UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – USP/EEL

MATEUS VINÍCIUS CASAGRANDE DA SILVA

Síntese do palmitato de isopropila catalisada por lipase imobilizada em copolímero magnetizado

Lorena
2017

MATEUS VINÍCIUS CASAGRANDE DA SILVA

Síntese do palmitato de isopropila catalisada por lipase imobilizada em copolímero magnetizado

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa de Freitas

Versão Original

Lorena

2017

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Mateus Vinícius Casagrande da
Síntese do palmitato de isopropila catalisada por lipase imobilizada em copolímero magnetizado / Mateus Vinícius Casagrande da Silva; orientadora Larissa de Freitas - Versão Original. - Lorena, 2017.
117 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2017
Orientadora: Larissa de Freitas

1. Lipase imobilizada. 2. Palmitato de isopropila. 3. Copolímero magnetizado. 4. Éster emoliente. 5. Biorreator. I. Título. II. Freitas, Larissa de, orient.

Dedico este trabalho a minha família,
pelo amor e apoio incondicional

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha vida, pelo amor, por iluminar meu caminho e ter me abençoado desde sempre.

À minha família: minha mãe, Telma, meu pai, Antônio, meu irmão, Rafael, meus avôs, Izildo e Antônio, minhas avós, Alvina e Vera, por todo o amor e carinho que tiveram comigo e pelo apoio incondicional durante toda minha vida.

À Professora Drª. Larissa de Freitas, por ter me orientado durante todo meu trabalho e possibilitado o desenvolvimento do meu projeto, e também pela atenção, paciência, disponibilidade, confiança e pelos ensinamentos.

À Professora Drª. Heizir Ferreira de Castro pelas contribuições, disponibilidade e apoio ao meu trabalho.

Ao Professor Dr. Pedro Carlos de Oliveira, ao Professor Dr. Leandro Gonçalves de Aguiar, ao Professor Júlio Cesar dos Santos e à Professa Drª. Patrícia da Rós, pelo apoio ao meu trabalho.

Aos meus amigos Mauro, Gustavo, Jefferson, Alessandro, Rodrigo, Leandro, Marcos, Leonardo, Conrado, Bruno, pelo apoio que me deram durante toda a minha vida.

Aos companheiros de laboratório que me ajudaram durante todo meu trabalho, Fuad, Caio, Letícia, Gabriel, Matheus, Heitor, Sara, Drª. Ana Karine, Annie, Renata, Rodney, Drª. Daniela. Dr. Leivyson Rafael.

A todos os professores e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

Às demais pessoas, amigos e familiares, que apoiaram, torceram e contribuíram em tudo na minha vida.

RESUMO

SILVA, M. V. C. **Síntese do palmitato de isopropila catalisada por lipase imobilizada em copolímero magnetizado.** 2017. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

Este trabalho teve como objetivo sintetizar o palmitato de isopropila, éster emoliente, empregando como biocatalisador lipases microbianas imobilizadas em partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) (STY-DVB-M) obtidas por meio da técnica de polimerização em suspensão e magnetizadas por co-precipitação de íons de Fe^{+2} e Fe^{+3}em meio básico. Inicialmente, a influência da concentração do agente de suspensão e da agitação na distribuição granulométrica do polímero sintetizado foi avaliada por planejamento experimental 2^2, com triplicata no ponto central. As polimerizações que resultaram nas maiores quantidades de partículas com tamanhos apropriados para utilização como suporte para imobilização (entre 80 e 24 mesh), foram obtidas empregando as seguintes condições experimentais: 1% de agente de suspensão (PVA) e 400 rpm de agitação. O suporte obtido foi utilizado para imobilizar a lipase de *Candida rugosa* (LCR) e lipase de *Penicillium camemberti* (LG) via adsorção física e os biocatalisadores resultantes aplicados em reações de esterificação do ácido palmítico com isopropanol em meio heptano. Para cada biocatalisador foi adotado um planejamento experimental estrela rotacional 2^2, com triplicata no ponto central para avaliar a influência da concentração de biocatalisador (% m/v) e da razão molar (ácido:álcool) no rendimento de esterificação. Nas condições otimizadas em 12 h de reação foram obtidos 75,60 e 88,53% de rendimento de esterificação, respectivamente, para a LCR e LG imobilizada em STY-DVB-M. A quantidade de água formada durante o bioprocesso não foi considerada fator relevante para interferir no progresso da síntese. O biocatalisador obtido pela LG imobilizada em STY-DVB-M foi empregado em biorreator de tanque agitado (280 mL), na condição ótima, em um experimento com ampliação de escala, atingindo 85,68% de rendimento em 12 horas de reação. No entanto, foi observado cisalhamento do suporte em função da agitação mecânica, optando-se pela realização do bioprocesso em biorreator de leito fixo (dimensões: 11 mm de diâmetro interno x 16,6 mm de comprimento) com recirculação do meio reacional (1,5 $mL.min^{-1}$). A operação do sistema nesta configuração foi impossibilitada pela evaporação e/ou percolação do solvente. Assim, foram realizadas reações em reator de leito fixo em meio isento de solvente nas seguintes razões molares: 1:3, 1:4 e 1:6 (ácido:álcool), cujos melhores resultados foram obtidos na razão molar de 1:4, apresentando 56% de rendimento, 215,88 $g.L^{-1}$ do palmitato de isopropila e produtividade de 26,87 $g.L^{-1}.h^{-1}$, decorridas 8h de reação com vazão de reciclo de 1,5 $mLmin^{-1}$. O emprego de peneira molecular no reservatório do substrato proporcionou um acréscimo de aproximadamente 7% na formação do éster. Essa mesma condição experimental (1:4 em meio isento de solvente) foi testada em reator de tanque agitado, atingindo produtividade de 33,40 $g.L^{-1}.h^{-1}$ em 8h de reação. No entanto, em função da desvantagem do cisalhamento do suporte constatada neste tipo de biorreator, concluiu-se que o biorreator de leito fixo foi a configuração mais adequada, para a condução do bioprocesso estudado, apresentando viabilidade do processo enzimático empregando lipase imobilizada em suporte híbrido magnetizado para a síntese do palmitato de isopropila.

Palavras-chave: Lipase imobilizada, Copolímero magnetizado, Palmitato de isopropila, Éster emoliente, Biorreator.

ABSTRACT

SILVA, M. V. C. **Isopropyl palmitate synthesis catalyzed by immobilized lipase on magnetized copolymer**. 2017. 117p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

The aim of this study was to synthesize isopropyl palmitate, an emollient ester, using as biocatalyst microbial lipase immobilized on magnetic copolymer. The support was prepared by suspension polymerization technique using styrene and divinylbenzene monomers in the presence of magnetite particles synthesized by co-precipitation of Fe^{+2} and Fe^{+3}. The influence of the suspending agent concentration and the mechanical agitation on the granulometric distribution of the synthesized polymer was assessed by a 2^2 factorial design with triplicate at central point. The statistical analysis indicated that the optimal experimental conditions to obtain the largest amount of particles with suitable size (between 80 and 24 mesh) to be used as immobilizing support were attained at 1% suspending agent (PVA) at 400 rpm stirring. The resulting support was used to immobilize *Candida rugosa* lipase (LCR) and *Penicillium camemberti* lipase (LG) by physical adsorption and applied in the esterification reaction of palmitic acid with isopropyl alcohol in presence of solvent (heptane). For each biocatalyst a central composite 2^2 experimental design with triplicate at central point was performed to determine the influence of biocatalyst concentration (% m/v) and molar ratio (acid: alcohol) on the reaction yield. Under the optimal conditions higher performance was achieved by LG immobilized on STY-DVB-M (88.53%) than LCR immobilized on STY-DVB-M (75.60%) with shaking at 12 hours reaction. For both reactions the amount of water formed as byproduct was not found to be a relevant factor that interferes in the synthesis progress. The most activity immobilized biocatalyst (LG STY-DVB-M) was used in agitated tank bioreactor (280 mL), under optimized conditions, in an experiment with scale-up, reaching 85.68% yield in 12 hours. However, it has been observed that the support was low mechanical shear and therefore an attempted was made to run the reaction in a packed bed bioreactor (dimensions: 11 mm internal diameter x 16,6 mm length) with recirculation of the reaction medium (1,5 $mL.min^{-1}$). The system could not be operated under this configuration because of solvent evaporation and/or percolation. Thereby, the reactions were carried out in packed bed reactor using solvent-free medium under the following molar ratios: 1:3, 1:4 and 1:6 (acid: alcohol). The best performance (56% yield, 215.88 g L^{-1} of isopropyl palmitate and 26.87 $gL^{-1}.h^{-1}$ of productivity) was attained running the reactor with substrate at molar ratio of acid to alcohol of 1:4 for 8 hours with recycle rate of 1,5 $mL.min^{-1}$. The use of a molecular sieve in the substrate reservoir resulted in an increase of approximately 7% of ester formation. By comparison, esterification run under the same experimental condition (1:4 in solvent-free medium) was carried out in a stirred tank reactor and slight higher productivity (33.40 $g.L^{-1}.h^{-1}$) was achieved. However, due the shear limitation of the support, it was concluded that the most suitable configuration for this bioprocess is the packed bed bioreactor, thereby showing that the enzymatic process is feasible using lipase immobilized on a magnetized hybrid support for isopropyl palmitate synthesis.

Key-words: Immobilized lipase, Magnetized copolymer, Isopropyl palmitate, Emollient ester, Bioreactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Mecanismo de reação da hidrólise das ligações éster catalisada por esterases e lipases...**24**
Figura 3.2 - Esquema representativo da formação do Poli(estireno-co-divinilbenzeno) a partir dos monômeros de estireno e divinilbenzeno. **38**
Figura 3.3 – Esquema representativo da formação de palmitato de isopropila a partir da esterificação do ácido palmítico e álcool isopropílico. **45**
Figura 3.4 – Tipos de reatores utilizados com enzimas imobilizadas. **47**
Figura 4.1 – Ilustração da reação entre sódio e isopropanol. **53**
Figura 4.2 – Ilustração da reação entre ácido palmítico e cloreto de tionila. **54**
Figura 4.3 – Ilustração da reação entre isopropóxido de sódio e cloreto de hexadecanoíla para a síntese do palmitato de isopropila. **54**
Figura 4.4 – Aparato experimental utilizado para a síntese do padrão de palmitato de isopropila. **55**
Figura 4.5 – Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico: a) Ácido oleico, b) Magnetita e c) Partícula de magnetita revestida com ácido oleico. **57**
Figura 4.6 – Síntese das partículas de STY-DVB-M. **59**
Figura 4.7 – Suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado: a) STY-DVB-M pós peneiramento e b) STY-DVB-M atraído por um ímã. **59**
Figura 4.8 – Sistema reacional utilizado para as reações de esterificação em frascos agitados. **63**
Figura 4.9 - Esquema do biorreator descontínuo de tanque agitado para a síntese do palmitato de isopropila **65**
Figura 4.10 – Esquema do biorreator descontínuo de leito fixo para a síntese do palmitato de isopropila **66**
Figura 5.1 - Espectro obtido para o palmitato de isopropila a partir da análise de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^{1}H) **67**
Figura 5.2 – Espectro obtido para o palmitato de isopropila a partir da análise de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C). **68**
Figura 5.3 – Cromatograma obtido para quantificação do palmitato de isopropila. **70**
Figura 5.4 - Gráficos da distribuição granulométrica das partículas de STY-DVB-M obtidas nos diferentes ensaios realizados de acordo com o planejamento fatorial simples 2^2 ..... **73**
Figura 5.5 – Gráfico de Pareto obtido pela análise estatística do planejamento fatorial 2^2 para verificar a influência das variáveis agitação (rpm) e concentração de PVA (%) na fração mássica de STY-DVB-M útil sintetizada **74**
Figura 5.6 – Superfície de resposta gerada a partir da fração mássica de STY-DVB-M útil obtida em função da variação da concentração de PVA (%) e agitação mecânica (rpm). **76**
Figura 5.7 – Rendimento da síntese do palmitato de isopropila empregando 0,125 $mol \cdot L^{-1}$ de ácido palmítico, 0,1 $mol \cdot L^{-1}$ de álcool isopropílico, 2,5% (m/v) de biocatalisador e 45ºC **78**
Figura 5.8 – Rendimento da reação de esterificação obtido nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental 2² estrela rotacional, empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador **80**
Figura 5.9 – Gráfico de Pareto do rendimento da reação de esterificação empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador para a síntese do palmitato de isopropila. **82**
Figura 5.10 – Superfície de resposta gerada a partir do rendimento de reação em função da variação da concentração de biocatalisador e razão molar, empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador. **83**
Figura 5.11 – Rendimento obtido nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental 2² estrela rotacional, empregando LG imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador. **86**
Figura 5.12 – Gráfico de Pareto do rendimento de reação de esterificação empregando LG imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador. **88**
Figura 5.13 – Superfície de resposta gerada a partir do rendimento de reação em função da variação da concentração de biocatalisador e razão molar, empregando LG imobilizada em STY-DVB-M **90**
Figura 5.14 – Rendimento obtido na síntese do palmitato de isopropila empregando 0,271 $mol \cdot L^{-1}$ de ácido palmítico, 0,1 $mol \cdot L^{-1}$ de álcool isopropílico, 17,07% (m/v) de biocatalisador e 45ºC, catalisada pela lipase *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M. **91**

Figura 5.15 - Aparato experimental utilizado para a realização da ampliação de escala em reator de tanque agitado. **92**
Figura 5.16 – Rendimento da síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M, empregando 0,271 mol·L-1 de ácido palmítico e 0,1 mol·L^{-1} de álcool isopropílico em meio heptano e 17,07% (m/v) de biocatalisador a 45ºC. **93**
Figura 5.17 – Perfil do consumo do ácido palmítico e da formação do palmitato de isopropila da reação de esterificação catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M, empregando 0,271 mol·L^{-1} de ácido palmítico e 0,1 mol·L^{-1} de álcool isopropílico em meio heptano e 17,07% (m/v) de biocatalisador a 45ºC. **93**
Figura 5.18 - Sistema operacional do biorreator de leito fixo com recirculação e com condensador de refluxo adaptado **95**
Figura 5.19 - Rendimento da síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M realizada a 45ºC em *shaker*, empregando 10% (m/v) de biocatalisador, 0,271 mol·L^{-1} de ácido palmítico e 0,1 mol·L^{-1} de álcool isopropílico em meio diferentes solventes. **96**
Figura 5.20 - Rendimento da síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M realizada a 50ºC em *shaker*, empregando 10% (m/v) de biocatalisador em meio isento de solvente, em diferentes razões molares (ácido:álcool) **98**
Figura 5.21 - Rendimento da síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em reator de leito fixo com vazão de reciclo 1,5 mL.min^{-1}, empregando 4,3 g de biocatalisador, 40 mL de substrato, sob temperatura de 50 ˚C, em diferentes razões molares (ácido:álcool) **100**
Figura 5.22 - Perfil do consumo do ácido palmítico e da formação do palmitato de isopropila na reação de esterificação catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em reator de leito fixo com vazão de reciclo 1,5 mL.min^{-1}, empregando 4,3 g de biocatalisador, 40 mL de substrato, sob temperatura de 50 ˚C, em diferentes razões molares (ácido:álcool). **100**
Figura 5.23 - Rendimento da síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em reator de leito fixo empregando razão molar (ácido:álcool) de 1:4 com vazão de reciclo 1,5 mL.min^{-1}, 4,3 g de biocatalisador, 40 mL de substrato contendo peneira molecular (20% m/v), sob temperatura de 50 ˚C. **102**
Figura 5.24 – Perfil do consumo do ácido palmítico e da formação do palmitato de isopropila na reação de esterificação catalisada lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em reator de leito fixo empregando razão molar (ácido:álcool) de 1:4 com vazão de reciclo 1,5 mL.min^{-1}, 4,3 g de biocatalisador, 40 mL de substrato contendo peneira molecular (20% m/v), sob temperatura de 50 ˚C. **102**
Figura 5.25 - Comparação dos resultados obtidos para a síntese do palmitato de isopropila na reação de esterificação catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em reator de leito fixo empregando razão molar de 1:4 (ácido: álcool), em 8h de reação. **103**
Figura 5.26 - Síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em meio isento de solvente, realizada em reator de tanque agitado empregando 10% (m/v) de biocatalisador, 20 mL de substrato, sob temperatura de 50 ˚C, em diferentes razões molares (ácido:álcool) **104**
Figura 5.27 - Perfil do consumo do ácido palmítico e da formação do palmitato de isopropila na reação de esterificação catalisada lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em reator de tanque agitado, 10 (% m/v) de biocatalisador, 20 mL de substrato, sob temperatura de 50 ˚C, empregando razão molar (ácido:álcool) de: a) 1:4; b) 1:6. **105**

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Formulação utilizada nas reações de polimerização. **58**
Tabela 4.2 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento de experimentos para analisar a influência da concentração de PVA (%) e agitação (rpm) na distribuição granulométrica do STY-DVB-M. **60**
Tabela 4.3 - Planejamento experimental utilizado na análise da influência da concentração de PVA (%) e agitação (rpm). **61**
Tabela 4.4 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento de experimentos para avaliar a da influência da razão molar e da concentração de biocatalisador na síntese do palmitato de isopropila. **63**
Tabela 4.5 - Planejamento experimental utilizado na análise da influência da concentração de biocatalisador (%) e razão molar (ácido:álcool). **64**
Tabela 5.1 - Análise dos espectros obtidos para o palmitato de isopropila. **68**
Tabela 5.2 - Sinais de deslocamento para cada tipo de grupo químico para análise de RMN ^{1}H. **69**
Tabela 5.3 - Sinais de deslocamento para cada tipo de grupo químico para análise de RMN ^{13}C. **69**
Tabela 5.4 - Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem do palmitato de isopropila **70**
Tabela 5.5 - Resultados do planejamento de experimentos para a análise granulométrica do STY-DVB-M. **71**
Tabela 5.6 - ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos da análise granulométrica do STY-DVB-M. **75**
Tabela 5.7 - Atividade de esterificação e umidade dos biocatalisadores de LCR e LG imobilizadas em STY-DVB-M. **77**
Tabela 5.8 - Rendimento da reação de esterificação obtido nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental 2² estrela rotacional empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador. **81**
Tabela 5.9 - ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos utilizando LCR imobilizada em suporte STY-DVB-M. **82**
Tabela 5.10 - Resultados do teor de água presente no meio reacional, empregando LCR em STY-DVB-M como biocatalisador na síntese do palmitato de isopropila. **85**
Tabela 5.11 - Rendimento obtido nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental 2² estrela rotacional empregando LG imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador. **87**
Tabela 5.12 – ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos utilizando LG imobilizada em suporte STY-DVB-M. **89**
Tabela 5.13 - Resultados do teor de água presente no meio, empregando LG em STY-DVB-M como biocatalisador na síntese do palmitato de isopropila. **91**
Tabela 5.14 - Comparação da produtividade do palmitato de isopropila obtida em 8 horas de reação para os diferentes testes realizados. **105**

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 – Classificação das enzimas de acordo com a Comissão das Enzimas da União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC). **22**
Quadro 3.2 – Microrganismos produtores de lipases. **25**
Quadro 3.3 – Principais métodos de imobilização de enzimas e suas classificações. **27**
Quadro 3.4 – Classificação dos suportes: tipos e exemplos de materiais. **32**
Quadro 3.5 – Utilização do poli(estireno-co-divinilbenzeno) como suporte para imobilização de lipases. **38**
Quadro 3.6 – Trabalhos que utilizaram polímeros magnéticos para imobilização de lipases empregando magnetita (Fe_3O_4). **42**

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AIBN	Azobisisobutironitrila
LCR	Lipase de *Candida rugosa*
LG	Lipase de *Penicillium camemberti*
STY-DVB-M	Poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado
PEG	Polietilenoglicol
PVA	Álcool polivinílico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 OBJETIVOS 19
3 REVISÃO DA LITERATURA 20
3.1 Biotecnologia e Biocatálise 20
3.2 Enzimas 20
3.3 Lipases 23
3.4 Imobilização de enzimas 26
3.5 Métodos para imobilização de enzimas 26
3.5.1 Adsorção 28
3.5.2 Ligação Covalente 29
3.5.3 Aprisionamento/Microencapsulamento 30
3.5.4 Ligações cruzadas (cross-linking) 30
3.6 Suportes para imobilização 31
3.7 Polímeros 32
3.8 Métodos de polimerização 33
3.8.1 Polimerização em massa 34
3.8.2 Polimerização em solução 34
3.8.3 Polimerização em suspensão 35
3.8.4 Polimerização em emulsão 36
3.9 Poli(estireno-co-divinilbenzeno) 37
3.10 Materiais Magnéticos 39
3.11 Compósitos magnéticos 41
3.12 Ésteres em cosmetologia 43
3.12.1 Biocatálise em cosmetologia 44
3.12.2 Síntese de ésteres catalisada por lipases 44
3.13 Biorreatores 45
3.13.1 Reator de tanque agitado 47
3.13.2 Reator de leito fixo e leito fluidizado 49
3.13.3 Reator de membrana 49
4 MATERIAIS E MÉTODOS 51
4.1 Materiais 51
4.1.1 Síntese dos suportes poliméricos 51
4.1.2 Reações de esterificação, imobilização e quantificação da atividade enzimática 51
4.1.3 Síntese do padrão cromatográfico de palmitato de isopropila 51
4.1.4 Enzimas 52
4.2 Métodos de análise 52
4.2.1 Atividade de esterificação 52
4.2.2 Determinação do teor de umidade 52
4.2.3 Quantificação do teor do palmitato de isopropila sintetizado 53

4.2.3.1 Síntese do padrão cromatográfico de palmitato de isopropila 53
4.2.3.2 Caracterização do palmitato de isopropila sintetizado por RMN ^{1}H e RMN ^{13}C 55
4.2.4 Acompanhamento das reações de esterificação 55
4.2.5 Produtividade 56
4.3 Métodos experimentais 56
4.3.1 Síntese da magnetita 56
4.3.2 Modificação da magnetita com ácido oleico 57
4.3.3 Purificação do Azobisisobutironitrila (AIBN) 58
4.3.4 Síntese do poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STY-DVB-M) 58
4.3.5 Densidade cristalina do derivado imobilizado 60
4.3.6 Influência do agente de suspensão e da agitação mecânica na polimerização em suspensão para obtenção do poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado 60
4.3.6.1 Análise granulométrica 61
4.3.7 Imobilização das lipases de *Candida rugosa* (LCR) *e Penicillium camemberti* (G) em suporte polimérico 61
4.3.8 Síntese do palmitato de isopropila 62
4.3.8.1 Preparação do substrato 62
4.3.8.2 Reações de esterificação do palmitato de isopropila conduzidas em frascos agitados 62
4.3.8.3 Síntese do palmitato de isopropila em biorreator descontínuo de tanque agitado 64
4.3.8.4 Síntese do palmitato de isopropila em reator descontínuo de leito fixo 65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 67
5.1 Estabelecimento do método de análise para determinação do teor do palmitato de isopropila 67
5.1.2. Desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação do palmitato de isopropila 69
5.2 Influência do agente de suspensão e da agitação mecânica na polimerização em suspensão para obtenção do poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado 71
5.3 Imobilização das lipases em suporte polimérico magnetizado e atividade de esterificação 76
5.4 Síntese do palmitato de isopropila realizada em frascos agitados 79
5.4.1 Desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STY-DVB-M na síntese do palmitato de isopropila 79
5.4.2 – Desempenho da lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M na síntese do palmitato de isopropila 85
5.5 Síntese do palmitato de isopropila conduzida em biorreator de tanque agitado 92
5.6 Síntese do palmitato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo 94
5.6.1 Síntese do palmitato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo em meio heptano 94
5.6.2 Seleção do solvente mais adequado para a síntese do palmitato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo 95
5.6.3 Síntese do palmitato de isopropila em meio isento de solvente conduzida em biorreator de leito fixo 97
5.7 - Comparação do desempenho de diferentes configurações de biorreatores na síntese do palmitato de isopropila em meio isento de solvente 103
6 CONCLUSÕES 107
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 109
REFERÊNCIAS 110

1 INTRODUÇÃO

A globalização e a competitividade do mundo moderno exigem que as indústrias operem seus processos com rendimento e produtividade cada vez maiores e em condições de desenvolvimento sustentável, de química verde, ou em sistemas de tecnologia limpa, sendo este um obstáculo a superar sem a disponibilidade de biocatalisadores adaptados a estas condições (POLSHRTTIWAR et al., 2011; VERMA; BARROW; PURI, 2013).

Processos que utilizam lipases como biocatalisadores são muito atraentes pela gama de possibilidades de aplicação dessa enzima, pois ela pode catalisar reações de esterificação, hidrólise e interesterificação com extrema facilidade, obtendo produtos de qualidade superior e com alto rendimento (TREVISAN, 2014). No entanto, algumas dificuldades são encontradas nesse tipo de processo, como por exemplo a recuperação do biocatalisador, a insolubilidade da enzima em alguns meios reacionais e a instabilidade enzimática. Para solucionar este problema, a imobilização de enzima é uma técnica que pode ser utilizada pois propicia diversos benefícios em relação à enzima na forma livre, como o aproveitamento da propriedade catalítica por um maior período de tempo; a possibilidade de operação do processo de forma contínua, proporcionando assim maior controle das variáveis do processo; e a facilidade de separação do biocatalisador dos produtos e dos substratos não convertidos. Além disso, a imobilização pode alterar as propriedades catalíticas da enzima, conferindo-lhe maior estabilidade térmica e ao pH, e redução da inibição tanto por substrato como pelo produto (DE CASTRO et al., 2010).

Atualmente, diversos materiais têm sido utilizados como suporte para a imobilização de enzimas. Híbridos poliméricos com partículas magnetizadas tem se mostrado bastante interessantes para esta aplicação, pois apresentam diversas vantagens de operação e bons resultados. Suas principais vantagens são: a) Alta área superficial específica, possibilitando maior disponibilidade para imobilizar enzimas e maior interação com o meio reacional; b) Alto carregamento enzimático, tornando as enzimas mais estáveis e com atividades biocatalíticas mais elevadas; c) Baixa resistência à transferência de massa, fazendo com que as enzimas imobilizadas sejam mais estáveis e reativas; d) Facilidade de separação das partículas magnetizadas, devido à possibilidade da utilização de um ímã externo, permitindo a preservação da enzima imobilizada em comparação aos métodos tradicionais de centrifugação e filtração; e e) Facilidade de uso/reuso em reatores enzimáticos, devido a facilidade de preparação e manuseio (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; VERMA; BARROW; PURI, 2013).

Processos bioquímicos catalisados por enzimas são geralmente realizados em biorreatores, equipamento onde ocorre a transformação da mistura reacional (constituída

do meio para conversão enzimática) nos produtos desejados em condições operacionais ótimas (pH, temperatura, etc), na qual o agente biológico possa expressar o máximo de sua atividade catalítica, visando a obtenção de elevadas conversões e produtividades. Enzimas imobilizadas tem sido cada vez mais utilizadas em biorreatores por apresentarem vantagens como a possibilidade de aplicação em processos enzimáticos de múltiplas etapas; obtenção de rendimentos e produtividades elevadas; manutenção da atividade enzimática por longos períodos de operação além da facilidade de separação dos produtos formados (PEREIRA JR., 2008).

O desempenho de qualquer biorreator depende de alguns fatores, dentre eles, destacam-se a agitação efetiva, para manter homogênea a distribuição do substrato no interior do reator e a tensão de cisalhamento branda, visto que tensões elevadas podem danificar a matriz de imobilização ou até mesmo desnaturar as enzimas presentes no biorreator (NAJAFPOUR, 2007).

Os tipos de reatores mais comumente utilizados são: reator de tanque agitado, leito fixo e fluidizado, sendo esses dois últimos os mais empregados por apresentarem condições de tensão de cisalhamento e colisões mais brandas (PEREIRA JR, 2008). A seleção do tipo de biorreator a ser utilizado empregando como catalisador enzimas imobilizadas, depende da análise dos seguintes fatores: a) Forma da enzima imobilizada, que pode ser partículas, membrana ou fibras; b) Natureza do substrato (solução, sólidos em suspensão, coloidal); c) Requisitos operacionais da reação, como controle de pH e temperatura; d) Cinética da reação, inibição por substrato, produto, ou ambos; e) Superfície catalítica por unidade de volume de reator; f) Características de transferência de massa interna e externa; g) Facilidade de substituição do biocatalisador e sua regeneração; h) Facilidade de operação e Custo da construção do biorreator (ZANIN; MORAES, 2014).

Este trabalho teve como objetivo sintetizar o palmitato de isopropila, empregando a rota enzimática a partir da utilização de lipase microbiana imobilizada em partículas de copolímero de estireno e divinilbenzeno, a partir de reações de esterificação. O palmitato de isopropila é um éster emoliente, muito utilizado na indústria cosmética para formulação de cremes, loções, filtros solares, antitranspirantes, maquiagens entre outros. É biodegradável, não tóxico e apresenta boa solubilidade em gordura, mantendo a maciez, a plasticidade, a hidratação e restauração da oleosidade da pele (GORCEA; LAURA, 2013; NISHAT; VIRENDRA, 2015).

2 OBJETIVOS

O objetivo principal do projeto foi sintetizar via rota enzimática o palmitato de isopropila, empregando como biocatalisador lipase microbiana imobilizada em partículas de copolímero de estireno e divinilbenzeno (STY-DVB) magnetizadas por co-precipitação de íons de Fe^{+2} e Fe^{+3}em meio básico. Este objetivo geral foi atingido mediante a execução dos seguintes objetivos específicos:

- Síntese das partículas de STY-DVB magnetizadas pela co-precipitação de íons de Fe^{+2} e Fe^{+3}em meio alcalino;

- Imobilização das lipases microbianas de *Candida rugosa* e de *Penicillium camemberti* no suporte de STY-DVB utilizando a técnica de adsorção física;

- Aplicação dos derivados imobilizados na reação de esterificação do ácido palmítico com isopropanol;

- Seleção dos parâmetros operacionais ideais do processo, como: concentração de biocatalisador, tempo de reação, razão molar entre os materiais de partida e solvente;

- Avaliação do desempenho dos derivados imobilizados na síntese do palmitato de isopropila em biorreatores de tanque agitado e leito fixo (em modo descontínuo);

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biotecnologia e Biocatálise

A sociedade contemporânea busca cada vez mais processos baseados no desenvolvimento sustentável, sendo necessário o conhecimento e a exploração consciente e efetiva dos recursos naturais. O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, e grande parte de suas atividades econômicas são realizadas por extrativismo ou pela utilização não sustentável de espécies nativas. Para alcançar o desenvolvimento sustável é necessário o conhecimento e o emprego da biotecnologia, sendo este um campo dinâmico, multidisciplinar e amplamente relacionado com a química verde, o que permite a união do economicamente viável com o ecologicamente correto (GONÇALVES; MARSAIOLI, 2013).

Dentre as diversas áreas da biotecnologia, destaca-se a catálise enzimática, sendo uma alternativa promissora para substituir as metodologias tradicionais. As enzimas são produzidas por tecnologia renovável utilizando biomassa vegetal, animal ou de microrganismos e podem ser aplicadas para catalisar diversas reações em temperatura ambiente sob pressão atmosférica, evitando a formação de subprodutos. Devido sua versatilidade, são utilizadas para a produção de diferentes produtos como detergentes, fármacos, bicombustíveis, ésteres e alimentos (GONÇALVES, MARSAIOLI, 2013).

Dentre as maiores motivações para que as indústrias e o meio acadêmico continuem investindo e pesquisando novas tecnologias enzimáticas estão o desenvolvimento de novos produtos, processos e serviços e o aperfeiçoamento dos já existentes, além do melhoramento contínuo dos processos convencionais, porém utilizando novas matérias primas e diferentes biocatalisadores (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005).

3.2 Enzimas

Enzimas em sua grande maioria são proteínas com peso molecular variando de 12.000 à 1.000.000, que possuem a finalidade de catalisar reações químicas e bioquímicas. Atuam de forma a acelerar a velocidade de reação com redução da energia de ativação, sem, no entanto, alterar a constante de equilíbrio. Possuem elevado poder catalítico, acelerando as reações químicas geralmente em um grau maior que os catalisadores sintéticos e inorgânicos, e alta especificidade para os seus respectivos substratos.

Geralmente atuam em meio aquoso sob condições amenas de pH, temperatura e pressão, porém também podem atuar em meio orgânico, como por exemplo em meio heptano (NELSON; COX, 2011; ZANIN; MORAES, 2014).

Nos seres vivos as enzimas são as principais responsáveis pelos processos bioquímicos, catalisando cada reação das centenas de etapas que degradam ou sintetizam as moléculas dos nutrientes e/ou estruturais, geralmente sacarídeos, proteínas e lipídios, conservando e transformando a energia química (NELSON; COX, 2011).

As enzimas industriais, utilizadas para sintetizar produtos de interesse comercial, são produzidas em sua maioria por microrganismos, pois possuem ampla diversidade catalítica e possibilidade da produção por processos fermentativos em grande escala, com regularidade e a simplicidade, embora também possam ser produzidas a partir tecidos animais e vegetais (BON et al., 2008).

A atividade catalítica das enzimas depende da integridade de sua conformação nativa, caso seja desnaturada essa atividade é geralmente perdida, sendo degradada em suas unidades de aminoácidos (NELSON; COX, 2011). Algumas enzimas necessitam de cofatores ou coenzimas para possuírem atividade catalítica. Os principais cofatores inorgânicos são metais tais como zinco, cobre, manganês, etc., e as coenzimas são compostos orgânicos quase sempre derivados de vitaminas (NELSON; COX, 2011).

As enzimas podem ser classificadas de acordo com os tipos de reações dos substratos que catalisam. O Quadro 3.1 mostra a classificação das enzimas de acordo com a Comissão das Enzimas da União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC).

Embora as vantagens catalíticas das enzimas sejam muitas, sua utilização em processos industriais tem sido limitada, devido principalmente à: (a) baixa estabilidade nas condições de operação; (b) elevado custo de obtenção da enzima, desde o isolamento até a purificação, e (c) dificuldade técnica e elevado custo para a separação do substrato e produto, ao final da reação. Estes fatores restringem o emprego de enzimas solúveis, principalmente em processos em batelada, pois ao final do processo, dependendo do produto almejado, pode ser necessário a realização de tratamentos que gerem variações de pH e temperatura, levando à desnaturação da enzima, provocando a perda da sua atividade catalítica e impedindo sua reutilização (ZANIN; MORAES, 2014).

Quadro 3.1 – Classificação das enzimas de acordo com a Comissão das Enzimas da União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC).

Classe	Ação catalítica	Subclasse	Observações
Oxidoredutases	Reações de oxidação-redução	Desidrogenases Oxidases Oxigenases Peroxidases	Requer co-substrato
Transferases	Reações de transferência de duas moléculas	-Transaminases -Quinases -Transaldolases -Transcetilases	Reação de dois substratos na qual um precisa ser ativado
Hidrolases	Reações de hidrólises de ligações covalentes	-Lipases -Fosfatases -Proteases -Amilases	Reação de dois substratos sendo um deles H_2O
Liases	Reações de clivagem de ligações não-hidrolíticas	-Aldolases -Fumarases -Carboxilases	Quando se tem um substrato há quebra de ligação. Quando se tem dois substratos há formação de ligação
Isomerases	Reações de isomerização	-Racemases -Epimerases -Cis-transisomerases. -Mutases	Reação de somente um substrato
Ligases	Reações de formação de ligações	Formadoras de ligações: -Carbono-oxigênio. -Carbono-enxofre. -Carbono-nitrogênio. -Carbono-carbono.	Requer ATP como co-substrato e dois substratos

Fonte: Adaptado (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005).

3.3 Lipases

Lipases são as enzimas responsáveis pela catálise da hidrólise de óleos e gorduras, além de catalisarem reações de esterificação, transesterificação e interesterificação, dependendo do tipo do substrato e das condições do meio ao qual está atuando. São as hidrolases (EC 3.1.1.3) mais usadas para reações de síntese orgânica, encontradas em abundância na natureza, estando presente nos animais, fungos, plantas e bactérias. (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005; SALIHU; ALAM, 2015). A catálise dessas reações é realizada pela tríade catalítica, presente nestas enzimas, composta pelos aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp), este último algumas vezes pode ser substituído por ácido glutâmico (Glu) (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005).

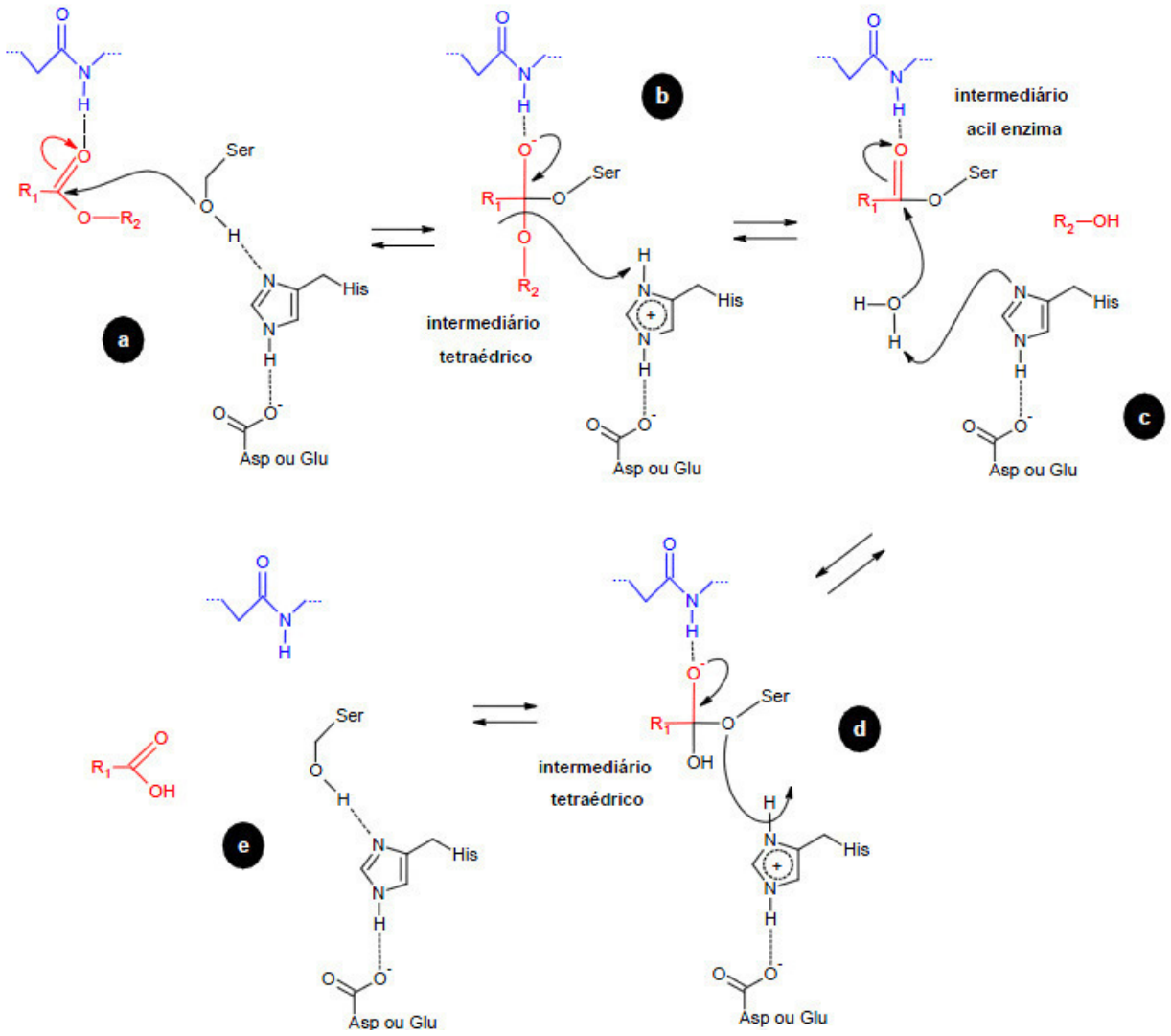
O mecanismo de hidrólise do substrato (Figura 3.1) ocorre em duas etapas. Inicialmente, ocorre um ataque do oxigênio hidrofílico do grupo hidroxila do resíduo serina ao carbono da carbonila ativado do éster do lipídeo, um intermediário tetraédrico é formado, sendo o O^- estabilizado pela interação com dois grupos peptídicos NH. A histidina doa um próton ao componente álcool que está deixando o substrato, restando então um intermediário covalente (enzima acilada), estando o componente ácido do substrato esterificado pelo resíduo serina da enzima. Uma molécula de água é ativada pelo resíduo histidina na vizinhança e o íon hidroxila resultante realiza um ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente. O resíduo histidina doa um próton ao átomo de oxigênio do resíduo serina ativo, a ligação éster entre serina e componente acila é rompida, liberando o produto acilado (TREVISAN, 2014).

Lipases de origem microbiana são amplamente utilizadas em diferentes aplicações industriais devido a diversas vantagens, tais como: sua grande versatilidade e disponibilidade, possuem grande diversidade em suas propriedades enzimáticas e especificidade de substrato, atuam em condições amenas de temperatura, pressão e pH, são estáveis em solventes orgânicos, na maioria das vezes não necessitam de cofatores e não catalisam reações paralelas, apresentam ampla quimiosseletvidade, regiosseletividade e esterosseletividade (ANDUALEMA; GESSESSE, 2012; TREVISAN, 2014). O Quadro 3.2 apresenta alguns dos principais microrganismos produtores de lipases.

Lipases são utilizadas industrialmente para a produção de queijos, transesterificação de triglicerídeos para síntese de biodiesel, ésteres para cosméticos, modificação de óleos e gorduras (síntese de monoglicerídeos, manteiga de cacau, etc.), em formulação de

detergentes e sabões, entre diversas outras utilizações (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005).

Figura 3.1 - Mecanismo de reação da hidrólise das ligações éster catalisada por esterases e lipases: (a) Ataque nucleofílico do hidroxilo da serina ao carbono suscetível da ligação éster, (b) intermediário tetraédrico, (c) intermediário acil enzima e ataque nucleofílico da água, (d) intermediário tetraédrico e (e) enzima livre. A tríade catalítica e a água estão representadas em preto, os resíduos do espaço oxianiónico em azul e o substrato em vermelho.



Fonte: (VAZ; CHOUPINA, 2012).

Quadro 3.2 – Microrganismos produtores de lipases.

Espécie	**Referência**
Acinetobacter junii	ANBU et al., 2011.
Aeromas sp.	LEE et al., 2003.
Aspergillus oryaze	CHEN et al., 1998.
Bacillus cereus	EL-SHAFEI; REZKALLAH, 1997.
Bacillus coagulans	EL-SHAFEI; REZKALLAH, 1997.
Bacillus sp.	WANG; SRIVASTAVA; SHEN, 1995.
Candida antartica	SHIMADA et al., 1999; ROBLES-MEDINA; GONZALEZ-MORENO; ESTEBAN-CERDAN, 2009.
Candida rugosa	JAEGER; REETZ, 1998.
Geotrichum sp.	LOTRAKUL; DARHMSTHITI, 1997.
Pseudomonas cepacia	KAIEDA; SAMUKAWA; FUKUDA, 2001.
Pseudomonas fluorescens	KOJIMA; YOKOE; MASE, 1994; RAJMOHAN; DODD; WAITES, 2002.
Pseudomonas mendocina	CHEN et al., 1998.
Thermotoga sp.	ADAMS; PERLER; KELLY, 1995; FISCHER et al., 1996.
Thermomyces lanuginosus	ROBLES-MEDINA; GONZALEZ-MORENO; ESTEBAN-CERDAN, 2009; CHEN et al., 1998.
Yersinia enterocolitica	GLOGAUER et al., 2011.

Fonte: (ANDUALEMA; GESSESSE, 2012).

De acordo com Buchholz (2005), o grande interesse em se utilizar lipases em síntese orgânica é devido às seguintes razões:

- São altamente ativas em solventes apolares;
- Frequentemente oferecem elevada estereosseletividade;
- Reagem com agentes nucleofílicos diferentes da água (aminas, álcoois, etc);
- Catalisam a maioria dos triglicerídeos.

Embora as lipases sejam versáteis, seu uso é restrito a um curto período de tempo e em temperaturas mais amenas, pois sua atividade catalítica é perdida por desnaturação ou inativação térmica; além disso lipases livres não podem ser reutilizadas em operações contínuas. Dessa forma, uma alternativa para a viabilização da sua utilização industrial seria a imobilização, técnica que oferece uma série de vantagens, como a permanência da atividade catalítica por um período prolongado de tempo; possibilidade de operação contínua do processo; facilidade de separação do produto final e da interrupção da reação;

maior estabilidade térmica e ao pH e redução da inibição tanto por substrato como pelo produto (ANDUALEMA; GESSESSE, 2012; GUISAN, 2006).

3.4 Imobilização de enzimas

Enzimas podem catalisar reações em diferentes estados: como moléculas livres em solução, em agregados com outros compostos e fixadas à superfícies. Enzimas imobilizadas são as que estão fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região do espaço com a retenção de sua atividade catalítica, podendo ser utilizada repetidamente e continuamente (GUISAN, 2006).

A imobilização visa à redução do custo global de um processo enzimático, visto que as enzimas imobilizadas oferecem vantagens em relação às solúveis, pois são mais estáveis termicamente; são facilmente separadas do meio reacional possibilitando sua reutilização; além de possibilitarem a operação contínua do processo, facilitando um maior controle das variáveis do processo, visto que o biocatalisador é retido no interior do biorreator (ZANIN; MORAES, 2014).

Para obtenção do êxito de um processo de imobilização é necessário que seu custo seja baixo e de fácil operação, que a meia-vida operacional da enzima seja elevada e apresente boa recuperação da atividade catalítica (BON et al., 2008; ZANIN; MORAES, 2014).

Algumas adversidades como, perda da atividade catalítica durante o processo de imobilização com a inativação parcial da enzima e redução da velocidade de reação, e consequentemente do rendimento do produto, podem surgir quando enzimas imobilizadas são utilizadas. Isto é decorrente do método selecionado para o processo de imobilização, que pode acarretar alterações de orientação de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, reduzindo assim, sua atividade catalítica. Assim, para um melhor aproveitamento do processo em questão, é necessário selecionar adequadamente o tipo de suporte e a técnica de imobilização, visando à obtenção de um biocatalisador ativo e estável.

3.5 Métodos para imobilização de enzimas

As enzimas podem ser imobilizadas por duas maneiras diferentes: 1) no interior de um suporte por meio da encapsulação e/ou aprisionamento e 2) na superfície de um suporte por meio de adsorção física reversível, ligações iônicas ou covalentes.

Para escolher um método de imobilização adequado, bem como sua robustez, devem ser observadas as condições do processo na qual o biocatalisador será aplicado, como por exemplo, o tipo de reação (que pode ser de hidrólise ou condensação), o sistema de reação (homogêneo ou heterogêneo), o meio reacional (hidrofóbico ou hidrofílico), as condições reacionais, o tipo de substrato e o custo da imobilização (CAO, 2005).

A imobilização de enzimas pode ser classificada em dois diferentes métodos: os reversíveis e os irreversíveis (ZANIN; MORAES, 2014). Os métodos irreversíveis consistem em interações mais fortes entre a enzima e o suporte, na qual a enzima não poderá se desprender do suporte sem que ocorra perda da sua atividade catalítica ou a destruição do suporte. Os tipos mais comuns são ligação covalente, microencapsulamento/ aprisionamento e ligações cruzadas (GUISAN, 2006).

Métodos reversíveis de imobilização de enzimas consistem em interações mais fracas, na qual a enzima poderá se desprender do suporte em condições amenas e adequadas. Esse método é muito atrativo, pois há a possibilidade de recuperação do suporte quando a atividade catalítica da enzima estiver muito reduzida, sendo possível a realização de uma nova imobilização. Os tipos mais comuns são adsorção, quelação e formação de ligação de dissulfeto (GUISAN, 2006).

O Quadro 3.3 ilustra os principais tipos de métodos de imobilização bem como suas classificações.

Quadro 3.3 – Principais métodos de imobilização de enzimas e suas classificações.

Método	**Tipo**
Irreversível	Ligação covalente
	Aprisionamento/ Microencapsulamento
	Ligações cruzadas
Reversível	Adsorção
	Quelação ou ligação metálica
	Formação de ligações dissulfeto

Fonte: (GUISAN, 2006).

3.5.1 Adsorção

Adsorção é o método mais simples para a imobilização de enzimas, pois baseia-se na sua fixação na matriz do suporte por meio de ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals ou interações hidrofóbicas, sendo realizada em condições simples e amenas de processo, preservando, geralmente, a atividade catalítica das enzimas. A imobilização pode ser revertida alterando as condições do meio que influenciam as forças de interação, tais como pH, força iônica, temperatura ou polaridade do solvente (CAO, 2005; GUISAN, 2006).

Por ser uma técnica simples, possui como vantagens a realização do processo em condições amenas; baixo custo; é reversível, possibilitando o reuso do suporte; apresenta elevada retenção da atividade catalítica da enzima, pois não há modificação química e não requer aditivos químicos (CAO, 2005; GUISAN, 2006; ZHANG, 2012).

Para uma boa adsorção da enzima ao suporte, algumas condições devem ser atendidas, entre elas a afinidade enzima-suporte é a mais importante. Esta condição é assegurada pela presença de grupos ativos específicos na matriz do suporte, que permitem a geração das interações enzima-suporte. Contudo, na ausência desses grupos, as interações podem ser ajustadas por meio da utilização de agentes intermediários (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

Este tipo de imobilização de enzima possui muitas subclasses, de acordo com o tipo de interação enzima-suporte, tais como adsorção física, ligação iônica, adsorção hidrofóbica e adsorção por afinidade (GUISAN, 2006). São utilizados praticamente todos os tipos de suportes (sintéticos, naturais, orgânicos e inorgânicos), porém as interações da enzima com a matriz do suporte é relativamente fraca podendo ocasionar a dessorção da enzima durante o processo (CAO, 2005; GUISAN, 2006).

A adsorção por ligação iônica é uma técnica simples e reversível, baseia-se nas interações iônicas entre os materiais de troca-iônica e a enzima. Possui como desvantagem a dificuldade em se determinar as condições nas quais a enzima permaneça fortemente ligada ao suporte e com sua atividade mantida (ADLERCREUTZ, 2012).

A adsorção hidrofóbica ocorre por meio das interações hidrofóbicas entre enzima-suporte. Mesmo não havendo formação de ligação química, as enzimas ficam imobilizadas na matriz do suporte, e a força de ligação entre o suporte e a enzima dependerá da hidrofobicidade de cada um. Alguns fatores podem interferir nesta técnica, tais como pH, concentração de sais e temperatura (GUISAN, 2006).

3.5.2 Ligação Covalente

Esta técnica baseia-se na formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte. Geralmente ocorre reação química entre os aminoácidos ativos localizados na superfície da enzima e grupos funcionas acoplados na superfície do suporte. Os aminoácidos residuais essenciais para a atividade catalítica não podem estar envolvidos na ligação entre a enzima e o suporte, sendo este um fator difícil de ser controlado durante o processo de imobilização em alguns casos (CAO, 2005; GUISAN, 2006).

Este método de imobilização é muito utilizado em processos de larga escala, principalmente em casos em que a enzima não pode estar presente no produto final, pois proporciona elevada estabilidade entre as ligações enzima-suporte, não ocorrendo difusão da enzima para o meio reacional (ZANIN; MORAES, 2014).

Uma variedade de processos foram desenvolvidos de acordo com os tipos de grupos funcionais disponíveis na matriz, tais como os métodos de acoplamentos, que são divididos em duas classes: a) ativação da matriz pela adição de um grupo funcional e b) modificação da matriz para produzir um grupo ativo. O processo de ativação é geralmente designado para gerar grupos eletrofílicos no suporte, que na etapa de acoplamento, reagirão com a parte nucleofílica da proteína (GUISAN, 2006).

De acordo com Cao (2005), algumas propriedades podem afetar a eficiência de uma imobilização por ligação covalente, tais como:

- Orientação da enzima;
- Natureza física do suporte (por exemplo, tamanho e formato da partícula e do poro);
- Natureza química do suporte;
- Natureza da ligação ou interação química (composição química da matriz);
- Propriedades do meio utilizado para acoplar as enzimas;
- Distribuição da enzima no suporte;
- Conformação da enzima antes e depois da imobilização;
- Número de ligações formadas entre a enzima e o suporte.

3.5.3 Aprisionamento/Microencapsulamento

Este método é baseado na oclusão da enzima em uma rede polimérica ou em uma micro cápsula, na qual ocorre a dispersão da enzima (solúvel ou insolúvel) em um meio fluídico (solução polimérica), seguida por um processo de solidificação, tornando a matriz insolúvel (CAO, 2005; GUISAN, 2006). A matriz retém a enzima, e permite a difusão de substratos e produtos de baixo peso molecular (ZANIN; MORAES, 2014).

A formação da matriz e a obtenção do biocatalisador podem ser conseguidos por métodos que utilizam interações químicas (ligações-cruzadas, polimerização), interações físicas (geletificação física) ou a combinação desses dois métodos (CAO, 2005). Diferentes materiais podem ser usados para aprisionar enzimas, tais como, gel, fibra de aprisionamento e microencapsulação. Estes podem ser preparados em formatos de pérolas, membranas, filmes, discos e fibras. As matrizes mais utilizadas são: poliacrilamida gel e alginato (CAO, 2005; GUISAN, 2006).

Este método possui como principais vantagens a elevada área superficial de contato entre o substrato e a enzima e a possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como principais desvantagens destaca-se a restrição de utilização destes biocatalisadores, pois geralmente só podem ser aplicados com substratos de baixo peso molecular; a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização; os possíveis efeitos de inibição por produtos ou substrato no interior da matriz porosa e a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação (ZANIN; MORAES, 2014).

3.5.4 Ligações cruzadas (cross-linking)

Este método de imobilização é caracterizado pela obtenção de uma enzima insolúvel, por meio de ligações cruzadas intermoleculares entre as moléculas da enzima solúvel, sem a presença de um suporte sólido (ZANIN; MORAES, 2014).

Neste método, o suporte e o agente de ligação estão ligados entre si em uma rede estrutural tridimensional. O agente ligante, geralmente glutaraldeído, está presente em pequenas proporções mássicas e/ou volumétricas, quando comparado com os suportes dos outros métodos de imobilização e com a quantidade de enzima utilizada, assim o biocatalisador resultante ocupa menor espaço no processo (GUISAN, 2006).

O biocatalisador obtido por esta técnica de imobilização apresenta elevada estabilidade da enzima imobilizada devido às fortes interações geradas, no entanto, pode ocorrer redução da atividade catalítica. Esta técnica também pode ser utilizada em combinação com outros métodos de imobilização, como por exemplo adsorção, visando melhorar a qualidade dos biocatalisadores (ZHANG, 2012).

3.6 Suportes para imobilização

Existe uma enorme variedade de suportes disponíveis para imobilização de enzimas, porém nem todos os suportes podem ser utilizados para imobilizar uma enzima específica, visto que o sucesso do processo de imobilização é conseguido quando algumas condições são satisfeitas. Dentre estas, uma boa afinidade entre a enzima e o suporte é essencial, o que geralmente é conseguida pela formação de grupos ativos específicos no suporte, por meio da utilização de agentes intermediários modificadores (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

Os suportes para imobilização são escolhidos de acordo com as suas propriedades, sendo que as mais desejáveis são: alta resistência mecânica e à compressão, biocompatibilidade, resistência à ataques microbianos, boa disponibilidade e baixo custo (GUISAN, 2006). Além disso o suporte deve ser quimicamente resistente tanto nas condições do processo de imobilização das enzimas, como também nas condições reacionais do processo, na qual o biocatalisador será empregado (BON et al., 2008).

As características físicas do suporte, tais como resistência mecânica, diâmetro médio da partícula, coeficiente de expansão e resiliência, são muito importantes para definir o tipo de reator e da operação a ser utilizada no processo (GUISAN, 2006). O Quadro 3.4 mostra a classificação dos suportes utilizados para imobilização de enzimas.

Quadro 3.4 – Classificação dos suportes: tipos e exemplos de materiais.

Classificação	Tipo	Exemplos
Orgânico	Polímeros naturais	• Polissacarídeos: celulose, agar, agarose, dextranas • Proteínas: colágeno, abumina • Carbono
	Polímeros sintéticos	• Poli(estireno-co-divinilbenzeno) • Poliacrialatos • Polimetacrilatos • Poliamidas • Poliacrilamidas
Inorgânico	Minerais naturais	• Bentonita • Silica
	Materiais processados	• Vidro (com e sem poros controlados) • Metais • Óxidos metálicos com poros controlados

Fonte: (GUISAN, 2006).

3.7 Polímeros

O termo polímero origina-se do grego, em que "poli" significa muitos e "mero" unidade de repetição. São macromoléculas compostas por muitas unidades de repetição de monômeros, ligadas entre si por ligações covalentes (CANEVAROLO JR, 2010). São caracterizados pela sua estrutura química, tamanho de cadeia e interações intra e intermoleculares. Possuem peso molecular entre 10^3 a 10^8, sendo que a maioria dos polímeros industrializados possuem peso molecular entre 10^4 a 10^6 (MANO; MENDES, 1999).

Os polímeros podem ser classificados de acordo com seu comportamento mecânico, que varia conforme sua estrutura química (tipo de monômero), tamanho de sua cadeia polimérica e do tipo de ligação covalente, sendo divididos basicamente em três tipos: borrachas (elastômeros), plásticos e fibras (CANEVAROLO JR, 2010). No entanto,

de acordo com Callister e Rethwisch (2012), nesta classificação ainda podem ser incluídas as espumas, as películas, os adesivos e os revestimentos.

Suas propriedades físicas dependem do comprimento de sua molécula, ou seja de sua massa molar, bem como da estrutura química dos monômeros presentes, pois estes estão relacionados com as interações intra e intermoleculares. Em função dos polímeros apresentarem diversos tamanhos de molécula e serem constituídos por diferentes monômeros, existem grandes diferenças em suas propriedades físicas (CANEVAROLO JR, 2010). Estão presentes em lugares distintos e com diferentes aplicações, tais como, nas plantas e nos animais como ácidos nucléicos e polissacarídeos, servindo como base para suas vidas (polímeros naturais); na construção civil estão presentes em tintas, concretos, isolamentos, em vigas de madeira e compósitos; em materiais domésticos estão presentes nos encanamentos, eletrodomésticos e automóveis. Enfim, os polímeros possuem diversas aplicações, podendo compor materiais bem simples até os materiais mais complexos utilizados na engenharia (CARRAHER JR., 2013).

Polímeros são denominados termoplásticos se possuírem a capacidade de se "amolecer" e serem remodelados quando submetidos a calor e pressão, e termorrígidos se decompuserem-se antes de "amolecerem" e serem remodelados. Em ambos os casos estes polímeros podem ser reciclados, porém os termoplásticos são mais facilmente processados pois em condições adequadas, de calor e pressão, conseguem ser remodelados (CARRAHER JR., 2013).

Se o polímero possuir somente repetições de um monômero específico em sua cadeia polimérica é denominado homopolímero, se possuir dois ou mais monômeros em repetição é denominado copolímero. A copolimerização é muito aplicada quando faz-se necessária a combinação de propriedades químicas e físicas em materiais específicos (CHANDA, 2006).

3.8 Métodos de polimerização

Para a produção de um determinado polímero é necessário a escolha de um método adequado que possibilite um bom controle de massa e de distribuição, bem como a facilidade de manuseio e processamento da massa polimérica formada. Os principais métodos de polimerização são: em massa, em solução, em suspensão e emulsão (CANEVAROLO JR, 2010).

3.8.1 Polimerização em massa

Polimerização em massa é a técnica mais simples de polimerização, na qual a mistura reacional é constituída essencialmente pelo monômero e, quando necessário, um iniciador solúvel ao monômero. Para que a reação ocorra é necessário o aquecimento do meio reacional, sendo que o progresso da síntese pode ser observado pelo aumento da viscosidade do meio (FRIED, 2003).

Sua principal vantagem é a obtenção de um produto puro com baixa quantidade de impurezas, e a principal desvantagem é o difícil controle da temperatura, visto que a reação de polimerização é exotérmica. Esse fator pode gerar pontos de superaquecimento no reator que instabilizará o crescimento da cadeia, aumentando a velocidade de término da reação, resultando em um polímero com ampla distribuição de massa molar (CANEVAROLO JR, 2010).

Este método apresenta facilidade e baixo custo de produção de moldagem para poucas peças, além de exibir excelentes qualidades elétricas e óticas (MANO; MENDES, 1999). Exemplos de materiais produzidos por essa técnica são: chapas de acrílicos de poli(metil-metacrilato) e poliuretano (CANEVAROLO JR, 2010; MANO; MENDES, 1999).

3.8.2 Polimerização em solução

Neste método o monômero e o iniciador são misturados à um solvente, devendo, inicialmente serem solúveis entre si. No entanto, com o decorrer da reação o polímero formado poderá ou não ser solúvel no meio reacional, caso seja solúvel, o produto final é uma solução do polímero no solvente, e normalmente é empregado nesta forma. Se o polímero sintetizado for insolúvel no meio, recebe a denominação de polimerização em lama ou com precipitação, e neste caso, o polímero é separado do meio reacional, seco e granulado (CANEVAROLO JR, 2010).

Neste tipo de polimerização a escolha do solvente é muito importante, devendo apresentar as seguintes características: aumentar a capacidade total de calor sem contribuir para a geração de calor; ser um diluente inerte; facilitar a mistura dos componentes do meio, reduzindo a taxa de aumento da viscosidade com o decorrer da reação de polimerização (FREID, 2003).

Dentre as vantagens deste método, destacam-se a boa transferência de calor e homogeneização da temperatura e a facilidade de purificação do polímero. Como desvantagens, estão a utilização de solventes, que são tóxicos e nocivos ao homem e ao meio ambiente, além da elevação do custo de produção. Geralmente são reações mais lentas devido a diluição dos monômeros, e os reatores utilizados possuem maiores dimensões, ocasionando baixo rendimento operacional. Poliolefinas, polibutadieno e resinas de poli-fenol-formaldeídos são produzidas por meio deste método (CANEVAROLO JR, 2010; MANO; MENDES, 1999).

3.8.3 Polimerização em suspensão

Nesse tipo de polimerização, o iniciador é previamente dissolvido no monômero e em seguida adicionado à uma solução aquosa contendo o agente de suspensão. Iniciada a agitação do meio, o agente de suspensão dispersará o monômero em forma de pequenas gotas, estabilizando-as, evitando a coalescência entre elas. Como produto final são obtidas pérolas porosas com dimensões de 0,05 a 0,25 mm, que devem ser lavadas e secas para posterior utilização (CANEVAROLO JR, 2010).

Os iniciadores mais empregados nesta técnica de polimerização são, principalmente, peróxidos (peróxidos de benzoíla, diacetil, lauril, e terc-butil e, em alguns casos, compostos do tipo azo (Azobisisobutironitrila - AIBN) e iônicos (alquilas de alumínio e antimônio, cloreto de titânio e crómio, e alguns tipos de óxidos) (FRIED, 2003).

Alguns fatores podem influenciar tanto na qualidade do produto final como também no tamanho das partículas sintetizadas por esta técnica (JAHANZAD; SAJJADI; BROOKS, 2005; MACHADO, 2000; TADROS, 1993; VIVALDO-LIMA et al., 1997). Dentre eles podem ser citados:

a) Concentração do agente de suspensão - previnem a coalescência das gotas de polímero e posteriormente, quando o efeito gel torna-se pronunciado, estabilizam as partículas, evitando que ocorra a coalescência;

b) Agitação - quanto maior a frequência de agitação, maior será a “quebra” das gotas, favorecendo assim a formação de gotas menores, e consequentemente partículas poliméricas menores;

c) Concentração de iniciador - tem grande influência na massa molar e distribuição do tamanho das partículas do polímero. Com o aumento na concentração de iniciador a taxa de polimerização aumenta e as cadeias poliméricas produzidas possuem menor tamanho (menor massa molar), além disso a alta taxa de polimerização contribui com o aumento da viscosidade do meio e propicia o mecanismo de coalescência;

d) Temperatura - o tamanho das partículas aumenta com o aumento da temperatura, pois a taxa de polimerização é maior, contribuindo com o aumento na viscosidade reacional e para que o mecanismo de coalescência seja pronunciado.

Como vantagens desta técnica têm-se a substituição de solventes por água, o fácil controle da temperatura, a obtenção de um polímero com elevado peso molecular e a facilidade de separação do meio reacional. Uma das desvantagens deste método é que para a obtenção de um produto homogêneo e uniforme é necessário manter uma agitação contínua, regular e vigorosa, além da dificuldade de remoção do monômero e do agente de suspensão residuais (MANO; MENDES, 1999).

Poliestireno, poli(cloreto de vinila) e poli(metacrilato de metila) são exemplos de polímeros produzidos por polimerização em suspensão (CANEVAROLO JR, 2010; MANO; MENDES, 1999).

3.8.4 Polimerização em emulsão

A polimerização em emulsão é muito utilizada comercialmente para a produção de uma ampla variedade de polímeros. Em geral, o sistema reacional é constituído dos seguintes componentes: monômero(s), meio de dispersão, agente emulsificante, iniciador solúvel em água, e, eventualmente, um agente de transferência. A água atua tanto como meio de dispersão, no qual os componentes estão dispersos pelo agente emulsificante, quanto como meio de transferência de calor (FRIED, 2003).

Neste método o agente emulsificante (surfactante) é adicionado à água sob agitação vigorosa, onde serão formadas micelas, em seguida o monômero é adicionado, sendo que parte dele ficará em forma de gotas, e parte penetrará nas micelas (região hidrofóbica). Posteriormente será adicionado o iniciador, que deve ser solúvel em água, para evitar a polimerização nas gotas de monômeros e ocorrer preferencialmente nas micelas. Com o decorrer da reação, o polímero será formado nas micelas, reduzindo a

concentração de monômero, gerando uma pressão osmótica que forçará o deslocamento do monômero presente na forma de gotas para as micelas, dando prosseguimento à polimerização. O produto final obtido é um pó fino com granulometria da ordem de 1 a 10 micrômetros (CANEVAROLO JR, 2010). Monômeros tais como estireno, acrilatos , metacrilatos, cloreto de vinila, butadieno, e cloropropeno são utilizados na polimerização em emulsão por apresentarem baixa solubilidade em água (FRIED, 2003).

As vantagens deste método são a utilização de água como meio dispersante, facilidade de homogeneização, poucas reações laterais e obtenção de um polímero de elevado peso molecular. Como desvantagens estão a necessidade de um agente coagulante para precipitar o polímero, a dificuldade de purificação do polímero e a necessidade de iniciador hidrossolúvel (MANO; MENDES, 1999).

Esta técnica é muito empregada para a produção de látex utilizado em tintas residências à base de poli(acetato de vinila), poli(estireno-co-butadieno) e poli(cloreto de vinila) (CANEVAROLO JR, 2010; MANO; MENDES, 1999).

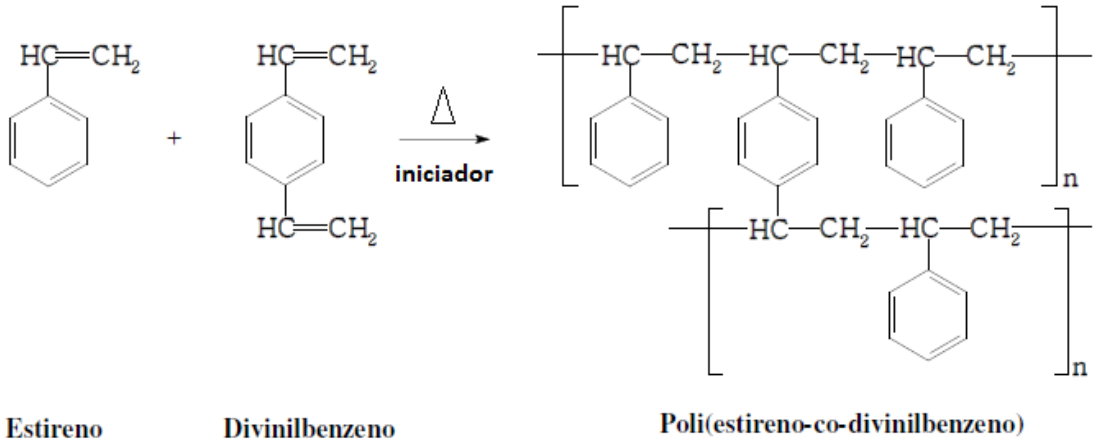
3.9 Poli(estireno-co-divinilbenzeno)

Poli(estireno-co-divinilbenzeno) é composto por monômeros de estireno e divinilbenzeno, obtido pelo método da polimerização em suspensão, normalmente com partículas entre os tamanhos de 0,1 a 0,15 mm. Possui alto valor agregado e pode ser aplicado em separação cromatográfica, resinas de troca iônica e suporte para imobilização de enzimas (JAHANZAD; SAJJADI; BROOKS, 2005; LIMA, 2013). A Figura 3.2 ilustra a formação do poli(estireno-co-divinilbenzeno).

O poli(estireno-co-divinilbenzeno) pode apresentar características do tipo gel, não possuindo poros permanentes, e consequentemente não sendo eficiente na adsorção de macromoléculas, como também apresentar características do tipo macroporoso, com poros permanentes, com aplicações mais amplas (GARCIA-DIEGO; CUELLAR, 2005; LIMA, 2013). Nesse último caso, pode ser utilizado como suporte para imobilização de enzimas, devido a sua grande área específica e diâmetro médio de poro, e alto grau de hidrofobicidade em comparação com outros suportes poliméricos que também possuem estireno em sua composição (CIRILO et al., 2015).

O Quadro 3.5 ilustra alguns exemplos de trabalhos que utilizaram o poli(estireno-co-divinilbenzeno) como suporte para imobilização de lipases.

Figura 3.2 - Esquema representativo da formação do Poli(estireno-co-divinilbenzeno) a partir dos monômeros de estireno e divinilbenzeno.



Fonte: (BENTO, 2015).

Quadro 3.5 - Utilização do poli(estireno-co-divinilbenzeno) como suporte para imobilização de lipases.

Lipase	Método de imobilização	Produto de interesse	Referência
Burkholderia cepacia	Adsorção física	Biodiesel a partir de óleo de soja e etanol (transesterificação)	CASTIGLIONI et al., 2016.
Candida rugosa	Adsorção física	Butirato de butila a partir de butanol e ácido butanóico (esterificação)	OLIVEIRA et al., 2000
Candida rugosa	Adsorção física	Butirato de butila a partir de butanol e ácido butanóico (esterificação)	SANTOS; DE CASTRO, 2006.
Candida rugosa	Adsorção física	Diversos ésteres butílicos (esterificação)	SANTOS et al., 2007.
Thermomyces lanuginosus	Adsorção física	Butirato de butila a partir de butanol e ácido butanóico (esterificação)	MARTINS et al., 2013.
Thermomyces lanuginosus	Ligação covalente	Biodiesel a partir de oléo de canola e metanol (transesterificação)	DIZGE; KESKINLER; TANRISEVEN, 2009.

Fonte: Próprio autor.

Bento et al. (2017) utilizou esse mesmo copolímero magnetizado com íons de ferro para imobilizar a lipase de *Candida rugosa* por adsorção física, visando à produção do butirato de butila via esterificação. O biocatalisador magnetizado sintetizado apresentou

bom desempenho, alcançando conversões entre 89-94% nas reações de esterificação, revelando tempo de meia vida de $t_{1/2}$=52 dias na estabilidade operacional. Além disso, a imobilização aumentou a estabilidade térmica da lipase em 50 vezes em relação à sua forma livre.

3.10 Materiais Magnéticos

As propriedades magnéticas de um material são devidas ao momento magnético dos elétrons de seus átomos, e se originam das camadas eletrônicas parcialmente preenchidas dos átomos dos metais de transição. Destaque especial é dado aos metais de transição da série do ferro (elementos com a camada 3d semi-preenchida) Fe, Co, e Ni, e aos metais de terras raras ou elementos com a camada 4f semi-preenchida tais como, Nd, Sm, Gd e Dy.

Há duas origens de momento magnético atômico, os associados com o momento orbital dos elétrons e os associados ao spin eletrônico. O momento magnético dos metais de transição da série do ferro e dos não-metais (tais como seus óxidos Fe_3O_4 e NiO) são dados pelo spin eletrônico, e seu momento é igual ao número de spins desemparelhados (CULLITY; GRAHAN, 2009; LIU, 2006).

O comportamento macroscópico de um material magnético pode ser classificado em diamagnético, paramagnético e ferromagnético, de acordo com diferentes parâmetros magnéticos (JILES, 1998).

Os materiais diamagnéticos, são materiais cujo seu magnetismo responde contrariamente ao campo magnético aplicado, ou seja, possui magnetismo negativo. O efeito de um campo magnético aplicado numa única órbita de eletron é o de reduzir a corrente efetiva da órbita, de modo a produzir um momento magnético oposto ao campo aplicado. Exemplos de materiais diamagnéticos são: cobre, prata, ouro e bismuto(CULLITY; GRAHAN, 2009; JILES, 1998).

Os materiais paramagnéticos, são materiais com magnetização fraca, sendo constituídos por átomos ou moléculas aos quais possuem o mesmo momento magnético, ou seja, quando não estão sob o efeito de um campo magnético, os momentos atômicos estão em sentidos aleatórios e cancelam-se uns aos outros, então a magnetização resultante é nula. Porém, quando estão sob efeito de um campo magnético, há a tendência de cada momento atômico se direcionar paralelamente ao campo magnético aplicado; se forças opostas não estiverem agindo ocorrerá o completo alinhamento dos momentos atômicos e

o composto adquirirá um grande momento no sentido do campo magnético. No entanto, a agitação térmica dos átomos é contrária à essa tendência e mantém os momentos atômicos direcionados aleatoriamente, resultando em um alinhamento parcial na direção do campo magnético, e consequentemente magnetização fraca. Além disso, o incremento da temperatura pode intensificar ainda mais o efeito de randomização dos momentos atômicos, resultando em uma magnetização ainda mais fraca. Exemplos de materiais paramagnéticos: alumínio, platina, manganês e vários sais de metais de transição tais como, cloretos, sulfatos e carbonatos de manganês, cromo, ferro e cobre (CULLITY; GRAHAN, 2009; JILES, 1998).

Os materiais ferromagnéticos são os materiais magnéticos mais utilizados, pois possuem a habilidade de reter a magnetização, agindo como fonte de campo magnético. Dentre eles estão o ferro, cobalto, níquel e alguns metais raros e suas ligas (CULLITY; GRAHAN, 2009; JILES, 1998).

A magnetita foi o primeiro material magnético conhecido pelo homem, muito comum em rochas ígneas, na qual ocorre naturalmente na forma de óxido de ferro Fe_3O_4. É o material mineral magnético mais comum, componente essencial da pedra-ímã, classificado como ferromagnético contendo íons de ferro nos estados de oxidação 2^+ e 3^+.

Atualmente a magnetita é utilizada como minério de ferro, cimento, toner (tinta), em ferrofluidos e para a produção de materiais híbridos magnéticos (COEY, 2010; CULLITY; GRAHAN, 2009). Pode ser sintetizada por diversas técnicas de produção tais como, a decomposição térmica redutiva, pelo método da pirólise sol-gel, pela técnica hidrotérmica, pela microemulsão e pela co-precipitação, sendo esta última a técnica mais difundida e de baixo custo, devido à sua simplicidade e eficiência para a preparação de vários materiais de estado sólido de interesse. Esta técnica consiste na preparação de uma solução aquosa de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em uma solução básica, gerando as nanopartículas de óxido de ferro (BARRETO et al., 2012; BENTO, 2015).

Nos últimos anos, partículas magnéticas compostas por óxidos de ferro, têm atraído muito interesse devido as suas propriedades multifuncionais, tais como, biocompatibilidade, superparamagnetismo, pequeno tamanho e baixa toxicidade (REN et al., 2011). Além disso, podem ser empregadas como matrizes para o preparo de biocatalisadores, devido sua facilidade de recuperação do meio reacional (GUISAN, 2006).

3.11 Compósitos magnéticos

Os compósitos magnéticos são formados basicamente por uma matriz polimérica e cargas magnéticas, geralmente obtidas da magnetita, e apresentam forte propriedade magnética e baixa toxicidade, além de fácil obtenção. Compósitos magnéticos e/ou suportes magnéticos vêm obtendo destaques em diferentes aplicações nas áreas biomédicas, físicas e biotecnológicas, sendo muito utilizadas para imobilização de proteínas, enzimas e drogas; diagnósticos por imagem; imunoensaios; separação magnética de células e sua purificação e liberação controlada de fármacos (BENTO, 2015; DUSSÁN; CARDONA; GIRALDO, 2012).

As matrizes dos principais compósitos magnéticos, utilizados como suportes para imobilizar enzimas, são geralmente polímeros sintéticos, ou diferentes tipos de polissacarídeos tais como alginato, celulose, ou agarose (GUISAN, 2006).

Compósitos magnéticos apresentam diversas vantagens para a imobilização de enzimas, dentre elas: a) Elevada área superficial específica, possibilitando maior disponibilidade para imobilizar enzimas e maior interação com o meio reacional; b) Elevado carregamento enzimático, tornando as enzimas mais estáveis e com maiores atividades biocatalíticas; c) Baixa resistência à transferência de massa, fazendo com que as enzimas imobilizadas sejam mais estáveis e reativas; d) Facilidade de separação das partículas magnetizadas, devido a possibilidade da utilização de um ímã externo, permitindo a preservação da enzima imobilizada em comparação aos métodos tradicionais de centrifugação e filtração; e) Facilidade de uso/reuso em reatores enzimáticos, devido a facilidade de preparação e manuseio (DUSSÁN; CARDONA; GIRALDO, 2012; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; VERMA; BARROW; PURI, 2013). Outra vantagem seria sua utilização para aplicação em reatores de fluxo contínuo utilizando leito fluidizado por meio da aplicação de campo magnético externo (BRUNO; LIMA FILHO; DE CASTRO, 2008).

O Quadro 3.6 apresenta alguns trabalhos que utilizaram polímeros magnéticos para a imobilização de lipases.

Quadro 3.6 – Trabalhos que utilizaram polímeros magnéticos para imobilização de lipases empregando magnetita (Fe_3O_4).

Matriz polimérica	Lipase	Resultados	Referência
Polímero grafitizado à base de metacrilato de glicidila e cloreto de 2-metacriloxietil trimetil amônio.	*Candida rugosa*	Foi verificada uma atividade residual do biocatalisador de 70% após 6 ciclos da reação de hidrolise do azeite de oliva.	YONG et al., 2008.
Poli(ureia-uretano)	*Candida antarctica*	O desempenho do biocatalisador foi testado nas sínteses do oleato de etila, oleato de geranila e propionato de geranila, obtendo-se 100% de conversão para todos os ésteres.	CHIARADIA, et al., 2016.
Poli(alil glicidil éter-co-etilenoglicol dimetacrilato)	*Candida rugosa*	Foram sintetizados ésteres a partir de fitoesteróis e ácido linoleico, atingindo-se conversão de 93,5%.	ZHENG et al., 2012.
Poli(metilmetracrilato -co-divinilbenzeno)	*Mucor javanicus*	O biocatalisador apresentou atividade de esterificação de 335,10 $U.g^{-1}$ na síntese do oleato de glicerila e 95% de atividade catalítica residual após 30 ciclos.	MENG et al., 2013.
Poli(acetato de vinilaco-divinilbenzeno)	*Candida cylindracea*	Foi realizado o teste de estabilidade operacional do biocatalisador e após 6 ciclos de reação de hidrolise do azeite de oliva, a atividade catalítica residual foi de 74%.	GUO; BAI; SUN, 2003.
Poli(estireno-co-divinilbenzeno)	*Candida rugosa*	O desempenho do biocatalisador foi avaliado na síntese do butirato de butila em meio heptano, obtendo-se conversão total em algumas condições testadas.	BENTO et al., 2017

Fonte: Próprio autor.

3.12 Ésteres em cosmetologia

A humanidade vem se preocupando e valorizando cada vez mais a estética e a beleza, seja por vaidade ou por questões de saúde. Atualmente o culto à beleza se intensificou de uma tal maneira que alterou de forma marcante a indústria cosmética, devido à grande procura por produtos cosméticos. O aumento da renda, da qualidade de vida e da longevidade da população foram os principais fatores que aumentaram a demanda por cosméticos. Além disso, o desenvolvimento da publicidade e propaganda também contribuem de forma significativa para que a população desperte maior preocupação com esse segmento (CUSTODIO, 2014).

De acordo com a ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético), nos últimos 18 anos o mercado brasileiro apresenta um crescimento acelerado, numa média de 9,8% ao ano, estando entre os países maiores consumidores de produtos cosméticos no mundo (ABIHPEC, 2014).

Nesse contexto, cabe ressaltar que enzimas podem ser incorporadas às formulações cosméticas em diferentes produtos visando diversas aplicações, como por exemplo, em cremes antiacne, esfoliantes, na higiene oral, tintura capilar, tratamentos anticaspa, cremes antienvelhecimento cutâneo, etc. No entanto, para esta aplicação, a enzima deve ter sua atividade catalítica mantida até o prazo de validade do produto, além de não ser prejudicial ao corpo humano (BON et al., 2008).

O mercado cosmético é dividido em cinco grandes segmentos: cuidados com a pele (*skincare*), cuidados com cabelos, maquiagem, fragrâncias e produtos de higiene. Dentre todas as classes de compostos orgânicos utilizados na composição de produtos cosméticos, os ésteres têm uma ampla gama de aplicação, como: emolientes em cremes, surfactantes em shampoos, antioxidantes em cremes *antiaging* e fragrâncias em perfumes e sabores em batons. Ésteres emolientes, formados por cadeias carbônicas longas, são uma das classes mais importantes desse setor, devido sua não toxicidade, biodegradabilidade e boa solubilidade em gordura, responsáveis por manter a maciez, plasticidade, hidratação e restauração da oleosidade da pele, sendo muito empregados em formulações de *skincare* (GORCEA; LAURA, 2013; KHAN; RATHOD, 2015; NISHAT; VIRENDRA, 2015).

3.12.1 Biocatálise em cosmetologia

Atualmente a maioria das indústrias produtoras de ésteres utilizam processos que empregam temperaturas elevadas (150-240°C) e catalisadores ácidos e básicos. Porém esse tipo de processo gera um produto com qualidade inferior, que pode conter componentes agressivos para a pele e à saúde humana, sendo necessárias etapas posteriores de purificação, acarretando em um maior custo de produção (KHAN; RATHOD, 2015).

A globalização e a competitividade do mundo moderno exige que as indústrias operem seus processos com rendimentos e produtividade cada vez maiores e em condições e/ou sistemas de tecnologia limpa, principalmente devido a demanda social por produtos mais naturais (NISHAT; VIRENDRA, 2015).

Nesse contexto, a aplicação de enzimas para a produção de ésteres é uma excelente alternativa, visto que os processos enzimáticos empregam temperaturas mais amenas (entre 30-70°C) e baixa pressão. Além disso, enzimas são estereosseletivas, o que acarretará a síntese de um produto mais puro, sem coloração e odores, podendo ser classificados como processos que utilizam a "química verde", atendendo as exigências do mercado consumidor contemporâneo (KHAN; RATHOD, 2015).

3.12.2 Síntese de ésteres catalisada por lipases

Ésteres podem ser sintetizados por meio de reações de esterificação, transesterificação (alcoólise e acidólise) e interesterificação. Quando obtidos por via enzimática, são catalisados por lipases. A maior parte dos ésteres sintetizados por biocatálise tem como finalidade, aplicações para biodiesel, biolubrificantes, emulsificantes, essências e emolientes. Industrialmente, os emolientes são a principal classe de éster obtida por essa rota (KHAN; RATHOD, 2015; TODERO et al., 2015).

O palmitato de isopropila é um éster de cadeia ramificada contendo 19 átomos de carbono no total, é inodoro, incolor e transparente, possui toque seco, é não oleoso, e é doador de consistência. Sua longa cadeia carbônica faz com que este éster apresente propriedades hidrofóbicas, emolientes, lubrificantes e dispersantes. É um auxiliar de média espalhabilidade e um excelente diluente para óleos vegetais e minerais (SMITH, 1995).

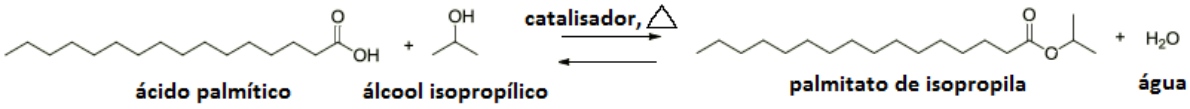
Devido às essas propriedades, este éster é aplicado em diversas formulações cosméticas, tais como, cremes, loções, maquiagens, óleos de banho, desodorantes, protetores solares e batons. Em batons e maquiagens é empregado com o objetivo de

aumentar a solubilidade dos corantes e pigmentos; já para formulações de filtros solares é um excelente solvente, pois possui baixo ponto de turbidez e auxilia na penetração cutânea. Geralmente está presente em concentrações que variam de 1 a 10% na composição desses produtos, dependendo do tipo de aplicação específica (SMITH, 1995).

Também pode ser empregado na fabricação de fármacos, como por exemplo na composição de insulina, de acordo com NANODERMA LTD (2010), e na composição de organogéis, conforme mencionado por Willimann (1992). Em ambos os casos, o palmitato de isopropila atua como um agente de permeação transdérmica. Há diversos trabalhos na literatura que relatam a síntese deste éster empregando a via enzimática por meio de diferentes fontes de lipases imobilizadas (GARCIA et al., 1996; GARCIA et al., 1999; KEE; HASSAN; RAMANCHANDRAN, 1999; LIESE et al., 2006; SCHORKEN; KEMERS, 2009).

O palmitato de isopropila pode ser obtido por meio da reação de esterificação entre o ácido palmítico (ácido hexadecanóico) e o álcool isopropílico, necessitando de um catalisador químico ou enzimático, conforme ilustrado na Figura 3.3.

Figura 3.3 – Esquema representativo da formação de palmitato de isopropila a partir da esterificação do ácido palmítico e álcool isopropílico.



Fonte: Próprio autor.

3.13 Biorreatores

Biorreator é um equipamento onde transformações bioquímicas são catalisadas por enzimas ou células microbianas. A mistura reacional, constituída de meio (de cultivo ou para conversão enzimática) e agente biológico, será processada em biorreatores, onde deverão ser mantidas as condições ótimas para o agente biológico expressar o máximo de sua atividade catalítica, seja através do metabolismo da célula ou da reação enzimática (PEREIRA JR., 2008).

A princípio, enzimas na forma livre e solúvel só poderiam ser empregadas em reatores descontínuos, contudo, com o avanço das técnicas de imobilização, surge a

possibilidade em se utilizar outros tipos de reatores, inclusive os reatores de operação contínua. Dessa forma, a utilização de enzimas imobilizadas em diferentes configurações de biorreatores têm sido muito empregadas (SCHMIDELL, 2001).

Os reatores bioquímicos são baseados nos reatores químicos tradicionais, porém com algumas modificações para otimizar a operação e a conversão dos reagentes. Ressalta-se que reatores ideais, discutidos pela maioria dos autores, podem apresentar comportamento diferente de reatores reais na prática (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005).

A seleção do tipo de biorreator a ser utilizado com enzimas imobilizadas depende da análise dos seguintes fatores: a) Forma da enzima imobilizada, que pode ser partículas, membrana ou fibras; b) Natureza do substrato (solução, sólidos em suspensão, coloidal); c) Requisitos operacionais da reação, tais como controle de pH e temperatura; d) Cinética da reação, inibição por substrato, produto, ou ambos; e) Superfície catalítica por unidade de volume de reator; f) Características de transferência de massa interna e externa; g) Facilidade de substituição do biocatalisador e sua regeneração; h) Facilidade de operação e i) Custo da construção do biorreator (ZANIN; MORAES, 2014)

Para minimizar custos, a escolha do reator adequado ao processo deve seguir os seguintes aspectos técnicos e econômicos, descritos por Buchoolz (2005):

- Elevada produtividade catalítica, ou seja alta eficiência e boa estabilidade operacional;
- Elevado rendimento de produto (em geral maior que 90%), com elevada concentração e pureza, ou seja baixa concentração de subprodutos que são difíceis de serem separados, e uso de poucos aditivos;
- Baixo custo de manufatura e manutenção, pouco espaço requerido, podendo ser preferencialmente um reator ou poucos reatores com pequenos volumes, utilizando o mínimo de equipamentos possíveis (válvulas, instrumentação, etc.).

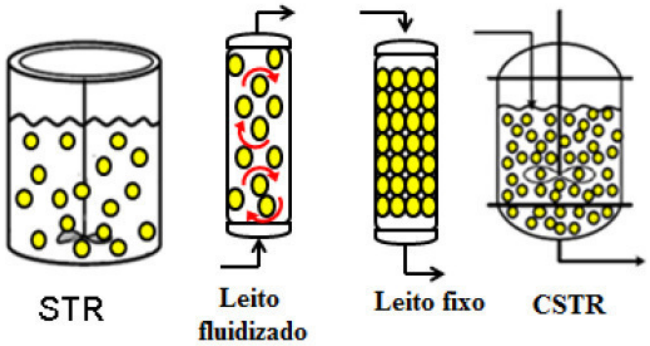
Na maioria dos casos, esses requisitos tendem a ser contraditórios, visto que, elevada conversão e produtividade catalítica são mais facilmente alcançadas em reatores em série que somente em um único reator, o que acarreta em maior custo de manufatura e manutenção, pois requer maior espaço e instrumentação de controle. Contudo, uma decisão economicamente viável pode ser encontrada, por meio de levantamento de informações

apropriadas, cálculos e experimentos previamente realizados (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005).

Os tipos de biorreatores mais comumente utilizados são: biorreator de tanque agitado, biorreator tubular de leito fixo ou fluidizado, e biorreatores de membranas, sendo os tubulares os mais empregados por apresentarem condições de tensão de cisalhamento e colisões mais brandas. No entanto, em alguns processos pode ocorrer a combinação destes tipos reatores, sendo realizadas experimentações e modelagens matemáticas para identificar a configuração ótima do processo (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005).

A Figura 3.4 ilustra os principais tipos de reatores utilizados com enzimas imobilizadas.

Figura 3.4 – Tipos de reatores utilizados com enzimas imobilizadas.



Fonte: (ZANIN; MORAES, 2014).

A conversão adequada do substrato depende das seguintes condições: quantidade e atividade do biocatalisador (baseada na taxa máxima da velocidade de reação V_{max}); o tempo de reação (t) ou tempo espacial (τ) e a concentração de substrato [S] (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005).

3.13.1 Reator de tanque agitado

Os reatores de tanque agitado (STR) são os mais estudados e utilizados industrialmente, pois apresentam versatilidade e fornecem bons resultados para uma grande gama de bioprocessos. Dentre estes está a indústria farmacêutica, que utilizam STR em seus processos, pois diferentes substâncias podem ser produzidas no mesmo biorreator durante seu tempo de vida útil, e os investimentos para a construção e aquisição destes equipamentos são normalmente recuperados na comercialização do primeiro produto.

Apesar de sua flexibilidade, os biorreatores do tipo tanque agitados apresentam algumas desvantagens, como a demanda de grande aporte de energia para a agitação mecânica, são de difícil escalonamento e precisam ser cuidadosamente projetados para produzir uma mistura adequada. Industrialmente, o reator de tanque agitado é utilizado em dois modos de operação: contínuo e descontínuo (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER 2005; PEREIRA JR, 2008).

O biorreator de tanque agitado descontínuo consiste em um vaso cilíndrico com um motor no eixo central que suporta um ou mais agitadores. Este tipo de reator pode ser empregado em processos nos quais, finalizada a reação, a enzima imobilizada pode ser separada da mistura final com relativa facilidade (por exemplo, filtração, decantação) (SCHMIDELL, 2001).

O reator ideal descontínuo de tanque agitado é caracterizado pela alteração nas condições do meio reacional a todo instante do processo, já que a concentração do substrato é reduzida e as concentrações de produtos e sub-produtos são aumentadas em função do tempo de reação. O principal problema desta forma de operação é decorrente do fenômeno de inibição, tanto pelo substrato quanto pelo produto, porém possui a vantagem de possuir baixo custo e fácil controle da operação (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005; PEREIRA JR., 2008).

No biorreator contínuo de tanque agitado (CSTR) há entrada e saída contínua de fluido, e eventualmente uma certa quantidade de enzima pode ser arrastada no efluente, sendo necessário acoplar na saída do reator, um sistema que permita recuperá-la (por exemplo, filtração) (SCHMIDELL, 2001).

No reator ideal contínuo de tanque agitado a concentração de substrato é constante ao longo do tempo e do espaço, e é igual a concentração no produto final, consequentemente esse tipo de reator é geralmente menos favorável, quando trata-se de uma reação com inibição por produto, visto que opera com elevada concentração deste. Por outro lado, é indicado para reações com inibição por substrato, principalmente quando o processo opera com concentração de substrato que resultará na taxa máxima de velocidade da reação (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005).

3.13.2 Reator de leito fixo e leito fluidizado

Os reatores de leito fixo (PBR) e fluidizado são os mais utilizados para aplicação de enzimas imobilizadas. Nestas configurações, o biocatalisador é mantido no interior do reator (em uma coluna recheada com partículas de enzima imobilizada) enquanto o fluido é passado através do leito, sendo que a concentração de substrato varia de acordo com o tempo ou o comprimento do reator (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005). Os suportes mais adequados para imobilização de enzimas para utilização nestes reatores são partículas poliméricas pouco compressivas ou materiais mais rígidos (CHISTI, 2006).

No biorreator de leito fixo a enzima imobilizada é empacotada no interior da coluna, enquanto o substrato é bombeado através dela. Tradicionalmente, essa configuração é uma das mais utilizadas em larga escala, devido a sua elevada eficiência, baixo custo, facilidade de construção, operação e ampliação de escala, além do menor grau de força de cisalhamento, evitando a ruptura das partículas do biocatalisador (SCHMIDELL, 2001; ZANIN; MORAES, 2014).

No biorreator de leito fluidizado a enzima imobilizada encontra-se em suspensão no interior do reator, sendo o substrato bombeado através dele. A velocidade do fluxo de alimentação do substrato é suficiente para impedir a deposição das partículas no fundo do reator, e para evitar que as mesmas sejam arrastadas com o fluido (SCHMIDELL, 2001). Este tipo de configuração apresenta algumas vantagens em relação aos reatores de tanque agitado e leito fixo, tais como a melhora do sistema de transferência de calor, massa e da mistura do meio reacional, além da ausência da obstrução do leito catalítico e caminhos preferenciais (DAMNJAZOVIC et al., 2012).

3.13.3 Reator de membrana

Reatores de membranas são utilizados com sucesso em determinados bioprocessos, tendo como principal vantagem a possibilidade de confinar enzimas dentro do biorreator, separando-as da corrente de saída do sistema, principalmente quando se opera continuamente, tornando esta etapa desnecessária durante o processo de *downstream*. Além disso, permite a utilização em sistemas constituídos por duas fases líquidas, nas quais o biocatalisador pode estar solúvel ou insolúvel (células ou enzimas imobilizadas). Embora, esta vantagem também possa ser conseguida empregando outras técnicas de imobilização, o confinamento de células ou enzimas em biorreatores à membrana microporosa é talvez, a maneira mais inócua de imobilização de células e enzimas, pois não são utilizados agentes

químicos e nem condições drásticas de aprisionamento. O uso de biorreatores à membrana é particularmente atraente em sistemas bifásicos, pois muitas dificuldades associadas com emulsificação e separação de fases podem ser evitadas (AIRES-BARROS, 2002; PEREIRA JR., 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Síntese dos suportes poliméricos

Para a síntese do copolímero poli(estireno-co-divinilbenzeno) e recristalização do Azobisisobutironitrila (AIBN) foram utilizados: água ultrapura, álcool polivinílico – PVA 88% hidrolisado – MM 78000 (Polysciences, Inc.), Azobisisobutironitrila - AIBN (MIG Química), divinilbenzeno 80% (Sigma-Aldrich®), estireno 99% (Sigma-Aldrich®), heptano 95% (Cromoline), metanol 99,8% (Cromoline), e toluol 99,5% (Cromoline). Para a síntese e modificação da magnetita: acetato de etila 99,5% (Cromoline) água ultra pura, hidróxido de sódio 99% (Synth), cloreto de ferro (II) tetrahidratado 99% (Sigma-Aldrich®), cloreto de ferro (III) pentahidratado 97% (Sigma-Aldrich®), ácido oleico P.A (Cromoline) e etanol 96% (Cromoline).

4.1.2 Reações de esterificação, imobilização e quantificação da atividade enzimática

Para o processo de imobilização das enzimas, foram utilizados: polietilenoglicol - PEG MM 1500 (Synth) e heptano 95% (Cromoline). Para a quantificação da atividade hidrolítica: acetona (Cromoline), diidrogenofosfato de potássio 99% (Cromoline), etanol anidro (Synth), goma arábica em pó pura (Synth), hidrogenofosfatodissódico 99% (Synth), hidróxido de potássio 85% (Synth), óleo de oliva comercial com baixo teor de acidez (Carbonell). Para a quantificação da atividade de esterificação: ácido oleico P.S (Cromoline) e etanol 96% (Cromoline). Para realização da síntese do palmitato de isopropila foram empregados: ácido palmítico 96% (Sigma-Aldrich®), álcool isopropílico 99,5% (Cromoline), heptano 95% (Cromoline), álcool butílico terciário 99% (Cromoline), decano 99,5% (Sigma-Aldrich®), iso-octano 99,5% (Cromoline) e peneira molecular 3A, 8-12 mesh (tipo esférica, Sigma-Aldrich®).

4.1.3 Síntese do padrão cromatográfico de palmitato de isopropila

Para a síntese do padrão cromatográfico de palmitato de isopropila foram utilizados: cloreto de tionila 99,5% (Merck), toluol 99,5% (Cromoline), sódio metálico

(Merck), ácido palmítico 96% (Sigma-Aldrich®) e álcool isopropílico 99,5% (Cromoline). Para as análises cromatográficas do teor de palmitato de isopropila foram utilizados: padrão cromatográfico de palmitato de isopropila (sintetizado pelo Próprio autor), álcool isopropílico 99,5% (Cromoline), hexanol 99,5% (Cromoline) e heptano 95% (Cromoline).

4.1.4 Enzimas

Foram utilizadas as preparações comerciais de lipase microbiana de *Candida rugosa* tipo VII e lipase de *Penicillium camemberti* (lipase G), adquiridas na sua forma livre, da Sigma-Aldrich®.

4.2 Métodos de análise

4.2.1 Atividade de esterificação

Foram avaliadas as atividades de esterificação das lipases imobilizadas, conforme metodologia descrita por Pinto et al. (2014). Para essa finalidade foram adicionadas 10,1 mL de ácido oleico e 1,9 mL de etanol absoluto em um frasco de vidro de 100 mL, mantido sob agitação à temperatura de 45 °C. Posteriormente 0,5 g de biocatalisador foi adicionado ao meio reacional, sendo retiradas alíquotas de 100 µL em tempos pré-determinados (0, 20 min, 30 min, 40 min, 60 min) para avaliação da atividade enzimática. Ao final da reação, foram adicionadas 10 mL de solução 1:1 de etanol e acetona, sendo o teor de ácido oleico determinado por titulação com hidróxido de potássio (0,02 $mol \cdot L^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática de esterificação (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de oleato de etila por minuto de reação sob as condições do ensaio. A atividade de esterificação foi determinada apenas na região linear do gráfico: concentração do produto *versus* unidade de tempo.

4.2.2 Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade do AIBN e dos biocatalisadores foi feita em balança analítica acoplada com infravermelho (ID 50, Marte) durante 15 min a 105 ºC.

A determinação do teor de umidade do substrato e do meio reacional ao final das reações de esterificação foi efetuada em Titulador Karl Fisher (AKF5000, Koehler), empregando 0,5 g de amostra.

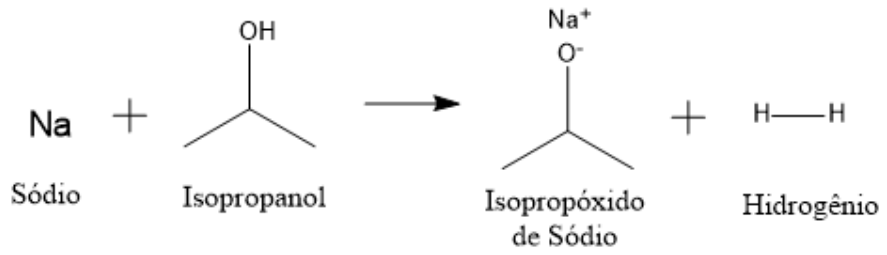
4.2.3 Quantificação do teor do palmitato de isopropila sintetizado a partir das reações de esterificação

4.2.3.1 Síntese do padrão cromatográfico de palmitato de isopropila

O padrão cromatográfico de palmitato de isopropila foi sintetizado a partir da reação do isopropóxido de sódio e cloreto de hexadecanoíla, de acordo com metodologia modificada de Urioste et. al (2008). Para a síntese do isopropóxido de sódio foram adicionados 55g de isopropanol (em excesso) e 0,9 g de sódio metálico em um béquer de 100 mL, sendo em seguida agitado mecanicamente por 1 hora para que todo o sódio reagisse com o isopropanol (Figura 4.1).

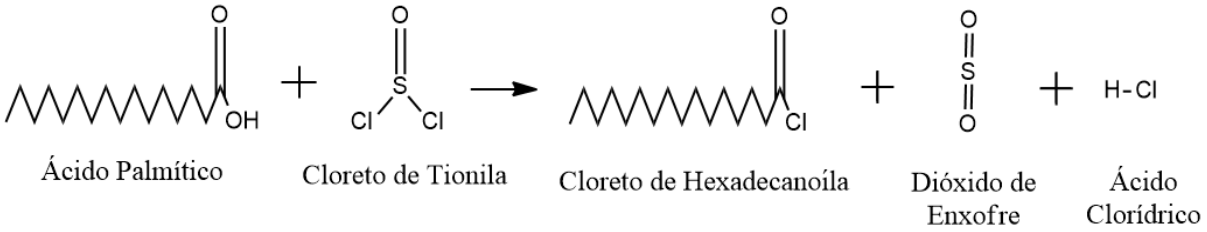
A síntese do cloreto de hexadecanoíla foi conduzida em balão de fundo redondo de 100 mL, ao qual foi adicionado 10 g de ácido palmítico, sendo em seguida aquecido até atingir a temperatura de 70 °C para fusão do ácido, e então adicionadas vagarosamente 9,3 g de cloreto de tionila ($SOCl_2$), por meio de um amostrador automático. A reação foi realizada durante 3 horas (Figura 4.2) e o $SOCl_2$ residual foi removido por evaporação à vácuo, com adição de 10 mL de toluol.

Figura 4.1 – Ilustração da reação entre sódio e isopropanol.



Fonte: Próprio autor.

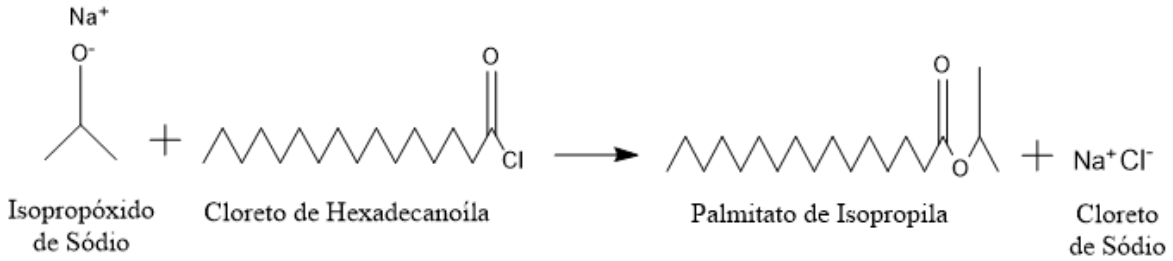
Figura 4.2 – Ilustração da reação entre ácido palmítico e cloreto de tionila.



Fonte: Próprio autor.

Em seguida, o isopropóxido de sódio e o cloreto de hexadecanoíla foram colocados em um balão de três bocas de 100 mL sob agitação mecânica de 300 rpm durante 2 horas, para a síntese do palmitato de isopropila. O meio reacional foi então filtrado para separação do cloreto de sódio formado, e evaporado para remoção dos líquidos mais voláteis (principalmente o excesso de isopropanol). As Figuras 4.3 e 4.4 ilustram a reação de síntese do éster e o aparato experimental utilizado, respectivamente.

Figura 4.3 – Ilustração da reação entre isopropóxido de sódio e cloreto de hexadecanoíla para a síntese do palmitato de isopropila.



Fonte: Próprio autor.

A purificação do palmitato de isopropila foi realizada por destilação à vácuo (2 mmHg), sendo que a primeira gota do destilado (fração que continha o palmitato de isopropila) foi coletada na temperatura de 140 °C, continuada até 200 °C.

Figura 4.4 – Aparato experimental utilizado para a síntese do padrão de palmitato de isopropila.

Fonte: Próprio autor.

4.2.3.2 Caracterização do palmitato de isopropila sintetizado por RMN ^{1}H e RMN ^{13}C

A composição do padrão cromatográfico sintetizado foi confirmada pela análise de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ^{1}H) e de carbono (RMN ^{13}C).

Os espectros foram obtidos no aparelho Varian modelo Mercury 300 MHz e analisados no software MestRe-C 1.0. Os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelo sinal do TMS (Tetrametilsilano - δ =0) em solvente $CDCl_3$. Cada espectro foi analisado calculando-se a integração dos números relativos de hidrogênio ou carbono presente na estrutura química do monoéster de ácido em 0,00-6,00 ppm.

4.2.4 Acompanhamento das reações de esterificação

O consumo do ácido graxo na reação de esterificação foi acompanhado por titulação com solução aquosa de KOH (0,02 mol·L^{-1}) e fenolftaleína como indicador, sendo adicionadas 10 mL de etanol à cada alíquota de 0,5 g do meio reacional. O acompanhamento da síntese foi expresso em termos de *rendimento teórico*, ou seja, o cálculo de rendimento foi baseado na estequiometria da reação de esterificação, considerando-se que todo o reagente limitante foi convertido à palmitato de isopropila (Equação 4.1).

$$\mathrm{Re}\,n\dim ento(\%) = \frac{(C_i - C_t)}{C_i} \times 100 \qquad \textbf{(4.1)}$$

Em que: C_i = Concentração do reagente limitante no substrato (mmol·L^{-1}) e C_t = Concentração do reagente limitante em tempo determinado da reação de esterificação (mmol·L^{-1}).

O teor do éster palmitato de isopropila foi quantificado em um cromatógrafo gasoso PerkinElmer® - Modelo Clarus 580, equipado com uma coluna capilar com recheio composto de 5% difenilo e 95% dimetilpolisiloxano, revestida por fibra de vidro e detector de ionização de chama (FID), conforme item 5.1.2.

4.2.5 Produtividade

Os valores de produtividade obtidos nos processos enzimáticos realizados nos biorreatores testados foram determinados empregando-se a Equação 4.2.

$$\Pr odutividade(g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}) = \frac{C_{éster}}{t} \qquad \textbf{(4.2)}$$

em que: $C_{éster}$ = é a quantidade de éster formada na reação de esterificação em g·L^{-1} e t = é o tempo de reação em horas.

4.3 Métodos experimentais

4.3.1 Síntese da magnetita

A magnetita usada para magnetizar o polímero poli(estireno-co-divinilbenzeno) foi sintetizada a partir da técnica de co-precipitação utilizando uma mistura de 60 mL de cada uma das soluções férricas: cloreto de ferro II (0,6 mol·L^{-1}) e cloreto de Ferro III (1,2 mol·L^{-1}). A solução resultante foi colocada sob aquecimento a 65°C com agitação mecânica, adicionando-se lentamente solução de hidróxido de sódio (4 mol·L^{-1}) até que a solução atingisse pH 11. A Equação 4.3 ilustra a reação entre os íons ferro Fe^{+2} e Fe^{+3} com o íon hidroxila, para a formação da magnetita.

$$\mathbf{Fe^{+2} + 2\ F^{+3} + 8\ OH^{-} \Rightarrow Fe_3O_4 + 4}\ H_2O \qquad \textbf{(4.3)}$$

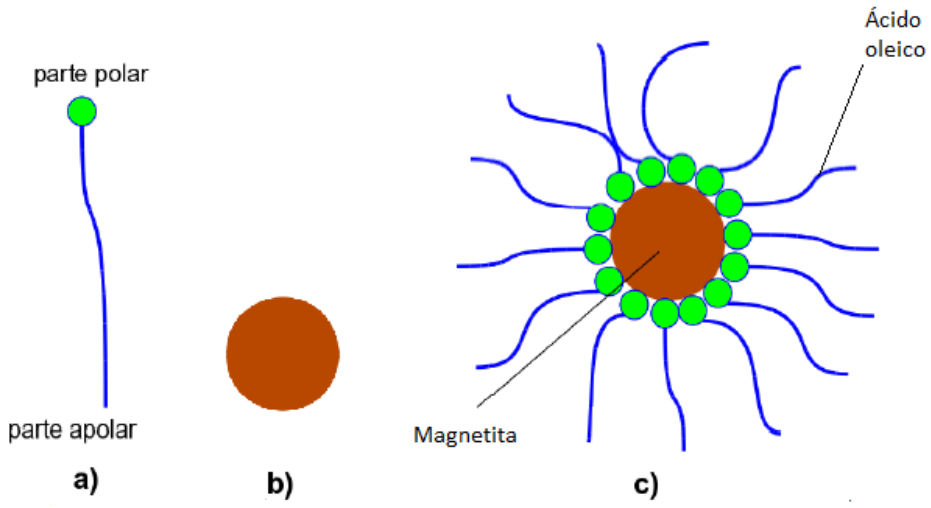
A solução férrica formada foi mantida sob agitação por 30 min a 65 ºC seguido de repouso sobre um imã (campo magnético externo) para auxiliar a decantação das partículas magnéticas precipitadas na reação. A massa negra decantada foi separada e lavada sucessivamente com água UP e solução 1:1 de acetato de etila e água UP até que o

sobrenadante atingisse o pH 7,0. A solução contendo magnetita foi filtrada à vácuo e levada à estufa a 60 ºC por 18 h.

4.3.2 Modificação da magnetita com ácido oleico

Visando aumentar a hidrofobicidade da magnetita, e assim facilitar sua dispersão na fase orgânica durante a polimerização, foi realizada uma modificação da sua superfície empregando ácido oleico, conforme metodologia descrita por Bento (2015). Para isso, foram adicionados 3,25g de magnetita, 40 mL de ácido oleico e 80 mL de água ultra pura em um béquer sob agitação mecânica por 15 minutos. A solução resultante foi filtrada a vácuo e lavada com etanol para remover o ácido oleico residual. As partículas magnéticas modificadas foram levadas à estufa a 60 ºC por 18h para completa secagem. A Figura 4.5 ilustra a modificação da superfície da magnetita.

Figura 4.5 – Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico: a) Ácido oleico, b) Magnetita e c) Partícula de magnetita revestida com ácido oleico.



Fonte: Modificado (LACZKOWSKI, 2010).

4.3.3 Purificação do Azobisisobutironitrila (AIBN)

O AIBN, iniciador das reações de polimerização, foi recristalizado a fim de aumentar seu grau de pureza. A recristalização foi realizada dissolvendo 5 gramas de AIBN em 200 mL de metanol sob agitação magnética vigorosa até sua dissolução completa, em aproximadamente 30 minutos sob temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi mantida em refrigerador sob temperatura de 4-8°C por 6 horas, sendo em seguida colocado no congelador sob temperatura de -6 a -3 °C por 18 horas. Os cristais foram filtrados e secos em dessecador utilizando sílica gel como agente desumidificante.

4.3.4 Síntese do poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STY-DVB-M)

O poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado foi sintetizado a partir da técnica de polimerização em suspensão, empregando uma fase orgânica e uma fase aquosa. A fase orgânica foi composta pelos monômeros estireno e divinilbenzeno na proporção 50/50 (m/m) (fase dispersa) e solução aquosa de álcool polivinílico (PVA) como fase aquosa e agente de suspensão (fase contínua). À essa mistura também foram adicionados toluol como bom solvente e heptano como mau solvente, AIBN como iniciador, e magnetita modificada na proporção de 10% em relação aos monômeros. Com o intuito de evitar a coagulação das partículas poliméricas durante a polimerização, a razão fase orgânica/aquosa utilizada foi de 1:8 (v/v). A Tabela 4.2 apresenta as quantidades utilizadas de cada reagente na polimerização.

Tabela 4.1 - Formulação utilizada nas reações de polimerização.

Reagente	Massa (g)
AIBN	0,377
Água ultrapura	800,00
Divinilbenzeno	12,566
Estireno	12,566
Heptano	27,645
Magnetita modificada	2,513
PVA	8 - 16
Toluol	27,645

Fonte: Próprio autor

Os reagentes foram adicionados a um reator com capacidade total de 1L mantido à 70 °C por 6 horas sob agitação mecânica e atmosfera inerte de nitrogênio. A Figura 4.6 ilustra o aparato experimental utilizado. Após a polimerização, o meio contendo as partículas de copolímero foi filtrado a vácuo e lavado exaustivamente com água UP à temperatura ambiente e água UP aquecida na temperatura de 50 °C, acetona e etanol, para remoção da fase aquosa e dos reagentes residuais. Em seguida, o material foi seco em estufa a 60 ºC por 18 h e peneirado para classificação granulométrica (Figura 4.7).

Figura 4.6 – Síntese das partículas de STY-DVB-M.

Fonte: Próprio autor

Figura 4.7 – Suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado: a) STY-DVB-M pós peneiramento e b) STY-DVB-M atraído por um ímã.

a) b)

Fonte: Próprio autor.

4.3.5 Densidade cristalina do derivado imobilizado

A densidade cristalina ou densidade do esqueleto sólido foi determinada conforme metodologia modificada de Zanin (1989). Colocou-se uma massa conhecida de partículas do suporte polimérico no interior de um balão volumétrico (previamente aferido com água à temperatura ambiente) e as mesmas foram imersas em heptano sob vácuo, visando eliminar o ar contido nos espaços intra e interpartículas. Em seguida, o balão volumétrico foi completado com heptano, sendo o volume ocupado pelo sólido obtido pela diferença após o preenchimento completo do balão. A densidade foi calculada como a relação entre a massa e o volume ocupado pelos sólidos (ZANIN, 1989).

4.3.6 Influência do agente de suspensão e da agitação mecânica na polimerização em suspensão para obtenção do poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado

Visando verificar a influência de fatores fundamentais, como agitação e quantidade do agente de suspensão (PVA), para obtenção de partículas poliméricas numa faixa granulométrica ideal para posterior imobilização da enzima, foram realizados ensaios, de acordo com um planejamento experimental 2^2 com triplicata no ponto central. As variáveis e os níveis utilizados estão indicados na Tabela 4.2 e os experimentos realizados estão indicados na Tabela 4.3.

Tabela 4.2 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento de experimentos para analisar a influência dos fatores concentração de PVA (%) e agitação (rpm) na distribuição granulométrica do STY-DVB-M.

Variáveis	**Níveis**		
	-1	**0**	**1**
A - Concentração de PVA (%)	1	1,5	2,0
B - Agitação (rpm)	320	360	400

Fonte: Próprio autor

Tabela 4.3 - Planejamento experimental utilizado na análise da influência da concentração de PVA (%) e agitação (rpm).

Ensaios	PVA (%)	Agitação (rpm)	PVA (%)	Agitação (rpm)
1	1	400	-1	1
2	2	320	1	-1
3	1,5	360	0	0
4	1	320	-1	-1
5	1,5	360	0	0
6	1,5	360	0	0
7	2	400	1	1

Fonte: Próprio autor

4.3.6.1 Análise granulométrica

Para a classificação granulométrica das partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado obtidas pelo planejamento de experimentos (item 4.3.6) foi utilizado um agitador de peneiras eletromagnético (Sppencer), sendo empregado o seguinte conjunto de peneiras de aço inox: 80, 42, 35 e 24 mesh tyler de abertura. As quantidades mássicas das partículas obtidas em cada faixa granulométrica proposta foi calculada a partir da diferença de peso entre a peneira após o peneiramento e a peneira vazia em uma balança semi-quantitativa (UX4200H, Shimadzu). O material retido pelas peneiras de 80, 42 e 35 mesh tyler foi utilizado como suporte para imobilização das enzimas.

4.3.7 Imobilização das lipases de *Candida rugosa* (LCR) *e Penicillium camemberti* (G) em suporte polimérico

O suporte sintetizado de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STY-DVB-M) foi embebido em heptano em uma proporção de 1:10 (m/v) e mantido sob agitação por 2 h em *shaker*. Em seguida foram adicionados 100 µL de solução aquosa 5 $g \cdot L^{-1}$ de polietilenoglicol (PEG-1500) e 0,25 g de lipase, para cada 1 g de suporte. A suspensão resultante foi colocada sob suave agitação até a visível adesão da enzima ao suporte, seguido de contato estático por um período de 18 h a 4ºC. Posteriormente, o derivado

imobilizado foi filtrado a vácuo e lavado com heptano até a redução da umidade para valores inferiores a 10%.

4.3.8 Síntese do palmitato de isopropila

4.3.8.1 Preparação do substrato

As soluções dos reagentes utilizados para a síntese do palmitato de isopropila foram preparadas em balões volumétricos. A massa adequada do ácido palmítico bem como o volume necessário do álcool isopropílico para cada concentração testada, foram adicionados ao balão volumétrico, sendo este avolumado com heptano. Peneira molecular (tipo esférica, Sigma-Aldrich®) foi utilizada para retirar a água presente no substrato preparado, numa relação de 10% (m/v). Primeiramente a peneira molecular foi levada a um forno mufla (SP-1200, SP Labor®) a 300°C por 3 horas a fim de desidratá-la. Após o tempo determinado, a peneira foi colocada em um dessecador para resfriamento, e então transferida à um frasco de vidro de 100 mL juntamente com o substrato preparado. O substrato foi armazenado em refrigerador na temperatura de 4-8°C por 18 horas.

4.3.8.2 Reações de esterificação do palmitato de isopropila conduzidas em frascos agitados

O palmitato de isopropila foi sintetizado a partir da reação de esterificação do ácido palmítico e álcool isopropílico catalisada pelas lipases de *Candida rugosa* e de *Penicillium camemberti* imobilizadas em STY-DVB-M. Vale ressaltar que o suporte magnetizado foi testado no meio reacional (controle negativo), e não apresentou nenhum tipo de influência na síntese do éster, visto que a concentração do ácido palmítico manteve-se praticamente constante durante todo o período do ensaio.

As reações de esterificação foram conduzidas em frascos de vidro com capacidade total de 100 mL, contendo 20 mL de substrato e quantidade adequada de biocatalisador. Os frascos foram mantidos em *shaker* a temperatura de 45-50 °C sob agitação de 150 rpm, com retiradas de alíquotas em tempos pré-determinados, para acompanhamento do rendimento da reação. A Figura 4.8 ilustra o sistema reacional utilizado.

Figura 4.8 – Sistema reacional utilizado para as reações de esterificação em frascos agitados.

Fonte: Próprio autor.

4.3.8.2.1 Influência da razão molar e da quantidade de biocatalisador na síntese do palmitato de isopropila

Para verificar a influência da razão molar e da quantidade de biocatalisador na síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Candida rugosa* e de *Penicillium camemberti* imobilizadas em STY-DVB-M, foi realizado um planejamento experimental 2^2 estrela rotacional com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central. As variáveis e os níveis utilizados estão indicados na Tabela 4.4, e os experimentos realizados estão indicados na Tabela 4.5.

Tabela 4.4 – Variáveis e níveis utilizados no planejamento de experimentos para avaliar a da influência da razão molar e da concentração de biocatalisador na síntese do palmitato de isopropila.

Variáveis	**Níveis**				
	-α (-1,414)	**-1**	**0**	**1**	**+α (1,414)**
A - Concentração de biocatalisador (% m/v)	2,93	5	10	15	17,07
B - Razão molar (ácido:álcool)	1,29	1,5	2	2,5	2,71

Fonte: Próprio autor

Tabela 4.5 - Planejamento experimental utilizado na análise da influência da concentração de biocatalisador (%) e razão molar (ácido:álcool).

Ensaios	Biocatalisador (%)	Razão molar (ácido:álcool)	Biocatalisador (%)	Razão molar (ácido:álcool)
1	5	1,5	-1	-1
2	15	1,5	1	-1
3	5	2,5	-1	1
4	15	2,5	1	1
5	10	2	0	0
6	2,93	2	-1,414	0
7	17,07	2	1,414	0
8	10	1,29	0	-1,414
9	10	2,71	0	1,414
10	10	2	0	0
11	10	2	0	0

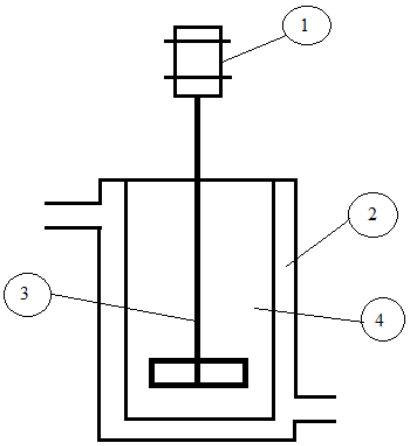
Fonte: Próprio autor.

4.3.8.3 Síntese do palmitato de isopropila em biorreator descontínuo de tanque agitado

Os testes conduzidos em biorreator de tanque agitado foram efetuados em reatores de vidro encamisado, com capacidade para 60 e 280 mL (reator utilizado para ampliação de escala). A agitação destes sistemas foi mantida em 450 rpm por meio de um agitador mecânico (RW20 digital, IKA®), com impelidor tipo turbina de pá fina aberta.

A Figura 4.9 ilustra o esquema experimental utilizado para a síntese do palmitato de isopropila em biorreator de tanque agitado.

Figura 4.9 - Esquema do biorreator descontínuo de tanque agitado para a síntese do palmitato de isopropila: 1 – Agitador mecânico; 2 – Camisa de aquecimento; 3 – Impelidor tipo turbina de pá fina aberta; 4 – Biorreator.



Fonte: Próprio autor.

4.3.8.4 Síntese do palmitato de isopropila em reator descontínuo de leito fixo

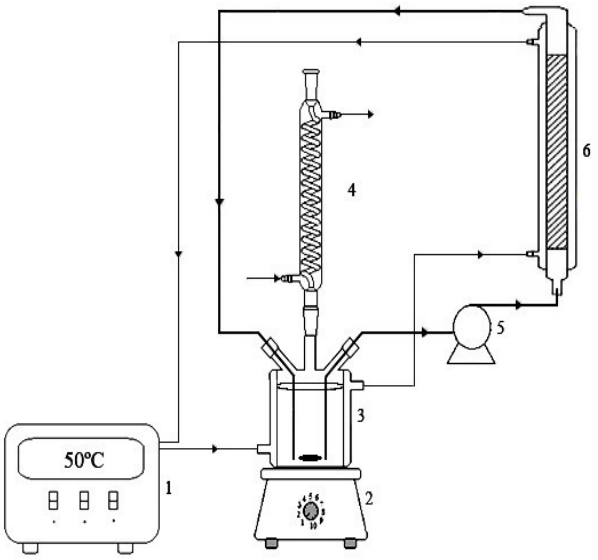
Os testes conduzidos em biorreator de leito fixo com recirculação do meio reacional foram efetuados em coluna de vidro encamisada, confeccionada por empresa especializada (Diogolab - Vidraria para Laboratório), medindo 16,6 mm de altura e 11 mm de diâmetro interno, correspondendo a um volume total de 15,8 mL. Essa relação entre a altura/diâmetro da coluna foi baseada em resultados anteriores que mostraram que colunas que apresentam maior relação altura/diâmetro (*l/d*) sofrem menor limitação de transferência de massa (DAMSTRUP et al., 2007; RAMOS et al., 2014).

Para a recirculação do substrato foi utilizado um reservado de vidro cilíndrico encamisado (50 mL), com três bocas, na qual foi acoplado um condensador de refluxo. O substrato foi bombeado através da coluna com auxílio de uma bomba peristáltica (Sci-Q 400, Watson-Marlow). Para compor o aparato experimental também foram utilizados os seguintes equipamentos: aquecedor (AB 1200, Britânia), banho termostatizado (Banho Ultratermostatizado Criostato, Nova Ética), agitador magnético (752, Fisatom) e resistências flexíveis (2m/25W, KW Resistências Elétricas).

As mangueiras e as conexões utilizadas foram constituídas de marprene (Watson-Marlow) apresentando as seguintes especificações: 1,6 x 1,6 mm (902.0016.016); 4,8 x 1,6 mm (902.0048.016); 8,0 x 1,6 mm (902.0080.016) e 9,6 x 2,4 mm (902.0096.024).

A Figura 4.10 ilustra o esquema experimental utilizado para a condução da síntese do palmitato de isopropila em biorreator de leito fixo com recirculação do meio reacional.

Figura 4.10 – Esquema do biorreator descontínuo de leito fixo para a síntese do palmitato de isopropila : 1 – Banho termostatizado; 2 – Agitador magnético; 3 –Reservatório de substrato; 4 – Condensador; 5 – Bomba peristáltica; 6 – Coluna de vidro.



Fonte: Próprio autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

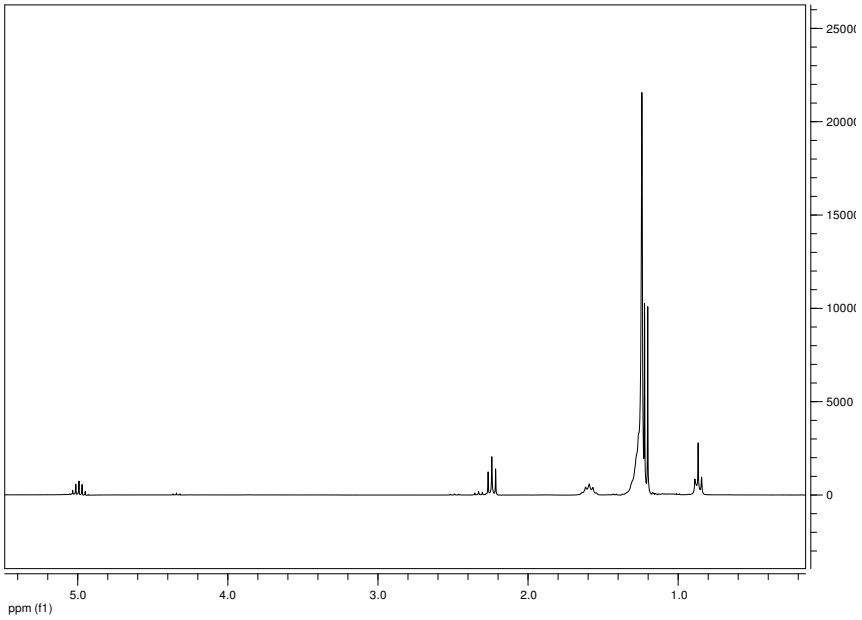
5.1 Estabelecimento do método de análise para determinação do teor do palmitato de isopropila

5.1.1 Caracterização do palmitato de isopropila por RMN ^{1}H e RMN ^{13}C

O padrão cromatográfico do palmitato de isopropila sintetizado de acordo com item 4.2.3.1, teve sua estrutura química confirmada pela análise de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^{1}H) e de carbono (RMN ^{13}C).

As Figuras 5.1 e 5.2 mostram os espectros obtidos pela análise de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^{1}H) e pela análise de ressonância magnética nuclear carbono (RMN ^{13}C), respectivamente. A Tabela 5.1 mostra a análise dos espectros obtidos para o palmitato de isopropila.

Figura 5.1 - Espectro obtido para o palmitato de isopropila a partir da análise de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^{1}H).

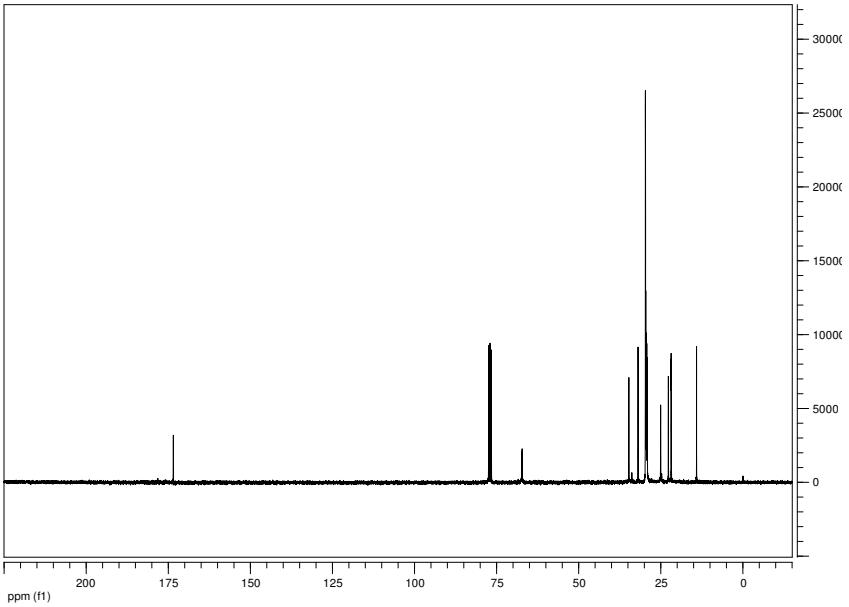


Fonte: Próprio autor

De acordo com Paiva et al. (2014), existem dois tipos de hidrogênios distintos característicos nos ésteres: os hidrogênios do carbono ligados ao oxigênio da carbonila referente ao álcool (que origina o éster), apresentando sinais de deslocamento entre 3,5-4,8 (ppm); e os hidrogênios do carbono (denominado carbono α) ligados ao grupo carbonila referente ao ácido (que origina éster), apresentando sinais de deslocamento entre 2,1-2,5

(ppm). Além disso, o hidrogênio do radical isopropila (álcool) tem o pico característico em forma de hepteto (de 4,7 a 5,1 ppm). Essas evidências foram observadas no espectro da Figura 5.1, confirmando a estrutura química do palmitato de isopropila.

Figura 5.2 – Espectro obtido para o palmitato de isopropila a partir da análise de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C).



Fonte: Próprio autor.

Tabela 5.1 - Análise dos espectros obtidos para o palmitato de isopropila.

Tipo de análise	Deslocamentos
RMN ^{1}H	($CDCl_3$, δ, 300 Hz, $C_{19}H_{38}O_2$): 4,91-5,09 (hept, H, CH_3); 2,20-2,20 (t, 2H, CH_2); 1,55-1,55 (2t, 2H, CH_2); 1,19-1,29 (m, 30H, CH_2/CH_3); 0,82-0,90 (2t, 3H, CH_3).
RMN ^{13}C	($CDCl_3$, δ, 300 Hz, $C_{19}H_{38}O_2$): 173,42-173,47 (s, 1C, CO); 67,14-67,39 (d, 1C, CH); 34,66-34,76 (s, 1C, CH_2); 31,86-31,94 (s, 1C, CH_2); 29,08-29,76 (m, 10C, CH_2/CH_3); 24,97-25,06 (s, 1C, CH_2/CH_3); 22,63-22,72 (s, 1C, CH_2/CH_3); 21,75-21,89 (d, 2C, CH_2/CH_3); 14,06-14,12 (s, C, CH_3).

Fonte: Próprio autor.

No espectro da Figura 5.2, o carbono referente a carbonila é facilmente identificado na região de δ 173,42-173,47 (ppm), confirmando também a presença do éster.

As Tabelas 5.2 e 5.3 mostram os principais grupos químicos e seus respectivos sinais de deslocamentos referente ao tetrametilsilano, para análise de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C, respectivamente.

Tabela 5.2 – Sinais de deslocamento para cada tipo de grupo químico para análise de RMN ^{1}H.

Grupo químico	Sinais de deslocamento δ (ppm)
$R\text{-}CH_3$	0,7-1,3
$R\text{-}CH_2\text{-}R$	1,2-1,4
R3-CH	1,4-1,7

Fonte: (PAVIA et al., 2014).

Tabela 5.3 – Sinais de deslocamento para cada tipo de grupo químico para análise de RMN ^{13}C.

Grupo químico	Sinais de deslocamento δ (ppm)
$R\text{-}CH_3$	8-30
$R\text{-}CH_2\text{-}R$	15-55
$R_3\text{-}CH$ ou R_4C	20-60
C=O (carbonila)	155-185

Fonte: (PAVIA et al., 2014).

5.1.2. Desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação do palmitato de isopropila

O método de análise para quantificação do teor do éster palmitato de isopropila foi realizado em um cromatógrafo gasoso PerkinElmer® - Modelo Clarus 580, equipado com uma coluna capilar com recheio composto de 5% difenilo e 95% dimetilpolisiloxano, revestida por fibra de vidro e detector de ionização de chama (FID). Os fluxos dos gases para alimentação do detector foram mantidos em 40 e 400 $mL\cdot min^{-1}$ de H_2 e ar sintético, respectivamente, sendo N_2 utilizado como gás de arraste (fluxo de variado de 0,2 a 1 $mL.min^{-1}$).

O estabelecimento do método de análise foi iniciado com uma isoterma à 105 ˚C por 7 minutos e vazão de N_2 de 0,2 $mL\cdot min^{-1}$. Posteriormente a vazão do gás de arraste foi alterada para 1 $mL.min^{-1}$, e duas rampas de aquecimento foram estabelecidas: 20 ˚C /min até atingir 200 ˚C, mantendo-se constante por 1 min e 25 ˚C/min até atingir 300 ˚C, mantendo-se constante por 2 minutos, totalizando um tempo de 18,75 minutos de análise

(Tabela 5.4). O volume de injeção foi de 1µL de uma mistura 1:1 da amostra com o padrão interno (8,0 g·L^{-1} de hexanol em heptano).

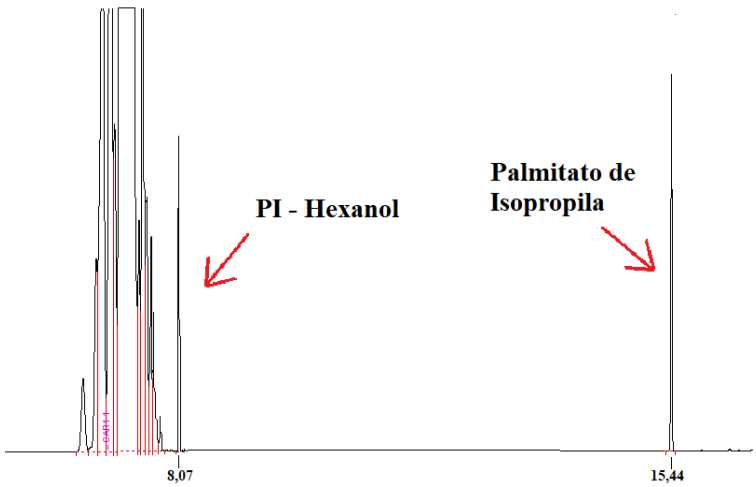
Tabela 5.4 – Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem do palmitato de isopropila

Temperatura (°C)	Taxa de aquecimento (°C·min^{-1})	Tempo (min)	Vazão do gás de arraste (mL·min^{-1})
105	-	7	0,2
105-200	20	-	1,0
200	-	1	1,0
200-300	25	-	1,0
300	-	2	1,0

Fonte: Próprio autor.

A Figura 5.3 apresenta o cromatograma obtido após o estabelecimento do método de análise para a quantificação do palmitato de isopropila em g·L^{-1}.

Figura 5.3 – Cromatograma obtido para quantificação do palmitato de isopropila.



Fonte: Próprio autor.

5.2 Influência do agente de suspensão e da agitação mecânica na polimerização em suspensão para obtenção do poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado

Apesar dos resultados promissores obtidos por Bento (2015), que avaliou o desempenho das partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STY-DVB-M) como suporte para imobilização de lipases, julgou-se necessário efetuar um estudo mais detalhado da síntese desse copolímero. Dessa maneira seria possível obter uma matriz com características mais adequadas para a imobilização de enzimas, como por exemplo, maior uniformidade no tamanho das esferas poliméricas sintetizadas.

Visando então, verificar a influência dos fatores: concentração de PVA e agitação mecânica, na distribuição granulométrica das partículas do STY-DVB-M obtidas por polimerização em suspensão, foi realizado um planejamento experimental completo 2^2 com triplicata no ponto central.

A variável resposta analisada nestes experimentos foi a fração mássica de STY-DVB-M útil, ou seja, a relação entre a quantidade de polímero com faixa de tamanho de partículas entre 80 a 24 mesh e a massa total sintetizada. Essa faixa foi selecionada por ser considerada como mais adequada para a imobilização de enzimas. A Tabela 5.5 apresenta os ensaios realizados e os resultados obtidos.

Tabela 5.5 – Resultados do planejamento de experimentos para a análise granulométrica do STY-DVB-M.

Ensaio	PVA (%)	Agitação (rpm)	Fração mássica de STY-DVB-M útil (%)
P1	1,0	400	75,94
P2	2,0	320	49,68
P3	1,5	360	54,92
P4	1,0	320	25,02
P5	1,5	360	58,48
P6	1,5	360	58,82
P7	2,0	400	66,17

Fonte: próprio autor.

Com o intuito de estudar a influência desses fatores na distribuição granulométrica do polímero sintetizado, foi efetuada uma análise detalhada para cada ensaio do planejamento estatístico. Para isso, as partículas de STY-DVB-M obtidas após as polimerizações foram separadas nas seguintes faixas granulométricas: maior que 80 mesh, entre 80 e 42 mesh, entre 42 e 35, entre 35 e 24 mesh, e menor que 24 mesh. A Figura 5.4 ilustra os gráficos obtidos para distribuição granulométrica de cada experimento realizado.

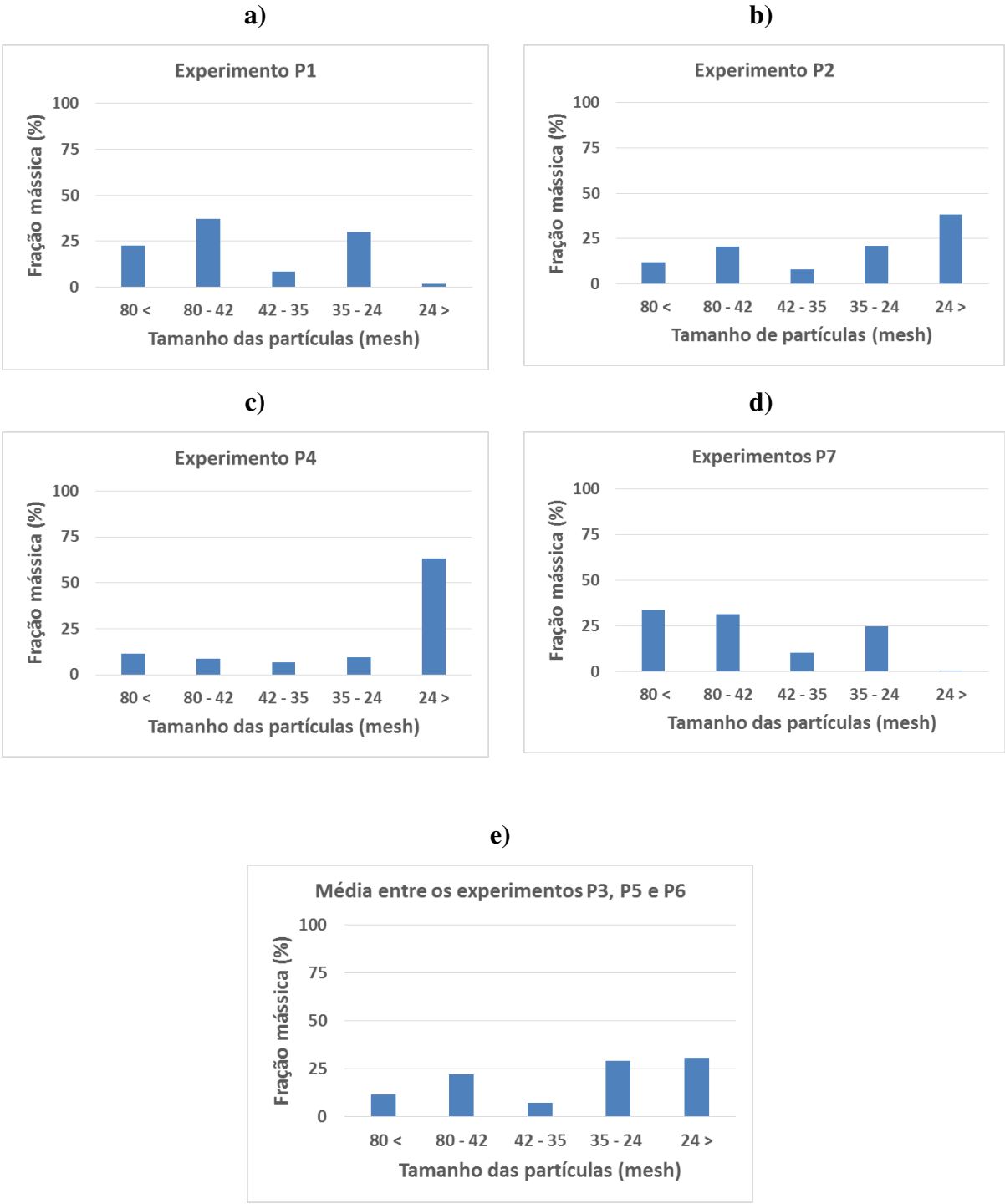
É possível afirmar que empregando-se agitação e concentração de PVA no nível baixo (ensaio P4), cerca de 65% de toda a massa de polímero formada foi de partículas menores que 24 mesh, ou seja, partículas grandes. Isso pode ser explicado pelo fenômeno da coalescência das partículas poliméricas, nas quais, as gotas de monômeros presentes na polimerização em suspensão formaram aglomerados maiores. Esse fato é decorrente da quantidade do agente de suspensão utilizada não ter sido suficiente para manter a estabilidade das gotas de monômero, na condição de agitação empregada neste ensaio.

No ensaio P2, no qual foi empregada agitação no nível baixo e concentração de PVA no nível alto, parte expressiva das partículas poliméricas com tamanho menor que 24 mesh, ainda prevalecia. No entanto, foi observada uma melhora na distribuição granulométrica entre as outras faixas analisadas, tendo como hipótese que, o aumento da concentração de PVA possa ter reduzido a coalescência das partículas poliméricas durante a polimerização.

Empregando tanto a agitação como a concentração de PVA no nível alto (ensaio P7), nota-se que partículas com tamanho menores que 24 mesh praticamente não foram mais formadas. Essa observação contribui com a hipótese anterior, de que o incremento da concentração do agente de suspensão possa ter diminuído o fenômeno da coalescência, prevalecendo a formação de partículas menores. No entanto, mais de 30% das partículas sintetizadas apresentaram tamanhos maiores que 80 mesh, ou seja, partículas muito pequenas, e não adequadas para a utilização desejada neste trabalho.

Nas condições operacionais dos pontos centrais (média dos experimentos P3, P5 e P6), nota-se que as partículas sintetizadas apresentaram uma distribuição granulométrica razoavelmente homogênea. Porém houve formação de elevada quantidade de partículas com tamanho menores que 24 mesh, indicando que esta concentração de PVA e agitação não são adequadas para formação das partículas poliméricas dentro da faixa de tamanho desejada.

Figura 5.4 - Gráficos da distribuição granulométrica das partículas de STY-DVB-M obtidas nos diferentes ensaios realizados de acordo com o planejamento fatorial simples 2^2: a) Ensaio P1 (1% de PVA e 400 rpm de agitação), b) Ensaio P2 (2% de PVA e 320 rpm de agitação), c) Ensaio P4 (1% de PVA e 320 rpm de agitação), d) Ensaio P7 (2% de PVA e 400 rpm de agitação) e e) Ensaios P3, P5 e P6 (1,5% de PVA e 360 rpm de agitação).

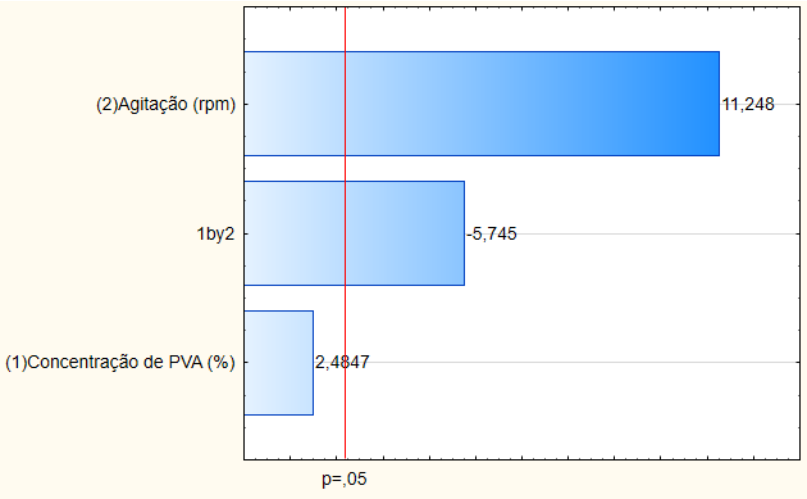


Fonte: próprio autor

Nas condições experimentais de nível alto de agitação e nível baixo de PVA (ensaio P1), houve uma distribuição granulométrica desejável das partículas sintetizadas, sendo que cerca de 80% de toda massa polimérica obtida apresentou tamanhos de partículas entre 80 a 24 mesh, ideal para posterior imobilização da lipase.

Para a realização da análise estatística foram empregados os softwares Statistica versão 12 (StatSoft Inc., USA) e Design-Expert 10.0 (Stat-Ease Corporation, USA). A Figura 5.5 mostra o gráfico de Pareto obtido pela análise estatística (com 95% de confiança) do planejamento fatorial 2^2, com o auxílio dos softwares mencionados.

Figura 5.5 – Gráfico de Pareto obtido pela análise estatística do planejamento fatorial 2^2 para verificar a influência das variáveis agitação (rpm) e concentração de PVA (%) na fração mássica de STY-DVB-M útil sintetizada.



Fonte: Próprio autor.

Analisando o Pareto nota-se que o efeito linear da agitação e o efeito de interação entre a concentração de PVA e a agitação mecânica foram significativos, ou seja, exerceram influência na obtenção da fração mássica de STY-DVB-M útil sintetizado.

A Tabela 5.6 apresenta a análise de variância (ANOVA) obtida para um modelo de primeira ordem ajustado para a resposta granulométrica das partículas do STY-DVB-M em função da concentração de PVA e agitação mecânica, conforme Equação 5.1. O modelo proposto foi significativo ao nível de 95% de confiança, não sendo constatada falta de ajuste. Verifica-se ainda, pelo valor do coeficiente de correlação (R^2), que a equação ajustada foi capaz de explicar 98,22% da variabilidade dos valores experimentais.

Tabela 5.6 – ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos da análise granulométrica do STY-DVB-M.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	p
Modelo	1487,81	3,00	495,94	55,24	0,0040
A-Concentração de PVA	55,43	1,00	55,43	6,17	0,0889
B- Agitação	1136,03	1,00	1136,03	126,54	0,0015
AB	296,36	1,00	296,36	33,01	0,0105
Resíduo	26,93	3,00	8,98		
Falta de Ajuste	17,60	1,00	17,60	3,77	0,1916
Erro Puro	9,33	2,00	4,67		
Cor Total	1514,74	6,00			

Fonte: Próprio autor.

$$Y= -339.667 +162.380*A +1.067*B -0.430*A*B \quad (\mathbf{5.1})$$

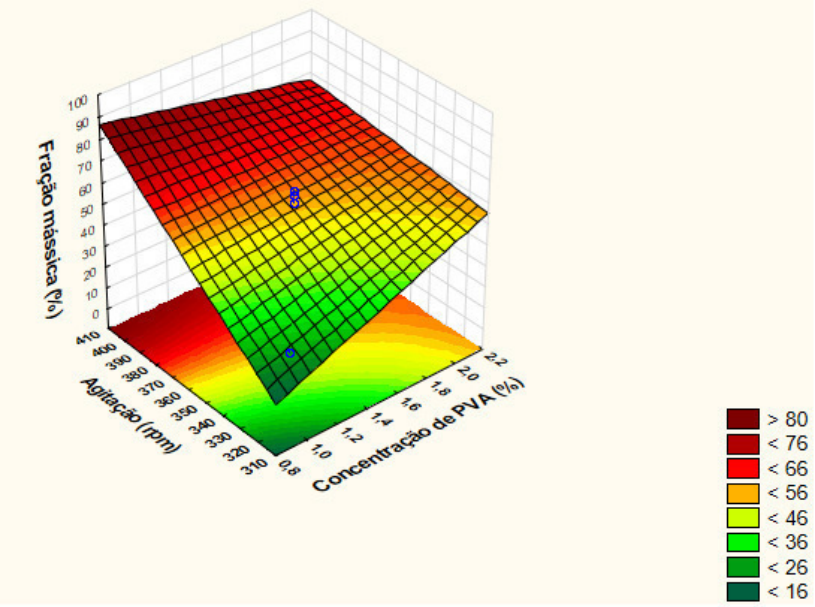
Em que: Y representa a fração mássica (%) de STY-DVB-M útil obtida; A é o valor codificado da variável concentração de PVA (%) e B o valor codificado da variável agitação.

A Figura 5.6 ilustra a superfície de resposta gerada a partir dos dados obtidos do planejamento estatístico, na qual é possível notar que o efeito da agitação na massa útil de STY-DVB-M formada é linear, atingindo a máxima quantidade em 400 rpm. Além disso, o efeito da interação entre a agitação e a concentração de PVA é negativo, ou seja, quanto menor a concentração de PVA, maior deve ser a agitação empregada durante a polimerização. Isso se deve ao fato de que baixas concentrações de PVA propiciam o fenômeno da coalescência entre as gotas de monômeros durante a polimerização, assim, uma agitação mais vigorosa minimiza esse efeito.

Com o auxílio do programa estatístico Design-Expert 10.0, foi possível encontrar a condição ótima de concentração de PVA e agitação para obtenção da quantidade máxima de massa de STY-DVB-M útil, na faixa de variação estudada. As condições experimentais ótimas indicadas foram: nível baixo de concentração de PVA (1%) e nível alto de agitação (400 rpm). Como resposta, o *software* indicou que a fração mássica de polímero desejado

seria de 77,13%, e no experimento realizado a fração mássica obtida foi 75,94%, apresentando uma diferença de 2,84%, considerado satisfatório.

Figura 5.6 – Superfície de resposta gerada a partir da fração mássica de STY-DVB-M útil obtida em função da variação da concentração de PVA (%) e agitação mecânica (rpm).



Fonte: Próprio autor.

Desta forma, esta condição experimental foi adotada para a síntese das partículas de STY-DVB-M, pois atende o objetivo alvo do trabalho, que é a utilização desse copolímero como matriz de imobilização de lipase, visando a catálise das sínteses de ésteres emolientes.

5.3 Imobilização das lipases em suporte polimérico magnetizado e atividade de esterificação

O suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STY-DVB-M) na faixa granulométrica entre 80 a 24 mesh foi preparado conforme estabelecido no item 5.2 e utilizado para imobilizar as lipases selecionadas de *Candida rugosa* (LCR) e lipase de *Penicillium camemberti* (LG).

Ambas as lipases foram selecionadas por serem muito relatada na literatura como adequadas para reações de esterificação de diferentes alcoóis e ácidos (VILAS BOAS et al., 2017; BENTO et al., 2017; ARONNE et al., 2014; OZYILMAZ; GEZER, 2010; PIRES-CABRAL; FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2010; RAGHAVENDRA; SAYANIA; MADAMWAR, 2010; FREITAS et al., 2010; FREITAS et al., 2011).

A Tabela 5.7 mostra os valores de atividade de esterificação na formação do oleato de etila, bem como as umidades dos derivados imobilizados empregados nas sínteses, estes ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 5.7 – Atividade de esterificação e umidade dos biocatalisadores de LCR e LG imobilizadas em STY-DVB-M.

Biocatalisador	Atividade de esterificação ($U \cdot g^{-1}$)	Umidade (%)
LCR em STY-DVB-M	107,39 ± 11,36	9,79 ± 2,70
LG em STY-DVB-M	119,56 ± 13,91	9,45 ±1,71

Fonte: próprio autor.

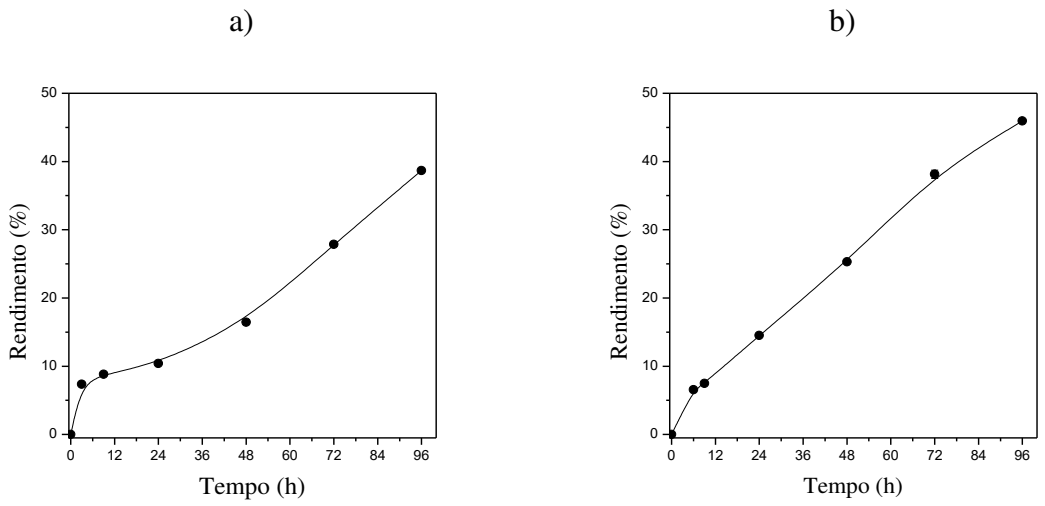
Visando testar o desempenho dos biocatalisadores no modelo reacional selecionado (ácido palmítico e álcool isopropílico), tomou-se como base o sistema estudado por Bento et al. (2017), que empregou lipase imobilizada no suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STY-DVB-M) para catalisar a síntese do butirato de butila.

Para esta finalidade, as sínteses do palmitato de isopropila foram conduzidas empregando as seguintes condições experimentais:

- ✓ Concentração do substrato: ácido palmítico a 0,125 $mol \cdot L^{-1}$ e álcool isopropílico a 0,1 $mol \cdot L^{-1}$ em meio heptano;
- ✓ Quantidade de biocatalisador: 2,5% (m/v), relação entre a massa de biocatalisador seco e volume total de meio reacional;
- ✓ Temperatura da reação: 45º C.

A Figura 5.7 (a, b) mostra o perfil do rendimento em função do tempo de reação obtido para cada biocatalisador testado.

Figura 5.7 – Rendimento da síntese do palmitato de isopropila empregando 0,125 mol·L^{-1} de ácido palmítico, 0,1 mol·L^{-1} de álcool isopropílico, 2,5% (m/v) de biocatalisador e 45ºC, catalisada por: a) lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STY-DVB-M (LCR1) e b) lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M (LG1).



Fonte: Próprio autor

Observando os resultados, nota-se que ambos os biocatalisadores não apresentaram desempenho satisfatório nessas condições experimentais, atingindo rendimento máximo de 38,67 e 45,95 % em 96 horas, quando empregou-se a LCR imobilizada em STY-DVB-M (Figura 5.7a) e a LG imobilizada em STY-DVB-M (Figura 5.7b), respectivamente.

Desse modo, com o intuito de elevar a conversão da reação de esterificação, optou-se por realizar um planejamento experimental, verificando-se a influência da razão molar (ácido:álcool) e da concentração do biocatalisador no rendimento da síntese do palmitato de isopropila.

Com base nos resultados obtidos e fundamentados na literatura, julgou-se que a quantidade de biocatalisador empregada foi insuficiente para obtenção de elevados rendimentos, visto que em trabalhos similares foi observado que o aumento da quantidade de biocatalisador afeta positivamente a reação de esterificação.

Em estudo realizado por por Lage et al. (2012), que empregaram a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em polimetacrilato para a síntese do oleato de isoamila, variando-se a concentração de biocatalisador de 5 a 25 %, percebeberam um incremento na conversão do ácido em função do aumento da concentração do biocatalisador. Resultados similares foram obtidos por Todero et al. (2015), utilizando o mesmo biocatalisador para a síntese butirato de isoamila, variando-se a concentração de biocatalisador de 2 a 30 %.

Além disso, sabe-se que o excesso de álcool no meio reacional, prejudica a catálise enzimática, pois pode ocasionar a inibição da lipase pela elevada concentração deste reagente e/ou redução da sua camada de hidratação, em função do aumento da polaridade do meio reacional. De acordo com Bassi et al. (2016), que estudando a síntese do oleato de octila empregando *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em polimetacrilato como biocatalisador, verificaram que razões molares superiores a 1:2,5 (ácido:álcool) resultavam em baixas conversões de éster.

Dessa forma, para a realização do planejamento de experimentos, estabeleceu-se 1,5:1 (ácido:álcool) como menor razão molar, mantendo sempre o ácido em excesso no meio reacional, e concentração mínima de 5% de biocatalisador, sendo esta o dobro da quantidade inicial utilizada.

5.4 Síntese do palmitato de isopropila realizada em frascos agitados

Com o intuito de analisar estatisticamente a influência da razão molar (ácido:álcool) e da concentração do biocatalisador no rendimento da reação da síntese do palmitato de isopropila, foram realizados testes empregando os dois biocatalisadores estudados: lipase de *Candida rugosa* e de *Penicillium camemberti* imobilizada em suporte de STY-DVB-M.

Para esta finalidade, os ensaios foram realizados de acordo com um planejamento experimental 2^2 estrela rotacional com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central. Essas reações foram acompanhadas pelo consumo do ácido graxo no meio reacional, em duplicata e em tempos pré-determinados. Para esta série de experimentos as seguintes variáveis foram mantidas constantes:

- ✓ Concentração de álcool isopropílico: 0,1 $mol \cdot L^{-1}$ em meio heptano;
- ✓ Temperatura da reação: 45º C.

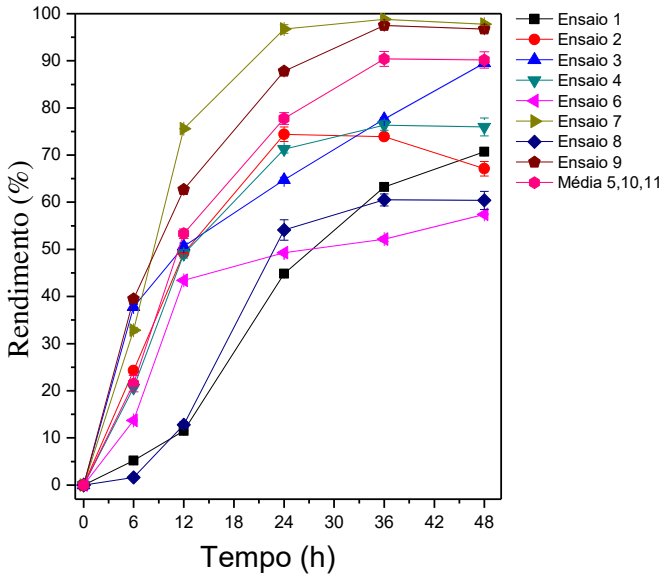
5.4.1 Desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STY-DVB-M na síntese do palmitato de isopropila

A Tabela 5.8 mostra os resultados obtidos de rendimento das reações de esterificação, de acordo com o planejamento experimental 2^2 estrela rotacional, em tempos pré-determinados, empregando como biocatalisador LCR imobilizada em STY-DVB-M. É

possível observar grande variação no rendimento de reação nos testes realizados, tanto em função das diferentes condições experimentais como nos diferentes tempos reacionais.

A Figura 5.8 ilustra o perfil do rendimento em cada ensaio realizado, sendo a triplicata do ponto central (ensaios 5, 10, e 11) mostrada em função do valor médio. Esses resultados comprovam que o rendimento máximo ocorreu quando foram empregadas as condições de ponto central para os níveis mais elevados, tanto da razão molar quanto do biocatalisador (ensaios 7 e 9). Em ambos os ensaios, a conversão atingida foi de praticamente 100% em 36 horas de reação.

Figura 5.8 – Rendimento da reação de esterificação obtido nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental 2² estrela rotacional, empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador



Fonte: Próprio autor.

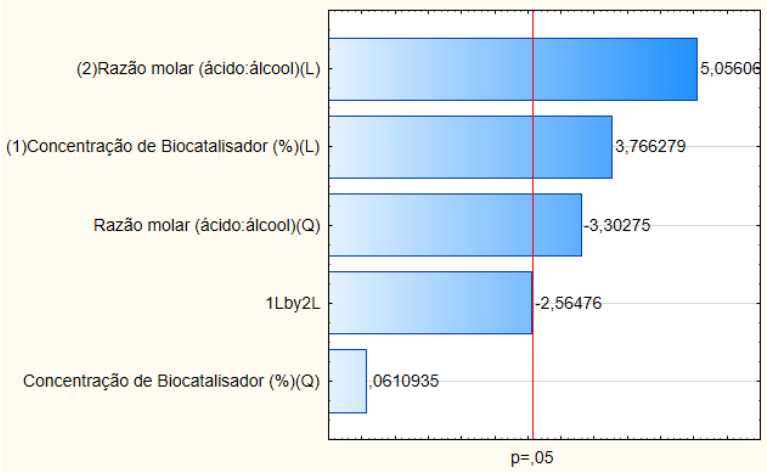
A partir dos dados obtidos e com o auxílio dos softwares estatísticos, foi possível gerar o gráfico de Pareto (Figura 5.9) e realizar a análise de variância (ANOVA - Tabela 5.9), com 95% de nível de confiança, em 12 h de reação

Tabela 5.8 - Rendimento da reação de esterificação obtido nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental 2² estrela rotacional empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador.

Ensaios	Concentração de biocatalisador (% m/v)	Razão molar (ácido:álcool)	Rendimento (%)				
			6 h	12 h	24 h	36 h	48 h
1	5	1,5	5,20 ± 0,01	11,50 ± 0,19	44,86 ± 0,35	63,21 ± 0,33	70,71 ± 0,40
2	15	1,5	24,28 ± 0,09	49,19 ± 0,13	74,40 ± 1,54	73,92 ± 0,33	67,12 ± 1,54
3	5	2,5	37,80 ± 0,01	50,64 ± 0,50	64,77 ± 0,68	77,66 ± 0,50	89,56 ± 0,27
4	15	2,5	20,62 ± 0,05	49,03 ± 0,90	71,23 ± 0,78	76,34 ± 1,05	75,95 ± 1,90
5	10	2	20,79 ± 0,25	57,33 ± 0,23	79,23 ± 0,42	90,99 ± 0,34	89,72 ± 0,52
6	2,93	2	13,72 ± 0,16	43,41 ± 0,10	49,29 ± 0,02	52,18 ± 0,49	57,42 ± 0,10
7	17,07	2	32,87 ± 0,57	75,61 ± 0,05	96,74 ± 0,92	98,83 ± 0,26	97,78 ± 0,20
8	10	1,29	1,61 ± 0,01	12,80 ± 0,64	54,09 ± 2,17	60,49 ± 1,27	60,38 ± 1,94
9	10	2,71	39,47 ± 0,22	62,67 ± 0,41	87,82 ± 0,50	97,52 ± 0,47	96,76 ± 0,16
10	10	2	20,29 ± 0,15	52,62 ± 0,69	76,97 ± 0,44	88,64 ± 0,07	88,73 ± 0,89
11	10	2	23,50 ± 0,13	54,50 ± 0,88	77,10 ± 0,63	91,62 ± 0,49	92,09 ± 1,48

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.9 – Gráfico de Pareto do rendimento da reação de esterificação empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador para a síntese do palmitato de isopropila.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 5.9 – ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos utilizando LCR imobilizada em suporte STY-DVB-M.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	p
Modelo	3429,395	5	685,879	11,683	0,009
A - Concentração de biocatalisador	832,735	1	832,735	14,185	0,013
B- Razão molar	1500,746	1	1500,746	25,564	0,004
AB	386,166	1	386,166	6,578	0,050
A^2	0,219	1	0,219	0,004	0,954
B^2	640,374	1	640,374	10,908	0,021
Resíduo	293,530	5	58,706		
Falta de Ajuste	282,323	3	94,108	16,795	0,057
Erro Puro	11,207	2	5,603		
Cor Total	3722,925	10			

Fonte: Próprio autor.

Verifica-se na Figura 5.9, que utilizando a LCR imobilizada em STY-DVB-M na síntese do palmitato de isopropila, os efeitos lineares da razão molar e da concentração de biocatalisador, bem como o efeito quadrático da razão molar e a interação entre esses dois fatores foram significativos, ou seja, influenciaram o rendimento das reações de esterificação nos testes realizados.

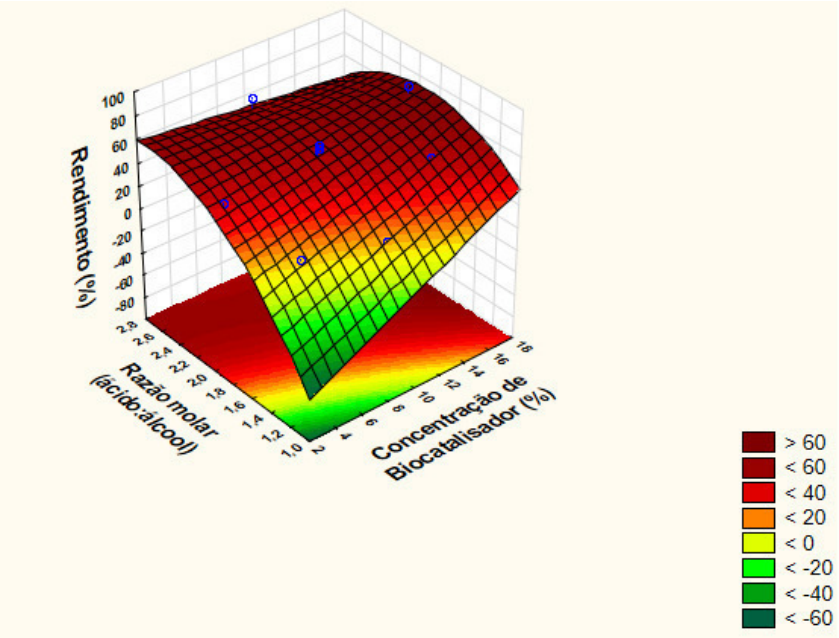
Dessa forma, o modelo estatístico proposto (Equação 5.2) é apto para descrever o comportamento do rendimento de reação nas condições do planejamento de experimento proposto. O valor do coeficiente de correlação (R^2) obtido foi de 0,9212 ($R^2 > 0,9$), e dessa forma, a equação ajustada é capaz de explicar 92,12% da variabilidade dos valores experimentais.

$$Y = -267.437 + 9.743*A + 235.975*B - 3.930*A*B + 0,008*A^2 - 42,334*B^2 \quad (\mathbf{5.2})$$

Em que: Y representa o rendimento de reação (%); A é o valor codificado da variável concentração de biocatalisador (% m/v) e B o valor codificado da variável razão molar (ácido:álcool).

A Figura 5.10 ilustra a superfície de resposta gerada a partir dos dados obtidos do planejamento estatístico, na qual é possível notar que tanto a variação na concentração do biocatalisador como da razão molar influenciaram de forma marcante o rendimento das reações de esterificação.

Figura 5.10 – Superfície de resposta gerada a partir do rendimento de reação em função da variação da concentração de biocatalisador e razão molar, empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador.



Fonte: Próprio autor

Sabe-se Pelo Princípio de Le Chateliêr, que o excesso de um dos reagentes no meio reacional é necessário para deslocar o equilíbrio da reação, acarretando uma maior formação

de produto. Para o estudo em questão, constatou-se que o excesso de ácido palmítico no meio reacional, favoreceu a síntese do palmitato de isopropila (ensaio 9). Adicionalmente, um maior carregamento enzimático por volume reacional, aumenta o contato entre o substrato e a enzima, possibilitando maior velocidade de reação (ensaio 7).

Nota-se pela Figura 5.10 que a região no qual observou-se os valores mais elevados de rendimento está na faixa de 2,0 à 2,4 (ácido:álcool) de razão molar e 14,0 à 17,07 % (m/v) de concentração de biocatalisador. Nota-se que acima de 14 % (m/v) de biocatalisador não houve aumento significativo no rendimento das reações. Esse resultado pode ser atribuído a uma possível aglomeração do biocatalisador no meio reacional, dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. Lage et al. (2016) obteve resultados similares utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em poli(metacrilato de propila) para a síntese do oleato de isoamila em meio heptano. Nesse estudo, no qual a concentração do biocatalisador foi variada entre 5 – 25 % (m/v) foi constatado que para concentrações superiores a 20% (m/v) de biocatalisador a conversão da reação não aumentou significativamente.

Com o auxílio do programa estatístico Design-Expert 10.0, foi possível encontrar a condição ótima de concentração de biocatalisador e razão molar para obtenção do máximo rendimento, nas condições estudadas, sendo elas: nível α+ de concentração de biocatalisador (17,07% m/v) e nível central de razão molar (2,0). Como resposta, o *software* indicou que o rendimento desejado seria de 69,53 %, e no experimento realizado o rendimento obtido foi 75,61 %, apresentando uma diferença de 8,04%, considerado satisfatório para processos biotecnológicos.

Visando ainda verificar a influência da quantidade de água presente no substrato formada durante as sínteses, foram quantificados os teores de água no início e ao final de 48h de cada ensaio realizado, em Titulador Karl Fisher (AKF5000, Koehler), sendo os resultados mostrados na Tabela 5.10.

É possível verificar que o teor de água presente tanto no início da reação, como ao final da síntese (em 48h) apresentou valores baixos, variando entre 70 a 183 ppm. Esses valores estão de acordo com De Castro e Anderson (1995), que estudando a síntese do butirato de citronela a partir da esterificação do ácido butírico e citronelol em meio heptano, catalisada pela Lipozyme, constatou que as conversões mais elevadas foram obtidas quando o teor de água presente no meio reacional apresentava-se na faixa de 100-200 ppm.

Tabela 5.10 – Resultados do teor de água presente no meio reacional no início e ao final de 48h de reação, empregando LCR em STY-DVB-M como biocatalisador na síntese do palmitato de isopropila.

Ensaios	Teor de água inicial ppm	Teor de água final ppm
1	183	111
2	183	123
3	92	134
4	92	134
5	156	80
6	156	125
7	156	76
8	83	104
9	93	88
10	156	70
11	156	89

Fonte: Próprio autor.

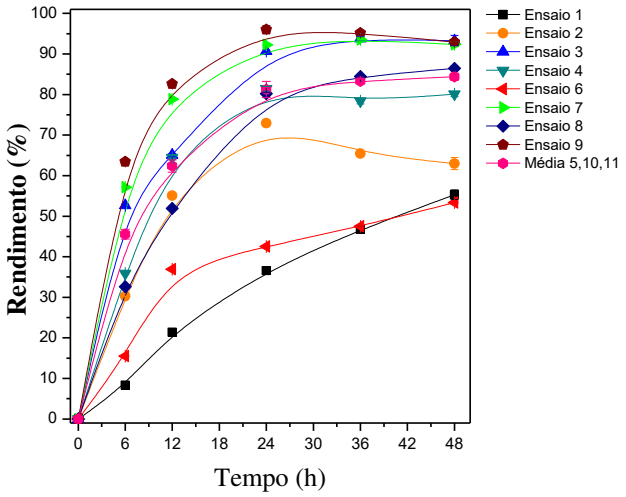
Dessa maneira, esse fator não foi considerado relevante para interferir no deslocamento do equilíbrio da reação de esterificação, pois pelo princípio de Le Chatelier, sabe-se que o aumento da concentração de um dos produtos da reação (água) causa deslocamento de equilíbrio no sentido inverso, ou seja diminui a formação do produto desejado (palmitato de isopropila).

5.4.2 – Desempenho da lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M na síntese do palmitato de isopropila

A Tabela 5.11 mostra os resultados obtidos de rendimento das reações de esterificação, de acordo com o planejamento experimental 2^2 estrela rotacional com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central, em tempos pré-determinados, empregando como biocatalisador a LG imobilizada em STY-DVB-M. É possível observar uma grande variação do rendimento das reações nos testes realizados, tanto em função das diferentes condições experimentais testadas como também nos diferentes tempos reacionais.

A Figura 5.11 ilustra o rendimento da reação em cada ensaio realizado, sendo a triplicata do ponto central (ensaios 5, 10, e 11) plotada em função do valor médio, observando que os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 7 e 9.

Figura 5.11 – Rendimento obtido nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental 2² estrela rotacional, empregando LG imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador.



Fonte: Próprio autor.

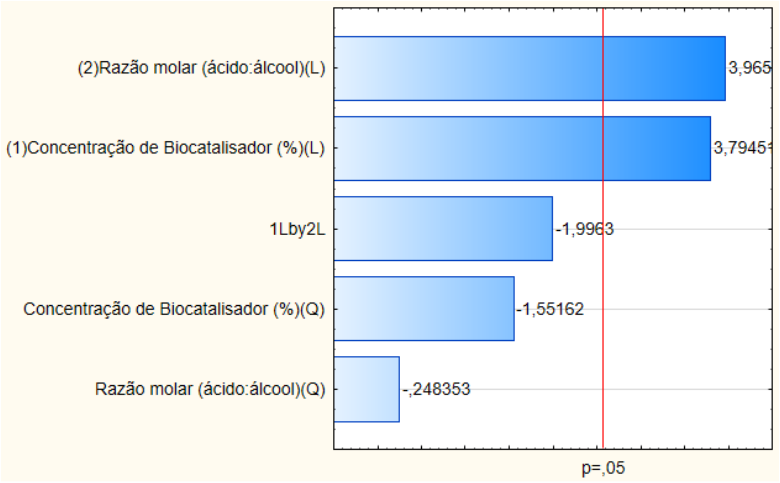
A partir dos dados obtidos e com o auxílio dos softwares estatísticos, foi possível gerar o gráfico de Pareto (Figura 5.12) e realizar a análise de variância (ANOVA - Tabela 5.12), com 95% de nível de confiança, em 12 h de reação.

Tabela 5.11 - Rendimento obtido nos ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental 2² estrela rotacional empregando LG imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador.

Ensaios	Concentração de biocatalisador (% m/v)	Razão molar (ácido:álcool)	Rendimento (%)				
			6 h	12 h	24 h	36 h	48 h
1	5	1,5	8,36 ± 0,02	21,37 ± 0,02	36,57 ± 0,59	46,70 ± 0,92	55,30 ± 1,81
2	15	1,5	30,27 ± 0,01	55,08 ± 0,53	72,93 ± 0,80	65,45 ± 0,38	62,97 ± 1,50
3	5	2,5	52,67 ± 0,36	65,08 ± 0,40	90,68 ± 0,22	93,77 ± 0,59	93,27 ± 1,30
4	15	2,5	35,86 ± 0,12	64,44 ± 0,47	81,42 ± 0,57	78,36 ± 0,68	80,10 ± 0,64
5	10	2	44,30 ± 0,18	66,96 ± 0,23	80,29 ± 0,42	83,07 ± 2,17	84,51 ± 0,25
6	2,93	2	15,49 ± 0,07	36,92 ± 0,33	42,53 ± 0,31	47,50 ± 0,17	53,37 ± 0,20
7	17,07	2	57,14 ± 0,18	78,84 ± 0,05	92,26 ± 0,16	93,58 ± 0,54	92,36 ± 0,59
8	10	1,29	32,61 ± 0,01	51,91 ± 0,21	80,18 ± 0,36	84,44 ± 0,10	86,48 ± 0,49
9	10	2,71	63,41 ± 0,38	82,63 ± 0,31	96,03 ± 0,93	95,13 ± 0,28	92,95 ± 0,06
10	10	2	45,70 ± 0,05	59,79 ± 0,39	83,54 ± 0,66	82,99 ± 0,41	83,51 ± 0,47
11	10	2	46,66 ± 0,04	64,04 ± 0,06	79,92 ± 0,29	83,87 ± 0,07	85,18 ± 0,97

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.12 – Gráfico de Pareto do rendimento de reação de esterificação empregando LG imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador.



Fonte: Próprio autor.

A partir do gráfico de pareto (Figura 5.12) verifica-se que quando empregou-se a LG imobilizada em STY-DVB-M para catalisar a síntese do palmitato de isopropila, os efeitos lineares da razão molar e da concentração de biocatalisador foram significativos, ou seja, influenciaram o rendimento nos testes realizados na faixa estudada.

A Tabela 5.12 apresenta a análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos para LG imobilizada em STY-DVB-M na síntese do palmitato de isopropila. Para o nível de confiança de 95%, o modelo matemático proposto (Equação 5.3) é adequado para descrever o comportamento do rendimento de reação nas condições estudadas. Verifica-se ainda pelo valor do coeficiente de correlação (0,8797) que a equação ajustada foi capaz de explicar 87,97% da variabilidade dos valores experimentais.

$$Y = -113.179 + 13.678*A + 72.730*B - 3.435*A*B - 0.225*A^2 - 3.575*B^2 \quad (\mathbf{5.3})$$

Em que: Y representa o rendimento de reação (%); A é o valor codificado da variável concentração de biocatalisador (% m/v) e B o valor codificado da variável razão molar (ácido:álcool).

Tabela 5.12 – ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos utilizando LG imobilizada em suporte STY-DVB-M.

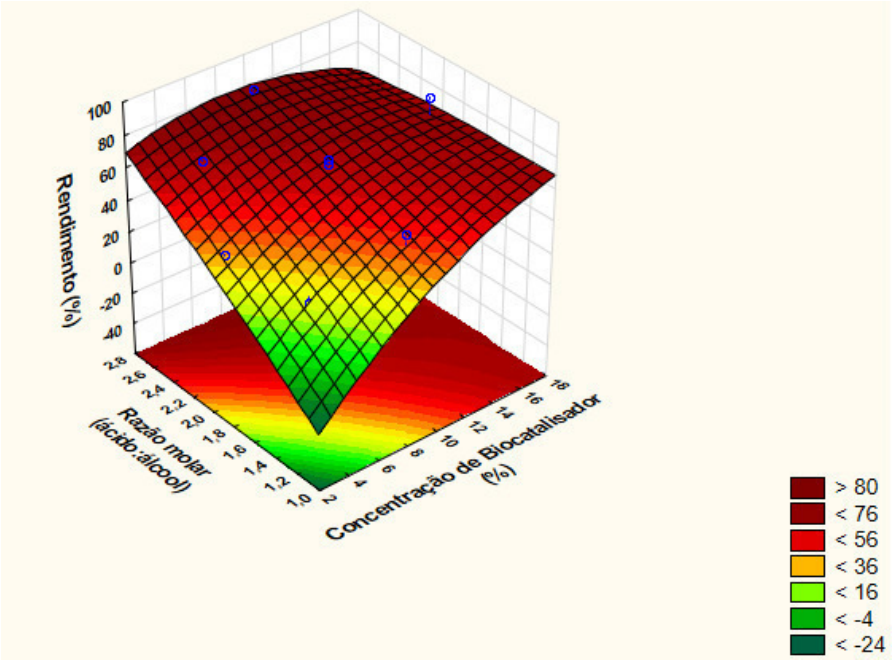
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	p
Modelo	2707,006	5	541,401	7,312	0,024
A- Concentração de biocatalisador	1066,058	1	1066,058	14,398	0,013
B- Razão molar	1164,025	1	1164,025	15,722	0,011
AB	295,065	1	295,065	3,985	0,102
A^2	178,253	1	178,253	2,408	0,182
B^2	4,567	1	4,567	0,062	0,814
Resíduo	370,201	5	74,040		
Falta de Ajuste	344,157	3	114,719	8,809	0,104
Erro Puro	26,045	2	13,022		
Cor Total	3077,207	10			

Fonte: Próprio autor.

A Figura 5.13 ilustra a superfície de resposta gerada a partir dos dados obtidos do planejamento estatístico, na qual é possível notar que ambos os fatores: concentração do biocalisador e da razão molar, se comportam como função linear em relação ao rendimento de reação.

A região com os maiores valores de rendimento na faixa de razão molar (ácido:álcool) entre 2,2 a 2,71 e concentração de biocatalisador entre 10 e 17,07 % (m/v). Lage et al. (2016) observou comportamento similar quando variou a concentração do ácido oleico (0,5–2 $mol \cdot L^{-1}$) na síntese do oleato de isoamila empregando lipase *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em poli(metacrilato de propila) como biocatalisador. Esses autores constataram que o aumento da concentração do ácido no meio reacional, levava a um incremento na conversão da reação.

Figura 5.13 – Superfície de resposta gerada a partir do rendimento de reação em função da variação da concentração de biocatalisador e razão molar, empregando LG imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador.



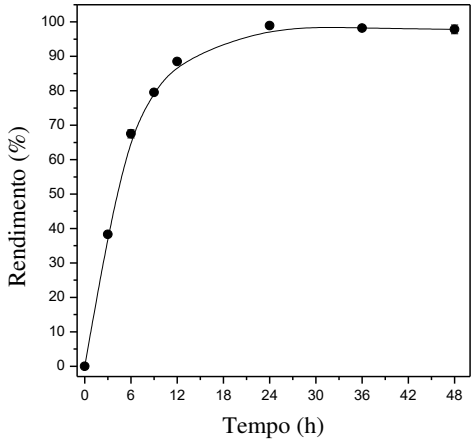
Fonte: Próprio autor.

Com o auxílio do programa estatístico Design-Expert 10.0, foi possível encontrar a condição ótima de concentração de biocatalisador e razão molar para obtenção máxima do rendimento de reação, na faixa estudada. As condições experimentais ótimas indicadas foram: nível α+ de concentração de biocatalisador (17,07% m/v) e nível α+ de razão molar (2,71), tendo como resposta, um rendimento de 92,15%. Para a confirmação do modelo, foi realizado um ensaio nessas condições, cujo rendimento da reação é mostrado na Figura 5.14.

De acordo com a Figura 5.14, observa-se que em 12 horas de reação o rendimento foi de 88,53%, apresentando uma diferença em relação ao valor predito do modelo de 3,93%, considerado satisfatório.

Similarmente à análise realizada para os testes empregando a LCR imobilizada em STY-DVB-M, também foi verificada a influência da quantidade de água presente no substrato no início da reação e ao final de 48h para os testes realizados empregando LG imobilizada em STY-DVB-M. Os resultados mostrados na Tabela 5.13, foram semelhantes aos encontrados nos testes empregando a LCR imobilizada em STY-DVB-M, ou seja, a quantidade de água presente no meio reacional não foi um fator considerado relevante e que pudesse interferir no progresso da síntese.

Figura 5.14 – Rendimento obtido na síntese do palmitato de isopropila empregando 0,271 mol·L^{-1} de ácido palmítico, 0,1 mol·L^{-1} de álcool isopropílico, 17,07% (m/v) de biocatalisador e 45ºC, catalisada pela lipase *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 5.13 – Resultados do teor de água presente no meio reacional no início e ao final de 48h de reação, empregando LG em STY-DVB-M como biocatalisador na síntese do palmitato de isopropila.

Ensaios	Teor de água inicial (ppm)	Teor de água inicial (ppm)
1	183	107
2	183	263
3	92	129
4	92	182
5	156	84
6	156	105
7	156	213
8	83	93
9	93	205
10	156	116
11	156	77

Fonte: Próprio autor.

5.5 Síntese do palmitato de isopropila conduzida em biorreator de tanque agitado

Para dar continuidade ao trabalho foi selecionado o biocatalisador obtido pela imobilização da lipase G em STY-DVB-M, por ter apresentado um melhor desempenho na síntese do palmitato de isopropila, atingindo rendimentos mais elevados.

Dessa forma, foi realizado um novo experimento, com ampliação de escala em um reator de tanque agitado. As condições empregadas para a realização do teste, foram as indicadas pelo delineamento experimental como ótimas:

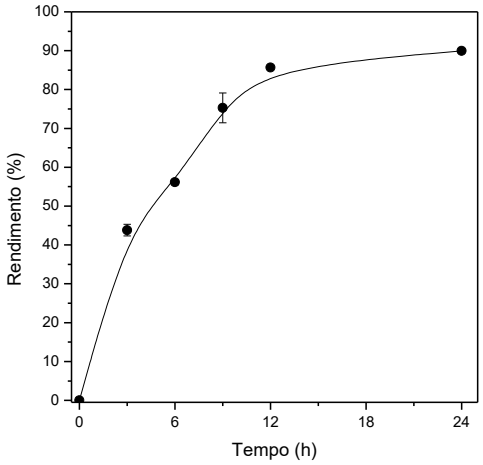
- ✓ Concentração de substrato: ácido palmítico a 0,271 $mol \cdot L^{-1}$ e álcool isopropílico a 0,1 $mol \cdot L^{-1}$ em meio heptano.
- ✓ Quantidade de biocatalisador: 17,01% (m/v), relação entre a massa de biocatalisador seco e volume total de meio reacional.
- ✓ Temperatura da reação: 45º C.
- ✓ Volume total do substrato: 100 mL.

As Figuras 5.15 e 5.16 mostram o aparato experimental empregado e o rendimento da síntese do palmitato de isopropila em função do tempo de reação, respectivamente.

Figura 5.15 - Aparato experimental utilizado para a realização da ampliação de escala em reator de tanque agitado.

Fonte: Próprio autor.

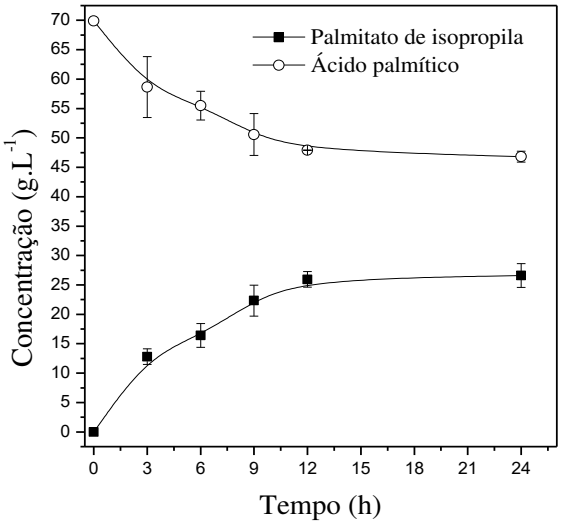
Figura 5.16 – Rendimento da síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M, empregando 0,271 mol·L-1 de ácido palmítico e 0,1 mol·L^{-1} de álcool isopropílico em meio heptano e 17,07% (m/v) de biocatalisador a 45ºC.



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 5.17 observa-se o perfil do consumo do ácido palmítico e da formação do palmitato de isopropila no experimento realizado com ampliação de escala.

Figura 5.17 – Perfil do consumo do ácido palmítico e da formação do palmitato de isopropila da reação de esterificação catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M, empregando 0,271 mol·L^{-1} de ácido palmítico e 0,1 mol·L^{-1} de álcool isopropílico em meio heptano e 17,07% (m/v) de biocatalisador a 45ºC.



Fonte: Próprio autor.

Analisando as Figuras 5.16 e 5.17 é possível observar que o teste efetuado com ampliação de escala obteve resultados muito similares ao realizado em frasco agitado, atingindo rendimento de 85,68% em 12 horas de reação (confirmando resultando obtido anteriormente), apresentando 25,93 $g \cdot L^{-1}$ de éster e produtividade de 2,16 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$.

No entanto, foi observado a "quebra" das partículas do suporte do biocatalisador no interior do biorreator, devido ao cisalhamento causado pela hélice do impelidor do agitador mecânico. Dessa forma, como alternativa para solucionar este problema, foi realizado um teste em reator de leito fixo, visto que este tipo de biorreator não apresenta a desvantagem das elevadas tensões de cisalhamento proveniente da agitação mecânica.

5.6 Síntese do palmitato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo

5.6.1 Síntese do palmitato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo em meio heptano

Visando evitar o cisalhamento das partículas poliméricas, foi realizado um teste em um reator de leito fixo, empregando condições muito similares às utilizadas no reator de tanque agitado (item 5.4), sendo utilizado como biocatalisador a lipase G imobilizada em STY-DVB-M, razão molar de 2,71:1 (ácido:álcool) em meio heptano e temperatura de 45 ˚C. Este experimento foi conduzido em uma coluna de vidro encamisada (16,6 mm de altura e 10 mm de diâmetro interno) e operado de modo descontínuo, ou seja, com reciclo do meio reacional.

Para o empacotamento do leito foram utilizadas 4,3 g do biocatalisador seco (densidade cristalina de 1,11 $g.mL^{-1}$), volume total de substrato de 40 mL (incluindo o reservatório do substrato), e vazão de recirculação de 1,5 $mL.min^{-1}$. Vale ressaltar que estas condições experimentais resultaram numa proporção de aproximadamente 10% de volume de substrato/massa de biocatalisador, sendo estabelecida como um parâmetro para os testes subsequentes.

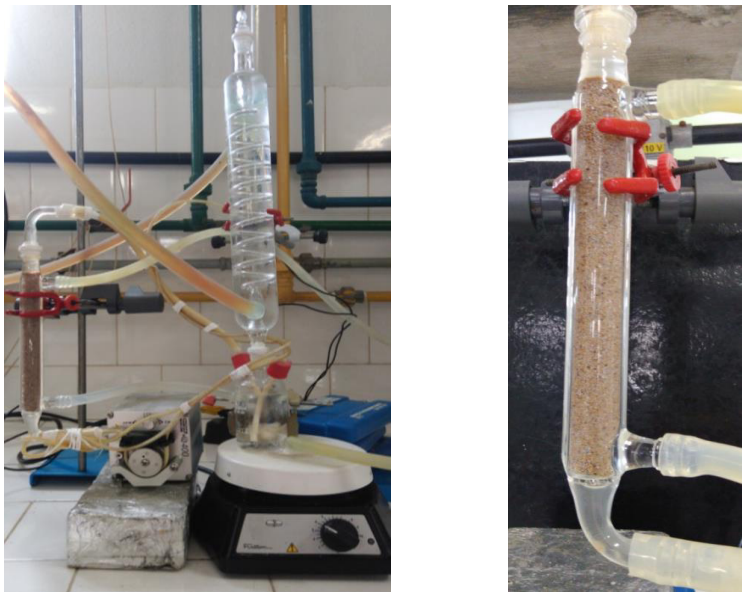
No entanto, no decorrer da reação, foi observado uma diminuição do volume reacional, em função da redução do nível de substrato do reservatório, concentrando os reagentes e produtos, e impossibilitando a quantificação do éster formado. Tentando minimizar a evaporação do solvente ou a percolação do mesmo pelas conexões ou mangueiras, todas as mangueiras foram substituídas por mangueiras de marprene, vedadas

todas as conexões e adaptado um condensador de refluxo ao sistema (Figura 5.18). No entanto, o problema persistiu, impossibilitando a operação do sistema.

Dessa forma, foi realizado um novo teste, sem o emprego do reservatório de substrato, recirculando somente o meio reacional presente no reator de coluna e nas mangueiras (volume total de 25 mL). No entanto, a evaporação/percolação do solvente do meio reacional permanecia. Sendo assim, na tentativa de operar o processo, foram realizados alguns testes empregando diferentes solventes menos voláteis, como alternativas para substituição do heptano.

Figura 5.18 - Sistema operacional do biorreator de leito fixo com recirculação e com condensador de refluxo adaptado: a) Sistema experimental e b) coluna empacotada.

a) b)



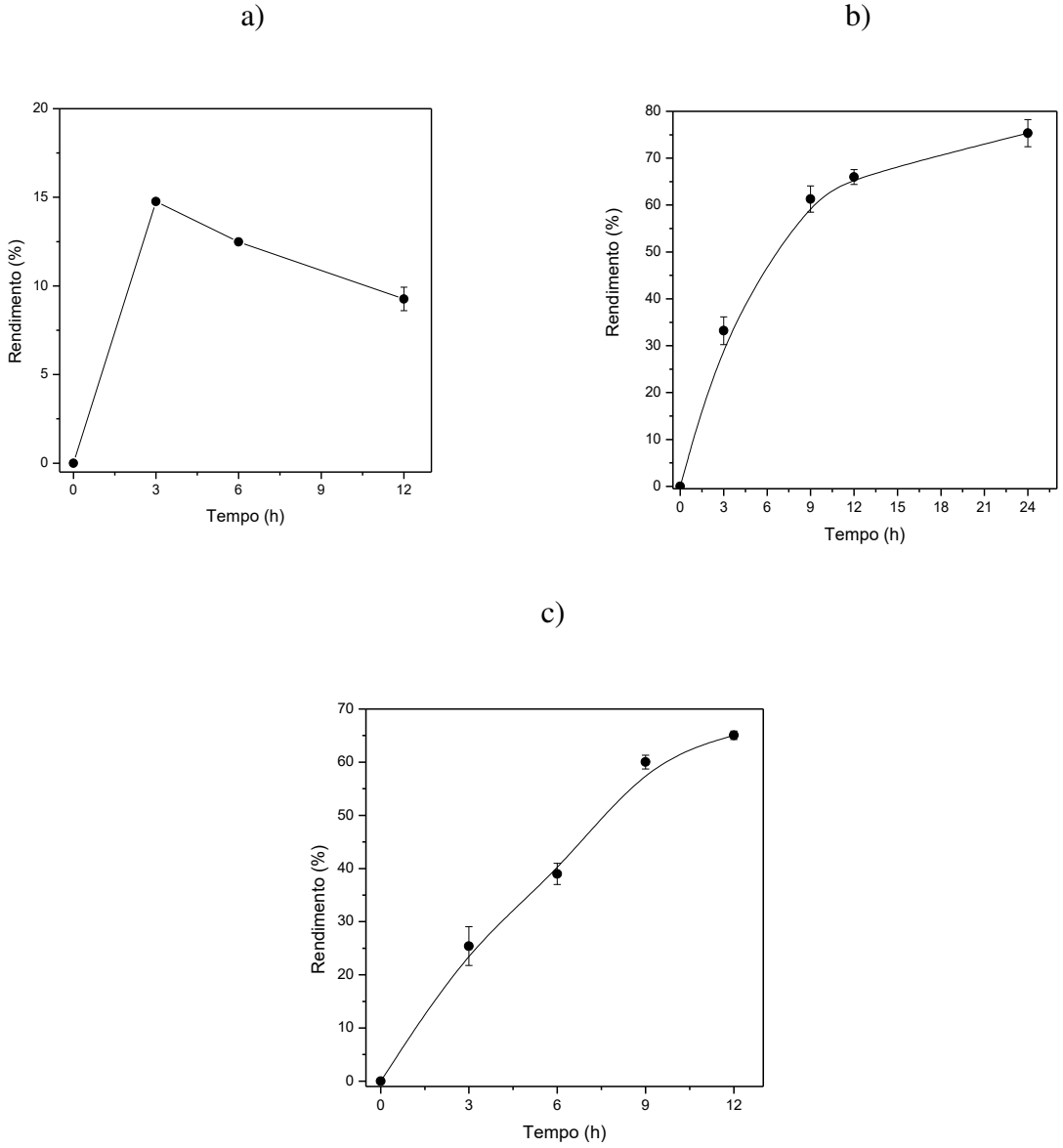
Fonte: Próprio autor.

5.6.2 Seleção do solvente mais adequado para a síntese do palmitato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo

Visando selecionar um solvente que possibilitasse a operação do processo em biorreator de leito fixo, foram testados os seguintes solventes: álcool butílico terciário, iso-octano e decano (Figura 5.19). Estes testes foram conduzidos em frascos agitados (*shaker*) empregando as seguintes condições experimentais:

- ✓ Concentração do substrato: ácido palmítico a 0,271 mol.L^{-1} e álcool isopropílico a 0,1 mol.L^{-1} em meio solvente (razão molar ácido:álcool 2,71:1),
- ✓ Quantidade de biocatalisador: 10% (m/v),
- ✓ Temperatura da reação: 45˚C.

Figura 5.19 - Rendimento da síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M realizada a 45ºC em *shaker*, empregando 10% (m/v) de biocatalisador, 0,271 mol·L^{-1} de ácido palmítico e 0,1 mol·L^{-1} de álcool isopropílico em meio diferentes solventes: a) Álcool butílico terciário; b) Iso-octano e c) Decano.



Fonte: Próprio autor.

Observando a Figura 5.19 nota-se que apenas o experimento contendo o álcool butílico terciário como solvente, apresentou rendimento de reação muito baixo, inferior a 15%, e portanto inadequado para esta finalidade. Esse fato pode ser justificado por dois fatores:

• Polaridade do solvente - o álcool butílico terciário é considerado um solvente polar (log p = 0,317) e por esse motivo, pode acarretar uma redução da camada de hidratação da lipase, desidratando-a e reduzindo o seu poder de catálise;

• Elevada concentração de álcool no meio reacional - de acordo com os resultados obtidos anteriormente, o excesso do álcool desfavorece a síntese do éster. E nesse caso, como o solvente utilizado também é um álcool, a concentração total desse composto orgânico presente no meio reacional, pode ter dificultado o acesso do ácido graxo ao sítio ativo da lipase, gerando uma redução na taxa de formação do palmitato de isopropila.

Os demais experimentos apresentaram resultados muito semelhantes, alcançando rendimentos de 66,0% e 65,1%, respectivamente para os solventes iso-octano (log p = 4,09) e decano (log p = 5,80), no tempo de 12 horas.

Assim, para a realização de um novo teste no reator de leito fixo, foi selecionado o decano como solvente para o meio reacional, por apresentar baixa volatilidade e estrutura química bastante similar ao heptano. As condições experimentais empregadas foram as descritas no item 5.5.1, exceto com relação a substituição do solvente heptano por decano. No entanto, novamente foi observada uma redução significativa do volume do meio reacional, concentrando os reagentes e impossibilitando a operação do sistema.

Diante desses resultados julgou-se conveniente realizar o processo em questão em meio isento de solvente, o que aliás, suprime a toxicidade do processo.

5.6.3 Síntese do palmitato de isopropila em meio isento de solvente conduzida em biorreator de leito fixo

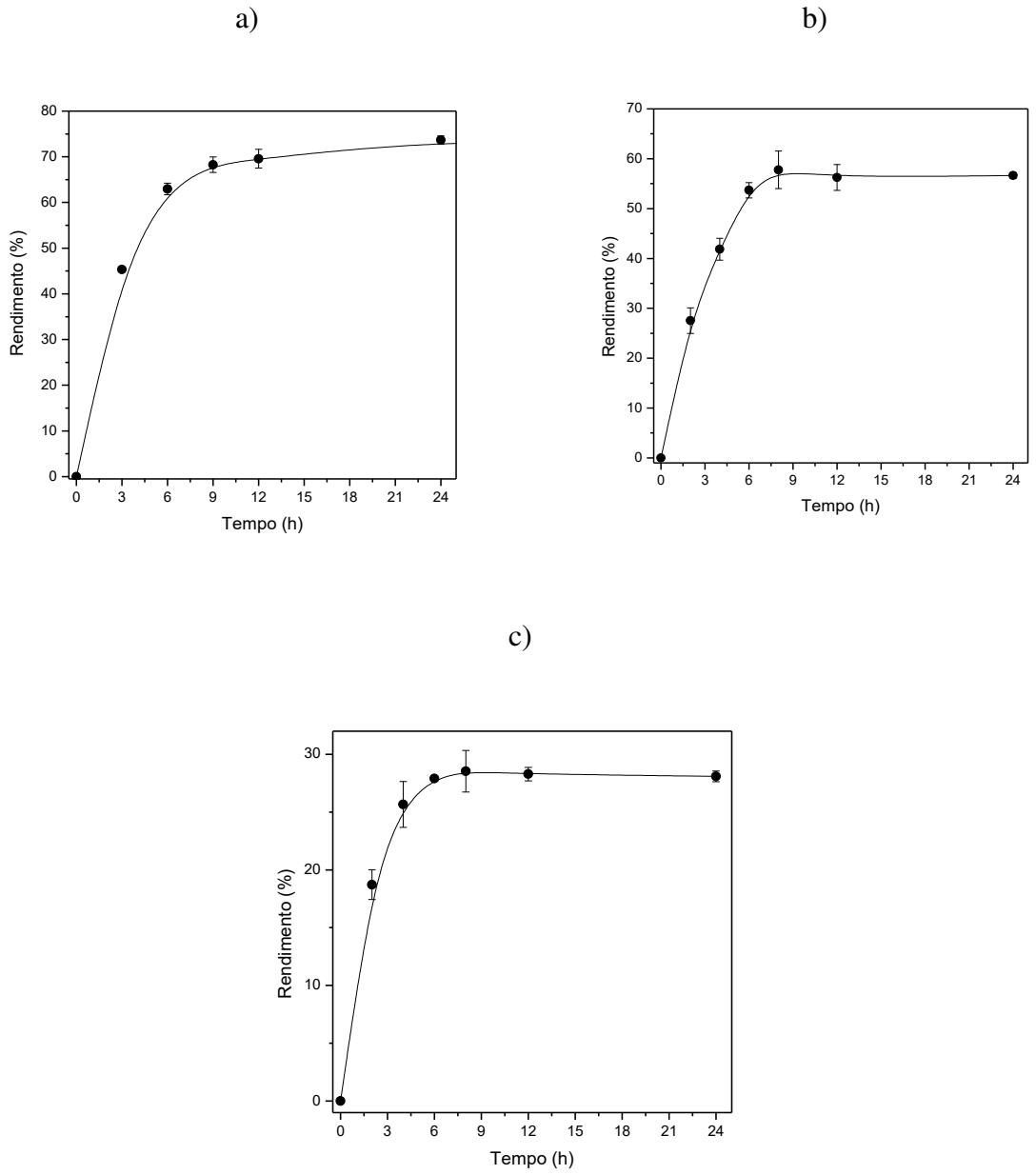
Visando selecionar uma condição experimental que possibilitasse a operação do processo em biorreator de leito fixo, foram testadas as seguintes razões molares de 1:3, 1:4 e 1:6 (ácido:álcool) em meio isento de solvente.

Ressalta-se que estas proporções foram as que permitiram a solubilização total do ácido graxo a 50°C, empregando-se a menor quantidade de álcool isopropílico. Esta estratégia foi adotada com o intuito de que a polaridade do meio reacional não ficasse muito elevada,

evitando assim, uma possível inibição da enzima lipase, em função da exposição de uma elevada concentração de álcool.

Inicialmente estes testes foram realizados em frascos agitados (*shaker*) e a Figura 5.20 ilustra os resultados obtidos.

Figura 5.20 - Rendimento da síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M realizada a 50ºC em *shaker*, empregando 10% (m/v) de biocatalisador em meio isento de solvente, em diferentes razões molares (ácido:álcool): a) 1:3, b) 1:4 e c) 1:6.



Fonte: Próprio autor.

Como pode ser observado na Figura 20, o teste que empregou a menor razão molar (1:3) foi o que apresentou o melhor resultado, atingindo cerca de 70% de rendimento em 12h de reação, seguido pela razão molar 1:4 (56,2%) e 1:6 (28,3%), respectivamente. Com esses resultados é possível afirmar que, a redução da quantidade de álcool isopropílico do meio reacional, elevou o rendimento da reação.

Resultados similares foram observados por Yu et al. (2015), que utilizaram lipase de *Candida rugosa* imobilizada em sílica mesoporosa como biocatalisador na esterificação do ácido linoleico com álcool etílico, em diferentes razões molares (ácido:álcool) 1:1 e 1:2, em meio iso-octano, para a síntese do linoleato de etila. Empregando razão molar de 1:1, o rendimento obtido foi de aproximadamente 54,9% e na razão molar de 1:2 de apenas 38,1%, em 8h de reação.

Garcia et al. (1999), estudando a síntese do palmitato de isopropila a partir da esterificação do ácido palmítico com álcool isopropílico empregando razão molar 1:1 (ácido:álcool), 75 °C e 5 (% m/m) de lipase imobilizada de *Candida antarctica* (Novozym 435), obteve aproximadamente 75% de rendimento em 2 horas de reação.

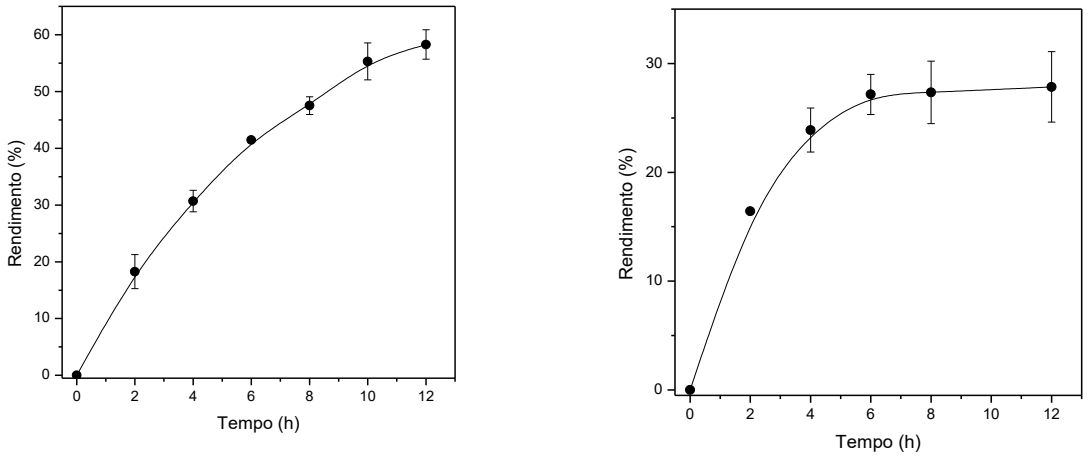
Como em todos os experimentos houve consumo do ácido palmítico, estas condições experimentais foram testadas em reator de leito fixo operado em modo descontínuo e com reciclo do meio reacional. No entanto, não foi possível operar o reator empregando a menor razão molar ácido:álcool (1:3), pois ocorreu solidificação do ácido palmítico no interior da coluna de vidro encamisada, nas conexões e mangueiras do sistema experimental utilizado.

A Figura 5.21 mostra os resultados obtidos para as demais razões molares testadas na síntese do palmitato de isopropila em reator de leito fixo com reciclo operado de modo descontínuo. Os resultados obtidos apresentaram o mesmo perfil dos testes realizados em frascos agitados (Figura 5.20), atingindo cerca de 56 e 28% de rendimento para as razões molares (ácido:álcool) de 1:4 e 1:6, respectivamente em 12h de reação.

A Figura 5.22 mostra o perfil do consumo do ácido palmítico e da formação do palmitato de isopropila ao longo da reação, para os experimentos que utilizaram razão molar de 1:4 e 1:6.

Figura 5.21 - Rendimento da síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em reator de leito fixo com vazão de reciclo 1,5 mL.min^{-1}, empregando 4,3 g de biocatalisador, 40 mL de substrato, sob temperatura de 50 ˚C, em diferentes razões molares (ácido:álcool): a) 1:4 e b) 1:6.

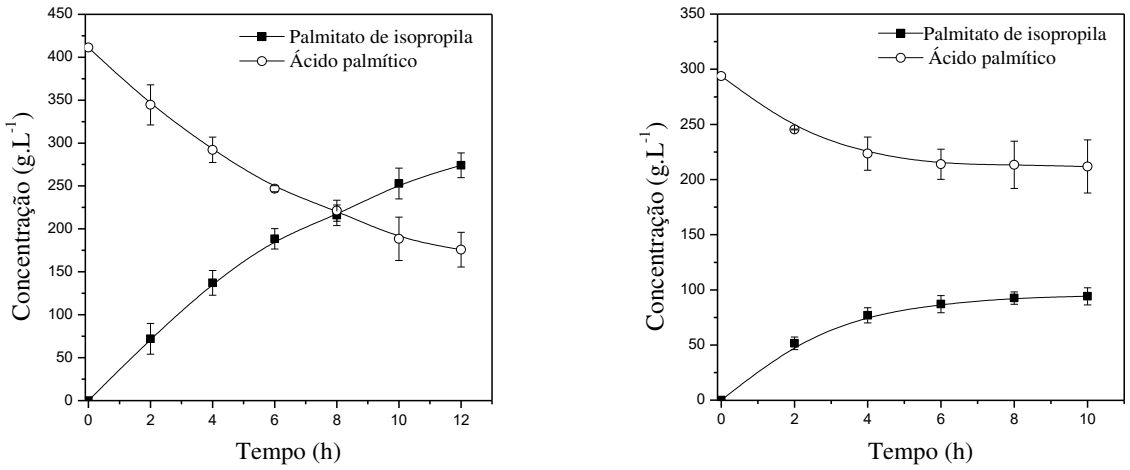
a) b)



Fonte: Próprio autor.

Figura 5.22 - Perfil do consumo do ácido palmítico e da formação do palmitato de isopropila na reação de esterificação catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em reator de leito fixo com vazão de reciclo 1,5 mL.min^{-1}, empregando 4,3 g de biocatalisador, 40 mL de substrato, sob temperatura de 50 ˚C, em diferentes razões molares (ácido:álcool): a) 1:4 e b) 1:6.

a) b)



Fonte: Próprio autor.

Quando utilizou-se razão molar de 1:4, a concentração do palmitato de isopropila foi de 215,88 $g.L^{-1}$ e produtividade de 26,87 $g.L^{-1}.h^{-1}$ em 08 horas de reação. Por outro lado, quando foi empregada a razão molar de 1:6 a concentração do éster foi de 92,59 $g.L^{-1}$ e produtividade de 11,57 $g.L^{-1}.h^{-1}$ no mesmo tempo reacional.

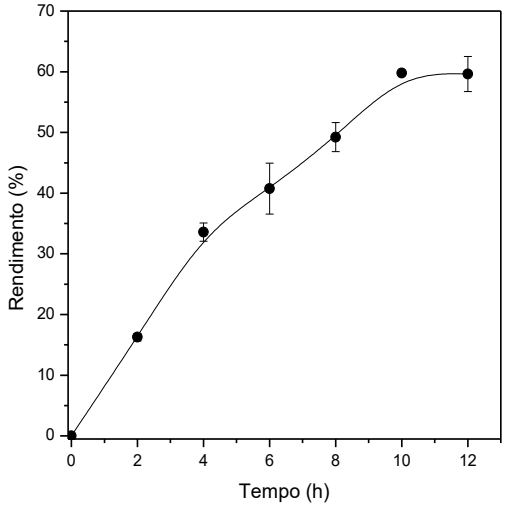
Buscando aumentar o rendimento do processo, foi realizado um novo teste utilizando como estratégia peneira molecular no reservatório de recirculação do substrato (20% m/v), visando assim, deslocar o equilíbrio da reação em função da remoção da água formada na reação de esterificação. As condições experimentais empregadas para a realização do experimento foram:

- ✓ Razão molar (ácido:álcool): 1:4;
- ✓ Quantidade de biocatalisador para empacotamento do leito: 4,3 g (massa seca);
- ✓ Volume total de substrato: 40 mL;
- ✓ Vazão de reciclo do substrato: 1,5 $mL.min^{-1}$;
- ✓ Peneira molecular: 8g;
- ✓ Temperatura: 50 ˚C.

A Figura 5.23 mostra os resultados obtidos para este teste, atingindo cerca de 58% de rendimento em 12h de reação. A Figura 5.24 mostra o perfil do consumo do ácido palmítico e da formação do éster em $g \cdot L^{-1}$ ao longo da reação.

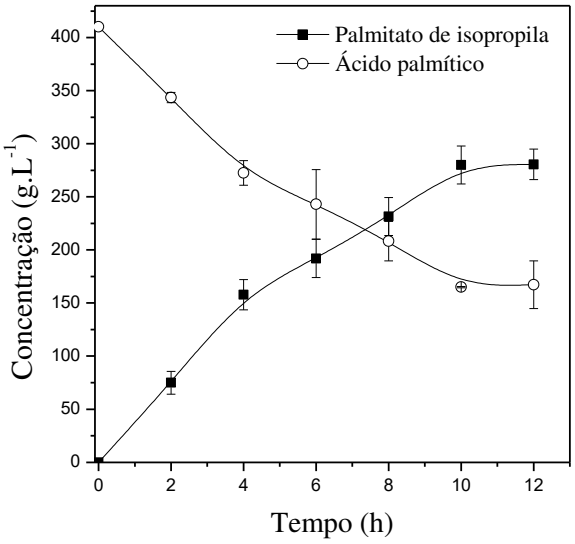
Nestas condições foi constatada concentração de 231,48 $g.L^{-1}$ de palmitato de isopropila e produtividade de 28,94 $g.L^{-1}.h^{-1}$, em 08 horas de reação, indicando que a remoção da água formada na reação de esterificação, pode ter contribuído para o deslocamento do equilíbrio reacional, melhorando o desempenho da catálise enzimática.

Figura 5.23 - Rendimento da síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em reator de leito fixo empregando razão molar (ácido:álcool) de 1:4 com vazão de reciclo 1,5 mL.min^{-1}, 4,3 g de biocatalisador, 40 mL de substrato contendo peneira molecular (20% m/v), sob temperatura de 50 ˚C.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5.24 – Perfil do consumo do ácido palmítico e da formação do palmitato de isopropila na reação de esterificação catalisada lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em reator de leito fixo empregando razão molar (ácido:álcool) de 1:4 com vazão de reciclo 1,5 mL.min^{-1}, 4,3 g de biocatalisador, 40 mL de substrato contendo peneira molecular (20% m/v), sob temperatura de 50 ˚C.

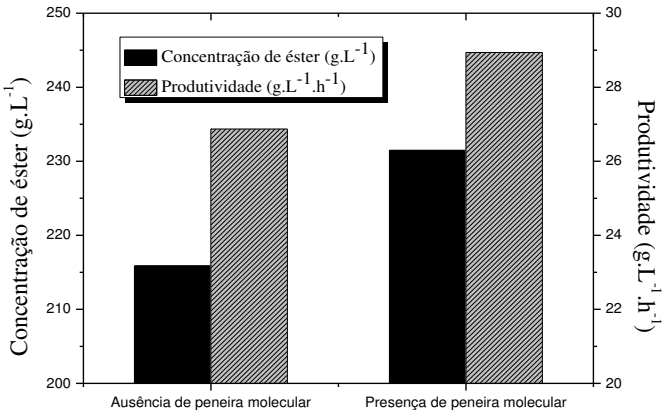


Fonte: Próprio autor.

A Figura 5.25 mostra uma comparação entre os valores de concentração e produtividade do éster palmitato de isopropila obtido em reator de leito fixo, na presença ou ausência de peneira molecular no reservatório de recirculação do substrato.

De acordo com a Figura 5.25 nota-se que quando empregou-se peneira molecular no interior do reservatório do substrato, observou-se um efeito benéfico na concentração e na produtividade do éster, apresentando um acréscimo de aproximadamente 7% na formação do palmitato de isopropila e consequentemente na sua produtividade.

Figura 5.25 - Comparação dos resultados obtidos para a síntese do palmitato de isopropila na reação de esterificação catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em reator de leito fixo empregando razão molar de 1:4 (ácido: álcool), em 8h de reação.



Fonte: Próprio autor.

5.7 - Comparação do desempenho de diferentes configurações de biorreatores na síntese do palmitato de isopropila em meio isento de solvente

Visando comparar o desempenho de diferentes configurações de biorreatores na síntese do palmitato de isopropila em meio isento de solvente, foram realizados testes em reator de tanque agitado, empregando as mesmas condições testadas para o bioprocesso em leito empacotado (razão molar (ácido:álcool): 1:4 e 1:6).

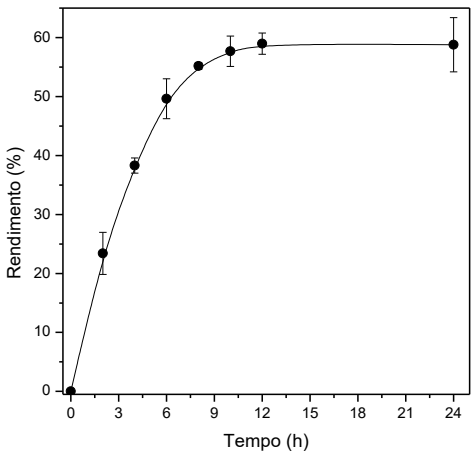
A Figura 5.26 mostra o aparato experimental e o rendimento da síntese do palmitato de isopropila em tanque agitado em meio isento de solvente e a Figura 5.27 mostra o perfil do consumo do ácido palmítico e da formação do éster em $g \cdot L^{-1}$ ao longo da reação.

Conforme observado na Figura 5.27, quando utilizou-se razão molar de 1:4, a concentração do palmitato de isopropila foi de 267,22 $g.L^{-1}$ e produtividade de 33,40 $g.L^{-1}.h^{-1}$ em 08 horas de reação, e para razão molar de 1:6 a concentração do éster foi de 89,85 $g.L^{-1}$ e produtividade de 11,23 $g.L^{-1}.h^{-1}$ no mesmo tempo reacional.

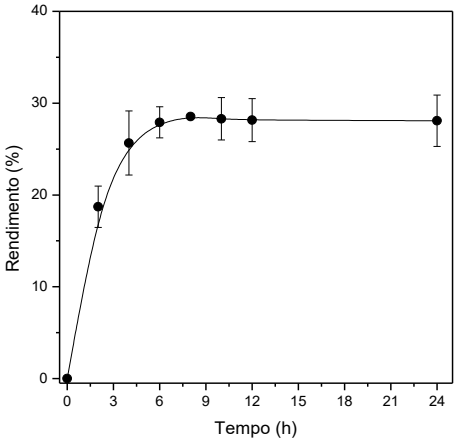
Figura 5.26 - Síntese do palmitato de isopropila catalisada pela lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em meio isento de solvente, realizada em reator de tanque agitado empregando 10% (m/v) de biocatalisador, 20 mL de substrato, sob temperatura de 50 ˚C, em diferentes razões molares (ácido:álcool): a) sistema experimental, b) rendimento da reação empregando razão molar de 1:4 e c) rendimento da reação empregando razão molar de 1:6.

a)

b)



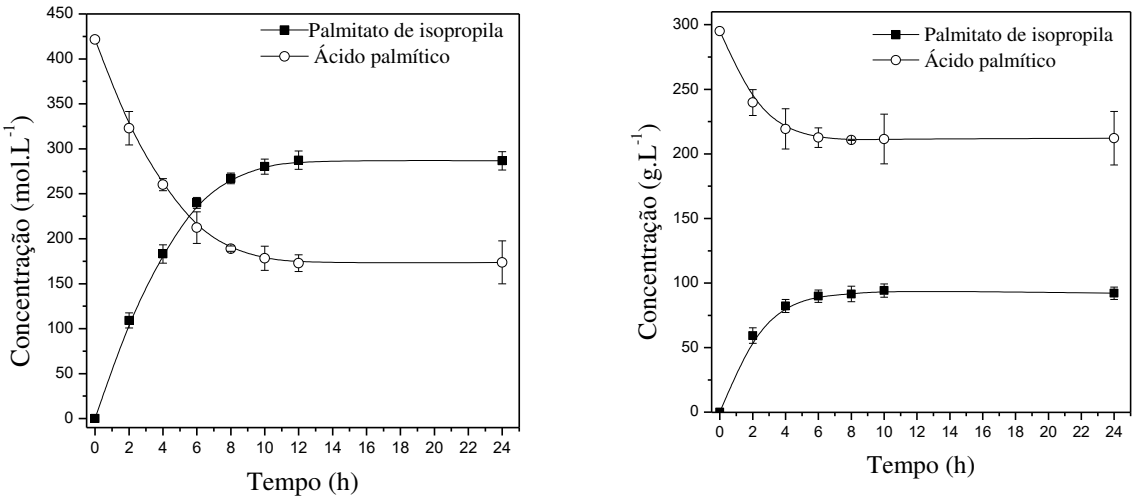
c)



Fonte: Próprio autor.

Figura 5.27 - Perfil do consumo do ácido palmítico e da formação do palmitato de isopropila na reação de esterificação catalisada lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M em reator de tanque agitado, 10 (% m/v) de biocatalisador, 20 mL de substrato, sob temperatura de 50 ˚C, empregando razão molar (ácido:álcool) de: a) 1:4; b) 1:6.

a) b)



Fonte: Próprio autor.

A Tabela 5.14 ilustra uma comparação da produtividade do palmitato de isopropila obtida nos biorreatores empregando as diferentes condições experimentais testadas.

Tabela 5.14 – Comparação da produtividade do palmitato de isopropila obtida em 8 horas de reação para os diferentes testes realizados.

Tipo de biorreator	Razão molar (ácido:álcool)	Peneira molecular (% m/v)	Solvente	Produtividade ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
	2,7:1	ausente	heptano	2,16
Tanque agitado	1:6	ausente	isento	11,23
	1:4	ausente	isento	33,40
	1:6	ausente	isento	11,57
Leito fixo	1:4	ausente	isento	26,87
	1:4	20	isento	28,94

* 0,271 $mol \cdot L^{-1}$ de ácido palmítico e 0,1 $mol \cdot L^{-1}$ de álcool isopropílico em meio heptano

Fonte: Próprio autor.

De acordo com a Tabela 5.14, de um modo geral, é possível constatar que os melhores resultados foram obtidos quando empregou-se menor razão molar (ácido:álcool) e meio isento de solvente (GARCIA et al .1999; YU et al., 2015).

Entre os testes realizados em tanque agitado, a maior produtividade (33,40 $g.L^{-1}.h^{-1}$) foi obtida em meio isento de solvente e empregando razão molar de 1:4 (ácido:álcool). Essa condição experimental também foi a que apresentou melhor desempenho para a síntese do éster em reator de leito empacotado, porém empregando peneira molecular no reservatório de recirculação (28,94 $g.L^{-1}.h^{-1}$).

A produtividade mais elevada obtida no reator de tanque agitado, pode ser explicada em função das próprias características desse tipo de biorreator, como a existência de uma agitação adequada, que confere ao meio reacional bom grau de mistura e distribuição de calor homogênea, contribuindo para um melhor rendimento da reação. Por outro lado, a utilização desta configuração confere a desvantagem do cisalhamento das partículas do biocatalisador, que impossibilita sua reutilização.

Dessa forma, julga-se que nas condições de estudo, a melhor opção para a síntese do palmitato de isopropila a partir da esterificação empregando a lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M, é a sua condução em reator de leito fixo, empregando as menores razões molares entre ácido:álcool e em meio isento de solvente.

6 CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que o copolímero de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado com magnetita modificada possui potencial para aplicação como suporte para a imobilização de enzimas, visto que os biocatalisadores obtidos pela imobilização das lipases de *Candida rugosa e* de *Penicillium camemberti* nesse copolímero, apresentaram bom desempenho de catálise na síntese do palmitato de isopropila. A partir dos estudos realizados foi possível verificar que:

- A concentração do agente de suspensão (PVA) e a agitação do meio reacional na polimerização exercem grande influência na distribuição granulométrica do polímero sintetizado. A análise estatística indicou que o efeito da agitação na massa útil de STY-DVB-M formada é linear e positivo e o efeito da interação entre a agitação e a concentração de PVA é negativo, ou seja, quanto menor a concentração de PVA, maior deve ser a agitação empregada durante a polimerização.

- Para a LCR imobilizada em STY-DVB-M os efeitos lineares da razão molar e da concentração de biocatalisador, bem como o efeito quadrático da razão molar e a interação entre esses dois fatores foram significativos, ou seja, influenciaram o rendimento da reação de síntese do palmitato de isopropila. Os valores mais elevados de rendimento foram obtidos na faixa de 2,0 à 2,4 (ácido:álcool) de razão molar e 14,0 à 17,07 % (m/v) de concentração de biocatalisador. As condições experimentais ótimas indicadas foram: nível α+ de concentração de biocatalisador (17,07% m/v) e nível central de razão molar (2,0). Em 12 horas de reação, foi obtido rendimento de 75,60 %.

- Para a LG imobilizada em STY-DVB-M ambos os fatores de concentração do biocatalisador e da razão molar, se comportam como uma função linear em relação ao rendimento de reação da síntese do palmitato de isopropila. Os maiores valores de rendimentos foram obtidos na faixa de razão molar (ácido:álcool) entre 2,2 a 2,71 e concentração de biocatalisador entre 10 e 17,07 % (m/v). As condições experimentais ótimas indicadas foram: nível α+ de concentração de biocatalisador (17,07% m/v) e

nível α+ de razão molar (2,71). Em 12 horas de reação, foi obtido um rendimento de 88,53 %.

- O teste efetuado com ampliação de escala no reator de tanque agitado atingiu rendimento de 85,68% em 12 horas de reação, apresentando 25,93 $g \cdot L^{-1}$ de éster e produtividade de 2,16 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$. No entanto, foi observado o cisalhamento das partículas do suporte do biocatalisador no interior do biorreator, em função da agitação mecânica.

- Não foi possível operar o sistema experimental empregando biorreator de leito fixo em meio solvente, devido a ocorrência da sua evaporação/percolação do meio reacional durante a realização da reação de esterificação.

- Dentre as razões molares testadas em reator de leito fixo 1:3, 1:4 e 1:6 (ácido:álcool) em meio isento de solvente, a condição na qual foi possível operar o sistema e que apresentou o melhor resultado foi a razão de 1:4, apresentando 56% de rendimento em 12h de reação, 215,88 $g.L^{-1}$ do palmitato de isopropila e produtividade de 26,87 $g.L^{-1}.h^{-1}$, em 08 horas de reação.

- Constatou-se que na condução do sistema em reator de leito fixo, a utilização de peneira molecular no reservatório do substrato, apresentou um efeito benéfico para a síntese do palmitato de isopropila, atingindo concentração de 231,48 $g.L^{-1}$ e produtividade de 28,94 $g.L^{-1}.h^{-1}$ para o éster, em 08 horas de reação, o que representa aproximadamente 7% de acréscimo. Este dado indica que a remoção da água formada na reação de esterificação, contribuiu para o deslocamento do equilíbrio reacional, melhorando o desempenho da catálise enzimática.

- Comparando-se o desempenho da síntese do palmitato de isopropila nos biorreatores testados, a produtividade mais elevada foi obtida no biorreator de tanque agitado (33,40 $g.L^{-1}.h^{-1}$). No entanto, o cisalhamento do suporte observado, sugere que esta configuração não é a mais indicada, selecionando-se o biorreator de leito fixo como o mais adequado para esta aplicação.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos é possível vislumbrar a continuidade dos estudos para obtenção do palmitato de isopropila a partir da catálise enzimática empregando lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno). Para esta finalidade, sugere-se

- ✓ Estudar a síntese do palmitato de isopropila em outras configurações de biorreatores e modo de operação do bioprocesso: como por exemplo o reator de tanque agitado "tipo cesta" e o reator de leito fixo operado em modo contínuo.

- ✓ Avaliar o desempenho de diferentes lipases para a síntese do palmitato de isopropila, como a lipase de *Candida antarctica* e de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno).

- ✓ Sintetizar outros tipos de suportes híbridos poliméricos magnéticos a partir de diferentes composições químicas (monômeros), visando aumentar a resistência mecânica dessas partículas.

- ✓ Utilizar subprodutos industriais como fonte de matéria-prima para a síntese de ésteres emolientes, como por exemplo a borra ácida (óleo ácido) e os ácidos graxos destilados oriundos dos processos de refino de óleos vegetais, visando reduzir o custo final do bioprocesso.

REFERÊNCIAS

ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético), **Anuário 2014**. Disponível em: <http://abihpec.org.br/anuario-2014/>. Acesso em 02 Ago. 2016.

ADAMS, M. W. W.; PERLER, F. B.; KELLY, R. M. Extremozymes: Expanding limits of biocatalysis. **Nat. Biotechnol.**, v.13, p. 662-668, 1995.

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 6406-6436, 2012.

AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. **Bol. Biotecnol.**, n.72, p.2-13, 2002.

ANBU, P. M. J. et al. Screening and optimization of extracellular lipases by *Acinetobacter* species isolated from oil-contamined in South Korea. **Afr. J. Biotechnol.**, v.10, p. 4147-4156, 2011.

ANDUALEMA, B.; GESSESSE A. Microbial lipases and their industrial applications: review. **Biotech.**, v.11, p.100-118, 2012.

ARONNE, A. et al. Structural characterization of MAPLE deposited lipase biofilm. **Appl. Surf. Sci.**, v. 320, p.524-530, 2014.

BARRETO, A. C. H. et al. Novel ferrofluids coated with a renewable material obtained from cashew nut shell liquid. **Microfluid. Nanofluid.**, v.12, p.677-686, 2012.

BASSI, J. J. et al. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 92, p. 900-909, 2016.

BENTO, H. B. S. **Preparação e caracterização de biocatalisadores a partir de lipases imobilizadas em partículas magnetizadas de poli(estireno-co-divinilbenzeno)**. 2015. 94p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, EEL-USP, Lorena. 2015.

BENTO, H. B. S. et al. Magnetized poly(STY-co-DVB) as a matrix for immobilizing microbial lipase to be used in biotransformation. **J. Magn. Magn. Mater.**, 426, 95-101, 2017.

BON, E. P. S.; et al. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência LTDA, 2008, 505 p.

BRUNO, L. M.; LIMA FILHO, J. L.; DE CASTRO, H. F. Comparative performance of microbial lipases immobilized on magnetic polysiloxane polyvinyl alcohol particles. **Braz. Arch. Biol. Techn.**, v.51, n.5, p889-896, 2008.

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. **Biocatalysts and Enzyme Technology**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, 448 p.

CALLISTER Jr., W. D; RETHWISCH, D. G. **Ciência e engenharia dos materiais** – uma Introdução. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos S.A., 2012. 817 p.

CANEVAROLO JR, S. V. **Ciência dos polímeros**. São Paulo: Editora Artliber, 2010. 280 p.

CAO, L. **Carrier-bound immobilized enzymes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. 563 p.

CARRAHER, JR. C. E. **Introduction to polymer chemistry**. Boca Raton: CRC PRESS, 2013. 530 p.

CASTIGLIONI, G. L. et al. Application of Poly(styrene-co-divinylbenzene) macroporous microparticles as a catalyst in the enzymatic synthesis of biodiesel. **J. Polym. Environ.**, 2016 doi:10.1007/s10924-016-0769-4.

CHANDA, M. **Introduction to polymer science and chemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2006. 640 p.

CHEN, S. J.; CHENG, C. Y.; CHEN, T. L. Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. **J. Ferment. Bioteng**., v. 86, p 308-312, 1998.

CHIARADIA, V. et al. Simultaneous single-step immobilization of *Candida antarctica* lipase B and incorporation of magnetic nanoparticles on poly(urea-urethane)nanoparticles by interfacial miniemulsion polymerization. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v.131, p. 31-35, 2016.

CHISTI, Y. Bioreactor design. In: RATLEDE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic biotechnology**. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2006. Cap.7, p.181-200.

CIRILO L. C. M. et al. Influência do grau de hidrofobicidade de suportes poliméricos com morfologia casca-núcleo na imobilização de lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – COBEQ, 20., 2014. Florianópolis. **Anais**... São Paulo: Blucher, 2015. p. 366-374.

COEY, J. M. D. **Magnetism and magnetic materials**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. 614 p.

COSTA E SILVA, W. **Produção de Biodiesel a partir de óleos láuricos em reatores de leito fixo duplo estágio incorporado coluna extratora do glicerol formado como subproduto**. 2013. 131p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, EEL-USP, Lorena. 2013.

CULLITY, B. D.; GHAHAM, C. D. **Introduction to magnetic materials**, 2nd ed. Weinheim: WILEY, 2009. 568p.

CUSTODIO, A. A. C. **Estudo de pré-formulação e desenvolvimento de cosméticos – Linhas Healthy and Beauty**. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2014, 79p.

DAMNJAZOVIC, J. J. et al. Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 75, p. 50-59, 2012.

DAMSTRUP, M. L. et al. Process development of continuous glycerolysis in an immobilized enzyme-packed reactor for industrial monoacylglycerol production. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 7786-7792 2007.

DE CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine Chemicals by biotransformation using lipases. **Quim. Nova.,** v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.

DE CASTRO, H. F. et al. Modificação enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício. In: BIOCATÁLISE e biotransformação: fundamentos e aplicações. São Paulo: Schoba, 2010, v.1. p.275-337.

DIZGE, N.; KESKINLER, B.; TANRISEVEN, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene–divinylbenzene copolymer. **Biochem. Eng. J.**, v. 44, p. 220-225, 2009.

DUSSÁN, K. J.; CARDONA, C. A.; GIRALDO, O. Immobilization and characterization of the *Candida rugosa* lipase enzyme on magnetic particles. **Rev. Mex. Fís.**, v. 58, p.47-51, 2012.

EL-SHAFEI, H. A.; REZKALLAH, L. A. Production, purification and characterization of *Bacillus* lipase. **Microbiol. Res.**, v. 52. p. 199-208, 1997.

FISCHER, L. et al. Catalytic potency of β- glucosidase from the extremophile *Pyrococus furiosus* in glucoconjugate synthesis. **Bio. Technol.**, v.14, p. 88-91, 1996

FREITAS, L. **Estratégias para desenvolvimento de um sistema operacional eficiente para a produção enzimática de monoglicerídeos**. 2009. 154 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, EEL-USP, Lorena. 2009.

FREITAS, L. et al. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camemberti* lipase immobilized on epoxy SiO2-PVA composite. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v.65, p.87-90, 2010.

FREITAS, L. et al. Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor. **Eur. Food Res. Technol.**, v.233, p.743-750, 2011.

FRIED, J. R. **Polymer science & technology**. 2nd ed. Westford, Massachusetts: Prentice Hall: 2003. 582p.

GARCIA-DIEGO, C.; CUELLAR J. Synthesis of Macroporous Poly (styrene-co-divinylbenzene) Microparticles Using n-Heptane as the Porogen: Quantitative Effects of the DVB Concentration and the Monomeric Fraction on Their Structural Characteristics. **Ind. Eng. Chem. Res.**, n. 44, p. 8237-8247, 2005.

GARCIA, T. et al. Kinetic modelling of esterification reactions catalyzed by immobilized lipases. **Chem. Eng. Sci.**, v. 51. n. 11, p. 2841-2846, 1996.

GARCIA, T. et al. Enzymatic synthesis of fatty esters Part I. Kinetic approach. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 25, p. 584-590, 1999.

GLOGAUER, A. V. P. et al. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbiol. Cell Fact.**, v. 10, p. 54-54, 2011.

GONÇALVES, C. G. S.; MARSAIOLI, A. J. Fatos e tendências da biocatálise. **Quim. Nova**, v. 36, n. 10, p.1587-1590, 2013.

GORCEA, M.; LAURA, D. Evaluating the physiochemical properties of emollient esters for cosmetic use. **International Specialty Products (ISP)**, v. 31, 2013.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press, 2006. 449 p.

GUO, Z.; BAI, S.; SUN, Y. Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. **Enzyme and Microb. Technol.**, v.32, n.7, p.776-782, 2003.

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

JAHANZAD, F.; SAJJADI, S.; BROOKS, B. W. Characteristic intervals in suspension polymerization reactors: An experimental and modelling study. **Chem. Eng. Sci.**, v. 60, p. 5574-5589, 2005.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, p.801-821, 2014.

JILES, D. **Introduction to magnetism and magnetic materials**. Boca Raton: CRC PRESS, 1998, 536 p.

KAIEDA, M. T.; SAMUKAWA, A. K.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 91, p.12-15, 2001.

KEE, C. Y. G.; HASSAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Studies on the kinetics of isopropyl palmitate synthesis in packed bed bioreactor Using Immobilized Lipase. **Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.**, v.27, p. 393-398, 1999.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. **Process Biochem.**, v. 50, p. 1793-1806, 2015.

KOJIMA, Y. M.; YOKOE, M.; MASE, T. Purification and characterization of alkaline lipase from *Pseudomas fluorescens* AK102. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 58, p. 1564-1568, 1994.

LACZKOWSKI, I. M. **Efeito magneto-óptico em mistura binária dopada com ferrofluído**. 2010. 116p. Tese (Doutorado em Física) – Universidade de Maringá, UEM, Maringá. 2010.

LAGE, F. A. P. et al. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 84, p. 56 -67, 2012.

LEE, H. K. et al. Purification and characterization of cold active lipase from *Psychrotrophic Aeromanas sp*. LPB 4. **J. Microbiol.**, v. 41, p. 22-27, 2003.

LIESE, A. et al. Processes. In INDUSTRIAL biotransformation. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2006, p. 273–320.

LIMA, W. A. **Síntese e caracterização de compósitos polianilina/poli(estireno-co-divinilbenzeno) para Adsorção de Ânions [SnCl4]$^{-2}$**. 2013. 120p. Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás – IQ/UFG, Goiânia. 2013.

LIU, Y.; SELLMYER, D. J.; SHINDO, D. Handbook of advanced magnetics materials. In: NANOSTRUCTURAL effects. New York: Springer, 2006, 377 p. v. 1.

LOTRAKUL, P.; DARHMSTHITI, S. Lipase production by *Aeromas sobria* LP004 in a medium containing whey and soybean meal. World. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 13, p. 163-166, 1997.

MACHADO, R. A. F. et al. Mathematical modeling of polystyrene particle size distribution produced by suspension polymerization. **Braz. J. Chem. Eng.**, v.17, p. 395-405, 2000.

MANO, B. M.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. Rio de Janeiro: Editora Blucher, 1999. 191p.

MARTINS, A. B. et al. Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene–divinylbenzene beads. **Bioresource Technol.**, v. 133, p. 417-422, 2013.

MENG, X. et al. Improvements of lipase performance in high-viscosity system by immobilisation onto a novel kind of poly(methylmethacrylate-co-divinylbenzene) encapsulated porous magnetic microsphere carrier. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 89, p.86-92, 2013.

NAJAFPOUR, G. D. Bioreactor Design. In: **BIOCHEMICAL engineering and biotechnology**. Netherlands: Elsevier, 2007. Cap 6, p.142-169.

NANODERMA LTD. AMMON SINTOV, HAIM LEVY. TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW**. Pharmaceutical compositions based on a microemulsion.** US 2010/0034880 A1. FEB. 5, 2008. FEB 11, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 5th ed, 2011, 1273 p.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticlesas versatile carriers and supporting materials for enzymes. **J. Mol. Catal. B-Enzym.,** v. 85-86, p. 71–92, 2013.

NISHAT, R. K.; VIRENDRA, K. R. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. **Process Biochem.**, v. 50, p. 1793-1806, 2015.

OLIVEIRA, P. C. et al. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno divinilbenzeno. **Quim. Nova**, v.23, n.5, p.632-636, 2000.

OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v.64, p.140-145, 2010

PAVIA, D. L. et al. **Introduction to spectroscopy.** Stamford:. Cengage Learning, 5 ed. 2014. 784 p.

PEREIRA JR, N. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008, 63p.

PINTO, M. C.; FREIRE, D. M. G.; PINTO, J. C. Influence of the Morphology of Core-Shell Supports on the Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica*. **Molecules**, v. 19, p. 12509-12530, 2014.

PIRES-CABRAL, P.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. **Biochem. Eng. J.**, v. 48, p. 246-252, 2010.

POLSHETTIWAR, V. et al. Magnetically Recoverable Nanocatalysts. **Chem. Rev.**, v.111, p.3036-3075, 2011.

RAGHAVENDRA, T.; SAYANIA, D.; MADAMWAR, D. Synthesis of the 'green apple ester' ethyl valerate in organic solvents by *Candida rugosa* lipase immobilized in MBGs in organic solvents: Effects of immobilization and reaction parameters. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 63, p. 31-38, 2010.

RAJMOHAN, S.; DODD, C. E.; WAITES, W. M.; Enzymes from isolates of *Pseudomas fluorescens* involved in food spoilage. **J. Applied Microbiol.**, v. 93, p, 205-213, 2002.

RAMOS, K.; TEIXEIRA, L. F.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Influência da relação geométrica do reator de leito fixo na produção contínua de biodiesel enzimático em meio isento de solvente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – COBEQ, 20., 2014. **Anais**... São Paulo: Blucher, 2015. p. 1679-1686.

REN, Y. et al. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. **BMC Biotechnol.**, v.11, p.63, 2011.

ROBLES-MEDINA, A. et al. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, p. 398-408, 2009

SALIHU, A; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: a review. **Process Biochem.**, v. 50, p. 86-96, 2015.

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

SANTOS, J. C. et al. Lipase-catalyzed synthesis of butyl esters by direct esterification in solvente-free system. **J. Chem. Technol. Biot.**, v.82, p.956-961, 2007.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA. 2001. v.2 541 p.

SCHORKEN, U.; KEMPERS, P. Lipid biotechnology: industrially relevant production process. **Eur. J. Lipid Sci. Tech.**, v. 111, p. 627–645, 2009.

SHIMADA, Y. et al. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 76, p. 789-793, 1999.

SMITH, E.W.; MAIBACH H.I. **Percutaneous penetration enhancers:** the fundamentals. Florida: Editor CRC, 1995.

TADROS, T. F. Industrial applications of dispersions. **Adv. Colloid Interfac.**, v. 46, p. 1-47, 1993.

TODERO, L. M. et al. Enzymatic syntheses of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability e mass transfer studies. **Bioprocess. Biosyst. Eng.**, v. 38, p. 1601-1613, 2015.

TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap.7. p.337-357.

URIOSTE, D. et al. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presente no biodiesel a partir de óleo de babaçu. **Quim. Nova**, v. 31, No.2, p. 407-412, 2008.

VADGAMA, R. M.; ODANETH, A. A.; LALI, A. M. Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase médium Part I: Batch optimization studies. **Biotechnol. Rep.**, v.8, p. 133-137, 2015.

VAZ, M.; CHOUPINA, A. Lipases: biocatalizadores da hidrólise de triacilglicerois. **R. E. B.**, v.5, p,42-58, 2012.

VERMA, M. L.; BARROW, C. J.; PURI, M. Nanobiotechnology as a novel paradigma for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel production. **Appl. Microbiol. Biot.**, v.97, p.23-39, 2013.

VILAS BOAS, R. N. et al. Síntese enzimática do caprilato de isopentila utilizando óleo fusel como matéria-prima. **Quim. Nova**, p. 1-7, 2017.

VIVALDO-LIMA, E. et al. An updated review on suspension polymerization. **Ind. Eng. Chem. Res**., v. 36, p. 939-965, 1997.

WANG, Y. K. C.; SRIVASTAVA G. J.; SHEN H. J. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic Bacillus straind A30-1 (ATCC 53841). **J. Ferment. Bioeng.**, v. 79, p. 433-438, 1995.

WILLIMANN H. et al. Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs. **J. Pharm. Sci.,** v. p. 1992.

YONG, Y. et al. Preparation and application of polymer-grafted magnetic nanoparticles for lipase immobilisation. **J. Magn. Magn. Mater.**, v. 320, p. 2350– 2355, 2008.

YU, W. H. et al. Immobilization of Candida rugosa lipase on MSU-H type mesoporous sílica for selective esterification of conjugated linoleic acid isomers with etanol. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 111, p. 43-50, 2015.

ZANIN, G. M.; MORAES, F, F. Enzimas imobilizadas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2014. Cap.4. p.41-84.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada**. 1989. 454 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1989.

ZHANG, B. et al. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Appl. Microbiol. Biot.**, v.93, p.61-70, 2012.

ZHENG, M.; DONG, L.; LU, Y; GUO P.; DENG, Q.; LI, W.; FENG, Y.; HUANG, F. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) polymer microsphere for synthesis of phytosterol esters of unsaturated fatty acids. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 74, p. 16-23, 2012.