres (a) palmitato, (b) estearato e (c) linoleato de etila, mostrando os sinais dos hidrogênios do carbono etóxi na região de 4,05 - 4,20 ppm. (200 MHz, CDCl₃)



Os espectros de RMN ^1H do óleo de soja e dos ésteres etílicos, obtidos em CDCl_3 , tiveram o número relativo de hidrogênios em cada grupo, calculado baseando-se na integração dos hidrogênios metilênicos em 4,05-4,40 ppm (com relação ao triacilglicerol e os hidrogênios dos carbonos etóxi dos ésteres). Como mencionado anteriormente, nesta região há sobreposição dos sinais relevantes dos ésteres (quarteto) e do óleo (duplo, duplo-dublete).

O espectro do óleo de soja puro mostrou 8 conjuntos de sinais que são identificados como: a) hidrogênios olefínicos e um hidrogênio metilênico do glicerol; b) 4 hidrogênios do glicerol; c) hidrogênios dialilmetilênicos; d) 3 grupos CH_2 α -carboxílico; e) grupos CH_2 vizinhos aos carbonos insaturados; f) grupos CH_2 vizinhos aos átomos de carbonos saturados; g) grupos CH_2 ligados a dois átomos de carbonos saturados e h) 3 grupos metilas terminais, Figura 46 (B).^{114,115}

A Figura 47, mostra as correlações das misturas de óleo e ésteres pré-estabelecidas determinadas pela curva de RMN ^1H (através da equação exponencial e pela equação da reta, Equação 6 e Figura 30, item 2.2.13.2). Não houve diferença significativa entre as duas maneiras de calcular, exceto por pequenas variações nas extremidades, 0 ou 100 % de ésteres. Mas, o cálculo da porcentagem dos ésteres através da curva, pela equação exponencial é mais prático.

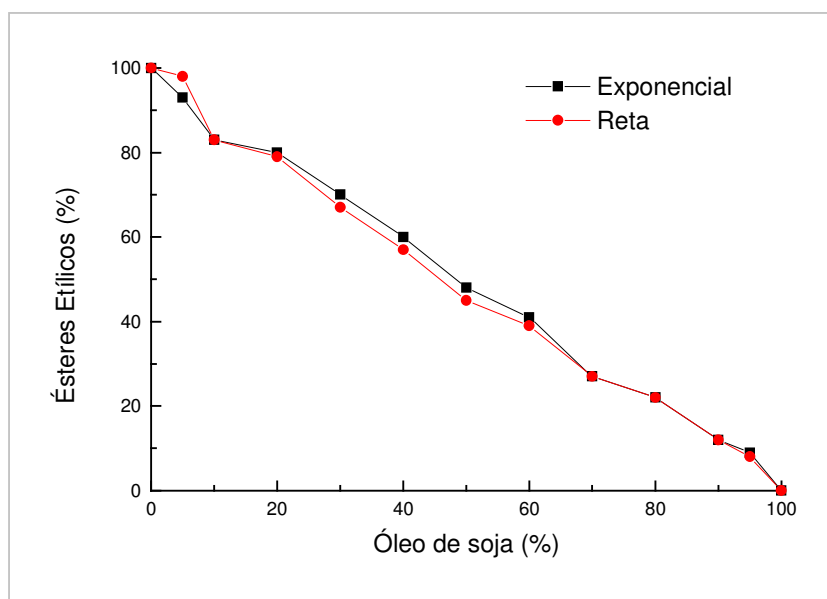


Figura 47. Correlação das porcentagens das misturas óleo/ésteres etílicos, calculadas através da curva de RMN ^1H , pela equação da reta e equação exponencial de 1a. ordem.

3.2.4.3 Espectros de RMN ^1H da Mistura Óleo/Ésteres 50 % (200 x 400 MHz)

Para obter uma melhor separação dos sinais de RMN ^1H do óleo de soja e ésteres etílicos na região de 4,05 – 4,40 ppm, foram realizadas algumas

análises em espectrômetro de 400 MHz e comparadas com os obtidos em 200 MHz.

O espectro de RMN ^1H (400 MHz, Figura 48), da mistura óleo e ésteres etílicos (1:1), mostrou uma pequena separação dos sinais sobrepostos, evidenciando claramente o quarteto do éster, que é observado como multipletto no espectro de 200 MHz.

A finalidade de comparar os espectros de RMN ^1H desta mistura (óleo/ésteres 50%) em 200 e 400 MHz, foi somente para verificar a diferença de resolução entre os dois espectros e evidenciar a sobreposição do quarteto dos ésteres sobre o duplo, duplo-dublete do óleo. Uma vez que todas as análises de RMN ^1H realizadas neste trabalho, foram obtidas em espectrômetro de 200 MHz.

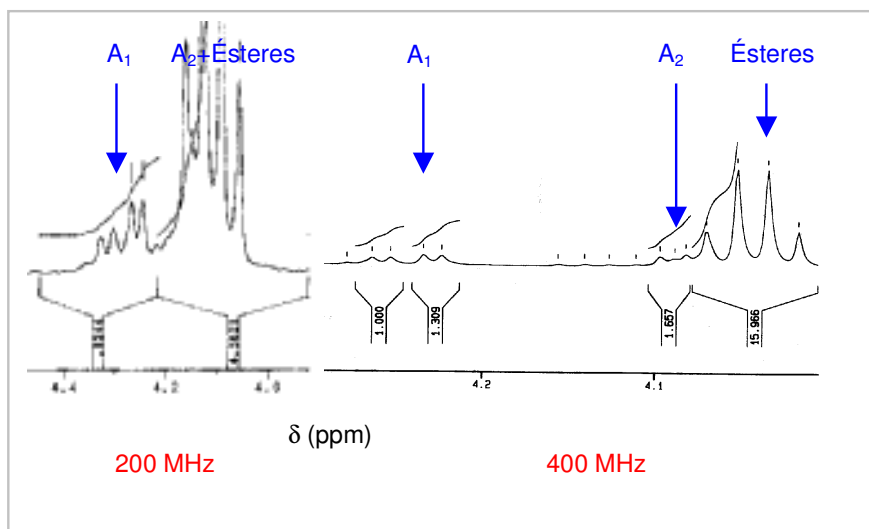


Figura 48. Espectros de RMN ^1H (4,05 - 4,40 ppm) da mistura óleo e ésteres etílico (1:1), obtidos em espectrômetro de 200 e 400 MHz, com CDCl_3 . (A_1), Duplo dublete do glicerol não sobreposto; (A_2), duplo dublete do glicerol sobreposto pelo quarteto do éster no espectro de 200 e separados em 400 MHz.

3.2.4.4 Determinação dos Ésteres Através das Medidas de Viscosidade

A reação de transesterificação de óleos vegetais para obtenção de biodiesel, é usualmente monitorada por CG, que em geral requer derivatização das amostras.^{100,118} Outras técnicas não habituais também tem sido relatadas,

tais como espectroscopia de infravermelho próximo⁴⁴, análises térmicas^{119,120}, medidas de viscosidade e densidade.^{122,123} A aplicação de medidas de viscosidade pode ser usada como uma técnica promissora, por ser rápida, de baixo custo e eficiente.^{121,123,124,125}

Para a utilização das medidas de viscosidade na quantificação dos ésteres, foram preparadas misturas de óleo e ésteres etílicos (0 – 100 %), semelhantes às usadas para a obtenção da curva de calibração por RMN ¹H. Cada proporção das misturas teve sua viscosidade determinada em viscosímetro Brookfield. Este, estava equipado com acessórios para utilizar pequenas quantidades de amostras nas análises (0,5 – 1,0 mL) e também, estava acoplado a um microcomputador, que através de um programa exclusivo (Rheocalc v. 1.0), são estabelecidas todas as condições para a determinação dos valores de viscosidade.

Na Tabela 8 e Figura 23 do item 2.2.8, foi apresentado os resultados das medidas de viscosidade do óleo de soja e dos ésteres etílicos puros, além das misturas óleo/ésteres em diferentes proporções e a respectiva curva de calibração e sua linearização. Nas misturas, a medida que aumentou a concentração de ésteres, a viscosidade diminuiu gradativamente de 52,64 no óleo para 6,12 mPa.s nos ésteres puros. Esta diminuição reflete a diferença de peso molecular, polaridade, forças intermoleculares etc.¹²⁵

A linearização desta curva permitiu a sua utilização para a quantificação dos ésteres etílicos pela equação da reta, usando os coeficientes angular e linear. Esta técnica, é semelhante a de Fillipis e col.¹²¹ para determinação do conteúdo dos ésteres metílicos em reações de transesterificação do óleo de soja. Ressalta-se no entanto, que neste trabalho a quantificação dos ésteres por este método foi somente para comparar as proporções dos ésteres obtidos por via química, através das curvas de calibração de RMN ¹H e por medidas de viscosidade. Foi também usada para comparar alguns resultados de transesterificação enzimática de amostras dos óleos.

3.2.4.4.1 Correlação das Determinações dos Ésteres Etílicos (RMN ¹H x Medidas de Viscosidade)

A Figura 49, apresenta as concentrações dos ésteres etílicos, em diferentes misturas óleo/ésteres (preparadas para esta finalidade). As quantificações foram realizadas pela curva de RMN ^1H e medidas de viscosidade, através da equação da reta. Verificou-se que existe correlação dos resultados obtidos pelas duas técnicas, não apresentando diferenças significativas em altas ou baixas concentrações.

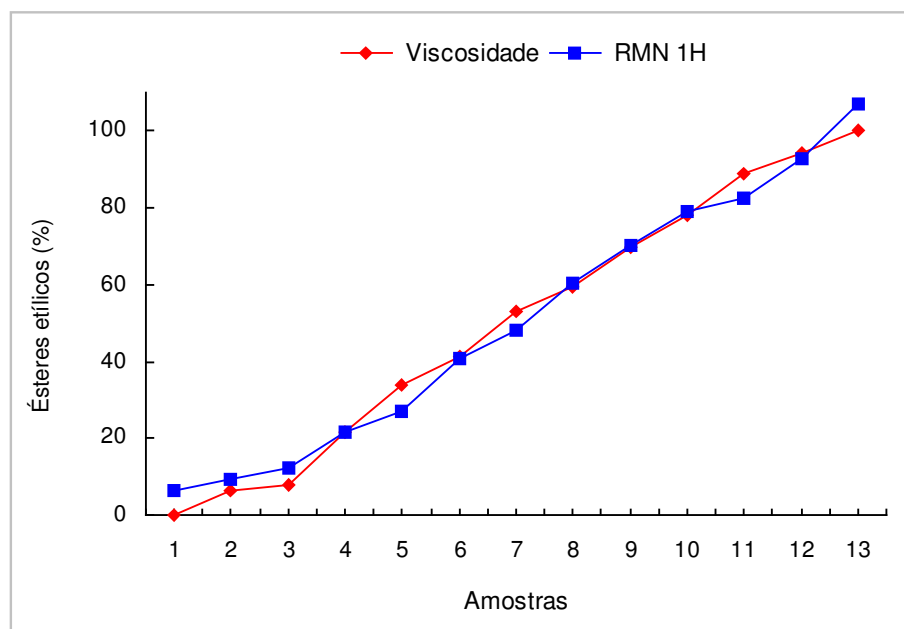


Figura 49. Correlação entre os resultados do conteúdo dos ésteres etílicos e óleo (mistura 0 à 100 %, v/v), determinadas por medidas de viscosidade e RMN ^1H .

A aplicação da técnica de medidas de viscosidade para a quantificação de ésteres etílicos em reações de transesterificação de óleos vegetais, apresentaram algumas particularidades. A determinação por RMN ^1H necessita de pequena quantidade de amostra e não é necessário a purificação prévia da mesma. Por outro lado, a determinação através de medidas de viscosidade precisa de no mínimo 0,5 mL de amostra (para viscosímetro do tipo Brookfield com acessórios). Além disso, os ésteres devem ser submetidos à processo de purificação, para remoção de glicerol, excesso de álcool, mono e di-glicerídeos etc. Portanto, esta técnica torna-se mais indicada para monitoramento de produção industrial, devido a quantidade de amostra exigida para as análises.

3.2.5 Obtenção do Biodiesel por via Enzimática

As reações de transesterificação enzimática dos óleos de soja, apresentadas a seguir, de um modo geral, foram realizadas mantendo-se constante a relação óleo/álcool e variando-se as massas das lipases, temperatura, tempo de reação e testando a reutilização dos biocatalisadores.

3.2.5.1 Alcoólise do Óleo de Soja com a CRL

No estudo da alcoólise do óleo de soja com a CRL por via enzimática, limitou-se a verificar a influência do suporte e do tipo de álcool utilizado. No primeiro caso, foi comparado a eficiência da CRL imobilizada no carvão de coco e no gel de ágar na conversão do óleo em ésteres, e no segundo, verificou-se a influência dos álcoois metanol e etanol hidratado.

3.2.5.1.1 Influência do Suporte

Inicialmente foi verificada a eficiência da CRL livre e imobilizada (em carvão de coco e gel de ágar), na reação de transesterificação do óleo de soja refinado com etanol, nas mesmas condições experimentais. Com a lipase adsorvida no carvão de coco, não houve formação dos produtos, enquanto que aprisionada no gel, a conversão foi quantitativa após 24 horas de reação e de apenas 20 % com a CRL livre, Figura 50.

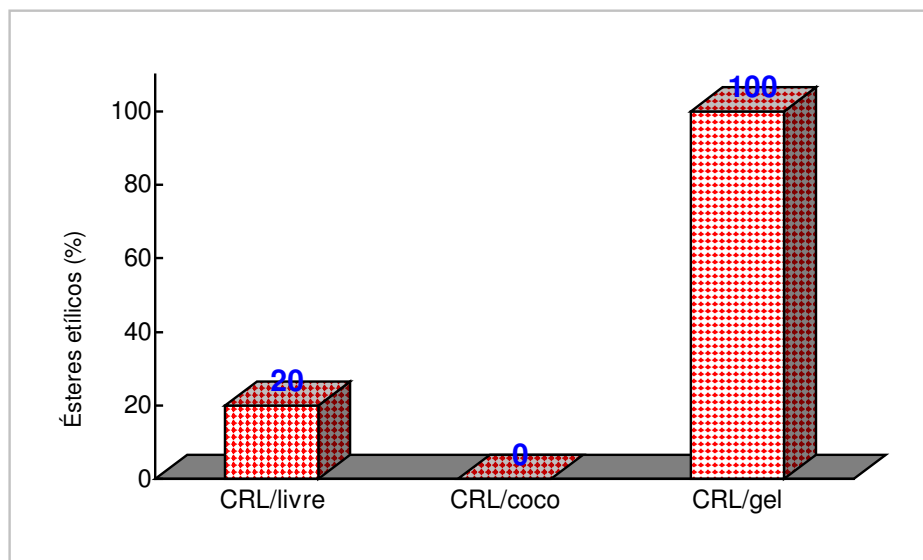
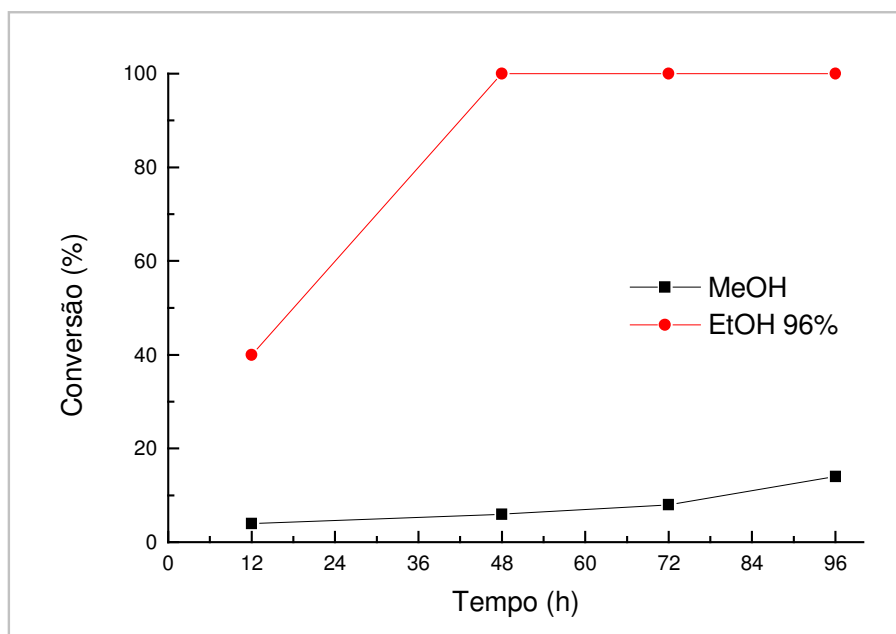


Figura 50. Influência do suporte na etanolólise do óleo de soja refinado com CRL livre (60 mg), imobilizada em carvão de coco (54mg/g) e em gel de ágar (60mg/0.4g). [1 ml

A diferença obtida entre os resultados com a CRL livre e imobilizada em gel de ágar na alcoólise do óleo de soja, mostrada na Figura 50, apresentaram o mesmo comportamento observado na esterificação do ácido láurico com n-pentanol, ou seja, a CRL imobilizada em gel de ágar apresentou maior eficiência do que livre ou imobilizada em carvão de coco. Estes resultados mostram que o gel de ágar é um bom suporte para a CRL, enquanto que o carvão de coco, interferiu de modo negativo na eficiência da enzima. Esta eficiência, está de acordo com os trabalhos de Wu e col. que observaram resultados análogos em reações de esterificação e transesterificação de óleos de oliva e colza.⁶⁹

3.2.5.1.2 Influência do Álcool

A seguir, foi avaliada a influência do álcool na reação de transesterificação do óleo de soja refinado. Os resultados mostraram que a conversão do óleo com etanol hidratado (96 %), usando a CRL imobilizada em gel de ágar foi de 100% após 48 horas de reação, e com metanol não ultrapassou 20 % mesmo após 96 horas, Figura 51.



A água presente no etanol pode ter contribuído para a CRL manter sua atividade. Além disto, o metanol, devido a sua alta polaridade, pode deslocar água do gel e alterar a conformação da CRL. Segundo Uosukainen, e col.¹²⁶, a diminuição da atividade da água pela presença do metanol, pode afetar o rendimento do produto.

Os melhores resultados obtidos com a etanólise do óleo de soja, em relação à metanólise, foram importantes considerando que o etanol é um produto que pode ser obtido com maior facilidade a partir de biomassas, além de apresentar menor toxicidade.¹²⁷

3.2.5.2 Alcoólise dos Óleos de Soja com a Lipolase

A Lipolase é comercializada na forma líquida, e sua imobilização em carvão de coco e gel de ágar foi realizada com sucesso. Nestes experimentos iniciais, verificou-se a eficiência desta lipase imobilizada no carvão de coco e os resultados foram comparados com a mesma na forma livre. A etanólise do óleo de soja refinado foi monitorada por CCD e os ésteres quantificados por RMN ¹H.

3.2.5.2.1 Etanólise do Óleo de Soja com a Lipolase (Imobilizada x Livre)

A Tabela 17, mostra os resultados da etanólise do óleo de soja usando a Lipolase imobilizada e na forma livre. Verificou-se que com o sistema Lipolase/carvão de coco, não houve formação de ésteres mesmo após 192 horas de reação. Ao contrário, quando usada livre e nas mesmas condições,

obteve-se em 24 horas de reação 80 % de conversão com 0,1 mL de lipase por mL de óleo, e conversão quantitativa com 0,3 mL de lipase por mL de óleo.

Tabela 17. Porcentagens de ésteres formados e valores de Rf na etanolise do óleo de soja refinado com a Lipolase imobilizada em carvão de coco e livre.

Lipolase/carvão-coco (mL/g)	Rf (24 h)	Rf (48 h)	Rf (192 h)	Conversão (%)
0,12/0,1	0	0	0	0
0,37/0,3	0	0	0	0
0,62/0,5	0	0	0	0
Lipolase livre	(24h)	/	/	(24h)
(mL)				
0,1	0,60	/	/	80
0,3	0,61	/	/	100
0,6	0,64	/	/	100

[1 mL óleo; 0,5 mL EtOH; 20 mL n-hexano; 35 °C].

Considerando-se a ineficiência do sistema Lipolase/carvão de coco na alcoólise do óleo de soja refinado mostrada na Tabela 16, verificou-se a interferência do suporte, fazendo o aprisionamento de volumes de lipase em diferentes massas de suporte (0,3 mL de Lipolase em 1,2; 0,9; 0,6 e 0,3 g de carvão de coco), ou seja, a Lipolase foi misturada ao suporte, no próprio erlenmeyer usado para a reação. A mistura ficou em contato por 24 horas em geladeira, e depois foi adicionado o óleo, álcool, solvente, e deixado em reação por 48 horas. Entretanto, mesmo com a maior quantidade de lipase (0,3 mL/0,3 g de carvão), não houve formação dos ésteres etílicos. Possivelmente, apesar da grande área superficial do carvão, a retenção de água livre não foi suficiente para manter a atividade enzimática da lipase no meio reacional.

3.2.5.2.2 Influência da Massa de Lipolase Livre e Imobilizada em Gel de Ágar

A seguir, verificou-se qual a quantidade de Lipolase livre e imobilizada era necessária para obter-se a máxima conversão de 1 mL de óleo de soja

refinado com etanol hidratado (96 %). Observou-se que, com 0,1 mL da lipase, obteve-se 80 e 100% de conversão para a enzima livre e imobilizada, respectivamente, após 24 horas de reação, Figura 52.

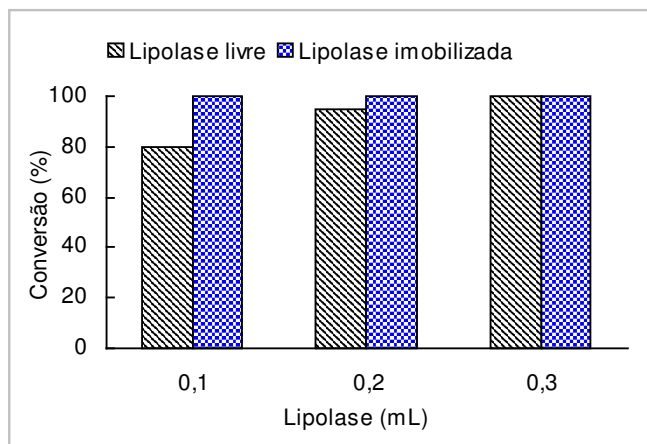


Figura 52. Variação da conversão do óleo de soja refinado, em ésteres etílicos, em função da quantidade de Lipolase livre e imobilizada em gel de ágar. [1 mL óleo; 0,5 mL EtOH; 20 mL n-hex.; 0,4 g ágar; 24h de reação á 35°C].

Nestas condições, concluiu-se que a utilização de 0,1 mL de Lipolase/g de gel foi suficiente para obter o produto da reação de transesterificação do óleo, com conversão máxima. Portanto, esta relação (lipase/óleo) foi utilizada em todos os experimentos que se seguiram.

3.2.5.2.3 Influência do Tempo de Aquecimento do Óleo

O óleo de soja submetido à aquecimento de 2 à 60 horas em laboratório à 180-190 °C, apresentou diferentes resultados de transesterificação enzimática, dependendo do tempo de aquecimento e das mudanças das características físicas e químicas.

A porcentagem de conversão em ésteres etílicos do óleo aquecido, usando Lipolase imobilizada em gel de ágar, foi gradativamente diminuindo com o tempo de aquecimento ao qual o óleo foi submetido. Verificou-se que até 10 horas, a diminuição foi pequena (100 → 80 %), mas a partir deste tempo

diminuiu para 50% com 22 horas, e 29 % com o óleo aquecido por 60 horas, Figura 53.

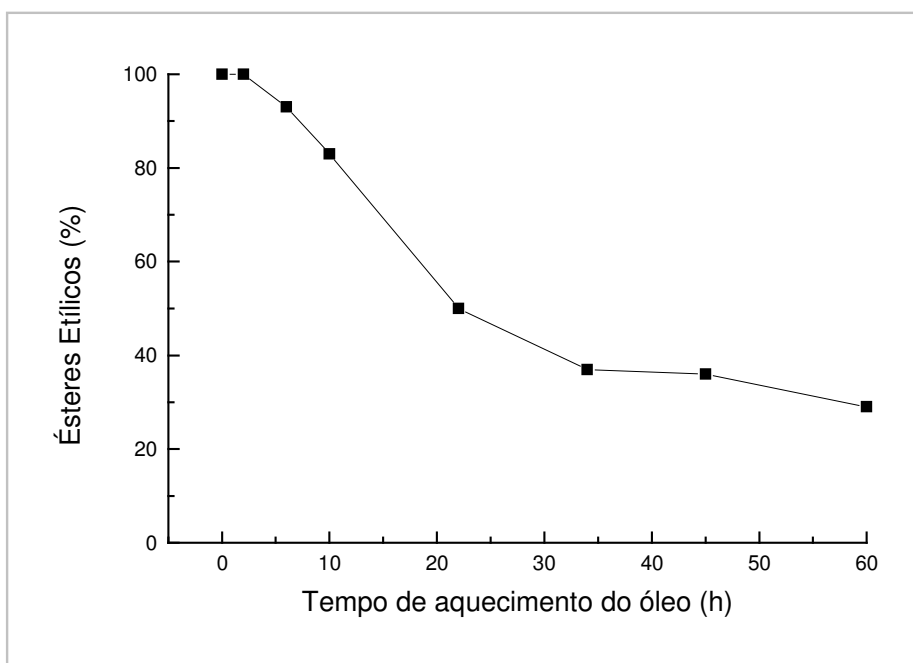


Figura 53. Variação do conteúdo de ésteres formados na etanólise do óleo de soja submetido a diferentes tempos de aquecimento, utilizando-se Lipolase imobilizada em gel de ágar (0,1mL/0,4g). [1 mL óleo; 0,5 mL EtOH; 20 mL n-hex.; 24 horas de reação à 35 °C].

Estes resultados eram esperados, pois a degradação térmica que ocorreu com o óleo depois do aquecimento, possivelmente interferiu na atividade da lipase. Além dos produtos de oxidação, deve ter se formado polímeros, compostos polares e muitos outros voláteis e não voláteis.^{16,17,18}

Provavelmente, a maior interferência na reação e que levou a uma baixa conversão, foram os polímeros formados no processo da oxidação, que refletiram no aumento da viscosidade do óleo. Como o óleo não foi submetido a purificação para separar a parte polimerizada, observou-se que a partir de 22 horas de aquecimento a viscosidade foi muito alterada e, após 60 horas, aumentou quase nove vezes em relação ao valor da inicial (Figura 32, item 3.1).

3.2.5.2.4 Reutilização da Lipolase Imobilizada em Gel de Ágar

A etanolise dos óleos de soja refinado, degomado e usado em frituras, apresentaram bons resultados com a Lipolase imobilizada em gel de ágar após 24 horas de reação, à 35 °C. Os óleos refinado e degomado apresentaram conversão completa (100 %), e isto indicou que os componentes minoritários existentes no óleo degomado (excesso de ácido usado na degomagem, tocoferóis etc), não interferiram na atividade enzimática. Ao contrário, o óleo de frituras em condições semelhantes apresentou conversão de apenas 50 %. Porém, na reutilização do biocatalisador por duas vezes, as porcentagens de conversão com os três tipos de óleos permaneceram inalteradas, Figura 54.

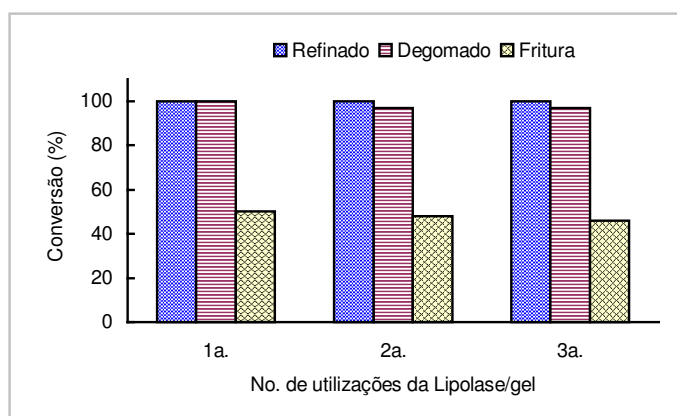


Figura 54. Conversão (%) dos óleos de soja refinado, degomado e usado em frituras, em sucessivas reutilizações com a Lipolase imobilizada em gel de ágar (0,1mL/0,4g) e etanol hidratado. [1 mL óleo; 0,5 mL álcool; 20 mL n-hex.; 24horas de reação à 35 °C].

A eficiência da reutilização da Lipolase imobilizada em gel de ágar para o óleo refinado era esperada, tendo em vista o seu grau de pureza. No entanto, para os óleos degomado e de frituras, os resultados foram surpreendentes, considerando-se que o óleo degomado apresenta alta acidez (> 1%) e uma série de componentes minoritários comuns em óleos vegetais brutos (Figura 4, item 1.3). Embora o óleo de frituras apresentasse uma série de compostos decorrente da degradação térmica,^{15,16,17} nestas condições a conversão em ésteres foi de 50 %. O número de ciclos de reutilização da Lipolase possivelmente poderia ser maior, considerando-se que enquanto não houvesse a sinerese do gel ela poderia manter a mesma atividade. A temperatura de reação de 35 °C não deve contribuir significativamente para a diminuição da atividade da lipase, pois segundo a literatura a Lipolase pode ser utilizada em

até 70 °C sem perda da atividade, porém com significativa redução da vida útil.^{128,129}

3.2.5.2.5 Influência do Álcool

A alcoólise dos óleos de soja refinado, aquecido por 2 horas, degomado e usado em frituras, utilizando a lipolase imobilizada em gel de ágar, apresentaram resultados inferiores para o metanol em relação ao etanol hidratado nas mesmas condições de reação.

As porcentagens de conversão dos óleos com o etanol foram quantitativas, exceto para o óleo de frituras (50 %). Para o metanol, apesar do tempo de reação ter sido aumentado de 24 para 96 horas, as conversões foram de 48, 60, 27 e 10 %, para os óleos refinado, degomado, aquecido por 2 horas e usado em frituras, respectivamente. Estes resultados apresentaram o mesmo perfil dos obtidos com a CRL para etanol hidratado e metanol, mostrados anteriormente. Ou seja, o etanol foi mais eficiente do que o metanol nestas reações, mesmo com o tempo de reação menor, Figura 55.

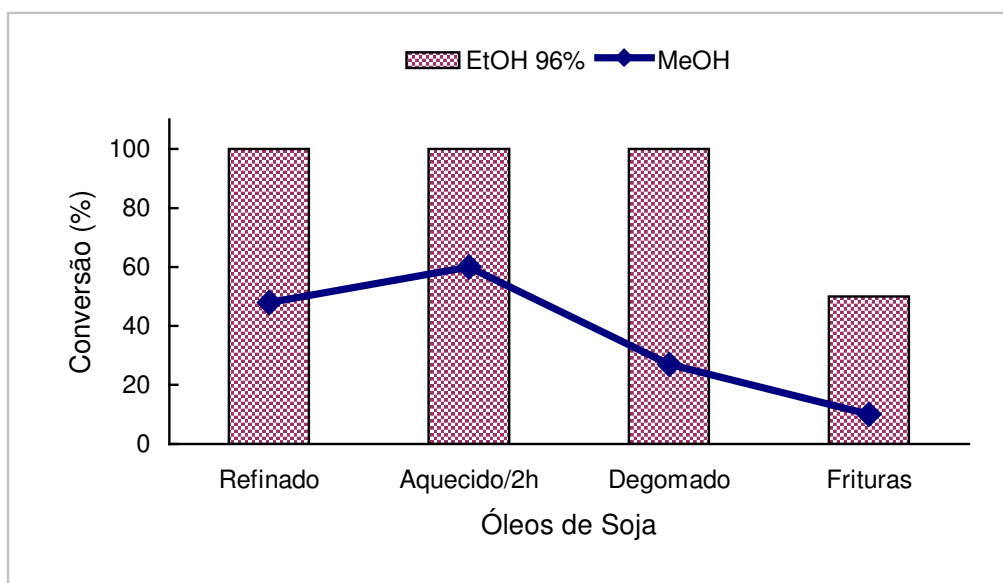


Figura 55. Influência do álcool na conversão dos óleos de soja refinado, aquecido por 2 horas, degomado e usado em frituras usando metanol, etanol e Lipolase imobilizada em gel de ágar (0,1 mL/0,4 g). [1 mL óleo; 0,5 mL álcool; 20 mL n-hex.; 35 °C; tempo de reação: 24h c/ EtOH e 96h c/ MeOH].

3.2.5.3 Transesterificação dos Óleos de Soja com a Lipozyme

A Lipozyme é distribuída pelo fornecedor (Novozymes), imobilizada em resina aniônica e apresenta-se na forma granulada (0,2-0,6 mm). Esta lipase foi utilizada neste trabalho em diversos experimentos. Foram avaliados o tempo, massa e temperatura para obter as melhores condições de reação; efeito da acidez no óleo; reutilização do biocatalisador, influência do tempo de aquecimento do óleo na reação de transesterificação e efeito do tipo de álcool . A quantidade de lipase usada nos experimentos foi calculada em porcentagem (m/v), em relação ao volume de óleo.

3.2.5.3.1 Influência do Tempo de Reação

A Figura 56, mostra as porcentagens de conversão na etanolise com a Lipozyme dos óleos refinado, degomado, usado em fritura e aquecido por 60 horas. Os resultados foram quantitativos para os óleos refinado, degomado e usado em frituras, sendo que o primeiro apresentou tempo de reação de 16 horas e os demais 48 horas. O óleo aquecido por 60h, apresentou conversão de 60 %, após 264 horas.

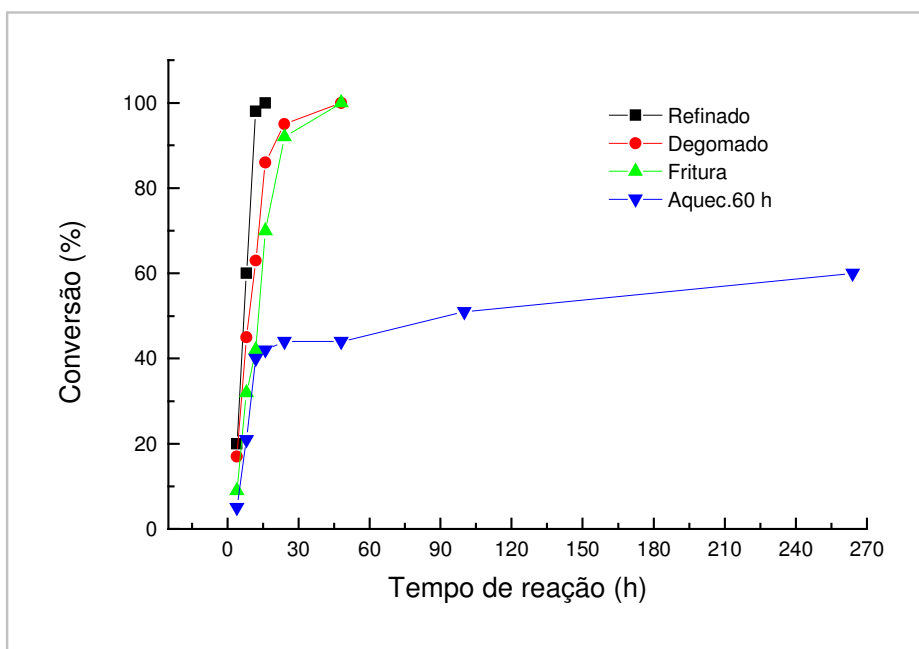


Figura 56. Variação da conversão dos óleos refinado, degomado, usado em frituras e aquecido

Através destes resultados, verificou-se que os óleos que apresentaram conversão quantitativa em ésteres (refinado, degomado e usado em frituras), tinham viscosidades entre 52 – 60 mPa.s (Tabela-6, item 2.1.1), enquanto que o óleo aquecido por 60 horas em laboratório apresentava viscosidade em torno de 8 vezes superior aos demais. Portanto, a alta viscosidade, que reflete a formação de subprodutos, pode ter sido a responsável pela baixa conversão deste óleo nos ésteres correspondentes.

3.2.5.3.2 Influência da Massa de Lipozyme

Dando continuidade a estes estudos, avaliou-se a influência da quantidade de lipase na reação de transesterificação dos óleos de soja refinado, degomado, de frituras e aquecido por 60 horas. Utilizou-se massa do biocatalisador entre 5 – 20 % em relação ao volume de óleo usado nos experimentos, e tempo de reação de 8 horas.

A Figura 57, mostra que o óleo refinado apresentou conversão quantitativa com 15 % de lipase, e o degomado com 20 %. Entretanto, as porcentagens de conversão dos óleos oxidados (usado em frituras e aquecido por 60 horas), foram de 42 e 28 %, respectivamente com 20 % de lipase. Estes resultados mostraram que para os óleos oxidados, não basta aumentar a quantidade do biocatalisador para melhorar a taxa de conversão, possivelmente precisaria também aumentar o tempo de reação.

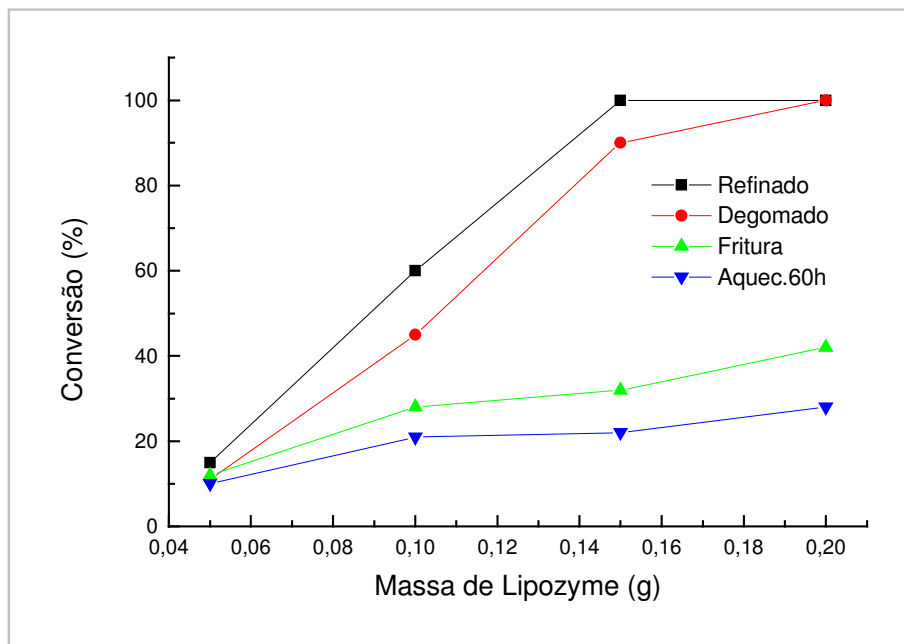
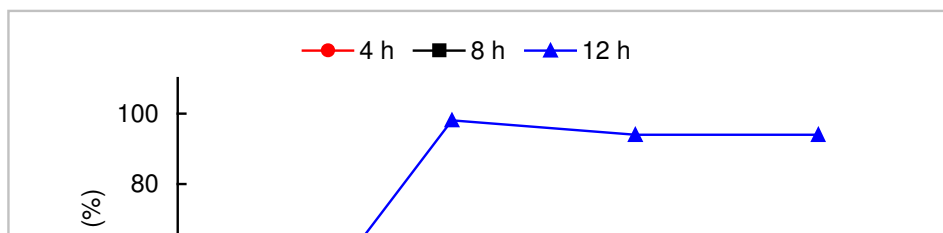


Figura 57. Influência da massa de Lipozyme por mL de óleo na conversão dos óleos de soja refinado, degomado, usado em frituras e aquecido em laboratório por 60 horas. [1ml óleo; 0,5mL EtOH; 20 mL n-hexano; 35 °C; 8 horas de reação].

3.2.5.3.3 Influência da Temperatura

Foi verificada a influência da temperatura (20 – 50 °C), na etanólise do óleo de soja refinado, catalisada pela Lipozyme, nos tempos de 4, 8 e 12 horas de reação.

A Figura 58, mostra os resultados da conversão do óleo em ésteres etílicos em diferentes temperaturas e tempos de reação. Verificou-se que com 4 horas de reação, a conversão máxima foi 16 % à 40 °C, e foi pouco dependente da temperatura. Com 8 horas, a maior conversão foi 60 % à 50 °C. Porém, com 12 horas, obteve-se conversão superior a 90 % nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C e apenas 30 % à 20 °C. Com estes resultados verificou-se que não houve diferença significativa entre 30 e 50 °C. Considerando-se que segundo o fornecedor, a Lipozyme apresenta ótima atividade entre 40-70 °C,¹²⁹ optou-se pela temperatura de 35 °C para a realização dos experimentos posteriores.



3.2.5.3.4 Efeito da Acidez do Óleo na Etanólise com a Lipozyme

A seguir, verificou-se a influência da acidez na reação de transesterificação dos óleos refinado e degomado com a Lipozyme. O óleo refinado que inicialmente tinha acidez inferior a 0,1%, foi acidificado com ácido acético glacial até apresentar valor próximo a 1%. O óleo degomado, inicialmente tinha acidez superior a 1 % e foi neutralizado com NaOH até ficar com o valor menor que 0,1%.

A Tabela 18, mostra os resultados da conversão da etanólise dos óleos refinado e degomado que tiveram seus valores de acidez, aumentado ou diminuído. Observou-se que o óleo refinado com a acidez original ou depois de alterada 21 vezes, continuou formando os ésteres com conversão quantitativa. O óleo degomado, que teve sua acidez original reduzida em torno de 24 vezes, apresentou conversão superior a 80 % antes e após a neutralização. Nestas condições verificou-se que a acidez não interferiu na atividade da lipase.

Tabela 18. Influência da acidez na conversão dos óleos refinado e degomado em ésteres etílicos com a Lipozyme.

1.	Tipo de Óleo	Valores de Acidez (%)	Conversão em Ésteres Etílicos (%)
	Refinado (original)	0,044	100
	Refinado (acidificado)	0,927	100

3.2.5.3.5 Influência do Álcool

A influência do tipo de álcool usado na reação de transesterificação dos óleos refinado, degomado e usado em frituras foi verificada também com a Lipozyme. Foram utilizados metanol e etanol e a reação foi efetuada à 35 °C, por 48 horas, e nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente.

A Tabela 19, mostra que as conversões obtidas na etanólise dos óleos foram quantitativas, mas o resultado com metanol foi inferior a 20%. Como já tinha sido observado com a Lipolase (Figura 55, item 3.2.5.2.5), a reação com metanol formou os ésteres metílicos em menor quantidade. Resultados análogos foram observados por Jones e col. na etanólise de gordura animal.¹³⁰

Estes resultados são análogos aos obtidos com a Lipolase e CRL e mostraram que o etanol hidratado oferece boas perspectivas para a produção de ésteres por via enzimática.

Tabela 19. Influência do álcool nas reações de transesterificação dos óleos refinado, degomado e usado em frituras com a Lipozyme.

Alcool	Tipo de Óleo	Conversão (%)
Etanol (96 %)	Refinado	100
	Degomado	100
	Fritura	100
Metanol	Refinado	15
	Degomado	14
	Fritura	3

[Massa de Lipozyme / mL óleo (0,1 g); 0,5 mL álcool; 20 mL n-hex.; 35 °C; 48 horas].

3.2.5.3.6 Reutilização da Lipozyme

Utilizando-se a Lipozyme em reações de transesterificação dos óleos de soja obteve-se produtos com conversão quantitativa somente com massas de lipase a partir de 10 % em relação ao volume de óleo usado. Esta quantidade de lipase foi usada em novos experimentos nas mesmas condições, para avaliar a eficiência do biocatalisador em sucessivas reutilizações. Com esta finalidade foi realizada a etanolise dos óleos refinado, degomado e usado em frituras, com 10 % da lipase, à 35 °C por 24 horas de reação. As conversões (%), dos óleos após a primeira utilização da Lipozyme foram superiores a 90 %. Porém, na reutilização do biocatalisador estes valores foram inferiores à 10%, Figura 59.

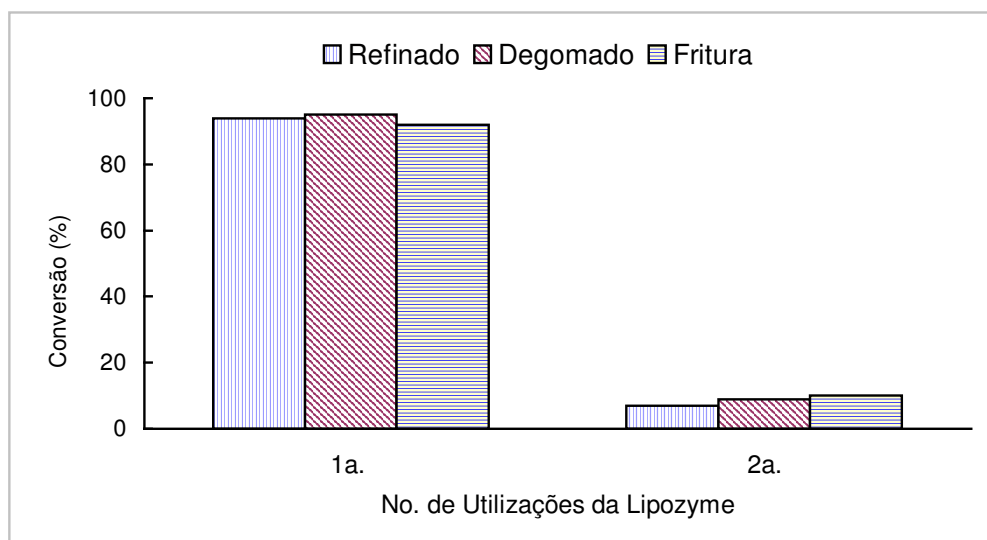


Figura 59. Conversão (%) dos óleos de soja refinado, degomado e usado em frituras com a Lipozyme reutilizando-a por uma vez. [1 mL óleo; 0,5 mL EtOH; 20 mL n-hex.; 0,1 g Lipozyme; 35 °C; 24 horas].

Na expectativa de melhorar a eficiência do biocatalisador reutilizado, aumentou-se o tempo de reação para 408 horas, mas não obteve-se nenhum resultado significativo. Na sequência o biocatalisador foi lavado com n-hexano e depois com água destilada, secado em temperatura ambiente e depois

reutilizado. Mesmo nestas condições, não foi observado nenhum aumento na obtenção dos ésteres.

3.2.5.3.7 Efeito do Tempo de Aquecimento do Óleo

O óleo de soja refinado aquecido por 60 horas em laboratório, apresentou diferentes graus de transesterificação enzimática, dependendo do tempo de aquecimento e das mudanças das características físicas e químicas.

A etanolise destes óleos foi realizada à 35 °C por 48 horas, usando 10 % da lipase em relação ao volume de óleo usado. Os resultados obtidos em ésteres foram de 100% para o óleo não aquecido (0) e de 98, 95 e 85 % para os óleos aquecidos por 2, 6 e 10 horas, respectivamente. Por outro lado, as frações de óleo aquecidas por mais de 22 horas, apresentaram porcentagens de conversão inferiores a 20 % e as amostras subsequentes apresentaram resultados ainda menores, Figura 60.

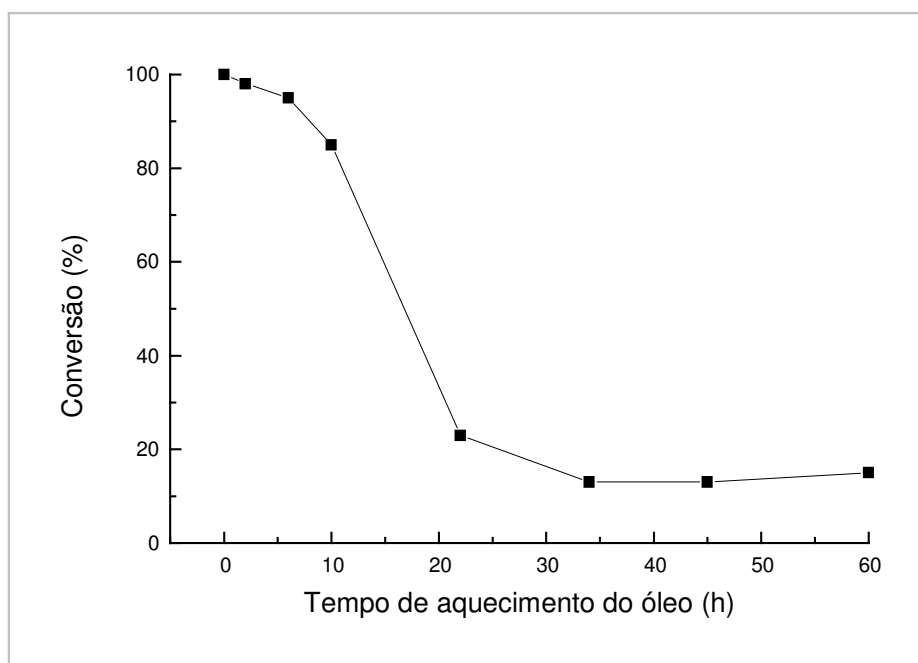


Figura 60. Variação do conteúdo de ésteres formados na etanolise do óleo de soja, submetido a diferentes tempos de aquecimento, utilizando a Lipozyme. [1 mL óleo; 0,5 mL EtOH; 20 mL n-hexano; 0,1 g de lipase; 48 horas de reação à 35 °C].

Estes resultados apresentaram o mesmo perfil dos obtidos com a Lipolase imobilizada em gel de ágar (Figura 53, item 3.2.5.2.3). O aumento da viscosidade do óleo aquecido a partir de 22 horas, deve ter contribuído para a diminuição da atividade da Lipozyme, possivelmente por interações dos resíduos de aminoácidos do centro ativo da lipase com materiais poliméricos formados durante o aquecimento do óleo.

3.2.6 Considerações Finais

Os melhores resultados obtidos nas reações de transesterificação dos óleos de soja refinado, degomado e oxidado (usado em frituras e aquecido em laboratório por 60 horas), foram selecionados considerando-se as médias das porcentagens de conversão, tempos de reação e quantidade de lipase necessária para a transformação destes óleos. Foram utilizados como biocatalisadores a CRL/ágar, Lipolase/ágar e Lipozyme.

A Tabela 20, apresenta as médias dos resultados de transesterificação (superiores à 50 % de conversão) de todos os experimentos realizados com os óleos refinado, degomado e usado em frituras. Para o óleo aquecidos por 60 horas foram selecionados os valores de conversão superiores à 5 %. Este óleo, de um modo geral apresentou baixa conversão, em função da alta viscosidade adquirida no processo de oxidação.

Tabela 20. Médias das porcentagens de conversão das etanólises dos óleos de soja refinado, degomado e oxidado com as lipases imobilizadas CRL, Lipolase e Lipozyme.

Tipo de óleo	Variáveis	CF Lipolase/ágar		
		(30mg/0,4g)	(0,1mL/0,4g)	Lipozyme (0,14g)
Refinado	Conversão (%)	80	97	83
	Tempo de reação (h)	96	24	12
Degomado	Conversão (%)	70	88	90
	Tempo de reação (h)	96	24	22
Fritura	Conversão	50	58	96
	Tempo de reação (h)	96	24	144
60h	Conversão (%)	8	34	33
	Tempo de reação (h)	96	24	74

Os resultados das médias de conversão dos óleos refinado, degomado e oxidado termicamente, com a CRL imobilizada no gel de ágar foram: 80 % para o óleo refinado; 70 % para o óleo degomado; 50 % para o óleo de frituras e 8 % para o óleo aquecido por 60 horas, no tempo médio de 96 horas.

Com a Lipolase imobilizada em gel de ágar, de um modo geral o tempo de reação foi de 24 horas e os valores de conversão superiores a 90 %, para os óleos refinado e degomado. Para o óleo de frituras, nestas condições a conversão foi de 60 %, e 34 % para o óleo aquecido por 60 horas.

Ao utilizar a Lipozyme verificou-se que os resultados médios (% de conversão), para os óleos refinado, degomado e de fritura foram superiores a 80 %, com tempos de reação de 12, 22 e 144 horas, respectivamente. Porém, com o óleo aquecido em laboratório por 60 horas, a conversão média foi de 33 %, com tempo de reação de 74 horas.

Estes resultados demonstraram que a CRL, Lipozyme e a Lipolase imobilizadas, apresentaram boas conversões para os óleos refinado, degomado e o usado em frituras. Considerou-se que o sistema Lipolase/ágar foi o mais efetivo, pois o tempo de reação e a menor quantidade de lipase necessária para a conversão de 1 mL de óleo nos correspondentes ésteres foram menores. Além disto, nas reutilizações deste biocatalisador obteve-se resultados semelhantes aos da primeira utilização.

3.2.7 Caracterização do Biodiesel Obtido por Via Enzimática

A caracterização dos ésteres etílicos obtidos por via enzimática usando a Lipozyme, foi realizada com os óleos de soja refinado, degomado, de frituras e aquecido em laboratório por 60 horas. As medidas de viscosidade e porcentagem de conversão destes ésteres, foram comparados com os valores obtidos dos ésteres preparados por via química (padrão).

A caracterização consistiu em comparar as viscosidades dos óleos, com as dos ésteres obtidos após as reações e relacionar estas com as porcentagens de conversão calculadas por RMN ^1H . A diferença dos valores das viscosidades dos óleos e dos ésteres foi significativa, conforme mostrado na Tabela 21.

Tabela 21. Caracterização dos ésteres etílicos obtidos por via enzimática com a Lipozyme, a partir dos óleos de soja refinado, degomado e oxidado termicamente.

Amostras	Viscosidade-óleos (mPa.s)	Viscosidade-ésteres (mPa.s)	Conversão ^(a) (%)
Padrão	52,64	6,12	100
Refinado	52,64	7,86	100
Degomado	55,17	18,66	74
Fritura	59,41	8,80	100
60h	457,62	65,63	51

[5 mL óleo; 2,5 mL EtOH; 30 mL n-hex.; 0,15 g lipase; 35 °C; tempo de reação: 48 h p/ os óleos refinado, degomado e fritura, e 264 p/ o óleo 60h; ^(a) a % de conversão foi determinada por RMN ^1H , CDCl_3 , 200 MHz].

O óleo refinado transesterificado por via química usado como padrão, apresentou valor de viscosidade de 6,12 mPa.s. Na literatura, é reportado que ésteres de óleos vegetais transesterificados com etanol apresentam valores de viscosidade superiores a 6 mPa.s.¹²⁹ Comparando-se os valores das viscosidades do óleo refinado transesterificado obtidos por via química e enzimática são de 6,12 e 7,86 mPa.s, respectivamente. Este aumento na viscosidade dos ésteres obtidos por via enzimática, possivelmente deve-se a presença de mono e di-glicerídeos, já que a Lipozyme é específica (1,3) e estes ésteres não foram adequadamente purificados, visando a remoção destes componentes.

Os ésteres do óleo degomado apresentaram valor de viscosidade elevado (18,66 mPa.s), mas deve-se considerar que a conversão não foi completa (74 %). Quanto aos ésteres obtidos a partir da etanolise enzimática do

óleo de frituras, embora a conversão tenha sido completa, o valor da viscosidade foi superior ao do padrão (8,8 X 6,12 mPa.s). Mas neste caso, o aumento não deve ser atribuído simplesmente ao conteúdo de mono e diglicerídeos, uma vez que a viscosidade do óleo original foi superior a do óleo refinado (59,41 X 52,64 mPa.s). Possivelmente a presença de compostos formados na oxidação do óleo de frituras, foram responsáveis pelo aumento da viscosidade. O mesmo ocorreu com o óleo aquecido em laboratório por 60 horas que apresentou a conversão máxima de 51 %.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com a utilização dos biocatalisadores imobilizados ou livres para a transesterificação etílica dos óleos de soja refinado, degomado e oxidado termicamente, conclui-se que:

- ❖ Na preparação dos biocatalisadores usando a CRL imobilizada em carvão ativo de casca de coco, de pinus e bauxita, verificou-se que o carvão de coco mostrou-se mais adequado para a imobilização da lipase que os demais suportes, devido principalmente a maior resistência mecânica. Este suporte adsorveu aproximadamente 80 % da CRL na concentração de 5 g/L, em tampão fosfato de sódio pH 7,2 à 35 °C, com tempo de contato de uma hora.
- ❖ A CRL adsorvida nestes suportes foi caracterizada por análise termogravimétrica e se decompôs em temperatura inferior a 350°C. Os suportes puros apresentaram boa estabilidade térmica. Com exceção da perda de água em temperatura inferior a 100 °C, as decomposições tanto dos carvões como da bauxita foram inferiores à 4 % até 900 °C.
- ❖ A imobilização da CRL em gel de ágar (30-60 mg/0,4g), apresentou melhores resultados na reação de transesterificação do ácido láurico com n-pentanol do que com o suporte CRL/carvão de coco. O tempo de reação para obter conversão quantitativa do éster foi de 24 horas, e com a CRL imobilizada no carvão após 408 horas de reação foi apenas de 23 %.
- ❖ As reações de transesterificação com os óleos de soja refinado, degomado e oxidado, usando a CRL imobilizada em carvão ativo de casca de coco, não foram eficientes.
- ❖ Os resultados da etanolise dos óleos de soja refinado, degomado e oxidado, usando as lipases imobilizadas (Lipolase/ágar e Lipozyme/resina

aniônica), mostraram que as conversões foram quantitativas para os óleos refinado e degomado em tempo inferior a 24 horas de reação. Para o óleo usado em frituras o tempo médio foi de 48 horas e com o óleo aquecido em laboratório, não foi obtido a conversão máxima, mesmo após 260 horas.

- ❖ A etanólise das frações do óleo aquecido em laboratório (com diferentes tempos de aquecimento), com a Lipolase e Lipozyme mostrou que o aumento da viscosidade influenciou na conversão dos óleos. A conversão diminuiu gradativamente de 100 % no óleo não aquecido para 84 % com o aquecido por 10 horas e menor que 30 % com o aquecido a partir de 22 horas.
- ❖ Na reutilização dos biocatalisadores, verificou-se que a Lipolase/ágar manteve constante os resultados das conversões de óleo em ésteres por três vezes consecutivas, ao contrário da Lipozyme que perdeu a atividade após a primeira utilização.
- ❖ A alcoólise do óleo refinado com metanol e etanol hidratado, usando a Lipolase/ágar e Lipozyme, mostrou que nas mesmas condições de reação, a conversão foi quantitativa com o etanol e em torno de 20 % com o metanol.
- ❖ O uso de RMN ^1H e de medidas de viscosidade para quantificação dos ésteres etílicos obtidos através da reação de transesterificação do óleo de soja mostrou-se tecnicamente viável. Nos dois casos utilizaram-se curvas de calibração. As determinações através de RMN ^1H mostraram-se adequadas para monitoramento e quantificação dos produtos em reações realizadas em laboratório.

Finalmente, conclui-se que a utilização de lipases imobilizadas em reações de etanólise dos óleos de soja refinado, degomado ou descartado de frituras, surge como uma opção interessante. Alguns fatores como elevada acidez, produtos de oxidação ou alta viscosidade (desde que não seja superior a 80 mPa.s), interferiram pouco na conversão dos óleos em ésteres.

Deve-se salientar que o gel de ágar, além de melhorar a eficiência das lipases na reação de transesterificação dos óleos, permitiu a reutilização dos biocatalisadores imobilizados com excelentes resultados. A utilização deste suporte deve ser aprimorada para realização da etanólise dos óleos em escala piloto (bateladas com quantidades superiores a 20 litros), e determinação do número máximo de reutilização do biocatalisador. Este estudo poderá

demonstrar a viabilidade técnica da produção de biodiesel com etanol hidratado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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
2. BONN, E. P. S. e PEREIRA JR, N. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro; Fundação Biblioteca Nacional; 113 p.; 1999.
3. LIMA, A. W. O. e ANGNES, L. Biocatálise em Meios Aquo-Restritos: Fundamentos e Aplicações em Química Analítica. **Química Nova**; vol. 22; no. 2; 229 – 245; 1999.
4. DE CONTI, R. RODRIGUES, J. A. R. e MORAN, P. J. S. Biocatálise: Avanços Recentes. **Química Nova**; vol. 24; no. 5; 672 – 675; 2001
5. HERRERA, C. G. Esteres Metílicos de Ácidos Grasos como Carburante. Implicaciones Económicas, Ecológicas y Energéticas; **Grasas y Aceites**; 46; 121; 1995.
6. RUIZ, W. A. e TORALLES, R. P. Hidrólise Enzimática dos Óleos Vegetais. **Óleos & Grãos**. Ano VIII; no. 50; set/out.; 42 – 48; 1999.
7. TORALLES, R. P. e AUGUSTO-RUIZ, W. Produção e Utilização de Ácidos Graxos. **Óleos & Grãos**; no.; 61; 26 – 32; 2001.
8. SCHUCHARDT, U. e RIBEIRO, M. L. A. Indústria Petroquímica no Próximo Século: Como Substituir o Petróleo como Matéria-Prima? **Química Nova**. V. 24; N. 2; 247 – 251; 2001.
9. TURATTI, J. M. Importância das Vitaminas Lipossolúveis em Óleos Vegetais. **Óleos & Grãos**; Ano 9, N 54; mar/abr; 24 – 28; 2000.
10. FERRARI, R. A. Componentes Minoritários de Óleos Vegetais. **Óleos & Grãos**; Ano 9, N 58; jan/fev; 20 – 28; 2001.
11. SÃO PAULO. Secretaria da Indústria e Comércio Ciência e Tecnologia. **Soja: Produção, Pré-Processamento e Transformação Agroindustrial**. São Paulo.[sd]. Série Extensão Agroindustrial, 7; 99 p.
12. SERUYA, H. **Óleos Vegetais**. In: XXXI Congresso Brasileiro de Química. Curso. Recife; [s.n.]; 1991.

13. COSTA NETO, P. R. ROSSI, L. F. S. ZAGONEL, G. F. e RAMOS, L. P. Produção de Biocombustíveis Alternativo ao Óleo Diesel Através da Transesterificação de Óleo de Soja Usado em Frituras. **Química Nova**. V. 23, n. 4, p. 531-537; 2000.
14. LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. A. C. In: **Anais do Simpósio sobre Qualidade Tecnológica e Nutricional de Óleos e Processos de Frituras**; Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras; São Paulo; Brasil; 144 p.; 1997.
15. COSTA NETO, P. R. FREITAS, R. J. S. Purificação de Óleo de Frituras; **Bol. CEPPA**; 14; 163; 1996.
16. ROMERO, A. CUESTA, C. and SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Cyclic Fatty Acid Monomers and Thermoxidative Alteration Compounds Formed During Frying of Frozen Foods in Extra Virgin Olive Oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.** vol. 77; no. 11; 1169 – 1175; 2000.
17. SBOG. **Qualidade Tecnológica e Nutricional de Óleos e Processos de Frituras**; *Seminário*; Universidade São Judas Tadeu; São Paulo; 1997.
18. ARELLANO, D. B. Estabilidade em Óleos e Gorduras; **Óleos & Grãos**; v.13, n.10; 1993.
19. GONÇALVES, D. **Oligomerização Catalítica de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos do Óleo de Soja**; Rio de Janeiro; Dissertação Mestrado em Química; Curso de Pós-graduação do Instituto de Química; Universidade Federal do Rio de Janeiro; 122 p.; 1975.
20. SHWAB, W.; DYKSTRA, G. J. SELKE, E. et. al. Diesel Fuel from Thermal Decomposition of Soybean Oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 65, no 11; 1781- 1785; 1988.
21. 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; Brasil; 19-22 jul; p. 42; 1998.
22. FANGRUI, M. and HANNA, M. A. Biodiesel Production: a review. **Bioresource Technology**. 70; 1-15; 1999.
23. MONYEM, A. CANAKCI, M. VAN GERPEN, J. H. Investigation of Biodiesel Thermal Stability under Simulated in-use Conditions. **Appl. Eng. Agriculture**. Vol. 16; no. 4; 373-378; 2000
24. FREEDMAN, B. Variables Affecting of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 61; n. 10; p.1638-1643; 1984.
25. BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio, Secretaria de Tecnologia Industrial. **Obtenção de Combustível de Óleo Vegetal a Nível de Propriedade Rural**. Brasília, STI/CIT, 98 p. (Documento, 18); 1985.
26. FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. Transesterification Kinetics of Soybean Oil; **J. Am. Oil Chem. Soc.** 63; 1375; 1986.

27. STOURNAS, S.; LOIS, E. and SERDARI, A. Effects of Fatty Acid Derivatives on the Ignition Quality and Cold Flow of Diesel Fuel. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 72; n. 4; 436-437; 1995.
28. PIRES, M. J. R. **The Heterogeneous Formation of N₂O in the Presence of Sulfur-containing Gases: Experiments and Modeling.** *Thèse de Docteur és Sciences.* École Polytechnique Fédérale de Lausanne. 18 p.; 1995.
29. QUEIROZ, S. L. e BATISTA, A. A. Funções Biológicas do Óxido Nítrico. **Química Nova**; vol. 22; no. 4; 584 – 590; 1999.
30. BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretária de Tecnologia Industrial, **Produção de Combustíveis Líquidos a Partir de Óleos Vegetais**; Brasília; STI/CIT; 364 p.; 1985.
31. CAMPBELL, M. K. **Biochemistry**; 2 th; USA; Saunders Publishing College; 1995.
32. VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**; New York; John Wiley & Sons; 1990.
33. NELSON, D. L. and COX. M. M. **LEHNINGER Principles of Biochemistry**; 3rd. edition; Worth Publishers; 1151 p.; 2000.
34. TURNER N. A. and VULFSON, E. N. At What Temperature can Enzymes Maintain their Catalytic Activity? **Enzyme and Microb. Technol.** 27; 108 –113; 2000.
35. JUNQUEIRA, L. C. U. e CARNEIRO, J. **Biologia Celular**; 2a. edição; Guanabara Koogan; 299 p.; 1977.
36. STRYER, L. **Bioquímica**; 3a. ed.; Rio de Janeiro; Guanabara Koogan S. A.; 1992.
37. KIRBY, A. J. Enzymes Mechanisms, Models and Mimics; **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**; v. 35; 707-723; 1996.
38. PALMER, T. **Understanding Enzymes**; 4a. ed.; London; Prentice Hall-Ellis Horwood; 1995.
39. MC MURRY, J. **Química Orgânica**. V. 2; 4a. edição (traduzida); LTC Editora S. A.; 660 p.; 1997.
40. FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 3rd Edition; Springer – Verlag; New York; 1997.
41. KOSKINEN, A. M. P. and KLIBANOV, A. M. **Enzymatic Reactions in Organic Media**. Blackie Academic & Professional; 314 p.; 1996.
42. Co, S. A. Biochemicals and Reagents for Life Science Research. **Catálogo da Sigma**. 1998.680.
43. WATANABE, Y. SHIMADA, Y. SUGIHARA, A. and TOMINAGA, O. Enzymatic Conversion of Waste Edible Oil to Biodiesel Fuel in a Fixed-Bed Bioreactor. **J. Am. Oil Chem. Soc.** Vol. 78; no. 7; 2001.
44. KNOTHE, G. Rapid Monitoring of Transesterification in Assessing Biodiesel Fuel Quality by Near-Infrared Spectroscopy Using a Fiber-Optic Probe. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 76; n. 7; 795-800; 1999.

45. MITTELBACH M. Lipase Catalyzed Alcoholyses of Sunflower Oil, **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 67; n. 3; 168-170; 1990.
46. NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R. e MAZZUCO, L. Biotransformação de Óleos e Gorduras; **BIO-TECNOLOGIA Ciência & Desenvolvimento**; ano III n.19; 28-31; 2001.
47. FACIOLI, N. L. e GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via Enzimática da Composição Triglicéridica do Óleo de Piqui; **Química Nova**; 21(1); 16-19; 1998.
48. UOSUKAINEN, E. LINKO, Y. LAMSA, M. et. al. Transesterification of Trimethylol-propane and Rapeseed Oil Methyl Ester to Environmentally Acceptable Lubrificants. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 75; no. 11; 1557-1563; 1998.
49. YEE, L. N.; AKOH, C. C. and PHILLIPS, R. S. Lipase PS-Catalyzed Transesterification of Citronellyl Butyrate and Geranyl Caproate: Effect of Reaction Parameters, **J. Am. Oil Chem. Soc.**; v. 74; n. 3; 255-260; 1997.
50. GANDHI, N. N. Applications of Lipases, **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 74; n. 6; 621- 634; 1997.
51. HARALDSON, G. G. KRISTINSSON, B. SIGURDARDOTTIR, R. et. al. The Preparation of Concentrates of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid by Lipase-Catalyzed Transesterification of Fish Oil with Ethanol. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 74; no. 11; 1419-1424; 1997.
52. SELLAPPAN, S. and AKOH, C. C. Enzymatic Acidolysis of Tristearin with Lauric and Oleic Acids to Produce Coating Lipids. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 77; n.11; 1127 – 1133; 2000.
53. GENBANK, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/genbanksearch.html>, 01/2001.
54. PANDEY, A. BENJAMIN, S. SOCCOL, C. R. et. al. The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 29; 119 – 131; 1999.
55. VILLENEUVE, P. MUDERHWA, J. M. GRAILLE, J. et. al. Customizing Lipases or Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approaches. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic.** 9:4-6:113 – 148; 2000.
56. KONISHI, H.; NEFF, W. E. and MOUNTS, T. L. Oxidative Stability of Soybean Oil Products Obtained by Regioselective Chemical Interesterification, **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 72; n. 11; 1393-1398; 1995.
57. BASHEER, S.; MOGI, K.; and NAKAJIMA, M. Interesterification Kinetics of Triglycerides and Fatty Acids with Modified Lipase in n-Hexane, **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 72; n. 5; 511-518; 1995.
58. HAYES, D. G. The Catalytic of Lipases Toward Hydroxy Fatty Acids – A Review, **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 73; n. 5; 543-549; 1996.

59. GHOSH, S. and BHATTACHARYYA, D. K. Utilization of High-Melting Palm Stearin in Lipase-Catalyzed Interesterification with Liquid Oils, **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 74, n. 5; 589-592; 1997.
60. CONTERON, A.; MARTINEZ, M. and ARACIL, J. Reactions of Olive Oil and Glycerol Over Immobilized Lipase, **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 75; n. 5; 657- 660; 1998.
61. MACRAE, A. R. Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 80; n. 2; 291-294; 1983
62. PECNIK, S. and KNEZ, Z. Enzymatic Fatty Ester Synthesis; **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 69; n. 3; 261-265; 1992.
63. 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.
64. SERCHEL, R. and VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review, **J. Braz. Chem. Soc.** V. 9; n. 1; 199-210; 1998.
65. NELSON, L. A. ; FOGLIA, T. A.; and MARMER, W. N. Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel; **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 73; n. 8; 1191-1195; 1996.
66. LINKO, Y. Y.; LAMSA, M.; HUHTALA, A. and LINKO, P. Lipase-Catalyzed Transesterification of Rapeseed Oil and 2-Ethyl-1-Hexanol, **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 71; n. 12; 1411-1414; 1994.
67. MURAKAMI, M.; KAWASAKI, Y.; KAWANARI, M. et. al. Tranesterification of Oil by Fatty Acid-Modified Lipase, **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 70; n. 571-574; 1993.
68. OSTERBERG, E. BLOMSTROM, A-C. and KOLMBERG, K. Lipase Catalyzed Transesterification of Unsaturated Lipids in a Microemulsion; **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 66; n. 9; 1330-1333; 1989.
69. WU, X. Y.; JAASKELAINEN, S. and LINKO, Y. Y. An Investigation of Crude Lipases for Hydrolysis, Esterification, and Transesterification, **Enzyme Microb. Technol.**; 19; 226-231; 1996.
70. CERNIA, E. PALOCCI, C. SORO, S. The Role of the Medium in Lipase-Catalyzed Esterifications and Transesterifications; **Chem. Phys. Lipids.** V. 93; 157-168; 1998.
71. COSTA, V. E. U. AMORIM, H. L. N. O Emprego de Lipases como Agentes de Resolução Cinética de Enantiômeros em Síntese Orgânica: Aspectos Gerais sobre a Influência do Solvente. **Química Nova.** V. 22; n. 6; 863 - 873; 1999.
72. NAVRÁTIL, M. & STURDÍK, E. Bioactive Components in Productions Using Immobilized Biosystems. **Biologia, Bratislava;** 54; 635 – 648; 1999.
73. LYE, G. J.; PAVLOU, O. P.; ROSJIDI, M. et. al. Immobilization of *Candida cylindracea* Lipase on Colloidal Liquid Aphrons (CLAs) and Development of a Continuous CLA-Membrane Reactor. **Biotechnol. and Bioeng.** V. 51; 69 78; 1996.

74. QUEIROZ, N. **Aplicações Sintéticas de Enzimas Imobilizadas em Organo-gel e Gel de Agar**. *Dissertação de Mestrado*, Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina; 75 p.; 1997.
75. LOUGHLIN, W. A. Biotransformations in Organic Synthesis. *Bioresource Technology*. 74; 49 – 62; 2000.
76. BAN, K. KAIEDA, M. MATSUMOTO, T. et. al. Whole Cell Biocatalyst for Biodiesel Fuel Production Utilizing *Rhizopus oryzae* Cells Immobilized within Biomass Support Particles. *Biochem. Eng. J.*; 8; 39-43; 2001.
77. KRAMER, G. F. H. BATENBURG, L. DERKSEN, J. T. P. CUPERUS, F. P.
A. Convenient Activity Assay for Immobilized Lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*; 3; 121 – 125; 1997.
78. MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S. et. al. Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils – A Review, *J. Am. Oil Chem. Soc.* V. 67, no.12, 890-910; 1990.
79. FERREIRA DA SILVA, P. L. **Utilização de α -amilase e amiloglicosidase Imobilizada em Carvão Ativo de Casca de Coco na Hidrólise de Amido**. *Dissertação de Mestrado*. Depto. de Química da Universidade Federa de Santa Catarina; 70 p.; 2001.
80. BRAUN, B.; KLEIN, E. Immobilization of *Candida rugosa* Lipase to Nylon Fibers Using its Carbohydrate Groups as Chemical Link, *Biotechnol. Bioeng.* V. 51; .327-341; 1996.
81. TANTRAKULSIRI, J.; JEIASHOPE, N. and KRISANANGKURA, K. Utilization of Rice Hull Ash as a Support Material for Immobilization of *Candida Cylindracea* Lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* V. 74, n. 2; 173-175; 1997.
82. ROSU, R.; UOZAKI, Y.; IWASAKI, Y. et. al. Repeated Use of Immobilized Lipase for Monoacylglycerol Production by Solid-Phase Glycerolysis of Olive Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* V. 74; n. 4; 445-450; 1997.
83. CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. *Adv. Polym. Sci.* 83; Springer Verlager Berlin Heidelberg; 107-125; 1987.
84. MRANI, I.; FRAS, G.; BÉNET, J. C. Microstructure et Propriétés Hygromécaniques du Gel d'Agar. *J. Phys. III*; V. 5; 985-998; 1985.
85. BLANCO, R. M.; GIUSÁN, J. M.; HALLING, P. Agarose-Chymotripsin as a Catalyst for Peptide and Amino Acid Ester Synthesis in Organic Media. *Biotech. Lett.*; V. 11; n. 11; 811-816; 1989.
86. JESUS, P. C. **Enzimas Imobilizadas em Crisotila e Organo Gel Aplicação na Resolução de Ácidos Racêmicos**; *Tese de Doutorado*; UFSC; 1998.
87. KANG, T. S. and RHEE, J. S. Characteristics of Immobilized Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Olive Oil of High Concentration in Reverse Phase System; *Biothechnol. Bioeng.* 33, 1469-1476; 1989.

88. ESTEVES, W. GONÇALVES, L. A. G. e BARRERA-ARELLANO, D. **Metodologia Padrão Alemã: para Análises de Gordura e Outros Lipídios**. UNICAMP/FEA / Laboratório de de Óleos e Gorduras; não paginado; 1995.
89. ZAGONEL, G. F. **Obtenção e Caracterização de Biocombustíveis a Partir da Transesterificação Etilica do Óleo de Soja**. *Dissertação de Mestrado*; Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná; Curitiba; 70 p.; 2000.
90. YATES, R. A. and CALDWELL, J. D. Regeneration of Oils Used for Deep Frying: A Comparison of Active Filter Aids; **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 70; n. 5; 507 – 511; 1993.
91. ALCANTARA, R. AMORES, J. CANOIRA L. et. al. Catalytic Production of Biodiesel from Soybean Oil Used Frying Oil and Tallow. **Biomass and Bioenergy**. 18; 515 - 527; 2000.
92. SELMI, B. and THOMAS, D. Immobilized Lipase-Catalyzed Ethanolysis of Sunflower Oil in a Solvent-Free Medium. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 75; no. 6; 691-695; 1998.
93. SHIMADA, Y. WATANABE, Y. SAMUKAWA, T. et al. Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 76; n. 7; 789-793; 1999.
94. WATANABE, Y. SHIMADA, Y. SUGIHARA, A. et. al. Continuous Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 77; n. 4; 355-360; 2000.
95. CANAKCI, M. and VAN GERPEN, J. Biodiesel Production Via Acid Catalysis. **Transactions of the ASAE**. V. 42; n. 5; 1203-1210; 1999.
96. KIM, I. H. YOON, C. S. and LEE, K. W. Transesterification of Conjugated Linoleic Acid and Tricaprylin by Lipases in Organic Solvents. **Food Research International**; 34; 301-306; 2001.
97. CRABBE, E. NOLASCO-HIPOLITO, C. KOBAYASHI, G. et. al. Biodiesel Production from Crude Palm Oil and Evaluation of Butanol Extraction and Fuel Properties. **Process Biochemistry**; 37; 65-71; 2001.
98. MITTELBAACH, M. and ENZELSBERGER, H. Transesterification of Heated Rapeseed Oil for Extending Diesel Fuel. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 76; n. 5; 545 – 550; 1999.
99. OLIVEIRA, A. C. ROSA, M. F. AIRES-BARROS, M. R. and CABRAL, J. M. S. Enzymatic Esterification of Ethanol and Oleic Acid – a Kinetic Study. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**. 11; 999-1005; 2001.
100. GELBARD, G.; BRÈS, O.; VARGAS R. M. et. al. ¹H Nuclear Magnetic Resonance Determination of the Yield of the Transesterification of Rapeseed Oil with Methanol; **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 72; n. 10; 1239-1241; 1995.
101. PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura. Empresa Paranaense de Classificação de Produtos (**CLASPAR**). Resolução do Concex No. 169 de 08/03/89.; Curitiba – Pr; 1989.

102. COSTA NETO, P. R. SCHMITT, M. e BARRETO, A. Verificação da Eficiência de Provas Rápidas no Controle de Óleos de Frituras. **Tecnologia & Humanismo**; n. 15; CEFET/PR; Curitiba; 53-57;1995.
103. WANG, C. and ERHAN, S. Study of Thermal Polymerization of Vegetable Oils with a Differential Scanning Calorimeter. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 76; n.10; 1211-11216; 1999.
104. MORETTO, E. FETT, R. **Óleos e Gorduras Vegetais: Processamento e Análises**. 2a. ed. Editora da UFSC; Florianópolis; 179 p.;1989.
105. AGGARWAL, P. and DOLLIMORE, D. The Production of Active Carbon from Corn Cobs by Chemical Activation. **Journal of Thermal Analysis**. V. 50; 525-531; 1997.
106. GARCIA-FERRO, M. A. RIVERA-UTRILLA, J. BAUTISTA-TOLEDO, I. and MORENO-CASTILHA, C. Adsorption of Humic Substances on Activated Carbon from Aqueous Solutions and their Effect on the Removal of CR(III) Ions. **Langmuir**; 14; 1880-1886; 1998.
107. RYCHLICKI, G. and TERZYK, A. P. The Influence of Carbon Surface Oxidation on the Adsorption of Methanol and Ethanol. **Journal of Thermal Analysis**; V. 54; 343-350; 1998.
108. CATÁLOGO DA SIGMA, 1995.
109. ATKINS, P. W. **Físico-Química**. 6a. Ed. v. 3; Livros Técnicos e Científicos; 159 p.; 1997.
110. MULLER, J. C. M. HAKVOORT, G. and JANSEN, J. C. DSC and TG Study of Water Adsorption and Desorption on Zeolite NaA (powder and attached as layer on metal). **Journal of Thermal Analysis**. V. 5; 449-466; 1998.
111. MATOS, J. R. MIYANO, M. H. SIQUEIRA, L. et. al. Ilustração da Influência da Razão de Aquecimento nos Resultados da Termogravimetria. **Química Nova**. V. 23; n. 1; 113 – 115; 2000.
112. BRADY, C. METCALFE, L. SLABOSZEWSKI, D. and FRANK, D. Lipase Immobilized on a Hydrophobic, Microporous Support for the Hydrolysis of Fats. **J. Am.Oil Chem. Soc.** V. 65; n. 6; 917-921; 1988.
113. FERNANDES-LAFUENTE, R. ARMISÉN, P. SABUQUILLO, P. et. al. Immobilization of Lipases by Selective Adsorption on Hydrophobic Supports. **Chem. Phys. Lipids**. 93; 185-197; 1998.
114. SHAHIDI, F. **Stability of Fats and Oils**. In: 6o. Congresso e Exposição Latino-americano sobre Processamento de óleos e Gorduras. UNICAMP; Anais; 47– 54; 1995.
115. MIYAKE, Y.; YOKOMIZO, K.; and MATSUZAKI, N. Determination of Unsaturated Fatty Acid Composition by High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 75; n. 9; 1091-1094; 1998.
116. PEDERSEN, H. T. MUNK, L. and ENGELSEN, S. B. Low-Field ¹H Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics Combined for

- Simultaneous Determination of Water, Oil and Protein Contents in Oil Seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* V. 77; n. 10; 1069-1076; 2000.
117. KNOTHE, G. Monitoring a Progressing Transesterification Reaction by Fiber-Optic Near Infrared Spectroscopy with Correlation to ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* V. 77; n. 5; 489-493; 2000.
 118. HAN, J. J. IWASAKI, Y. and YAMANE, T. Monitoring of Lipase-Catalyzed Transesterification Between Eicosapentaenoic Acid Ethyl Ester and Tricaprylin by Silver Ion High-Performance Liquid Chromatography and High Temperature Gas Chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* V. 76; n. 1; 31-39; 1999.
 119. REY, F. J. CHAMORRO, O. MARTIN, F. J. and GIL, J. M. Characterization of Fatty Acid Methyl Esters by Thermal Analysis. *Journal of Thermal Analysis.* V. 40; 463-473; 1993.
 120. DUNN, R. O. Thermal Analysis of Alternative Diesel Fuels from Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* V. 76; n. 1; 109-115; 1999.
 121. FILLIPIS, P. DE; GIAVARINI, C.; SCARSELLA, M. et. al. Transesterification Processes for Vegetable Oils: A Simple Control Method of Methyl Esters Content. *J. Am. Oil Chem. Soc.* V. 72; n.11; 1399-1404; 1995.
 122. RODENBUSH, C. M. HSIEH, F. H. and VISWANATH, D. S. Density and Viscosity of Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* V. 76; n. 12; 1415-1419; 1999.
 123. ABIGOR, R. D. UADIA, P. O. FOGLIA, T. A. et. al. Lipase-catalysed Production of Biodiesel Fuel from some Nigerian Lauric Oils. *Biochem. Soc. Trans.* V. 28; n. 6; 979-981; 2000.
 124. SAGGIN. R. and COUPLAND, J. N. Oil Viscosity Measurement by Ultrasonic Reflectance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* V. 78; n. 5; 2001.
 125. TAT, M. E. and GERPEN, J. H. V. The Kinematic Viscosity of Biodiesel and Its Blends with Diesel Fuel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* V. 76; n. 12; 1511-1513; 1998.
 126. UOSUKAINEN, E. LINKO Y. LAMSA, M. et. al. Optimization of Enzymatic Transesterification of Rapeseed Oil Ester Using Response Surface and Principal Component Methodology. *Enzyme and Microbial Technology*; 25; 236-243; 1999.
 127. LENGA, R. E. **The Sigma Aldrich Library of Chemical Safety Data.** Edition I; 1985.
 128. SVANHOLM, H. **Enzymatic Interesterification and Esterification.** Presented at the AOCS Short Course on Speciality Fats; 05-01/02; 1989.
 129. CATÁLOGO DA NOVO. B 347c-GB 500. 2000. E-mail:enzymesla@novo.dk

130. JONES, K. MARMER, W. N. and FOGLIA, T. A. Production of Alkyl Esters from Tallow and Grease Using Lipase Immobilized in a Phyllosilicate Sol-Gel. *J. Am.Oil Chem. Soc.* V. 78; no. 6; 2001

Anexos

Trabalhos Publicados e Submetido

1. Nascimento, M. G.; Costa Neto, P. R. e Mazzuco, L.; Biotransformação de Óleos e Gorduras; **BIO-TECNOLOGIA Ciência & Desenvolvimento**; ano III n.19; 28-31; 2001.
2. Pedro R. Costa Neto; Miguel S. Balparda Caro; Lilian Mazzuco and Maria da Graça Nascimento; Quantification of Soybean Oil Ethanolysis Using H¹ - NMR; **Journal of Magnetic Ressonance** (este trabalho foi submetido para publicação em jan/2002).

Participação em Congressos Sem Apresentação de Trabalhos

1. **Congresso Internacional de Biocombustíveis Líquidos**; Instituto de Tecnologia do Paraná; Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior; Curitiba; 19 - 22 jul/1998.
2. **VI Encontro de Química da Região Sul**; Universidade Estadual de Maringá; Maringá; 04-06 nov/1998.
3. **VI Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos**; Universidade federal do Paraná; Curitiba; 11 – 13 ago/1999.
4. **4o. Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**; Rio de Janeiro; 6 – 8 out/1999.
5. **VII Encontro de Química da Região Sul**; UNISUL; Tubarão; 3 - 5 nov/1999.
6. **Seminário: Combustíveis e Tecnologia Automotiva**. Curitiba, 03 e 04 de abril de 2002.

Participação em Congressos Com Apresentação de Trabalhos

1. Costa Neto, P. R. e Nascimento, M. G. Uso de Carvão Ativo e Bauxita para Imobilização de Lipase de *Candida cylindracea*. **22a. Reunião da Sociedade Brasileira de Química**; Poços de Caldas - MG; 25 – 28 mai/1999.
2. Costa Neto, P. R.; Mazzuco, L. e Nascimento, M. G.; Carvão Ativo Granulado de Casca de Coco como Suporte para Enzimas. **23a. Reunião da Sociedade Brasileira de Química**; Poços de Caldas - MG; 23 – 26 mai/2000.
3. Costa Neto, P. R.; Mazzuco, L. e Nascimento, M. G.; Estudo de Adsorção de lipase de *Candida rugosa* por Análise Termogravimétrica; **VIII Encontro de Química da Região Sul**; UNISC; Santa Cruz do Sul; 8 – 10 nov/2000.
4. Costa Neto, P. R.; Mazzuco, L. e Nascimento, M. G.; Obtenção de Ésteres do Óleo de Soja Oxidado via Enzimática; **24a. Reunião da Sociedade Brasileira de Química**; Poços de Caldas - MG; 28 – 31 mai/2001.
5. Costa Neto, P. R.; Mazzuco, L. e Nascimento, M. G.; Determinação da Conversão de Óleos de Soja em Ésteres Etílicos (Biodiesel) por Viscosidade; **IX Encontro de Química da Região Sul**; Londrina - PR; 7 – 9 nov/2001.
6. Costa Neto, P. R.; Mazzuco, L. e Nascimento, M. G.; Influência do Álcool na Reação de Transesterificação Enzimática do Óleo de Soja. **25a. Reunião da Sociedade Brasileira de Química**; (Resumo submetido em fev/2002).