UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL

PATRÍCIA CAROLINE MOLGERO DA RÓS

**ETANÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS POR CATÁLISE ENZIMÁTICA ACELERADA
POR IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS**

Lorena
2009

PATRÍCIA CAROLINE MOLGERO DA RÓS

**ETANÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS POR CATÁLISE ENZIMÁTICA ACELERADA
POR IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS**

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

Área de concentração: Processos Catalíticos e
Biocatalíticos

Orientadora: Profa. Dra. Heizir F. de Castro

**Lorena
2009**

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 pela Biblioteca Especializada em Engenharia de Materiais
USP/EEL

Da Rós, Patrícia Caroline Molgero

Etanólise de óleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de micro-ondas. / Patrícia Caroline Molgero Da Rós; orientador Heizir Ferreira de Castro. --Lorena, 2009.
122 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo.

1. Biodiesel 2. Etanol 3. Óleo de palma 4. Óleo de babaçu 5. Lípase 6. Micro-ondas I. Título.

CDU 577.152.9

Dedicatória

*Aos meus amados avós: Erlindo e Íria,
por serem exemplos de vida, sabedoria, honestidade e respeito,
por estarem presentes em cada etapa da minha vida, mesmo que distantes,
pelo amor, carinho e conselhos
por serem os anjos que DEUS colocou em meu caminho...*

*Aos meus pais: Roseli e José Carlos,
por terem me concebido a vida,,
por cada palavra dita, cada ensinamento, cada carinho retribuído,
por me possibilitarem a realização deste sonho,
pelo incentivo, paciência, compreensão e companheirismo,
pelo privilégio de ser sua filha...*

*À minha linda irmã Jéssica,
por ser minha companheira sempre,
pela doçura de suas palavras nos momentos difíceis,
pelo carinho, amizade e confiança...*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho, tornando possível a realização desta conquista. Obrigado Senhor, por ter me concedido forças e capacidade em todos os momentos difíceis.

A Profª Dra. Heizir Ferreira de Castro, minha orientadora. Obrigada pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela confiança e incentivo. Agradeço pela ótima orientação, amizade, paciência, dedicação, pelos conselhos e acima de tudo por estar ao meu lado sempre que precisei de seu apoio.

Aos meus queridos avós, Erlindo e Íria, que apesar da distância sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, me incentivando e me dando carinho.

Aos meus pais, Roseli e José Carlos, que além de pais foram meus amigos e companheiros ao longo dessa caminhada. Obrigado por me tornarem uma pessoa capaz de ir em busca de seus sonhos, por mais difíceis que eles sejam, pelo incentivo, educação, conselhos e amor incondicional.

À minha querida irmã Jéssica, pelo carinho, paciência, companheirismo e acima de tudo o amor que nos une, que é muito especial.

Ao Prof Dr. Ernandes Benedito Pereira, que sem dúvidas é um dos grandes responsáveis por meu ingresso nessa carreira. Obrigado por ser além de tudo meu grande amigo, por ter acreditado em mim e me apoiado em todos os momentos.

À minha querida prima Kátia, pela grande colaboração ao longo de minha formação acadêmica, por sua amizade, carinho e incentivo.

Ao Dr. Júlio César dos Santos, por estar sempre disponível em expressar seus conhecimentos, pelas sugestões e contribuições neste trabalho.

Aos colegas do nosso grupo de trabalho: Alessandra, Ana Paula, André, Ariela, Felipe, Gisele, Grazielle, Guilherme, José Roberto, Larissa, Matheus, Renato, pela ajuda, amizade, e ótima convivência no laboratório.

Aos amigos especiais que conheci ao longo dessa caminhada: Laila, Alegria, Juliana, Jeca, Motta, Jerta, Tiago e Vivi, que estiveram comigo durante a realização deste trabalho. Obrigado pelos momentos de alegria, amizade sincera e por amenizarem a saudade que sentia de minha família. Pela paciência, compreensão e contribuição sempre.

Aos colegas do Edifício Nathália, que estiveram sempre presentes, me apoiando e ajudando carinhosamente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido.

À todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

DA RÓS, P. C. M. **Etanólise de Óleos Vegetais por Catálise Enzimática Acelerada por Irradiação de Micro-ondas**. 2009, 123f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2009.

O presente projeto teve como objetivo estudar a aplicação de campos eletromagnéticos de alta frequência (micro-ondas) em processos enzimáticos, particularmente na síntese enzimática de biodiesel a partir da etanólise de óleos vegetais em meio isento de solvente. A enzima indicada para esse tipo de processo – lipase (EC 3.1.1.3) foi usada na forma imobilizada e os ensaios foram realizados utilizando óleos vegetais de baixo custo (babaçu e palma) e etanol como fontes de matérias-primas. Para cada óleo vegetal foi usada uma específica preparação de lipase, tomando por base resultados anteriormente obtidos. Para o óleo de babaçu foi utilizada a lipase de *Burkholderia cepacia*-PS, enquanto para o óleo de palma foi empregada a lipase de *Pseudomonas fluorescens*-AK. O trabalho experimental foi desenvolvido em três etapas. Na primeira etapa, a lipase de *Burkholderia cepacia*-PS foi imobilizada em dois suportes não comerciais, um inorgânico (Nb_2O_5) e outro inorgânico-orgânico (híbrido, SiO_2 -PVA) visando determinar o suporte mais adequado para imobilizar esta específica preparação de lipase. Os derivados imobilizados resultantes foram caracterizados quanto suas propriedades bioquímicas (pH e temperatura), cinéticas (K_m e V_{max}); estabilidade térmica (60 °C) e posteriormente utilizados na reação de interesse. Os resultados obtidos indicaram que o derivado imobilizado na matriz híbrida (SiO_2 -PVA) foi mais estável termicamente e mais eficiente para mediar a reação de etanólise do óleo de babaçu, alcançando 90,1% de rendimento em 24 h. Esta matriz também foi utilizada para imobilizar a lipase de *Pseudomonas fluorescens*-AK. Na segunda etapa do trabalho, foram realizados testes de estabilidade térmica das lipases imobilizadas em SiO_2 -PVA no reator de micro-ondas (Discover/University-Wave, Cem Corporation). Os testes foram realizados a 60°C em meio orgânico, revelando tempos de meia-vida da ordem de 5,63 e 8,22 h, respectivamente para *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas fluorescens*. Na última etapa, buscou-se por meio da utilização de um método estatístico, determinar as condições adequadas de transesterificação para cada óleo vegetal. Esta etapa foi realizada por meio de uma matriz de planejamento fatorial, avaliando simultaneamente a influência da temperatura e razão molar na síntese do biodiesel. Para a etanólise do óleo de babaçu, a formação dos ésteres etílicos foi fortemente influenciada pelas variáveis quadráticas (X_1^2 , X_2^2), razão molar e temperatura, respectivamente. O modelo matemático proposto permitiu prever as condições necessárias que favorecem o alcance de elevados rendimentos da produção de biodiesel, sendo a reação maximizada (100%) em 10h de reação para meios reacionais constituídos de uma razão molar de 1:12 (óleo/etanol) a 50 °C. Para a etanólise do óleo de palma, a formação dos ésteres etílicos foi fortemente influenciada pelas variáveis lineares (X_1 , X_2), razão molar e temperatura, respectivamente. O modelo matemático proposto indicou que os níveis baixos temperatura (43°C) e razão molar 1:8 (óleo/etanol) conduzem a uma conversão de 97% dos ácidos graxos presentes no óleo de palma em ésteres etílicos em apenas 12 h de reação. Os resultados obtidos indicam que o desenvolvimento de reações enzimáticas assistidas por micro-ondas constitui um procedimento potencial para a produção de biodiesel tendo em vista que foi possível diminuir os tempos de reação, demonstrando a viabilidade do processo enzimático proposto para ambos óleos vegetais, com vantagens adicionais em relação ao processo submetido ao aquecimento convencional.

Palavras-chave: Biodiesel. Etanol. Óleo de Palma. Óleo de Babaçu. Lipase. Micro-ondas.

ABSTRACT

DA RÓS, P. C. M. **Ethanolysis of vegetal oils by enzymatic catalysis accelerated by microwave irradiation.** 2009. 123f. Dissertation (Master of Science in Chemical Engineering) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2009.

The objective of this project was to study the application of electromagnetic fields of high frequency (microwave) in enzymatic process, especially in the synthesis of biodiesel by the ethanolysis of vegetal oils in a solvent free system. The indicated enzyme for this process – lipase (EC 3.1.1.3) was used in an immobilized form and the assays were carried out using low cost vegetal oils (babassu oil and palm oil) and ethanol as raw material sources. For each vegetal oil a specific lipase preparation was used based on previous results. For babassu oil lipase from *Burkholderia cepacia*-PS was used while for palm oil lipase from *Pseudomonas fluorescens*-AK. The experimental work was developed in three steps. In the first, lipase from *Burkholderia cepacia*-PS was immobilized on two non-commercial matrixes, as inorganic matrix (niobium oxide, Nb₂O₅) and hybrid matrix (polysiloxane-polyvinyl alcohol, SiO₂-PVA) aiming to determine the most suitable matrix to immobilize this specific preparation of lipase. The resulting immobilized derivatives were analyzed regarding their biochemical properties (pH and temperature), kinetic properties (K_m and V_{max}) and thermal stability (60°C) following their applications in the reaction proposed. The results obtained indicated that the immobilized derivate on hybrid matrix (SiO₂-PVA) was more thermally stable and efficient to mediate the ethanolysis reaction of babassu oil, reaching a yield of 90.1% in 24 h. This matrix was also used to immobilize lipase from *Pseudomonas fluorescens*-AK. In the second stage of work, thermal stability tests of the immobilized lipases on SiO₂-PVA under microwave irradiation were performed using a microwave reactor (Discover/University-Wave, Cem Corporation). The tests were performed at 60°C in organic medium, revealing half-life times in the order of 5.65 and 8.22h, respectively for *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas fluorescens*. In the last stage, conditions to carry out the transesterification for each vegetable oil were determined, using a statistic method. This stage was conducted by a factorial design matrix, attaining the influence of temperature and molar ratio in biodiesel synthesis. For the ethanolysis of babassu oil, the formation of ethyl esters was strongly influenced by quadratic variables (X_1^2 , X_2^2), molar ratio and temperature, respectively. The statistical model allowed predicting the adequate conditions that could reach high yields of biodiesel production, maximizing the reaction (100%) in 10h for reaction media consisting of a molar ratio of 1:12 (oil/ethanol) at 50°C. For ethanolysis of palm oil, the formation of ethyl ester was highly influenced by linear variables (X_1 , X_2), molar ratio and temperature, respectively. The proposed statistic model indicated that the low levels of temperature (43°C) and ratio molar 1:8 (oil/ethanol) conduct to 97% conversion of fatty acid present on palm oil in ethyl esters in 12h of reaction. The obtained results indicated that the development of enzymatic reactions conducted by microwaves constitutes a potential procedure for the production of biodiesel in view that it was possible to reduce the reaction time, demonstrating the viability of the considered enzymatic process for both vegetal oils, with advantages adds in relation to the submitted process to the conventional heating.

Keywords: Biodiesel. Ethanol. Palm oil. Babassu oil. Lipase. Microwave.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Campos e aplicações das enzimas.....	18
Tabela 2.2 - Exemplos de trabalhos realizados empregando diferentes suportes para imobilização da lipase de <i>Candida rugosa</i>	24
Tabela 2.3 - Características físico-químicas do biodiesel de diferentes fontes e do óleo diesel convencional.....	28
Tabela 2.4 - Comparação das vantagens e desvantagens do etanol e metanol como agente acilante na obtenção de biodiesel.	30
Tabela 2.5 - Comparação entre catálise alcalina e catálise enzimática (lipases) para a produção de Biodiesel.	35
Tabela 2.6 - Produção enzimática de biodiesel por transesterificação de óleos e gorduras.	36
Conclusão	37
Tabela 2.6 - Produção enzimática de biodiesel por transesterificação de óleos e gorduras.	37
Tabela 2.7 - Reações enzimáticas assistidas por micro-ondas.	44
Tabela 2.8 - Dados relatados na literatura referentes a condução de reações enzimáticas usando reator de micro-ondas manufaturado comercialmente.	46
Tabela 3.1 - Tipo de análise e equipamentos utilizados nos ensaios.....	48
Tabela 3.2 - Propriedades morfológicas do suporte Nb ₂ O ₅ quanto à área superficial, volume de poros e tamanho médio dos poros.....	49
Tabela 3.3 - Propriedades morfológicas do suporte SiO ₂ -PVA quanto à área superficial, volume de poros e tamanho médio dos poros.....	50
Tabela 3.4 - Níveis reais e codificados para as variáveis temperatura e pH avaliados segundo planejamento experimental estrela rotacional.	51
Tabela 3.5 - Níveis selecionados para o planejamento experimental da etanólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA.....	54
Tabela 3.6 - Níveis selecionados para o planejamento experimental da etanólise do óleo de palma catalisada pela lipase AK imobilizada em SiO ₂	54
Tabela 4.1 - Caracterização dos óleos de babaçu e palma.....	61
Tabela 4.2 - Composição percentual em ácidos graxos dos óleos de babaçu e palma.....	62
Tabela 4.3 - Coeficiente de ajuste dos dados a lei de potência $\tau = 40^\circ\text{C}$	63
Tabela 4.4 - Teores de umidade, atividade hidrolítica e rendimento de imobilização dos derivados imobilizados.....	64

Tabela 4.5 - Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial utilizado para avaliar a influência das variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada.....	65
Tabela 4.6 - Estimativas dos efeitos das variáveis, erros padrão (EP) e valores de p para a atividade hidrolítica da lipase PS livre e imobilizada em SiO ₂ -PVA e Nb ₂ O ₅ , obtidos nos ensaios do planejamento experimental.	66
Tabela 4.7 - Modelos obtidos pelos resultados do planejamento experimental, considerando a atividade da lipase (A, U/g) como função dos valores codificados do pH (X ₁) e temperatura (X ₂).	67
Tabela 4.8 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a atividade hidrolítica da lipase PS livre como função do pH (X ₁) e temperatura (X ₂).....	67
Tabela 4.9 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a atividade hidrolítica da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA como função do pH (X ₁) e temperatura (X ₂).	68
Tabela 4.10 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a atividade hidrolítica da lipase PS imobilizada em Nb ₂ O ₅ como função do pH (X ₁) e temperatura (X ₂).68	
Tabela 4.11 - Valores de km e V_{max} obtidos a partir das curvas da atividade hidrolítica em função da concentração de substrato.	70
Tabela 4.12 - Constantes de inativação térmica da lipase PS livre e imobilizada e seus respectivos tempos de meia-vida.....	72
Tabela 4.13 - Propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> (livre e imobilizada em SiO ₂ -PVA e Nb ₂ O ₅).	72
Tabela 4.14 - Rendimento de transesterificação e produtividade da reação de etanólise do óleo de babaçu utilizando diferentes derivados imobilizados.	75
Tabela 4.15 - Concentração de lipase (%) e os respectivos valores de biocatalisador correspondente à porcentagem, atividade enzimática e a quantidade de unidades de atividade por grama de óleo fornecida ao meio.	76
Tabela 4.16 - Constantes de inativação térmica das lipases de <i>Burkholderia cepacia</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizadas em SiO ₂ -PVA.....	80
Tabela 4.17 - Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial composto central 2 ² utilizado para avaliar a influência das variáveis: razão molar e temperatura no rendimento da etanólise do óleo de babaçu.	83
Tabela 4.18 - Estimativas dos efeitos das variáveis, erros padrão, valores de t e p para o rendimento da etanólise do óleo de babaçu pelo planejamento fatorial.	83
Tabela 4.19 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento da etanólise do óleo de babaçu.	84

Tabela 4.20 - Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial composto central 2^2 utilizado para avaliar a influência das variáveis: razão molar e temperatura no rendimento da etanólise do óleo de palma.	86
Tabela 4.21 - Estimativas dos efeitos das variáveis, erros padrão, valores de t e p para o rendimento da etanólise do óleo de palma pelo planejamento fatorial completo 2^2	89
Tabela 4.22 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento da etanólise do óleo de palma.....	90
Tabela 4.23 - Comparação dos parâmetros globais de reação de etanólise do óleo de babaçu (rendimento e produtividade), para os experimentos realizados em reatores convencionais e micro-ondas, utilizando lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA.....	92
Tabela 4.24 - Comparação dos parâmetros globais de reação de etanólise do óleo de palma (rendimento e produtividade), para os experimentos realizados em reatores convencionais e micro-ondas, utilizando lipase AK imobilizada em SiO_2 -PVA.	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Reações catalisadas por lipases (De CASTRO et al., 2004).	20
Figura 2.2. Estrutura química do óxido de nióbio V hidratado	26
Figura 2.3. Etapas envolvidas na formação do SiO ₂ -PVA (“R” representa o grupo alquil) (SANTOS et al., 2008b).	27
Figura 2.4. Representação esquemática da reação global de transesterificação.....	33
Figura 2.5. Representação esquemática das etapas envolvidas na transesterificação.	33
Figura 2.6. Fotografia de um magnetron e as principais partes: geometria interna da cavidade de ressonância aberta.	38
Figura 2.7. Ilustração da molécula da água nos instantes de rotação gerados pelas ondas eletromagnéticas.	39
Figura 2.8. Reator de micro-ondas Discover.	45
Figura 3.1. Reator de micro-ondas Discover operando durante os experimentos.....	53
Figura 4.1. Viscosidade absoluta em função da taxa de deformação dos óleos refinados sob a temperatura de 40 °C: óleo de babaçu (a); óleo de palma (b).....	62
Figura 4.2. Tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação dos óleos refinados sob a temperatura de 40 °C: óleo de babaçu (a); óleo de palma (b).	63
Figura 4.3. Atividade hidrolítica da lipase de Burkholderia cepacia livre (a), imobilizada no suporte híbrido SiO ₂ -PVA (b) e imobilizada no suporte inorgânico Nb ₂ O ₅ (c) em função da concentração do substrato.....	69
Figura 4.4. Desativação térmica da lipase PS livre, imobilizada em SiO ₂ -PVA e imobilizada em Nb ₂ O ₅ (experimentos conduzidos em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 sob temperatura de 60 °C).	71
Figura 4.5. Espectros no infravermelho obtidos para as amostras do suporte SiO ₂ -PVA ativado com epícloridrina, lipase livre e após a imobilização (a) suporte Nb ₂ O ₅ ativado com glutaraldeído, lipase livre e após a imobilização (b).	73
Figura 4.6. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo na reação de etanolise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA (a) e Nb ₂ O ₅ (b). Razão molar óleo/etanol (1:12) a 50°C.....	75
Figura 4.7. Rendimento de transesterificação do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA em função da quantidade de unidades de atividade enzimática fornecida ao meio reacional por grama de óleo (Razão molar óleo/etanol= 1/18 e temperatura de 40°C).....	77

Figura 4.8. Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA, em bateladas consecutivas de etanólise do óleo de babaçu a 40 °C. (a) rendimento de transesterificação, (b) viscosidade do produto transesterificado ao final de cada ciclo.....	78
Figura 4.9. Atividade residual das lipases PS e AK imobilizada em SiO ₂ -PVA após tratamento térmico (em heptano) em função do tempo de exposição da irradiação de micro-ondas (100 W).	79
Figura 4.10. Perfil de formação dos monoésteres de etila na reação de etanólise do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA, sob diferentes condições operacionais (ensaio 1 a 6).....	81
Conclusão Figura 4.10. Perfil de formação dos monoésteres de etila na reação de etanólise do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA sob diferentes condições operacionais (ensaio 7 a 11).....	82
Figura 4.11. Superfície de resposta para o rendimento da etanólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA em função da razão molar e temperatura, de acordo com o modelo predito pela equação 4.1.....	85
Figura 4.12. Perfil de formação dos monoésteres de etila na reação de etanólise do óleo de babaçu nas condições preditas pelo modelo matemático.	85
Figura 4.13. Perfil de formação dos monoésteres de etila na reação de etanólise do óleo de palma empregando lipase AK imobilizada em SiO ₂ -PVA, sob diferentes condições operacionais (ensaio 1 a 6).....	87
Conclusão Figura 4.13. Perfil de formação dos monoésteres de etila na reação de etanólise do óleo de palma empregando lipase AK imobilizada em SiO ₂ -PVA, sob diferentes condições operacionais (ensaio 7 a 11).....	88
Figura 4.14. Superfície de resposta para o rendimento da etanólise do óleo de palma catalisada pela lipase AK imobilizada em SiO ₂ -PVA em função da razão molar e temperatura, de acordo com o modelo predito pela equação 4.2.	90
Figura 4.15. Perfil de formação dos monoésteres de etila na reação de etanólise do óleo de palma empregando lipase AK imobilizada em SiO ₂ -PVA em função do tempo, nas condições preditas pelo modelo estatístico.....	91

LISTA DE SIGLAS

AK	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
ASTM	American Society for Testing and Materials
kd	Constante de desativação térmica
K_m	Constante de Michaelis-Menten
Nb₂O₅	Óxido de Nióbio
PEG	Polietilenoglicol
PS	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
PVA	Álcool polivinílico
SiO₂-PVA	Polissiloxano-Álcool Polivinílico
TEOS	Tetraetilortossilicato
V_{max}	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. <i>Enzimas como biocatalisadores</i>	17
2.1.1. Lipases	18
2.1.2. Reações catalisadas por lipases	19
2.2. <i>Imobilização de enzimas.....</i>	21
2.2.1. Suportes para imobilização de enzimas.....	22
2.2.1.1. Suporte inorgânico: Óxido de nióbio.....	25
2.2.1.2. Suporte híbrido: polissiloxano-álcool polivinílico	26
2.3. <i>Biodiesel</i>	27
2.3.1. Matérias-primas para a produção de biodiesel	29
2.3.2. Óleos vegetais	30
2.4. <i>Métodos de obtenção do biodiesel.....</i>	32
2.5. <i>Transesterificação</i>	32
2.6. <i>Micro-ondas</i>	38
2.6.1. Comparação do aquecimento de micro-ondas com aquecimento convencional	39
2.6.2. Reações enzimáticas assistidas por micro-ondas	40
2.6.3. Reatores de Micro-ondas	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1. <i>Materiais.....</i>	47
3.1.1. Fonte de lipases	47
3.1.2. Substratos	47
3.1.3. Suportes de imobilização.....	47
3.1.4. Outros reagentes	47
3.2. <i>Equipamentos.....</i>	48
3.3. <i>Metodologia experimental.....</i>	48
3.3.1. Síntese do suporte inorgânico.....	48
3.3.2. Síntese do suporte híbrido	49
3.3.3. Imobilização da lipase PS nos suportes ativados	50
3.3.4. Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas dos derivados imobilizados.....	51
3.3.4.1. Propriedades bioquímicas.....	51
3.3.4.2. Parâmetros cinéticos	51
3.3.5. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	52
3.3.6. Síntese de Biodiesel.....	52
3.3.6.1. Imobilização das lipases em SiO ₂ -PVA para utilização na síntese do biodiesel.....	52
3.3.6.2. Reação de transesterificação enzimática do óleo de babaçu e etanol sob aquecimento convencional	52
3.3.6.3. Reação de transesterificação enzimática do óleo de babaçu e etanol sob irradiação de micro-ondas (reator Discover).....	53

3.3.6.4. Reação de transesterificação enzimática do óleo de palma e etanol sob irradiação de micro-ondas (reator Discover)	54
3.3.7. Testes de estabilidade das lipases imobilizadas	55
3.3.7.1. Estabilidade térmica sob aquecimento convencional	55
3.3.7.2. Estabilidade térmica dos derivados imobilizados sob irradiação de micro-ondas	55
3.3.7.3. Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA.....	56
3.4. Métodos de Análise	56
3.4.1. Índice de Acidez (I.A.)	56
3.4.2. Índice de Peróxido (I.P.)	57
3.4.3. Índice de Iodo (I.I.)	57
3.4.4. Índice de Saponificação (I.S.)	58
3.4.5. Teor de umidade	58
3.4.6. Determinação da atividade hidrolítica	59
3.4.7. Separação dos produtos formados na reação de transesterificação dos óleos de babaçu e palma com etanol.....	59
3.4.8. Análise de viscosidade dos óleos vegetais e amostras de biodiesel	59
3.4.9. Determinação dos ésteres formados e cálculo do rendimento de transesterificação	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1. Características das amostras de óleos de babaçu e de palma	61
4.1.1. Composição química e propriedades dos óleos refinados.....	61
4.1.2. Viscosidade do óleo de babaçu e do óleo de palma	62
4.2. Seleção do suporte para imobilização da lipase PS.....	64
4.2.1. Influência do tipo de suporte no rendimento de imobilização da lipase PS..	64
4.2.2. Influência do tipo de suporte nas propriedades bioquímicas dos derivados imobilizados.....	65
4.2.3. Influência da concentração do substrato e determinação dos parâmetros cinéticos	69
4.2.4. Constante de desativação térmica da lipase livre e imobilizada (k_d)	70
4.2.5. Análise por espectroscopia no infravermelho	73
4.2.6. Seleção do suporte de imobilização da lipase PS para mediar a reação de etanolise do óleo de babaçu.....	74
4.3. Influência da atividade da lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA para mediar a reação de etanolise do óleo de babaçu.....	75
4.4. Estabilidade operacional.....	77
4.5. Reações no reator de micro-ondas Discover	79
4.5.1. Estabilidade térmica das lipases de <i>Burkholderia cepacia</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i> em meio orgânico no reator de micro-ondas Discover	79
4.5.2. Otimização da síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO ₂ -PVA sob irradiação de micro-ondas empregando a metodologia de planejamento fatorial	80
4.5.3. Otimização da síntese de biodiesel a partir do óleo de palma e etanol catalisada pela lipase AK imobilizada em SiO ₂ -PVA sob irradiação de micro-ondas empregando a metodologia de planejamento fatorial	86

4.6. Comparação do rendimento de transesterificação e produtividade para as reações de síntese de biodiesel conduzidas usando diferentes fontes de aquecimento (aquecimento convencional e irradiação de micro-ondas).....	92
5. CONCLUSÕES.....	94
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	96
REFERÊNCIAS	97
APÊNDICES	106

1. INTRODUÇÃO

A radiação de micro-ondas é um tipo de energia eletromagnética com frequência na faixa de 3×10^2 a 3×10^5 MHz (BARBOZA et al., 2001; LINDSTROM et al., 2001). Essa radiação não-ionizante causa migração de íons e rotação de dipolos, mas não causa mudanças na estrutura molecular. O aquecimento de um material por irradiação com micro-ondas se dá devido à interação da onda eletromagnética com o dipolo elétrico da molécula. Um importante atributo do aquecimento por micro-ondas é a absorção direta da energia pelo material a ser aquecido, ao contrário do que ocorre quando o aquecimento é realizado por convecção, no qual a energia é transferida lentamente do recipiente de reação para a solução. Assim, o aquecimento por micro-ondas é seletivo e dependerá, principalmente, da constante dielétrica e da frequência de relaxação do material (GRAEBIN; EIFLER-LIMA, 2005).

Além de outros usos como em fornos domésticos, o aquecimento por irradiação de micro-ondas vem se tornando um método alternativo em aplicações científicas, substituindo com sucesso o aquecimento convencional (manta, bico de bunsen, e placa de aquecimento), principalmente na condução de diversas transformações orgânicas reduzindo os tempos de processo, devido à sua eficiência em aquecer rapidamente meios reacionais (GRAEBIN; EIFLER-LIMA, 2005; SANSEVERINO, 2002).

As principais vantagens da utilização de energia de micro-ondas são (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006): a) as taxas de aquecimento em uma reação na qual alguma substância (solvente ou reagente) presente absorva bem micro-ondas são muito maiores que no aquecimento convencional; b) o reator ou recipiente da reação pode ser transparente às micro-ondas (como teflon, por exemplo), a energia é absorvida somente pelos reagentes ou solvente (ou até seletivamente por apenas um dos constituintes da reação); c) a energia é transferida diretamente para a amostra, não havendo contato físico com a fonte de aquecimento; d) a possibilidade de obter rendimentos mais elevados, maior seletividade e menor decomposição térmica.

Os primeiros relatos de sínteses conduzidas em forno de micro-ondas surgiram em 1986 em dois trabalhos independentes de Gedye e Guigere (LINDSTROM et al., 2001; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006). As reações foram conduzidas em frasco selado com uma comparação ao aquecimento convencional. Uma notável redução no tempo de reação foi observada, embora não tenha havido um controle de pressão. Desde então, esta técnica tem evoluído como uma ferramenta útil e promissora do ponto de vista industrial, já existindo

vários reatores em escala de laboratório. Revisões abrangentes sobre reações aceleradas por micro-ondas mostram que é grande a diversidade de tipos de reações beneficiadas por este tipo de aquecimento (GUPTA; ROY, 2004; ROSINI; NASCENTES; NÓBREGA, 2004).

Lipases ou triacil glicerol hidrolases (E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalisam preferencialmente a hidrólise de acilglicerídeos na interface óleo/ água. As reações hidrolíticas por lipases são essencialmente reversíveis e o potencial destas enzimas na síntese orgânica tem sido bem documentado (De CASTRO et al., 2004). A versatilidade da lipase como catalisador é também evidente pelo número de processos em fase de implantação industrial, particularmente no setor oleoquímico, que tem um interesse permanente em desenvolver técnicas capazes de modificar as propriedades físico-químicas, funcionais e organolépticas das matérias-primas oleosas, ampliando a possibilidade de aplicação de seus produtos. O potencial da tecnologia enzimática para o desenvolvimento de novas rotas de processos visando à obtenção de produtos conhecidos e/ou novos a custos mais competitivos, vem ao encontro da necessidade deste setor em alcançar suas metas de expansão.

Neste contexto, propõe-se no presente trabalho o aprimoramento da síntese enzimática de biodiesel, visando atingir maior rendimento de processo, menor consumo de energia, redução de resíduos, permitindo desta forma a obtenção de resultados satisfatórios que possam competir com a via química nas biotransformações de compostos de interesse do setor oleoquímico e energético. Particular ênfase foi dada ao estudo do efeito de campos eletromagnéticos de alta frequência (micro-ondas) no desenvolvimento de processos de biotransformação utilizando lipase como catalisador, tendo em vista a versatilidade desta particular classe de enzima para mediar reações típicas do setor de óleos e gorduras. Mais especificamente, a reação de interesse neste projeto foi a etanólise de óleos vegetais (óleo de babaçu e óleo de palma) visando à produção de biodiesel.

Conforme considerações anteriormente descritas, este trabalho teve como objetivo estabelecer os parâmetros de irradiação do reator de micro-ondas (potência, temperatura, tempo, velocidade de agitação); avaliar a estabilidade térmica das lipases pré-selecionadas (AK e PS) imobilizadas na matriz híbrida SiO_2 sob os campos eletromagnéticos (irradiação de micro-ondas); ajustar as condições operacionais, relacionadas à reação enzimática (razão molar entre os materiais de partida e temperatura da reação), empregando-se um planejamento fatorial. Os resultados obtidos nas sínteses de biodiesel sob irradiação de micro-ondas e aquecimento convencional foram comparados, considerando-se a velocidade de formação dos ésteres etílicos, rendimento global da reação e produtividade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliográfica será dado um enfoque aos principais temas relacionados com o trabalho desenvolvido, iniciando-se pelo emprego dos biocatalisadores, com destaque especial as lipases, seguido de imobilização de enzimas bem como os suportes de imobilização selecionados para utilização no presente trabalho. Em seguida, serão abordados aspectos relacionados ao produto alvo deste projeto (biodiesel), incluindo potenciais matérias-primas e os métodos de obtenção, dando enfoque na reação de transesterificação. Por fim, serão enfocados fundamentos referentes à irradiação de micro-ondas e sua aplicação em reações químicas.

2.1. Enzimas como biocatalisadores

Enzimas são catalisadores de reações químicas em sistemas biológicos *in vivo*, envolvendo reações com substratos naturais e não naturais *in vitro* (FABER, 1997; STRYER, 1992;). As enzimas são proteínas de elevada massa molecular. São altamente específicas, apresentam elevado poder catalítico e possuem em suas estruturas grupos polares, tais como COOH, OH, NH₂, SH e CONH₂, que atuam como catalisadores.

As enzimas, como toda proteína natural, são constituídas de uma ou mais cadeias de aminoácidos ligados covalentemente por meio de ligações peptídicas. A composição dos aminoácidos e a sequência destes na cadeia são características particulares de cada enzima, sendo que, induz uma conformação tridimensional própria, essencial à atividade catalítica. Esta atividade é exercida pelo sítio ativo, que pode ser definido como a parte da estrutura da enzima que atua em contato direto com a substância (substrato) a ser transformada (FABER, 1997).

As enzimas vêm sendo usadas por vários séculos, apesar de sua verdadeira natureza ter sido conhecida apenas recentemente. Estima-se que das 25.000 enzimas presentes na natureza, cerca de 2.800 foram classificadas e perto de 400 são comercializadas em sua forma purificada (FABER, 1997).

O interesse em utilizar enzimas como catalisadores vem aumentando gradativamente devido a sua alta versatilidade e às condições suaves de temperatura e pH em que se realizam as reações, apresentando grande importância na pesquisa científica, nos diagnósticos clínicos e na indústria. A Tabela 2.1 apresenta as principais aplicações de enzimas.

Tabela 2.1 - Campos e aplicações das enzimas.

Campos	Aplicações
Pesquisas científicas	Usadas como ferramenta em pesquisa em análises, biotransformações e separações.
Cosméticos	Formulações de creme para tratamento de cutis, clareamento dos dentes.
Diagnóstico medicinal e análises químicas	Dosagem de glicose no sangue, uréia, colesterol.
Terapêutica	Agentes antitromboses, tratamentos antitumores, agentes antiinflamatórios, AIDS, digestivo.
Catálises industriais em sistemas especializados	Vinhos, laticínios, frutas, carnes, modificação de amido, produção de frutose, formulação de detergentes, síntese de aminoácidos, tratamento de efluentes, branqueamento de polpas celulósicas, entre outras.

Adaptado: Sharma; Chisti; Banerjee, 2001.

Entre as muitas vantagens da utilização de enzimas, três características são consideradas as mais importantes: *Quimiosseletividade*, *Regiosseletividade* e *Enantioseletividade*.

Durante o curso da reação catalisada enzimaticamente, qualquer tipo de quiralidade do substrato pode ser reconhecida pela enzima, e isso causa uma preferência para as duas direções possíveis com relação a estereoquímica da reação. As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais usados em biotransformações (FABER, 1997) sendo de particular e grande interesse para o desenvolvimento deste trabalho, as lipases.

2.1.1. Lipases

As lipases (triacilglicerol acilhidrolase; EC 3.1.1.3) fazem parte de um grupo de enzimas hidrolíticas, de origem e propriedades diversas, que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster carboxílicas presentes em triacilgliceróis, para liberar ácidos graxos e glicerol. As reações lipolíticas ocorrem na interface lipídeo-água onde substratos lipolíticos geralmente formam um equilíbrio entre os estados monomérico, micelar e emulsificado (FABER, 1997).

Quanto às funções fisiológicas das lipases, estão relacionadas à digestão de gorduras e à mobilização dos triglicerídeos armazenados no organismo (MARZZOCO; TORRES, 1999).

A versatilidade das lipases permite que estas enzimas sejam selecionadas para aplicações potenciais em diversos setores, como: alimentício, farmacêutico, têxtil, cosmético e indústrias de papel (De CASTRO et al., 2004; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Estas enzimas encontram-se largamente distribuídas na natureza, podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana. Contudo, enzimas microbianas são geralmente mais usadas que enzimas derivadas de plantas ou animais, pela razão da grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, o possível rendimento elevado, a facilidade da manipulação genética, suprimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e desenvolvimento rápido de microrganismos em meios de cultivo de baixo custo. Enzimas microbianas são também mais estáveis que aquelas provenientes de plantas e animais, sendo sua produção mais conveniente e segura (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de isolar microrganismos produtores destas enzimas, incluindo vários gêneros e espécies de bactérias, leveduras e fungos (FABER, 1997). Estudos de triagem foram feitos até no continente antártico, com seleção de 33 linhagens de fungos, sendo que, a maioria apresentou capacidade de produzir lipases com elevadas atividades (FENICE; SELBMANN; ZUCCONI, 1997).

Dependendo da sua origem, lipases podem apresentar massa molecular variando de 19 a 75 kDa (JAEGER; REETZ, 1998) e atuar numa ampla faixa de pH (4-9) e de temperatura, a qual varia da temperatura ambiente até 70 °C (CASTRO; ANDERSON, 1995).

2.1.2. Reações catalisadas por lipases

Lipases catalisam a clivagem de ligações éster via reação de hidrólise (com concomitante consumo de moléculas de água) (PAIVA; BALCÃO; MALCATA, 2000). Também podem catalisar a reação reversa, isto é, a formação de ésteres a partir de um álcool e um ácido carboxílico de um ácido de cadeia longa, como um ácido graxo, com liberação de moléculas de água, num processo denominado esterificação (MALCATA et al., 1992).

Esses dois processos básicos podem ser combinados num padrão sequencial para dar origem a um grupo de reações usualmente denominadas de transesterificações, que, dependendo do substrato de partida, podem ser acidólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um ácido carboxílico), alcoólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um álcool) e interesterificação (quando dois grupos acilas são deslocados entre dois ésteres), sem ocorrer nem consumo nem formação de água (Figura 2.1) (De CASTRO et al., 2004).

Figura 2.1. Reações catalisadas por lipases (De CASTRO et al., 2004).

Apesar de lipases de fontes distintas serem capazes de catalisar a mesma reação o desempenho de cada uma delas, sob as mesmas condições reacionais, pode ser bastante diferente (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

Entre as lipases disponíveis comercialmente, foram selecionadas para o desenvolvimento do presente trabalho as lipases de *Burkholderia cepacia*-PS e *Pseudomonas fluorescens*-AK, tomando por base trabalhos desenvolvidos anteriormente (De CASTRO, 2008; MOREIRA et al., 2007). Algumas características dessas lipases são descritas a seguir, de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante (AMANO, 2008).

Lipase PS é uma nova preparação enzimática lipolítica desenvolvida pela Amano Enzyme Inc, obtida por fermentação submersa de uma linhagem selecionada proveniente de *Burkholderia cepacia*, e posteriormente purificada por precipitação com etanol. Contém cerca

de 25% de proteína e alguns aditivos ou estabilizantes como diatomáceas, dextrinas e CaCl_2 e possui elevada atividade lipolítica (AMANO ENZYME, 2008).

Lipase AK é uma preparação enzimática produzida por um único processo de fermentação de uma linhagem selecionada de *Pseudomonas fluorescens*. Como a maioria das lipases microbianas, as preparações comerciais disponíveis desta lipase possui preferência estereoquímica para hidrólise de ésteres de álcoois secundários (FABER, 1997). A lipase AK “AMANO” 20 tem uma elevada atividade lipolítica e estabilidade térmica (AMANO ENZYME, 2008).

Apesar das inúmeras vantagens catalíticas das enzimas, sua utilização em processos industriais tem sido limitada, principalmente devido: a baixa estabilidade nas condições de operação; ao elevado custo de obtenção da enzima (desde o isolamento até a purificação), a dificuldade técnica e elevado custo de recuperação e separação do produto ao final da reação. Isto restringe o emprego de enzimas solúveis, principalmente em reações de batelada, onde ao final do processo, a enzima dificilmente consegue ser recuperada, impedindo sua reutilização em bateladas posteriores (ZANIN; MORAES, 2004).

Com a finalidade de aproveitar o potencial catalítico das enzimas, e reunir as vantagens dessas proteínas sobre os catalisadores químicos, tem-se estudado formas de torná-las insolúveis ao meio reacional. Neste contexto, uma forma que tem apresentado resultados bem satisfatórios é ligar as enzimas em suportes sólidos insolúveis ao meio reacional, ou torná-las insolúveis por meio de ligações entre seus grupos químicos. Estas são conhecidas como enzimas imobilizadas (ZANIN; MORAES, 2004).

2.2. Imobilização de enzimas

Enzimas imobilizadas são enzimas fisicamente confinadas numa certa região do espaço com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser usada repetida e continuamente, enquanto o sistema enzimático se mantiver ativo (ZANIN; MORAES, 2004).

Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior a enzima livre, porém, dificilmente isto ocorre. Desta forma, o processo de imobilização não deve acarretar em alterações estruturais danosas à atividade catalítica, bem como modificações no sítio ativo (VILLENEUVE et al., 2000). Em função disso, dois fatores são fundamentais para o desenvolvimento de um sistema imobilizado com ótimo desempenho: o método de imobilização e o suporte para imobilização (ZANIN; MORAIS, 2004).

Apesar da grande diversidade de métodos de imobilização existentes, não há um método aplicável para todas as enzimas. Isto porque existem diferenças relacionadas às características e composição química das enzimas, diferentes propriedades de substrato e produto e à finalidade de aplicação do produto obtido (VILLENEUVE et al., 2000).

Nesse trabalho, optou-se pela utilização do método de *Ligação Covalente*, baseado numa forte interação entre a enzima e o suporte. Esta técnica tem sido desenvolvida desde 1950, e tornou-se o método mais difundido e pesquisado (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). O procedimento é realizado por meio da ligação covalente entre os grupos funcionais não ativos da enzima (grupos não essenciais para atividade catalítica) e os grupos reativos (hidroxila, carbonila, entre outros) presentes na superfície sólida do suporte. Por tratar-se de uma ligação forte, o derivado imobilizado obtido é estável, não permitindo que a enzima se desprenda do suporte em presença do substrato ou de soluções de alta concentração iônica. Desta forma, evita-se o fenômeno de dessorção, fato comum no método adsorção (ZANIN; MORAES, 2004).

2.2.1. Suportes para imobilização de enzimas

Na escolha de um suporte para determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como aquelas relativas à possibilidade de regeneração do material. As principais propriedades que devem ser analisadas são: contribuições da superfície do suporte, tais como: os efeitos de pH, carga de superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, presença de íons metálicos; morfologia e composição; resistência ao ataque microbiano e resistência à compactação em operações a altas vazões (reatores de leito fixo) (TISCHER; KASCHE, 1999).

Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos com diferentes características de tamanho, forma e densidade, tem sido estudada para a imobilização de lipases. Estudos comparativos mostram diferenças acentuadas no desempenho de lipases imobilizadas nos vários suportes e evidenciam que apesar das várias experiências reportadas na literatura, a imobilização de lipases ainda é um desafio complexo, uma vez que a extensão da imobilização depende da estrutura da enzima, método de imobilização e do tipo de suporte. Em muitos casos, suportes que proporcionam uma elevada atividade e estabilidade da enzima apresentam sérias limitações de resistência mecânica e de queda de pressão, que os tornam inviáveis para a utilização em alguns tipos de reatores (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Suportes com alta resistência mecânica são desejáveis particularmente em sistemas com agitação. A presença de solventes pode requerer materiais com alta resistência química. Vários microrganismos crescem em muitos substratos catalisados por lipase, portanto existe também a necessidade de suportes com resistência microbiana. Os suportes permitem a utilização efetiva da enzima quando as moléculas de proteína estão acessíveis ao substrato. Considerando que a perda de atividade é uma questão de tempo, o suporte deve ser também facilmente regenerado e reutilizado (ZANIN; MORAES, 2004).

O Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena tem desenvolvido estudos de seleção de suportes adequados para imobilização da lipase de *Candida rugosa* (LCR), conforme apresentado na Tabela 2.2. Entre as matrizes testadas, resultados promissores foram alcançados empregando uma matriz inorgânica (óxido de nióbio hidratado- $\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) e uma matriz híbrida sílica-álcool polivinílico (SiO_2 -PVA). Essas matrizes mostraram-se compatíveis com a lipase de *Candida rugosa*, resultando em elevado grau de recuperação da atividade enzimática e elevada estabilidade operacional. Outra vantagem apresentada por esses dois tipos de suporte não comerciais é o baixo custo de obtenção em relação aos suportes manufaturados industrialmente.

Em função desses resultados promissores e para dar continuidade à linha de pesquisa, o presente trabalho verificou a potencialidade desses dois suportes para imobilizar a lipase pré-selecionada (*Burkholderia cepacia*-PS) para catalisar a etanólise do óleo de babaçu (De Castro, 2008) verificando o desempenho dos derivados imobilizados na síntese de biodiesel. A lipase de *Pseudomonas fluorescens* (AK), pré-selecionada para catalisar a etanólise do óleo de palma (MOREIRA, 2007) foi anteriormente caracterizada quanto suas propriedades bioquímicas e melhor suporte para imobilizá-la (SANTOS et al., 2008a).

Tabela 2.2 - Exemplos de trabalhos realizados empregando diferentes suportes para imobilização da lipase de *Candida rugosa*.

Característica	SPC	Quitina	Quitosana	ZrP	Celulignina	Óxido de nióbio	SIO ₂ -PVA
Tipo de suporte	Inorgânico	Orgânico	Orgânico	Inorgânico	Orgânico	Inorgânico	Híbrido
Método de imobilização	Covalente	Covalente	Adsorção	Covalente	Covalente	Covalente	Covalente
Ativação do suporte	Silanização + GA	HEMDA	Não ativado	Silanização + GA	CDI	Silanização + GA	GA
Rendimento de imobilização (%)	18,0	26,0	26,0	nd	64,0	51,2	81,5
Atividade da enzima (U.mg ⁻¹)	51,0	60,0	60,0	325,0	193,0	124,3	407,0
pH ótimo	7,5	7,4	7,4	7,5	8,0	7,0	8,0
Temperatura ótima (°C)	50,0	45,0	45,0	50,0	40,0	55,0	55,0
Constante de inativação térmica a 50 °C (h ⁻¹)	0,26	1,07	0,63	0,37	0,79	0,52	1,78
Estabilidade operacional							
Hidrólise (t _{1/2} a 37 °C, h)	21,0	3,3	5,0	0,93	3,5	nd	nd
Esterificação (t _{1/2} a 37 °C, h)	32,0	426,0	83,0	169,0	302,0	406,0	81,0
Referência	SOARES et al., 1999	GOMES; PEREIRA; CASTRO, 2004	PEREIRA; ZANIN; CASTRO, 2003	MENDES et al., 2007	GOMES et al., 2006	MIRANDA, 2004	PAULA et al., 2008

SPC: sílica de porosidade controlada, ZrP: fosfato de zircônio

GA: glutaraldeído, CDI: carbonildiimidazol, HEMDA: hexametilenodiamina

nd: não determinado

2.2.1.1. Suporte inorgânico: Óxido de nióbio

O nióbio é um metal refratário que pertence ao grupo VB na tabela periódica. Tem cor prateada clara, é dúctil, com número atômico 41 e tem sido bastante aplicado em engenharia moderna. Apresenta alto ponto de fusão (2468 °C), é maleável, resistente em altas temperaturas (metal refratário) e à ação de ácidos (AGGARWAL et al., 2007). É encontrado em mais de 50 minerais diferentes, destacando-se os dos grupos columbita-tantalita e do pirocloro-microlita como os principais minérios de nióbio e eventualmente de tântalo.

Os compostos químicos de nióbio pentavalente (Nb_2O_5) são os mais estáveis e mais usados. São conhecidos também compostos em que o metal é di, tri, e tetravalente, sendo NbO_2 preto e NbO um pó cinza, os quais são formados quando Nb_2O_5 é reduzido pelo hidrogênio ou carbono. O pentóxido de nióbio é produto intermediário dos processos industriais, sendo esse branco e tornando-se amarelo com aquecimento, porém esta cor desaparece após resfriamento (ZELIKMAN; KREIN; SAMSONOV, 1966).

Várias aplicações já foram identificadas na área de catálise para o nióbio e seus compostos. Em particular, o óxido de nióbio é o que apresenta maior acidez entre os óxidos metálicos (MIRANDA, 2004).

Como suporte de catalisador, o pentóxido de nióbio pode ter um papel especial, como por exemplo, na decomposição dos óxidos de nitrogênio, substituindo parcialmente o pentóxido de vanádio em misturas deste com dióxido de titânio.

Óxido de nióbio V hidratado ($\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) tem elevado potencial de aplicação, proporcionando aumento da atividade, seletividade, durabilidade e até resistência mecânica. Pode ser facilmente obtido pela fusão do pentóxido de nióbio com carbonato de potássio, formando niobato e posterior precipitação com solução de ácido nítrico de concentração adequada (MIRANDA, 2004). É estável em relação a maior parte dos reagentes ácidos, exceto aos ácidos fluorídrico, sulfúrico concentrado e clorídrico (LAI et al., 2006). Sua capacidade de troca iônica decresce com o aumento da temperatura de aquecimento, e é transformado em material cristalino sob elevadas condições de temperatura (CLEARFIELD, 1982).

Quanto a sua capacidade de troca iônica (SILVA et al., 2001) e propriedades de sorção, uma seqüência de trabalhos publicados por Egorov e colaboradores (1967) mostrou estudos feitos em condições dinâmicas em colunas, com alguns íons: cátions e ânions. Estes estudos comprovaram que o óxido de nióbio V hidratado comporta-se como um trocador

iônico anfótero semelhante a compostos de zircônio, titânio e estanho.

Considerando que a estrutura do óxido de nióbio hidratado (Figura 2.2) é similar à sílica, este material foi testado como matriz alternativa para imobilização da enzima lipase, adotando como metodologia de imobilização a ligação covalente (óxido de nióbio foi previamente silanizado com γ -aminopropiltrietóxisilano e ativado com glutaraldeído). Os resultados obtidos foram extremamente satisfatórios em todos os parâmetros estudados quando comparado aos outros suportes inorgânicos, ressaltando ainda uma aplicação potencial na modificação de óleos vegetais (MIRANDA, 2004).

Figura 2.2. Estrutura química do óxido de nióbio V hidratado

2.2.1.2. Suporte híbrido: polissiloxano-álcool polivinílico

A matriz híbrida SiO_2 -PVA é obtida pela técnica sol-gel, a partir de tetraetilortossilicato (TEOS) e álcool polivinílico (PVA). O produto resultante, polissiloxano-álcool polivinílico (SiO_2 -PVA) é um composto que combina atributos físico-químicos de material orgânico e inorgânico (BRUNO et al., 2005). A síntese desta matriz envolve três etapas, conforme esquematizado na Figura 2.3.

As vantagens da técnica sol-gel são a homogeneidade e pureza dos géis formados, bem como temperatura de síntese relativamente baixa. Esta técnica é um excelente método para preparação de materiais híbridos. A baixa temperatura da síntese possibilita que espécies orgânicas ou inorgânicas sejam incorporadas em uma matriz rígida de óxido de silicone sem que ocorra degradação (LIMA-BARROS et al., 2002). Por apresentar atributos híbridos, essa matriz (SiO_2 -PVA) permite a manipulação da hidrofiliicidade e hidrofobicidade, capacidade

tamponante, condutividade elétrica, carga iônica, porosidade e propriedades mecânicas em geral (GILL; BALLESTEROS, 1998), bem como elevada atividade e estabilidade.

Figura 2.3. Etapas envolvidas na formação do SiO_2 -PVA (“R” representa o grupo alquil) (SANTOS et al., 2008b).

2.3. Biodiesel

Historicamente, o uso direto de óleos vegetais como combustível foi rapidamente superado pelo uso de óleo diesel derivado de petróleo por fatores tanto econômicos quanto técnicos. Àquela época, os aspectos ambientais, que hoje privilegiam os combustíveis renováveis como o óleo vegetal, não foram considerados importantes. Dessa forma, os motores diesel foram projetados e são fabricados, de acordo com rígidas especificações, para uso do óleo diesel de petróleo. Esses motores são sensíveis às gomas que se formam durante a combustão do óleo vegetal e que se depositam nas paredes do motor. Para superar esse problema, processos de transesterificação são utilizados para obtenção de ésteres de óleos vegetais (COSTA NETO et al., 2000).

O produto resultante (biodiesel) é definido como ésteres alquílicos de ácidos graxos, obtidos na reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo (óleos e gorduras vegetais ou animais) com álcool de cadeia curta (PINTO et al., 2005). Apresenta propriedades físicas similares ao óleo diesel de petróleo, além de maior lubricidade (COSTA NETO et al., 2000). A Tabela 2.3 apresenta as principais características do biodiesel em relação ao diesel.

Tabela 2.3 - Características físico-químicas do biodiesel de diferentes fontes e do óleo diesel convencional.

Características	Origem do Biodiesel					Óleo diesel
	Mamona	Babaçu	Palma	Algodão	Pequi	
Poder Calorífico (Kcal/kg)	9046	9440	9530	9520	9590	10824
Ponto de névoa (° C)	-6	-6	6	nd	8	1
Índice de Cetano	nd	65	nd	57,5	60	45,8
Densidade a 20 °C	0,9190	0,8865	0,8597	0,8750	0,8650	0,8497
Viscosidade a 37,8 °C (cSt)	21,6	3,9	6,4	6,0	5,2	3,04
Inflamabilidade (° C)	208	nd	nd	184	186	55
Ponto de fluidez (°C)	-30	nd	nd	-3	5	nd
Teor de cinzas (%)	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,014
Cor (ASTM)	1	0	0,5	1,0	1,0	2,0
Resíduo de Carbono	0,09	0,03	0,02	nd	0,01	0,35

Fonte: COSTA NETO et al., 2000.

nd= não determinado

Além de ser totalmente compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades, o biodiesel ainda apresenta várias vantagens adicionais em comparação ao combustível fóssil: é derivado de matérias-primas renováveis de ocorrência natural, reduzindo assim, atual dependência sobre os derivados do petróleo e preservando as suas últimas reservas; é biodegradável; gera redução nas principais emissões presentes nos gases de exaustão (com exceção dos óxidos de nitrogênio, NO_x); possui um alto ponto de fulgor, o que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros; apresenta excelente lubricidade (KNOTHE et al., 2006).

Destaca-se ainda, o fato do biodiesel ser consumido de uma maneira similar à empregada na combustão dos combustíveis à base de petróleo. Desta forma, os motores que foram projetados para combustíveis a diesel podem ser operados sem modificação nenhuma utilizando Biodiesel (MARTÍN; OTERO, 2008).

2.3.1. Matérias-primas para a produção de biodiesel

O biodiesel tem sido produzido a partir de uma variedade de fontes, incluindo óleos vegetais crus e refinados, gorduras animais, óleos e gorduras residuais (RAMOS et al., 2003).

Na categoria de óleos vegetais, podem ser transformados em biodiesel, óleos extraídos da: semente de soja, grão de amendoim, polpa do dendê, amêndoa do coco de dendê, amêndoa do coco da praia, caroço de algodão, amêndoa do coco de babaçu, semente de girassol, bagaço de mamona, semente de colza, semente de maracujá, polpa de abacate, caroço de oiticica, semente de linhaça, semente de tomate, entre muitos outros vegetais em forma de sementes, amêndoas ou polpas (RAMOS et al., 2003).

Óleos vegetais são constituídos de triacilgliceróis, sendo estes compostos por cadeias curtas ou longas de ácidos graxos, cujo grau de saturação, ou insaturação, é função do tipo da semente que originou o óleo. Óleos que possuem maior número de ácidos graxos saturados, como por exemplo, o óleo de babaçu (rico em ácidos láurico), apresenta-se em estado sólido à temperatura de 20–25 °C; aqueles cujo teor de poliinsaturados é mais elevado, por exemplo, soja, algodão, amendoim (ricos em ácidos linoleico/ oleico) apresentam-se em estado líquido à temperatura ambiente ou abaixo desta (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2008).

Embora o óleo de soja seja o mais produzido no Brasil, algumas desvantagens são pertinentes a esse óleo como a formação de depósitos de carbono por combustão incompleta, devido à redução da eficiência de lubrificação do óleo, decorrente da polimerização de ácidos graxos poliinsaturados, como exemplo, os ácidos linoleico e linolênico, presentes em grande concentração nesse óleo e também pela presença de gomas e fosfolipídios que auxiliam no entupimento dos sistemas de injeção (RAMOS et al., 2003). Outros óleos alternativos têm sido empregados para a produção de biodiesel, como os óleos de babaçu e palma. Esses óleos são produzidos nacionalmente e com reduzida concentração de ácidos poliinsaturados, gomas e fosfolipídios e não necessitam da implantação de uma unidade de refino, o que torna atrativo a sua aplicação em reações de síntese de biodiesel.

Com relação ao álcool, somente álcoois simples, tais como metanol, etanol, propanol, butanol e pentanol, têm sido usados na produção do biodiesel. O metanol é o álcool mais freqüentemente utilizado por razões de natureza física e química (cadeia curta e polaridade) (COSTA NETO et al., 2000) e também por apresentar um custo mais acessível que os demais álcoois. Ressalta-se, no entanto, que o metanol tem uma toxicidade muito elevada à saúde humana, podendo causar, inclusive, cegueira e câncer. Por outro lado, o etanol apresenta a

vantagem de não ser tóxico, ser biodegradável e ser produzido a partir de fontes renováveis. A Tabela 2.4 permite uma melhor avaliação das vantagens e desvantagens da utilização do etanol ou metanol como agente acilante na obtenção de biodiesel.

Tabela 2.4 - Comparação das vantagens e desvantagens do etanol e metanol como agente acilante na obtenção de biodiesel.

Etanol	Metanol
Origem renovável	Derivado do petróleo
Produto nacional	O país é importador do produto
Não tóxico	Tóxico
Processo de separação da glicerina mais complexo	Separação imediata da glicerina
Maior investimento na unidade	Menor custo

A opção de utilização de etanol no Brasil é bastante atrativa devido à grande capacidade agrícola e a já consolidada indústria do etanol no país. É natural a idéia de substituição do álcool metílico pelo etílico na produção de biodiesel. Mesmo considerando algumas desvantagens técnicas existentes na produção do biodiesel pela rota etílica (mais lenta, consome mais álcool, maior dificuldade de separação), o biodiesel etílico possui uma viscosidade maior que o biodiesel metílico promovendo uma maior lubricidade em relação ao biodiesel metílico. Destaca-se ainda que biodiesel etílico gera significativamente menos opacidade na fumaça que o biodiesel metílico, sua temperatura de combustão é menor, significando, entre outras coisas, uma redução nas emissões de NO_x . Deste modo, é válido e estratégico qualquer esforço para se aperfeiçoar a rota etílica de produção de biodiesel.

2.3.2. Óleos vegetais

Como o presente trabalho trata da utilização de óleos vegetais para a produção de biocombustível alternativo, dando ênfase aos óleos de babaçu e palma, é importante ressaltar algumas características referentes a esses óleos.

O coco de babaçu conhecido como baguaçu ou coco-de-macaco (*Orrbignya speciosa*), pertence à família botânica da Palma original no Brasil - Região Amazônica e Mata Atlântica na Bahia. Os frutos são ovais alongados, de coloração castanha, a polpa é farinácea e oleosa, envolvendo de 3 a 4 sementes oleaginosas (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2008).

Considerando os 17 milhões de hectares de florestas onde predomina a palmeira do babaçu e as possibilidades de aproveitamento integral do coco, o babaçu constitui,

potencialmente, uma extraordinária matéria-prima para a obtenção de produtos com altos teores de matérias graxas, ou seja, gorduras de aplicação alimentícia ou industrial. Constituindo cerca de 65% do peso da amêndoa, esse óleo é utilizado para a fabricação de sabão, glicerina, óleo comestível, entre outros. O óleo de coco babaçu refinado é um produto largamente utilizado na produção de cosméticos, tais como, cremes faciais, cremes para o corpo, cremes para os lábios, preparados para cabelos secos, entre outros.

Apesar dessa potencialidade, medida pela dimensão de ocorrência e valor econômico das várias aplicações já testadas, a exploração do coco de babaçu é ainda realizada em grande parte do nordeste de forma muito artesanal (PARENTE, 2008), tendo em vista que essas pequenas comunidades não têm acesso aos equipamentos existentes para a quebra automática do coco de babaçu, com a separação de seus constituintes, bem como as tecnologias de aplicações das matérias-primas resultantes.

Desta forma a prática do aproveitamento integral do coco, partindo da quebra mecanizada, poderia ser uma excelente oportunidade de geração de renda na coleta do coco, bem como na industrialização dos constituintes, produzindo riquezas oportunas para os Estados detentores de babaçu, quais sejam: Maranhão, Piauí, Tocantins, parte de Goiás, além de várias micro-regiões isoladas no Ceará, em Mato Grosso, em Rondônia e outras. Neste cenário, o óleo de babaçu poderia ingressar no mercado energético, com quantidades substanciais e preços competitivos (PARENTE, 2008).

O óleo de palma pertence ao grupo do ácido oléico-linoleico, por apresentar uma grande quantidade desses ácidos graxos (D'AGOSTINI, 2001). O óleo extraído do coco do dendê pode ser obtido da polpa e das amêndoas. O óleo da polpa, denominado de óleo de dendê, é o tradicional óleo da culinária baiana, de cor vermelha, com sabor e odor característicos, sendo comercializado internacionalmente com a designação *palm oil*. Seu preço varia na faixa de 300 a 400 dólares/ tonelada. O óleo obtido das amêndoas, denominado de óleo de palmiste, é comercializado no mercado internacional com preços superiores a 500 dólares por tonelada.

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

Para cada 100 toneladas de frutos processados obtém-se em média 30 toneladas de óleo. Cerca de 20% do óleo é descartado no rejeito do tanque de clarificação (borra) e cerca

de 7% perdido na fibra. Os efluentes não são tóxicos, pois somente a água é adicionada durante o processo de extração (FREITAS et al., 1998). Sob o ponto de vista do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o plantio racional da palma africana (dendezeiro) para a utilização do óleo de palma como matéria-prima na produção de biodiesel é uma boa opção, devido a sua cultura apresentar alta produtividade.

2.4. Métodos de obtenção do biodiesel

Quatro métodos têm sido investigados para solucionar os problemas relacionados ao uso direto de óleos vegetais como combustível: viscosidade muito alta, baixa volatilidade e caráter poliinsaturado, e, assim, permitir o seu uso em motores diesel sem problemas operacionais, como a formação de incrustações e depósitos. Dentre os métodos destacam-se: *diluição de óleos vegetais com petrodiesel, micro-emulsificação, pirólise e transesterificação* (KNOTHE et al., 2006).

No entanto, a transesterificação tem sido o método mais utilizado, melhorando as propriedades físicas dos combustíveis para o motor diesel. Os óleos vegetais, quando submetidos ao processo transesterificação, sofrem quedas bruscas nos valores do ponto de névoa e viscosidade, podendo assim o combustível obtido (biodiesel) ser queimado diretamente em motores diesel sem necessidade de adaptação (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

2.5. Transesterificação

A reação de transesterificação na presença de um catalisador (homogêneo ou heterogêneo), representada pelas Figuras 2.4 e 2.5, é utilizada para produção de biodiesel, gerando glicerol como subproduto (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006).

A equação geral da reação de transesterificação é representada na Figura 2.4. Para que a reação ocorra de forma adequada é importante que as três etapas consecutivas sejam monitoradas, bem como a reversibilidade da reação, conforme mostrado na Figura 2.5 (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). Na primeira etapa, os triglicerídeos são convertidos para diglicerídeos, os quais serão convertidos a monoglicerídeos na etapa posterior. Por último, monoglicerídeos são convertidos a glicerol. Em cada etapa da reação, ocorre a liberação de uma molécula do éster de interesse (FREEDMAN; BUTTERFIELD; PRYDE, 1986; NOUREDDINI; ZHU, 1997). O biodiesel formado deve ser purificado antes de sua

utilização em motores e a glicerina pode ser recuperada, aumentando o lucro inerente ao processo, já que possui alto valor agregado (KNOTHE et al., 2006).

Figura 2.4. Representação esquemática da reação global de transesterificação.

Figura 2.5. Representação esquemática das etapas envolvidas na transesterificação.

Os catalisadores usados na reação de transesterificação podem ser homogêneos ou heterogêneos. Os catalisadores homogêneos mais usados são: hidróxidos de sódio (NaOH) ou potássio (KOH), seguidos dos alquilatos metálicos (metóxido ou etóxido de sódio), metais sódio e liga sódio-potássio (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; GIOIELLI, 1998; ROZENAAL, 1992).

Embora a transesterificação química, empregando catálise homogênea alcalina, resulte em altas taxas de conversão de triglicerídeos em seus respectivos ésteres, existem alguns inconvenientes que devem ser considerados: elevados gastos energéticos, difícil recuperação do glicerol, necessidade de remoção do catalisador, além de requerer o tratamento da água alcalina residual e o emprego de substratos e reagentes com baixa concentração de água e ácidos graxos livres. Além disso, o uso dos catalisadores alcalinos homogêneos gera problemas ao meio ambiente, exigindo inúmeras etapas de recuperação e purificação do produto final (AKOH et al., 2007).

Assim, a substituição da catálise homogênea pela heterogênea surge como uma opção tecnológica interessante, pois atende a demanda por processos menos poluentes e mais seletivos, em função das inúmeras vantagens que os processos heterogêneos oferecem sobre os homogêneos clássicos, tais como pouca ou nenhuma corrosão; fácil separação; poucos problemas com rejeitos; fácil manuseio e possibilidade de reutilização. Além disso, o uso de catalisador heterogêneo minimiza os problemas relativos às etapas finais de purificação do biodiesel, reduzindo a ocorrência das reações indesejáveis de saponificação e permite uma simplificação e redução dos custos dos processos pela diminuição do número de operações associadas. Várias pesquisas recentes relacionadas a alcoólise de triglicerídeos envolvem o uso de catalisadores heterogêneos, como por exemplo, zeólitas básicas, óxidos e carbonatos de metais alcalino-terrosos e enzimas, em particular lipases (PINTO et al., 2005).

A reação de transesterificação catalisada por lipases tem encontrado interesse atual, por se tratar de uma via eficiente, altamente seletiva, envolver menor consumo de energia (as reações podem ser realizadas em condições brandas de pressão e temperatura), e facilitar a recuperação do subproduto formado na reação: glicerol. A maioria dessas pesquisas refere-se à determinação da melhor fonte de enzima e dos fatores que influenciam na reação de transesterificação para melhorar o rendimento do biodiesel comparável às reações catalisadas por catalisadores químicos e para possível ampliação da escala industrial (AKOH et al.,

2007).

A Tabela 2.5 apresenta uma comparação entre alguns fatores essenciais da reação de transesterificação (síntese de biodiesel) empregando um catalisador homogêneo químico (alcalino, que é o mais utilizado) e enzimático (lipase).

Tabela 2.5 - Comparação entre catálise alcalina e catálise enzimática (lipases) para a produção de Biodiesel.

	Catálise Alcalina	Catálise Enzimática
Temperatura de reação	60-70 °C	40-60 °C
Sub-produtos	glicerina, sais e sabões	glicerina
Recuperação do catalisador	Difícil	Recuperação superior a 95%
Recuperação do glicerol	Difícil	Fácil
Rendimento de ésteres alquílicos	Alto	Alto
Purificação do produto	Neutralização, Filtração e Centrifugação	Filtração e Centrifugação

Fonte: MARCHETTI, 2007; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; PINTO et al., 2005.

A Tabela 2.6 resume os diversos trabalhos publicados empregando a catálise enzimática como rota de produção de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas lipídicas. Considerando esses resultados promissores, e com base em trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Biocatálise (MARTINS et al., 2007; MOREIRA, 2007; URIOSTE, 2004), foram selecionadas as lipases de *Burkholderia cepacia* (PS) e *Pseudomonas fluorescens* (AK) como biocatalisadores para mediar a síntese de biodiesel das matérias-primas testadas neste trabalho.

Tabela 2.6 - Produção enzimática de biodiesel por transesterificação de óleos e gorduras.

Fonte de óleo ou gordura	Biocatalisador	Agente acilante	Solvente	Rendimento (%)	Referência
pinhão manso	Novozym-435	acetato de etila	isento	91,3	MODI et al., 2007
óleo de laranja				90,0	
óleo de girassol				92,7	
óleo de algodão	Novozym-435	metanol	terc-butanol	97,0	ROYON et al., 2007
óleo de palma	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	etanol	isento	90,9 75,1	MOREIRA et al., 2007
óleo de babaçu	Lipase pancreática	etanol propanol butanol	isento	75 80 95	PAULA et al., 2007
pinhão manso	Novozym-435	propanol	hexano	92,8	MODI et al., 2006
óleo de laranja				91,7	
óleo de girassol				93,4	
óleo de soja residual tratado	<i>Candida cylindracea</i>	metanol	óleo diesel	100	KOJIMA et al., 2004
óleo de soja	<i>Burkholderia cepacia</i>	metanol	isento	67,0	NOUREDDINI et al., 2005
		etanol		65,0	
óleo de soja	<i>Rhizopus miehei</i>	metanol	n-hexano	92,2	SHIEH et al., 2003
óleo residual de fritura	Novozym-435	acetato de metila	mistura de solventes	92,0	XU et al., 2003
óleo de algodão	Novozym-435	metanol	isento	91,5	KOSE et al., 2002

Conclusão Tabela 2.6 - Produção enzimática de biodiesel por transesterificação de óleos e gorduras.

Fonte de óleo ou gordura	Catalisador	Agente acilante	Solvente	Rendimento (%)	Referência
óleo de soja	<i>Candida antarctica</i>	metanol	isento	93,8	WATANABE et al., 2002
óleo de farelo de arroz	<i>Cryptococcus</i> spp.	metanol	meio aquoso	80,0	KAMINI; IEFUJI, 2001
óleo de palmiste	<i>Burkholderia cepacia</i>	etanol, terc-butanol, n- butanol metanol	isento	72,0 62,0 42,0 15,0	ABIGOR et al., 2000
óleo de girassol	Lipozyme	etanol	isento	83,0	SELMi; TOMAS, 1998
óleo de colza	<i>Candida rugosa</i>	2-etil-1-hexanol	isento	97,0	LINKO et al., 1998
óleo de peixe	<i>Candida antarctica</i>	etanol	isento	100	BREIVIK et al., 1997
sebo, óleo de soja óleo de colza	<i>Rhizopus miehei</i> (Lipozyme) <i>Rhizopus miehei</i> (Lipozyme IM-60) <i>Candida antarctica</i> (SP-435)	álcool primário etanol álcool secundário	Hexano Isento hexano	94,8-98,5 65,5 61,2-83,8	NELSON et al., 1996
óleo de girassol	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	metanol	isento éter de petróleo	3,0 79,0	MITTELBACh, 1990

2.6. Micro-ondas

Fornos de micro-ondas têm sido empregados para diversas finalidades, tais como secagem de amostras, extração de compostos orgânicos e mineralização de amostras orgânicas e inorgânicas (ROSINI; NASCENTES; NÓBREGA, 2004). Uma aplicação recente é a obtenção de produtos orgânicos por reações conduzidas em forno de micro-ondas doméstico ou em reatores especificamente preparados para esta finalidade (SANSEVERINO, 2002).

A radiação micro-ondas é um tipo de energia eletromagnética confinada a uma faixa do espectro que se estende desde 300 a 300000 MHz e que corresponde a comprimento de onda de 1 mm a 1 m. Radares de aviação civil, aparelhos de telefonia celular e fornos de micro-ondas domésticos, são exemplos de dispositivos que funcionam a base de micro-ondas e que estão presentes no cotidiano de mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo (KEYSON et al., 2006).

Os princípios envolvidos no aquecimento por micro-ondas englobam conceitos químicos e físicos, tais como, temperatura, ligação química, estrutura molecular, momento de dipolo, polarização, capacidade calorífica e constante dielétrica (ROSINI; NASCENTES; NÓBREGA, 2004).

As micro-ondas são geradas por uma válvula chamada magnetron. Esta consiste de um dispositivo sob vácuo que converte energia elétrica em micro-ondas. Uma diferença constante de potencial é aplicada entre o ânodo e o cátodo, ambos presentes na cavidade do micro-ondas. Posteriormente, os elétrons são acelerados do cátodo para o ânodo na presença de um forte campo magnético, ocorrendo a emissão de ondas eletromagnéticas que são guiadas até a cavidade contendo o material a ser aquecido (BARBOZA et al., 2001). A Figura 2.6 mostra a válvula magnetron e suas principais partes constituintes.

Figura 2.6. Fotografia de um magnetron e as principais partes: geometria interna da cavidade de ressonância aberta.

O aquecimento por micro-ondas, também denominado aquecimento dielétrico, pode ocorrer por meio de dois mecanismos. O primeiro, denominado rotação de dipolo, relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido as moléculas voltam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida nestes dipolos é dissipada na forma de calor. No segundo mecanismo, denominado condução iônica, o calor é gerado por perdas por fricção, que acontecem pela migração de íons dissolvidos sob ação de um campo magnético (SANSEVERINO, 2002). A Figura 2.7 mostra a molécula da água nos instantes de rotação gerados pelas ondas eletromagnéticas. No instante (1) a molécula da água está alinhada com o campo elétrico da onda; no instante (2) o campo inverteu seu sentido e a molécula tende a girar; no instante (3) a onda muda de sentido novamente e a molécula tende a acompanhar o campo. O processo se repete de acordo com a frequência da onda.

Figura 2.7. Ilustração da molécula da água nos instantes de rotação gerados pelas ondas eletromagnéticas.

2.6.1. Comparação do aquecimento de micro-ondas com aquecimento convencional

Relatos apontam o uso do reator de micro-ondas como fonte de aquecimento de reações químicas, ressaltando a obtenção menores tempos de reação e rendimentos superiores àqueles obtidos com fonte de aquecimento convencional, isto é, aquecimento com o uso de manta de aquecimento ou chapa-quente, bico de bunsen, entre outros (GRAEBIN; EIFLER-LIMA, 2005).

Em um forno de micro-ondas doméstico, as ondas eletromagnéticas geradas pelo magnetron são guiadas para a cavidade do forno e refletidas para as paredes deste. Ao contrário do aquecimento convencional, no qual uma substância é aquecida de fora para dentro, no interior do forno de micro-ondas o que ocorre é uma transferência de calor dos

diversos pontos que absorveram a energia da parte interna para externa (SADICOFF; AMORIM; MATTOS, 2000).

Nos domínios da química e das ciências dos materiais, a aplicação da tecnologia de micro-ondas tem despertado especial interesse na síntese de compostos orgânicos e inorgânicos e no tratamento térmico de muitos materiais em escala laboratorial e industrial (KEYSON et al., 2006).

Diversas reações clássicas podem ser bastante aceleradas (muitas vezes por um fator 10^3) quando o aquecimento é realizado por meio de irradiação de micro-ondas ao invés de aquecimento convencional. Além disso, os rendimentos de reações realizadas em presença de micro-ondas costumam ser maior, além de gerar menor quantidade de subprodutos e não ocorrem decomposições de materiais (SADICOFF; AMORIM; MATTOS, 2000).

Desta forma, recentemente, as reações de transesterificação têm recebido maior destaque devido à demanda por biodiesel, incentivada pelo programa nacional de combustíveis alternativos derivados de óleos vegetais. Este processo normalmente é realizado sob temperaturas elevadas e por longos tempos reacionais (geralmente maiores que 24 h). Sendo assim, um dos fatores significantes que pode reduzir o tempo dessas reações é a utilização da irradiação de micro-ondas como transferência de calor (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006).

Reações orgânicas com aquecimento por micro-ondas podem ser conduzidas em micro-ondas modificados, em digestores de micro-ondas (que tradicionalmente são usados em Química Analítica) ou em reatores de micro-ondas. O surgimento de reatores de micro-ondas para condução de reações químicas ocorreu como consequência direta do estudo das reações em forno doméstico, que demonstrou o grande potencial desta técnica. Segundo Sanseverino (2002), estes reatores apresentam algumas vantagens marcantes sobre o forno doméstico de micro-ondas, tais como: possibilidade de realização de refluxo, controle de temperatura e pressão e outro fator muito importante é a distribuição homogênea das micro-ondas.

2.6.2. Reações enzimáticas assistidas por micro-ondas

No desenvolvimento de processos mais limpos e eficientes duas condições reacionais parecem bastante adequadas para as transformações químicas: reações enzimáticas em sistemas isentos de solventes e reações aceleradas sob irradiação de micro-ondas (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006).

Reações enzimáticas assistidas por micro-ondas ainda estão em fase inicial de investigação, apesar de constituírem tema de relevante importância principalmente para aplicação em sistemas não aquosos, nos quais as enzimas apresentam uma elevada estabilidade térmica quando comparada àquela observada em sistemas aquosos. Trabalhos publicados sugerem a possibilidade dos campos magnéticos de alta frequência influenciarem não apenas a velocidade inicial das reações, mas também a enantiosseletividade das enzimas quando comparado com sistemas submetidos ao aquecimento convencional (GUPTA; ROY, 2004; YADAV; LATHI, 2006). A Tabela 2.7 apresenta de forma resumida exemplos de diversas reações enzimáticas assistidas por micro-ondas, com enfoque particular nos tipos de enzimas e substratos usados, bem como nos parâmetros de operação do equipamento gerador de microondas.

A irradiação de micro-ondas altera a taxa das reações químicas. Os resultados têm destacado com frequência: rendimentos elevados, produtos purificados, maior eficiência e distribuição homogênea da energia e efeitos de aquecimento e facilidade de eliminação da água (SAXENA et al., 2005).

As diversas técnicas de aquecimento por micro-ondas têm se expandido nas diversas áreas e com profundo impacto. Um dos casos é na aplicação em processos biológicos relevantes, assim como na síntese de peptídeos e oligopeptídeos. Incluem também nesta grande área, a aplicação de aquecimento de micro-ondas para sínteses orgânicas catalisadas por enzimas. Muitos dos trabalhos têm sido focalizados no uso de lipases: pesquisadores revelam que as velocidades de reações e os rendimentos dos produtos obtidos nas reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipases são significativamente elevados quando se usa aquecimento de microondas. A estabilidade enzimática também é mais elevada sob aquecimento de micro-ondas em comparação ao aquecimento térmico convencional (LEADBEATER; STENCEL; WOOD, 2007).

Réjasse e colaboradores (2004), estudaram a estabilidade térmica da lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435) após incubação a 100 °C sob aquecimento convencional e de irradiação de micro-ondas. A reação de estudo foi a reação de transesterificação (alcoólise) do butanol com butirato de etila, visando à obtenção do butirato de butila. A lipase foi incubada separadamente nos dois reagentes (butanol e butirato de etila) por um período máximo de 6 h. Em seguida, o biocatalisador foi recuperado por filtração e testado na síntese do butirato de butila. Os resultados mostraram que, quando incubada em butanol sob aquecimento

convencional, a lipase apresentou uma constante de inativação térmica (k_d) da ordem de $10,04 \text{ h}^{-1}$, enquanto que sob aquecimento de micro-ondas apresentou um k_d aproximadamente 7 vezes menor (da ordem de $1,59 \text{ h}^{-1}$). Estes resultados revelaram um tempo de meia-vida do biocalisador de 6,3 vezes maior em relação ao obtido para o biocatalisador submetido ao aquecimento convencional. Entretanto, quando a incubação foi realizada no butirato de etila a constante de desativação térmica (k_d) foi similar para os dois tipos de aquecimento. Desta forma, sob aquecimento de micro-ondas a polaridade do solvente foi considerada um parâmetro muito importante, pois quanto maior a polaridade do solvente, maior foi sua facilidade de interagir com a energia do micro-ondas. Neste caso, uma potência de 24W foi fornecida ao butanol para manter a temperatura à 100°C , enquanto que 210W foram requeridos para o butirato de etila.

Lin e Lin (1998), empregando lipase pancreática em reações sob micro-ondas, mostraram incrementos de quatro a seis vezes na velocidade de reação e de três a nove vezes na estereosseletividade quando comparado com os resultados obtidos usando aquecimento convencional.

O mecanismo de interação das micro-ondas com os sistemas enzimáticos ainda não está claramente definido. Entretanto, alguns autores sugerem que o efeito das micro-ondas na velocidade de reação é creditado não apenas ao efeito térmico (KABZA et al., 1996). De uma maneira geral, considera-se que a velocidade de reação é acelerada desde que as moléculas absorvam energia por dois mecanismos distintos: rotação de dipolo e movimento iônico (ROY; GUPTA, 2003). Esses pesquisadores testaram o efeito de micro-ondas em reações de esterificação usando quimiotripsina e constataram incrementos de 2 a 5 vezes nas velocidades reacionais. Combinando a ativação com sais e ajuste de pH, sob micro-ondas, foram obtidas velocidades de transesterificação 20 vezes superiores ao experimento controle (sistema não exposto ao campo).

Resultados não menos importantes foram reportados por Parker et al. (1996) enfatizando a importância da otimização da atividade da água para obter incrementos na velocidade de reação. Nesse trabalho, a enzima foi previamente hidratada e ressuspensa em meio orgânico a 50°C por irradiação em micro-ondas, alcançando velocidades de reação de duas a três vezes superiores as obtidas sob aquecimento convencional. Finalmente, especial destaque deve ser dado ao trabalho descrito por Maugard et al. (2003) que reportaram incrementos da ordem de 217 vezes na síntese de oligossacarídeos a partir de lactose usando

β -galactosidase sob micro-ondas.

Vantagens adicionais da irradiação de micro-ondas perante o aquecimento convencional tem sido reportadas no aumento da enantiosseletividade enzimática. O trabalho recente publicado por Yu et al. (2007) relata a comparação da resolução enzimática do R, S-2-octanol utilizando os dois tipos de aquecimento: convencional e irradiação de micro-ondas. Nesse caso, os resultados obtidos por irradiação de micro-ondas foram realçados tanto para a velocidade inicial da reação quanto para a enantiosseletividade enzimática. Uma conversão de 50% foi obtida após 3 h de reação sob irradiação de micro-ondas, enquanto que para o aquecimento convencional foram requeridas 12 h para obter a mesma conversão. Tanto a atividade enzimática como a enantiosseletividade foram calculadas, e os resultados demonstraram elevada eficiência da irradiação de micro-ondas. A enantiosseletividade foi praticamente 3 vezes maior quando a reação foi mediada por irradiação de micro-ondas.

A hidrólise da trioleína usando a lipase fúngica de *Aspergillus carneus* foi conduzida sob ambas formas de aquecimento: convencional e irradiação de micro-ondas com baixa (175W/ 38- 40 °C) e alta (800W/ 90 °C) potência (SAXENA et al., 2005). A análise dos produtos obtidos na hidrólise (trioleína, dioleína, monoleína e ácido oléico) revelou que em condições normais de aquecimento, o rendimento desejado foi alcançado com 24 h de reação. No aquecimento por irradiação de micro-ondas sob níveis baixos de potência foram necessários apenas 45 a 90 segundos para a produção de monoleína e ácido oléico e sob níveis altos de potência o tempo foi ainda reduzido para 15 a 30 segundos. A hidrólise completa da trioleína foi realizada em 160 segundos sob potência baixa e 75 segundos sob potência alta.

Esses mesmos autores relatam ainda a produção de bioéster, biosurfatante e glicerídeos sob as mesmas condições especificadas. Estas reações foram conduzidas rapidamente por um período máximo de 30 segundos em meio com ou sem solvente operando-se nas condições altas de potência e mediadas pela irradiação de micro-ondas.

A maioria dos estudos tem sido realizada usando fornos de micro-ondas domésticos, apesar deste equipamento não permitir um controle eficaz de temperatura e pressão e não apresentar uma distribuição homogênea da emissão das micro-ondas. Para essa finalidade, torna-se necessário o uso reatores equipados com um sistema contínuo de controle de temperatura por infravermelho e distribuição homogênea das micro-ondas (PARKER et al., 1996), como o equipamento utilizado nesse trabalho.

Tabela 2.7 - Reações enzimáticas assistidas por micro-ondas.

Tipo de reação	Substrato	Enzima	Parâmetros utilizados (Potência/ temperatura)	Referência
Hidrólise	Triolina	Lipase de <i>Aspergillus carneus</i>	175W/ 38-40°C	SAXENA et al., 2005
Transesterificação	Óleo vegetal	Lipase de <i>Aspergillus carneus</i>	800W/ 90°C	SAXENA et al., 2005
*Esterificação	*n-Acetil-L-fenilalanina e etanol	* α -Quimotripsina	Condições não especificadas	ROY; GUPTA, 2003
**Transesterificação (solvente orgânico)	**n-Acetil-L-fenilalanina etil ester e propanol	**Subtilisina Carlsberg	Condições não especificadas	ROY; GUPTA, 2003
Síntese	p-nitrofenil- β -D-galatopiranoside e lactose	β -galatosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i>	12W/ 40°C	MAUGARD et al., 2003
Acilação (solvente orgânico)	a) 1,2,3,4-Tetrahydro-1-naftol b) Mentol e ácido palmítico	Lipase de pâncreas de porco (LPP)	700W/ 25-35° C	LIN; LIN, 1998
Interesterificação	Butanol etilbutirato	<i>Fusarium solani</i> Cutinase	2,45 Ghz / 50° C	PARKER et al., 1996
Hidrólise	P-nitrofenil poliéster e carboidratos	Celulase	750W / 75° C	KABZA et al., 1996
Transesterificação	Feniletanol	<i>Candida antartica</i> -Novozymes e <i>Pseudomonas cepacia</i>	30-90W/ 70-100° C	CARRILLO-MUÑOZ et al., 1996

2.6.3. Reatores de Micro-ondas

Reatores de micro-ondas são atualmente comercializados por diversas empresas, entre as quais se destacam: Cem e Anton Par. A Tabela 2.8 apresenta de forma resumida dados descritos na literatura referentes à condução de reações enzimáticas usando reator de micro-ondas manufaturado comercialmente.

No presente trabalho foi utilizado o reator de micro-ondas Discover/University-Wave, Cem Corporation modelo PN # CE-925SB235-SPB-PLUG (Figura 2.8), que possui uma câmara interna cilíndrica com as seguintes dimensões: 100 mm de altura, 75 mm diâmetro, dotado de agitação magnética, a qual pode ser ajustada em três níveis (baixo, médio e alto). A potência máxima de operação é da ordem de 300 W. O controle de temperatura é realizado com auxílio de ar comprimido direcionado para o interior da câmara; o fluxo de ar pode ser configurado para operar em diferentes níveis de pressão e/ou de modo intermitente. A temperatura da reação é monitorada, por um sensor de infravermelho, localizado na parte inferior da câmara. Um software ChemDriver, é utilizado para coleta dos dados referentes a cada experimento como por exemplo: variação de irradiação e temperatura em função do tempo. Destaca-se ainda que o formato cilíndrico da câmara interna propicia a irradiação homogênea em toda a extensão da mistura reacional, diferentemente dos reatores de micro-ondas construídos a partir de adaptações em fornos domésticos.

Figura 2.8. Reator de micro-ondas Discover.

Tabela 2.8 - Dados relatados na literatura referentes a condução de reações enzimáticas usando reator de micro-ondas manufaturado comercialmente.

Objetivo do estudo	Tipo de reator		Condições de operação do reator	Referencia
Influência das micro-ondas na digestão da tripsina em diferentes solventes	reator comercial Focused Synthesis, Discover, CEM Co).	monomodo (CEM Microwave Model	O reator foi operado numa frequência de 2,5 GHz e uma potência máxima de 300 W. A temperatura do meio reacional foi monitorada por um sensor de infravermelho e a temperatura da reação era medida instantaneamente após a irradiação de micro-ondas utilizando um termopar.	LIN et al., 2005
Síntese enzimática do propileno glicol mono laurato a partir do 1,2-propanodiol e ácido láurico	Micro-ondas CEM-SP1245 CEM Corporation, EUA.	Discover, modelo,	Foi utilizado um frasco cilíndrico de vidro, com capacidade para 120 mL no interior da câmara de micro-ondas, sob agitação mecânica realizada por uma turbina de 1,5 cm de diâmetro, resultando em uma agitação do meio reacional em 500 rpm.	YADAV; LATHI, 2006
Determinar a estabilidade térmica da lipase imobilizada de <i>Candida antarctica</i> lipase B em meio orgânico	reator de micro-ondas monomodo Synthewave S402 (Prolabo, França).		O reator operava numa potência máxima de 300 W, e era dotado de agitação em diferentes velocidades, além de possuir um controle de temperatura por infra-vermelho.	RÉJASSE et al., 2004
Verificar os efeitos da alta pressão e irradiação das micro-ondas na hidrólise da β -lactoglobulina pela α -quimiotripsina e pronase	reator de micro-ondas monomodo (Prolabo, Fontenay Sousbois, França)		O frasco contendo o substrato foi pré-aquecido a 40 °C, e após adição das enzimas foi acondicionado em um recipiente de teflon e inserido no forno para irradiação de micro-ondas. Na reação foi utilizado entre 5 a 10% da potência nominal do aparelho (300W).	IZQUIERDO, 2005

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Fonte de lipases

Os experimentos foram realizados com preparações comerciais de lipases microbianas de *Burkholderia cepacia* (Lipase PS) e *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), manufaturadas pela Amano Pharmaceuticals e adquiridas comercialmente da Sigma Co. (St. Louis, MO, USA). Essas enzimas foram empregadas na forma imobilizada empregando técnicas adequadas. Para a lipase de *Burkholderia cepacia* foi efetuado um estudo detalhado para seleção do suporte, enquanto para a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (AK) foi utilizado o procedimento previamente reportado por Moreira et al. (2007) e Santos et al. (2008a).

3.1.2. Substratos

Como substratos na síntese de biodiesel foram utilizados: etanol anidro Cromoline 99,8%, (São Paulo, Brasil), amostras de óleo de babaçu refinado fornecida gentilmente pela Cognis (Jacareí, São Paulo, Brasil) e amostras de óleo de palma refinado fornecidas gentilmente pela Agropalma (Belém, Pará, Brasil).

3.1.3. Suportes de imobilização

Como suportes foram usados óxido de nióbio hidratado ($\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) sintetizado segundo técnica descrita por Miranda, (2004) e o composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO_2 -PVA) preparado pela técnica sol-gel, conforme descrito por Paula et al. (2008), empregando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich (EUA).

3.1.4. Outros reagentes

Outros reagentes utilizados foram: solventes (acetona - Cromoline, etanol 95% - Reagen, hexano - Cromoline), hidróxido de potássio (Merck), indicador ácido-base (fenolftaleína - Coleman), álcool polivinílico (MM 72.000, Reagen), HCl (mínimo 36%, Isofar), glutaraldeído 25% (Nuclear), epícloridrina (Sigma), polietilenoglicol (MM 1500, Synth), goma arábica em pó pura (Synth) e óleo de oliva comercial baixo teor de acidez

(Carbonell). Padrões cromatográficos (ésteres etílicos) previamente sintetizados por via química (URIOSSTE et al., 2008).

3.2. Equipamentos

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

Tabela 3.1 - Tipo de análise e equipamentos utilizados nos ensaios.

Tipo de análise e/ou ensaio	Equipamento	Modelo/ fabricante
Medidas de pH	Potenciômetro	Modelo TEC2, Tecnal
Dosagem de ésteres etílicos (biodiesel)	Cromatógrafo a gás	Modelo GC-3800, Varian
Pesagem de materiais	Balança analítica	Modelo AY220, Shimadzu
Agitação de reações	Placa de agitação magnética e temperatura controlada	Modelo 752A, Fisatom
Purificação do produto	Rota evaporador	Modelo 801, Fisatom
Análise qualitativa	Espectrômetro no infravermelho	Spectrun One, Perkin Elmer
Atividade hidrolítica	Bureta digital (50mL)	Hirshmann Techcolor
Teor de umidade	Balança analítica Karl Fischer	ID 50, Marte Mettler DL18, Titrator
Reações utilizando campos magnéticos	Reator de micro-ondas Discover	Discover/University-Wave, Cem Corporation modelo PN # CE-925SB235-SPB-PLUG
Medidas de viscosidade	Viscosímetro	Modelo LVDVIII-CP 520, Brookfield

3.3. Metodologia experimental

3.3.1. Síntese do suporte inorgânico

O óxido de nióbio (Nb_2O_5) foi sintetizado conforme metodologia descrita por Miranda (2004), consistindo da fusão do pentóxido de nióbio com carbonato de potássio, na proporção 1:5 numa temperatura de 1000 °C, por 5-6 h. O material fundido foi retirado da mufla e então lixiviado com água deionizada fervente. Adicionou-se lentamente (gota a gota) à solução de niobato de potássio, solução de ácido nítrico (1,0 M) até ajuste do pH em valores entre 0,5–1,0. O precipitado foi filtrado num sistema a vácuo, e posteriormente submetido a diversas lavagens com água deionizada. O óxido de nióbio V foi seco em estufa a 50 °C por 24 h e

mantido em dessecador, sob sílica gel até sua utilização. As propriedades morfológicas do suporte obtido estão mostradas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Propriedades morfológicas do suporte Nb₂O₅ quanto à área superficial, volume de poros e tamanho médio dos poros.

Área superficial específica (m ² /g)	Volume de poros (cm ³ /g)	Tamanho médio dos poros (Å)
42,15	0,029	17,93

Em seguida, o óxido de nióbio hidratado foi tratado por imersão em HNO₃ a 1% e aquecido a 75 °C sob agitação durante 1 h. O material foi filtrado em funil de Büchner e lavado intensamente com água destilada até a obtenção de filtrados com pH neutro. O suporte pré-tratado foi levado a secagem em estufa numa temperatura de 105 °C por 24 h. O procedimento de ativação do óxido de nióbio foi baseado na metodologia descrita por Miranda et al. (2006), envolvendo duas etapas: silanização do suporte com solução de γ -aminopropiltrietoxisilano (γ -APTS) a 0,5% (v/v) e ativação do suporte com solução de glutaraldeído numa concentração de 2,5% em tampão hidrogenofosfato 0,1 M (pH 8). O suporte ativado foi transferido para um funil de Büchner e lavado com água destilada para eliminar o excesso de glutaraldeído. Após a lavagem, a água foi succionada por 30 min.

3.3.2. Síntese do suporte híbrido

O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico foi sintetizado, conforme metodologia descrita por Paula et al. (2008), pela mistura de 5mL de tetraetil ortosilicato (TEOS), 5mL de etanol e 6mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (m/v). Essa mistura foi aquecida a 60 °C, sob agitação, com adição de duas a três gotas de HCl concentrado. Após um período de incubação de 40 min, a preparação foi mantida a 25 °C por 48 h até a completa solidificação (formação da rede de interpenetrada de polissiloxano e álcool polivinílico – SiO₂-PVA). O composto foi então triturado até que passasse completamente por uma peneira padrão série Tyler de 42 MESH e ficasse retido em peneira de 60 MESH. A Tabela 3.3 apresenta as propriedades morfológicas do suporte obtido.

Tabela 3.3 - Propriedades morfológicas do suporte SiO₂-PVA quanto à área superficial, volume de poros e tamanho médio dos poros.

Área superficial específica (m ² /g)	Volume de poros (cm ³ /g)	Tamanho médio dos poros (Å)
461,00	0,275	22,91

Em seguida, o suporte foi embebido em solução de agente de ativação epicloridrina 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio (0,1 M e pH 7), na proporção massa de suporte: volume de solução de 1:10, sendo esta mistura mantida sob agitação por 1 h à temperatura ambiente. Após este período, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada e solução tampão de fosfato, e em seguida levado à estufa (60 °C) por 24 h.

3.3.3. Imobilização da lipase PS nos suportes ativados

Os suportes ativados (SiO₂-PVA e Nb₂O₅) foram embebidos em hexano numa relação sólido: líquido de 1:10 e mantido sob agitação branda por 2 h. Após este período, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 200 mg de lipase PS na sua forma livre e 100 µL de solução aquosa contendo 5 mg/mL de polietilenoglicol (PEG-1500). As suspensões contendo enzima e suporte, foram mantidas sob suave agitação a 30°C por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a 4 °C. A recuperação dos derivados imobilizados foi efetuada por filtração à vácuo, com lavagens sucessivas com hexano até a redução da umidade dos derivados imobilizados em valores não superiores a 15%. A atividade hidrolítica dos derivados imobilizados foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al., 1999). O rendimento de imobilização ($\eta\%$) foi calculado pela equação 3.1.

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

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

3.3.4. Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas dos derivados imobilizados

3.3.4.1. Propriedades bioquímicas

A influência do pH e da temperatura na atividade hidrolítica da lipase PS livre e dos derivados imobilizados foram avaliadas em experimentos realizados segundo um planejamento experimental 2^2 estrela rotacional com quatro replicatas no ponto central. Os níveis reais e codificados das variáveis em estudo estão apresentados na Tabela 3.4.

Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato (preparado pela emulsão de azeite de oliva com solução de goma arábica a 7%), 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0, 1 M, com pH variável, 6,1, 6,5, 7,5, 8,5, 8,9) e preparação enzimática (0,5mg/mL), para enzima livre ou 0,05g do derivado imobilizado. Os frascos foram incubados em temperaturas variadas (36, 40, 50, 60 e 64 °C) por 5 min, em banho termostatzado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1). Os resultados obtidos foram analisados com auxílio dos softwares Statistica versão 5.0 (StatSoft Inc., USA) e Design-Expert 6.0 (Stat-Ease Corporation, USA).

Tabela 3.4 - Níveis reais e codificados para as variáveis temperatura e pH avaliados segundo planejamento experimental estrela rotacional.

Variáveis		Níveis				
Reais	Codificadas	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
pH	X_1	6,1	6,5	7,5	8,5	8,9
Temperatura	X_2	36	40	50	60	64

3.3.4.2. Parâmetros cinéticos

Para o cálculo da constante de Michaelis-Menten foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variáveis obtidos a partir de emulsões preparadas em diferentes proporções de azeite de oliva e solução aquosa de goma arábica (7% m/v). As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisada pelas preparações de lipase livre e imobilizada foram determinadas de acordo com a metodologia de hidrólise do azeite de oliva descrita anteriormente. As constantes cinéticas K_m e V_{max} foram determinadas pelo Programa Enzyme fitter.

3.3.5. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi conduzida na faixa de onda de 400 a 4000 cm^{-1} para o acompanhamento do procedimento de imobilização lipase livre nos diferentes suportes. O Espectrômetro utilizado foi modelo Spectrum GX, Perkin Elmer.

3.3.6. Síntese de Biodiesel

3.3.6.1. Imobilização das lipases em SiO_2 -PVA para utilização na síntese do biodiesel

O suporte SiO_2 -PVA previamente ativado com epícloridrina, conforme descrito no item 3.3.2, foi inicialmente embebido em hexano numa relação sólido: líquido de 1:10 e mantido sob agitação branda por 2 h. Após este período, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 250 mg das lipases selecionadas (PS e AK) na sua forma livre e 100 μL de solução aquosa contendo 5 mg/mL de polietilenoglicol (PEG-1500), como estabilizante da enzima. A suspensão contendo enzima e suporte foi mantida sob suave agitação a 30°C por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a 4 °C. A recuperação dos derivados imobilizados foi efetuada por filtração à vácuo, com lavagens sucessivas com hexano até a redução da umidade dos derivados imobilizados em valores não superiores a 15%. A atividade hidrolítica dos derivados imobilizados foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al., 1999).

3.3.6.2. Reação de transesterificação enzimática do óleo de babaçu e etanol sob aquecimento convencional

As reações de síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu foram realizadas em reatores de vidro cilíndrico (40 mL) hermeticamente fechados, utilizando-se agitação mecânica. (170 rpm) na temperatura de 50 °C e razão molar (1:12 óleo de babaçu/etanol). As reações foram incubadas com as preparações de lipase PS imobilizada numa proporção fixa de 20% (m/m) em relação à massa total de reagentes. As reações foram conduzidas por um período máximo de 48 h e monitoradas pela retirada de alíquotas do meio reacional para dosagem dos ésteres etílicos formados (URIOSTE et al., 2008).

3.3.6.3. Reação de transesterificação enzimática do óleo de babaçu e etanol sob irradiação de micro-ondas (reator Discover)

A otimização das condições reacionais da reação de transesterificação do óleo de babaçu visando à obtenção de ésteres de etila foi efetuada por meio de planejamento experimental, considerando como variáveis independentes: razão molar (óleo-etanol) e temperatura. As sínteses foram realizadas no reator de micro-ondas Discover. Um reator de vidro esférico (100 mL), acoplado com condensador de refluxo contendo óleo de babaçu e etanol numa razão molar adequada para o experimento correspondente, foi inserido na câmara de microondas do reator, sendo irradiada determinada potência de micro-ondas para manter a temperatura adequada do meio reacional praticamente constante durante todo o experimento (Figura 3.1). As misturas foram incubadas com lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA na proporção de 500 U/g de óleo. As reações foram conduzidas por um período máximo de 8 h, com agitação magnética no nível alto para todos os experimentos. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação, para quantificação da formação dos ésteres de etila por cromatografia de fase gasosa. A Tabela 3.5 mostra os níveis selecionados para o planejamento experimento.

Figura 3.1. Reator de micro-ondas Discover operando durante os experimentos.

Tabela 3.5 - Níveis selecionados para o planejamento experimental da etanolise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA.

Variáveis	Níveis				
	alfa (-)	nível baixo	ponto central	nível alto	alfa (+)
Temperatura (°C)	40	43	50	57	60
Razão molar (óleo/etanol)	7,0	8,4	12,0	15,4	16,8

3.3.6.4. Reação de transesterificação enzimática do óleo de palma e etanol sob irradiação de micro-ondas (reator Discover)

A otimização das condições reacionais da reação de etanolise do óleo de palma foi avaliada em experimentos realizados por meio de um planejamento fatorial completo 2² estrela rotacional com 3 replicatas no ponto central, conforme descrito na Tabela 3.6. Foram consideradas como variáveis independentes: razão molar (óleo: etanol) e temperatura. As sínteses foram realizadas no reator de micro-ondas Discover, no qual foi acoplado um reator de vidro esférico (100 mL) acoplado com condensador de refluxo, contendo óleo de palma e etanol na razão molar adequada, para cada experimento correspondente. A irradiação das micro-ondas foi variada dependendo da temperatura de cada reação, sendo adequada para manter a temperatura do meio reacional praticamente constante durante todo o experimento. As misturas foram incubadas com lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA numa proporção fixa de 20% em relação a massa total de reagentes. As reações foram conduzidas por um período máximo de 8 h, com agitação magnética no nível alto para todos os experimentos. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação, para quantificação da formação dos ésteres de etila por cromatografia de fase gasosa.

Tabela 3.6 - Níveis selecionados para o planejamento experimental da etanolise do óleo de palma catalisada pela lipase AK imobilizada em SiO₂.

Variáveis	Níveis				
	-α	nível baixo (-)	ponto central	nível alto (+)	+α
Temperatura (°C)	40	43	50	57	60
Razão molar (óleo/etanol)	6,3	8,0	12,0	16,0	17,7

3.3.7. Testes de estabilidade das lipases imobilizadas

3.3.7.1. Estabilidade térmica sob aquecimento convencional

O efeito da temperatura na estabilidade da lipase PS livre e imobilizada nos suportes SiO₂-PVA e Nb₂O₅ foi determinado por meio da incubação de amostras da lipase livre (1 mL, 5 mg/mL) e imobilizada (0,05 g) numa temperatura de 60 °C em meio aquoso (0,1 M tampão fosfato, pH 6,5) durante diferentes períodos de incubação. Para a lipase livre retiram-se amostras nos tempos de 5, 10, 15, 30 e 60 min, e para as lipases imobilizadas retiram-se amostras nos intervalos de 30, 60 e 120 min. Após tratamento térmico, as amostras de lipase (livre e imobilizada) foram imediatamente resfriadas e a atividade residual determinada a 40 °C, pela adição de 5 mL de substrato preparado (emulsão do azeite de oliva/ água), conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). As constantes de desativação (k_d , h⁻¹), foram calculadas pela equação 3.2.

$$\ln A = \ln A_0 - K_d * t \quad \text{Equação 3.2}$$

Em que: A_0 = atividade enzimática inicial; A = atividade residual após tratamento térmico durante um certo período de incubação (t).

3.3.7.2. Estabilidade térmica dos derivados imobilizados sob irradiação de micro-ondas

A estabilidade térmica das lipases imobilizadas (PS e AK) em SiO₂-PVA foi determinada submetendo ao efeito de irradiação de micro-ondas 0,05 g do derivado imobilizado em meio orgânico (heptano) durante os tempos 0,5; 1h; 2h e 3h, sob uma irradiação de micro-ondas de 100W, com o intuito de manter a temperatura constante em 60 °C. Após o período de incubação, as amostras dos derivados imobilizados foram retiradas e imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação. Em seguida, o solvente heptano foi removido e as atividades residuais dos derivados imobilizados foram determinadas a 40 °C, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). As constantes de desativação térmica foram calculadas, como descrito anteriormente na equação 3.2.

3.3.7.3. Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi verificada em reações de transesterificação do óleo de babaçu com etanol em regime de bateladas consecutivas com reutilização do sistema imobilizado, segundo metodologia descrita por Moreira, 2007.

As reações de transesterificação foram realizadas utilizando-se 2,7 g de lipase imobilizada (massa seca) e 12 g de substrato, na razão molar 1:7 óleo/etanol, em bateladas consecutivas (24 h/ 40°C), monitoradas no tempo inicial e final. As reações foram realizadas em reator cilíndrico de 40 mL e a lipase imobilizada foi acondicionada em uma cesta construída em tela de aço inox, malha 100 (0,147 mm), com altura de 65 mm e diâmetro de 12 mm, que era colocada na parte superior do reator e retirada do reator ao final da reação. Entre as bateladas, a lipase imobilizada foi lavada com uma mistura de hexano/acetona para a remoção dos reagentes e/ou produtos eventualmente retidos no suporte. Após duas horas, tempo necessário para total evaporação do solvente a lipase imobilizada foi reutilizada em uma outra reação com um novo substrato na mesma concentração do utilizado na reação anterior. Ao final de cada ciclo, foi analisado o teor dos ésteres formados por cromatografia de fase gasosa. O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi calculado pela equação 3.3.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_d} \quad \text{Equação 3.3}$$

Em que k_d = constante de desativação.

3.4. Métodos de Análise

3.4.1. Índice de Acidez (I.A.)

O índice de acidez dos óleos vegetais foi determinado de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta determinação em um Erlenmeyer pesaram-se cerca de 2,0 g da amostra, seguida da adição de 25mL de uma mistura de éter etílico e álcool etílico (95%) preparada na proporção 2:1 em volume. Em seguida, titulou-se com solução de hidróxido de potássio (KOH) de concentração 0,01M previamente padronizada, utilizando-se fenolftaleína como indicador. O resultado foi calculado pela relação entre a massa em miligramas de hidróxido de potássio consumidos por grama de amostra analisada, conforme as equações 3.4 (a, b).

$$I.A. = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times MM_{base} \times C_{base}}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.4 (a)}$$

$$\%AGI = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times MM_{ácido\ graxo} \times C_{base} \times 100}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.4 (b)}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL), MM_{base} = Massa Molar do KOH (56,1g/mol), C_{base} = Concentração molar da solução de KOH (mol/L), $MM_{ácido\ graxo}$ = Massa Molar do ácido oléico (282 g/mol), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g)

3.4.2. Índice de Peróxido (I.P.)

O índice de peróxido dos óleos vegetais foi determinado de acordo com o método oficial Cd 8b-90 da AOCS (2004). Para esta determinação, uma massa de aproximadamente 5g de amostra foi submetida à reação com solução saturada de iodeto de potássio por 1 min. O excesso de iodeto de potássio foi então titulado com tiosulfato de sódio 0,01N. O resultado foi calculado pela relação entre a quantidade em miliequivalentes de peróxido por 1000g de amostra. O cálculo do índice de peróxido foi realizado de acordo com a equação 3.5.

$$I.P. = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times C_{Tiosulfato} \times 1000}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.5}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL), $C_{tiosulfato}$ = Concentração molar da solução de tiosulfato de sódio (mol/L), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g)

3.4.3. Índice de Iodo (I.I.)

O índice de iodo dos óleos vegetais foi determinado pelo Método de Hübl de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta determinação, uma amostra (cerca de 0,25g) foi submetida à reação com solução de iodo por 30 min ao abrigo da luz e posteriormente titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,1N. O branco foi realizado com

10 mL de clorofórmio e 20 mL de solução alcoólica de iodo 5%. O cálculo do índice de iodo foi realizado pela equação 3.6.

$$I.I. = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times MM_{I_2} \times C_{Tiosulfato} \times 0,1}{2 \times m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.6}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL), MM_{I_2} = Massa Molar do I_2 (253,8g/mol), C_{tio} = Concentração molar da solução de tiosulfato de sódio (mol/L), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g)

3.4.4. Índice de Saponificação (I.S.)

O índice de saponificação da matéria-prima foi determinado de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta medida, uma amostra de 2,5 g da amostra foi saponificada com solução alcoólica de hidróxido de potássio (4% m/v) e titulada com ácido clorídrico (0,5 N). O cálculo do índice de saponificação foi realizado de acordo com a equação 3.7.

$$I.S. = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times MM_{KOH} \times C_{HCl}}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.7}$$

Em que: $V_{amostra}$ = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL), V_{branco} = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL), MM_{base} = Massa Molar do KOH (56,1g/mol), C_{HCl} = Concentração molar da solução de HCl (mol/L), $m_{amostra}$ = Massa de amostra (g)

3.4.5. Teor de umidade

Os teores de água nos suportes puro e ativado, bem como nos sistemas imobilizados foram medidos diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (Marte ID 50).

3.4.6. Determinação da atividade hidrolítica

A atividade enzimática da lipase nas formas livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH (0,02M) utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela equação abaixo e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram calculadas segundo a equação 3.8 e expressas em μmol/g.min (U).

$$\text{Atividade } (\mu\text{mol} / \text{g} \cdot \text{min}) = \frac{(V_A - V_B) \cdot N \cdot 10^6}{t \cdot m} \quad \text{Equação 3.8}$$

Em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra, V_B = volume do KOH gasto na titulação do branco, N = normalidade da solução de KOH, t = tempo de reação em min, m = massa em gramas.

3.4.7. Separação dos produtos formados na reação de transesterificação dos óleos de babaçu e palma com etanol

Para a separação da glicerina liberada na síntese do biodiesel, o meio reacional foi submetido a uma etapa de purificação, constituída basicamente de uma lavagem com água destilada. O volume da amostra recolhido foi medido e em seguida adicionado o mesmo volume de água destilada. A mistura foi transferida para um funil de decantação, efetuando-se uma agitação e deixando a mistura em repouso por 30 min para a separação das fases. A fase superior era composta pelos ésteres de etila (biodiesel) e a fase inferior por glicerol e água de lavagem. A fase inferior foi descartada e a fase superior submetida à evaporação em rota-evaporador. A amostra de biodiesel purificada foi submetida análise de viscosidade.

3.4.8. Análise de viscosidade dos óleos vegetais e amostras de biodiesel

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas em duplicata a 40 °C para o óleo vegetal e para o biodiesel, empregando 0,5 mL de fluido. Os dados obtidos (viscosidade, taxa de

deformação e tensão de cisalhamento) foram ajustados de acordo com a lei de potência (equação 3.9), conforme descrito por Freitas et al. (1998).

$$\tau = K\gamma^n \quad \text{Equação 3.9}$$

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

3.4.9. Determinação dos ésteres formados e cálculo do rendimento de transesterificação

Para a análise dos monoésteres de ácido graxo empregou-se um Cromatógrafo de fase gasosa Varian – Modelo CG 3800 equipado com uma coluna de aço inoxidável empacotada (5%DEGS CHR-WHP 80/100 6ft 2.0mmID 1/8inOD, RESTEK 80/100) e detector de ionização em chama (FID). A temperatura do detector foi fixada em 230 °C e a do injetor em 190°C. Nitrogênio foi usado como gás de arraste num fluxo de 25 mL/min. Os fluxos dos gases de arraste para alimentação do detector foram: 30 mL/min de H₂ e 300 mL/min de ar sintético. A temperatura da coluna inicialmente foi mantida a 120°C por 15 min e em seguida aquecida numa taxa de 25°C/min, até 170 °C, permanecendo nessas condições por 26 min.

O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (M_t) em relação à massa teórica esperada de ésteres de etila (M_e). M_e foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial do óleo de babaçu (M_0), da massa molecular correspondente a cada ácido (MM_a) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela equação 3.10 (a), em que M_0 corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (C_a), com a massa inicial de óleo utilizada (M_i) equação 3.10 (b). O rendimento foi calculado dividindo a massa total de ésteres determinada pela análise de cromatografia gasosa (M_t) pela massa teórica de ésteres de etila (M_e), conforme mostrado na equação 3.10 (c).

$$Me = \frac{(Mo.MMe)}{MMa} \quad (a) \quad Mo = Ca.Mi \quad (b) \quad (c) \quad R = \frac{Mt}{Me} \times 100 \quad \text{Equação 3.10}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características das amostras de óleos de babaçu e de palma

4.1.1. Composição química e propriedades dos óleos refinados

Independente do tipo de catalisador selecionado, a qualidade do óleo utilizado na reação de transesterificação é de fundamental importância, tendo em vista que venenos ou inibidores catalíticos podem reduzir o rendimento da reação.

Na Tabela 4.1 apresenta-se a composição dos óleos de babaçu e palma utilizando a metodologia descrita na seção 3.4. Os resultados obtidos permitem discutir sobre as características das matérias primas utilizadas; os índices de acidez e peróxido indicam a deterioração da gordura em termos de rancidez hidrolítica (pelo índice de acidez) a partir da concentração de ácidos graxos livres e rancidez oxidativa (pelo índice de peróxido). O índice de saponificação é útil para verificação da massa molecular média de uma gordura e da adulteração por outros óleos com índices de saponificação muito diferentes (CECCHI, 2003). O índice de iodo revela o grau de insaturação da matéria-prima. Neste caso, por se tratar de óleos refinados, os valores encontrados, principalmente em relação ao índice de acidez e a concentração de ácidos graxos livres estão em faixas adequadas para utilização na reação de transesterificação. Óleos com elevado índice de acidez inibem a atuação de catalisadores (ROZENAAL, 1992).

Tabela 4.1 - Caracterização dos óleos de babaçu e palma.

Características	Óleo de babaçu	Óleo de palma
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,65	0,33
Índice de peróxido (mEq/kg)	1,82	2,05
Índice de iodo (g I ₂ /g)	25,38	98,04
Índice de saponificação (mgKOH/g)	238,20	198,39
Massa específica (g/cm ³)	0,85	0,80
Ácidos graxos livres (%)	0,33	0,18
pH	5,00	5,80

Com relação à composição em ácidos graxos, o óleo de babaçu apresenta 83% em ácidos graxos saturados e 17% em ácidos graxos insaturados, enquanto que o óleo de palma apresenta 51,9% em ácidos graxos saturados e 48,1% em ácidos insaturados (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Composição percentual em ácidos graxos dos óleos de babaçu e palma.

Ácido graxo	Valores (m/m %)	
	Óleo de babaçu	Óleo de palma
C8:0 - Octanóico	3,50	-
C10:0 - Decanóico	4,50	-
C12:0 - Láurico	44,70	0,10
C14:0 - Mirístico	17,50	1,20
C16:0- Palmítico	9,70	46,80
C18:0- Esteárico	3,10	3,80
C18:1- Oléico	15,20	37,60
C18:2- Linoleico	1,80	10,50

4.1.2. Viscosidade do óleo de babaçu e do óleo de palma

O estudo da viscosidade é um dos parâmetros fundamentais no processo de produção de biodiesel, sendo que, a aplicação direta dos óleos vegetais nos motores é limitada por algumas propriedades físicas dos mesmos, principalmente sua alta viscosidade. Desta forma, o estudo da viscosidade dos óleos vegetais é fundamental para posterior comparação com o biodiesel obtido.

A Figura 4.1 mostra a variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para o estudo do comportamento da viscosidade absoluta dos óleos de babaçu e palma submetidos à temperatura de 40 °C.

Figura 4.1. Viscosidade absoluta em função da taxa de deformação dos óleos refinados sob a temperatura de 40 °C: óleo de babaçu (a); óleo de palma (b).

Observa-se na Figura 4.1 (a, b), que com o aumento da taxa de deformação, a viscosidade permanece constante; isto é, um comportamento de fluido newtoniano para ambos óleos sob estas condições. Com a análise do comportamento da curva, demonstrada na Figura 4.2 verifica-se que a variação é linear para os dois, indicando que os fluidos seguem a lei da potência indicada pela equação 3.6, com $n = 1$.

Figura 4.2. Tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação dos óleos refinados sob a temperatura de 40 °C: óleo de babaçu (a); óleo de palma (b).

Na Tabela 4.3 são apresentados os coeficientes de ajuste dos dados $\log \tau$ em função do $\log \gamma$. Os valores dos coeficientes angulares para o óleo de babaçu e óleo de palma são aproximadamente igual a 1, o que confirma o fluido como newtoniano, em que a viscosidade é constante e independente da taxa de cisalhamento.

Tabela 4.3 - Coeficiente de ajuste dos dados a lei de potência $\tau = 40$ °C.

Parâmetros	Óleo de babaçu	Óleo de palma
K (cP)	25,09	29,5
N	1,01	0,99

Assim, verifica-se que o óleo de babaçu refinado na faixa de taxa de deformação entre 19 a 65 s^{-1} apresenta uma viscosidade absoluta de 25,09 cP. Com base neste valor pode-se calcular o valor da viscosidade cinemática do óleo que foi de 29,51 cSt, sendo este valor coerente ao apresentado na literatura que varia de 36,50 cSt quando medido a 37,8 °C e 23 cSt quando medido à 50 °C (COSTA, 2006). O óleo de palma refinado na faixa de taxa de

deformação entre 10 a 70 s⁻¹ apresentou viscosidade absoluta média de 29,5 cP, com viscosidade cinemática de aproximadamente 36,87 cSt, valor este compatível ao apresentado na literatura que é de 36,8 cSt.

4.2. Seleção do suporte para imobilização da lipase PS

4.2.1. Influência do tipo de suporte no rendimento de imobilização da lipase PS

O suporte tem sido considerado como um material inerte com pouca ou nenhuma interferência no comportamento cinético da enzima (RESLOW; ADLERCREUTZ; MATTIASON, 1988). Entretanto, especialmente no caso das lipases, a literatura indica uma influência marcante das propriedades do suporte nas características finais do derivado imobilizado. Além do suporte, as diferentes estratégias empregadas durante o processo de imobilização da enzima podem resultar em melhoria das propriedades do biocatalisador obtido.

Os suportes: híbrido (SiO₂-PVA) e inorgânico (óxido de nióbio-Nb₂O₅) foram sintetizados e ativados, conforme metodologia descrita no item 3.3.2 e 3.3.1, respectivamente. Nesses experimentos empregou-se um carregamento fixo de lipase de 200 mg por grama de suporte, correspondendo a 12000 unidades de atividade enzimática por grama de suporte. A Tabela 4.4 apresenta os dados relativos aos teores de umidade, atividade hidrolítica e rendimento de imobilização dos derivados imobilizados nos suportes SiO₂-PVA e Nb₂O₅.

Tabela 4.4 - Teores de umidade, atividade hidrolítica e rendimento de imobilização dos derivados imobilizados.

Derivados imobilizados	Teor de Umidade (%)	Atividade (U/g seca)	Rendimento de Imobilização (%)
PS imobilizada em SiO ₂ -PVA	13,95	3632,76	30,27
PS imobilizada em Nb ₂ O ₅	10,95	3228,44	26,90

Atividade quantificada em pH (6,50) e temperatura 40 °C.

Os teores de umidade e valores de atividade hidrolítica foram semelhantes para ambos derivados imobilizados. Os valores de atividade foram utilizados para o cálculo do rendimento de imobilização, com base na atividade hidrolítica recuperada no suporte em relação à atividade da lipase livre oferecida no procedimento de imobilização.

Geralmente, o emprego de técnicas de imobilização resulta em perda de atividade de parte das moléculas enzimáticas, o que está diretamente relacionado à interação enzima-suporte. Segundo Georgio e Hubbell (1993), três formas de interação podem ser distinguidas: (1) a ligação da proteína na matriz pode resultar em mudanças conformacionais que afetam a função catalítica; (2) o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima pode ser afetado por impedimento estérico do suporte e; (3) as propriedades do suporte, como sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, ou a presença de cargas fixas, afetam o modo de ação da enzima.

Os resultados obtidos indicam que nas condições adotadas, a interação de ambos suportes com a enzima resultaram em rendimentos de imobilização similares da ordem de 30,27 e 26,90%, respectivamente para os suportes híbrido e inorgânico. Desta forma, foi necessário efetuar uma série de testes adicionais para permitir uma escolha mais adequada do suporte para imobilização da lipase PS.

4.2.2. Influência do tipo de suporte nas propriedades bioquímicas dos derivados imobilizados

Um planejamento fatorial completo 2^2 foi empregado para alcançar as condições ótimas de pH e da temperatura para atividade hidrolítica da lipase PS livre e imobilizada. A matriz experimental é mostrada na Tabela 4.5, juntamente com os resultados obtidos.

Tabela 4.5 - Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial utilizado para avaliar a influência das variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada.

Ensaio	Variáveis (valores codificados em parêntesis)		Atividade hidrolítica (U/g)		
	pH (X ₁)	T (°C) (X ₂)	Lipase Livre	Imobilizada em SiO ₂ - PVA	Imobilizada em Nb ₂ O ₅
1	6.5 (-1)	40 (-1)	33956	1468	2000
2	8.5 (+1)	40 (-1)	32812	2650	1445
3	6.5 (-1)	60 (+1)	44564	1381	2033
4	8.5 (+1)	60 (+1)	48204	2717	1457
5	7.5 (0)	50 (0)	54080	1902	1582
6	7.5 (0)	50 (0)	52156	1962	1639
7	7.5 (0)	50 (0)	54756	1911	1631
8	6.1 (-1.41)	50 (0)	44200		
9	8.9 (+1.41)	50 (0)	50024		
10	7.5 (0)	36 (-1.41)	24284		
11	7.5 (0)	64 (+1.41)	32552		

Para a enzima livre, os pontos estrela foram adicionados ao planejamento para compor o modelo quadrático, sendo que para este sistema o modelo linear não foi satisfatório (R^2 de 0,35 com falta significativa de ajuste, num nível de confiança de 95%).

Como indicado na Tabela 4.5, a influência das variáveis estudadas na atividade hidrolítica da lipase foi diferente para as formas livre e imobilizada.

Para a lipase livre, as atividades hidrolíticas variaram entre 24284 a 54756 U/g e as atividades mais elevadas foram obtidas para o nível central de temperatura (50° C) e para o valor de pH níveis centrais ou alcalinos (ensaio 5, 6, 7 e 9). Os valores para a atividade hidrolítica da lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA variaram entre 1381 a 2717 U/g e as atividades mais elevadas foram obtidas nos níveis alcalinos de pH (ensaio 2 e 4). Para a lipase PS imobilizada em Nb_2O_5 os valores de atividade hidrolítica variaram entre 1445 a 2033 U/g e as atividades mais elevadas foram obtidas no nível mais baixo para o pH (6,5), correspondente aos ensaios 1 e 3.

Os resultados da Tabela 4.5 foram usados para estimar os efeitos das variáveis principais e suas interações (Tabela 4.6). Para a lipase livre, a análise estatística dos resultados mostrou os efeitos quadráticos significativos para ambas variáveis estudadas, além de um efeito linear significativo e positivo para a variável temperatura, em 95% do nível de confiança. Para os derivados imobilizados, por outro lado, somente o efeito linear do pH foi significativo neste nível de confiança.

Tabela 4.6 - Estimativas dos efeitos das variáveis, erros padrão (EP) e valores de p para a atividade hidrolítica da lipase PS livre e imobilizada em SiO_2 -PVA e Nb_2O_5 , obtidos nos ensaios do planejamento experimental.

Variáveis	Lipase livre			Lipase imobilizada em SiO_2 - PVA			Lipase imobilizada em Nb_2O_5		
	Efeito	EP	p	Efeito	EP	p	Efeito	EP	p
Media	53655	± 779	0,0000*	1999	± 12	0,0000*	1684	± 12	0,0000*
X_1 -Linear	2685	± 955	0,1067	1259	± 32	0,0007*	-566	± 31	0,0030*
X_1 -Quadrático	- 5469	± 1140	0,0408*						
X_2 -Linear	9443	± 955	0,0100*	-10	± 32	0,7865	23	± 31	0,5418
X_2 -Quadrático	-24275	± 1140	0,0022*						
$X_1 \cdot X_2$	2392	± 1349	0,2182	77	± 32	0,1403	-11	± 31	0,7661

*significativo ao nível de 95% de confiança; X_1 e X_2 representam as variáveis pH e temperatura, respectivamente.

A partir desses resultados, os modelos estatísticos foram compostos com os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos. Os coeficientes relativos aos efeitos

não significativos foram excluídos do modelo, exceto quando eram necessários para manter a hierarquia (MYERS; MONTGOMERY, 1995). As equações resultantes são mostradas na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Modelos obtidos pelos resultados do planejamento experimental, considerando a atividade da lipase (A, U/g) como função dos valores codificados do pH (X_1) e temperatura (X_2).

	Modelos	R^2
Lipase livre	$A = 53655 + 1343 \cdot X_1 - 2734 \cdot X_1^2 + 4721 \cdot X_2 - 12137 \cdot X_2^2$	0,9545
Imobilizada em SiO ₂ - PVA	$A = 1199 + 630 \cdot X_1$	0,9774
Imobilizada em Nb ₂ O ₅	$A = 1684 - 283 \cdot X_1$	0,9255

A análise de variância dos modelos (Tabelas 4.8 a 4.10) indicou que a falta de ajuste não foi significativa ao nível de 95% de confiança, e os valores do R^2 mostrados na Tabela 4.7 indicaram que os modelos podem explicar mais de 90% da variabilidade experimental. Assim, as equações foram consideradas adequadas para descrever a atividade em função das variáveis estudadas.

Considerando os modelos ajustados, as condições determinadas para cada sistema enzimático avaliado foram: enzima livre, 50°C e pH 7,5; derivado imobilizado em SiO₂-PVA, entre 40-60°C e pH 8,5; derivado imobilizado em Nb₂O₅, entre 40-60°C e pH 6,5. Para confirmar estes modelos, os ensaios foram realizados sob as condições estabelecidas e as diferenças entre os valores experimentais e teóricos foram menores que 8%.

Tabela 4.8 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a atividade hidrolítica da lipase PS livre como função do pH (X_1) e temperatura (X_2).

Variáveis	Soma quadrática (x 10 ⁻³)	Grau de liberdade	Média quadrática (x 10 ⁻³)	F	p
X_1	14375	1	14375	7,89	0,1067
X_1^2	41883	1	41883	23,01	0,0408*
X_2	177793	1	177793	97,70	0,0101*
X_2^2	825221	1	825221	453,47	0,0022*
<i>Falta de ajuste</i>	44997	4	11249	6,18	0,1441
Erro Puro	3640	2	1820		
Cor total	1069960	10			

*significativo ao nível de 95% de confiança; X_1 e X_2 representam as variáveis pH e temperatura, respectivamente.

Tabela 4.9 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a atividade hidrolítica da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA como função do pH (X₁) e temperatura (X₂).

Variáveis	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	p
X ₁	1585081	1	1585081	1513,93	0,0006*
Falta de ajuste	34556	3	11519	11,00	0,0845
Erro Puro	2094	2	1047		
Cor total	1621731	6			

*significativo ao nível de 95% de confiança; X₁ e X₂ representam as variáveis pH e temperatura, respectivamente

Tabela 4.10 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a atividade hidrolítica da lipase PS imobilizada em Nb₂O₅ como função do pH (X₁) e temperatura (X₂).

Variáveis	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	p
X ₁	319790	1	319790	335,79	0,0030*
Falta de ajuste	23850	3	7950	8,35	0,1089
Erro Puro	1905	2	952		
Cor total	345545	6			

*significativo ao nível de 95% de confiança; X₁ e X₂ representam as variáveis pH e temperatura, respectivamente

Os resultados obtidos para a enzima livre são similares aos descritos na literatura por outros autores (PENCREACH et al., 1997) para a lipase de *Pseudomonas cepacia* antiga denominação da lipase de *Burkholderia cepacia*.

Com relação aos derivados imobilizados, o procedimento de imobilização conduziu aos sistemas enzimáticos estáveis térmicos na faixa entre 40 a 60°C sem mudanças significativas em sua atividade. Entretanto, os valores ótimos de pH para os sistemas imobilizados foram deslocados de maneira oposta. A lipase imobilizada em SiO₂-PVA teve o maior valor de atividade sob condições mais alcalinas de pH (8,5), enquanto a imobilização da lipase em Nb₂O₅ deslocou o maior valor de atividade para pH mais ácido (6,5). As mudanças nos valores ótimos de pH para mais alcalinos é um comportamento previsto para lipases imobilizadas, tendo em vista que, o ataque nucleofílico do aminoácido serina é auxiliado pelo comportamento básico da histidina (VILLENEUNE et al., 2000). Tal comportamento é esperado devido a abertura parcial da hélice (tampa) durante a imobilização, tornando possível a exposição do sítio ativo diretamente aos íons de hidrogênio da solução, e somente as condições menos ácidas conduzem a forma não protonada do anel imidazólico requerido para um comportamento básico (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). O

desempenho oposto exibido pelo derivado imobilizado em Nb_2O_5 pode ser atribuído ao caráter positivo do suporte, que favoreceu a formação de um microambiente mais básico ao redor da molécula da lipase. Neste caso, o pH ótimo de atuação da enzima existirá quando no macroambiente houver maior concentração de íons H^+ , isto é pH mais ácido (menor que 7,5).

4.2.3. Influência da concentração do substrato e determinação dos parâmetros cinéticos

Para verificar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial da reação hidrolítica da lipase livre e imobilizada nos suportes ($\text{SiO}_2\text{-PVA}$ e Nb_2O_5) e a ocorrência de algum tipo de inibição, a porcentagem de azeite de oliva na emulsão óleo e água foi variada entre 10 a 70% (m/v). Os ensaios foram conduzidos em pH 6,5 e temperatura de 40°C.

Nas Figuras 4.3 (a,b,c) são apresentadas as atividades enzimáticas das lipases livre e imobilizada em função da concentração do substrato (em ácidos graxos), conforme descrito no Apêndice E. Os parâmetros cinéticos foram determinados a partir desses resultados, considerando-se a cinética de Michaelis-Menten e empregando-se o Programa Enzyme fitter para ajuste dos dados experimentais.

Figura 4.3. Atividade hidrolítica da lipase de *Burkholderia cepacia* livre (a), imobilizada no suporte híbrido $\text{SiO}_2\text{-PVA}$ (b) e imobilizada no suporte inorgânico Nb_2O_5 (c) em função da concentração do substrato.

Os resultados obtidos sugerem que a atividade de ambas formas de lipase (livre e imobilizada), em função da concentração de ácidos graxos, segue uma cinética do tipo

Michaelis-Menten, indicando que na faixa de concentração estudada e no tempo de reação hidrolítica (5 min), não se detectou uma possível inibição no sítio ativo da enzima. A partir das curvas da atividade hidrolítica em função da concentração de substrato, foram obtidos os parâmetros cinéticos K_m (mM) e V_{max} (U/g) para cada uma das preparações em estudo. Esses resultados são apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 - Valores de k_m e V_{max} obtidos a partir das curvas da atividade hidrolítica em função da concentração de substrato.

Lipase	k_m (mM)	V_{max} U/g
PS livre	4.018	56.441
PS imobilizada em SiO ₂ -PVA	1.883	3.873
PS imobilizada em Nb ₂ O ₅	5.267	6.323

Geralmente o processo de imobilização diminui a afinidade da enzima pelo substrato (PEREIRA; ZANIN; CASTRO, 2003). No caso específico da lipase imobilizada em óxido de nióbio a redução desta afinidade foi bem acentuada, revelando um aumento no valor de K_m : de 4017mM (lipase livre) para 5267mM (lipase imobilizada em óxido de nióbio). No caso da lipase imobilizada em SiO₂-PVA, o valor de K_m reduziu para 1882mM, resultando assim em um aumento da afinidade pelo substrato.

Este fato pode ser justificado em função das diferentes características físico-químicas dos dois suportes testados. É provável, que o suporte híbrido (SiO₂-PVA), por apresentar combinações orgânicas e inorgânicas em seu material, permitindo modificações nas propriedades mecânicas, controle da porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico (ZOPPI; CASTRO; YOSHIDA, 1997), tenha possibilitado maior compatibilidade com a lipase PS.

4.2.4. Constante de desativação térmica da lipase livre e imobilizada (k_d)

Um aumento de temperatura, geralmente corresponde a um aumento na taxa de reação por unidade de enzima imobilizada. Entretanto, um aumento de temperatura também pode promover aumento na taxa de desnaturação térmica da lipase, portanto, reduzindo a taxa de formação de produto.

Neste contexto, experimentos foram efetuados para determinar a constante de desativação térmica (k_d), e o tempo de meia-vida da lipase PS livre e imobilizada nos

diferentes suportes ($\text{SiO}_2\text{-PVA}$ e Nb_2O_5) sob efeito da temperatura de 60 °C. No Apêndice F são mostrados os valores de atividade residual, bem como a atividade medida nos ensaios da lipase PS livre e dos derivados imobilizados submetidos ao tratamento térmico. Esses resultados estão plotados na Figura 4.4 e foram utilizados para calcular a constante de desativação térmica (k_d) e o tempo de meia-vida (Tabela 4.12). O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial da enzima.

Figura 4.4. Desativação térmica da lipase PS livre, imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$ e imobilizada em Nb_2O_5 (experimentos conduzidos em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5 sob temperatura de 60 °C).

Observa-se na Figura 4.4 que a perda de atividade catalítica para enzima livre foi bem superior daquela determinada para ambos derivados imobilizados, confirmando que o procedimento de imobilização conferiu maior estabilidade térmica a enzima. Desta forma, o desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido uma importante ferramenta por propiciar a reutilização destas enzimas, facilitar a separação dos produtos, aumentar a estabilidade em solventes orgânicos (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004), além de alterar as propriedades catalíticas e físico-químicas da enzima em relação a sua forma solúvel, conferindo, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura (ZANIN; MORAES, 2004), como constatado nesse caso.

Verifica-se na Tabela 4.12 que os testes de estabilidade térmica demonstraram influência crítica do tipo de suporte na estabilidade do derivado imobilizado, revelando tempos de meia-vida mais elevados, para a lipase imobilizada em SiO₂-PVA da ordem de 6,24 h. O tempo de meia-vida do derivado imobilizado em Nb₂O₅ foi de 2,77 h, enquanto a enzima livre foi totalmente desnaturada após 30 min de incubação a 60 °C.

Tabela 4.12 - Constantes de inativação térmica da lipase PS livre e imobilizada e seus respectivos tempos de meia-vida.

Lipase	k_d (h ⁻¹)	Tempo de meia-vida (h)
PS livre	1,95	0,36
PS imobilizada em SiO ₂ -PVA	0,11	6,24
PS imobilizada em Nb ₂ O ₅	0,25	2,77

O derivado imobilizado em SiO₂-PVA apresentou maior estabilidade térmica do que o derivado em Nb₂O₅, provavelmente devido à pequena congruência geométrica entre o suporte (Nb₂O₅) e a enzima, que não permitiu a formação de ligações novas entre a lipase e os grupos ativos do suporte. Consequentemente, uma melhoria pouco significativa na estabilidade térmica foi observada após a imobilização. Em contraste, o uso do suporte com uma boa congruência geométrica, como SiO₂-PVA epoxilado pode fornecer a formação de uma ligação covalente forte da enzima no suporte, e, aumentando assim, a estabilidade térmica do derivado (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1995).

Para melhor ilustrar as diferenças entre as propriedades catalíticas observadas nas preparações da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada nos diferentes suportes, as propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase livre e imobilizada em SiO₂-PVA e em Nb₂O₅ são mostradas na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 - Propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase de *Burkholderia cepacia* (livre e imobilizada em SiO₂-PVA e Nb₂O₅).

Parâmetros	Livre	Imobilizada em SiO ₂ - PVA	Imobilizada em Nb ₂ O ₅
pH ótimo	7,5	8,5	6,5
Temperatura ótima (°C)	50	40-60	40-60
Tempo de meia-vida (t _{1/2}) à 60°C, (h)	0,36	6,24	2,77
Parâmetros cinéticos K_m (mM)	4018	1883	5267
V_{max} U/g)	56441	3873	6323

4.2.5. Análise por espectroscopia no infravermelho

As amostras dos suportes (SiO_2 -PVA ativado com epicloridrina e Nb_2O_5 ativado com glutaraldeído), bem como os derivados imobilizados e a lipase PS livre, foram submetidos à análise na região do infravermelho. Os resultados são mostrados nas Figuras 4.5 (a), (b).

Verifica-se nas Figuras 4.5 (a, b), que a enzima livre apresentou espectro típico de proteínas, com bandas associadas ao grupo amida característico (CONH). Neste caso, entre a faixa de número de ondas de $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, há uma banda amida I, devida ao estiramento da dupla ligação CO e da ligação CN, além da flexão da ligação NH (STUART; GEORGE; MCINTYRE, 1996).

Figura 4.5. Espectros no infravermelho obtidos para as amostras do suporte SiO_2 -PVA ativado com epicloridrina, lipase livre e após a imobilização (a) suporte Nb_2O_5 ativado com glutaraldeído, lipase livre e após a imobilização (b).

Após a ativação dos suportes, observa-se que o pico correspondente às hidroxilas ($3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$) originalmente presente no SiO_2 -PVA e no Nb_2O_5 é maior no suporte Nb_2O_5 que no SiO_2 -PVA. Ressaltando que, para ambos suportes analisados foram empregados agentes de ativação diferentes e este comportamento pode estar relacionado à modificação química realizada na superfície dos suportes causada por cada um dos agentes de ativação testados (epicloridrina ou glutaraldeído).

Com relação aos derivados imobilizados, verifica-se nas Figuras 4.5 (a, b), que o derivado imobilizado em SiO₂-PVA apresentou picos dentro da mesma banda existente pela lipase livre, enquanto que a lipase imobilizada em Nb₂O₅ apresentou um deslocamento de seus picos para a direita da banda correspondente ao pico característico da enzima livre (Figura 4.5-b).

Desta forma, este efeito observado no espectro de infravermelho para o derivado imobilizado em Nb₂O₅ pode explicar o aumento do *K_m* e consequentemente, a diminuição da afinidade da preparação enzimática pelo substrato, resultando em menores valores de atividade catalítica quando comparado a lipase imobilizada em SiO₂-PVA. Este comportamento pode estar relacionado com algum tipo de inibição ocorrida no sítio ativo da enzima, dificultando a ligação da enzima com o substrato.

4.2.6. Seleção do suporte de imobilização da lipase PS para mediar a reação de etanólise do óleo de babaçu

Os derivados imobilizados foram ainda avaliados na reação de etanólise do óleo de babaçu visando selecionar o derivado mais ativo na reação de interesse. As reações de síntese do biodiesel foram conduzidas em reatores de vidro cilíndrico utilizando-se agitação mecânica (170 rpm), na temperatura de 50 °C e razão molar (1:12 óleo/etanol). As reações foram incubadas com lipase imobilizada numa proporção fixa de 20% (m/m) em relação à massa total de reagentes. O monitoramento da reação foi realizado pela retirada de alíquotas nos tempos 3, 24 e 48 h para dosagem dos ésteres etílicos formados. Os resultados obtidos em ésteres etílicos (porcentagem mássica) em função do tempo de reação são mostrados na Figura 4.6, tomando por base os dados descritos nos Apêndices G e H.

Conforme pode ser observado na Figura 4.6 (b), o perfil de formação dos ésteres de etila indica que a reação no tempo de 48 h, empregando o derivado imobilizado em Nb₂O₅ ainda não tinha alcançado o equilíbrio estequiométrico. Provavelmente, esta limitação tenha impedido o alcance da conversão total do meio reacional. O desempenho mais elevado na reação de etanólise foi alcançado pela atuação da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA (Tabela 4.14), atingindo rendimentos mais satisfatórios ao longo do acompanhamento da reação e alcançando a conversão máxima em 48 h, correspondendo a uma produtividade de 12,9 mg/g.h enquanto que, para a lipase imobilizada em Nb₂O₅ o rendimento máximo alcançado foi de 74,13% e a velocidade da reação foi bem mais lenta (produtividade de 9,6 mg/g.h).

Desta forma, pode-se comprovar que o suporte SiO₂-PVA ativado com epiclорidrina

forneceu um derivado imobilizado mais estável e eficiente para mediar a reação de etanólise do óleo de babaçu, sendo, portanto, o suporte selecionado para a imobilização da lipase PS. O desempenho mais baixo da lipase imobilizada em Nb_2O_5 pode estar relacionado com suas respectivas propriedades bioquímicas, cinéticas e morfológicas avaliadas.

Figura 4.6. Perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo na reação de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$ (a) e Nb_2O_5 (b). Razão molar óleo/etanol (1:12) a 50°C .

Tabela 4.14 - Rendimento de transesterificação e produtividade da reação de etanólise do óleo de babaçu utilizando diferentes derivados imobilizados.

Lipase PS	Rendimento de transesterificação (%)	Produtividade (mg biodiesel /g.h)
Imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$	100	12,9
Imobilizada em Nb_2O_5	74,13	9,6

4.3. Influência da atividade da lipase PS imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$ para mediar a reação de etanólise do óleo de babaçu

Tendo selecionado o suporte mais adequado para imobilizar a lipase PS, estudos posteriores foram realizados visando verificar a influência da atividade da lipase PS imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$ para mediar a reação de etanólise do óleo de babaçu, bem como determinar a relação unidades de atividade por grama de óleo para se obter um rendimento satisfatório. Utilizando a lipase PS imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$ foram realizados ensaios variando a proporção de lipase entre 5% a 30% (m/m) em relação massa total de reagentes no

meio reacional. Os experimentos foram realizados empregando uma massa fixa de meio reacional (12g) na razão molar 1:18 óleo/etanol e temperatura de 40 °C, por um período máximo de 48h.

A Tabela 4.15 apresenta os valores de atividade enzimática correspondente à porcentagem de enzima adicionada ao meio, bem como atividade enzimática correspondente a quantidade de óleo de babaçu adicionado ao meio reacional.

Com relação ao rendimento de transesterificação (Figura 4.7), verifica-se uma forte influência da quantidade de unidades de atividade fornecida ao meio. Comparando-se os resultados na Tabela 4.15, constata-se que o rendimento de transesterificação foi similar quando se utilizou 10 e 15% de biocatalisador, o que correspondeu a 286 e 432 U/ grama de óleo fornecida ao meio, respectivamente. Por outro lado, o aumento da concentração de biocatalisador para 30% (861 U) foi altamente benéfico ao processo, correspondendo a um aumento da velocidade de reação alcançando um rendimento final de reação de 85%. É provável que a conversão total não tenha sido alcançada devido ao excesso de etanol presente no meio. No entanto, esses resultados também revelam que o sistema imobilizado não foi tão suscetível aos efeitos de inibição normalmente observados para lipases de outras fontes em meios altamente polares, como os meios reacionais constituídos por etanol (PAULA et al., 2007).

Tabela 4.15 - Concentração de lipase (%) e os respectivos valores de biocatalisador correspondente à porcentagem, atividade enzimática e a quantidade de unidades de atividade por grama de óleo fornecida ao meio.

Concentração de lipase	Biocatalisador massa seca	Atividade enzimática correspondente	Unidades de atividade por grama de óleo
%	(g)	(U)	(U/g)
5	0,66	793	143
10	1,32	1586	286
15	1,99	2392	432
20	2,65	3183	575
30	3,97	4772	861

Umidade do derivado imobilizado: 10,35%;

Atividade enzimática: 1202 U/g (medida em pH 7,5 e temperatura de 37°C)

Figura 4.7. Rendimento de transesterificação do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA em função da quantidade de unidades de atividade enzimática fornecida ao meio reacional por grama de óleo (Razão molar óleo/etanol= 1/18 e temperatura de 40°C).

4.4. Estabilidade operacional

A estabilidade operacional é um parâmetro de fundamental importância quando se pretende utilizar industrialmente uma enzima imobilizada. Um dos objetivos principais de se imobilizar uma enzima é aumentar seu tempo de utilização em relação à enzima livre, mantendo-a estável num maior número possível de reações consecutivas. Os processos com enzimas imobilizadas só serão mais econômicos e vantajosos comparados aos processos com enzima livre desde que se consiga um tempo de meia-vida suficientemente elevado para a enzima imobilizada (ZANIN; MORAES, 2004).

Neste contexto a estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA foi testada na reação de interesse desse trabalho: etanólise do óleo de babaçu empregando condições reacionais anteriormente estabelecidas por Freitas et al. (2009) (razão molar 1:7 óleo/etanol e temperatura= 40 °C).

O estudo da estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA foi realizado em regime de bateladas consecutivas (24h, 170 rpm), conforme metodologia descrita no item 3.3.7.3. A atividade de transesterificação do derivado imobilizado da lipase foi determinada pela formação dos ésteres de etila a partir da reação de etanólise empregando

20% de massa seca de enzima (2,68g) em relação ao meio reacional (12g). Os rendimentos de transesterificação, bem como os valores de viscosidade, obtidos ao final de cada reciclo são mostrados nas Figuras 4.8 (a) e (b), respectivamente.

Figura 4.8. Estabilidade operacional da lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA, em bateladas consecutivas de etanolise do óleo de babaçu a 40 °C. (a) rendimento de transesterificação, (b) viscosidade do produto transesterificado ao final de cada ciclo.

No final do primeiro ciclo, a concentração mássica dos ésteres no meio reacional foi da ordem de 76,12%, o que correspondeu a um rendimento de transesterificação de 99,86%. Nas bateladas seguintes, a produção de ésteres foi reduzindo gradativamente, atingindo ao final do décimo reciclo (240h) uma concentração mássica de 44,92% (rendimento= 58,67%). Isto revela um tempo de meia-vida de 290 h para o biocatalisador. Esses resultados são similares aos obtidos para outras fontes de lipases imobilizadas nesse tipo de suporte e indicam a viabilidade do biocatalisador para a síntese proposta (MOREIRA, 2007; URIOSTE, 2004).

Com relação à viscosidade do produto transesterificado (biodiesel) obtido ao final de cada ciclo (Figuras 4.8-b), verifica-se um aumento gradativo em função do número de reciclos efetuados. Considerando que existe uma correlação inversa entre rendimento de transesterificação e viscosidade (quanto maior o rendimento menor a viscosidade do produto), os dados mostrados nas Figuras 4.8 a-b confirmam experimentalmente esta correlação. À medida que o rendimento de transesterificação (Figura 4.8 a) foi sendo reduzido verifica-se um aumento gradativo da viscosidade do produto (Figura 4.8-b), atingindo uma viscosidade de 10 cp ao final do décimo reciclo (rendimento = 58,67%).

4.5. Reações no reator de micro-ondas Discover

4.5.1. Estabilidade térmica das lipases de *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas fluorescens* em meio orgânico no reator de micro-ondas Discover

Avaliar a estabilidade térmica das lipases imobilizadas em SiO₂-PVA foi uma etapa preliminar importante para o desenvolvimento do projeto, permitindo estimar o tempo de meia-vida do biocatalisador a 60°C, temperatura considerada promover uma boa potência de irradiação de micro-ondas. Os testes foram realizados incubando as lipases de *Burkholderia cepacia* (PS) e *Pseudomonas fluorescens* (AK) imobilizadas em SiO₂-PVA em meio orgânico (heptano) a 60 °C sob irradiação de micro-ondas, durante um período máximo de 3h, que subestimava aproximadamente 100 W para o meio estabelecido.

A atividade hidrolítica dos derivados imobilizados antes do tratamento térmico foi considerada 100% ativa, e a equação utilizada para o cálculo do kd (constante de desativação térmica), está relatada no item 3.3.7.1. A Figura 4.9 mostra os valores das atividades residuais das lipases PS e AK imobilizadas em SiO₂-PVA em função do tempo de exposição da irradiação do micro-ondas.

Figura 4.9. Atividade residual das lipases PS e AK imobilizada em SiO₂-PVA após tratamento térmico (em heptano) em função do tempo de exposição da irradiação de micro-ondas (100 W).

Durante todo o tempo de exposição das lipases sob tratamento térmico, a irradiação emitida pelas micro-ondas foi aproximadamente entre 80-100 W para o meio em questão. Contudo, cabe ressaltar que, a polaridade do solvente é considerada um parâmetro muito importante na emissão da irradiação, pois, quanto maior a polaridade do solvente menor será incidência de irradiação de micro-ondas para manter a temperatura, sob determinadas condições (RÉJASSE et al., 2004).

Os dados plotados na Figura 4.9 foram utilizados para calcular as constantes de inativação térmica e tempo de meia-vida das lipases imobilizadas, conforme apresentado na Tabela 4.16. Após linearização dos dados, obteve-se um $k_d = 0,123$ ($R^2 = 0,9436$) para a lipase de *Burkholderia cepacia*, o que correspondeu a um tempo de meia-vida da ordem de 5,65 h, valor este bastante similar aos valores previamente relatados por outros autores (MARTINS et al., 2007) para esta mesma preparação de lipase imobilizada em SiO₂-PVA. Entretanto, para a lipase de *Pseudomonas fluorescens*, obteve-se um menor valor de $k_d = 0,084$ ($R^2 = 0,9782$), correspondendo a um tempo de meia-vida da ordem de 8,22 h, o que conferiu a este sistema imobilizado maior estabilidade térmica. Estes resultados foram altamente promissores quando comparados com outras preparações de lipases relatadas na literatura (RÉJASSE et al., 2004).

Tabela 4.16 - Constantes de inativação térmica das lipases de *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas fluorescens* imobilizadas em SiO₂-PVA.

Lipase	k_d (h ⁻¹)	Tempo de meia-vida (h)
<i>Burkholderia cepacia</i> (Lipase PS)	0,123	5,65
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Lipase AK)	0,084	8,22

4.5.2. Otimização da síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA sob irradiação de micro-ondas empregando a metodologia de planejamento fatorial

Foi empregada a metodologia de planejamento de experimentos para avaliar a influência das variáveis: (X_1) razão molar (óleo/etanol) e (X_2) temperatura no rendimento da etanólise do óleo de babaçu utilizando a lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA. Para tanto, utilizou-se um planejamento fatorial completo 2² estrela rotacional, com três replicatas no ponto central, considerando como variável resposta o rendimento obtido em 7h de reação. O perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo é mostrado na Figura 4.10, tomando por base os dados detalhados no Apêndice J.

Figura 4.10. Perfil de formação dos monoésteres de etila na reação de etanolíse do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA, sob diferentes condições operacionais (ensaios 1 a 6).

Experimento 7 **Experimento 8** **Experimento 9** **Experimento 10** **Experimento 11**

Conclusão Figura 4.10. Perfil de formação dos monoésteres de etila na reação de etanolise do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA sob diferentes condições operacionais (ensaio 7 a 11).

A matriz experimental juntamente com os resultados obtidos é mostrada na Tabela 4.17. Os valores de rendimento de transesterificação variaram entre 56 a 77% e os rendimentos mais elevados foram obtidos nos níveis médios de razão molar (óleo/etanol = 1:12) e temperatura (50°C).

Tabela 4.17 - Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial composto central 2^2 utilizado para avaliar a influência das variáveis: razão molar e temperatura no rendimento da etanolise do óleo de babaçu.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Variável resposta (%)
	Razão molar	Temperatura	Razão molar	Temperatura	
1	-1	-1	8,4	43	56,00
2	1	-1	15,4	43	70,00
3	-1	1	8,4	57	71,50
4	1	1	15,4	57	59,76
5	0	0	12	50	75,20
6	-1,414	0	7	50	60,19
7	1,414	0	16,8	50	60,28
8	0	-1,414	12	40	77,15
9	0	1,414	12	60	66,78
10	0	0	12	50	76,00
11	0	0	12	50	77,08

A Tabela 4.18 reúne os dados da análise dos efeitos, estimativa de erro padrão e o teste t de Student's. Dentro da região analisada, verifica-se que rendimentos de transesterificação foram dependentes das variáveis quadráticas (X_1^2 , X_2^2), razão molar e temperatura, respectivamente, enquanto que as variáveis lineares (X_1 , X_2) não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Entretanto, a interação entre as variáveis X_1 (razão molar) e X_2 (temperatura) foi altamente significativa ($p=0,0053$).

Tabela 4.18 - Estimativas dos efeitos das variáveis, erros padrão, valores de t e p para o rendimento da etanolise do óleo de babaçu pelo planejamento fatorial.

Variáveis	Efeitos	Erro Padrão	t	p
Média	76,09	$\pm 0,54$	139,69*	0,0000*
(X_1) Razão Molar	0,59	$\pm 0,66$	0,895	0,4654
(X_1^2) Razão Molar	-16,75	$\pm 0,79$	-21,07*	0,0022*
(X_2) Temperatura	-2,35	$\pm 0,66$	-3,52	0,0719
(X_2^2) Temperatura	-5,02	$\pm 0,79$	-6,32*	0,0241*
X_1 , X_2	-12,87	$\pm 0,94$	-13,64*	0,0053*

*significativo ao nível de 95% de confiança.

A partir desses dados, foi possível compor o modelo estatístico incluindo os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos, como apresentado na equação 4.1, em que R: representa o rendimento de transesterificação (%); X_1 é o valor codificado da variável razão molar e X_2 o valor codificado da variável temperatura.

$$R (\%) = 76,09 - 8,37.X_1^2 - 2,51.X_2^2 - 6,43.X_1.X_2$$

Equação 4.1

A análise de variância do modelo estatístico (Tabela 4.19) indicou significância estatística ao nível de 95% de confiança, não sendo constatada falta de ajuste ($p= 0,06$). Verifica-se ainda pelo valor de R^2 que a equação ajustada foi capaz de explicar 88,91% da variabilidade dos valores experimentais.

Tabela 4.19 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento da etanolise do óleo de babaçu.

Variáveis	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	
				Valores	Prob > F
Modelo					
X_1^2	396,15*	1*	396,15*	445,05*	0,0029*
X_2^2	35,58*	1*	35,58*	39,97*	0,0241*
$X_1^2X_2^2$	165,64*	1*	165,64*	186,08*	0,0053*
<i>Falta de Ajuste</i>	68,32	5	13,66	15,35	0,0623
Erro puro	1,780	2	0,89		-
Cor total	631,90	10			

$$R^2 = 0,8891$$

X_1 = Razão Molar, X_2 = Temperatura, **F**: Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

Desta forma, considerou-se que o modelo estatístico obtido foi adequado para descrever o rendimento de transesterificação em função da razão molar e temperatura na síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu, obtendo-se a superfície de resposta apresentada na Figura 4.11. Os valores preditos pelo modelo representado na superfície de resposta indicam que o rendimento de transesterificação é maximado numa temperatura de 50°C e razão molar do óleo de babaçu/ etanol em 1:12.

Para confirmar o modelo matemático obtido, um experimento adicional foi efetuado nas condições preditas pelo modelo, e os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 4.12. O aumento do tempo de reação (7 para 12h) forneceu um incremento do rendimento global,

sendo alcançando a conversão total do óleo de babaçu nos ésteres correspondentes em apenas 10h de reação. Verifica-se ainda que, como em todos os demais experimentos realizados, o éster formado em maior concentração foi o laurato de etila, devido à composição do óleo de babaçu ser constituído por aproximadamente 45 % de ácido laurico.

Figura 4.11. Superfície de resposta para o rendimento da etanolise do óleo de babaçu catalisada pela lipase PS imobilizada em SiO_2 -PVA em função da razão molar e temperatura, de acordo com o modelo predito pela equação 4.1.

Figura 4.12. Perfil de formação dos monoésteres de etila na reação de etanolise do óleo de babaçu nas condições previstas pelo modelo matemático.

Ao final da reação, a amostra de biodiesel do óleo de babaçu foi purificada e submetida a análise de viscosidade, adotando metodologia anteriormente descrita, sendo obtido uma viscosidade da ordem de 4,2cSt a 40°C. Este resultado está dentro da Norma de especificação provisória da Agência Nacional de Petróleo, Gás natural e Biocombustível (ANP 255) cujos limites de viscosidade cinemática recomendados estão na faixa de 2,5 a 5,5 cSt à temperatura de 40°C.

4.5.3. Otimização da síntese de biodiesel a partir do óleo de palma e etanol catalisada pela lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA sob irradiação de micro-ondas empregando a metodologia de planejamento fatorial

A metodologia de planejamento de experimentos foi também empregada para avaliar a influência das variáveis: razão molar e temperatura no rendimento da etanólise do óleo de palma catalisada pela lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA. Para realização dos experimentos, utilizou-se um planejamento fatorial completo 2² estrela rotacional com três replicatas no ponto central, considerando como variável resposta o rendimento de transesterificação em 8h de reação. A matriz experimental juntamente com os resultados obtidos é mostrada na Tabela 4.20 e o perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo para essas reações é mostrado na Figura 4.13. As condições experimentais são descritas no Apêndice K.

Tabela 4.20 - Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial composto central 2² utilizado para avaliar a influência das variáveis: razão molar e temperatura no rendimento da etanólise do óleo de palma.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Rendimento (%)
	Razão molar	Temperatura (°C)	Razão molar	Temperatura (°C)	
1	-1	-1	8,0	43	86,52
2	1	-1	16,0	43	64,72
3	-1	1	8,0	57	62,93
4	1	1	16,0	57	67,67
5	0	0	12	50	71,79
6	-1,414	0	6,3	50	38,07
7	1,414	0	17,7	50	57,15
8	0	-1,414	12	40	64,76
9	0	1,414	12	60	56,71
10	0	0	12	50	73,96
11	0	0	12	50	70,82

Ensaio 6 a 9 não foram considerados para análise estatística.

Figura 4.13. Perfil de formação dos monoésteres de etila na reação de etanolise do óleo de palma empregando lipase AK imobilizada em SiO_2 -PVA, sob diferentes condições operacionais (ensaios 1 a 6).

Experimento 7 **Experimento 8** **Experimento 9** **Experimento 10** **Experimento 11**

Conclusão Figura 4.13. Perfil de formação dos monoésteres de etila na reação de etanolise do óleo de palma empregando lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA, sob diferentes condições operacionais (ensaio 7 a 11).

Os resultados obtidos indicam que a lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA foi capaz de formar os monoésteres de etila em todas as condições ensaiadas. Os rendimentos globais variaram entre 38,07 a 86,52%. O rendimento mais elevado foi verificado nas reações realizadas nos níveis baixos de razão molar e temperatura (razão molar = 1:8 (óleo/etanol) e temperatura = 43°C).

Com o auxílio do programa STATÍSTICA 5.0, analisou-se os dados obtidos para um modelo quadrático, entretanto o test t de Student's efetuado revelou uma falta significativa de ajuste ($R^2 < 0,5$) para um nível de confiança de 95%. Desta forma, os pontos estrelas (ensaios 6 a 9) foram excluídos do delineamento fatorial compor um modelo linear.

As estimativas dos efeitos, erros-padrão, valor de p e valor de t para a resposta analisada, considerando os ensaios 1 a 5 e 10, 11 são apresentadas na Tabela 4.21.

Tabela 4.21 - Estimativas dos efeitos das variáveis, erros padrão, valores de t e p para o rendimento da etanolise do óleo de palma pelo planejamento fatorial completo 2².

Variáveis	Efeitos	Erro Padrão	t	p
Média	71,20*	$\pm 0,61^*$	117,17*	0,0000*
(x_1) Razão Molar	-8,53*	$\pm 1,61^*$	-5,31*	0,0337*
(x_2) Temperatura	-10,32*	$\pm 1,61^*$	-6,42*	0,0234*
Interação	13,27*	$\pm 1,61^*$	8,25*	0,0144*

*significativo ao nível de 95% de confiança.

Analisando a Tabela 4.21, verifica-se que tanto a variável razão molar como a temperatura foram estatisticamente significativa ($p < 0,03$), contatando-se ainda um efeito altamente significativo da interação entre razão molar e temperatura ($p = 0,0144$).

Os efeitos principais foram ajustados por análise de regressão múltipla para um modelo linear (p curvatura = 0,25) e a melhor função linearizada é demonstrada pela equação 4.2

$$R (\%) = 70,23 - 4,03.X_1 - 5,39.X_2 + 6,87.X_1.X_2 \quad \text{Equação 4.2}$$

Em que: R: rendimento de transesterificação (%); X_1 : valor codificado da variável razão molar; X_2 : valor codificado da variável temperatura.

A validade do modelo proposto verificada por meio da análise de variância (Tabela 4.22) constatou que a regressão obtida foi estatisticamente significativa ($p < 0,10$),

apresentando um elevado coeficiente de determinação, $R^2 = 0,9862$, justificando 98,62% da variação total da resposta. Na região experimental testada o modelo é linear. Assim, a equação obtida foi usada para traçar a superfície de resposta como mostrado na Figura 4.14.

Tabela 4.22 - Análise de variância (ANOVA) para o rendimento da etanólise do óleo de palma.

Variáveis	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	
				Valores	Prob > F
Modelo	370,01	3	123,34	47,71	0,0206
Razão Molar X_1	65,04	1	65,04	25,16	0,0375
Temperatura X_2	116,32	1	116,32	45,00	0,0215
X_1X_2	188,65	1	188,65	72,98	0,0134
Curvatura	6,60	1	6,60	2,55	0,2511
Erro puro	5,17	2	2,58		
Cor total	381,78	6			
R^2	0,9862				

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

Figura 4.14. Superfície de resposta para o rendimento da etanólise do óleo de palma catalisada pela lipase AK imobilizada em SiO_2 -PVA em função da razão molar e temperatura, de acordo com o modelo predito pela equação 4.2.

Empregando-se o programa Design-Expert 6.0, procedeu-se à busca dos valores máximos de rendimento da etanólise do óleo de palma. Desta forma, as condições experimentais ótimas para se obter o rendimento máximo encontram-se nos níveis baixos de

razão molar e temperatura, 1:8 (óleo/etanol) e 43 °C, respectivamente. Nessa região podem ser obtidos rendimentos superiores a 80%.

Adotando essas condições, um experimento adicional foi efetuado para confirmação do modelo gerado, conduzindo, entretanto a reação por um período mais prolongado (12h), visando atingir o equilíbrio estequiométrico. Os resultados obtidos em termos de concentração mássica em ésteres etílicos em função do tempo de reação são mostrados na Figura 4.15.

Verifica-se que nas condições previstas pelo modelo estatístico o valor máximo de concentração mássica de ésteres de etila ocorreu no tempo de 12h (77,02%), correspondendo a um rendimento de transesterificação de 97,56%. Destaca-se ainda, nessa figura, que o equilíbrio estequiométrico da reação já pode ser observado a partir das 10h de reação.

Figura 4.15. Perfil de formação dos monoésteres de etila na reação de etanolise do óleo de palma empregando lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA em função do tempo, nas condições previstas pelo modelo estatístico.

Ao final da reação, a amostra de biodiesel do óleo de palma foi purificada e submetida a análise de viscosidade, adotando metodologia anteriormente descrita, sendo obtido uma viscosidade da ordem de 4,75cSt a 40°C. Este resultado está dentro da Norma de especificação provisória da Agencia Nacional de Petróleo, Gás natural e Biocombustível (ANP 255) cujos limites de viscosidade cinemática recomendados estão na faixa de 2,5 a 5,5 cSt à temperatura de 40°C.

4.6. Comparação do rendimento de transesterificação e produtividade para as reações de síntese de biodiesel conduzidas usando diferentes fontes de aquecimento (aquecimento convencional e irradiação de micro-ondas)

Para permitir uma real avaliação do efeito da irradiação de micro-ondas como forma de acelerar as reações de etanólise dos óleos vegetais testados (óleos de babaçu e palma), os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com aqueles anteriormente descritos usando aquecimento convencional, nas mesmas condições operacionais (FREITAS et al., 2009; SILVA et al., 2008). As Tabelas 4.23 e 4.24 apresentam a comparação dos resultados de rendimento de transesterificação e produtividade das reações de etanólise dos óleos de babaçu e palma conduzidas sob aquecimento convencional e micro-ondas.

Tabela 4.23 - Comparação dos parâmetros globais de reação de etanólise do óleo de babaçu (rendimento e produtividade), para os experimentos realizados em reatores convencionais e micro-ondas, utilizando lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA.

Tipo de sistema	Tempo de reação (h)	Rendimento de transesterificação (%)	Produtividade (mg/g.h)
Reator de micro-ondas Discover	10	100	74,64
Aquecimento convencional	48	83,20	10,47

Tabela 4.24 - Comparação dos parâmetros globais de reação de etanólise do óleo de palma (rendimento e produtividade), para os experimentos realizados em reatores convencionais e micro-ondas, utilizando lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA.

Tipo de sistema	Tempo de reação (h)	Rendimento de transesterificação (%)	Produtividade (mg/g.h)
Reator de micro-ondas Discover	12	97,56	64,18
Aquecimento convencional	24	61,30	20,25

Verifica-se pelos resultados obtidos (Tabela 4.23) que na etanólise do óleo de babaçu uma conversão total da matéria-prima foi obtida em apenas 10h para a reação efetuada com aquecimento por irradiação de micro-ondas (reator Discover), enquanto que, sob aquecimento convencional uma conversão de 83% foi obtida somente em 48h de reação, o que representa

um incremento de 7 vezes na velocidade da reação efetuada sob aquecimento convencional e uma produtividade de 74,64 mg/g.h.

Para a etanólise do óleo de palma, os resultados obtidos (Tabela 4.24) indicam aproximadamente uma conversão total após 12h de reação, enquanto que, sob aquecimento convencional uma conversão de 61,30% foi obtida em 24h de reação, o que representa um incremento de 3 vezes na velocidade da reação efetuada sob aquecimento convencional e uma produtividade de 64,18 mg/g.h.

Desta forma, verifica-se que, o biodiesel obtido sob o efeito de micro-ondas, resulta numa redução considerável do tempo de reação quando comparada com teste controle realizado com aquecimento convencional. Reações enzimáticas assistidas por micro-ondas constituem tema de relevante importância, principalmente para aplicação em sistemas não-aquosos, nos quais as enzimas apresentam estabilidade térmica mais elevada. Neste contexto, a aplicação de micro-ondas na transesterificação enzimática dos óleos de babaçu e palma com etanol constituíram um procedimento potencial para a produção de biodiesel, permitindo alcançar elevados rendimentos de reação em menor período de tempo.

5. CONCLUSÕES

O presente projeto teve como objetivo avaliar a aplicação de campos eletromagnéticos de alta frequência (irradiação de micro-ondas) em processos enzimáticos, particularmente na síntese de biodiesel a partir de óleos vegetais em meio isento de solvente e empregando lipase como catalisador. Em função de trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP), optou-se pela seleção das lipases de *Burkholderia cepacia* (PS) e *Pseudomonas fluorescens* (AK) como biocatalisadores das reações de etanólise do óleo de babaçu e etanólise do óleo de palma, respectivamente.

Os resultados obtidos foram altamente satisfatórios, e com base nos dados relatados neste trabalho pôde-se concluir que:

- Entre os suportes testados para imobilizar a lipase selecionada para catalisar a reação de etanólise do óleo de babaçu (*Burkholderia cepacia*-PS), o melhor desempenho com relação a todos os parâmetros analisados foi obtido pela matriz híbrida constituída de sílica e polivinilálcool (SiO₂-PVA).
- O sistema imobilizado em SiO₂-PVA foi 17 vezes mais estável termicamente que a lipase na forma livre. A superioridade deste sistema imobilizado foi ainda constatada por meio de um estudo comparativo entre lipase livre e imobilizada em termos de pH, temperatura e parâmetros cinéticos usando emulsão de azeite de oliva como substrato. Foram observadas modificações no pH ótimo da enzima imobilizada para valor mais elevado de pH (8,5) numa ampla faixa da temperatura (40 a 60°C) quando comparados com a enzima na sua forma livre (pH = 7,5 e temperatura = 50 °C). O estudo da influência da concentração de substrato na velocidade de reação mostrou um ajuste satisfatório do modelo de Michaelis-Menten aos pontos experimentais, com estimativa dos seguintes valores para V_{max} (56441U/g para enzima livre e 3873 U/g para o derivado imobilizado) e K_m (4018 mM para lipase livre e 1883 mM para a lipase imobilizada em SiO₂-PVA). Nos testes de estabilidade operacional, o derivado imobilizado foi utilizado sucessivamente na reação de transesterificação (24h/ 40°C), mantendo até 60% da atividade inicial após 10 ciclos de reação e revelando um tempo de meia-vida de 12 dias.
- O estudo da estabilidade térmica das lipases PS e AK imobilizadas em SiO₂-PVA realizada no reator de micro-ondas Discover sob temperatura de 60°C, revelou tempos de meia-vida de 5,65 e 8,22 h, respectivamente para PS e AK.

- O estabelecimento das condições adequadas de transesterificação para cada óleo vegetal empregando etanol como doador do grupo acila e as lipases microbianas de *Burkholderia cepacia* (PS) e *Pseudomonas fluorescens* (AK) imobilizadas em SiO₂-PVA, foi realizada por meio de uma matriz de planejamento fatorial completo 2², avaliando simultaneamente a influência da temperatura do sistema reacional e a razão molar entre os reagentes nas variáveis respostas consideradas (rendimento de transesterificação).
- Para o sistema reacional óleo de babaçu e etanol, a formação dos monoésteres de etila foi fortemente influenciada pelas variáveis quadráticas: (X₁², X₂²), razão molar e temperatura, respectivamente, bem como pela interação entre essas variáveis. O modelo matemático proposto: $R(\%) = 76,09 - 8,37.X_1^2 - 2,51.X_2^2 - 6,43.X_1.X_2$ permitiu prever as condições necessárias que favorecem o alcance de elevados rendimentos da produção de biodiesel, sendo a reação favorecida (100% em 10h) para meios reacionais constituídos de óleo de babaçu e etanol numa razão molar de 1:12 e temperatura de incubação de 50 °C.
- Para o sistema reacional óleo de palma e etanol, a formação dos monoésteres de etila foi fortemente influenciada pelas variáveis lineares (X₁, X₂), razão molar e temperatura respectivamente, bem como pela interação entre essas variáveis. O modelo matemático proposto: $R(\%) = 70,23 - 4,03.X_1 - 5,39.X_2 + 6,87.X_1.X_2$ permitiu prever as condições necessárias que favorecem o alcance de elevados rendimentos da produção de biodiesel, sendo a reação favorecida (> 97% em 12h) para meios reacionais constituídos de óleo de palma e etanol numa razão molar de 1:8 e temperatura de incubação de 43 °C.
- Os resultados indicaram que a transesterificação enzimática conduzida sob irradiação de micro-ondas reduziu significativamente o tempo das reações de síntese de biodiesel quando comparado ao aquecimento convencional, resultando em rendimentos elevados em menores tempos reacionais e produtividade de até 7 vezes maior.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar a estabilidade operacional dos biocatalisadores na síntese de biodiesel sob irradiação de micro-ondas em regime de bateladas consecutivas;
- Avaliar a possibilidade de emprego de outras configurações de reatores, bem como, estudar outras formas de agitação do meio reacional (agitação mecânica, por exemplo), tornando possível uma melhor homogeneidade das matérias-primas, que é fundamental para a reação de transesterificação.

REFERÊNCIAS

ABIGOR, R.; UADIA, P.; FOGLIA, T.; HAAS, M.; JONES, K.; OKPEFA, E.; OBIBUZOR, J.; BAFOR, M. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from Nigerian lauric oils. **Bioch. Trans**, v. 28, p. 979-981, 2000.

ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: <www.aboissa.com.br>. Acesso em 30 de jan. 2008.

AGGARWAL, G.; SMID, I.; PARK, S. J.; GERMAN, R. M. Development of niobium powder injection molding. Part II: Debinding and sintering. **International Journal of Refractory Metals and Hard Materials**, v. 25, p. 226-236, 2007.

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

AMANO ENZYME Inc. Disponível em: <www.amano-enzyme.co.jp>. Acesso em: 12 fev. 2008.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. AOCS Press, 2004. 5th Edition.

BALCÃO, V. M.; PAIVA A. L.; MALCATA F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial technology**, v.18, p.392-416, 1996.

BARBOZA, A. C. R. N.; CRUZ, C. V. M. S.; GRAZIANI, M. B.; LORENZETTI, M. C. F.; SABADINI, E. Aquecimento em forno de microondas/ desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais. **Química Nova**, v. 24, n.6, p. 901-904, 2001.

BREIVIK, H.; HARALDSSON, G. G.; KRISTINSSON, B. Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, p. 1425-1429, 1997.

BRUNO, L. M.; COELHO, J. S.; MELO, E. H. M.; LIMA-FILHO, J. L. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 189-192, 2005.

CARRILLO-MUNOZ, J-R.; BOUVET, D.; GUIBE-JAMPEL, E.; LOUPY, A.; PETIT, A.; Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions: Resolution of (±)-1-phenylethanol. **Journal of Organic Chemistry**, v.61, p. 7746-7749, 1996.

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

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed.rev. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

CLEARFIELD, A. Role of ion exchange in solid-state chemistry. **Chemical Review**, v. 88, n.1, p. 125-148, 1982.

COSTA, T. L. **Características físicas e físico-químicas do óleo de duas cultivares de mamona**. 2006. 113p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2006.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n.4, p. 531-537, 2000.

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

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

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

De CASTRO, H. F. **Produção integrada de biodiesel e emulsificantes a partir do óleo de babaçu usando derivados estabilizados de lipases pancreática e microbiana**. 2008. 88f. Relatório científico - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

EGOROV, Y. V.; SUKHAREV, Y. I.; LYUBIMOV, A. S.; KRYLOV, E. I. Hydrated niobium pentoxide as an ion exchanging ampholite. **Neorg. Mater**, v.3, n.7, p. 1210-1215, 1967.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: A Textbook**. 3. ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, Cap. 1, 2, 3, 1997.

FENICE, M.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L. Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains. **Polar Biology**, v. 17, p. 75-280, 1997.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; COWAN, D. A.; WOOD, A. N. P. Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 366-372, 1995.

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

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

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An Integrated Approach to Produce Biodiesel and Monoglycerides by Enzymatic Interestification of Babassu Oil (*Orbinya* sp). **Process Biochemistry**, (In Press), 2009.

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

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

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

GIOIELLI, L. A. Interesterificação de óleos e gorduras. **Engenharia de Alimentos**, v. 4, p. 22-24, 1998.

GOMES, F. M.; PEREIRA, E. B.; De CASTRO, H. F. Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis. **Biomacromolecules**, v.5, n.2, p. 17-23, 2004.

GOMES, F. M.; De PAULA, A. V.; SILVA, S. G. De CASTRO, H. F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v.29, p. 710-718, 2006.

GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L. O uso do forno de micro-ondas na síntese orgânica em fase sólida. **Química Nova**, v. 28, p.73-76, 2005.

GUPTA, M.N.; ROY, I. Enzymes in organic media: Forms, functions and applications. **European Journal Biochemistry**, v. 271, p. 2575–2583, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235–251, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo, 1985. 3a. ed., 533p., v. 1

IZQUIERDO, F. J.; ALLI, I.; GÓMES, R.; RAMASWAMY, H. S.; YAYLAYAN, V. Effects of high pressure and microwave on pronase and α -chymotrypsin hydrolysis of β -lactoglobulin. **Food Chemistry**, v. 92, p. 713-719, 2005.

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

KABZA, K. G.; GESTWICKI, J. E.; MCGRATH, J. L.; PETRASSI, H. M. Effect of Microwave Radiation on Copper(II) 2,2'-Bipyridy-Mediated Hydrolysis of Bis(*p*-nitrophenyl) Phosphodiester and Enzymatic Hydrolysis of Carbohydrates. **Journal of Organic Chemistry**, v.61, p.9599-9602, 1996.

KAMINI, N. R.; IEFUJI, H. Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by *Cryptococcus* spp. S-2. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 405-410, 2001.

KEYSON, D.; LONGO, E.; VASCONCELOS, J. S.; VARELA, J.A.; ÉBER, S.; DERMADEROSIAN, A. Síntese e processamento de cerâmicas em forno de micro-ondas doméstico. **Cerâmica**, v. 52, p.50-56, 2006.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual do Biodiesel** 1.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KOJIMA, S.; DU, D.; SATO, M.; PARK, E. Y. Efficient production of fatty acid methyl ester from waste activated bleaching earth using diesel oil as organic solvent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, p. 420-424, 2004.

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

LAI, F.; LIN, L.; HUANG, Z.; GAI, R.; QU, Y. Effect of thickness on the structure, morphology and optical properties of sputter deposited Nb₂O₅ films. **Applied Surface Science**, v. 253, p. 1801-1805, 2006.

LEADBEATER, N. E.; STENCEL, L. M.; WOOD, E. C. Probing the effects of microwave irradiation on enzyme-catalysed organic transformations: the case of lipase-catalysed transesterification reactions. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, p.1052-1055, 2007.

LIMA-BARROS, A.; ALMEIDA, A. M. P.; CARVALHO Jr.; L. B.; AZEVEDO, W. M. Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 459-463, 2002.

LIN, G.; LIN, W.-Y. Microwave-promoted lipase-catalyzed reactions. **Tetrahedron Letters**, v.39, p. 4333-4336, 1998.

LIN, S. S.; WU, C. H.; SUN, M. C.; SUN, C. M.; HO, Y. P. Microwave-assisted enzyme catalysed reactions in various solvent systems. **Journal American Society Mass Spectrom**, v.16, p. 581-588, 2005.

LINDSTROM, P.; TIERNEY, J.; WATHEY, B.; WESTMAN, J. Microwave assisted organic synthesis –A Review. **Tetrahedron**, v. 57, p. 9255-9283, 2001.

LINKO, Y. Y.; LAMSA, M.; WU, X.; UOSUKAINEN, E.; SEPPALA, J.; LINKO, P. Biodegradable products by lipase biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 41-50, 1998.

MALCATA, F. X.; GARCIA, H. S.; HILL, C.G., Jr.; AMUNDSON, C. H. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: part I. Lipase adsorption studies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 6, p. 647-57, 1992.

MAMAT, H.; NOR AINI, I.; SAID, MAMOT.; JAMALUDIN, RADZUAN. Physicochemical characteristics of palm oil and sunflower oil blends fractionated at different temperatures. **Food Chemistry**, v.91, n.4, p.731-736, 2005.

MARTÍN, E. H.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. **Bioresource Technology**, v.99, p.277-286, 2008.

MARTINS, C. L. P.; CASTRO, M. A. B.; PEREZ, V. H.; DA RÓS, P. C. M.; DE CASTRO, H. F. **Testes operacionais de um protótipo de reator de micro-ondas para obtenção de biodiesel por via enzimática.** In: SINAFERM – Simpósio Nacional de Bioprocessos, 16, 2007. Curitiba – PR. 7p. CD ROM.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. 2.ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 360p.

MAUGARD, T.; GAUNT, D.; LEGOY, M.D.; BESSON, T. Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Biotechnology Letters**, v.25, p.623-629, 2003.

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

MENDES, A. A.; BARBOSA, B. C. M.; DA SILVA, M. L. C. P.; DE CASTRO, H. F. Morphological, biochemical and kinetic properties of lipase from *Candida rugosa* immobilized in zirconium phosphate, **Biocatalysis and Biotransformation**, v.25, n.5, p. 393-400, 2007.

MIRANDA, M. **Aprimoramento do procedimento de imobilização da lipase microbiana em óxido de nióbio para modificação de óleos vegetais.** 2004. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2004.

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

MODI, M. K.; REDDY, J. R. C.; RAO, B. V. S. K.; PRASSAD, R. B. N. Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 637-640, 2006.

MODI, M. K.; REDDY, J. R. C.; RAO, B. V. S. K.; PRASSAD, R. B. N. Lipase-catalyzed mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1260-1264, 2007.

MOREIRA, A. B. R. **Seleção de fonte de lipase para síntese de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palma com etanol.** 2007. 127f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F.; DA RÓS, P. C. M. Seleção de fonte de lipase para etanolise do óleo de palma. In: SINAFERM 2007 – Simpósio Nacional de Bioprocessos, 16, 2007. Curitiba – PR. 8p, CD ROM.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiment**. 1.ed. New York: John Wiley & Sons, 1995. 728p.

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

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Burkholderia cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769-777, 2005.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 187-204, 2000.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado**. Disponível em: <www.xitizap.com/Livro-Biodiesel>. Acesso em 30 de jan. 2008.

PARKER, M.C.; BESSON, T.; LAMARE, S.; LEGOY, M.D. Microwave radiation can increase the rate of enzyme-catalyzed reactions in organic media. **Tetrahedron**, v.37, p.8383-8386, 1996.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; De CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n.3, p.281-288, 2007.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; De CASTRO, H. F. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, p. 35-40, 2008.

PENCREACH G.; LEULLIER M.; BARATTI J. C. Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.56, n.2, p. 181-189, 1997.

PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 4, p. 343-355, 2003.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. de P.; De ANDRADE, J. B. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, p. 1313-1330, 2005.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M. Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biociência e Desenvolvimento**, n. 31, p. 28-37, 2003.

RÉJASSE, B.; LAMARE, S.; LEGOY, M. D.; BESSON, T. Stability improvement of immobilized *Candida antarctica* lipase B in an organic medium under microwave radiation. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, p.1086-1089, 2004.

RESLOW, M.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASON, B. On the importance of the support material for bioorganic synthesis - Influence of material partition between solvent, enzyme and solid support in water-poor reaction media. **European Journal of Biochemistry**, v. 172, p. 573-578, 1988.

ROSINI, F.; NASCENTES, C. C.; NÓBREGA, J. A. Experimentos didáticos envolvendo radiação microondas. **Química Nova**, v. 27, n.6, p.1012-1015, 2004.

ROZENAAL, A. Interesterification of oils and fats. **Inform**, v. 3, n. 11, p. 1232-1237, 1992.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Non-thermal effects of microwaves on protease-catalyzed esterification and transesterification. **Tetrahedron**, v.59, p.5431-5436, 2003.

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

SADICOFF, B. L.; AMORIM, M. C. V.; MATTOS, M. C. S. Uma demonstração simples e visual do efeito do aquecimento com micro-ondas em reações de poliadição. **Química Nova**, v. 23, n.4, p.557-559, 2000.

SANSEVERINO, A. M. Micro-ondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, n.4, p. 660-667, 2002.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin, **Journal of Molecular Catalysis. B Enzymatic**, v. 52-53, p. 49-57, 2008a.

SANTOS, J.C.; MIJONE, P.D.; NUNES, G.F.M.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Covalent attachment of *Candida rugosa* lipase on chemically modified hybrid matrix of polysiloxane-polyvinyl alcohol with different activating compounds. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 61, p.229-236, 2008b.

SAXENA, R. K.; ISAR, J.; SARAN, S.; KAUSHIK, R.; DAVIDSON, W. S. Efficient microwave-assisted hydrolysis of triolein and synthesis of bioester, bio-surfactant and glycerides using *Aspergillus carneus* lipase. **Current Science**, v. 89, n.6, p.1000-1003, 2005.

SELMİ, B.; THOMAS, D. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in solvent-free medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 691-695, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

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

SILVA, G. S.; INOUE, D. Y.; DORS, G.; FURIGO JR, A.; DE CASTRO, H. F. Desempenho de diferentes lipases na síntese de biodiesel: *Pseudomonas* sp. imobilizada em suporte híbrido e Novozym® 435. In: WORKSHOP DE BIOCATALÍSE E BIOTRANSFORMAÇÃO, 4., 2008. São Carlos – SP. Anais de Resumo, p.66.

SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Adaptação de forno de micro-ondas doméstico para realização de reações de transesterificação sob refluxo e catálise por argilas. **Química Nova**, v. 29, n.2, p.376-380, 2006.

SILVA, M. L. C. P.; SILVA, L. J. P.; PEREZ, E. A. C.; TAGLIAFERRO, G. V. Estudo comparativo dos óxidos de nióbio hidratado obtidos pela precipitação convencional e em solução homogênea. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 50, p. 83-87, 2001.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77-9, p. 745-757, 1999.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1992. p.186.

STUART, B., GEORGE, W. O., MCINTYRE, P. S. In: ANDO, D. J. ed. **Modern Infrared Spectroscopy**. England: John Wiley & Sons, 1996, p. 117-119.

TISHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystal or carries? **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 223-232, 1999.

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

URIOSTE, D.; CASTRO, M. B. A.; BIAGGIO, F. C.; De CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v.31, n.2, p. 407-412, 2008.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. M.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

XU, Y.; DU, W.; LIU, D.; ZENG, J. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1239-1241, 2003.

YADAV, G. D.; LATHI, P. S. Intensification of enzymatic synthesis of propylene glycol monolaurate from 1,2- propanediol and lauric acid under microwave irradiation: Kinetics of forward and reverse reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.814-820, 2006.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 438-450, 1998.

YU, D.; WANG, Z.; CHEN, P.; JIN, L.; CHENG, Y.; ZHOU, J.; CAO, SHUGUI. Microwave-assisted resolution of (R, S)-2-octanol by enzymatic transesterification. **Journal of molecular catalysis**, v.48, p.51-57, 2007.

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

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas Imobilizadas. In: SAID, S. e PIETRO, R. C. L. R. (ed.) **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. cap. 4. p.35-85.

ZELIKMAN, A. N.; KREIN, O. E.; SAMSONOV, G. V. Metallurgy of rare metals, Israel **Program for Scientific Translations**, Jerusalém, 1966, p. 101.

ZOPPI, R. A.; De CASTRO, C. R.; YOSHIDA, I. V. P. Hybrids of SiO₂ and poly (amide 6-b-ethylene oxide). **Polymer**, v.38, n.23, p.5705-5712, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Rendimento em ésteres

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

APÊNDICE B - Valores referentes aos ácidos graxos analisados e ésteres correspondentes, em relação à composição do óleo de babaçu.

Ácidos Graxos	Óleo de babaçu (%)	Massa molecular Ácidos graxos (MM _a)	Massa molecular dos ésteres de etila (MM _e)	Massa de ácido presente em 3,37 g de óleo (M ₀)	Massa total ésteres de etila esperada
C8	3,50	144,22	172,22	0,12	0,141
C10	4,50	172,27	200,27	0,15	0,176
C12	44,70	200,32	228,32	1,51	1,717
C14	17,50	228,37	256,37	0,59	0,662
C16	9,70	256,42	284,42	0,33	0,363
C18	3,10	284,47	312,47	0,10	0,115
C18:1	15,20	282,46	310,46	0,51	0,563
Total	98,20			3,31	3,737

Cálculo baseado em massa inicial de óleo de babaçu igual a 3,37 gramas na razão molar 1:12 (óleo/etanol).

APÊNDICE C - Valores referentes aos ácidos graxos analisados e ésteres correspondentes, em relação à composição do óleo de palma.

Ácidos Graxos	Óleo de palma (%)	Massa molecular Ácidos graxos (MM _a)	Massa molecular dos ésteres de etila (MM _e)	Massa de ácido presente em 6 g de óleo (M ₀)	Massa total ésteres de etila esperada
C12	0,10	200,32	229,32	0,005	0,006
C14	1,20	228,37	257,37	0,070	0,079
C16	46,80	256,42	285,42	2,752	3,053
C18	3,80	284,47	313,47	0,223	0,245
C18:1	37,60	280,44	309,44	2,211	2,430
C18:2	10	280,44	308,44	0,58	0,64
Total	99,50	310,5	339,5	5,197	5,815

Cálculo baseado em massa inicial de óleo de palma igual a 6 gramas na razão molar 1:18 (óleo/etanol).

APÊNDICE D - Rendimento global de reação

$$\eta = \frac{M_b}{M_o} \times 100$$

Em que:

Mb- massa da fase biodiesel em gramas.

Mo- massa de óleo utilizada em gramas.

APÊNDICE E - Atividade hidrolítica da lipase PS livre e imobilizada nos suportes SiO₂-PVA e óxido de nióbio, utilizando diferentes concentrações de azeite de oliva para determinação dos parâmetros cinéticos (40 °C, pH 6,5).

Porcentagem de azeite na emulsão %	Concentração em ácidos graxos (mM)
10	372
20	744
30	1116
50	1488
60	1860
70	2232

Ácidos graxos (mM)	Atividade PS Livre (U/g)		Atividade PS imobilizada em Si₂O-PVA (U/g)		Atividade PS imobilizada em Óxido de Nióbio (U/g)	
	Experimental	Calculada	Experimental	Calculada	Experimental	Calculada
0	0	0	0	0	0	0
372	15.836	13.258	506	636	460	417
744	26.050	24.444	861	1.092	818	782
1116	28.370	34.009	1.668	1.436	1.011	1.105
1488	42.597	42.282	1.932	1.704	1.426	1.392
1860	54.422	49.507	1.949	1.919	*	*
2232	53.499	55.872	1.882	2.095	1.887	1881

* Valores retirados dos cálculos para melhor ajuste dos dados.

APÊNDICE F - Estabilidade térmica da lipase PS livre e imobilizada nos suportes SiO₂-PVA e óxido de nióbio.

Atividade residual da lipase PS livre, e dos derivados imobilizados submetidos ao tratamento térmico (60°C).

Estabilidade térmica mediada em meio aquoso (Tampão fosfato 0,1M, pH 6,5)

Atividade determinada a 40°C, tempo 5 min.

Tempo (min)	PS livre		PS imobilizada em SiO ₂ -PVA		PS imobilizada em Óxido de Nióbio	
	Atividade Residual (%)	Atividade Medida (U/g)	Atividade Residual (%)	Atividade Medida (U/g)	Atividade Residual (%)	Atividade Medida (U/g)
0	100	43291	100	2009	100	2284
5	90,23	39061	*	*	*	*
10	83,33	36076	*	*	*	*
15	59,77	25875	*	*	*	*
30	0	0	77,44	1556	65,81	1503
60	0	0	76,26	1532	58,21	1329
120	0	0	76,26	1532	56,79	1297

* Para os derivados imobilizados o tempo de incubação foi a partir de 30 min, não sendo quantificado sua atividade nos tempos 5, 10 e 15 min.

APÊNDICE G - Dados referentes aos testes de etanólise do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA na razão molar 1:12.

Materiais

-2,625 g de etanol

-3,375 g de óleo de babaçu

-1,3228 g PS imobilizada em SiO₂-PVA (massa seca), umidade 10,23%

Atividade enzimática = 1040,38 U/g

Razão Molar: 1:12 (óleo/etanol)

409,8 unidades de atividade/ g de óleo

Ácidos Graxos		Concentração (% mássica)		
		3h	24h	48h
Caprílico	C8	4,14	5,02	5,10
Capríco	C10	2,91	3,48	3,64
Láurico	C12	15,07	22,58	27,48
Mirístico	C14	10,03	11,70	11,82
Palmítico	C16	4,24	4,51	4,28
Estearico	C18	1,30	1,88	2,04
Oleico	C18:1	4,80	6,92	7,52
Total		42,49	56,09	61,88
Rendimento Total (%)		68,23	90,08	100

APÊNDICE H - Dados referentes aos testes de etanólise do óleo de babaçu empregando lipase PS imobilizada em Óxido de Nióbio.

Materiais:

-2,625 g de etanol

-3,34 g de óleo de babaçu

-1,34 gramas PS imobilizada em Óxido de Nióbio (massa seca), umidade 11,40%

Atividade enzimática = 912,31 U/g

Razão Molar: 1:12 (óleo/etanol)

366 unidades de atividade/ g de óleo

Ácidos Graxos		Produção (% mássica)		
		3h	24h	48h
Caprílico	C8	0,67	2,28	4,70
Capríco	C10	0,48	1,59	3,14
Láurico	C12	3,13	8,51	16,80
Mirístico	C14	2,89	5,85	10,44
Palmítico	C16	1,41	2,58	4,29
Estearico	C18	0,34	0,77	1,45
Oléico	C18:1	1,25	2,84	5,34
Total		10,17	24,42	46,16
Rendimento Total (%)		16,34	35,71	74,13

APÊNDICE I - Dados referentes aos testes de etanólise do óleo de babaçu no reator cilíndrico, empregando lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA na razão molar 1:18 e temperatura de 40 °C.

Materiais:

-6,46 g de etanol e 5,54 g de óleo de babaçu

- quantidade de lipase PS massa seca: 0,66g (5%), 1,32g (10%), 1,99g (15%), 2,6484g (20%), 3,97 (30%), com umidade de 10,35%.

Concentração de lipase	Rendimento de transesterificação (%)				
	3h	6h	12h	24h	48h
5%	14,25	24,09	42,85	43,90	45,93
10%	39,57	49,77	56,28	49,85	57,36
15%	45,40	58,80	51,74	54,91	60,19
20%	47,56	49,10	55,43	56,27	75,42
30%	55,12	54,30	63,71	73,65	85,26

APÊNDICE J - Resultados obtidos no planejamento experimento realizado para otimizar as condições reacionais para reação de transesterificação do óleo de babaçu e etanol sob irradiação de micro-ondas.

EXPERIMENTO 1.

Razão Molar (óleo:etanol): 1:8,4

Temperatura: 43 °C

Enzima: Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA

U por grama de óleo: 500 U/g

Razão Mássica (óleo:etanol): 7,77:4,23

Atividade Hidrolítica: 2487 U/g

Umidade: 10 %

RESULTADOS OBTIDOS

			Concentração (%)					
Ácido Graxo		Babaçu	1h	2h	4h	6h	7h	8h
Caprílico	C ₈	3,5	0,93	1,53	2,18	1,20	1,79	2,42
Cáprico	C ₁₀	4,5	0,71	0,94	1,48	5,43	1,31	1,75
Láurico	C ₁₂	44,7	9,50	13,58	15,65	18,00	18,77	18,02
Mirístico	C ₁₄	17,5	3,44	4,78	6,33	6,36	5,91	6,47
Palmítico	C ₁₆	9,7	2,50	3,47	3,49	2,05	3,11	3,291
Estearico	C ₁₈	3,1	0,85	1,08	1,25	0,93	4,98	1,39
Oleico	C _{18:1}	15,2	5,10	7,80	7,13	5,27	4,32	7,92
Total		98,2	23,04	33,19	37,52	39,23	40,20	41,26
Rendimento Total (%)			32,09	46,23	52,26	54,65	56,00	57,47

EXPERIMENTO 2.

Razão Molar (óleo:etanol): 1:15,4

Temperatura: 43 °C

Enzima: Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA

U por grama de óleo: 500 U/g

Razão Mássica (óleo:etanol): 6,00:6,00

Atividade Hidrolítica: 2298 U/g

Umidade: 10 %

RESULTADOS OBTIDOS

			Concentração (%)					
Ácido Graxo		Babaçu	1h	2h	4h	6h	7h	8h
Caprílico	C ₈	3,5	0,63	0,97	1,62	2,19	1,81	1,81
Cáprico	C ₁₀	4,5	0,57	0,86	1,24	1,76	1,62	1,64
Láurico	C ₁₂	44,7	6,86	9,84	13,41	19,33	19,88	19,87
Mirístico	C ₁₄	17,5	3,23	3,89	5,06	6,31	5,98	5,60
Palmítico	C ₁₆	9,7	1,76	1,69	2,53	2,79	2,43	2,35
Estearico	C ₁₈	3,1	0,60	0,54	0,96	1,16	1,09	1,69
Oleico	C _{18:1}	15,2	3,39	3,08	5,44	6,58	5,97	5,49
Total		98,2	17,03	20,87	30,27	40,13	38,78	38,85
Rendimento Total (%)			30,75	37,68	54,65	72,45	70,00	70,14

EXPERIMENTO 3.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:8,4**Temperatura:** 57 °C**Enzima:** Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 500 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 7,77:4,23**Atividade Hidrolítica:** 2035 U/g**Umidade:** 12 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)					
Ácido Graxo		Babaçu	1h	2h	4h	6h	7h	8h
Caprílico	C ₈	3,5	2,21	2,53	2,64	2,56	2,24	2,39
Cáprico	C ₁₀	4,5	1,74	2,07	2,17	2,06	2,57	2,59
Láurico	C ₁₂	44,7	18,81	22,54	23,95	23,48	23,59	23,36
Mirístico	C ₁₄	17,5	6,55	7,13	7,44	7,39	7,79	7,57
Palmítico	C ₁₆	9,7	3,23	3,30	3,35	3,32	3,15	3,27
Estearico	C ₁₈	3,1	1,31	1,54	1,67	1,69	1,79	1,79
Oleico	C _{18:1}	15,2	7,43	8,77	9,51	9,58	10,24	10,57
Total		98,2	41,28	47,88	50,74	50,08	51,36	51,53
Rendimento Total (%)			57,50	66,70	70,68	69,76	71,50	71,78

EXPERIMENTO 4.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:15,4**Temperatura:** 57 °C**Enzima:** Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 500 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 6:6**Atividade Hidrolítica:** 1600 U/g**Umidade:** 9 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)					
Ácido Graxo		Babaçu	1h	2h	4h	6h	7h	8h
Caprílico	C ₈	3,5	0,60	0,90	1,00	1,35	1,59	1,60
Cáprico	C ₁₀	4,5	1,02	1,59	1,64	1,67	1,90	1,91
Láurico	C ₁₂	44,7	9,87	12,37	13,56	15,70	16,76	16,78
Mirístico	C ₁₄	17,5	3,57	3,67	3,66	4,16	4,33	4,37
Palmítico	C ₁₆	9,7	1,00	2,23	1,84	3,03	3,57	3,59
Estearico	C ₁₈	3,1	0,33	0,77	0,51	1,12	1,00	1,00
Oleico	C _{18:1}	15,2	1,89	2,37	2,90	3,57	3,98	3,79
Total		98,2	18,28	23,88	25,12	30,59	33,13	33,04
Rendimento Total (%)			32,97	43,08	45,31	55,18	59,76	59,59

EXPERIMENTO 5.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:12**Temperatura:** 50 °C**Enzima:** Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 500 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 6,75:5,25**Atividade Hidrolítica:** 2536 U/g**Umidade:** 12 %**RESULTADOS OBTIDOS**

		Concentração (%)						
Ácido Graxo		Babaçu	1h	2h	4h	6h	7h	8h
Caprílico	C ₈	3,5	0,65	0,95	1,67	1,82	2,20	2,29
Cáprico	C ₁₀	4,5	0,45	0,72	1,23	2,69	2,50	2,50
Láurico	C ₁₂	44,7	4,34	7,18	12,79	19,57	22,37	22,60
Mirístico	C ₁₄	17,5	2,18	3,25	4,75	6,90	7,70	7,76
Palmítico	C ₁₆	9,7	1,35	1,87	2,38	3,37	3,60	3,70
Estearico	C ₁₈	3,1	0,55	0,69	0,88	1,49	1,50	1,50
Oleico	C _{18:1}	15,2	3,13	3,95	5,02	6,90	7,06	7,12
Total		98,2	12,66	18,62	28,71	42,73	46,92	47,47
Rendimento Total (%)			20,29	29,84	46,02	68,49	75,20	76,29

EXPERIMENTO 6.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:7**Temperatura:** 50 °C**Enzima:** Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 500 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 8,25:3,75**Atividade Hidrolítica:** 1759 U/g**Umidade:** 11,2%**RESULTADOS OBTIDOS**

		Concentração (%)						
Ácido Graxo		Babaçu	1h	2h	4h	6h	7h	8h
Caprílico	C ₈	3,5	1,18	1,84	2,60	2,04	2,52	2,59
Cáprico	C ₁₀	4,5	1,00	1,39	2,11	2,11	2,043	2,08
Láurico	C ₁₂	44,7	10,34	14,50	22,46	21,60	22,23	22,27
Mirístico	C ₁₄	17,5	4,20	5,62	7,12	7,12	6,96	7,00
Palmítico	C ₁₆	9,7	2,26	2,81	3,20	3,05	3,13	3,13
Estearico	C ₁₈	3,1	0,78	0,962	1,38	1,13	1,37	1,37
Oleico	C _{18:1}	15,2	4,46	5,46	7,84	7,06	7,77	7,79
Total		98,2	24,23	33,07	46,70	44,10	46,04	46,23
Rendimento Total (%)			31,67	43,23	61,04	57,64	60,19	60,43

EXPERIMENTO 7.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:16,8**Temperatura:** 50 °C**Enzima:** Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 500 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 5,74:6,26**Atividade Hidrolítica:** 2100 U/g**Umidade:** 11,8 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)					
Ácido Graxo		Babaçu	1h	2h	4h	6h	7h	8h
Caprílico	C ₈	3,5	0,58	1,10	1,79	2,34	1,83	1,95
Cáprico	C ₁₀	4,5	0,58	1,03	1,38	1,93	1,48	1,49
Láurico	C ₁₂	44,7	7,45	11,64	15,11	15,79	15,97	15,33
Mirístico	C ₁₄	17,5	3,72	4,38	5,05	5,20	5,19	5,13
Palmítico	C ₁₆	9,7	1,98	2,16	2,34	2,33	2,26	2,33
Esteárico	C ₁₈	3,1	0,52	0,74	0,86	0,91	0,78	0,90
Oleico	C _{18:1}	15,2	2,94	4,18	4,88	5,19	4,42	5,13
Total		98,2	17,78	25,23	31,41	33,73	31,92	32,26
Rendimento Total (%)			33,54	47,65	59,31	63,69	60,28	60,93

EXPERIMENTO 8.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:12**Temperatura:** 40 °C**Enzima:** Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 500 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 6,75:5,25**Atividade Hidrolítica:** 2000 U/g**Umidade:** 9,7 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)					
Ácido Graxo		Babaçu	1h	2h	4h	6h	7h	8h
Caprílico	C ₈	3,5	2,05	2,44	2,50	2,34	5,26	2,50
Cáprico	C ₁₀	4,5	1,62	1,93	2,00	2,05	2,06	2,06
Láurico	C ₁₂	44,7	17,91	21,04	22,13	22,36	22,87	22,89
Mirístico	C ₁₄	17,5	5,66	6,50	6,79	6,88	6,91	6,89
Palmítico	C ₁₆	9,7	2,76	3,06	3,16	3,17	3,18	3,27
Esteárico	C ₁₈	3,1	1,29	1,46	1,53	1,56	1,56	1,56
Oleico	C _{18:1}	15,2	7,35	8,28	8,67	8,60	8,88	8,88
Total		98,2	38,64	44,70	46,78	46,95	48,02	48,03
Rendimento Total (%)			62,07	71,82	75,16	75,43	77,15	77,20

EXPERIMENTO 9.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:12**Temperatura:** 60 °C**Enzima:** Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 500 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 6,75:5,25**Atividade Hidrolítica:** 2303 U/g**Umidade:** 11,9 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)					
Ácido Graxo		Babaçu	1h	2h	4h	6h	7h	8h
Caprílico	C ₈	3,5	1,65	1,90	1,90	2,06	2,26	2,26
Cáprico	C ₁₀	4,5	1,14	1,47	1,60	1,88	1,99	1,94
Láurico	C ₁₂	44,7	11,36	15,11	16,52	20,59	22,82	22,17
Mirístico	C ₁₄	17,5	4,02	5,04	5,80	5,87	6,81	6,89
Palmítico	C ₁₆	9,7	2,03	2,46	2,58	2,69	2,70	2,78
Estearico	C ₁₈	3,1	0,91	1,10	1,40	0,79	0,78	0,79
Oleico	C _{18:1}	15,2	5,20	6,23	6,90	5,88	4,41	5,57
Total		98,2	26,31	33,30	36,68	39,75	41,76	42,39
Rendimento Total (%)			42,08	53,26	58,65	63,57	66,78	67,79

EXPERIMENTO 10.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:12**Temperatura:** 50 °C**Enzima:** Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 500 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 6,75:5,25**Atividade Hidrolítica:** 1824 U/g**Umidade:** 12 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)					
Ácido Graxo		Babaçu	1h	2h	4h	6h	7h	8h
Caprílico	C ₈	3,5	2,19	2,17	2,11	2,47	2,18	2,65
Cáprico	C ₁₀	4,5	1,61	1,69	1,68	2,00	2,36	2,06
Láurico	C ₁₂	44,7	16,70	17,87	18,19	21,95	21,79	22,66
Mirístico	C ₁₄	17,5	5,90	6,00	6,00	7,00	7,57	7,12
Palmítico	C ₁₆	9,7	3,09	3,05	1,44	3,36	3,13	3,41
Estearico	C ₁₈	3,1	1,28	1,29	1,29	1,53	1,66	1,68
Oléico	C _{18:1}	15,2	7,26	7,38	7,30	8,69	8,80	9,54
Total		98,2	38,03	39,46	38,01	47,04	47,48	49,11
Rendimento Total (%)			60,96	63,24	60,93	75,39	76,00	78,94

EXPERIMENTO 11.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:12**Temperatura:** 50 °C**Enzima:** Lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 500 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 6,75:5,25**Atividade Hidrolítica:** 1899 U/g**Umidade:** 10,7 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)					
Ácido Graxo		Babaçu	1h	2h	4h	6h	7h	8h
Caprílico	C ₈	3,5	1,97	2,33	1,79	2,91	2,72	2,59
Cáprico	C ₁₀	4,5	1,57	1,87	1,51	2,51	2,15	2,15
Láurico	C ₁₂	44,7	16,49	20,52	16,89	2,89	19,69	24,81
Mirístico	C ₁₄	17,5	5,43	5,77	5,29	9,32	7,84	7,88
Palmítico	C ₁₆	9,7	2,44	2,71	2,36	4,83	3,31	3,44
Esteárico	C ₁₈	3,1	0,94	1,30	1,06	2,08	1,86	1,78
Oléico	C _{18:1}	15,2	5,69	7,72	6,01	11,82	10,51	10,34
Total		98,2	34,54	42,22	34,93	36,37	48,08	52,99
Rendimento Total (%)			55,39	67,70	56,00	58,31	77,08	84,98

APÊNDICE K - Resultados obtidos no planejamento experimento realizado para otimizar as condições reacionais para reação de transesterificação do óleo de palma e etanol sob irradiação de micro-ondas.

EXPERIMENTO 1.

Razão Molar (óleo:etanol): 1:8

Temperatura: 43 °C

Enzima: Lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA

U por grama de óleo: 487,13 U/g

Razão Mássica (óleo:etanol): 8,38:3,61

Atividade Hidrolítica: 1376 U/g

Umidade: 12,4 %

RESULTADOS OBTIDOS

			Concentração (%)				
Ácido Graxo		Óleo de Palma	2h	4h	6h	7h	8h
Láurico	C ₁₂	0,10	0,018	0,02	0,65	0,05	0,26
Mirístico	C ₁₄	1,20	0,078	0,21	1,09	0,75	1,60
Palmítico	C ₁₆	46,80	21,89	23,68	31,24	30,78	32,39
Estearico	C ₁₈	3,80	0,342	7,63	6,59	3,92	5,42
Oleico	C _{18:1}	37,60	20,37	17,71	23,16	26,58	27,83
Linoleico	C _{18:2}	10,00	0,002	0,02	0,41	0,003	0,002
Total		99,50	42,70	49,24	63,15	62,07	67,51
Rendimento Total (%)			54,53	62,88	80,11	79,26	86,52

EXPERIMENTO 2.

Razão Molar (óleo:etanol): 1:16

Temperatura: 43 °C

Enzima: Lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA

U por grama de óleo: 572 U/g

Razão Mássica (óleo:etanol): 6,44:5,55

Atividade Hidrolítica: 1206 U/g

Umidade: 13 %

RESULTADOS OBTIDOS

			Concentração (%)				
Ácido Graxo		Óleo de Palma	2h	4h	6h	7h	8h
Láurico	C ₁₂	0,10	0,026	0,05	0,29	0,16	0,21
Mirístico	C ₁₄	1,20	0,23	0,07	0,95	0,66	1,06
Palmítico	C ₁₆	46,80	18,51	16,25	23,66	17,82	21,50
Estearico	C ₁₈	3,80	0,32	2,36	0,33	2,88	0,46
Oleico	C _{18:1}	37,60	8,64	8,19	11,25	10,69	15,83
Linoleico	C _{18:2}	10,00	0,002	0,51	0,03	0,04	0,022
Total		99,50	27,72	27,42	36,48	32,21	39,05
Rendimento Total (%)			45,95	44,61	60,46	53,38	64,72

EXPERIMENTO 3.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:8**Temperatura:** 57 °C**Enzima:** Lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 427,8 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 8,41:3,61**Atividade Hidrolítica:** 1241 U/g**Umidade:** 11,9 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)				
Ácido Graxo		Óleo de Palma	2h	4h	6h	7h	8h
Láurico	C ₁₂	0,10	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03
Mirístico	C ₁₄	1,20	0,08	0,02	0,22	0,25	2,30
Palmítico	C ₁₆	46,80	17,21	17,15	20,68	26,97	31,02
Esteárico	C ₁₈	3,80	0,29	9,49	1,51	4,44	0,51
Oleico	C _{18:1}	37,60	12,07	10,39	16,27	17,60	15,23
Linoleico	C _{18:2}	10,00	0,20	0,31	0,003	0,62	0,90
Total		99,50	29,68	37,38	38,69	49,89	49,96
Rendimento Total (%)			37,90	47,34	49,42	62,93	62,98

EXPERIMENTO 4.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:16**Temperatura:** 57 °C**Enzima:** Lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 617,8 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 6,54:5,58**Atividade Hidrolítica:** 1375 U/g**Umidade:** 12,4%**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)				
Ácido Graxo		Óleo de Palma	2h	4h	6h	7h	8h
Láurico	C ₁₂	0,10	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03
Mirístico	C ₁₄	1,20	0,09	0,09	0,92	1,04	1,02
Palmítico	C ₁₆	46,80	16,22	18,06	20,98	24,62	22,69
Esteárico	C ₁₈	3,80	0,33	3,95	0,31	0,46	0,38
Oleico	C _{18:1}	37,60	9,41	14,62	12,81	12,57	16,60
Linoleico	C _{18:2}	10,00	0,002	0,025	0,002	0,003	0,002
Total		99,50	26,07	36,74	35,04	38,68	40,71
Rendimento Total (%)			43,21	60,89	58,07	64,10	67,47

EXPERIMENTO 5.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:12**Temperatura:** 50 °C**Enzima:** Lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 484,2 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 7,41:4,72**Atividade Hidrolítica:** 1180 U/g**Umidade:** 13 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)				
Ácido Graxo		Óleo de Palma	2h	4h	6h	7h	8h
Láurico	C ₁₂	0,10	0,02	0,02	0,02	0,03	0,23
Mirístico	C ₁₄	1,20	0,096	0,09	1,24	1,25	1,40
Palmítico	C ₁₆	46,80	20,49	24,42	25,55	25,10	27,22
Estearico	C ₁₈	3,80	0,37	3,84	3,57	3,57	0,43
Oleico	C _{18:1}	37,60	12,79	15,11	18,55	18,57	19,18
Linoleico	C _{18:2}	10,00	0,024	0,022	0,026	0,03	0,26
Total		99,50	33,77	43,48	48,93	48,54	48,71
Rendimento Total (%)			49,54	63,79	71,79	71,18	71,69

EXPERIMENTO 6.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:6,3**Temperatura:** 50 °C**Enzima:** Lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 360,7 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 9,01:3,05**Atividade Hidrolítica:** 1079 U/g**Umidade:** 12,5%**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)				
Ácido Graxo		Óleo de Palma	2h	4h	6h	7h	8h
Láurico	C ₁₂	0,10	0,15	0,08	0,07	0,07	0,05
Mirístico	C ₁₄	1,20	1,50	1,20	0,84	0,91	0,83
Palmítico	C ₁₆	46,80	15,12	17,29	13,41	22,87	20,06
Estearico	C ₁₈	3,80	1,53	1,00	0,97	0,86	0,58
Oleico	C _{18:1}	37,60	7,84	5,14	7,66	10,10	10,42
Linoleico	C _{18:2}	10,00	0,04	0,03	0,03	0,03	0,044
Total		99,50	26,17	24,73	22,97	34,83	31,98
Rendimento Total (%)			31,25	29,55	27,35	41,49	38,07

EXPERIMENTO 7.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:17,7**Temperatura:** 50 °C**Enzima:** Lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 481,4 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 6,21:5,89**Atividade Hidrolítica:** 988 U/g**Umidade:** 13,1 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)				
Ácido Graxo		Óleo de Palma	2h	4h	6h	7h	8h
Láurico	C ₁₂	0,10	0,12	0,15	0,12	0,14	0,25
Mirístico	C ₁₄	1,20	1,09	1,27	1,16	1,07	1,13
Palmítico	C ₁₆	46,80	12,18	15,84	18,94	19,10	18,82
Estearico	C ₁₈	3,80	0,63	0,03	0,34	0,48	0,35
Oleico	C _{18:1}	37,60	8,34	8,95	11,29	9,97	12,07
Linoleico	C _{18:2}	10,00	0,03	0,03	0,04	0,037	0,027
Total		99,50	22,38	26,26	31,88	30,80	32,65
Rendimento Total (%)			39,17	45,97	55,78	53,91	57,15

EXPERIMENTO 8**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:12**Temperatura:** 40 °C**Enzima:** Lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 435,3 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 7,36:4,6**Atividade Hidrolítica:** 1060 U/g**Umidade:** 12 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)				
Ácido Graxo		Óleo de Palma	2h	4h	6h	7h	8h
Láurico	C ₁₂	0,10	0,29	0,21	0,02	0,19	0,24
Mirístico	C ₁₄	1,20	0,24	0,22	0,40	0,82	1,22
Palmítico	C ₁₆	46,80	19,01	20,68	25,37	22,22	24,56
Estearico	C ₁₈	3,80	0,44	3,59	0,33	3,64	0,44
Oleico	C _{18:1}	37,60	8,19	14,14	10,75	21,50	17,91
Linoleico	C _{18:2}	10,00	0,02	0,023	0,04	0,02	0,02
Total		99,50	28,17	38,83	36,87	48,38	44,38
Rendimento Total (%)			41,33	56,66	54,09	70,59	64,76

EXPERIMENTO 9.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:12**Temperatura:** 60 °C**Enzima:** Lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 434,86 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 7,34:4,66**Atividade Hidrolítica:** 1060 U/g**Umidade:** 12 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)				
Ácido Graxo		Óleo de Palma	2h	4h	6h	7h	8h
Láurico	C ₁₂	0,10	0,26	0,21	0,02	0,18	0,24
Mirístico	C ₁₄	1,20	0,21	0,22	0,43	0,77	1,22
Palmítico	C ₁₆	46,80	20,22	20,10	23,70	20,88	24,65
Estearico	C ₁₈	3,80	0,38	3,60	0,35	3,42	0,44
Oleico	C _{18:1}	37,60	14,18	9,23	11,47	14,17	12,32
Linoleico	C _{18:2}	10,00	0,002	0,002	0,024	0,019	0,02
Total		99,50	35,25	33,35	36,22	39,42	38,9
Rendimento Total (%)			51,71	48,67	52,78	57,52	56,71

EXPERIMENTO 10.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:12**Temperatura:** 50 °C**Enzima:** Lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 464,4 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 7,38:4,71**Atividade Hidrolítica:** 1089 U/g**Umidade:** 14 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)				
Ácido Graxo		Óleo de Palma	2h	4h	6h	7h	8h
Láurico	C ₁₂	0,10	0,27	0,27	0,057	0,27	0,26
Mirístico	C ₁₄	1,20	0,21	1,01	0,97	0,73	0,51
Palmítico	C ₁₆	46,80	21,26	18,92	24,53	29,76	27,74
Estearico	C ₁₈	3,80	0,41	4,14	3,98	3,55	0,45
Oleico	C _{18:1}	37,60	16,05	10,70	16,00	14,44	19,72
Linoleico	C _{18:2}	10,00	0,02	0,030	0,023	0,031	0,035
Total		99,50	38,20	35,03	45,54	48,77	48,70
Rendimento Total (%)			55,60	50,98	66,27	70,88	70,82

EXPERIMENTO 11.**Razão Molar (óleo:etanol):** 1:12**Temperatura:** 50 °C**Enzima:** Lipase AK imobilizada em SiO₂-PVA**U por grama de óleo:** 496,4 U/g**Razão Mássica (óleo:etanol):** 7,36:4,75**Atividade Hidrolítica:** 1240 U/g**Umidade:** 11,9 %**RESULTADOS OBTIDOS**

			Concentração (%)				
Ácido Graxo		Óleo de Palma	2h	4h	6h	7h	8h
Láurico	C ₁₂	0,10	0,26	0,20	0,02	0,22	0,28
Mirístico	C ₁₄	1,20	0,21	0,21	0,41	0,93	1,40
Palmítico	C ₁₆	46,80	20,30	16,90	23,42	25,04	28,26
Esteárico	C ₁₈	3,80	0,38	3,43	0,33	4,10	0,51
Oleico	C _{18:1}	37,60	14,55	13,56	19,91	20,40	20,61
Linoleico	C _{18:2}	10,00	0,002	0,002	0,02	0,023	0,03
Total		99,50	35,69	34,26	44,11	50,68	51,08
Rendimento Total (%)			52,38	49,99	64,69	73,96	74,50