



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



FRANCIELLE BATISTA DA SILVA

Preparação e caracterização de triacetato de celulose a partir da polpa  
Kraft: aplicação na imobilização de lipase e catálise de reações de  
transesterificação

Uberlândia – MG

2017

FRANCIELLE BATISTA DA SILVA

Preparação e caracterização de triacetato de celulose a partir da polpa  
Kraft: aplicação na imobilização de lipase e catálise de reações de  
transesterificação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção de título de Doutora em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Maria Nascimento de Assunção

Co-orientador: Prof. Dr. Anízio Márcio Faria

Uberlândia - MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S586p  
2017

Silva, Francielle Batista da, 1986-  
Preparação e caracterização de triacetato de celulose a partir da polpa Kraft: aplicação na imobilização de lipase e catálise de reações de transesterificação / Francielle Batista da Silva. - 2017.  
105 f. : il.

Orientadora: Rosana Maria Nascimento de Assunção.  
Coorientador: Anizio Márcio Faria.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.15>  
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Enzimas - Teses. 3. Biodiesel - Teses. 4. Óleo de soja - Teses. I. Assunção, Rosana Maria Nascimento de. II. Faria, Anizio Márcio. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,  
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 073/PPQUI.**

**DATA: 30/11/2017**

**DISCENTE:** Francielle Batista da Silva

**MATRÍCULA:** 11313QMI002

**TÍTULO DO TRABALHO:** Preparação e caracterização de triacetato de celulose de polpa kraft: aplicação na imobilização de lipase e catálise de reações de transesterificação.

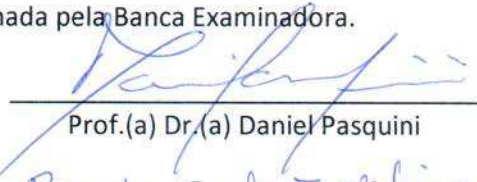
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** Química

**LINHA DE PESQUISA:** Físicoquímica de Macromoléculas e Colóides

**PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO:** Obtenção de ésteres etílicos e metílicos utilizando lipases de fungos filamentosos e técnicas de engenharia genética, empregando óleos residuais, pinhão manso e polpa de macaúba: viabilidade biotecnológica para a obtenção do biodiesel

Às nove horas do dia trinta de novembro do ano dois mil e dezessete, no(a) Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, piso superior do Bloco 5I no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Daniel Pasquini, da(o) do Instituto de Química da UFU, Renata Galvão de Lima, da Faculdade de Ciências Integradas do Pontal, da Universidade Federal de Uberlândia, Daniel Alves Cerqueira, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Hernane da Silva Barud, da Universidade de Araraquara, e Rosana Maria Nascimento de Assunção, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPBIC. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será MANTIDO.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 13 horas e 10 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

  
Prof.(a) Dr.(a) Daniel Pasquini

  
Prof.(a) Dr.(a) Daniel Alves Cerqueira

  
Prof.(a) Dr.(a) Renata Galvão de Lima

  
Prof.(a) Dr.(a) Hernane da Silva Barud

  
Orientador(a) : Prof.(a) Dr.(a) Rosana Maria Nascimento de Assunção

*Aos meus pais, Edmundo Batista da Silva e Maria Madalena da Silva, que  
jamais mediram esforços para que eu estudasse, dedico esse trabalho.*

---

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, pelo dom da vida e por me rodear das pessoas pelas quais agradecerei logo mais. A Ele também agradeço pelas respostas de minhas orações naqueles momentos em que achei que não conseguiria concluir este trabalho.

À minha filha, Isabela, simplesmente por ter nascido durante o doutorado e ter se tornado o maior motivo pelo qual lutei até o fim. Ao meu esposo Diego, meu companheiro fiel, até a eternidade. Aos meus pais e minha irmã, que dispensam palavras, tamanho amor. Aos demais familiares e amigos que torceram por mim e me incentivaram. Obrigada por tudo!

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosana, por ser tão sensível e perceber que além de um aluno de doutorado e um projeto de pesquisa existe um ser humano cheio de limitações. Ao Prof. Dr. Anízio, que ainda com o barco em alto mar, se prontificou a embarcar e terminar essa viagem conosco. A vocês, agradeço pela orientação, disponibilidade e carinho durante o desenvolvimento deste trabalho!

Ao meu amigo Dr. Wilson Galvão de Moraes Júnior, por todo apoio e auxílio no mundo complexo das enzimas.

Às minhas companheiras de trabalho e amigas que me ajudaram tanto: Cléo e Elen. O que seria de mim sem a ajuda de vocês? Nem sei como agradecer!

Aos colegas do LABREPOL- IQUFU, especialmente à Sabrina Ribeiro, que desde os primeiros passos deste trabalho deu sua colaboração; também a amiga Helena Ali, pela parceria e amizade;

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Batista (Flash) e Andressa Tironi, pelo auxílio;

Ao Roni Santos, pelo acompanhamento no Laboratório Multiusuário do IQUFU;

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Miria Hespanhol e Prof<sup>a</sup>. Dra. Vicelma Cardoso, pelo uso do cromatógrafo gasoso no NUCBIO/FEQ;

À Faculdade de Engenharia Química, por ceder sua infraestrutura de laboratórios para a realização dos experimentos. Também aos colegas de trabalho deste departamento.

*“O correr da vida embrulha tudo,  
a vida é assim: esquentada e esfria,  
aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem.  
O que Deus quer é ver a gente  
aprendendo a ser capaz  
de ficar alegre a mais,  
no meio da alegria,  
e ainda mais alegre  
ainda no meio da tristeza!  
A vida inventa!  
A gente principia as coisas,  
no não saber por que,  
e desde aí perde o poder de continuação  
porque a vida é mutirão de todos,  
por todos remexida e temperada.  
O mais importante e bonito, do mundo, é isto:  
que as pessoas não estão sempre iguais,  
ainda não foram terminadas,  
mas que elas vão sempre mudando.  
Afinam ou desafinam. Verdade maior.  
Viver é muito perigoso; e não é não.  
Nem sei explicar estas coisas.  
Um sentir é o do sentente, mas outro é do sentidor.”*

(Guimarães Rosa)

---

## RESUMO

---

O emprego de polímeros naturais e/ou semi-sintéticos como suportes para imobilização de enzimas é uma estratégia para estabilizar enzimas, permitindo aumento da atividade catalítica e remoção da enzima do meio reacional. Neste trabalho, estudou-se a produção de triacetato de celulose (TAC) através de reação de acetilação homogênea de polpa Kraft e a imobilização de fosfolipase comercial Lecitase Ultra® (LU) em TAC por adsorção física. TAC e a LU imobilizada em TAC (LU-TAC) foram caracterizados por Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR), Difração de raios-X de alto ângulo (DRX), Microscopia eletrônica de Varredura (MEV), e Termogravimetria (TGA). A produção de TAC foi confirmada através do valor do grau de substituição obtido por FTIR, igual a 2,7 e temperatura de fusão de 306 °C. LU-TAC apresentou atividade catalítica de 975,8 U/g, estabilidade térmica, especialmente nas temperaturas entre 35 e 40 °C, com inativação de 24 e 19,3%, respectivamente, em 8 horas de experimento. LU-TAC também apresentou estabilidade em toda a faixa de pH estudada, de 3 a 10. Na presença de *n*-hexano, nas primeiras 6 h de incubação, LU-TAC apresentou aumento de atividade enzimática. Nos estudos de dessorção, observou-se a remoção de 84,5% da lipase na presença de uma solução aquosa de Triton X-100 0,02%. Os parâmetros cinéticos,  $K_m$  e  $V_{max}$  foram obtidas para LU (0,24 mmol/L e 11,07  $\mu$ mol/min/mL, respectivamente) e LU-TAC (0,41 mmol/L e 7,09  $\mu$ mol/min/mL, respectivamente) os resultados mostram mudanças de atividade catalítica que podem estar associadas a interação do suporte com a enzima. Testes de reuso de LU-TAC indicaram que a atividade enzimática relativa se mantém acima de 50% por dois ciclos. O desempenho do sistema LU-TAC foi avaliado em reações de transesterificação de óleo de soja com metanol para produção de biodiesel. Para tanto, o processo de produção de biodiesel foi otimizado levando a condição ótima de trabalho: temperatura de 34,2 °C, 21,9 % de LU-TAC e 7,7 % de água. A porcentagem de ésteres totais obtida nessas condições foi de 48,4 %, mantendo fixas razão molar óleo/metanol 1:4 e concentração de *n*-hexano igual a 0,5mL/g de óleo. Os resultados obtidos mostram que o uso do TAC estabiliza a enzima e favorece o emprego desta na produção de biodiesel.

Palavras-chave: Lecitase ultra, imobilização, triacetato de celulose, biodiesel, óleo de soja.



---

## ABSTRACT

---

The use of natural and /or semi-synthetic polymers as carriers for enzymes is a strategy for stabilizing enzymes, increasing the catalytic activity and removal of the enzyme from the reaction medium. In this work, cellulose triacetate (TAC) was produced by homogeneous acetylation reaction of Kraft pulp and a commercial phospholipase Lecitase Ultra® (LU) was immobilized in TAC by physical adsorption. TAC and LU immobilized in TAC (LU-CTA) were characterized by Infrared Spectroscopy (FTIR), High Angle X-ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Thermogravimetry (TGA). TAC production was confirmed by degree of substitution obtained by FTIR, equal to 2.7 and melting temperature of 306 °C. LU-TAC presented catalytic activity of 975.8 U/g, thermal stability, especially at temperatures between 35 and 40 °C, with inactivation of 24 and 19.3%, respectively, in 8 hours of experiment. LU-TAC also showed stability throughout a studied pH range. In the presence of *n*-hexane, in the first 6 h of incubation, LU-CTA showed increase in enzymatic activity. In the desorption studies, we observed a removal of 84.5% of lipase in the presence of a 0.02% Triton X-100 aqueous solution. The kinetic parameters,  $K_m$  and  $V_{max}$ , were obtained for LU (0.24 mmol/L and 11.07  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mL}$ , respectively) and LU-TAC (0.41 mmol/L and 7.09  $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mL}$ , respectively). Results show changes in catalytic activity that may be associated with the interaction of the support to an enzyme. LU-TAC reuse tests indicated that the relative enzyme activity remained above 50% for two cycles. The performance of the LU-CTA system was evaluated in transesterification reactions of soybean oil with methanol for biodiesel production. Biodiesel production process was optimized, leading to an optimum working station: temperature of 34.2 °C, 21.9 % of LU-TAC and 7.7 % of water. A percentage of total esters obtained under these conditions was 48.4%, maintaining fixed molar ratio of oil / methanol 1: 4 and concentration of *n*-hexane equal to 0.5mL / g of oil. The results shown that the use of TAC stabilizes the enzyme and favors the use in biodiesel production.

Key words: Lecitase ultra, immobilization, cellulose triacetate, biodiesel, soybean oil.

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Fig. 1.1	Número de publicações entre os anos de 2010 e Novembro de 2017 encontradas na plataforma ScienceDirect sobre o termo “biodiesel”.....	2
Fig. 2.1	Representação da estrutura da celulose. As linhas pontilhadas representam ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares da celulose.....	5
Fig. 2.2	Estruturas propostas para a celulose I (nativa): (a) Triclínica, $I\alpha$ (parâmetros de cela: $a = 6,717 \text{ \AA}$ , $b = 5,962 \text{ \AA}$ , $c = 10,400 \text{ \AA}$ , $\alpha = 118.08^\circ$ , $\beta = 114.80^\circ$ e $\gamma = 80.37^\circ$ ), e (b) Monoclínica, $I\beta$ (parâmetros de cela: $a = 7,784 \text{ \AA}$ , $b = 8,201 \text{ \AA}$ , $c = 10,380 \text{ \AA}$ , $\alpha = \beta = 90^\circ$ e $\gamma = 96.5^\circ$ ); (c) orientação relativa das celas unitárias das estruturas $I\alpha$ (linha seccionada) e $I\beta$ (linha sólida).....	6
Fig. 2.3	Reações para obtenção dos principais produtos comerciais gerados a partir da celulose.....	7
Fig. 2.4	Reação de acetilação da celulose.....	8
Fig. 2.5	Métodos de imobilização de enzimas.....	11
Fig. 2.6	Diferentes reações catalisadas por lipase onde $R'$ , $R_1$ , $R_2$ e $R_3$ são diferentes grupos alquil; TAG: triacilglicerídeos, DAG: diacilglicerídeos, MAG: monoacilglicerídeos.....	14
Fig. 2.7	Representação do mecanismo de ativação interfacial das lipases.....	15
Fig. 2.8	Reação de transesterificação de óleo a biodiesel.....	21
Fig. 2.9	Cadeiras de ácidos graxos predominantes no óleo de soja.....	22
Fig. 2.10	Classificação de catalisadores de uma reação de transesterificação.....	23
Fig. 2.11	Mecanismo para transesterificação alcalina de trigilcerídeos.....	24
Fig.2.12	Mecanismo de reação de transesterificação com catálise ácida.....	25
Fig. 2.13	Parâmetros cruciais que afetam o rendimento da síntese de biodiesel com catálise enzimática.....	29
Fig. 4.1	Reação de hidrólise enzimática do palmitato de <i>p</i> -nitro fenila .....	38
Fig. 5.1	Fotografia de amostras de triacetato de celulose produzido a partir de polpa Kraft de eucalipto.....	46

Fig. 5.2	Mecanismo de reação para acetilação homogênea da celulose.....	47
Fig. 5.3	Espectro de infravermelho obtido para polpa Kraft (linha sólida) e acetato de celulose (linha tracejada) obtido por acetilação de polpa Kraft via método homogêneo.....	48
Fig. 5.4	Difratometria de raios X de polpa Kraft (A) e triacetato de celulose (B) obtido a partir da polpa Kraft.....	50
Fig. 5.5	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para amostras de (A) polpa Kraft e (B) triacetato de celulose.....	51
Fig. 5.6	Curva TG (linha tracejada) e DTA (linha sólida) para celulose de polpa Kraft (A) e triacetato de celulose produzido a partir de polpa Kraft (B).	52
Fig. 5.7	Rendimento de imobilização versus tempo de incubação para LU em TAC.....	54
Fig. 5.8	Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura para amostra de triacetato de celulose (B) e TAC com lipase imobilizada por adsorção física (C).....	54
Fig. 5.9	Espectro na região do infravermelho para o TAC e LU-TAC (A) de 500 a 4000 $\text{cm}^{-1}$ e (B) e (C) regiões ampliadas.....	55
Fig. 5.10	Curva de Difração de raios-X para TAC (A) e LU-TAC (B).....	57
Fig. 5.11	Curvas TGA (linha pontilhada) e DTA (linha sólida) para TAC (A) e LU-TAC (B).....	58
Fig. 5.12	Estabilidade térmica da lipase LU nas temperaturas de 30 °C (▲), 35 °C (◆), 40 °C (★), 45 °C (■) and 50 °C (●) em tampão fosfato de sódio 25mM, pH7 e determinação de atividade enzimática por reação de <i>p</i> -NPP para (A) LU e (B) LU-TAC.....	60
Fig. 5.13	Temperatura ótima para LU-TAC com atividade enzimática medida a pH 7.....	62
Fig. 5.14	Avaliação da atividade relativa (%) em relação a variação de pH entre 3 e 10 para enzima LU livre (cor sólida) e LU imobilizada em TAC (listrado).....	63
Fig. 5.15	Avaliação da atividade relativa (%) de LU-TAC na presença de metanol (■), etanol (●), propanol (▲) e <i>n</i> -hexano (◆).....	65
Fig. 5.16	Dessorção em LU-TAC na presença de Triton X-100.....	66

Fig. 5.17	Gráficos de Lineweaver-Burk para (A) LU ( $R^2= 0,94$ ) e (B) LU-TAC ( $R^2=0,96$ ).....	67
Fig. 5.18	Reuso de LU-TAC na hidrólise de <i>p</i> -NPP. Reações realizadas de acordo com a Seção 3.4.1.....	69
Fig. 5.19	Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para % FAME.	76
Fig. 5.20	Distribuição dos resíduos para a o modelo proposto para a % FAME produzida na transesterificação do óleo de soja catalisada por LU-TAC.	76
Fig. 5.21	Superfícies de resposta e curvas de contorno para % FAME em função de (A) % de LU-TAC e temperatura; (B) % água e temperatura e (C) % água e % LU-TAC.....	78
Fig. 5.22	Variação da produção de ésteres metílicos de ácidos graxos com o tempo na reação de transesterificação do óleo de soja catalisada por LU-TAC nas condições otimizadas do PCC.....	79
Fig. 5.23	Perfil cromatográfico de ésteres produzidos em reação de transesterificação de óleo de soja catalisada por LU-TAC. Condições cromatográficas: coluna RTX-5MS 30 m × 0,32 mm d.i. × 0,25 µm espessura de filme; temperatura do forno da coluna: 210 °C; injeção no modo split a 250 °C, razão Split 1:10; detector FID a 250 °C; volume de injeção: 1,0 µL.....	80
Fig. 5.24	% FAME obtida em cada ciclo de uso do catalisador LU-TAC na transesterificação do óleo de soja.....	81

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tab. 2.1	Comparação entre enzima livre e imobilizada.....	10
Tab. 2.2	Diferentes origens de lipases e substratos utilizados para produção de biodiesel.....	17
Tab. 2.3	Matérias-primas para produção e biodiesel.....	22
Tab. 2.4	Comparação dos métodos enzimático e químico para produção de biodiesel.....	28
Tab. 4.1	Testes propostos para avaliação dos efeitos da razão molar, % LU-TAC, % água, % <i>n</i> -hexano e temperatura na produção de biodiesel metílico (ésteres metílicos de ácidos graxos) a partir do óleo de soja catalisado pela LU-TAC.....	43
Tab.4.2	Valores utilizados no PCC para as três variáveis independentes avaliadas: (X <sub>1</sub> ) Temperatura (°C), (X <sub>2</sub> ) LU-TAC (% massa de óleo) e (X <sub>3</sub> ) Água (% massa de óleo).....	44
Tab.4.3	Matriz do PCC utilizado para avaliar a influência da temperatura, porcentagem de biocatalisador e água na produção de ésteres em reações de transesterificação catalisadas por LU imobilizada em TAC.....	45
Tab. 5.1	Atribuições das principais bandas de infravermelho de polpa Kraft e acetato de celulose obtido por acetilação de polpa Kraft.....	48
Tab. 5.2	Constante de inativação ( $k_d$ ) e tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) para LU livre e imobilizada em TAC (LU-TAC) para várias temperaturas.....	61
Tab. 5.3	p-valor para o teste de hipóteses que verificou a diferença entre a estabilidade do pH para LU livre e LU-TAC.....	64
Tab. 5.4	Parâmetros cinéticos para LU livre e imobilizada em TAC.....	67
Tab. 5.5	Efeito da razão molar, % LU-TAC, % água, % <i>n</i> -hexano e temperatura na produção de biodiesel metílico (ésteres metílicos de ácidos graxos) a partir do óleo de soja catalisado pela LU-TAC.....	71

Tab. 5.6	Matriz do PCC realizado para avaliação da influência da temperatura, % de LU-TAC e % de água na % de FAME obtida de reações de transesterificação de óleo de soja.....	73
Tab. 5.7	Regressão múltipla para % FAME com $R^2=0,93$ .....	74
Tab. 5.8	Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a % FAME com $R^2=0,93$ .....	75
Tab. 5.9	Análise de variância para % FAME obtida de acordo com o PCC estudado para a transesterificação de óleo de soja catalisada por LU-TAC.....	77

---

## SUMÁRIO

---

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1	CELULOSE .....	4
2.2	ACETATO DE CELULOSE .....	7
2.3	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	9
<b>2.3.1</b>	<b>Lipases .....</b>	<b>13</b>
2.3.1.1	<i>Lecitase ultra®.....</i>	18
2.4	BIODIESEL .....	20
<b>2.4.1</b>	<b>Catálise enzimática de reações de transesterificação .....</b>	<b>27</b>
2.4.1.1	<i>Fatores que influenciam as reações de transesterificação enzimática .....</i>	28
2.4.1.2	<i>Escolha do álcool e razão molar óleo/álcool nas reações de transesterificação .....</i>	29
2.4.1.3	<i>Presença de água nas reações de transesterificação com catálise enzimática .....</i>	31
2.4.1.4	<i>Presença de solvente nas reações de transesterificação com catálise enzimática .....</i>	32
2.4.1.5	<i>Outros fatores que influenciam nas reações de transesterificação com catálise enzimática .....</i>	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
4.1	MATERIAIS .....	35
4.2	PRODUÇÃO DE TRIACETATO DE CELULOSE .....	35
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO TRIACETATO DE CELULOSE .....	35
<b>4.3.1</b>	<b>Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Determinação do grau de substituição do Triacetato de Celulose .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Difratometria de raios-X .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Análise Termogravimétrica (TGA) .....</b>	<b>37</b>
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS LIPASES .....	37
<b>4.4.1</b>	<b>Determinação da atividade enzimática e dosagem de proteína .....</b>	<b>37</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Estudo de estabilidade térmica .....</b>	<b>38</b>

4.4.3	<b>Estudo de variação de pH</b> .....	39
4.5	<b>IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES E CARACTERIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR</b> .....	39
4.5.1	<b>Imobilização de Lecitase ultra em Triacetato de Celulose</b> .....	39
4.5.2	<b>Estudo de estabilidade térmica</b> .....	40
4.5.3	<b>Estudo de variação de pH</b> .....	40
4.5.4	<b>Estudo de estabilidade em solventes orgânicos</b> .....	40
4.5.6	<b>Estudo de dessorção da lipase do suporte</b> .....	40
4.6	<b>DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS APARENTES</b> .....	41
4.7	<b>REUSO DO BIOCATALISADOR</b> .....	41
4.8	<b>TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA CATALISADA POR LU-TAC</b> .....	41
4.8.1	<b>Identificação de ésteres metílicos formados</b> .....	41
4.8.2	<b>Testes preliminares para definição de faixas de estudo e variáveis da otimização das condições das reações de transesterificação</b> .....	43
4.8.3	<b>Otimização das condições de reação de transesterificação catalisada por LU-TAC</b> .....	44
4.8.4	<b>Reuso de LU-TAC em reações de transesterificação de óleo de soja</b> .....	45
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
5.1	<b>PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TRIACETATO DE CELULOSE</b> .....	46
5.2	<b>IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA</b> .....	53
5.3	<b>CARACTERIZAÇÃO DE LU-TAC</b> .....	54
5.3.1	<b>Estabilidade térmica de LU e LU-TAC</b> .....	59
5.3.2	<b>Efeito do pH na estabilidade de LU e LU-TAC</b> .....	62
5.3.3	<b>Efeito de solventes orgânicos</b> .....	64
5.3.4	<b>Dessorção enzimática</b> .....	65
5.3.5	<b>Determinação dos Parâmetros Cinéticos aparentes (<math>K_m</math> e <math>V_{máx}</math>)</b> .....	67
5.3.6	<b>Reutilização de LU-TAC</b> .....	68
5.4	<b>TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA UTILIZANDO LU-TAC COMO BIOCATALISADOR</b> .....	70



<b>5.4.1</b>	<b>Testes preliminares para definição de faixas de estudo e variáveis da otimização das condições das reações de transesterificação .....</b>	<b>70</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Otimização da produção de biodiesel via planejamento composto central (PCC) .....</b>	<b>72</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Reutilização de LU-TAC em reações de transesterificação .....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS .....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>86</b>
	<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>103</b>
	<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>105</b>

---

## TRABALHOS PRODUZIDOS DURANTE O DOUTORADO

---

Artigo: Preparation and characterization of cellulose triacetate as support for Lecitase ultra immobilization.

Autores: Francielle Batista da Silva, Wilson Galvão de Moraes Júnior, Cleuzilene Vieira da Silva, Andressa Tironi Vieira, Antônio Carlos Ferreira Batista, Anízio Márcio de Faria, Rosana Maria Nascimento Assunção.

Aceito para publicação na Revista *Molecules* (MDPI) no dia 06/11/2017.

## 1 INTRODUÇÃO

O emprego da catálise enzimática em diversos processos industriais é objeto de pesquisa e desenvolvimento devido a seletividade e bom desempenho das enzimas em reações que são realizadas geralmente em condições de temperaturas menores que as exigidas por catálise química. Entretanto, as enzimas em sua forma livre e purificadas são caras e apresentam baixa estabilidade térmica, faixa estreita de pH para a reação, sensibilidade a atividade de água no meio reacional e perda da atividade catalítica após um ciclo reativo. A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma boa estratégia que visa melhorar a estabilidade das enzimas, facilitar a recuperação e ampliar as aplicações desses sistemas em diversas reações químicas (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

As enzimas podem ser imobilizadas em suportes sólidos através de vários métodos, sendo a imobilização por adsorção um dos mais importantes e utilizados. Neste método, a interação entre o suporte e a enzima ocorre através de forças de van der Waals, interações dipolo e ligações de hidrogênio, estabelecendo uma interação entre o suporte e a enzima que geralmente não altera a estrutura da enzima.

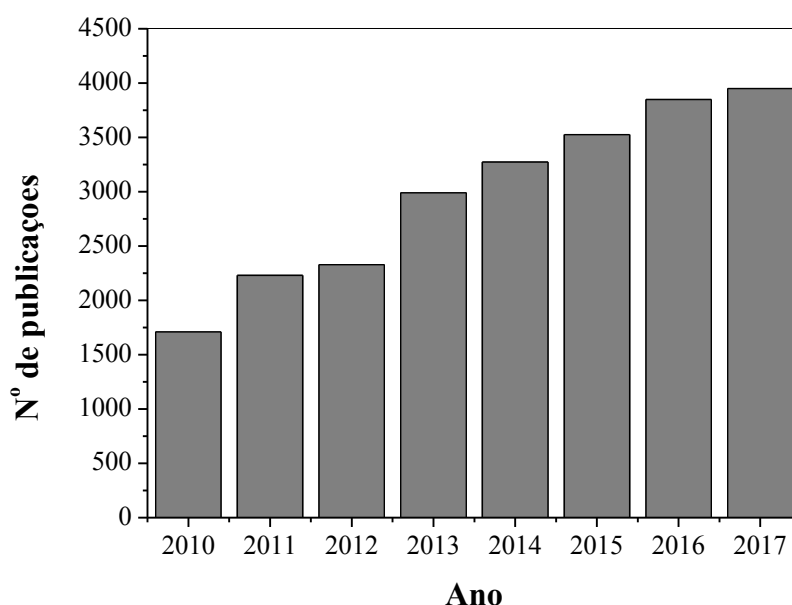
Vários compostos podem ser empregados como suportes sólidos. O critério utilizado para a escolha de suportes é o custo, disponibilidade, estabilidade ou reatividade em condições específicas. Neste sentido, as principais propriedades físico-químicas que devem ser levadas em consideração são: a presença de grupos funcionais na superfície do suporte que favoreçam a adsorção da enzima, a área superficial, a porosidade e a estrutura dos poros. Os suportes podem ser materiais orgânicos ou inorgânicos (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). No caso dos materiais orgânicos, o uso de suportes naturais como a celulose e seus derivados se destacam porque são de baixo custo, não tóxicas, renováveis, biodegradáveis e biocompatíveis (LIU; CHENG, 2016). As principais vantagens dos derivados esterificados da celulose são a facilidade de processamento e a possibilidade de ajuste do caráter hidrofílico/hidrofóbico através da modificação química da celulose.

Neste trabalho, foi preparado e caracterizado um biocatalisador pela imobilização da Lecitase Ultra® (LU) por adsorção física em triacetato de celulose (TAC). Esta enzima apresenta atividade fosfolipídica e lipídica e não existem trabalhos na literatura que apresentam a imobilização da LU em derivados acetilados da celulose. O TAC apresenta boa interação com substâncias hidrofóbicas, boa processabilidade na forma de filmes, membranas, micropartículas e na forma de pó (empregado neste trabalho), sendo um dos derivados mais importantes

comercialmente da celulose. Considerando a importância comercial destes sistemas, foi investigado o desempenho do sistema preparado na produção de biodiesel a partir do óleo de soja.

O estudo de fontes de matéria-prima, catalisadores, condições de reação, e todo o processo de produção de biodiesel cresceram nos últimos anos, assim como o estudo da catálise enzimática nas reações de transesterificação, como mostram dados de publicações entre os anos de 2010 a Novembro de 2017 (Figura 1.1), provando quão promissor é esse biocombustível e quantas variáveis e métodos podem ser propostos para seu avanço.

Figura 1.1 – Número de publicações entre os anos de 2010 e Novembro de 2017 encontradas na plataforma ScienceDirect sobre o termo “biodiesel”.



Fonte: A autora.

O biodiesel é uma das opções de biocombustíveis que vem sendo consolidada no Brasil como opção de substituição do óleo diesel. O uso de biodiesel ao invés do diesel mineral elimina totalmente o  $\text{SO}_2$ , a fuligem diminui em 60%, o monóxido de carbono e os hidrocarbonetos diminuem em 50%, os hidrocarbonetos poliaromáticos são reduzidos em mais de 70% e os gases aromáticos diminuem em 15% (BARNWAL; SHARMA, 2005).

A produção industrial do biodiesel no Brasil teve início em 2005, com volume aproximado de 700 mil litros. A Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, que determinava a presença de biodiesel no diesel em proporções crescentes ao longo dos anos foi decisiva para o

aumento da produção que chegou a 2,67 bilhões de litros em 2011, transformando o país no 2º maior produtor mundial de biocombustível da época (APROBIO, 2012). A proporção de biodiesel adicionada ao óleo diesel passou a ser de 6% a partir de Agosto de 2014 e de 7% a partir de Novembro de 2014, conforme a Lei nº 13.033/2014. A Lei nº 13.263/2016 alterou para 8% até março de 2017; 9%, em até março de 2018; e 10%, em até março de 2019 (BRASIL, 2016).

Em 2015, a capacidade nominal para produção de biodiesel no Brasil era de cerca de 7,4 milhões de m<sup>3</sup> (20,4 mil m<sup>3</sup>/dia). Entretanto, a produção nacional foi de 3,9 milhões de m<sup>3</sup>, o que correspondeu a 53,3% da capacidade total (ANP, 2016).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CELULOSE

A celulose é considerada uma fonte praticamente inesgotável sendo produzida pelas plantas, certas bactérias (PICHETH *et al.*, 2017), algas (CHEN *et al.*, 2016) e fungos. É um carboidrato polimérico gerado pela repetição de unidades de glicose, sendo uma molécula extensa de cadeia linear com grande número de grupos hidroxila (MELO, 2007).

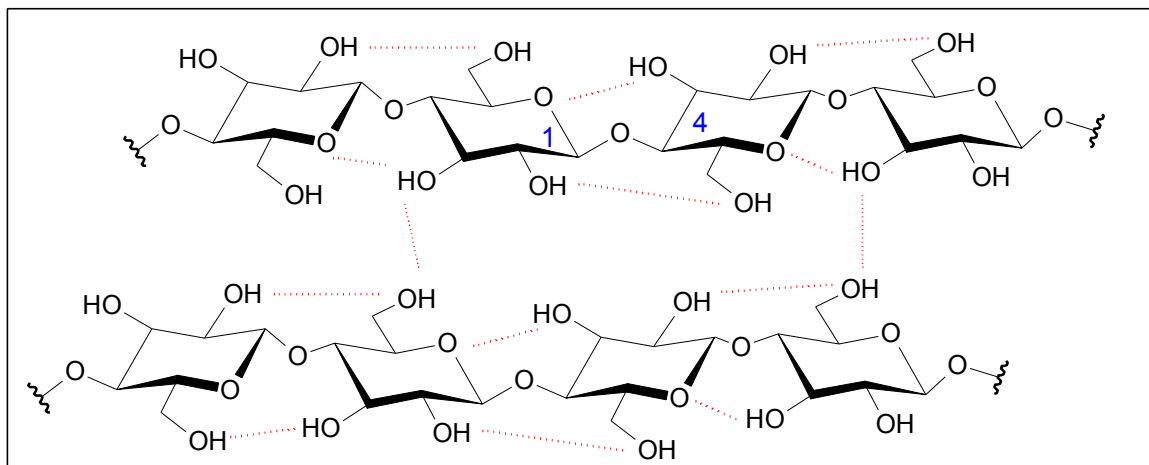
A celulose pode ser extraída de plantas, como madeiras diversas, sisal, algodão. Nas plantas, a celulose é encontrada junto com lignina e hemiceluloses. A lignina é uma macromolécula derivada de grupos fenilpropanóides, repetidos de forma irregular, que tem sua origem na polimerização desidrogenativa dos seguintes precursores primários: álcool trans-coniferílico, álcool trans-sinapílico e álcool trans-para-cumárico. A lignina une as fibras de vegetais lenhosos, agindo como um agente de endurecimento e barreira que impede a degradação da parede celular das plantas. A hemicelulose é constituída de uma mistura de açúcares ramificados e de baixo grau de polimerização. As unidades de açúcar mais comuns que constituem as hemiceluloses são:  $\beta$ -D-xilose,  $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-glicose,  $\alpha$ -L-arabinose,  $\alpha$ -D-galactose, ácido  $\beta$ -D-glucourônico, ácido  $\beta$ -D-galactourônico e ácido  $\alpha$ -D-4-O-metilglucourônico (GURGEL, 2007).

O processo de purificação da celulose de origem vegetal envolve a remoção de lignina, hemiceluloses e outras impurezas em condições controladas e que varia dependendo do tipo de planta (UMMARTYOTIN; MANUSPIYA, 2015). O processo de purificação da celulose mais difundido no Brasil é o processo Kraft. Esse processo envolve o cozimento de cavacos de madeira em uma solução de hidróxido de sódio e sulfeto de sódio em temperaturas em torno de 160 °C. Grande parte da lignina é removida após o processo, porém a lignina residual dá coloração escura à polpa sendo necessária uma etapa de branqueamento (NASCIMENTO, 2010).

Uma molécula de celulose é formada por unidades de anidro-glicose unidas por ligações covalentes entre átomos de C<sub>4</sub> e C<sub>1</sub>, ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. A celulose contém grupos hidroxila localizados nos átomos C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>6</sub>. Esses grupos, juntamente com os átomos de oxigênio do anel piranose e da ligação glicosídica, formam uma rede extensa de ligações de hidrogênio (Figura 2.1). Essa rede é formada tanto por ligações intra como intermoleculares. Enquanto as interações intramoleculares são responsáveis pela integridade e rigidez da cadeia

linear, as intermoleculares respondem pela estrutura cristalina e o arranjo macromolecular da celulose (CREDOU; BERTHELOT, 2014).

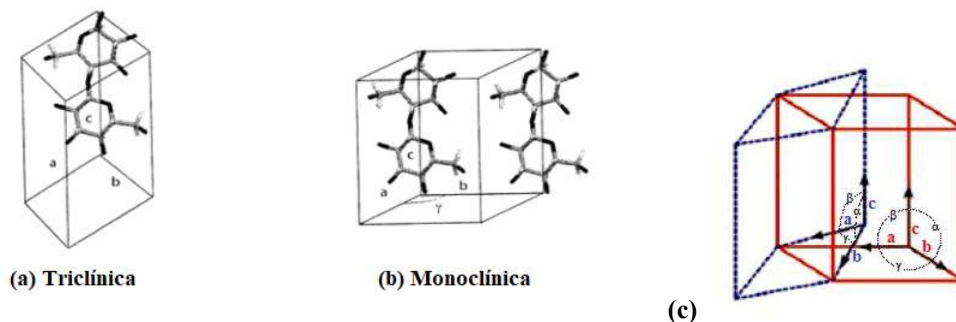
Figura 2.1- Representação da estrutura da celulose. As linhas pontilhadas representam ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares da celulose.



Fonte: A autora.

A celulose apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas) intermediadas por regiões menos ordenadas (regiões amorfas). As regiões amorfas são mais acessíveis ao ataque de reagentes, a adsorção de enzimas ou até mesmo a absorção da água. Nas regiões cristalinas existe um arranjo geométrico que se repete nos eixos principais da estrutura cristalina (cela unitária). Na celulose I (celulose nativa) são encontradas duas formas distintas:  $I\alpha$  e  $I\beta$ . O alomorfo  $I\alpha$  possui uma estrutura triclinica contendo somente uma cadeia por cela unitária, e a forma  $I\beta$  possui estrutura monoclinica, com duas cadeias de celulose por cela unitária (Figura 2.2). O grau de cristalinidade e as proporções dos polimorfos  $I\alpha$  e  $I\beta$  varia para cada fonte, mas em geral  $I\beta$  predomina em plantas enquanto  $I\alpha$  domina os organismos primitivos como algas e bactérias. Há ainda celulose II (obtida por regeneração ou mercerização), celulose III (preparada com amônia líquida a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou amina) e celulose IV (tratamento térmico de celulose II ou III em glicerol a  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (MITTAL *et al.*, 2011; WADA; HEUX; SUGIYAMA, 2004).

Figura 2.2 - Estruturas propostas para a celulose I (nativa): (a) Triclínica, I $\alpha$  (parâmetros de cela:  $a = 6,717 \text{ \AA}$ ,  $b = 5,962 \text{ \AA}$ ,  $c = 10,400 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 118.08^\circ$ ,  $\beta = 114.80^\circ$  e  $\gamma = 80.37^\circ$ ), e (b) Monoclínica, I $\beta$  (parâmetros de cela:  $a = 7,784 \text{ \AA}$ ,  $b = 8,201 \text{ \AA}$ ,  $c = 10,380 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = 90^\circ$  e  $\gamma = 96.5^\circ$ ); (c) orientação relativa das celas unitárias das estruturas I $\alpha$  (linha seccionada) e I $\beta$  (linha sólida).

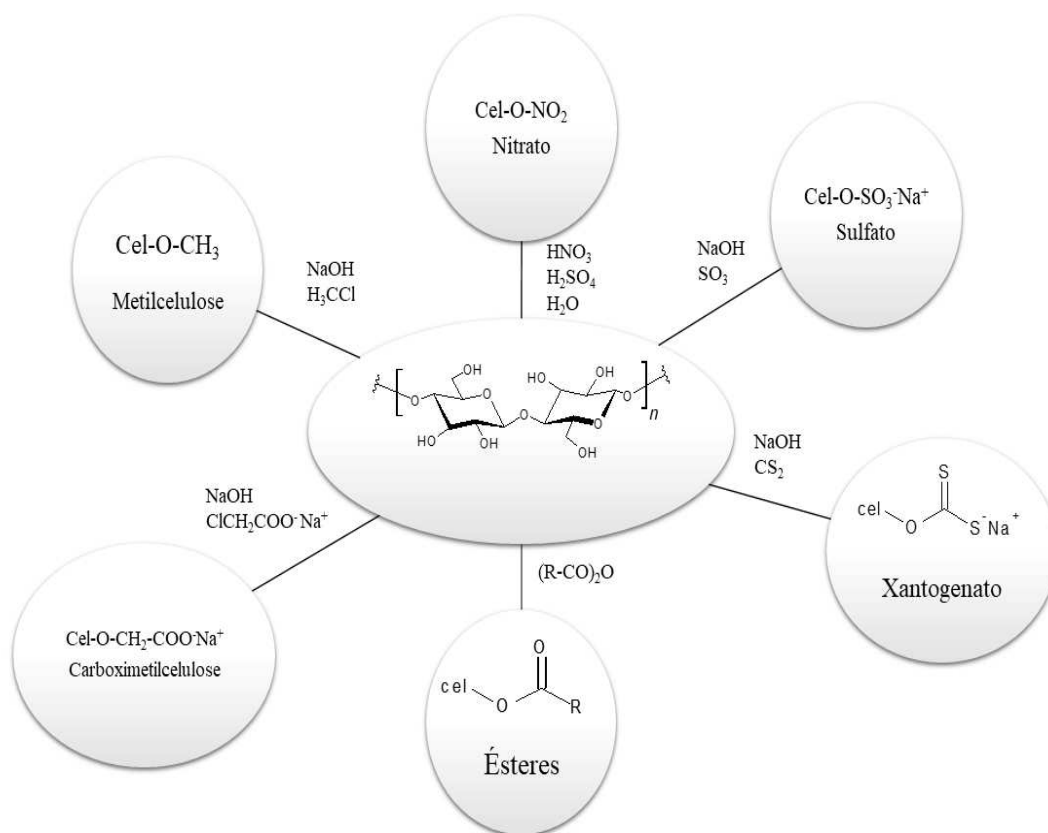


Fonte: Adaptado de Flauzino Neto (2012).

A celulose pode gerar vários compostos a partir de reações esquematizadas na Figura 2.3. Entre os principais produtos comerciais gerados a partir da celulose se destacam o nitrato de celulose, sulfato de celulose, xantogenato de celulose, metilcelulose, carboximetil celulose, e os ésteres orgânicos (acetato, propionato acetato, butirato acetato) de celulose (KLEMM *et al.*, 2015).



Figura 2.3 – Reações para obtenção dos principais produtos comerciais gerados a partir da celulose.



Fonte: Adaptado de Klemm *et al.* (2005).

Ésteres de celulose tem duas vantagens sobre a celulose: podem ser processados no estado fundido (a celulose degrada antes da fusão) e são mais solúveis que a celulose (insolúvel em água e vários solventes devido as interações de ligações de hidrogênio). Por isso, são muito aplicadas na indústria, especialmente acetato de celulose (CA), propionato acetato de celulose (CAP) e butirato acetato de celulose (CAB) (KOSAKA, 2007).

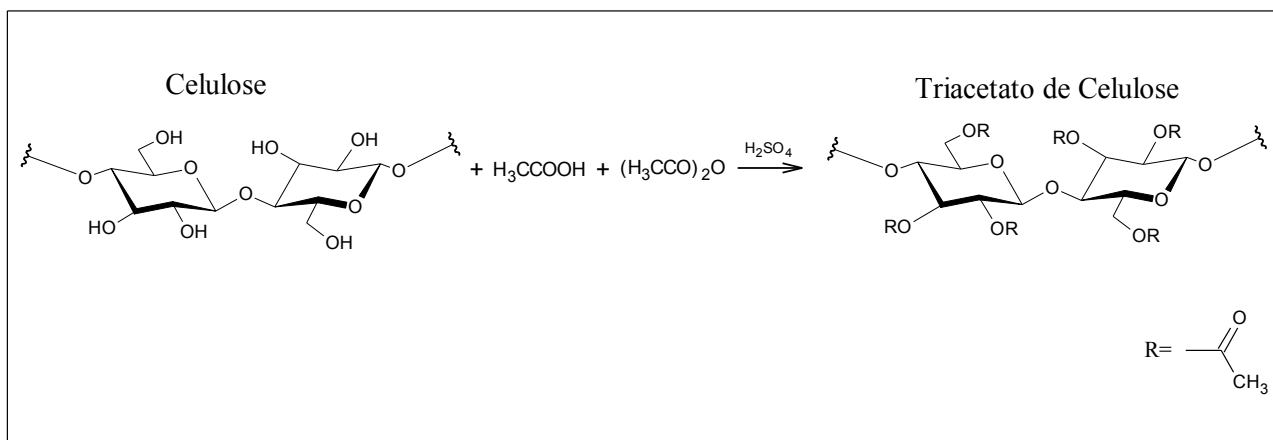
## 2.2 ACETATO DE CELULOSE

O acetato de celulose é um dos compostos derivados da celulose de grande importância comercial, sendo aplicado em fibras, plásticos, filmes fotográficos, filtros para cigarros, osmose (SILVA, J.C., 2015), separação de gases (LAM *et al.*, 2016), entre outros. Esse éster pode ser obtido por reação entre celulose, ácido acético (solvente) e anidrido acético, com ácido sulfúrico ou perclórico como catalisador. Essa reação pode ser do tipo homogênea ou heterogênea. A diferença entre os dois modos é que numa reação heterogênea o tolueno é utilizado como agente

não inchante e isso garante a manutenção da morfologia das fibras da celulose, fato que não é observado na rota homogênea (SASSI; CHANZY, 1995). O acetato de celulose pode ser obtido a partir de qualquer fonte celulósica, desde fontes com grande concentração de celulose como a algodão e celulose bacteriana (BARUD, *et al.*, 2008), de madeiras diversas após purificação incluindo processo Kraft (GOMIDE; FANTUZZI NETO; REGAZZI, 2010) até resíduos agroindustriais, quando purificados e extraída lignina e hemiceluloses (RIBEIRO, E., 2014; RIBEIRO, 2012; MEIRELES, 2007; CERQUEIRA, 2007; CRUZ, 2010; FERREIRA JÚNIOR, 2010).

A Figura 2.4 apresenta um esquema da reação de acetilação de celulose. O acetato é formado a partir da substituição dos grupos hidroxila de cada unidade de glicose por grupos acetila. O número médio de grupos acetila por unidades glicosídicas, ou grau de substituição (GS), pode ser variado de 0, no caso da celulose, a 3 no caso do triacetato. Entre 2,0-2,5 caracteriza-se o acetato como diacetato de celulose e GS acima de 2,7 caracteriza o material obtido como triacetato de celulose (MEIRELES, 2007).

Figura 2.4 – Reação de acetilação homogênea da celulose.



Fonte: Ribeiro (2012).

Segundo Zhou *et al.* (2016) a acetilação de celulose altera drasticamente as características da superfície do produto alterando o caráter fortemente hidrofílico da celulose com a diminuição da polaridade da celulose. À medida que o grau de substituição é aumentado, há um aumento consistente no caráter hidrofóbico do material obtido.

O Grupo de Reciclagem de Polímeros do IQUFU realiza vários estudos sobre derivados celulósicos, como o acetato de celulose e a metilcelulose (VIEIRA *et al.*, 2009; FERREIRA JÚNIOR *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010; CRUZ *et al.*, 2011; RODRIGUES FILHO *et al.*,

2011; VIEIRA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Recentemente, membranas de triacetato de celulose obtido a partir do bagaço da cana de açúcar foram utilizadas como material muco adesivo para liberação controlada de fármacos. Uma membrana simétrica com 6,5% TAC foi selecionada para o revestimento de partículas de goma gelana que incorporavam cetoprofeno. A membrana apresentou baixos valores para a digestão enzimática, permeabilidade ao vapor de água, dissolução e inchaço, força mucoadesiva, e liberação controlada, mostrando seu potencial para proteger produtos farmacêuticos (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Polímeros, incluindo acetato de celulose vem sendo utilizado como suporte para imobilização de enzimas há anos (ANSARI *et al.*, 2014; GUO; WANG; SONG, 2004; HUANG *et al.*, 2017; KUROKAWA *et al.*, 1994; LAHMAR *et al.*, 2017; RAUF *et al.*, 2006; SARBU *et al.*, 2006; YILDIZ; AKYILMAZ; DINÇKAYA, 2004). A celulose e seus derivados são boas matrizes para imobilização enzimática devido à sua boa interação com enzimas, biodegradabilidade, bioatividade e baixo risco de contaminação para o meio ambiente (LIU; CHEN, 2016).

### 2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Catalisadores, inclusive enzimas, diminuem a energia de ativação da reação e aumentam a velocidade de reação sem se consumirem substancialmente durante o processo e por definição, devem ser recicláveis. Catalisadores podem ser homogêneos quando estão na mesma fase dos reagentes ou heterogêneos, quando estão em fases diferentes. Se um catalisador é dissolvido no meio reacional, é impossível retê-lo, muito menos reutilizá-lo. A imobilização de um catalisador pode ser uma via direta para permitir a reciclagem do mesmo (HANEFELD; GARDOSSEI; MAGNER, 2009). Zhang *et al.* (2011) destacaram as diferenças entre enzimas imobilizadas e enzimas livres, conforme Tabela 2.1.

Fatores como custo e estabilidade limitam o uso dos processos enzimáticos. A imobilização de enzimas é uma técnica que permite o reuso do biocatalisador, a separação do meio reacional mais eficiente, reduz problemas em emissão de efluentes, é muitas vezes capaz de aumentar a atividade das enzimas (BARON, 2008; AMINI *et al.*, 2016).

Tabela 2.1 – Comparação entre enzima livre e imobilizada.

Características	Enzima livre	Enzima Imobilizada
Preço	Alto	Baixo
Eficiência	Baixa	Alta
Atividade	Instável	Estável
Reuso e reaproveitamento	Impossível	Possível
Tolerância a temperatura, pH, solvente, outros.	Baixa	Alta
Separação do substrato	Difícil	Fácil
Separação do produto	Difícil	Fácil

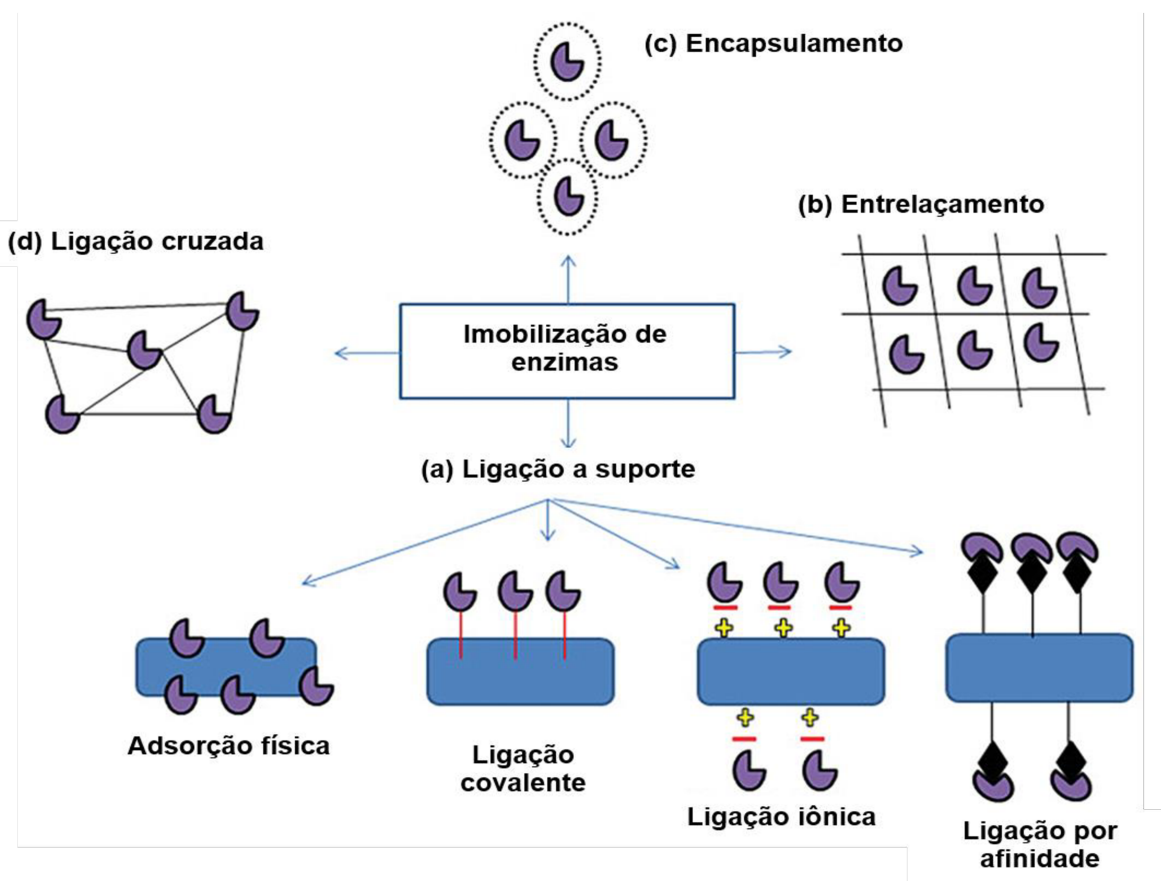
Fonte: Zhang *et al.* (2011).

Rodrigues *et al.* (2013) afirmam em seu trabalho que a imobilização de enzimas melhora sua atividade por vários motivos. Primeiramente, a imobilização evita que haja queda de atividade por agregação das moléculas enzimáticas, o que acontece no caso da enzima livre, que sofre severamente problemas de difusão. Outro fator é a inibição enzimática por substrato ou por algum produto de reação, minimizada para enzimas imobilizadas. A estabilidade em um pH diferente da condição ótima também é citada como uma consequência da imobilização. A provável “rigidez” que esse processo traz à enzima minimizando mudanças de conformação é um fator que colabora para a manutenção de sua atividade enzimática ao longo das reações, inclusive podendo ser utilizada em condições mais drásticas. A imobilização de enzimas também pode aumentar a seletividade das proteínas. O uso de diferentes protocolos de imobilização possibilita configurações diferentes de rigidez e distorção da enzima e propriedades físicas diferentes (PALOMO *et al.*, 2005b; VELASCO-LOZANO *et al.*, 2016 ; YOUSEFI; MOHAMMADI; HABIBI, 2014). Além disso, a imobilização de enzimas pode minimizar os efeitos de inibição, distorção ou bloqueio do centro ativo das enzimas e redução da inibição causada por algum substrato, componente do meio ou produto da reação (MATEO *et al.*, 2007).

A imobilização de enzimas pode acontecer de várias formas: adsorção física, encapsulamento, ligação iônica, ligação covalente, ligação cruzada, dentre outras (Figura 2.5) (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004), ou ainda por combinação de técnicas. Recentemente, imobilizou-se lipase em diatomita por adsorção e por entrelaçamento em alginato, combinando mais de um tipo de imobilização (ZHAO *et al.*, 2017). Outros trabalhos recentes aplicam a combinação da adsorção física, que favorece um mecanismo peculiar das lipases, com ligações covalentes (GARMROODI *et al.*, 2016; TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2017).

A adsorção é o método mais utilizado e útil, especialmente por ser um processo fácil e barato. Encontrar a combinação certa de suporte e enzima continua sendo o desafio, geralmente feito por métodos de tentativa. A natureza química do material, o tamanho da partícula, porosidade e área superficial influenciam na forma como a enzima interage com o suporte (NIGAN *et al.*, 2014). Esse tipo de interação é feito entre suporte e enzima a partir de interações do tipo van der Waals, dipolo e ligações de hidrogênio. A ligação é relativamente fraca, porém não causa mudança na estrutura original da enzima. Isso previne que os sítios ativos das enzimas tenham mudanças conformacionais e aconteça queda de atividade (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

Figura 2.5- Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Sankaran, Show e Chang (2016).

Diversos suportes são utilizados na imobilização de enzimas: suporte inorgânicos como sílicas, ouro, nanopartículas de zircônia, alumina, mica, hidroxiapatita, entre outros; suportes orgânicos: quitosana, alginato de cálcio, agarose, polímeros como polivinil álcool, polipropileno, poliestireno, gelatina, pectina, amido, entre outros (DATTA; CHRISTENA;

RAJARAM, 2012). Dentro dos suportes orgânicos, destacam-se os polissacarídeos naturais, como resíduos agroindustriais (ITTRAT *et al.*, 2014), celulose (HUANG *et al.*, 2011), acetato de celulose, acetato de propionato, acetato de butirato (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014). Geralmente, usa-se suportes hidrofóbicos para imobilizar lipases por adsorção física, pois se assemelham aos substratos, com baixa força iônica, permitindo a lipase se imobilizar facilmente sobre estes suportes (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998).

Vários suportes comerciais são estudados ao longo dos anos para imobilização de lipases para diversas aplicações, incluindo produção de biodiesel. Novozyme® 435 consiste de uma resina acrílica com lipase de *Candida antartica* amplamente aplicada em estudos para produção de biodiesel partindo de óleo residual (HAIGH *et al.*, 2014), óleos vegetais como de girassol, soja e oliva (HERNÁNDEZ-MARTÍN; OTERO, 2008), microalgas (LÓPEZ *et al.*, 2015). Esse suporte também vem sendo utilizado em estudos de produção de biodiesel utilizando etanol (CERVERÓ; ÁLVAREZ; LUQUE, 2014; VERDASCO-MARTÍN *et al.*, 2016). Lipozyme® RM IM também é uma enzima comercial muito utilizada pelos pesquisadores para produção de biodiesel partindo de óleo de Palma (MANURUNG *et al.*, 2015) de *Jatropha* (UNGCHAROENWIWAT; CANYUK; H-KITTIKUN, 2016). Várias outras opções são encontradas como a Novozym® 40086, que é estereoseletiva em reações de hidrólise de ésteres e transesterificação; lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Immobead 150; lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em Immobead 150; lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em Sol-Gel-AK; Amano Lipase PS-C II (imobilizada em cerâmica). Esse tipo de suporte tem preços variáveis, custando os mais baratos a partir de R\$500,00/g (NOVOZYMES, 2017; SIGMA-ALDRICH, 2017).

Em contrapartida ao uso de suportes comerciais, o desenvolvimento ou modificação de suportes para imobilização de enzimas é uma opção que pode minimizar custos, ou mesmo otimizar condições de reação dependentes da atividade enzimática.

Basso, Hesseler e Serban (2016) desenvolveram recentemente resinas metacrílicas funcionalizadas de octadecil (OD) para imobilização de lipases. O efeito da densidade do grupo OD sobre o desempenho da enzima é muito forte: um aumento de cinco vezes na densidade do grupo funcional dá um aumento na atividade enzimática de 65%. Isto confirma o fato de que um aumento gradual das propriedades hidrofóbicas das resinas permite uma melhor ativação da lipase durante o processo de imobilização, aumentando a probabilidade de colisão entre o substrato e a enzima.

Kim e colaboradores (2015) utilizaram nanocristais de celulose de linter de algodão e celulose bacteriana como suportes para imobilizar lipase de *Candida rugosa*. A lipase imobilizada em celulose de linter de algodão mostrou estabilidade térmica significativamente melhor e tempo de meia-vida durante a incubação a 60 °C 27 vezes superior ao da lipase livre. A lipase imobilizada também mostrou uma estabilidade de pH maior em pHs alcalinos.

A enzima lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada com êxito em fibras de 100-500 nm de álcool polivinílico por Wang e Hsieh (2008). As fibras bicomponentes carregadas de lipase exibiram uma atividade muito superior à enzima bruta após exposições a temperaturas e humidade elevadas.

Badgujar e Bhanage (2014) imobilizaram lipase de *Pseudomonas cepacia* em uma mistura de ácido polilático, quitosana e álcool polivinílico. O ensaio de atividade de lipase mostrou atividade aumentada de lipase imobilizada em relação à lipase bruta. Estudou-se estabilidade em solvente e foi encontrado maior tempo de meia-vida e menor constante de taxa de desativação para o n-hexano. O estudo cinético mostrou que a energia de ativação ( $E_a$ ) para a lipase imobilizada (13,76 kCal / mol) foi menor do que para a lipase bruta (19,9 kCal / mol), indicando uma melhor eficiência catalítica da lipase imobilizada. O biocatalisador imobilizado foi reciclado cinco vezes.

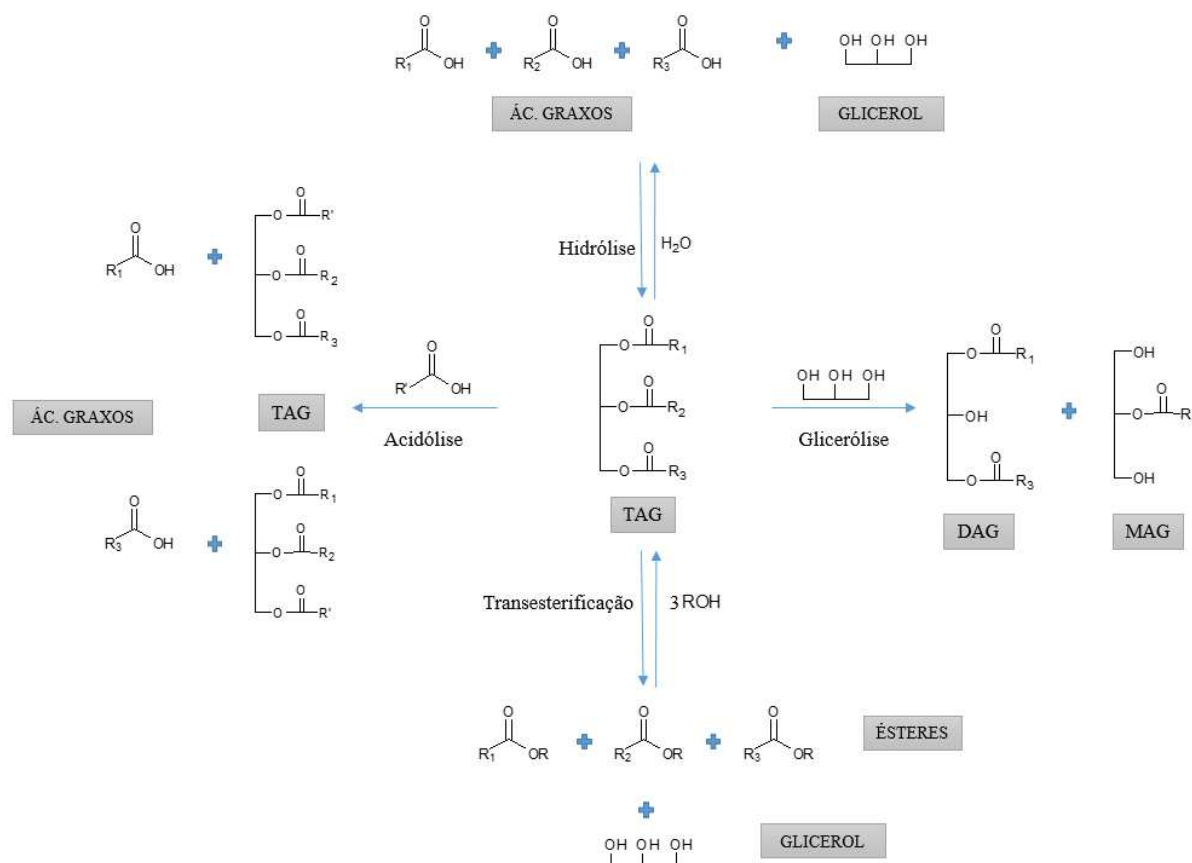
Kosaka (2007) estudou a imobilização de lipase em filmes de ésteres de celulose. Foram preparadas blendas de polietileno maleado, butirato acetato de celulose, acetato de celulose e propionato acetato de celulose. Observou-se que a adsorção de enzimas em filmes de acetato de celulose e propionato acetato de celulose com recozimento foi maior que nos mesmos filmes sem recozimento. Além disso, o autor concluiu que a atividade enzimática da lipase imobilizada em suportes hidrofóbicos apresentou atividade maior que a enzima na forma livre e manteve altos valores por três usos. A lipase imobilizada sobre filmes mais hidrofóbicos manteve 70% da sua atividade e a imobilizada sobre filmes hidrofílicos manteve apenas 30% da atividade, indicando que a preservação da estrutura conformacional da enzima foi favorecida pela hidrofobicidade do suporte e interações entre os resíduos polares da lipase e as partes de glucopiranosil dos ésteres de celulose.

### 2.3.1 Lipases

As Lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C 3.1.1.3) podem participar de várias reações industrialmente importantes como esterificação e transesterificação (alcoólise e acidólise)

(Figura 2.6). Por isso são usadas como catalisadores em processos de produção de alimentos, detergentes, indústria farmacêutica, de papel, cosméticos e síntese de produtos químicos em geral (GULDHE *et al.*, 2015). Em geral, as lipases tem alta atividade catalítica em solventes orgânicos, estereoseletividade e possibilidade de utilização em larga escala de temperatura (20 a 70 °C), por isso são muito utilizadas em meios não-aquosos ou aquo-restritos (PILISSÃO; NASCIMENTO, 2006). Como qualquer tipo de enzima, as lipases têm suas condições ótimas de trabalho: temperatura ótima, pH ótimo, tempo de reação. A temperatura ideal de trabalho para lipases geralmente varia entre 30 e 55 °C. O pH é outra variável importante pois pode afetar as taxas de reações catalisadas por lipases, devendo ser estudado para cada tipo de enzima.

Figura 2.6 – Diferentes reações catalisadas por lipase onde R', R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> são diferentes grupos alquil; TAG: triacilglicerídeos, DAG: diacilglicerídeos, MAG: monoacilglicerídeos.



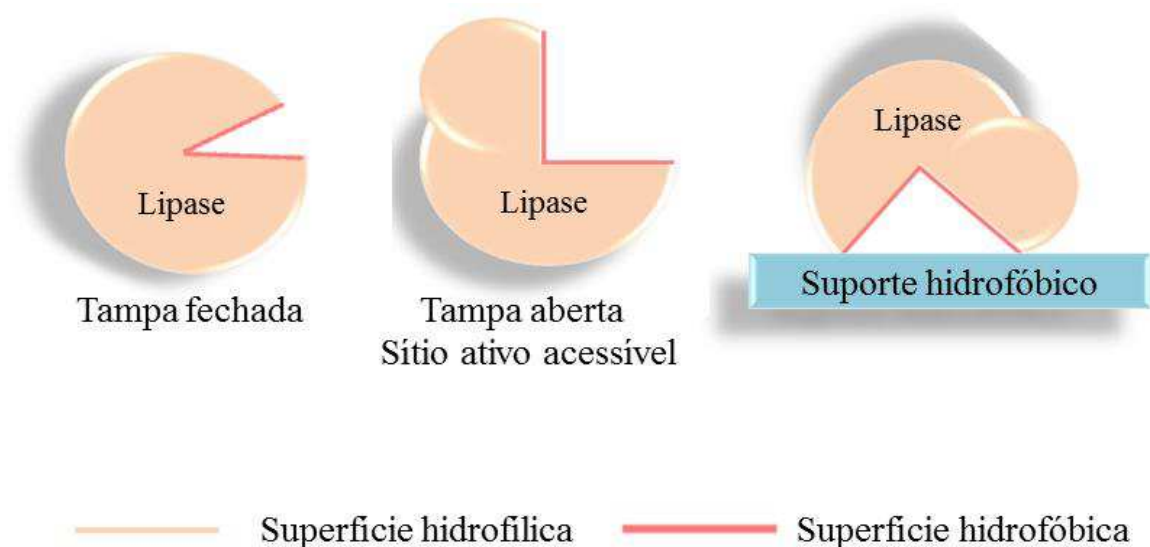
Fonte: Adaptado de Castro *et al.* (2004).

As lipases são conhecidas como hidrolases que catalisam a hidrólise de triglicerídeos a glicerol e ácidos graxos livres em interface água óleo. Um fato interessante sobre esta enzima



é que, enquanto os seus substratos são lípidios hidrofóbicos, ela é solúvel em água. Por isso, pressupõe-se que na sua maioria ela é hidrofílica e que o sítio catalítico está escondido dentro da estrutura desta proteína monomérica, sendo exposto na interface lípidio-água. Esse recurso é chamado de ativação interfacial. Este mecanismo, esquematizado na Figura 2.7, sugere a presença de uma tampa que, quando fechada cobre o sítio catalítico (tríade de serina, histidina aspartato) que faz a enzima inativa, mas na presença da interface, sofre uma mudança conformacional e se abre para revelar o local ativo (EGGERT *et al.*, 2002). Aplicando um suporte hidrofóbico como suporte para lipases, que se assemelham à superfície das gotas de substratos, em meio de baixa força iônica, as enzimas tornam-se seletivamente imobilizadas nesses suportes. Outras proteínas solúveis em água não são adsorvidas no suporte sob estas condições. As enzimas imobilizadas geralmente exibem uma atividade enzimática significativamente aumentada pela ativação interfacial (hiperativação) (MILED *et al.*, 2001; PALOMO *et al.*, 2002).

Figura 2.7 – Representação do mecanismo de ativação interfacial das lipases.



Fonte: Hanefeld; Gardossi; Magner (2009).

Por causa dessa estrutura, as lipases são capazes de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. O fato de poderem ser utilizadas para vários substratos, com estabilidade em diferentes condições de temperatura, pH, por resistirem a presença de solventes orgânicos, e a sua quimio-regio e enantioseletividade, fazem dessa enzima muito utilizada em várias aplicações (RIGO, 2009).

Lipases podem ser produzidas por uma grande quantidade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras e plantas (MOUNGUENGUI *et al.*, 2013). Muitos autores reportam os procedimentos de isolamento, purificação de lipases e a influência da composição do meio de cultura na produção da enzima. Segundo Guldhe *et al.* (2015), as lipases não específicas de *Candida antartica*, *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* e *Pseudomonas fluoresces* e as 1,3-específicas de *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* e *Rhizomucor miehei* são as mais comumente utilizadas para produção de biodiesel. A Tabela 2.2 apresenta alguns trabalhos recentes relatando produção de biodiesel com catálise enzimática e seus substratos, rendimentos e origem das lipases.

As lipases podem ser divididas em três tipos com relação à especificidade: *sn*-1,3-específicas (hidrolisam as ligações ésteres nas posições R<sub>1</sub> ou R<sub>3</sub> nos triglicerídeos); *sn*-2-específicas (hidrolisam as ligações ésteres nas posições R<sub>2</sub> dos triglicerídeos) e as não específicas (não distinguem posições das ligações ésteres) (ANTCZAK *et al.*, 2009).

Apesar da regioespecificidade ser algo que coloca em dúvida o uso de lipases específicas para produção de biodiesel, algumas enzimas *sn*-1,3-específicas catalisaram reações de transesterificação com rendimentos maiores que o teórico (66%), sugerindo que acontece migração do resíduo acil da posição *sn*-2 para posições terminais no glicerol (DU *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2010; WANG; WU; ZONG, 2008).

Tabela 2.2 – Diferentes origens de lipases e substratos utilizados para produção de biodiesel.

Origem da Lipase	Substrato	Rendimento	Referência
------------------	-----------	------------	------------

<i>Alcaligenes sp</i>	Óleo de canola	80%	SOLER; ILLANES; WILSON, 2016
<i>Burkholderia Cepacia</i>	Óleo de babaçu	100%	RÓS <i>et al.</i> , 2014
<i>Callera Trans L</i>	Óleo de soja cru	>95%	CESARINI <i>et al.</i> , 2014
<i>Candida rugosa</i>	Óleo de mamona	95%	SILVA, J. A., <i>et al.</i> , 2015
Novozym 435 ( <i>Candida antarctica lipase B</i> )	Resíduos de óleo de fritura	>80%	AZÓCAR <i>et al.</i> , 2014
Novozyme-435	Óleo de palma	70%	MAGALHÃES; PESSOA; ALVES, 2015
Novozyme-435 e <i>Aspergillus niger</i>	Óleo de rúcula	98,3% e 56,4%	MUMTAZ <i>et al.</i> , 2016
<i>Penicillium expansum</i> e Novozym 435	Óleo da semente de <i>Millettia pinnata</i>	93,5%	HUANG <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo residual	47%	LOPRESTO <i>et al.</i> , 2015
<i>Rhizopus Oryzae</i>	Óleo de seringueira	33%	VIPIN <i>et al.</i> , 2016

Fonte: A autora.

Du *et al.* (2005) estudaram os fatores que influenciavam a migração do resíduo acil dos triglicerídeos quando utilizada a enzima Lipozyme TL. Durante a transesterificação catalisada por Lipozyme TL imobilizada, concluíram que a migração de grupo acil ocorreu e mais de 90% de rendimento de biodiesel foi alcançado com 10% de lipase imobilizada para a metanólise. O suporte utilizado, gel de sílica, foi o principal fator que acelerou a migração de grupo acil e mais de 90% de biodiesel foi obtido quando 6% de gel de sílica e 4% de lipase imobilizada foram utilizados.

A combinação de lipases, para combinar propriedades específicas de cada tipo, tem sido proposta por alguns pesquisadores. A hidrólise do óleo de soja foi avaliada utilizando como biocatalisadores Novozym 435 (CALB), Lipozyme IM-TL (TLL), e Lipozyme IM-RM (RML).

Os resultados mostraram que, embora individualmente TLL foi a enzima mais ativa, e que CALB foi a menos ativa, a combinação de 80% de RML e 20% de CALB foi o melhor biocatalisador. Os parâmetros da reação foram otimizados, permitindo a obtenção de mais do que 80% de hidrólise em 24 h, usando a combinação, contra menos de 50% com qualquer lipase utilizada individualmente. Observou-se também a possibilidade de reutilizar a combinação de lipases, pelo menos, 15 ciclos sem qualquer diminuição significativa (ALVES, *et al.*, 2014).

Poppe *et al.* (2015) avaliaram a transesterificação enzimática de óleos de azeite e palma utilizando também Novozym 435 (CALB), Lipozyme TL-IM (TLL) e Lipozyme RM-IM (RML). Para o óleo de oliva, a combinação de 29,0% de TLL, 12,5% de RML, e 58,5% de CALB permitiu uma eficiência de conversão de 95% em 18 h de reação, superior aos 50% para obtidos para CALB, melhor resultado de enzima na forma individual. Para o óleo de palma, a melhor combinação de enzima foi de 52,5% de TLL e 47,5% de RML, resultando em 80% de conversão de ésteres de etila em 18 horas, em comparação com apenas 44% quando foi usada TLL independente. As misturas de enzimas puderam ser utilizadas para, pelo menos, sete ciclos mantendo mais que 80% da atividade inicial.

### 2.3.1.1 Lecitase ultra®

Lecitase Ultra® é uma fosfolipase artificial desenvolvida principalmente para processos de degomagem (LIU *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2016). Esta enzima é obtida a partir da fusão dos genes da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (para se obter uma boa estabilidade) e da fosfolipase *Fusarium oxysporum* (para obter a atividade de fosfolipase). Em alguns aspectos, comporta-se como uma lipase padrão, com a capacidade de se tornar adsorvidos em superfícies hidrofóbicas em baixa força iônica, e apresentar uma ampla especificidade (SANTOS *et al.*, 2014). Esta enzima é conhecida por possuir regioespecificidade *Sn-1,3* em relação aos triacilgliceróis (WANG *et al.*, 2010).

Yang e colaboradores (2006) observaram pH ótimo entre 5 e 6 e temperatura ótima em torno de 40 °C para atividade de Lecitase Ultra®. No processo de degomagem, a sua ação em hidrolisar fosfolípidios predominou e não houve hidrólise de triglicerídeos no processo realizado em óleo de colza a 50 °C.

Wang *et al.* (2010) estudaram a hidrólise parcial do óleo de soja catalisada pela Lecitase Ultra® em sistema livre de solvente. A enzima apresentou boa estabilidade em pHs entre 4,7 e 7,4 e temperaturas inferiores a 60 °C. As condições ótimas de pH e temperatura para a hidrólise

enzimática parcial do óleo de soja foram de 6,8 e 40 °C, respectivamente. Os experimentos foram conduzidos a partir da mistura de 50 g de óleo e 0,1 mL de enzima em 20 g de água por 8 h a uma agitação de 150 rpm.

Liu *et al.* (2012) imobilizaram LU para produção de diacilgliceróis a partir do óleo de soja. A enzima foi imobilizada por adsorção em resina macroporosa apresentando atividade enzimática de 1682 U/g. Os autores obtiveram 53,7% de diacilgliceróis (% massa) em sistema isento de solvente, por 12h, sob condições ótimas. A reutilização da enzima imobilizada foi possível por 28 ciclos consecutivos. Além disso, observou-se especificidade *Sn-1,3* para as reações.

Gonçalves *et al.* (2013) estudaram a imobilização da LU em Amberlite XAD2 e XAD4, por adsorção física sob irradiação ultrassom, para produção de monoacilgliceróis. Os resultados indicaram que a enzima imobilizada é capaz de converter entre 50 e 60% de resíduo alimentar de óleo de palma em monoacilgliceróis. Os autores concluíram que para os suportes utilizados a imobilização em meio orgânico estabiliza a enzima.

Lecitase ultra® tem sido também utilizada em reações enantioseletivas (MISHRA *et al.*, 2009; MISHRA *et al.*, 2011) e na produção de biodiesel (HIRATA *et al.*, 2016; TACIAS-PASCACIO *et al.* 2017). Também são encontrados na literatura estudos sobre a imobilização desta enzima, e a busca de melhoria da estabilidade e atividade dessa fosfolipase (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2014).

Hirata *et al.*, 2016 imobilizaram LU em octil agarose e em octil glioxil agarose e aplicaram o biocatalisador em reações de transesterificação de tributirina. Para ambos os suportes foram obtidos aproximadamente 55 mM de ésteres metílicos e 31 mM de ésteres etílicos. Isopropanol não foi reconhecido como nucleófilo pelos biocatalisadores avaliados neste trabalho.

Tacias-Pascacio *et al.* (2017) avaliaram a produção de biodiesel a partir de óleo de cozinha residual com LU imobilizada em vários suportes: estireno macroporoso, estireno metacrilato, octadecil metacrilato, DVB metacrilato e octadecil metacrilato, na ausência de solvente, e com *n*-hexano e *tert*-butanol. As maiores porcentagens de ésteres foram obtidas para sistemas com *tert*-butanol, chegando a 61% quando LU foi imobilizada em octadecil metacrilato. Adicionando *n*-hexano como solvente do meio reacional, as maiores porcentagens de ésteres (11%) foram obtidas utilizando estireno macroporoso e octadecil metacrilato como suportes de LU.

Nenhuma referência foi encontrada na literatura para imobilização de LU em suportes celulósicos ou derivados acetilados.

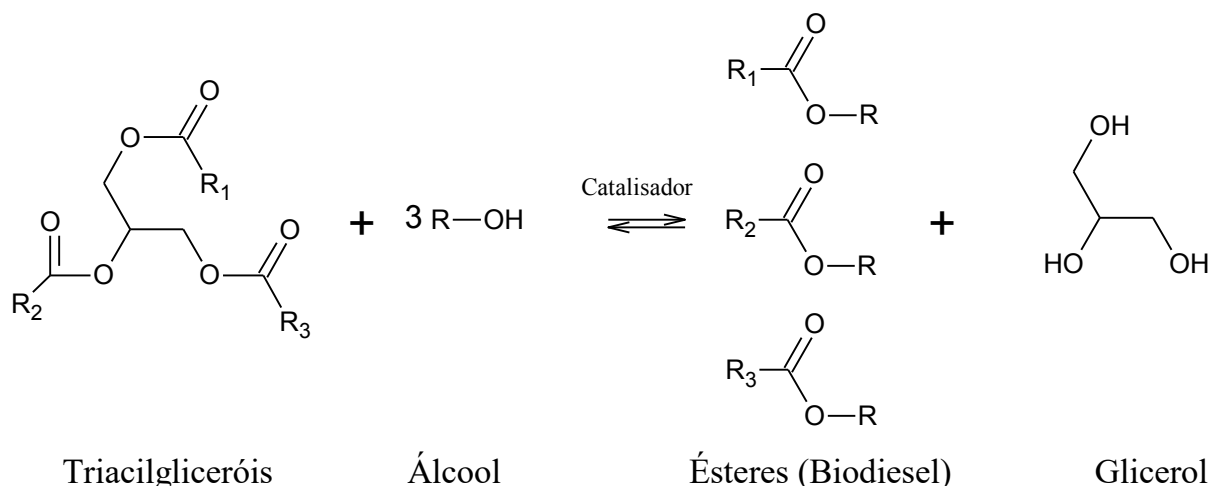
## 2.4 BIODIESEL

De acordo com a definição constante na resolução ANP no 7 de 19/03/2008, o biodiesel é um combustível derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais. O biodiesel pode ser produzido tanto por reação de transesterificação ou por esterificação. Em ambas as reações, há a participação de um álcool de cadeia curta para a obtenção dos ésteres podendo ser empregado o metanol (rota metílica) e o etanol (rota etílica).

O processo de transesterificação de óleos vegetais ou animais para a produção de biodiesel é um método muito popular. Como o biodiesel obtido por transesterificação tem características análogas às do óleo fóssil, pode ser utilizado como combustível sem prejuízo aos motores a diesel (MEHER; VIDYASAGAR; NAIK, 2006).

Na transesterificação de óleos vegetais, um triacilglicerídeo reage com um álcool na presença de catalisador, produzindo uma mistura de ésteres de ácidos graxos e glicerol, conforme esquematizado na Figura 2.8. Para uma transesterificação estequiometricamente completa, uma proporção molar 3:1 de álcool por triacilglicerídeo é necessária. Entretanto, devido ao caráter reversível da reação, o álcool geralmente é adicionado em excesso contribuindo, assim, para aumentar o rendimento do éster, bem como permitir a sua separação do glicerol formado (GERIS, 2007).

Figura 2.8 – Reação de transesterificação de óleo a biodiesel.



Fonte: A autora.

Existem várias matérias-primas potenciais para produção de biodiesel. O óleo de soja é a principal matéria-prima para a produção de biodiesel no Brasil, equivalente a 77,7% do total. A segunda matéria-prima é a gordura animal (18,8% do total) seguida pelo óleo de algodão (2% do total) e outros materiais graxos com 1,5% de participação (ANP, 2016).

A Tabela 2.3 descreve algumas fontes utilizadas para a produção de biodiesel. Os óleos não comestíveis são matérias-primas vistas como o futuro das fontes de produção de biodiesel, pois podem ser obtidos a partir de plantas cultivadas em terrenos baldios, em áreas remotas e florestas. Além disso, podem ser cultivadas em limites dos campos agrícolas, canais de irrigação entre outros pequenos espaços (VERMA; SHARMA, 2016). Apesar dos óleos não comestíveis serem promissores, especialmente em regiões que tem escassez na produção de alimentos, vários autores utilizam em suas pesquisas óleo de soja para produção de biodiesel (VEIGA; VELOSO; HENRIQUES, 2016; SANTÓRIO; VELOSO; HENRIQUES, 2016; BASHIRI; POURBEIRAM, 2016; PALACIOS-NEREO *et al.*, 2016; MO *et al.*, 2016; PRETTO; TARDIOLI; COSTA, 2016).

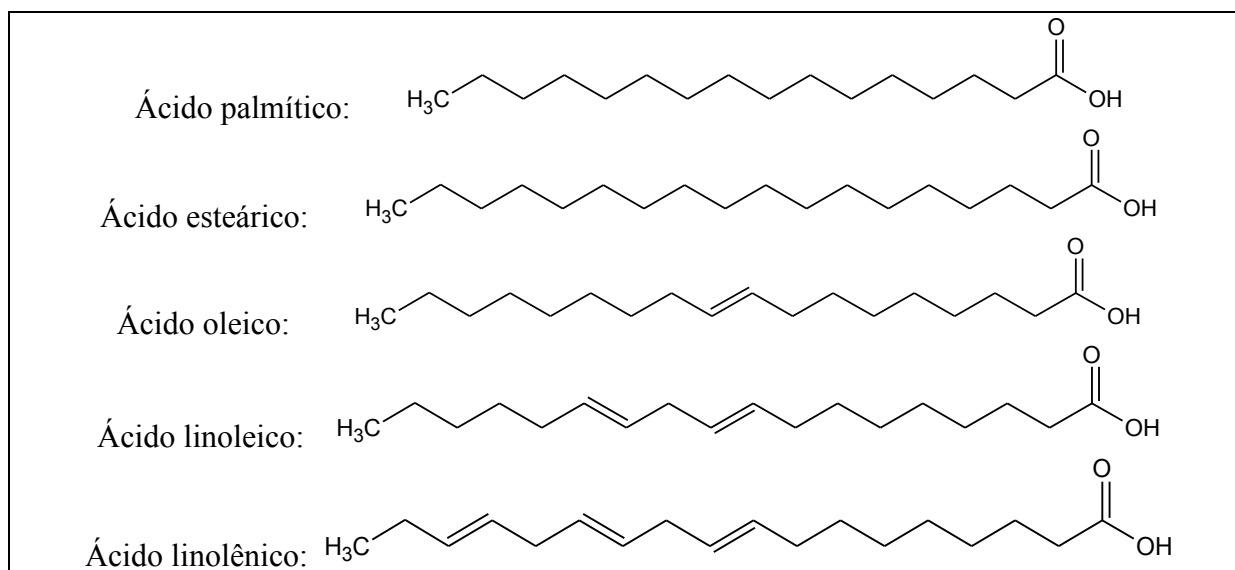
Tabela 2.3 – Matérias-primas para produção e biodiesel.

Óleos comestíveis	Óleos não-comestíveis	Outras fontes
Óleo de algodão	Óleo de Jatropha	Microalgas
Óleo de coco	Óleo de Karanja	Alga <i>Spirulina platensis</i>
Óleo de girassol	Óleo de Mahua	Óleo de cozinha usado
Óleo de canola	Óleo de Neem	Gorduras animais
Óleo de soja	Óleo de eucalipto	Sebo bovino
Óleo de mamona	Linhaça	Gordura de aves
Óleo mostarda		Óleo de peixe
Óleo de amendoim		Gordura de frango
Óleo de palma		Microalgas <i>Chlorella protothecoides</i>
Óleo de colza		

Fonte: Verma; Sharma (2016).

Gorduras animais e vegetais são constituídas de ésteres de ácidos graxos. Os principais componentes do óleo de soja são ésteres derivados de ácido palmítico (7-14%), ácido esteárico (1,4-5,5%), ácido oleico (19-30%), ácido linoleico (44-62%) e ácido linolênico (4-11%), que tem suas estruturas representadas na Figura 2.9 (AARTHY *et al.*, 2014).

Figura 2.9 – Cadeiras de ácidos graxos predominantes no óleo de soja.

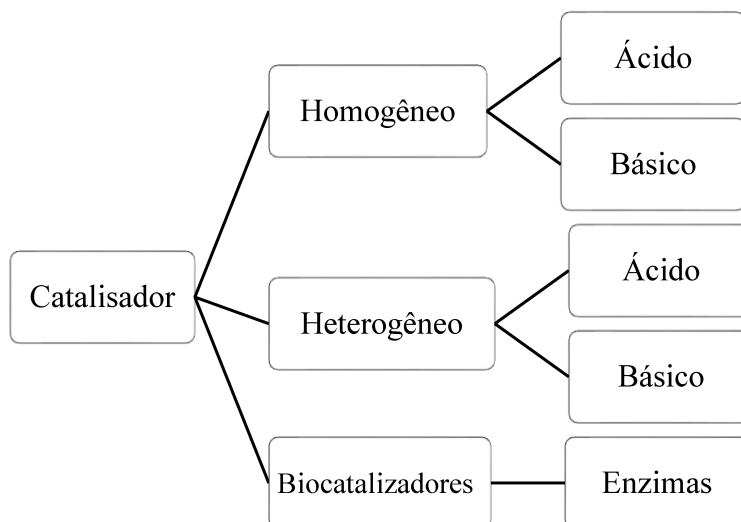


Fonte: A autora.



A produção de biodiesel, realizada através do processo de reação de transesterificação, é facilitada por catalisadores. O único caso em que o uso de catalisador não é necessário para a síntese de biodiesel é quando o álcool e óleo são usados em condições supercríticas. A seleção de catalisador adequado depende da quantidade de ácidos graxos livres no óleo. Os catalisadores podem ser geralmente classificados em homogêneos e heterogêneos ou biocatalisadores, conforme fluxograma (Figura 2.10). Catalisadores básicos podem ser subdivididos com base no tipo de hidróxidos, óxidos de metais e seus derivados. Da mesma forma, catalisadores ácidos podem ser subdivididos dependendo dos sítios ativos dos ácidos (CHOUHAN e SHARMA, 2011). As Lipases catalisam a hidrólise de triglicerídeos a glicerol e ácidos graxos livres em interface água óleo (AARTHY *et al.*, 2014).

Figura 2.10 – Classificação de catalisadores de uma reação de transesterificação.



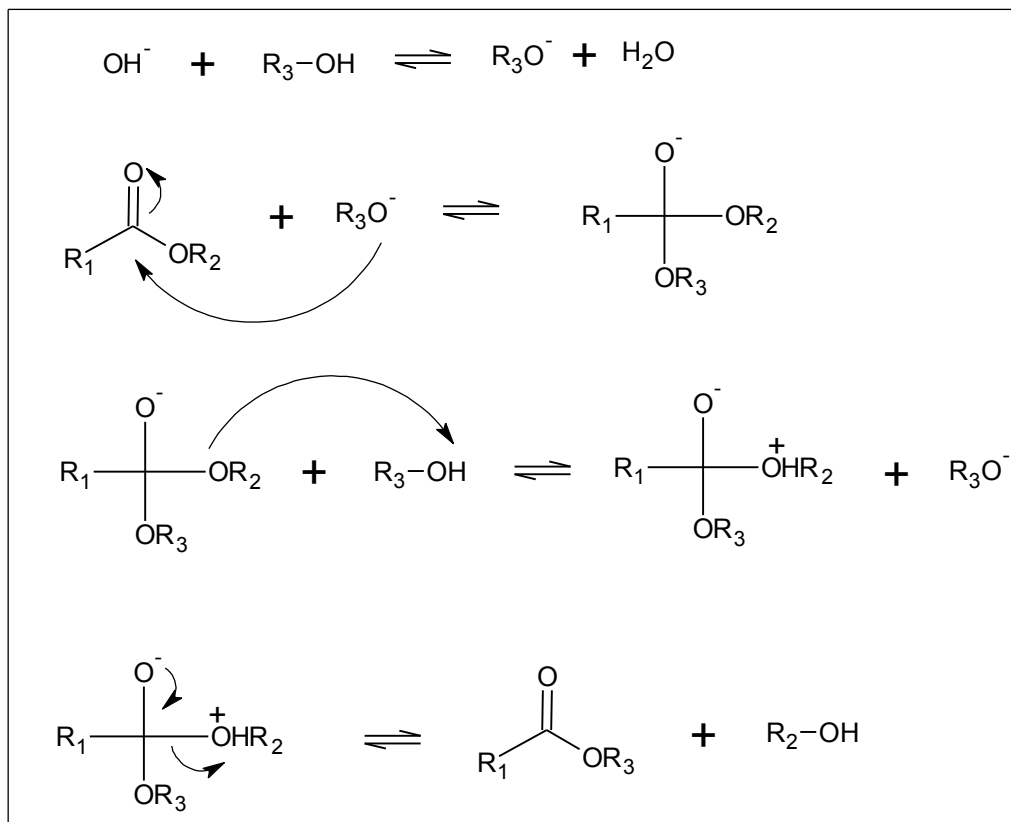
Fonte: Adaptado Chouhan e Sharma (2011).

A Figura 2.11 apresenta o mecanismo aceito para a transesterificação de triglicerídeos com mono-álcoois em meio alcalino. A espécie ativa é um alcóxido, formado pela reação do álcool com a base. A carbonila do triglicerídeo sofre ataque nucleofílico do alcóxido formando um intermediário tetraédrico. O rearranjo deste intermediário forma o éster de monoálcool (diglicerídeo) e o ânion. A reação se repete formando monoglicerídeo e por fim a glicerina (KUCEK, 2004).

Apesar da catálise básica nas reações de transesterificação ser a mais utilizada industrialmente apresenta problemas quando o óleo vegetal apresenta altos teores de ácido graxo livre, pois são formados sabões que acabam gerando emulsões e dificultando a separação dos produtos. Além disso, a solubilização dos hidróxidos no álcool para a formação do alcóxido

gera água, o que favorece também a saponificação dos triglicerídeos gerando dificuldades de purificação e perda de rendimento (SUAREZ *et al.*, 2007).

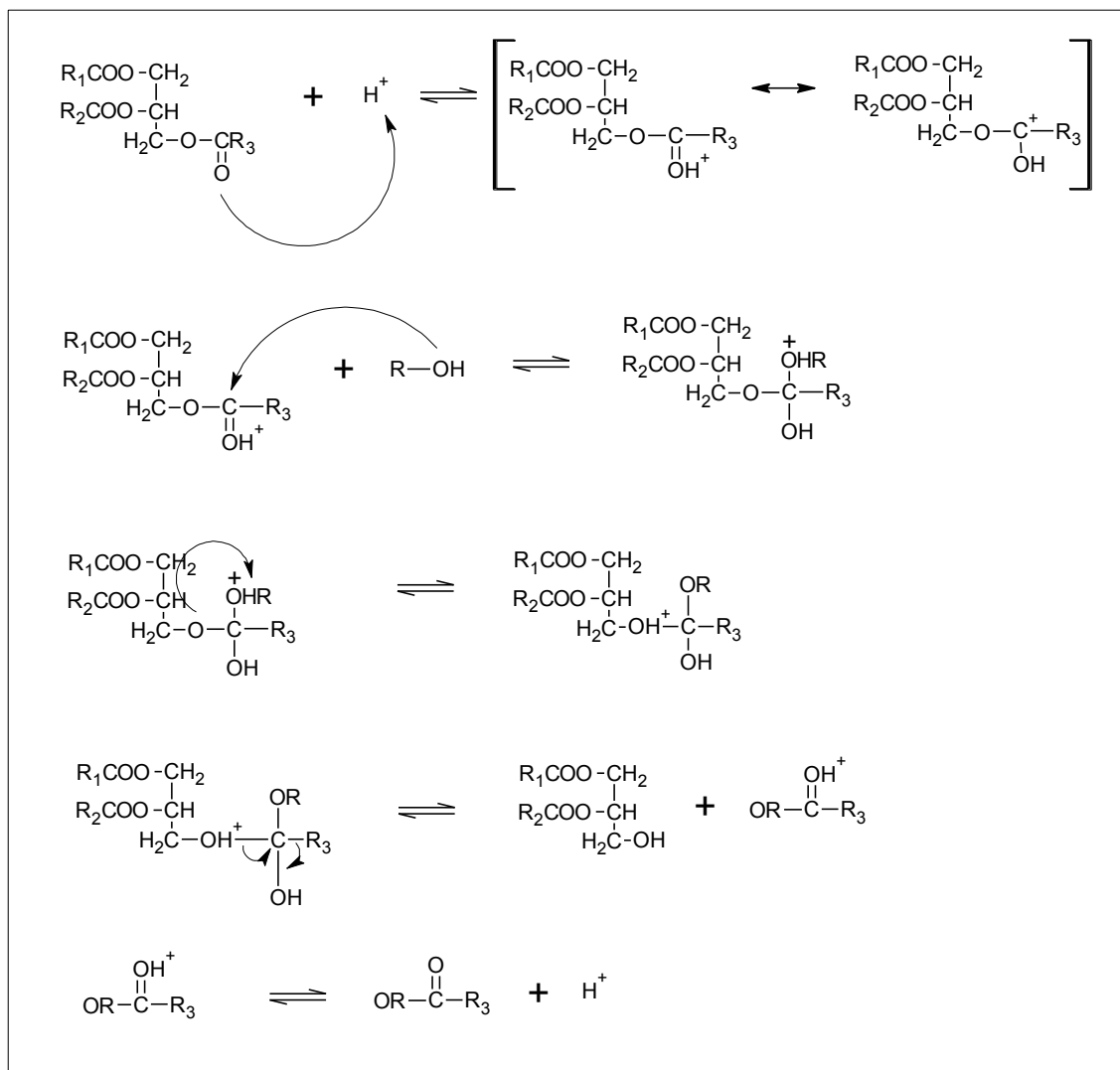
Figura 2.11 – Mecanismo para transesterificação alcalina de triglicerídeos.



Fonte: Kucek (2004).

O mecanismo de catálise ácida para reações de transesterificação é apresentado na Figura 2.12. Primeiramente acontece a ativação da carbonila, que é atacada pelo grupo nucleofílico do álcool. Após a adição do nucleófilo ocorre um prototropismo intermolecular, eliminação do diglicerídeo (grupo abandonador). Por fim acontece a desprotonação da carbonila do éster formado (diglicerídeo). Diglicerídeo e monoglicerídeo são convertidos pelo mesmo mecanismo na mistura de ésteres monoalquílicos e glicerol. A presença de água favorece a hidrólise dos triglicerídeos, ou do éster formado que, leva à formação de ácidos carboxílicos e reduz o rendimento da reação (GARCIA, 2006).

Figura 2.12 – Mecanismo de reação de transesterificação com catálise ácida.



Fonte: Garcia (2006).

A catálise heterogênea é eficiente pelo fato do catalisador ser um sólido, podendo ser reciclado, o que facilita o processo e reduz custos. Porém, em geral, são necessários maiores estudos para definição de tempo e temperatura apropriados das reações (COLOMBO; ENDER; BARROS, 2017). Catalisadores heterogêneos com potencial para produção de biodiesel podem ser classificados como: zeólitas, óxidos e sais inorgânicos, compostos de coordenação e líquidos iônicos, resinas trocadoras de íons, ácidos e bases orgânicos e materiais lamelares, sendo que este último inclui os hidroxissais lamelares (HSLs), os carboxilatos lamelares, os hidróxidos duplos lamelares (HDLs) e os óxidos estruturados (LDOs) oriundos da calcinação controlada de HDLs (CORDEIRO *et al.*, 2011).

Catalisadores heterogêneos ácidos são insensíveis ao conteúdo de FFA, promovem a esterificação e a transesterificação simultaneamente, permitem eliminar o passo de lavagem do

biodiesel, são facilmente separados do meio de reação, resultando em menor nível de contaminação do produto, são de fácil regeneração e reciclagem do catalisador e reduzem o problema de corrosão, mesmo com a presença de espécies ácida (CHOUMAN e SHARMA, 2011). Porém os rendimentos de ésteres produzidos são geralmente menores quando comparados aos rendimentos de reações com catálise homogênea. Este fato deve-se a vários motivos e justifica a busca por catalisadores com melhor estabilidade, seletividade, atividade e que sejam também economicamente viáveis e sustentáveis (ULLAH *et al.*, 2016). Catalisadores heterogêneos ácidos têm outras desvantagens como a atividade muito influenciável pela temperatura durante as reações, sendo normalmente mais ativos a temperaturas superiores a 170 °C (SERIO *et al.*, 2008), tem baixas taxas de reação, problemas de difusão de massa, são muito sensíveis a impurezas, e podem formar produtos secundários como éteres (MANSIR *et al.*, 2017). Os catalisadores heterogêneos ácidos incluem zeólitas e materiais derivados, óxidos mistos (sílica-alumina, poliestireno sulfonado, resinas de troca iônica) e heteropoliácidos. Esses catalisadores são geralmente classificados de acordo com sua acidez e morfologia (tamanho do poro e área superficial) (MANSIR *et al.*, 2017).

Os catalisadores heterogêneos básicos têm altas atividades catalíticas em processos de transesterificação. Esses catalisadores têm a intenção de superar as restrições do uso dos catalisadores básicos homogêneos, especialmente a saponificação. Porém, mesmo utilizando os catalisadores sólidos, a matéria-prima de alta concentração de ácidos graxos livres leva à saponificação. Outra característica desvantajosa dos catalisadores heterogêneos básicos é a sua alta afinidade com a água e a umidade durante o armazenamento (MARDHIAH *et al.*, 2017).

Alguns dos catalisadores heterogêneos básicos comumente utilizados são: K /  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, hidrotalcita HTiO<sub>2</sub>, óxidos mistos de Ca e Zn, os catalisadores CaO e MgO apoiados com Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, óxidos de metais alcalino-terrosos, KF / Ca-Al, zeólitas básicas, alumina carregada de metal alcalino (CHOUMAN e SHARMA, 2011).

#### **2.4.1 Catálise enzimática de reações de transesterificação**

A transesterificação enzimática tem chamado a atenção dos pesquisadores nos últimos anos devido ao problema de processamento do biodiesel gerado pela transesterificação química e pelo fato de a catálise enzimática prosseguir sem a geração de subprodutos, ser de fácil recuperação do produto, exigir condições brandas de reação, ser insensível ao óleo de alto teor de ácidos graxos e pela possibilidade de se reutilizar o catalisador. A Tabela 2.4 apresenta uma

comparação entre a transesterificação com catálise química e catálise enzimática. Apesar de todas as vantagens da catálise enzimática nos processos de transesterificação, ainda existem restrições, especialmente quando implementadas em escala industrial, como alto custo da enzima, a taxa de reação lenta e desativação da enzima (LAM; LEE; MOHAMED, 2010).

Quando comparada com a catálise química convencional, a transesterificação via catálise enzimática é muito promissora. As lipases são capazes de trabalhar em um ambiente mais suave que o meio reacional químico, o que sugere menor consumo de energia. Além disso, lipases tem a capacidade de transferir ambos os triacilgliceróis e ácidos graxos livres em biodiesel, o que significa que podem catalisar as reações de óleos variados, incluindo óleos usados. Ademais, o biodiesel pode ser facilmente separado a partir da mistura reacional através de filtração, o que torna a purificação do biodiesel muito mais fácil (YAN *et al.*, 2014).

Tabela 2.4 – Comparação dos métodos enzimático e químico para produção de biodiesel.

Parâmetro	Método Químico		Método Enzimático
	Processo ácido	Processo básico	
Rendimento Biodiesel	>90%	>96%	>96%
Ácidos graxos livres presentes no substrato	Converte em biodiesel	Forma sabão	Converte em biodiesel
Presença de água no substrato	Efeito negativo	Efeito negativo	Necessária
Purificação dos metil ésteres	Várias lavagens	Várias lavagens	Nenhuma
Recuperação do glicerol	Complexa, baixo grau de glicerol	Complexa, baixo grau de glicerol	Fácil, alto grau de glicerol
Taxa de reação	Lenta	Alta	Lenta
Temperatura de reação	>100°C	60-80 °C	20-50 °C
Recuperação do catalisador	Difícil, o catalisador gera subprodutos	Difícil	Fácil
Reuso do catalisador	Não há reuso	Parcialmente perdido em passos pós-processo	Reutilizável
Custo do Catalisador	Baixo	Baixo	Alto
Gasto de água	Alto	Alto	Baixo

Fonte: Gog *et al.*, (2012); Robles-Medina *et al.*, (2009).

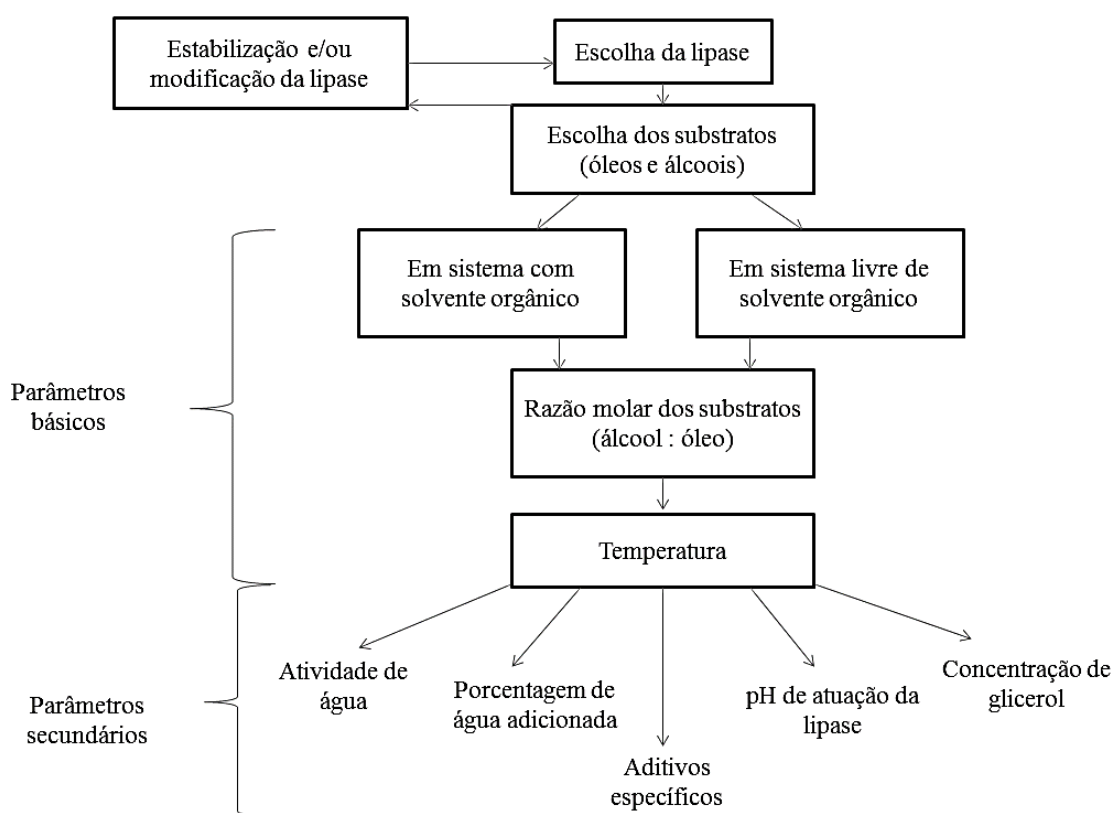
#### 2.4.1.1 Fatores que influenciam as reações de transesterificação enzimática

Durante o processo de transesterificação via catálise enzimática muitos fatores afetam o rendimento de biodiesel, tais como a razão molar de álcool/óleo, presença de água, presença de aditivos, presença de solvente orgânico, temperatura, o tipo de álcool, tipo de lipase, entre outros (GULDHE *et al.*, 2015).

Segundo Antczak *et al.* (2009) os fatores cruciais para a produtividade em uma síntese de biodiesel por catálise enzimática podem ser divididos em parâmetros básicos e secundários,

conforme esquema apresentado na Figura 2.13. Primeiramente deve ser feita a escolha da matéria prima e da lipase, que pode ser modificada para melhorar a eficiência catalítica e estabilidade. A seguir seleciona-se o solvente, otimiza-se a razão molar entre os substratos, temperatura, atividade de água, pH de trabalho e a concentração máxima de produtos permitida pela reação (parâmetros secundários).

Figura 2.13 – Parâmetros cruciais que afetam o rendimento da síntese de biodiesel com catálise enzimática.



Fonte: Adaptado de Antczak *et al.* (2009).

#### 2.4.1.2 Escolha do álcool e razão molar óleo/álcool nas reações de transesterificação

Vários tipos de álcoois podem ser utilizados nas reações de transesterificação catalisadas por lipases. Metanol e etanol são os mais empregados pela indústria de biodiesel, mas os dois tem alto poder de desnaturação das enzimas quando comparados a álcoois com cadeias longas, sendo inversamente proporcional o grau de inativação das lipases e o número de átomos de carbono do álcool (NELSON; FOGLIA; MARMER, 1996; CHEN; WU, 2003). Para resolver

o problema da inibição enzimática pela presença dos álcoois, várias alternativas vem sendo estudadas como a adição por etapas do álcool, uso de outros aceptores acil (MARX, 2016; XU *et al.*, 2003), uso de solventes no meio reacional e de lipases tolerantes aos álcoois (GULDHE, 2015).

Em relação às características como combustíveis, o biodiesel a partir de metanol e etanol demonstra ligeiras variações. Os combustíveis de biodiesel a partir de metanol apresentam pontos de fluidez e de névoa ligeiramente superiores e viscosidades ligeiramente inferiores às obtidas a partir do etanol. No entanto, o uso de metanol suscita preocupações ambientais, uma vez que as fontes não renováveis de combustíveis fósseis, como o gás natural, são atualmente as principais fontes de metanol (MUSA, 2016).

Altamirano *et al.* (2016) avaliaram o potencial do biodiesel de ésteres etílicos (FAEE) como substituto do biodiesel de ésteres metílicos (FAME) nas condições brasileiras, monitorando a renovação e o desempenho ambiental através da avaliação do ciclo de vida, incluindo misturas com diesel fóssil. Apesar de o etanol ser um agente de transesterificação renovável, ao contrário do metanol, a análise favorece a via metabólica metílica, com base nas métricas e indicadores calculados. Com relação à energia, a produção de FAEE requer aproximadamente 24% mais energia do que FAME.

As proporções molares de álcool para óleo desempenham um papel importante na transesterificação catalisada enzimaticamente. Estequiometricamente, a razão para a reação de transesterificação requer três mols de álcool para um mol de triglicerídeo para produzir três mols de éster de ácido graxo e um mol de glicerol (Figura 2.8). Um excesso de álcool é usado na produção de biodiesel para garantir que os óleos ou gorduras serão completamente convertidos em ésteres e uma maior proporção de triglicerídeos de álcool pode resultar em uma maior conversão de éster em um tempo mais curto. O rendimento de biodiesel é aumentado quando a razão de triglicéridos de álcool é aumentada para além de 3 e atinge um máximo. Além disso, a razão molar está associada ao tipo de catalisador utilizado e a proporção molar de álcool para triglicéridos na maioria das investigações é de 6: 1, com o uso de um catalisador alcalino. Quando a porcentagem de ácidos graxos livres nos óleos ou gorduras é alta, como no caso do óleo de cozinha usado, é necessária uma proporção molar de 15: 1 quando se utiliza a transesterificação catalisada por ácido (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

Nasaruddin, Alam e Jami (2014) estudaram a produção de biodiesel a partir de óleo de palma de baixo custo utilizando lipases de *Candida cylindracea* e etanol como grupo aceptor. Segundo os autores, as reações de transesterificação e esterificação são favoráveis quando a



concentração de álcool é superior à água. No entanto, quando o teor de água é maior, devido ao subproduto de água crescente da reação de esterificação, hidrólise e reação de esterificação reversível, a produção de biodiesel tornou-se baixa e o teor de ácidos graxos aumentou na mistura reacional. Os efeitos da relação molar de etanol/óleo foram avaliados e verificou-se que o rendimento máximo (43,8% m/m de óleo) foi atingido numa proporção molar de etanol: óleo de 4: 1. Contudo, o excesso de etanol a partir da exigência de estequiometria pode causar a alteração conformacional da estrutura da proteína lipase, inibindo assim a sua atividade e reduzindo o rendimento de biodiesel. Esse efeito foi relacionado ao fato da queda do rendimento da reação quando a razão molar de etanol/óleo foi aumentada para 6:1.

#### 2.4.1.3 Presença de água nas reações de transesterificação com catálise enzimática

A presença de água é fundamental para manter a conformação da lipase e também aumenta a área interfacial entre água e fase orgânica onde a lipase atua. Os rendimentos de transesterificação dependem da área interfacial que pode ser formada pela adição de certas quantidades de água ao meio reacional. Porém um excesso de água estimulará a reação de hidrólise concorrente causando a diminuição dos rendimentos de transesterificação. Vários estudos revelaram que a adição de uma pequena alíquota de água à mistura de reação catalisada por enzimas aumentou a taxa de síntese de ésteres de ácidos graxos. As porcentagens ideais devem ser estudadas para cada enzima (BABAKI *et al.*, 2015; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Shah e Gupta (2007) estudaram a alcóolise de óleo de *Jatropha* com lipase de *Pseudomonas cepacia*. A otimização do processo levou a um rendimento de 98% (m/m) utilizando a lipase imobilizada em celite a 50 ° C, na presença de água a 4-5% (m/m) por 8 h.

Ferrero *et al.* (2016) avaliou o efeito da concentração de água no meio na reação de etanolise de óleo de girassol utilizando lipase de *Pseudomonas Fluorescens*. Utilizou-se 0 a 5% de água em relação à massa de óleo, utilizando etanol absoluto e 87,5 mg de lipase / SBA-15 / g de óleo. A atividade da enzima imobilizada em sílica mesoporosa (SBA-15) aumentou à medida que a concentração de água aumentou, até 4%. Sob tais condições, o rendimento de ésteres etílicos era de 31% em comparação com 7% quando a mistura não continha água. Quando a concentração ótima de água, 4% em relação à massa de óleo, foi superada a atividade diminuiu.

#### 2.4.1.4 Presença de solvente nas reações de transesterificação com catálise enzimática

A utilização de solventes orgânicos na síntese enzimática de biodiesel reduz a viscosidade do sistema e ajuda na transferência de massa, melhorando a solubilidade mútua dos triglicerídeos hidrofóbicos e álcoois hidrofílicos, protegendo as enzimas da desnaturação por altas concentrações de álcoois e assegurando a transesterificação com a adição de álcool em apenas uma etapa. Os solventes orgânicos mais adequados para essa aplicação são isooctano, *n*-heptano, éter de petróleo, *n*-hexano, ciclohexano e *terc*-butanol. Através do uso dos solventes observa-se também um aumento da taxa de transesterificação (ANTCZAK *et al.*, 2009; GOG *et al.*, 2012; GULDHE *et al.*, 2015).

Babaki *et al.* (2015) estudaram o efeito do teor de água, *terc*-butanol e adsorvente de água no rendimento de éster metílico de ácidos graxos. A conversão completa foi obtida em condições ótimas para *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em sílica epoxifuncionalizada (Silica-CALB); 30% (m/m) de *terc*-butanol por peso do substrato, tempo de reação de 96 h, 50 ° C e proporção molar de metanol para óleo 3: 1, o qual foi adicionado à mistura reacional em três etapas. Em geral, adicionando *terc*-butanol ao meio reacional, a conversão de óleo em ésteres aumentou para lipases de *Rhizomucor miehei* (RML) imobilizada em sílica epoxifuncionalizada (Sílica-RML) e 50% em peso de *terc*-butanol por peso do substrato gerou o melhor rendimento. Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) imobilizada em sílica epoxifuncionalizada (Silica-TLL) atingiram 100% de rendimento a 10% de *terc*-butanol.

Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) imobilizada em aldeído-Lewatit (Lew-TLL) foi utilizada para a transesterificação enzimática de óleo de soja utilizando etanol como grupo aceptor. A transesterificação foi realizada por diferentes estratégias. Primeiro, com proporção molar 7,5:1 de etanol/óleo de soja, 15% de enzima imobilizada e 4% de água a 30 ° C. Na presença de *n*-hexano, a transesterificação atingiu 100% de conversão, enquanto que no sistema isento de solvente o rendimento era de 75%. Na razão molar estequiométrica 3:1 etanol/óleo de soja, o rendimento foi de 70% de conversão após 10 h de reação em ambos os sistemas (RODRIGUES *et al.*, 2010).

#### *2.2.1.5 Outros fatores que influenciam nas reações de transesterificação com catálise enzimática*

Há ainda outros fatores que influenciam as reações de transesterificação com catálise enzimática. A concentração de glicerol é um fator que influencia nos rendimentos de biodiesel na transesterificação com catálise enzimática. Esse produto é facilmente adsorvido pela lipase, afetando na atividade e estabilidade da enzima, especialmente em processos de reuso (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

O tipo de reator também é um fator a se considerar. O modo de operação para a produção de biodiesel pode ser um processo contínuo ou em batelada. Apesar da operação em batelada ser o método mais comumente usado, os reatores contínuos produzem maior rendimento. O processo em batelada é vantajoso porque tem um grande nível de dispersão de substrato, porém a pressão mecânica de agitação pode danificar a superfície de suportes de lipase imobilizada, provocando assim um rendimento de biodiesel baixo. Particularmente para a lipase imobilizada, o processo contínuo é favorecido devido a baixo custo, alta produtividade e alta eficiência energética. Para a produção contínua de biodiesel, o reator de leito fixo tem uma vantagem adicional de eliminação contínua de glicerol e prevenção do efeito inibitório do glicerol na lipase (SANKARAN; SHOW; CHANG, 2016).

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é preparar triacetato de celulose, a partir da polpa Kraft, para imobilização de lipases por adsorção física e aplicação na produção de biodiesel.

De forma mais específica são objetivos deste estudo:

- i) Produzir e caracterizar o triacetato de celulose (TAC) obtido a partir da esterificação da celulose da polpa Kraft;
- ii) Imobilizar a lipase Lecitase Ultra® por adsorção física no Triacetato de celulose;
- iii) Caracterizar o biocatalisador (LU-TAC) obtido;
- iv) Aplicar o biocatalisador nas reações de transesterificação de óleo de soja e otimizar condições de trabalho.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAL**

A enzima Lecitase Ultra® (LU) (Novozymes) foi doada pela LNF Latino Americana Company (Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brazil). A solução de lipases, LU fornecida pela Novozymes® é composta pela enzima (8% m/m), sorbitol (50% m/m) e água (42% m/m) (Anexo 1). A polpa Kraft branqueada, originária de eucalipto, foi doada pela empresa Suzano de Americana – SP. Todos os reagentes e padrões analíticos utilizados para síntese e caracterização dos derivados celulósicos são de grau analítico.

### **4.2 PRODUÇÃO DE TRIACETATO DE CELULOSE**

O procedimento utilizado para a produção do triacetato de celulose foi feito com adaptação de metodologia utilizada pelo grupo de Reciclagem de Polímeros do IQUFU (CERQUEIRA et. al. 2009). Adicionou-se 50,0 mL de ácido acético glacial a 2,00 g de polpa Kraft. Agitou-se a mistura em agitador magnético por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se uma solução contendo 0,16 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado em 18,0 mL de ácido acético glacial e agitou-se por 25 minutos em temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura. Ao filtrado adicionou-se 64,0 mL de anidrido acético, agitou-se e retornou-se o filtrado ao frasco inicial com o material. A solução foi agitada por mais 30 minutos e deixada em repouso. Após 5 horas adicionou-se água destilada ao meio reacional até que não houvesse mais a formação de precipitado. Filtrou-se a mistura a vácuo lavando com água destilada até pH neutro. O material foi seco em estufa por 90 minutos a 105°C.

### **4.3 CARACTERIZAÇÃO DE TRIACETATO DE CELULOSE**

#### **4.3.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

As amostras foram analisadas na forma de pastilhas de KBr, na proporção de 1:100 (m/m) de amostra em um Espectrômetro de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier Shimadzu IR Prestige-21. Foram feitas 32 varreduras com resolução

de 4 cm<sup>-1</sup>, na faixa de 500 a 4000 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram previamente secas e mantidas em dessecador para evitar a absorção de água do ambiente.

#### 4.3.2 Determinação do grau de substituição do Triacetato de Celulose

O grau de substituição (GS) do material obtido via acetilação foi calculado a partir da razão entre as absorbâncias das bandas de estiramento C=O (1750 cm<sup>-1</sup>) e OH (3400 cm<sup>-1</sup>). Segundo Hurtubise (1962) a razão entre essas absorbâncias está relacionada com a porcentagem de grupos acetila do acetato de celulose (%GA). O valor de %GA se relaciona com o GS de acordo com as Equações 3.1 e 3.2 (CERQUEIRA *et al.*, 2010):

$$\%GA = 43,69(1 - e^{-0,974.x})^{2,153} \quad \text{Eq.3.1}$$

Onde x= razão entre as absorbâncias das bandas de estiramento C=O (1750 cm<sup>-1</sup>) e OH (3400 cm<sup>-1</sup>).

$$GS = \left( \frac{162.\%GA}{43.100 - 42.\%GA} \right) . 100 \quad \text{Eq. 3.2}$$

#### 4.3.3 Difratometria de raios-X

A análise de difração de raios-X foi realizada à temperatura ambiente com variação de 2θ de 5 a 40° e uma velocidade de varredura de 2°min<sup>-1</sup>. O equipamento utilizado foi um difratômetro Shimadzu XRD-6000 LabX, operando a uma potência de 40 kV com uma corrente de 30 mA e radiação Kα do Cu (1,5406 Å).

O índice de cristalinidade foi calculado utilizando a área dos picos e halo amorfo conforme a Equação 3.3. As áreas dos picos e halos foram encontradas a partir de uma função de distribuição, neste caso, Pseudo-Voight 1 com auxílio do software Origin 8.0.

$$\%IC = \frac{A_c}{(A_c + A_a)} \quad \text{Eq. 3.3}$$

Onde  $A_c$  = área dos picos cristalinos e  $A_a$  = área do halo amorfo.

#### 4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura

Foram obtidas imagens em um microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss modelo EVO MA 10 com detector de elétrons secundários. Todas as amostras foram recobertas com ouro antes da aquisição das imagens em Sputtering Leica.

#### 4.3.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises foram feitas em um equipamento modelo TGA-50 da Shimadzu. Cerca de 7 mg de amostra foi aquecida, em cadinho de alumínio, de 25 °C até 600°C na velocidade de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min.

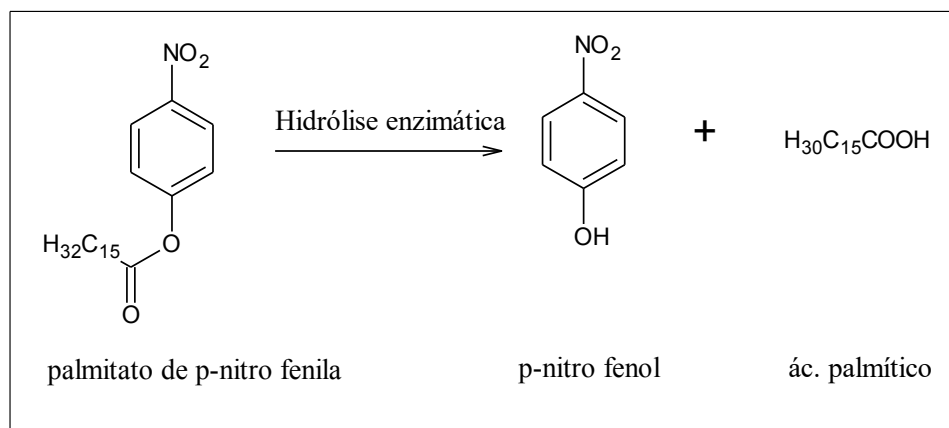
### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS LIPASES

#### 4.4.1 Determinação da atividade enzimática e dosagem de proteína

A atividade enzimática foi medida utilizando palmitato de *p*-nitro fenila (*p*-NPP) como substrato. As amostras foram incubadas em uma mistura das soluções A (18, 0 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol/L pH 5, 0,01g de goma arábica e 0,05 mL de Triton X-100) e solução B (0,006 g de *p*-NPP e 2 mL de 2-propanol). Aliquotas das amostras (0,1 mL de enzima livre ou 0,1g de enzima imobilizada) foram adicionadas à solução reacional (mistura das soluções A e B) na proporção 1:9 (v/v) e a reação foi controlada por 10 minutos a 50°C. Após esse tempo as amostras foram levadas a 92°C por 2 minutos e posteriormente a banho de gelo com adição de solução saturada de borato de sódio. A absorbância foi medida a 410 nm (Espectrofotômetro PG Instruments T70). Uma unidade de enzima equivale à liberação de 1µmol de *p*-nitrofenol (*p*-NP)/min para 1mL de enzima livre ou para 1g de enzima imobilizada (peso do suporte incluído). A metodologia foi adaptada do trabalho de Pencreach e Baratti (1996). Amostras contendo somente acetato de celulose foram submetidas à análise de atividade enzimática para confirmar a não reação com *p*-NPP e ausência de absorbância desse material em 410nm.

A atividade enzimática é determinada a 410 nm, pelo desenvolvimento de coloração amarela obtida na liberação do *p*-nitrofenol (*p*-NP) (absortividade molar  $\epsilon = 7.93 \text{ mmol/cm}$ ) (Figura 4.1) (FERNANDES, 2002).

Figura 4.1 – Reação de hidrólise enzimática do palmitato de *p*-nitro fenila.



Fonte: Fernandes (2002).

A dosagem de proteína da enzima foi feita segundo o método de Bradford (1976), com construção prévia de curva calibração (Anexo 2).

#### 4.4.2 Estudo de estabilidade térmica

Para o estudo de estabilidade térmica, 0,68 mL de amostra foi adicionada a 1,0 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mmol/L pH 7. As misturas foram levadas às temperaturas de 30, 35, 40, 45 e 50 °C durante 8 horas, as amostras foram retiradas a cada 1 hora e as atividades enzimáticas analisadas como descrito no item 4.4.1. Todos os experimentos foram feitos em triplicada para confirmação dos resultados obtidos.

A constante de inativação ( $k_d$ ) para cada lipase livre e imobilizada foi calculada através da Equação 3.4 (HENLEY; SADANA, 1985):

$$\ln \frac{A_i}{A_0} = -k_d \times t \quad \text{Eq. 3.4}$$

onde,  $A_i$  é a atividade enzimática após o tratamento térmico durante um determinado tempo de incubação em U/mL; e  $A_0$  é a atividade enzimática inicial, imediatamente antes de iniciar o experimento de estabilidade térmica em U/mL e  $t$  é o tempo. Para os dados experimentais obtidos em diferentes temperaturas, foi calculado um modelo de ajuste utilizando o software Origin 8.0.



O tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), definido como o tempo para que a atividade enzimática leva para reduzir 50%, foi determinado a partir dos modelos dados pelos ajustes dos dados experimentais obtidos.

#### **4.4.3 Estudo de variação de pH**

O efeito do pH na estabilidade enzimática das enzimas foi estudado variando pH das soluções tampão entre 3 e 10. Para pHs 3, 4 e 5, utilizou-se solução tampão citrato de sódio 50 mmol/L, para os pHs 6, 7 e 8 utilizou-se tampão fosfato de sódio 50 mmol/L e para os pHs 9 e 10, utilizou-se tampão bicarbonato de sódio 50 mmol/L.

Adicionou-se 1,0mL de tampão a 0,68 mL de amostra e deixou-se a mistura em agitação por 2 horas. Após esse tempo calculou-se atividade enzimática como descrito no item 4.4.1. Todos os experimentos foram feitos em triplicada para confirmação dos resultados obtidos.

### **4.5 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE E CARACTERIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR**

#### **4.5.1 Imobilização de Lecitase ultra em triacetato de celulose**

Para cada 1 g de triacetato de celulose (TAC) na forma de pó, adicionou-se 10 mL de solução enzimática (30% v/v) contendo Lecitase ultra® em tampão fosfato de sódio 25 mmol/L pH7. A suspensão foi mantida à temperatura de 4 °C, como proposto por Pereira *et al.*, (2015). A atividade enzimática foi periodicamente medida, a cada 15 minutos, para a suspensão e também para sobrenadante (sem a presença do suporte), como descrita no item 4.4.1, a fim de acompanhar o processo de imobilização, e até a estabilização do rendimento de imobilização (IR). Após a conclusão da imobilização, o suporte foi lavado com água deionizada, filtrado à vácuo e estocado a 4 °C para ser utilizado posteriormente.

Definiu-se como rendimento de imobilização (IR) a razão entre a quantidade de enzima imobilizada e a quantidade de enzima oferecida a imobilização (%), e atividade relativa (AR) como a razão entre a atividade no tempo  $t$  e a atividade inicial.

#### **4.5.2 Estudo de estabilidade térmica**

Para o estudo de estabilidade térmica, 0,1 g de biocatalisador foi adicionado a 1,0 mL de tampão, como descrito no teste 3.4.2. As soluções foram levadas às temperaturas de 30, 35, 40, 45 e 50°C durante 8 horas, as amostras foram retiradas a cada 1 hora e a atividade enzimática foi calculada como descrito no item 4.4.1. Todos os experimentos foram feitos em triplicada para confirmação dos resultados obtidos.

#### **4.5.3 Estudo de variação de pH**

Adicionou-se 1,0 mL de tampão a 0,1 g do biocatalisador imobilizado de amostra e deixou-se a mistura em agitação por 2 horas. Os pHs estudados, bem como os tampões utilizados foram os mesmos descritos no item 4.4.3. Após esse tempo a atividade enzimática foi calculada como descrito no item 4.4.1. Todos os experimentos foram feitos em triplicada para confirmação dos resultados obtidos.

#### **4.5.4 Estudo de estabilidade em solventes orgânicos**

A avaliação da estabilidade da lipase em solventes orgânicos foi feita incubando 0,1 g de biocatalisador imobilizado em solução tampão fosfato 25 mmol/L e pH 7 contendo etanol, metanol, propanol e *n*-hexano, separadamente, na proporção 1:1 (v/v). As amostras foram retiradas com 6, 24 e 30 h e as atividades enzimáticas calculadas como descrito no item 4.4.1. Todos os experimentos foram feitos em triplicada para confirmação dos resultados obtidos.

#### **4.5.5 Estudo de dessorção da lipase do suporte**

A fim de avaliar o efeito do surfactante na atividade enzimática, preparou-se soluções da lipase com Triton X-100 à concentrações de 0,02, 0,2, 0,5 e 1,0 %. As amostras foram deixadas sob agitação mecânica durante 50 minutos e as atividades enzimáticas foram calculadas como descrito no item 4.4.1. Todos os experimentos foram feitos em triplicada para confirmação dos resultados obtidos.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS APARENTES ( $K_m$ e $V_{máx}$ )

A atividade enzimática foi determinada em diferentes concentrações do substrato *p*-NPP (0,16-2,66 mmol/L) a temperatura ambiente medindo-se a absorbância à 410 nm. Os parâmetros cinéticos,  $K_m$  e  $V_{max}$  foram calculados pelo método de Lineweaver-Burk (duplo recíproco).  $K_m$  representa a constante de Michaelis-Menten e  $V_{max}$  é a velocidade máxima de reação. Os dados foram ajustados na reta dada pela Equação 3.5.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{máx}} + \frac{K_m}{V_{máx}} \frac{1}{[S]} \quad \text{Eq. 3.5}$$

Onde  $v$  representa velocidade de reação e  $[S]$  é a concentração de substrato.

#### 4.7 REUSO DO BIOCATALISADOR

Testes de reuso do biocatalisador LU-TAC foram realizados em medidas de batelada incubando 0,1g de LU-TAC com 0,90 mL de solução de *p*-NPP (preparada como descrito no item 4.4.1) por 5 ciclos. Após 10 minutos de reação, as amostras foram levadas a banho de 92 °C por 2 minutos e posteriormente em banho de gelo com adição de solução saturada de borato de sódio. O *p*-NP formado foi medido a 410 nm. Após cada ciclo, os catalisadores foram lavados com solução tampão fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7, filtrados e adicionados a nova solução de substrato para novo ciclo de hidrólise. A atividade enzimática foi calculada após cada ciclo e expressa na forma de atividade relativa após o primeiro ciclo.

#### 4.8 TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA CATALISADA POR LU-TAC

##### 4.8.1 Identificação de ésteres metílicos formados nas reações de transesterificação

Uma mistura de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos, C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub>, foi preparada pela solubilização de 100 mg dos ésteres para 10 mL de *n*-heptano. A análise por CG-MS do padrão de ésteres foi realizada em um equipamento da marca Shimadzu, modelo

GC17A/QP5000 empregando coluna capilar RTX-MS-5 (30 m, 0,32 mm de d.i. e 0,25 µm de filme constituído de 5%-polifenilmetilsiloxano-95%-polidimetilsiloxano) com programação de temperatura: 60 °C (2 min) aumenta a 10 °C min<sup>-1</sup> até 200 °C, em seguida aumenta a 5 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C (7 min); temperatura do injetor a 250 °C, temperatura da fonte de ionização de 250 °C e com energia de impacto de 70 eV, fragmentos captados na faixa de m/z 50 a 550. A identificação dos compostos separados por cromatografia foi feita por meio das bibliotecas de espectros de massas da NIST (NIST mass spectral library).

A produção de biodiesel via catálise enzimática não exige purificação dos ésteres metílicos obtidos. Após a reação uma separação de fases é suficiente para separar biodiesel (fase superior) do glicerol (fase inferior) (ATADASHI; AROUA; AZIZ, 2011; INTERNATIONAL CONFERENCE ON INFORMATION ENGINEERING FOR MECHANICS AND MATERIALS, 2015). Após centrifugação, alíquotas da fase superior das amostras foram diluídas em uma solução padrão contendo metilheptadecanoato. As amostras foram injetadas em um cromatógrafo gasoso Shimadzu (GC2010-Plus) equipado com detector FID e coluna RTX-WAX (30 m × 320 µm × 0.25 µm) com programação de temperatura: 60 °C (2 min) aumenta a 10 °C min<sup>-1</sup> até 200 °C, em seguida aumenta a 5 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C (7 min); temperatura do injetor a 250 °C. Foram analisadas amostras de 1 µL e comparando com resultados obtidos para análise da mistura de padrões previamente feita, os picos foram identificados. A porcentagem de ésteres metílicos obtidos foi calculada utilizando o método de compensação de padrão interno, baseado na norma europeia EN14103 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2003). A porcentagem de ésteres metílicos (% FAME) obtida para cada amostra foi calculada de acordo com a Equação 3.6:

$$\%FAME = \frac{\sum A - AEI}{AEI} * \frac{CEI * VEI}{m} * 100\% \quad \text{Eq. 3.6}$$

Onde  $\sum A$ : somatório das áreas dos picos de ésteres de C<sub>14:0</sub> a C<sub>24:1</sub>; *AEI*: área do pico do metilheptadecanoato; *CEI*: concentração, em mg/mL, da solução de metilheptadecanoato; *VEI*: volume, em mL, da solução de metilheptadecanoato; *m*: massa, em mg, de amostra.

#### 4.8.2 Testes preliminares para definição de faixas de estudo e variáveis da otimização das condições das reações de transesterificação

Testes preliminares foram realizados para uma primeira avaliação sobre temperatura, concentração de enzima, porcentagem de água, porcentagem de solvente (*n*-hexano) e razão óleo/álcool que posteriormente seriam estabelecidas para otimização do processo, buscando maiores rendimentos de produção de ésteres metílicos do óleo de soja. A massa molar do óleo de soja foi definida como 874,8 g/mol (FROEHNER; LEITHOLD; JÚNIOR, 2007)

Como apresentado na Tabela 4.1, variou-se a razão óleo de soja/metanol de 1:3 a 1:8, a porcentagem de LU-TAC em 20,0% com relação à massa de óleo e 40,0%, a porcentagem de água na reação de 10,0 a 20,0% com relação à massa de óleo, a concentração de *n*-hexano de 0,5 mL ou 1,5 mL/g de óleo, e a temperatura foi avaliada entre 30 e 40 °C. A agitação foi de 250 rpm para todos os testes. Os experimentos foram realizados em incubadora com agitação e temperatura controlados (Incubadora Nova Ética modelo 430) durante 24 horas. Após o fim da reação o suporte foi separado do sistema por filtração e o sobrenadante foi centrifugado. A fase superior, contendo os ésteres foi analisada por cromatografia gasosa, como descrito no item 4.8.1.

Tabela 4.1 – Testes propostos para avaliação dos efeitos da razão molar, % LU-TAC, % água, % *n*-hexano e temperatura na produção de biodiesel metílico (ésteres metílicos de ácidos graxos) a partir do óleo de soja catalisado pela LU-TAC.

	Razão molar óleo/metanol	LU-TAC (%) massa de óleo)	Água (%) massa de óleo)	<i>N</i> -hexano (mL/g óleo)	Temperatura (°C)
1	1:3	20	15	0,5	40
2	1:4	20	15	0,5	40
3	1:6	20	15	0,5	40
4	1:8	20	15	0,5	40
5	1:4	20	15	0,5	35
6	1:4	20	15	0,5	30
7	1:4	20	10	0,5	35
8	1:4	20	20	0,5	35
10	1:4	20	15	1,5	35
11	1:4	40	15	0,5	35

Fonte: A autora.

#### 4.8.3 Otimização das condições de reação de transesterificação catalisada por LU-TAC

No software Statistica 7.0, foi gerado um Planejamento Composto Central (PCC): fatorial completo  $2^3$ , incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos.

Os experimentos foram conduzidos em erlenmeyers, em incubadora sob agitação (250 rpm) e temperatura controlada. O tempo de reação foi fixado em 24 horas. A temperatura variou de 28,2 a 41,8 °C, a porcentagem de biocatalisador com relação à massa de óleo variou de 13,2 a 26,8% e a porcentagem de água adicionada variou de 8,2 a 21,8% com relação à massa de óleo de soja. O alfa de ortogonalidade utilizado no planejamento foi 1,353. As Equações de codificação foram as Equações 3.7, 3.8 e 3.9 para temperatura ( $X_1$ ), porcentagem de LU-TAC ( $X_2$ ) e água ( $X_3$ ), respectivamente.

$$X_1 = \frac{T-35}{5} \quad \text{Eq. 3.7}$$

$$X_2 = \frac{LU-TAC-20}{5} \quad \text{Eq. 3.8}$$

$$X_3 = \frac{A-15}{5} \quad \text{Eq. 3.9}$$

A Tabela 4.2 representa os valores utilizados no PCC para as variáveis independentes analisadas e a Tabela 4.3 refere-se à matriz do Planejamento Experimental para o estudo em questão.

Concluindo os ensaios e obtenção dos dados, conforme matriz gerada (Tabela 4.3) e analisando as respostas de acordo com o item 4.8.1, analisou-se os resultados estatisticamente com a ajuda do software Statistica 7.0 para a resposta obtida (% FAME).

Tabela 4.2 – Valores utilizados no PCC para as três variáveis independentes avaliadas: ( $X_1$ ) Temperatura (°C), ( $X_2$ ) LU-TAC (% massa de óleo) e ( $X_3$ ) Água (% massa de óleo).

Variáveis	Valores codificados		
	-1	0	+1
( $X_1$ ) Temperatura (°C)	30,0	35,0	40,0
( $X_2$ ) LU-TAC (% massa de óleo)	15,0	20,0	25,0
( $X_3$ ) Água (% massa de óleo)	10,0	15,0	20,0

Tabela 4.3 - Matriz do PCC utilizado para avaliar a influência da temperatura, porcentagem de biocatalisador e água na produção de ésteres em reações de transesterificação catalisadas por LU imobilizada em TAC.

Ensaio	Temperatura	% LU-TAC	%Água
1	30 (-1)	15 (-1)	10 (-1)
2	30 (-1)	15 (-1)	20 (+1)
3	30 (-1)	25 (+1)	10 (-1)
4	30 (-1)	25 (+1)	20 (+1)
5	40 (+1)	15 (-1)	10 (-1)
6	40 (+1)	15 (-1)	20 (+1)
7	40 (+1)	25 (+1)	10 (-1)
8	40 (+1)	25 (+1)	20 (+1)
9	28,2 (-1,35313)	20 (0)	15 (0)
10	41,8 (+1,35313)	20 (0)	15 (0)
11	35 (0)	13,2 (-1,35313)	15 (0)
12	35 (0)	26,8 (+1,35313)	15 (0)
13	35 (0)	20 (0)	8,2 (-1,35313)
14	35 (0)	20 (0)	21,8 (+1,35313)
15 (C)	35 (0)	20 (0)	15 (0)
16 (C)	35 (0)	20 (0)	15 (0)
17 (C)	35 (0)	20 (0)	15 (0)

Fonte: A autora.

#### 4.8.4 Reuso de LU-TAC em reações de transesterificação de óleo de soja

Estudos de reuso de LU-TAC foram feitos utilizando o reaproveitamento do catalisador por 6 ciclos subsequentes em reações utilizando os parâmetros otimizados de acordo com item 4.8.3. Após cada ciclo, a enzima foi drenada e lavada com tampão fosfato pH 7 25mmol/L antes de novo uso. A porcentagem de ésteres metílicos (% FAME) obtidos após cada uso foi determinada como descrito anteriormente no item 4.8.1.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TRIACETATO DE CELULOSE (TAC)

O Triacetato de celulose foi produzido a partir de acetilação homogênea, sendo anidrido acético o agente acetilante, ácido acético o solvente, e ácido sulfúrico catalisador da reação, com tempo de reação de 5 horas e 30 minutos. O material obtido apresentou coloração branca (Figura 5.1), insolubilidade em água e acetona e solubilidade em diclorometano, em concordância com resultados obtidos anteriormente por pesquisadores do Grupo de Reciclagem de Polímeros do IQUFU (RIBEIRO, 2012).

Figura 5.1 – Fotografia de amostra de triacetato de celulose produzido a partir de polpa Kraft de eucalipto.

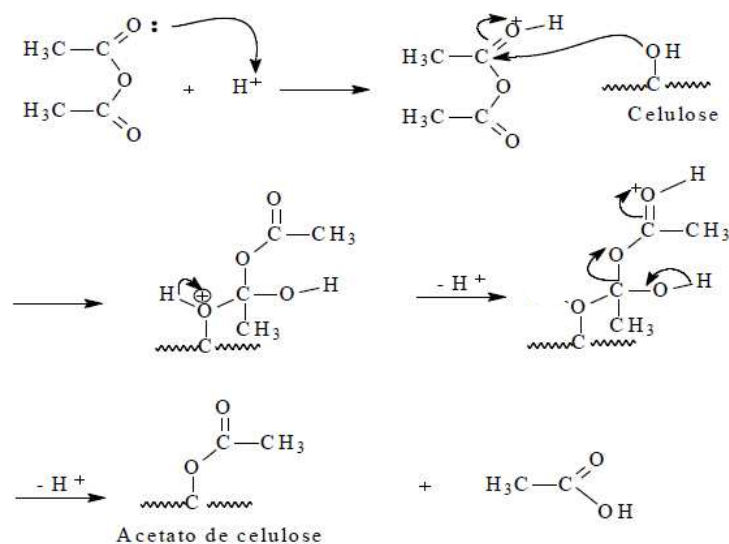


Fonte: A autora.

O mecanismo mais aceito para a reação de esterificação da celulose está descrito na Figura 5.2, de acordo com a proposta de Cruz (2010).



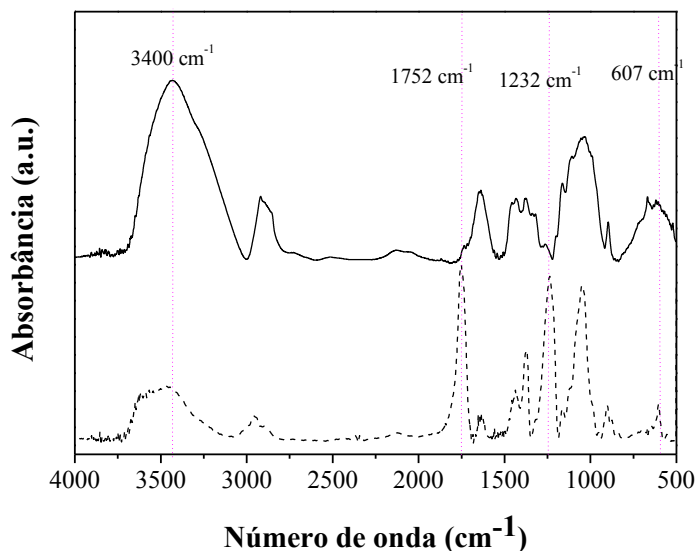
Figura 5.2 – Mecanismo de reação para acetilação homogênea da celulose.



Fonte: Cruz (2010).

A síntese do acetato de celulose foi confirmada através da Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). A Figura 5.3 apresenta espectros de infravermelho da polpa Kraft e do TAC obtido e a Tabela 5.1 mostra as principais bandas observadas e as suas atribuições.

Figura 5.3 – Espectro de infravermelho obtido para polpa Kraft (linha sólida) e acetato de celulose (linha tracejada) obtido por acetilação de polpa Kraft via método homogêneo.



Fonte: A autora.

Tabela 5.1 – Atribuições das principais bandas de infravermelho de polpa Kraft e acetato de celulose obtido por acetilação de polpa Kraft.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )		
Polpa Kraft	Acetato de celulose	Atribuição
3409	3496	Estiramento O-H
2900	2961	Estiramento assimétrico CH <sub>3</sub>
-	1752	Estiramento de C=O de éster
1630	1642	Deformação de H <sub>2</sub> O
1425	1435	Deformação assimétrica CH <sub>2</sub>
1375	1370	Deformação simétrica CH <sub>3</sub>
-	1232	Estiramento C-O de acetato
1049	1049	Estiramento C-O do anel
903	899	Ligações glicosídicas $\beta$ -1-4 entre as unidades de glicose
-	607	Estiramento C-O dos grupos acetila

Fonte: Ribeiro (2012); Silverstein, Webster, Kiemle (2007).

Observa-se a partir da Figura 5.3 e da Tabela 5.1 que a celulose sofreu acetilação, confirmada principalmente pela diminuição da intensidade do pico próximo a 3400cm<sup>-1</sup>, associado aos grupamentos OH e aparecimento do pico de carbonila de éster (1752 cm<sup>-1</sup>), estiramento C-O de acetato e C-O de grupos acetila (1232 e 607 cm<sup>-1</sup>, respectivamente). O

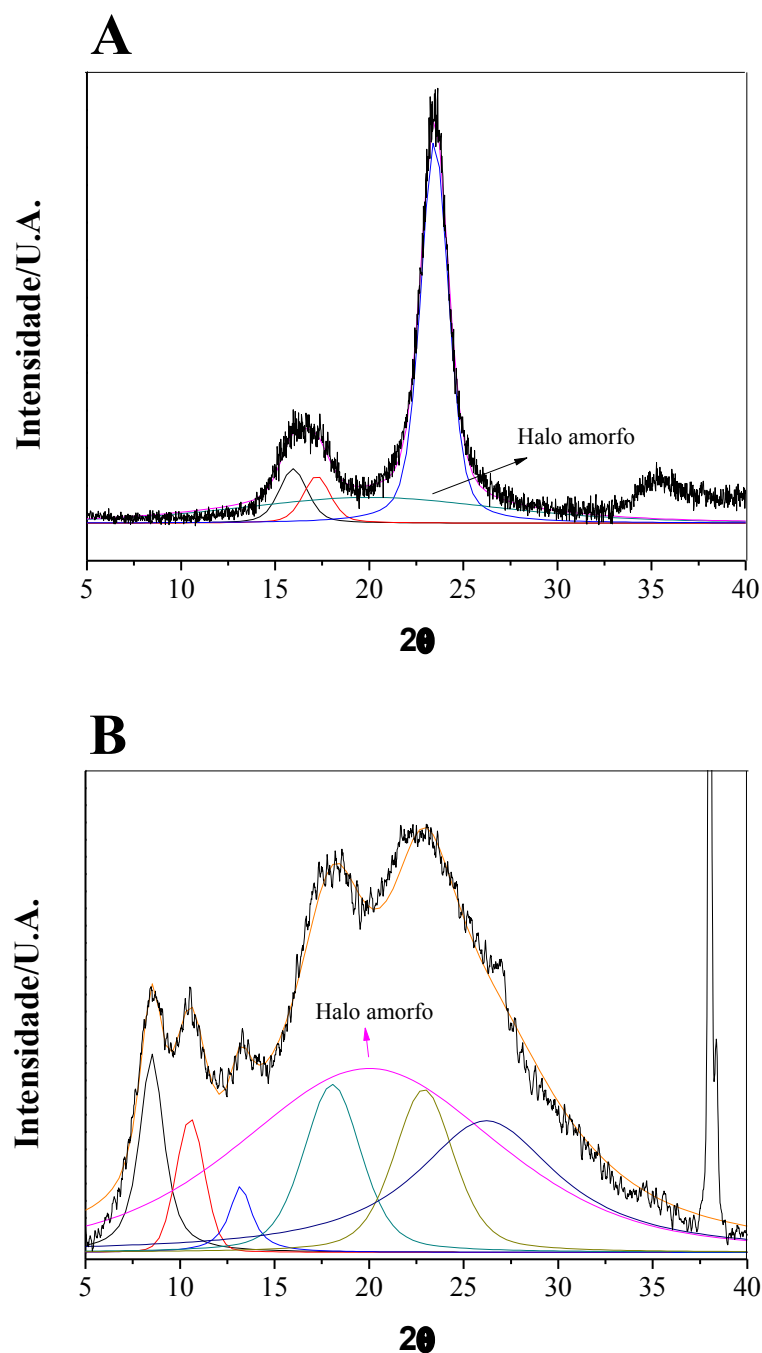
aparecimento desses picos é a maior evidência de que houve acetilação da celulose, já que outros picos são comuns aos dois materiais.

O grau de substituição do polímero foi obtido a partir da razão entre as absorbâncias dos picos de estiramento da ligação C=O e do estiramento da ligação O-H, descrito no item 4.3.2, atingindo um valor de 2,7, que indica que o material obtido é um triacetato de celulose (FISCHER *et al.*, 2008; KAMIDE; OKAJIMA; SAITO, 1981; PULEO *et al.*, 1989).

O grau de cristalinidade da celulose da polpa Kraft e do triacetato de celulose foram obtidos por difração de raios X, conforme apresentado na Figura 5.4. O perfil do difratograma de polpa Kraft (Figura 5.4 A) é típico de celulose tipo I, celulose nativa, que é um material semicristalino, e que apresenta um conjunto de picos sobrepostos em  $2\theta$  aproximadamente 16,0 e 17,5 e um pico de elevada intensidade em 23,5 ° com um halo amorfo centrado em aproximadamente 20° (FLAUZINO NETO, 2012; TONOLI, 2012). O perfil do difratograma é de um material semicristalino com um índice de cristalinidade de 67%.

O difratograma de triacetato de celulose apresenta picos centrados em  $2\theta = 8,5^\circ$ ,  $10,7^\circ$ ,  $13,4^\circ$ ,  $18,0^\circ$ ,  $22,5^\circ$  e  $26,0^\circ$ , com halo amorfo centrado em aproximadamente  $2\theta = 20^\circ$ . O comportamento observado no padrão de difração do triacetato de celulose em valores de baixo ângulo é típico para vários derivados celulósicos. A inserção de grupos volumosos como o grupo acetila leva a diminuição do valor de  $2\theta$  de  $16^\circ$  observado na celulose I para  $2\theta$  igual a  $8,5^\circ$  observado no difratograma do triacetato de celulose. Dessa forma, o pico em  $2\theta = 8,5^\circ$  está relacionado à desordem provocada pela acetilação da celulose e inserção do grupo acetila na molécula (RIBEIRO, E. 2013). A mudança no perfil dos difratogramas sugere uma diminuição da cristalinidade quando a celulose sofre acetilação. Barud *et al.* (2008) afirmam que a redução na cristalinidade de triacetato de celulose em relação à celulose ocorre devido à substituição dos grupos hidroxila por grupos acetila que são mais volumosos e a mudança do número e do padrão das ligações de hidrogênio nos materiais acetilados. O triacetato de celulose produzido neste trabalho apresenta índice de cristalinidade de 53%, obtido pela deconvolução dos picos e avaliação das áreas nos difratogramas apresentados na Figura 5.4.

Figura 5.4 – Difratometria de raios X de polpa Kraft (A) e triacetato de celulose (B) obtido a partir da polpa Kraft.

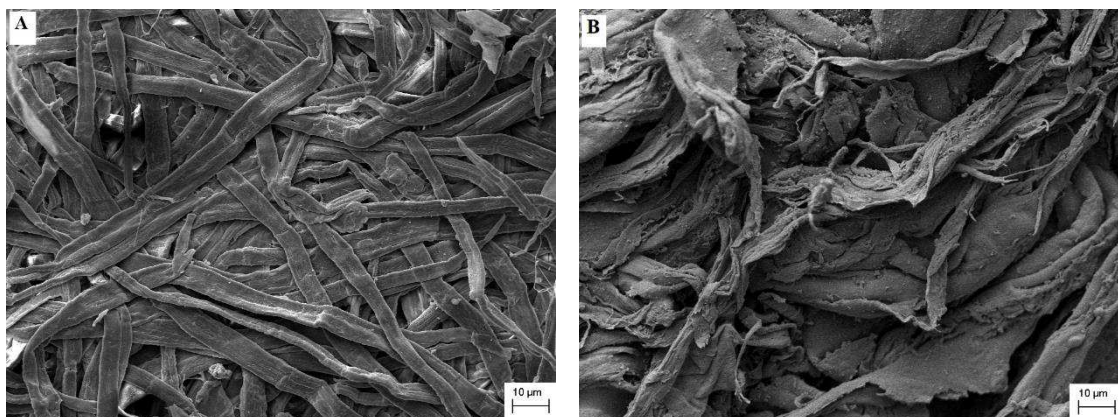


Fonte: A autora.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentadas na Figura 5.5, indicam a modificação da estrutura quando comparada a polpa Kraft (5.5 A) com o triacetato de celulose (5.5 B). Há uma modificação na estrutura das fibras da matéria-prima quando o material é acetilado. Durante a síntese ocorre inchamento das fibras devido à presença

do ácido acético glacial e hidrólise, que pode dar-se devido à presença do catalisador, ácido sulfúrico. Estes processos modificam a morfologia das fibras, inicialmente vistas, que se tornam um material de estrutura desorganizada.

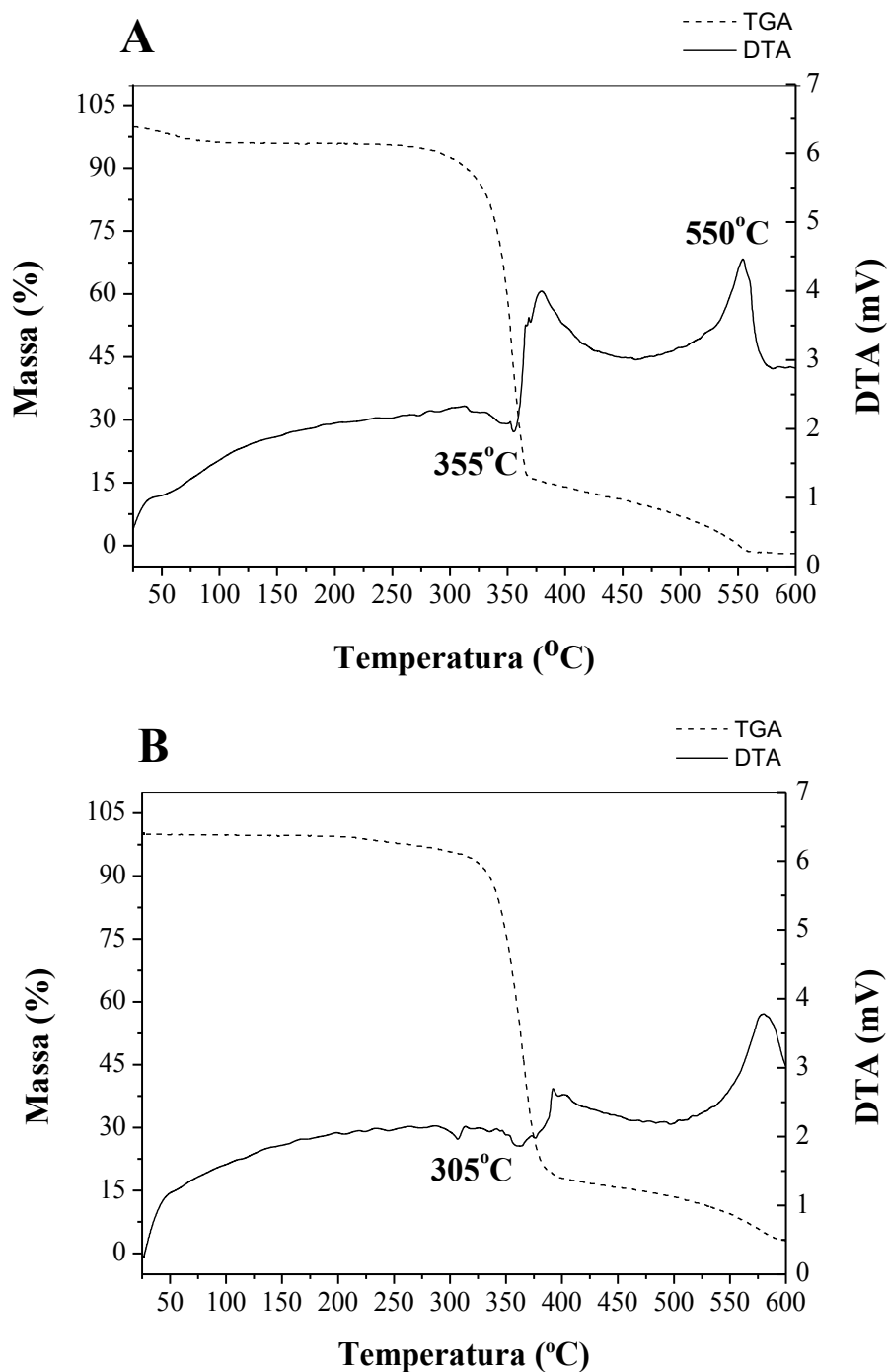
Figura 5.5 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para amostras de (A) polpa Kraft e (B) triacetato de celulose.



Fonte: A autora.

A Figura 5.6 apresenta os dados de análise termogravimétrica (TGA) para celulose da polpa Kraft e TAC. A curva termogravimétrica (linha pontilhada) da celulose (Figura 5.6 A) apresenta 3 eventos térmicos significativos, o primeiro entre 30 a 105 °C, relacionado a volatilização da água, o segundo processo refere-se à decomposição térmica iniciado em aproximadamente 250 °C, com uma perda de massa significativa de cerca de 80 %. No segundo evento, ocorre ruptura das cadeias poliméricas e fragmentação do polímero com volatilização dos produtos de degradação. No terceiro evento observa-se perda de massa relacionada à decomposição final dos resíduos do processo. A curva DTA (análise térmica diferencial) (linha sólida) pode apresentar além dos eventos em que ocorre perda de massa da amostra, outros eventos térmicos nos quais ocorrem processos como cristalização e fusão, sem perda de massa. A curva DTA para a celulose apresenta um pico endotérmico centrado em 60 °C, relacionado à volatilização da água, um pico endotérmico em 355 °C, relacionado ao início do processo de decomposição térmica com ruptura de grupos laterais e seguimentos da cadeia polimérica e, por fim, um evento exotérmico em 550 °C, onde ocorre a decomposição dos resíduos remanescentes do segundo evento.

Figura 5.6 – Curva TG (linha tracejada) e DTA (linha sólida) para celulose de polpa Kraft (A) e triacetato de celulose produzido a partir de polpa Kraft (B).



Fonte: A autora.

A curva termogravimétrica do triacetato de celulose (linha tracejada), indicada na Figura 5.6 B, apresenta três eventos térmicos típicos. O primeiro evento, pequena perda de massa a temperatura próxima de 100 °C, é atribuído a volatilização da água ligada a matriz polimérica.

Este evento apresenta uma perda de massa bem inferior ao apresentado para a celulose, aspecto esperado, considerando que o TAC é um polímero hidrofóbico quando comparado a celulose não modificada. O segundo evento está relacionado ao processo de decomposição térmica e se inicia por volta de 340 °C com perda de massa superior a 85%, que acontece devido a decomposição do polímero com cisão da cadeia polimérica (RIBEIRO, 2012). O terceiro evento, que se inicia em aproximadamente 400 °C, está relacionado à decomposição dos resíduos remanescentes dos processos anteriores. Considerando a temperatura em que se inicia o processo de decomposição, o material apresenta boa estabilidade térmica, principalmente pelo fato que será aplicado como suporte em reações enzimáticas cujas temperaturas não serão superiores a 70 °C.

Na curva DTA para o TAC (linha sólida da Figura 5.6 B) é possível observar os picos relacionados aos eventos térmicos de decomposição do polímero anteriormente citados e ainda um pico endotérmico em 305 °C, este evento está relacionado a fusão do TAC que ocorre nesta temperatura (RIBEIRO, 2012). Os resultados confirmam a produção do TAC e estão de acordo com o padrão de FTIR e com o grau de substituição encontrado.

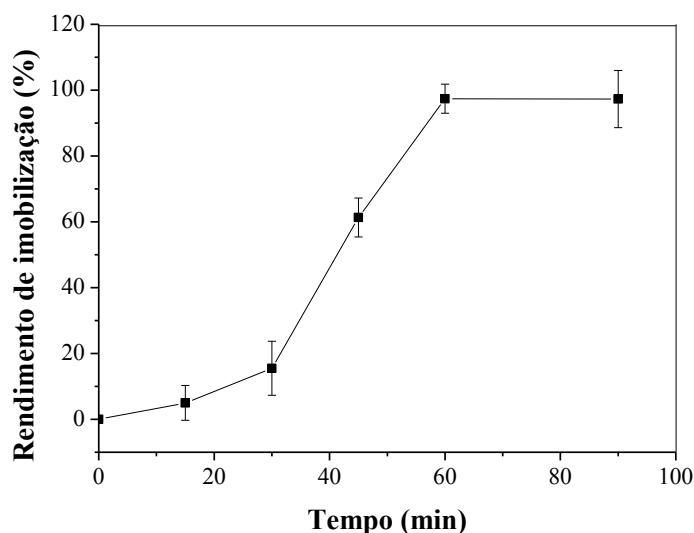
## 5.2 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

A enzima Lecitase Ultra® (LU) apresentou atividade enzimática de 335 U/mL, em que uma unidade de enzima equivale à liberação de 1 µmol de *p*-nitrofenol/min, dosagem de proteína de 5,57 mg/mL, totalizando uma atividade específica de 60 U/mg de proteína.

A atividade enzimática foi obtida a partir da hidrólise do palmitato de *p*-nitro fenila (*p*-NPP). A atividade enzimática é determinada a 410 nm, pelo desenvolvimento de coloração amarela obtida na liberação do *p*-nitrofenol (*p*-NP), como descrita no item 4.4.1.

Com o propósito de definir o tempo necessário para a imobilização máxima de enzima no suporte TAC o rendimento de imobilização foi medido em função do tempo, conforme definido anteriormente em 4.5.1. Observou-se  $97 \pm 4,4$  % de rendimento de imobilização após 60 min de imobilização (Figura 5.7) e o biocatalisador obtido (LU-TAC) apresentou atividade de 976 U/g. A imobilização de LU em TAC deu-se provavelmente por ativação interfacial, mecanismo peculiar das lipases que exibem sua “forma aberta” na presença de superfícies hidrofóbicas e em meios de baixa força iônica (MANOEL *et al.*, 2015).

Figura 5.7 – Rendimento de imobilização versus tempo de incubação para LU em TAC.



Fonte: A autora.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DE LU-TAC

A Figura 5.8 apresenta a microscopia de varredura de amostra de LU-TAC. Observa-se que a estrutura nítida das fibras que é bem aparente na celulose original e aparece de forma desorganizada e mais compactada no TAC fica menos evidente e mais compactada para LU-TAC. Este comportamento pode estar associado ao processamento de TAC, onde um possível inchamento e novo processo de secagem leva a agregação do triacetato de celulose.

A Figura 5.9 apresenta os espectros na região do infravermelho para o TAC e para LU-TAC.

Figura 5.8 – Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura para amostra de triacetato de celulose (B) e TAC com lipase imobilizada por adsorção física (C).

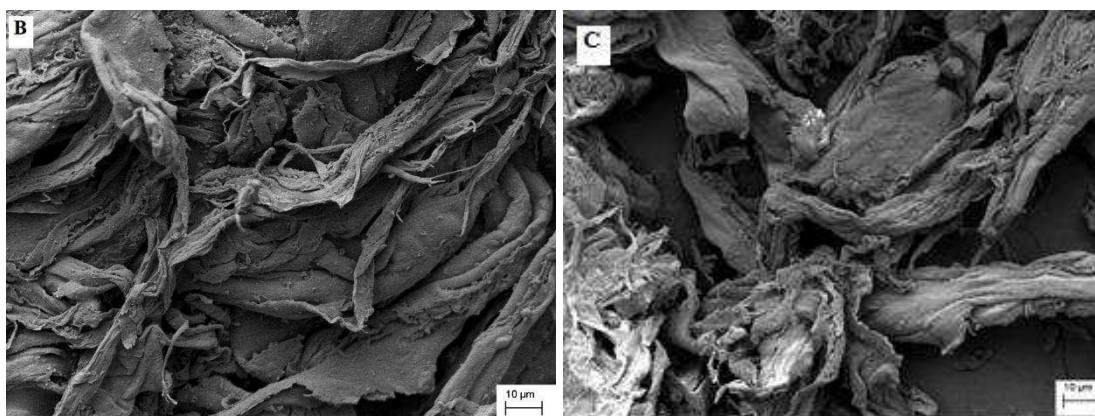
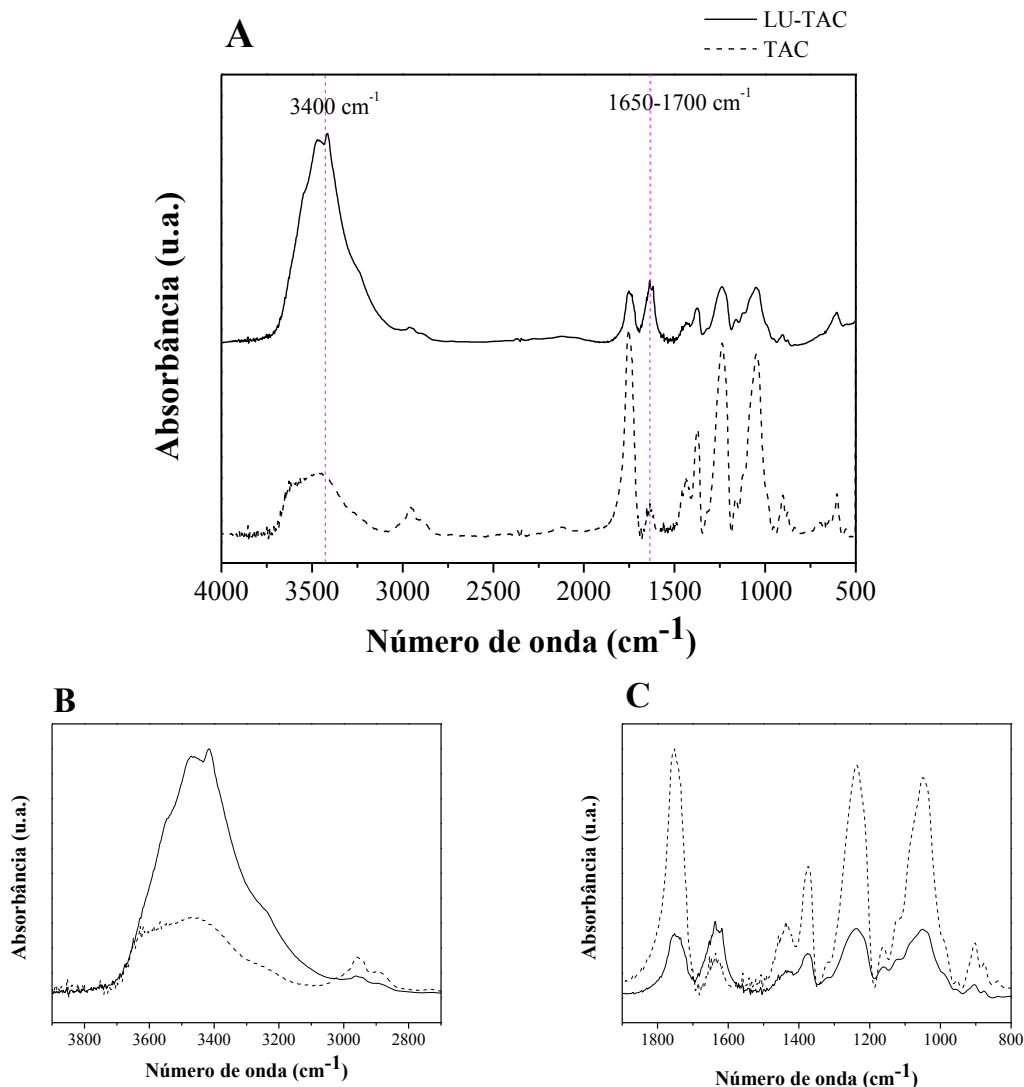




Figura 5.9 - Espectros na região do infravermelho para o TAC e LU-TAC (A) de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  e (B) e (C) regiões ampliadas.



Fonte: A autora.

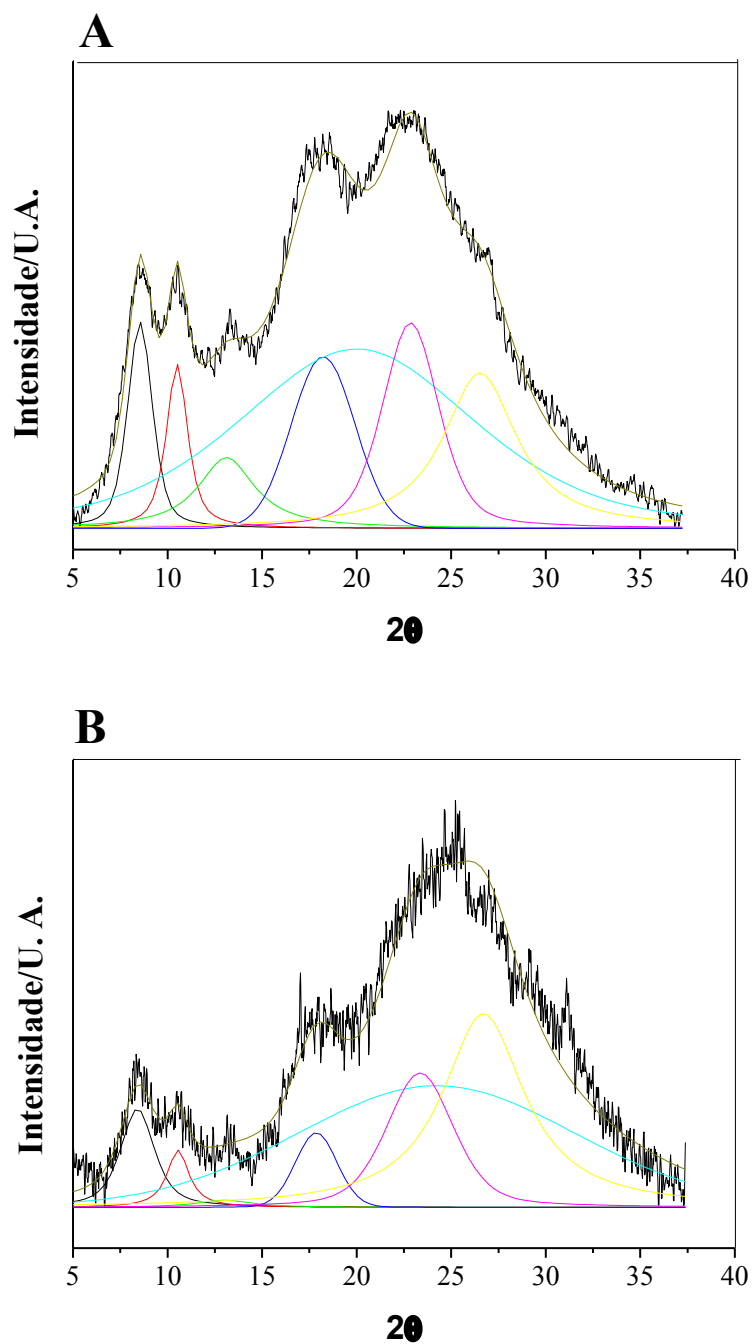
Na figura 5.9 observa-se que LU-TAC mantém grande parte das características do TAC original, com exceção da região de estiramento O-H e uma ligeira mudança na região de 1660 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 5.9 A). A banda em aproximadamente 3400  $\text{cm}^{-1}$  representa um perfil típico de estiramento O-H atribuído a água adsorvida e estiramento N-H, típicas da estrutura polipeptídica das enzimas, melhor observada na Figura 5.9 B. Os polipeptídeos apresentam uma estrutura bem característica relacionada a presença do grupo amida que pode ser classificado em amida I e amida II. A banda relacionada a amida I é atribuída ao estiramento da carbonila,  $\text{C}=\text{O}$ , do grupo (CONH) e aparece entre 1700 a 1650  $\text{cm}^{-1}$ , como pode ser observado na Figura 5.9 C. A banda em 1650  $\text{cm}^{-1}$  também pode ser influenciada pela presença de água, uma vez

que a deformação angular da molécula de água aparece entre 1640 a 1645  $\text{cm}^{-1}$ . Em LU-TAC, a contribuição das bandas da enzima é pequena, entretanto suficiente para indicar sua imobilização. Ainda é importante ressaltar que, a enzima pode estar homogeneamente dispersa no polímero, o que tornaria ainda mais difícil sua detecção por espectroscopia na região do infravermelho.

A estrutura cristalina do catalisador LU-TAC foi determinada pela técnica de difração de raios-X e os resultados comparados com o TAC. A Figura 5.10 apresenta as curvas de difração de Raios-X para TAC e LU-TAC.

O TAC é um polímero semicristalino, aspecto que pode ser observado no perfil do difratograma da Figura 5.10 (A) e confirmado pela curva DTA, através do aparecimento de um pico endotérmico em 305 °C, atribuído à fusão do TAC. A adsorção física do extrato enzimático comercial leva a modificação do perfil da curva de difração de LU-TAC em comparação ao TAC original. Observa-se uma redução da intensidade de alguns picos de difração em comparação a TAC. Além da redução da intensidade observa-se também um aumento da largura a meia altura. Estas mudanças indicam que o extrato enzimático é adsorvido pelo polímero devido a uma boa interação deste com a enzima e com o sorbitol, que faz parte dos componentes da fórmula do extrato comercial, e pode atuar como um plastificante. O inchamento do TAC não é geralmente superior a 12 % e o efeito de plasticização ocorre predominantemente nas regiões amorfas e nas regiões com certa organização bidimensional (amorfo rígido) que apresentam um baixo grau de ordem, desta forma alterando pouco a estrutura cristalina do polímero. Este aspecto pode ser confirmado pelo fato do índice de cristalinidade das amostras serem praticamente iguais: 53% para o TAC e 51% para o sistema LU-CTA.

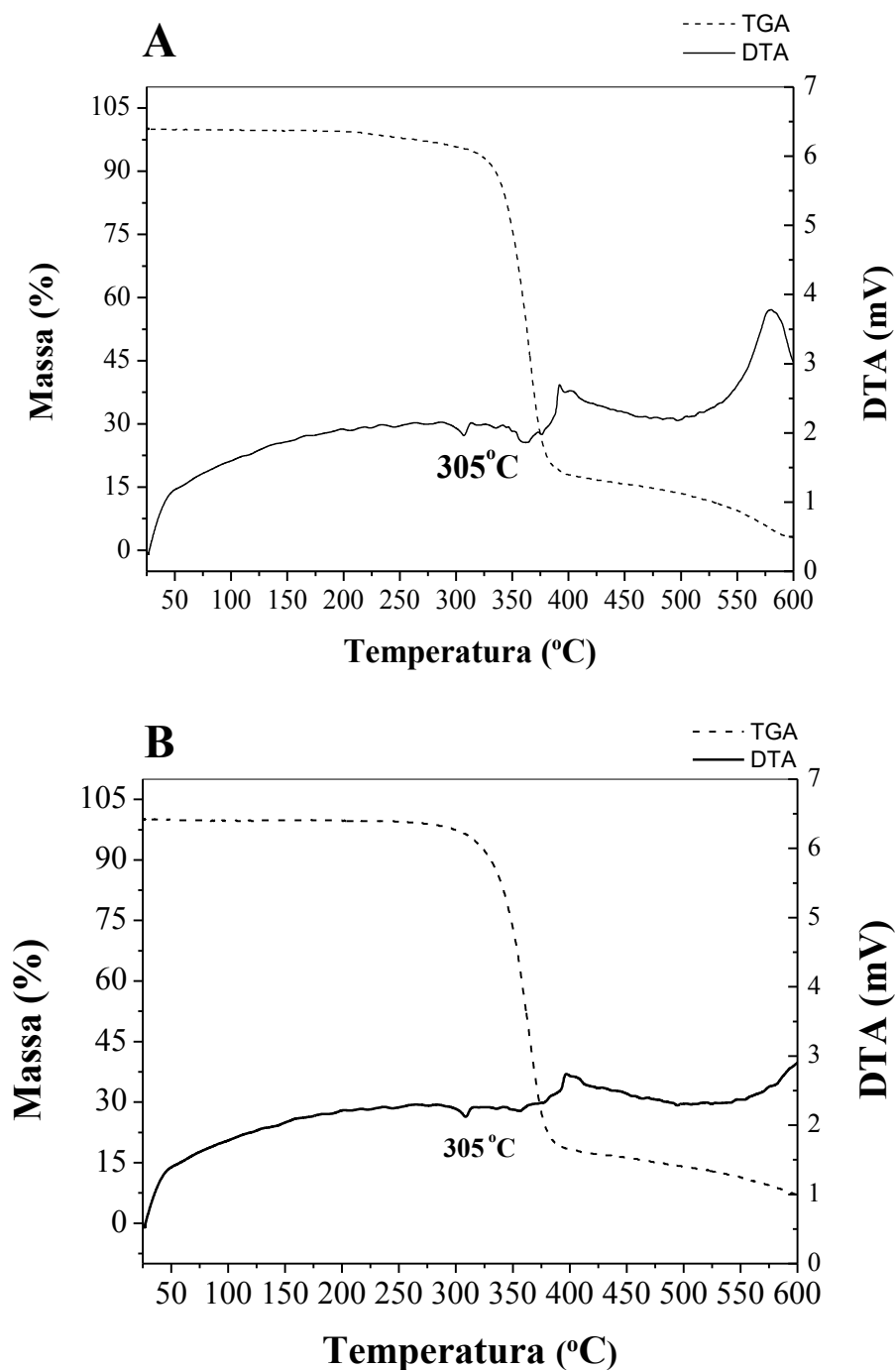
Figura 5.10 – Curva de Difração de raios-X para TAC (A) e LU-TAC (B).



Fonte: A autora.

A Figura 5.11 apresenta as curvas TG e DTA para LU (Figura 5.11 A) e LU-TAC (Figura 5.11 B).

Figura 5.11 - Curvas TGA (linha pontilhada) e DTA (linha sólida) para TAC (A) e LU-TAC. (B).



Fonte: A autora.

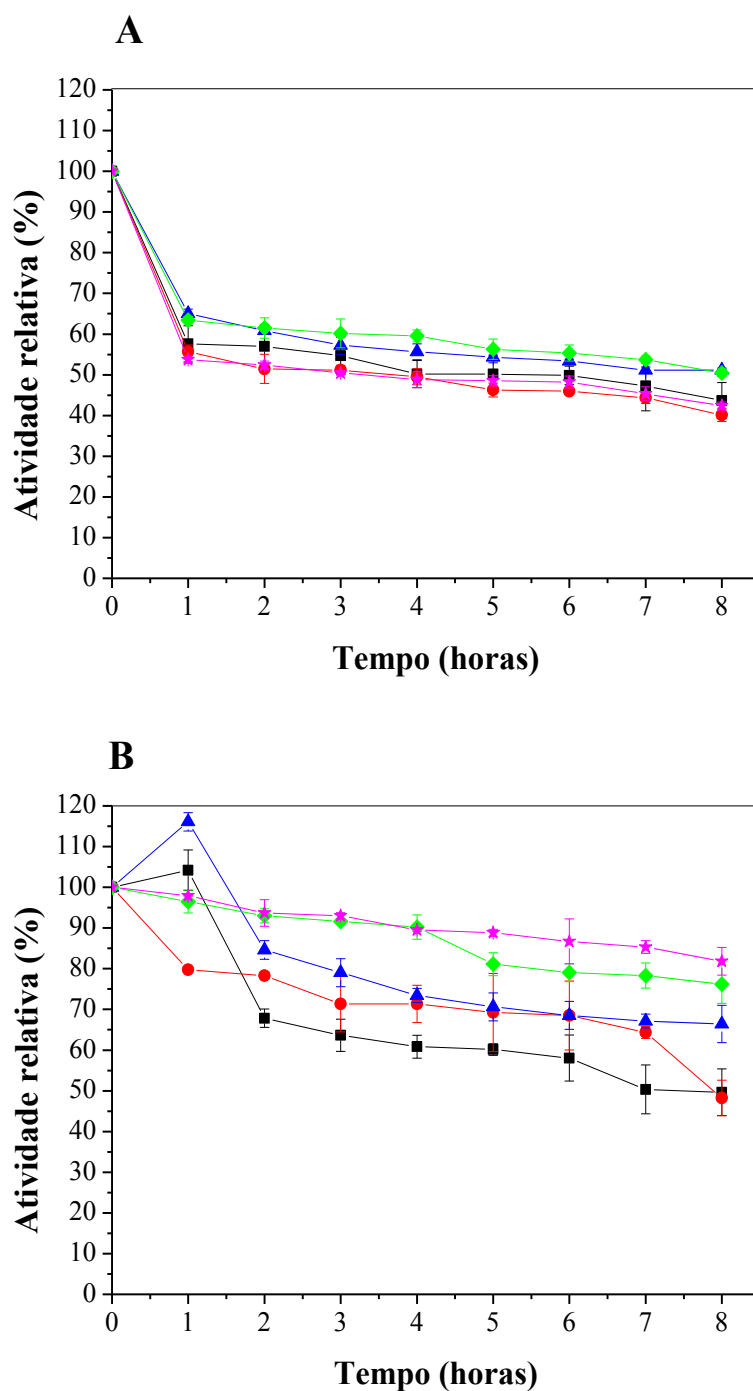
Observa-se na curva TGA (linha pontilhada) da Figura 5.11 B que a estabilidade térmica de LU-TAC é mantida quando comparada a TAC (Figura 5.11 A) e, neste caso, a adsorção do extrato enzimático não altera a estrutura macromolecular, o que indica um processo de adsorção física. O mesmo aspecto pode ser observado na curva DTA (linha sólida) em que se observa nitidamente a temperatura de fusão do TAC. Não observa-se um deslocamento significativo da

posição do pico, aspecto que indica baixa interação e acesso à estrutura cristalina. As mudanças observadas no DRX estão relacionadas a regiões de baixo ordenamento que são afetadas pela presença das moléculas de sorbitol presentes no extrato enzimático. Neste sentido, possíveis alterações na temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) do TAC poderiam ser esperadas. Entretanto, a medida realizada não é eficiente na avaliação da  $T_g$ .

### **5.3.1 Estabilidade térmica de LU e LU-TAC**

A estabilidade térmica de LU e LU-TAC foi comparada nas temperaturas de 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C. A Figura 5.12 A mostra o comportamento da LU livre, em termos de atividade relativa com o tempo. Observa-se que com uma hora de incubação na temperatura de 30 e 35 °C a enzima sofre uma inativação de aproximadamente 35 % chegando às 8 h com uma perda de atividade próxima de 50 %. As temperaturas de 40 °C, 45 °C e 50 °C apresentaram inativação de 43 %, 45 % e 47 %, respectivamente. A Figura 5.12 B apresenta o comportamento de LU-TAC. A 30 °C notou-se que na primeira hora de experimento, LU-TAC sofre aumento na atividade e nas horas seguintes a enzima inativa apresentou uma atividade enzimática relativa final de 56 % em 8h de incubação. Para 45 °C, comportamento semelhante foi observado: aumento na atividade na primeira hora de experimento apresentando uma atividade enzimática relativa final de 48 %, valor aproximado ao obtido para a temperatura de 50 °C. Observando os resultados apresentados, nota-se que LU-TAC é mais estável nas temperaturas de 35 °C e 40 °C com uma inativação de 24 e 19,3 %, respectivamente, em 8 horas de experimento.

Figura 5.12 – Estabilidade térmica da lipase LU nas temperaturas de 30 °C (▲), 35 °C (◆), 40 °C (★), 45 °C (■) and 50 °C (●) em tampão fosfato de sódio 25mM, pH7 e determinação de atividade enzimática por reação de *p*-NPP para (A) LU e (B) LU-TAC.



Fonte: A autora.

O aumento de temperatura geralmente provoca um aumento da velocidade de reação, com ou sem catalisadores. No entanto, as enzimas são sistemas biológicos de natureza

complexa, com atividade catalítica dependente de sua estrutura terciária e isso deve ser levado em consideração.

A Tabela 5.2 mostra os valores de constante de inativação ( $k_d$ ) e tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) para enzima livre e imobilizada. Em ambos os casos, as mudanças nos valores de  $k_d$  são observadas para as temperaturas avaliadas. As mudanças nos valores de  $k_d$  estão relacionadas à ocorrência de dois processos competitivos: i) o aumento da taxa de reação catalisada devido ao aumento da temperatura e ii) a altas temperaturas, a redução da taxa de reação devido à inativação da enzima. Assim, o aumento de  $k_d$  indica que a inativação da enzima é predominante na temperatura avaliada e, nessa condição, a reação enzimática ocorrerá mais lentamente.

Tabela 5.2 – Constante de inativação ( $k_d$ ) e tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) para LU livre e imobilizada em TAC (LU-TAC) para várias temperaturas.

T (°C)	$k_d$ (h <sup>-1</sup> )		$t_{1/2}$ (h)	
	LU livre	LU-TAC	LU livre	LU-TAC
30	0,062 ± 0,0013	0,050 ± 0,0058	11,18 ± 0,25	13,69 ± 1,63
35	0,058 ± 0,0039	0,036 ± 0,0055	11,84 ± 0,71	19,25 ± 4,27
40	0,069 ± 0,0028	0,024 ± 0,0013	10,01 ± 0,61	29,37 ± 1,71
45	0,071 ± 0,0091	0,076 ± 0,0067	9,76 ± 1,18	9,07 ± 0,84
50	0,077 ± 0,0057	0,064 ± 0,0074	9,00 ± 0,68	10,77 ± 1,17

Fonte: A autora.

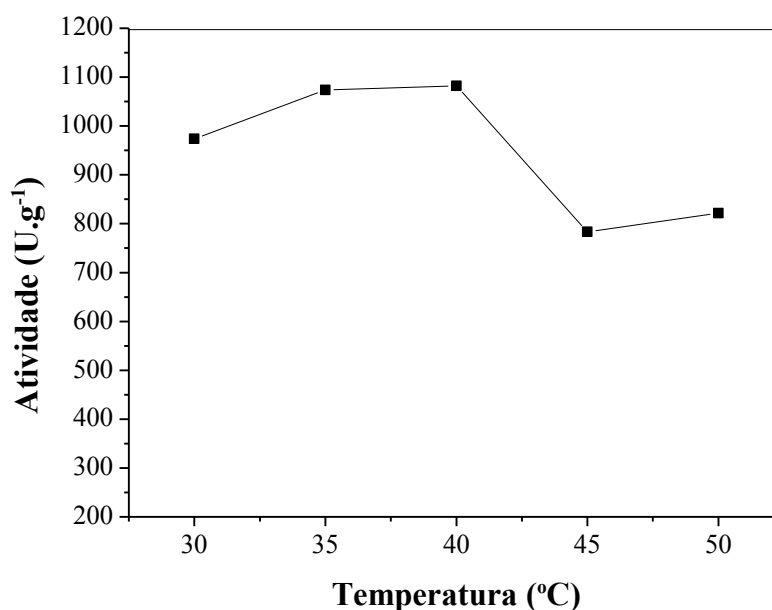
Para a enzima livre os valores da atividade relativa (%) (Figura 5.13 A) estão próximos, bem como os dados de  $k_d$  (Tabela 5.2), que sofreram alterações menores nas temperaturas de incubação entre 30 e 35 ° C. Este resultado indica que, para esta condição, a estabilidade da enzima é mantida. Para temperaturas superiores a 40 °C, há uma diminuição da atividade relativa (%), acompanhada de um pequeno aumento nos valores de  $k_d$  que mostra uma tendência de inativação da enzima. Este efeito pode ser confirmado quando observamos os dados obtidos para a enzima imobilizada. Na Figura 5.13, observa-se um aumento na atividade relativa que atinge a melhor condição a 40 ° C. A temperaturas acima de 40 °C, o sistema apresenta uma diminuição da atividade relativa (%) mais pronunciada e um aumento de valores de  $k_d$ , indicando que o sistema se torna termicamente instável. Nesse sentido, a imobilização da enzima no suporte estabiliza o sítio ativo e minimiza a mudança da estrutura terciária na faixa de temperatura considerada.

O tempo de meia-vida tem o valor mais alto na temperatura de 35 °C. Observa-se um aumento no tempo de meia-vida em comparação com 30 °C, e os valores diminuem para

temperaturas superiores a 35 °C. Para enzimas imobilizadas, os valores aumentam significativamente para temperaturas entre 30 a 40 °C, sendo o máximo a 40 °C. Os valores de tempo de meia-vida obtidos foram 29,37 h para a enzima imobilizada. Esse valor é 3 vezes maior que o da enzima livre na mesma temperatura.

Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos de Mishra *et al.* (2009), que estudou a estabilidade térmica da LU através da medição da atividade relativa após incubação a uma dada temperatura durante 1 h. No estudo, a temperatura de incubação variou entre 30 e 70 °C. Os resultados mostraram que a enzima é estável até 50 °C e perde sua atividade rapidamente a 60 °C, com uma atividade relativa de cerca de 10%. Para as temperaturas de incubação entre 30 e 40 °C, as atividades relativas são próximas e apresentam valores entre 80% e 90%. A atividade da enzima foi dependente da temperatura, conforme ilustrado na Figura 5.13. LU-TAC exibiu a atividade máxima a 40 °C, a mesma temperatura descrita na literatura para a enzima livre (YANG *et al.*, 2006).

Figure 5.13 - Temperatura ótima para LU-TAC com atividade enzimática medida a pH 7.



Fonte: A autora.

### 5.3.2 Efeito do pH na estabilidade de LU e LU-TAC

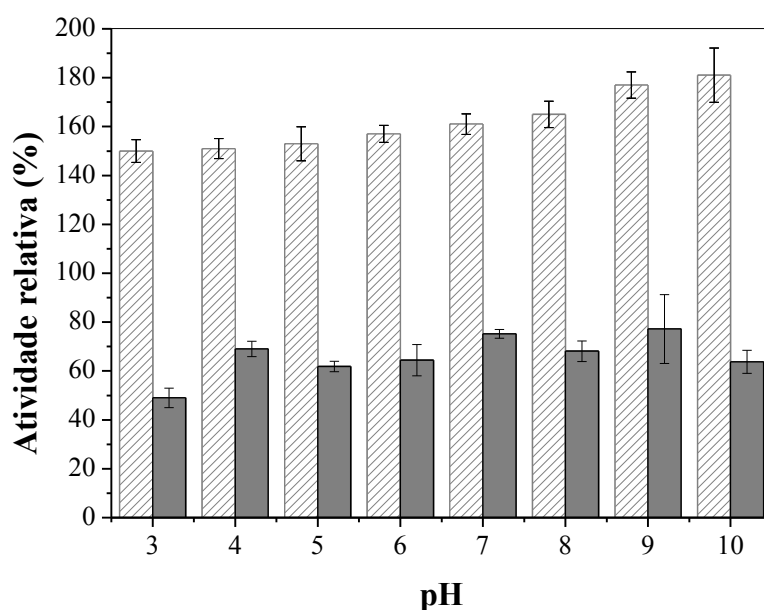
Os resultados do estudo de pH, mostrado na Figura 5.14, indicam que, em comparação com a LU livre, a lipase imobilizada apresentou aumento na atividade em todos os pHs



estudados. Além disso, em valores de pH mais altos (mais alcalinos) as atividades enzimáticas são mais acentuadas. A LU imobilizada em Octyl-Sepharose também mostrou maior atividade com um aumento de pH (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014).

Para verificar a diferença entre os valores de atividade para a enzima livre e a enzima imobilizada, um teste de hipóteses foi proposto. O valor de p para o teste de hipótese para cada pH é apresentado na Tabela 5.3. A hipótese de que LU livre e LU-TAC tem a mesma estabilidade foi considerada a hipótese nula ( $H_0$ ): LU e LU-TAC com estabilidade diferente para cada pH foi hipótese alternativa ( $H_1$ ): este teste foi feito em nível de significância estatística de 5%.

Figura 5.14 – Avaliação da atividade relativa (%) em relação a variação de pH entre 3 e 10 para enzima LU livre (cor sólida) e LU imobilizada em TAC (listrado).



Fonte: A autora.

Tabela 5.3 - p-valor para o teste de hipóteses que verificou a diferença entre a estabilidade do pH para LU livre e LU-TAC.

pH	p-valor
3	0,002213768
4	0,001215337
5	0,002850109
6	0,002422272
7	0,001211951
8	0,001342396
9	0,005351883
10	0,000951621

Fonte: A autora.

O valor p para os testes de hipóteses para LU e LU-TAC apresentou valores mais baixos do que o nível de significância estatística de 5% (para todos os pHs). Isso confirma que o valor está na região de rejeição da hipótese nula. Assim, a hipótese alternativa é aceita com 95% de confiança, demonstrando que há diferenças estatísticas entre LU livre e imobilizado.

Embora seus substratos sejam hidrofóbicos, as lipases são solúveis em água. Isto sugere que o sítio catalítico está escondido dentro da estrutura da proteína e que está exposto na interface lipídica-água (ativação interfacial). Assim, uma tampa cobre o local catalítico tornando a enzima inativa, mas na presença da interface ela sofre uma mudança conformacional e abre para revelar o sítio ativo. Estudos mostraram que a encapsulação de tais lipases usando suportes hidrofóbicos pode levar à hiperativação da lipase, uma vez que a hidrofobicidade da lipase é encapsulada em uma forma ativa "aberta". Esse fato geralmente torna as lipases mais estáveis sob diferentes condições de temperatura, pH e meios de reação (EGGERT *et al.*, 2002).

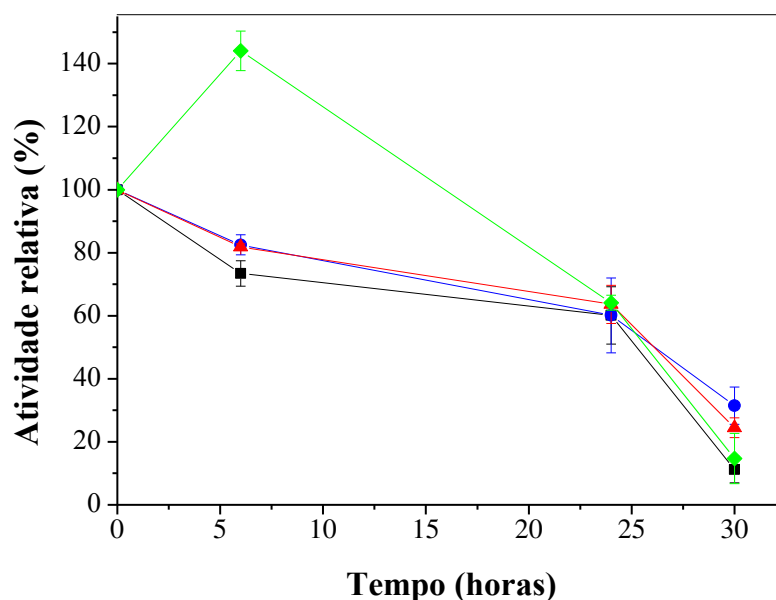
### 5.3.3 Efeito de solventes orgânicos

Estudou-se o efeito de solventes orgânicos na estabilidade da lipase LU imobilizada em TAC utilizando etanol, metanol, propanol e *n*-hexano à uma concentração final de 50 % (v/v), sob agitação mecânica durante 30 horas à 25 °C.

A Figura 5.15 mostra os perfis de estabilidade de LU-TAC na presença dos diferentes solventes orgânicos.

LU-TAC apresentou aumento na atividade na presença de *n*-hexano em 6 h de incubação. Com 24 h de incubação, LU-TAC apresentou atividade relativa semelhante em todos os solventes orgânicos estudados, com inativação de aproximadamente 38 %.

Figura 5.15 – Avaliação da atividade relativa (%) de LU-TAC na presença de metanol (■), etanol (●), propanol (▲) e *n*-hexano (◆).



Fonte: A autora.

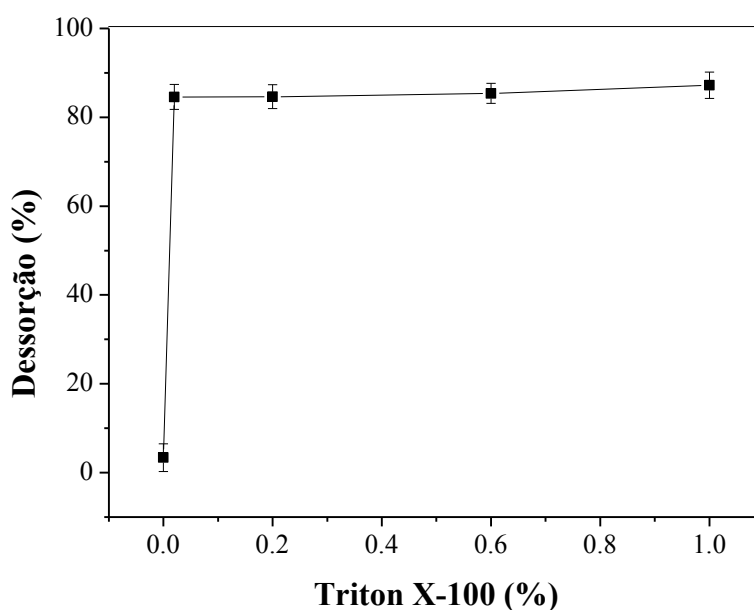
O uso de solventes orgânicos na síntese enzimática de FAME reduz a viscosidade do sistema reacional e ajuda na transferência de massa, melhorando a solubilidade mútua de triglicerídeos hidrofóbicos e álcoois hidrofílicos, protegendo as enzimas da desnaturação por altas concentrações de álcoois e garantindo a transesterificação com a adição de álcool em apenas um passo. Alguns solventes orgânicos utilizados para esta aplicação são isooctano, *n*-heptano, éter de petróleo, *n*-hexano, ciclo-hexano e terc-butanol. Através da utilização destes solventes, também foi observado um aumento na taxa de transesterificação (SALIHU; ALAM, 2015).

### 5.3.4 Dessorção enzimática

A imobilização por adsorção de enzimas tem algumas vantagens em relação à imobilização covalente: o suporte pode ser reutilizado após a inativação, minimizando custos; os suportes podem ser estáveis por longos períodos, mesmo sob temperaturas não controladas, e os protocolos de imobilização são muito simples (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

Com a finalidade de avaliar o reaproveitamento do suporte, foram realizados ensaios de dessorção da enzima assistida pelo tensoativo Triton 100-X. Avaliou-se a dessorção das Lipases na presença de Triton X-100 nas concentrações 0,02, 0,2, 0,5 e 1,0 % (v/v), conforme apresentado na Figura 5.16. Observou-se que 84,5 % da lipase foi dessorvida do suporte com o emprego de uma solução de concentração de 0,02 % de Triton X-100. Com o aumento da concentração da solução do tensoativo observou-se um pequeno aumento na dessorção. Esse resultado indica que a remoção da enzima ocorre com certa facilidade com emprego de baixas concentrações do tensoativo, o aumento da concentração deste surfactante não melhora significativamente a remoção da enzima. A fácil remoção de 85 % da enzima permite a reutilização do suporte para outra imobilização enzimática.

Figura 5.16 – Dessorção em LU-TAC na presença de Triton X-100.



Fonte: A autora.

Cabrera *et al.* (2009) observaram que a quantidade de surfactante para a dessorção enzimática completa depende do tipo de biocatalisador produzido. Em seus estudos, dependendo do biocatalisador, foram utilizadas diferentes concentrações de Triton X-100, variando de 1 a 4%, para a dessorção completa de lipase.

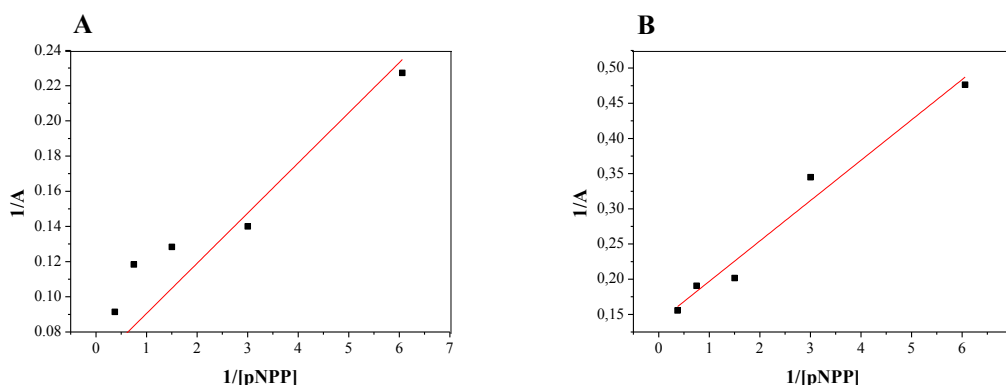
A adsorção da lipase no suporte deve ser forte para evitar a dessorção durante a sua aplicação em certa reação. Porém, a dessorção das lipases para reutilização do suporte ou para

a purificação das enzimas é uma vantagem, uma vez que este fato consiste da reversibilidade do processo de adsorção-dessorção (PALOMO *et al.*, 2005a).

### 5.3.5 Determinação dos Parâmetros Cinéticos aparentes ( $K_m$ e $V_{max}$ )

As constantes cinéticas foram determinadas utilizando como substrato *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP). As atividades da lipase livre e imobilizada (LU-TAC) foram avaliadas em diferentes concentrações de substrato (0,16 – 2,7 mM). Os resultados foram plotados em gráficos de Lineweaver & Burk. Logo,  $V_{max}$  indica a máxima velocidade possível para a transformação correspondente, enquanto o  $K_m$  indica a afinidade da enzima pelo substrato. A análise cinética demonstra que a dependência da atividade lipolítica de lipases livres e imobilizadas pode ser descrita pelo modelo de Michaelis-Menten. A Figura 5.17 apresenta os dados de ajuste para (A) enzima livre e (B) enzima imobilizada.

Figura 5.17 - Gráficos de Lineweaver-Burk para (A) LU ( $R^2=0,94$ ) e (B) LU-TAC ( $R^2=0,96$ ).



Fonte: A autora.

A Tabela 5.4 apresenta os dados de  $K_m$ ,  $V_{max}$  e eficiência catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) para LU e LU-TAC.

Tabela 5.4 – Parâmetros cinéticos para LU livre e imobilizada em TAC.

LU	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ )	$V_{max}/K_m$
Livre	0,24	11,07	46,12
Imobilizada	0,41	7,09	17,29

Fonte: A autora.

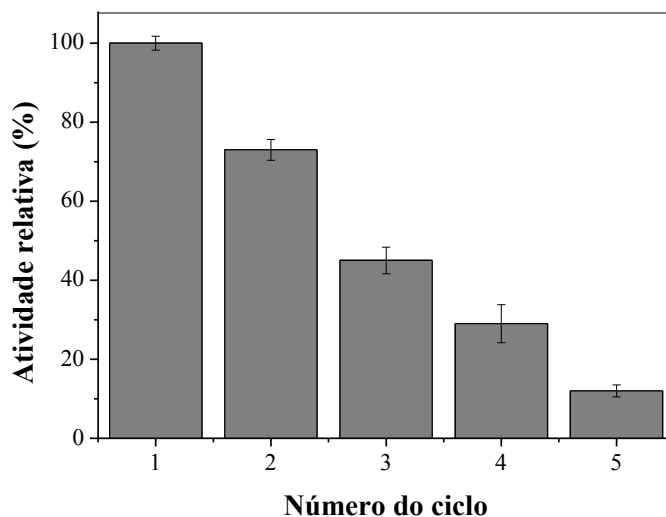
A enzima imobilizada em triacetato de celulose apresentou  $K_m$  maior que a enzima livre.  $K_m$  é uma constante relacionada com a afinidade da enzima pelo substrato. Na forma imobilizada, a enzima apresentou um valor 1,7 vezes maior, indicando menor afinidade por *p*-NPP. A mudança do valor do  $K_m$  indica que a enzima modifica parcialmente sua estrutura para se acomodar na superfície do polímero devido a boa interação entre a enzima e o suporte. Esta imobilização modifica parcialmente o comportamento da enzima e, portanto, muda o valor de  $K_m$  em relação a enzima original.

O valor de  $V_{m\acute{a}x}$  para a enzima imobilizada foi menor que o valor obtido para a enzima livre. A velocidade máxima de reação para a enzima imobilizada é 1,6 vezes menor que a encontrada para enzima livre. A formação de partículas poliméricas pequenas podem causar aglomerações, o que dificultaria a interação entre a enzima imobilizada e o substrato. Esse comportamento pode explicar o valor maior de  $K_m$ , a baixa  $V_{m\acute{a}x}$  encontrada para a enzima imobilizada e a menor eficiência catalítica ( $V_{m\acute{a}x}/K_m$ ) da enzima na forma imobilizada (CIPOLATTI *et al.*, 2015). Esta diminuição da eficiência catalítica, no entanto, não inviabiliza o emprego do sistema LU-TAC na catálise enzimática, fato que será observado nos testes de desempenho deste na transesterificação do óleo de soja.

### 5.3.6 Reutilização de LU-TAC

Para avaliar o reuso do biocatalisador, LU-TAC foi submetido a vários ciclos de hidrólise de *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP). A atividade relativa foi medida a cada ciclo e comparada com a atividade obtida após o primeiro ciclo. A Figura 5.18 apresenta os resultados obtidos.

Figura 5.18 - Reuso de LU-TAC na hidrólise de *p*-NPP. Reações realizadas de acordo com a Seção 4.4.1.



Fonte: A autora.

A LU-TAC mostrou um decréscimo de atividade após cada ciclo, restando mais de 50 % da atividade após apenas dois ciclos. A perda de atividade pode estar relacionada à dessorção da enzima do suporte, possivelmente causada pelas várias etapas do teste. Outro fator que pode ter levado à perda de atividade ao longo dos ciclos é a presença do Triton X-100 utilizado para preparação da solução de substrato *p*-NPP. Como visto anteriormente (Seção 5.3.4), esse surfactante favorece a dessorção da enzima inicialmente imobilizada no suporte. Turati *et al.* (2017) também observaram comportamento semelhante ao avaliar a dessorção de lipase de *Penicillium* sp. Section Gracilenta (CBMAI 1583) imobilizada por adsorção física e utilizando Triton X-100 na preparação do substrato.

A imobilização de lipases por adsorção física tem um problema principal: a dessorção das enzimas quando expostas a altas temperaturas ou na presença de detergentes, solventes orgânicos ou alguns produtos de reação (VIRGEN-ORTÍZ *et al.*, 2017). Para minimizar esses efeitos, alguns suportes heterofuncionais foram propostos, contendo: grupos catiônicos/aniônicos (RUEDA *et al.*, 2016), glutaraldeído (VESCOVI *et al.*, 2016), glioxil (BERNAL; ILLANES; WILSON, 2014), epóxido (GUAJARDO *et al.*, 2015). Recentemente, Fernandez-Lopez *et al.* (2017) propuseram a produção de revestimento físico de lipases imobilizadas em octil-agarose usando polímeros iônicos para imobilizar fisicamente por redes diferentes moléculas de lipase. A estratégia permitiu minimizar a dessorção enzimática, aumentando a estabilidade da enzima e mantendo a reversibilidade da imobilização.

## 5.4 TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEO DE SOJA UTILIZANDO LU-TAC COMO BIOCATALISADOR

### 5.4.1 Testes preliminares para definição de faixas de estudo e variáveis da otimização das condições das reações de transesterificação

Testes preliminares foram conduzidos afim de encontrar intervalos de estudo das variáveis e consequentemente propor a condição ótima para a produção de ésteres metílicos. Experimentos foram propostos, conforme Tabela 5.5, avaliando diferentes proporções óleo/metanol, % de LU-TAC em relação à massa de óleo, % de água em relação à massa de óleo, volume de solvente e temperatura. Observou-se previamente (Seção 5.3.3) que o *n*-hexano aumenta a atividade de LU-TAC nas primeiras 6 horas de incubação. Por esse motivo, esse solvente foi escolhido para emprego nas reações de transesterificação utilizando esse biocatalisador.

A avaliação da produção de biodiesel a partir do óleo de soja, via catálise enzimática pela LU-TAC, foi realizada por cromatografia gasosa. Inicialmente, uma mistura de 37 padrões de ésteres metílicos foi separada pela técnica e os picos cromatográficos identificados e confirmados por GC-MS. A partir da identificação dos ésteres foi possível empregar os tempos de retenções desses compostos para confirmar a identidade dos picos, registrados cromatograficamente, nas amostras submetidas às reações de transesterificação utilizando LU-TAC como biocatalisador.



Tabela 5.5 – Efeito da razão molar, % LU-TAC, % água, % *n*-hexano e temperatura na produção de biodiesel metílico (ésteres metílicos de ácidos graxos) a partir do óleo de soja catalisado pela LU-TAC.

	Razão molar óleo/metanol	LU-TAC (% massa de óleo)	Água (% massa de óleo)	<i>N</i> -hexano (mL/g óleo)	Temperatura (°C)	% FAME
1	1:3	20	15	0,5	40	16,0
2	1:4	20	15	0,5	40	13,1
3	1:6	20	15	0,5	40	7,6
4	1:8	20	15	0,5	40	4,8
5	1:4	20	15	0,5	35	40,0
6	1:4	20	15	0,5	30	25,0
7	1:4	20	10	0,5	35	42,5
8	1:4	20	20	0,5	35	18,3
10	1:4	20	15	1,5	35	39,0
11	1:4	40	15	0,5	35	41,9

Fonte: A autora.

Comparando os testes 1-4 (Tabela 5.5), em que variam-se apenas as razões molares óleo/metanol, observa-se que quanto maior a quantidade de metanol no meio reacional, menor é o rendimento de ésteres metílicos. Esse fato pode estar relacionado a uma queda da atividade enzimática da LU na presença de metanol. Apesar de a razão molar 1:3 ter o melhor resultado de FAME, optou-se por utilizar uma razão 1:4 nos próximos estudos, pois a reação de transesterificação (Figura 2.8) é uma reação reversível.

Nos testes 5 e 10 variou-se o volume de *n*-hexano adicionado mantendo os demais fatores constantes, sendo possível observar uma pequena variação no rendimento dos produtos. Considerando esse resultado e questões econômicas, optou-se por fixar o volume de *n*-hexano nas reações em 0,5 mL/g de óleo de soja. Atualmente, estudam-se reações desse tipo com a adição por etapas de metanol ou etanol ou livres de solventes, “solvent free” (GALEANO; MITCHELL; KRIEGER, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2010). Reações de transesterificação “solvente free” não se aplicariam utilizando o TAC como suporte para as lipases, pois ele se dissolve no meio reacional sem a adição de *n*-hexano.

A quantidade do catalisador LU-TAC foi variada nos testes 5 e 11. Observou-se uma pequena variação na porcentagem de ésteres produzidas, menor que 2 %. Apesar da pequena variação da % de ésteres esse fator deve ser melhor investigado, sendo então uma das variáveis a ser estudada no planejamento composto central.

A porcentagem de água com relação à massa de óleo também foi relevante nas reações de transesterificação utilizando biocatalisadores. A lipase tem seu sítio ativo disponível na interface água/óleo, sendo então necessária a adição de água. Porém, a quantidade ideal de água deve ser otimizada. Nota-se nos testes 5, 7 e 8 que a quantidade de água no sistema reacional influencia os resultados de % de ésteres, sendo necessário um estudo considerando sua interação também com outras variáveis.

Quando se trata de processos envolvendo o uso de enzimas, o controle de temperatura é indispensável. Analisando os dados de produção de FAME nos experimentos em que se variou apenas a temperatura de reação (testes 2, 5 e 6) nota-se que há uma grande influência dessa variável na reação. Sendo assim, a temperatura também foi selecionada para estudo de otimização da produção do biodiesel, catalisada pela LU-TAC.

#### **5.4.2 Otimização da produção de biodiesel via planejamento composto central (PCC)**

Considerando os testes preliminares para a produção de biodiesel, fixaram-se as variáveis concentração de *n*-hexano (0,5 mL/g de óleo) e a razão molar metanol/óleo (4:1) e realizou um estudo, empregando o Planejamento Composto Central (PCC), com as variáveis % LU-TAC, temperatura e % de água na produção de biodiesel metílico a partir do óleo de soja. Com relação a atividade de LU-TAC, ofereceu-se 195 U/g de óleo em cada reação. As condições de cada ensaio e os resultados obtidos foram dispostos na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Matriz do PCC realizado para avaliação da influência da temperatura, % de LU-TAC e % de água na % de FAME obtida de reações de transesterificação de óleo de soja.

Ensaio	Temperatura	% LU-TAC	%Água	% FAME
1	30 (-1)	15 (-1)	10 (-1)	25,2
2	30 (-1)	15 (-1)	20 (+1)	8,0
3	30 (-1)	25 (+1)	10 (-1)	33,1
4	30 (-1)	25 (+1)	20 (+1)	14,4
5	40 (+1)	15 (-1)	10 (-1)	26,6
6	40 (+1)	15 (-1)	20 (+1)	12,2
7	40 (+1)	25 (+1)	10 (-1)	39,9
8	40 (+1)	25 (+1)	20 (+1)	18,3
9	28,2 (-1,35313)	20 (0)	15 (0)	17,2
10	41,8 (+1,35313)	20 (0)	15 (0)	28,5
11	35 (0)	13,2 (-1,35313)	15 (0)	12,6
12	35 (0)	26,8 (+1,35313)	15 (0)	32,5
13	35 (0)	20 (0)	8,2 (-1,35313)	40,0
14	35 (0)	20 (0)	21,8 (+1,35313)	28,6
15 (C)	35 (0)	20 (0)	15 (0)	43,9
16 (C)	35 (0)	20 (0)	15 (0)	44,4
17 (C)	35 (0)	20 (0)	15 (0)	43,2

Fonte: A autora.

O efeito da temperatura sobre o teor de ésteres total, mantendo as demais variáveis constantes, pode ser verificado nos ensaios 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8 (Tabela 5.6). O aumento da temperatura contribuiu para um aumento na produção de ésteres em todos os testes realizados. No entanto, as maiores % de ésteres foram observadas à temperatura de 35 °C. A 41,8 °C a % de éster foi inferior aos valores encontrados para os testes a 40 °C. Este resultado indica que a temperatura de trabalho ideal da enzima para este meio de reação deve estar próxima de 35 °C. Este é um comportamento típico das enzimas, que tem suas atividades máximas a uma temperatura específica e, após essa temperatura, tem uma queda de atividade por desnaturação de suas estruturas (DANIEL; DANSON, 2013).

A quantidade de catalisador também influenciou positivamente a resposta estudada, conforme observado nos ensaios 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, 6 e 8 do PCC (Tabela 5.6). Assim como a temperatura, a porcentagem de catalisador tem um limite próximo ao ponto central do PCC. Como confirmação dessa hipótese, o ensaio 12, em que a concentração do catalisador foi de 26,8 % (a maior estudada), obteve-se uma % de ésteres inferior aos ensaios realizados no ponto central (15, 16 e 17), em que a % de catalisador foi de 20 % e 43,9 % de éster total em média no biodiesel. Quando a temperatura e a % de catalisador foram mantidos constantes variando-

se apenas a % de água foi possível notar um aumento no teor de ésteres à medida que a porcentagem de água diminuía. Isto pode ser observado nos ensaios 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, 9 e 10 do PCC. A presença de água é fundamental para manter a conformação da lipase e também aumentar a área interfacial entre a água e a fase orgânica, onde a lipase atua. A % de ésteres total obtida da transesterificação do óleo de soja depende da área interfacial, onde a lipase atua, que pode ser aumentada pela adição de certas quantidades de água. No entanto, um excesso de água estimulará a reação de hidrólise concorrente, causando uma diminuição na % de ésteres total. Vários estudos mostraram que a adição de uma pequena alíquota de água à mistura de reação catalisada por enzima aumentou a taxa de síntese de ésteres de ácidos graxos (BABAKI *et al.*, 2015; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014; FERRERO *et al.*, 2016).

Com os resultados apresentados na Tabela 5.6, foi possível analisar estatisticamente as % de ésteres totais obtidas das reações de transesterificação dentro das condições experimentais investigadas. Cada experimento planejado foi realizado de acordo com as condições previamente definidas e o teor de éster total quantificado por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama. Para avaliação do efeito, se significativo ou não, das variáveis no teor de éster total obtido da transesterificação do óleo de soja, determinaram-se os coeficientes de regressão após a regressão múltipla dos dados no programa Statistica 7.0. A Tabela 5.7 mostra os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos para a resposta (% de ésteres metílicos), bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos mesmos. A partir desta análise, com parâmetros significativos e não significativos, foi obtida a Equação 5.1.

Tabela 5.7 - Regressão múltipla para % FAME com  $R^2=0,93$ .

Variáveis e interações	Coeficientes de regressão	Desvio	t(7)	P
Termo independente	41,82908	2,490270	16,79701	0,000001
Temperatura (X <sub>1</sub> ) (L)	2,70885	1,404996	1,92801	0,095201
Temperatura (X <sub>1</sub> ) (Q)	-8,96115	1,852968	-4,83611	0,001886
% LU-TAC (X <sub>2</sub> ) (L)	5,19874	1,404996	3,70018	0,007653
% LU-TAC (X <sub>2</sub> ) (Q)	-9,12500	1,852968	-4,92453	0,001705
% Água (X <sub>3</sub> ) (L)	-7,48811	1,404996	-5,32963	0,001088
% Água (X <sub>3</sub> ) (Q)	-2,70757	1,852968	-1,46121	0,187344
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0,63750	1,696348	0,37581	0,718190
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-0,01250	1,696348	-0,00737	0,994326
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-1,08750	1,696348	-0,64108	0,541880

Fonte: A autora.

$$Y(\%) = 41,82908 + 2,70885X_1 - 8,96115X_1^2 + 5,19874X_2 - 9,12500X_2^2 - 7,48811X_3 - 2,70757X_3^2 + 0,63750X_1X_2 - 0,01250X_1X_3 - 1,08750X_2X_3 \quad \text{Eq. 5.1}$$

Na Tabela 5.8 estão dispostos os coeficientes de regressão das variáveis e interações com níveis de significância (p) menores que 10 % para a resposta medida (% de éster total), após a eliminação dos parâmetros não significativos. Os parâmetros não significativos, que foram desprezados para o nível de significância adotado, foram a água (quadrática) e as interações entre todas as variáveis. A Equação 5.2 representa o modelo com as variáveis significativas codificadas para as % FAME obtidas.

Tabela 5.8 - Regressão múltipla apenas com variáveis significativas para a % FAME com  $R^2=0,93$ .

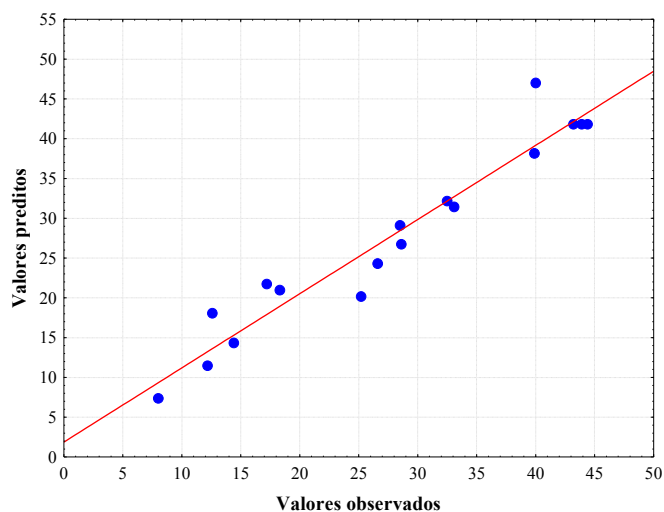
Variáveis e interações	Coeficientes de regressão	Desvio	t(7)	P
Termo independente	41,82908	2,490270	16,79701	0,000001
Temperatura ( $X_1$ ) (L)	2,70885	1,404996	1,92801	0,095201
Temperatura ( $X_1$ ) (Q)	-8,96115	1,852968	-4,83611	0,001886
% LU-TAC ( $X_2$ ) (L)	5,19874	1,404996	3,70018	0,007653
% LU-TAC ( $X_2$ ) (Q)	-9,12500	1,852968	-4,92453	0,001705
% Água ( $X_3$ ) (L)	-7,48811	1,404996	-5,32963	0,001088

Fonte: A autora.

$$Y(\%) = 41,82908 + 2,70885X_1 - 8,96115X_1^2 + 5,19874X_2 - 9,12500X_2^2 - 7,48811X_3 \quad \text{Eq. 5.2}$$

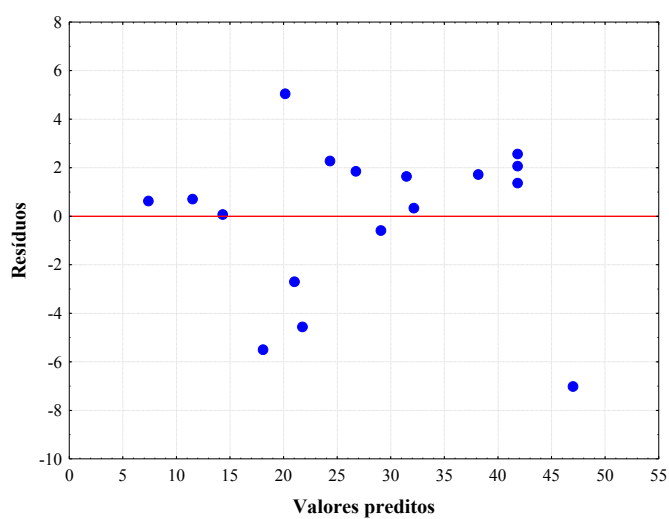
O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtido após o ajuste foi de 0,93, indicando que os resultados foram explicados pela equação empírica proposta com 93 % da variabilidade dos dados. As Figuras 5.19 e 5.20 mostram a distribuição dos resíduos em torno do zero e a representação dos valores previstos em função dos valores experimentais, respectivamente. Observa-se que os resíduos estão aleatoriamente distribuídos em torno do zero, indicando variância constante para todos os valores da resposta.

Figura 5.19 – Valores preditos por valores experimentais pelo modelo para % FAME.



Fonte: A autora.

Figura 5.20 – Distribuição dos resíduos para a o modelo proposto para a % FAME produzida na transesterificação do óleo de soja catalisada por LU-TAC.



Fonte: A autora.

Observando a análise de variância para a % FAME obtida na Tabela 5.9, é possível concluir que o modelo representa adequadamente os dados experimentais. O valor de F calculado ( $F_{\text{calc}}$ ) é 2,91 vezes maior que o valor tabelado ( $F_{\text{tab}}$ ) para 10 % de significância.

Tabela 5.9 – Análise de variância para % FAME obtida de acordo com o PCC estudado para a transesterificação de óleo de soja catalisada por LU-TAC.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F <sub>calc</sub>
Regressão	2213,212	9	245,912	
Resíduo	161,145	7	23,0208	10,6821
Total	2374,359	16		
F <sub>9;7;0,10</sub> = 3,92				

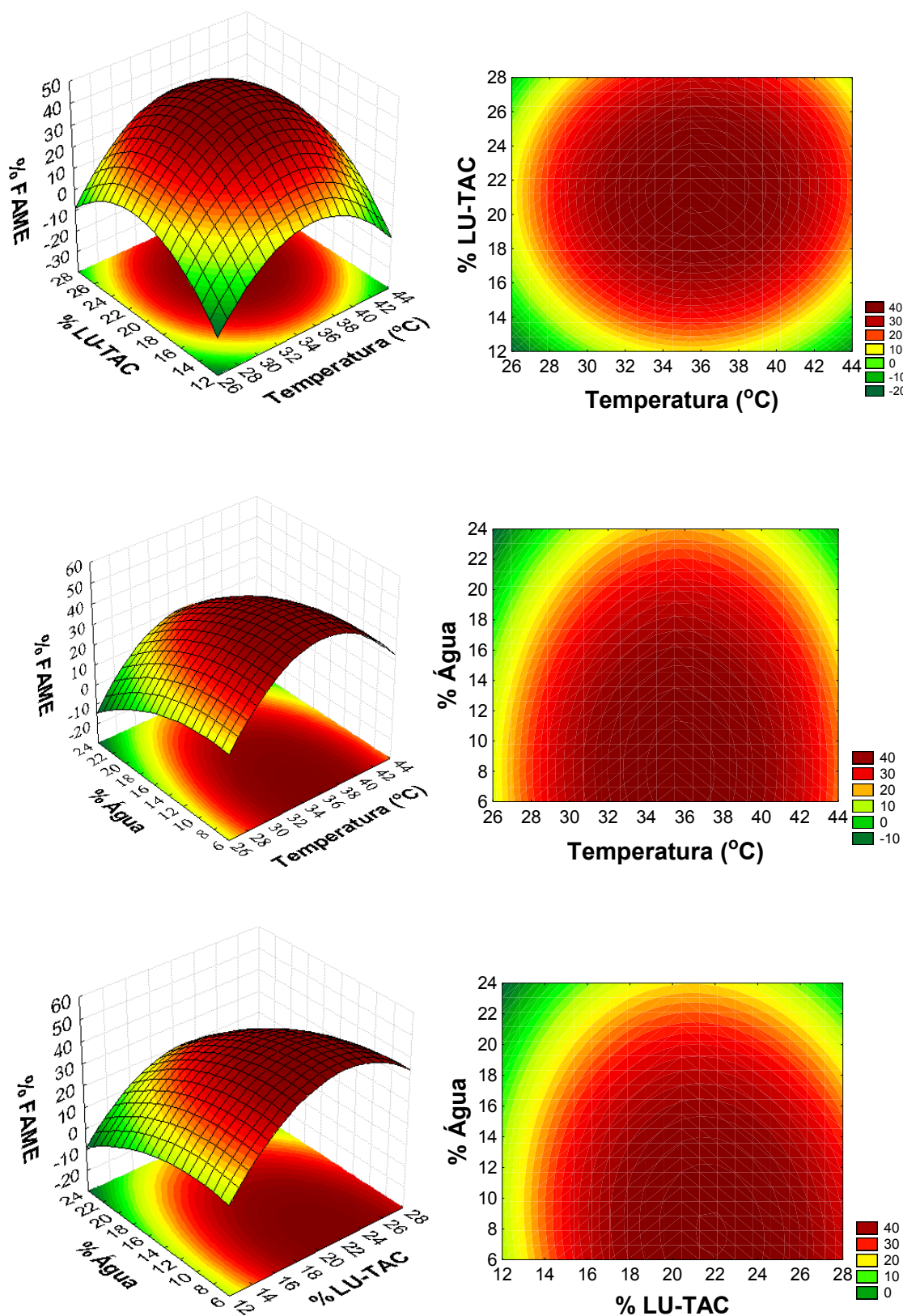
Fonte: A autora.

Como o modelo foi significativo, foi possível construir as superfícies de respostas e definir as regiões de interesse, que representam as condições otimizadas da produção de ésteres metílicos a partir da transesterificação do óleo de soja catalisada por LU-TAC. A Figura 5.21 apresenta as superfícies de resposta e as curvas de contorno em função da temperatura, % de LU-TAC e % de água para o PCC estudado. O intervalo de temperatura correspondente à porcentagem máxima de FAME está entre 33 e 37 °C. As porcentagens de FAME mais altas são obtidas entre 19 e 24 % de LU-TAC em relação à massa de óleo. A melhor resposta foi obtida para uma porcentagem de água inferior a 10 % em relação à massa de óleo.

Visando validar o modelo ajustado aos resultados de % de ésteres de acordo com o PCC estudado, foi realizada a reação de transesterificação nas condições definidas como ótimas para as variáveis: temperatura de 34,2 °C, 21,9 % de catalisador e 7,7 % de água. A porcentagem de ésteres totais obtida nessas condições foi de 48,4 %. Adicionando os valores das variáveis codificadas nestas condições à Equação 4.2 obteve-se 47,5 % de porcentagem de ésteres metílicos. Esses resultados confirmam a validade do modelo obtido para o experimento.

Para o ensaio realizado nas condições ótimas das variáveis estudadas, realizou-se um acompanhamento da produção de FAME com o tempo. Os dados foram apresentados na Figura 5.22. Observa-se que a reação de transesterificação do óleo de soja catalisada pela LU-TAC tem seu máximo de produção de ésteres metílicos estabilizando, em um tempo de aproximadamente 3 horas.

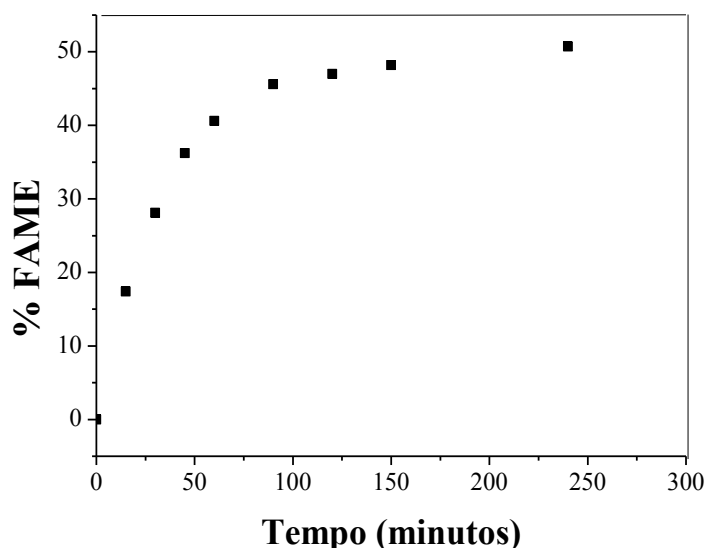
Figura 5.21 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para % FAME em função de (A) % de LU-TAC e temperatura; (B) % água e temperatura e (C) % água e % LU-TAC.



Fonte: A autora.



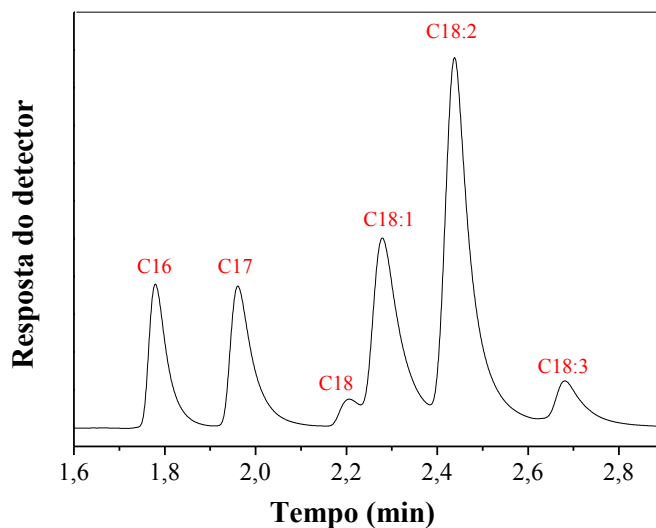
Figura 5.22 – Variação da produção de ésteres metílicos de ácidos graxos com o tempo na reação de transesterificação do óleo de soja catalisada por LU-TAC nas condições otimizadas do PCC.



Fonte: A autora.

A Figura 5.23 apresenta o perfil cromatográfico de ésteres produzidos a partir do óleo de soja com LU-TAC como catalisador. É possível observar na Figura 5.23 cinco picos correspondentes aos principais ésteres de ácidos graxos do óleo de soja: C16, C18, C18:1, C18:2 e C18:3 (ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico, respectivamente). O perfil cromatográfico apresentado é similar ao obtido para biodiesel de óleo de soja produzido via catálise alcalina (SANTOS; VIEIRA; VALENTINI, 2013). Desta forma, o perfil cromatográfico do biodiesel produzido via catálise por LU-TAC confirma a eficiência do sistema enzimático LU-TAC na transesterificação do óleo de soja. O pico com retenção em 2 minutos está relacionado ao metilheptadecanoato (C17), que foi adicionado ao produto da reação para quantificação dos ésteres metílicos.

Figura 5.23 – Perfil cromatográfico de ésteres produzidos em reação de transesterificação de óleo de soja catalisada por LU-TAC. Condições cromatográficas: coluna RTX-5MS 30 m × 0,32 mm d.i. × 0,25 µm espessura de filme; temperatura do forno da coluna: 210 °C; injeção no modo split a 250 °C, razão Split 1:10; detector FID a 250 °C; volume de injeção: 1,0 µL.

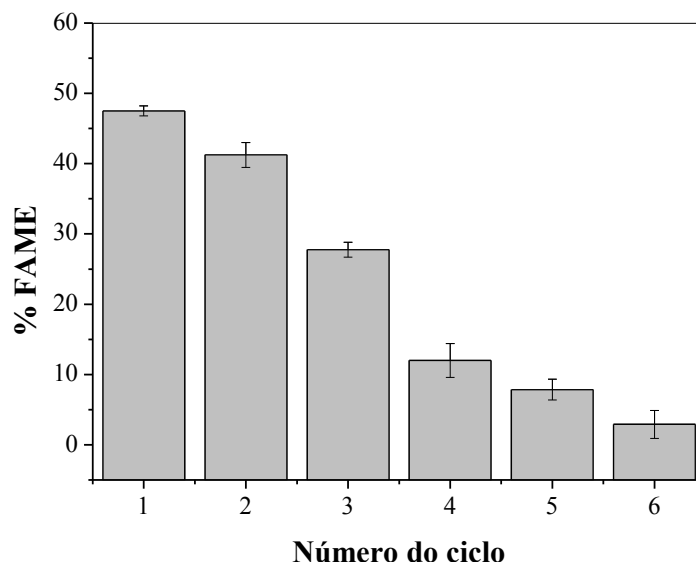


Fonte: A autora.

#### 5.4.3 Reutilização de LU-TAC em reações de transesterificação

Estudos de reuso do biocatalisador LU-TAC foram feitos utilizando o reaproveitamento do mesmo após ciclos subsequentes de uso. Após cada ciclo, a enzima foi drenada e lavada com tampão fosfato a 25mM e pH 7 antes de novo uso. A produção de FAME obtida em cada ciclo de uso está apresentada na Figura 5.24.

Figura 5.24 - % FAME obtida em cada ciclo de uso do catalisador LU-TAC na transesterificação do óleo de soja.



Fonte: A autora.

Observou-se na Figura 5.24 uma queda de aproximadamente 12 % na produção de FAME do primeiro para o segundo ciclo e quando comparado ao terceiro ciclo, a queda foi de aproximadamente 43 %. Esse resultado pode ser justificado pela principal desvantagem da imobilização por adsorção: a dessorção da enzima. Esse fato ocorre devido à ligação fraca entre a lipase e o suporte e é acelerado pelo sistema de emulsão água-óleo que reduz a estabilidade da lipase imobilizada (GOG *et al.*, 2012; SANKARAN; SHOW; CHANG, 2016), além do efeito de solventes e dos próprios produtos formados, pois os mono- e diglicerídeos também tem propriedades tensoativas (MURTY; BHAT; MUNISWARAN, 2002).

A porcentagem de FAME obtida nesse trabalho é relativamente baixa quando comparada a porcentagem de ésteres obtida para outras lipases (Tabela 2.2). Por outro lado, quando comparados a resultados obtidos com LU imobilizada em outros suportes, ou imobilizadas usando outros protocolos, os resultados são aceitáveis e promissores. Neste trabalho, produziu-se 48,4% de ésteres a temperatura de 34,2 °C, 21,9 % de LU-TAC, 7,7 % de água, 0,5mL *n*-hexano/g de óleo e razão molar (metanol/óleo) 4:1 com tempo de reação de 3 horas. Tacias-pascacio *et al.* (2017) avaliaram a produção de biodiesel de óleo de cozinha residual com LU imobilizada. Após 24 horas de reação a 30 °C, sob agitação, utilizando 2 g de óleo, 10 % de biocatalisador e 0,25 % de água (com relação à massa de óleo), razão molar 3:1

(álcool/óleo) e 3 mL de hexano, a porcentagem máxima de ésteres obtidas foi de 11 % utilizando estireno macroporoso e octadecil metacrilato como suportes.

Vale ressaltar que LU é uma enzima produzida prioritariamente para degomagem de óleo com atividade fosfolipídica e lipolítica. Além disso, nenhuma etapa de purificação dos ésteres foi empregada após as reações de transesterificação. Apesar disso, a LU-TAC catalisou as reações de transesterificação de óleo de soja produzindo porcentagem de ésteres 4 vezes maiores e em tempo 8 vezes menor que Tacias-Pascacio *et al.* (2017) quando utilizaram *n*-hexano como solvente do meio reacional.

Sabe-se que a modificação do suporte, especialmente se adicionados grupos heterofuncionais, pode minimizar efeitos de dessorção da enzima (VIRGEN-ORTÍZ *et al.*, 2017). Além disso, a imobilização por outros métodos também pode relevar novos comportamentos das enzimas. TAC é um polímero que permite uso também na forma de membranas (RIBEIRO, 2016), membranas de nanofibras (BRITES, 2015) micro e nanopartículas (ALVES, 2015). Assim, pode-se dizer que a imobilização de LU por adsorção física em TAC favoreceu a eficiência da enzima na produção de ésteres e que, existindo ainda inúmeras possibilidades para a imobilização de lipases nesse suporte, este é um polímero muito promissor para esse tipo de aplicação.

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- A produção de triacetato de celulose a partir da polpa Kraft de Eucalipto via reação homogênea a partir do procedimento adaptado neste trabalho, diminuindo o tempo de reação de acetilação, foi viável e eficiente.
- O material obtido é um triacetato de celulose uma vez que apresenta temperatura de fusão de 306 °C, GS igual a 2,7, solubilidade em diclorometano aspectos observados para um material com elevado grau de acetilação.
- É possível imobilizar a fosfolipase Lecitase Ultra® via adsorção física em triacetato de celulose com rendimento de imobilização de 97 %, sendo essa imobilização provavelmente via ativação interfacial.
- A enzima Lecitase Ultra® apresentou estabilidade térmica maior na forma imobilizada quando comparada à forma livre, especialmente para as temperaturas de 35 °C e 40 °C, com inativação de 24 e 19,3 %, respectivamente, com 8 horas de experimento.
- A enzima Lecitase Ultra® apresentou estabilidade maior na forma imobilizada quando comparada à forma livre, apresentando aumento de atividade enzimática para todos os pHs estudados, especialmente os pHs alcalinos. A mesma temperatura ótima, 40 °C, foi observada para a enzima na forma livre e imobilizada em TAC.
- Na forma imobilizada a enzima Lecitase Ultra® apresentou aumento na atividade na presença de *n*-hexano nas primeiras horas e atividade relativa semelhante em todos os solventes orgânicos estudados, com inativação de aproximadamente 38 % com 30 h de incubação.
- 84,5% da lipase foi desorvida do suporte usando uma concentração de 0,02 % de Triton X-100, sendo possível a sua remoção e reaproveitamento do suporte.
- As constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{max}$  foram encontradas para LU e LU-TAC. A enzima imobilizada apresentou menores valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  indicando maior afinidade com o substrato, porém menor acessibilidade.
- Estudo de reuso de LU-TAC em reações de hidrólise de *p*-NPP indicou perda de atividade enzimática menores de 50 % até dois ciclos.
- A avaliação estatística do PCC realizado para otimização das condições de reações de transesterificação utilizando LU-TAC como catalisador levaram a uma condição ótima de trabalho: temperatura de 34,2 °C, 21,9 % de LU-TAC e 7,7 % de água (com relação à

massa de óleo) com tempo de reação de 3 horas, resultando em uma % de ésteres totais de 48,4 %, sob tais condições experimentais. O modelo ajustado às % de ésteres obtidas de acordo com o PCC indicou uma porcentagem máxima teórica de 47,5 % de ésteres na condição ótima, resultado que não difere estatisticamente do obtido experimentalmente, mostrando que o modelo foi adequadamente ajustado ao estudo.

## 7 SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

- Combinar imobilização por adsorção física e por ligação covalente, funcionalizando a celulose e/ou o TAC (com grupos amina, catiônicos/aniônicos, aldeído, entre outros) estabilizando a forma aberta das lipases e minimizando efeitos de dessorção.
- Produzir blendas TAC/polímeros iônicos que minimizem efeitos de dessorção.
- Imobilizar lipases produzidas especificamente para catalisar reações de transesterificação;
- Avaliar a produção de ésteres etílicos na produção de biodiesel catalisada por LU-TAC;
- Avaliar a produção de biodiesel a partir de outras matérias-primas, como por exemplo, óleo residual;
- Aplicar LU-TAC em processos de degomagem e produção de diacil e monoacilglicerídeos;
- Utilizar outras fontes lignocelulósicas, especialmente resíduos agroindustriais, para produção de TAC e imobilização de lipases.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTHY, M. et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research And Design**, [s.l.], v. 92, n. 8, p.1591-1601, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2014.04.008>.
- ALTAMIRANO, Carlos Alberto Alejos et al. Ethylic or methylic route to soybean biodiesel? Tracking environmental answers through life cycle assessment. **Applied Energy**, [s.l.], v. 184, p.1246-1263, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.05.017>.
- ALVES, Janainne Nunes. **Produção e caracterização de matrizes modelo de triacetatos de celulose obtidos da palha de milho e diacetato de celulose comercial para liberação controlada de naproxeno**. 2015. 147 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.
- ALVES, Joana S. et al. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts. **Rsc Advances**, [s.l.], v. 4, n. 14, p.6863-6868, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3ra45969a>.
- AMINI, Zeynab et al. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energy Conversion And Management**, [s.l.], out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.049>.
- ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro, 2016. (Relatório técnico).
- ANSARI, Shakeel Ahmed et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -Galactosidase on Cellulose Acetate-Polymethylmethacrylate Membrane and Its Application in Hydrolysis of Lactose from Milk and Whey. **International Scholarly Research Notices**, [s.l.], v. 2014, p.1-6, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/163987>.
- ANTCZAK, Mirosława Szczesna et al. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.1185-1194, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2008.11.013>.
- APROBIO – ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE BODIESEL DO BRASIL. **Impactos socioeconômicos da indústria de biodiesel no Brasil**. São Paulo, 2012. (Relatório técnico). Disponível em <<http://aprobio.com.br/2014/10/30/relatorio-fipe-aprobio/>>. Acesso em: 10 Jan. 2017.
- ATADASHI, I.m.; AROUA, M.k.; AZIZ, A. Abdul. Biodiesel separation and purification: A review. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 36, n. 2, p.437-443, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2010.07.019>.
- AZÓCAR, Laura et al. Enzymatic biodiesel production kinetics using co-solvent and an anhydrous medium: a strategy to improve lipase performance in a semi-continuous reactor. **New Biotechnology**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.422-429, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.04.006>.



BABAKI, Mohadese et al. Effect of water, organic solvent and adsorbent contents on production of biodiesel fuel from canola oil catalyzed by various lipases immobilized on epoxy-functionalized silica as low cost biocatalyst. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 120, p.93-99, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.06.014>.

BADGUJAR, Kirtikumar C.; BHANAGE, Bhalchandra M.. Lipase immobilization on hydroxypropyl methyl cellulose support and its applications for chemo-selective synthesis of  $\beta$ -amino ester compounds. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 51, n. 10, p.1420-1433, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.008>.

BADGUJAR, Kirtikumar C.; BHANAGE, Bhalchandra M.. Synthesis of geranyl acetate in non-aqueous media using immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase on biodegradable polymer film: Kinetic modelling and chain length effect study. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 49, n. 8, p.1304-1313, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.04.014>.

BARNWAL, B.k.; SHARMA, M.p.. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.363-378, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2004.05.007>.

BARON, Alessandra Machado. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em catálise**. 2008. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BARUD, Hernane S. et al. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. **Thermochimica Acta**, [s.l.], v. 471, n. 1-2, p.61-69, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2008.02.009>.

BASHIRI, Hadis; POURBEIRAM, Nastaran. Biodiesel production through transesterification of soybean oil: A kinetic Monte Carlo study. **Journal Of Molecular Liquids**, [s.l.], v. 223, p.10-15, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2016.08.029>.

BASSO, Alessandra; HESSELER, Martin; SERBAN, Simona. Hydrophobic microenvironment optimization for efficient immobilization of lipases on octadecyl functionalised resins. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 72, n. 46, p.7323-7328, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2016.02.021>.

BERNAL, Claudia; ILLANES, Andres; WILSON, Lorena. Heterofunctional Hydrophilic–Hydrophobic Porous Silica as Support for Multipoint Covalent Immobilization of Lipases: Application to Lactulose Palmitate Synthesis. **Langmuir**, [s.l.], v. 30, n. 12, p.3557-3566, abr. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/la4047512>.

BRADFORD, Marion M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 72, n. 1-2, p.248-254, maio 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRASIL. Lei nº 13.263/2016, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel

comercializado no território nacional. **Lex:** Coletânea de Legislação e Jurisprudência, São Paulo, v. 60, p. 1260, maio/jun., 3. trim.1996. Legislação Federal e Marginália.

BRITES, Mariana de Melo. **Desenvolvimento de membranas de nanofibras a base de acetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar produzidas por eletrofiação para incorporação de enzimas.** 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Escolas de Artes, Ciência e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

CABRERA, Zaida et al. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 57, n. 1-4, p.171-176, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.08.012>.

CASTRO, Heizir F. de et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.146-156, fev. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000100025>.

CERQUEIRA, Daniel A. et al. Caracterização de acetato de celulose obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar por <sup>1</sup>H-RMN. **Polímeros**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.85-91, jun. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-14282010005000017>.

CERQUEIRA, Daniel A. et al. Synthesis and properties of polyaniline–cellulose acetate blends: The use of sugarcane bagasse waste and the effect of the substitution degree. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 78, n. 3, p.402-408, 15 out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.04.016>.

CERQUEIRA, Daniel Alves; RODRIGUES FILHO, Guimes; MEIRELES, Carla da Silva. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 69, n. 3, p.579-582, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.01.010>.

CERVERÓ, J.m.; ÁLVAREZ, J.r.; LUQUE, S.. Novozym 435-catalyzed synthesis of fatty acid ethyl esters from soybean oil for biodiesel production. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 61, p.131-137, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.12.005>.

CESARINI, Silvia et al. Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils. **Biotechnol Biofuels**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.29-41, 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-7-29>.

CHEN, Jech-wei; WU, Wen-teng. Regeneration of immobilized *Candida antartica* lipase for transesterification. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 95, n. 5, p.466-469, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723\(03\)80046-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1389-1723(03)80046-4).

CHEN, You Wei et al. Production of new cellulose nanomaterial from red algae marine biomass *Gelidium elegans*. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 151, p.1210-1219, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.083>.

CHOUHAN, A.p. Singh; SARMA, A.k.. Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.4378-4399, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.112>.

CHRISTOPHER, Lew P.; KUMAR, Hemanathan; ZAMBARE, Vasudeo P.. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, [s.l.], v. 119, p.497-520, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.01.017>.

CIPOLATTI, Eliane Pereira et al. Synthesis and modification of polyurethane for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase for ethanolysis of fish oil in solvent free system. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 122, p.163-169, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.006>.

COLOMBO, Kamila; ENDER, Laercio; BARROS, Antônio André Chivanga. The study of biodiesel production using CaO as a heterogeneous catalytic reaction. **Egyptian Journal Of Petroleum**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.341-349, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpe.2016.05.006>.

CORDEIRO, Claudiney Soares et al. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.477-486, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011000300021>.

CREDOU, Julie; BERTHELOT, Thomas. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. **J. Mater. Chem. B**, [s.l.], v. 2, n. 30, p.4767-4788, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c4tb00431k>.

CRUZ, Alisson Costa da et al. Utilização do acetato de celulose produzido a partir da celulose extraída do caroço de manga como matriz para produção de sistemas microparticulados. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.385-389, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011000300004>.

CRUZ, Alisson Costa da. **Síntese e caracterização de partículas de acetato de celulose, a partir do caroço de manga, para produção de matrizes de liberação controlada de drogas**. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

DALLA-VECCHIA, Roberto; NASCIMENTO, Maria da Graça; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.623-630, ago. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000400017>.

DANIEL, Roy M.; DANSON, Michael J.. Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. **Febs Letters**, [s.l.], v. 587, n. 17, p.2738-2743, 27 jun. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.027>.

DATTA, Sumitra; CHRISTENA, L. Rene; RAJARAM, Yamuna Rani Sriramulu. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-9, 6 jun. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.

DU, Wei et al. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 37, n. 1-6, p.68-71, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.09.008>.

EGGERT, Thorsten et al. Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. **Colloids And Surfaces B**:

**Biointerfaces**, [s.l.], v. 26, n. 1-2, p.37-46, set. 2002. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/s0927-7765\(02\)00033-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0927-7765(02)00033-4).

FERNANDES, Maria Luiza Machado. **HIDRÓLISE DE TRIGLICERÍDEOS E SÍNTESE DE ÉSTER DE ÁCIDO GRAXO EM SISTEMA DE MICELAS REVERSAS**. 2002. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry And Physics Of Lipids**, [s.l.], v. 93, n. 1-2, p.185-197, jun. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0009-3084\(98\)00042-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0009-3084(98)00042-5).

FERNANDEZ-LOPEZ, Laura et al. Physical crosslinking of lipase from *Rhizomucor miehei* immobilized on octyl agarose via coating with ionic polymers. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 54, p.81-88, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.018>.

FERNANDEZ-LORENTE, Gloria et al. Effect of the immobilization protocol in the activity, stability, and enantioselectivity of Lecitase® Ultra. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 47, n. 3-4, p.99-104, jul. 2007. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.04.008>.

FERREIRA JÚNIOR, Moacir Fernandes et al. SEM study of the morphology of asymmetric cellulose acetate membranes produced from recycled agro-industrial residues: sugarcane bagasse and mango seeds. **Polymer Bulletin**, [s.l.], v. 66, n. 3, p.377-389, 11 jul. 2010. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00289-010-0346-2>.

FERRERO, Gabriel O. et al. Towards sustainable biofuel production: Design of a new biocatalyst to biodiesel synthesis from waste oil and commercial ethanol. **Journal Of Cleaner Production**, [s.l.], v. 139, p.495-503, dez. 2016. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.08.047>.

FISCHER, Steffen et al. Properties and Applications of Cellulose Acetate. **Macromolecular Symposia**, [s.l.], v. 262, n. 1, p.89-96, jan. 2008. Wiley-Blackwell.  
<http://dx.doi.org/10.1002/masy.200850210>.

FLAUZINO NETO, Wilson Pires. **Extração e caracterização de nanocristais de celulose a partir da casca de soja, e sua aplicação como agente de reforço em nanocompósitos poliméricos utilizando carboximetilcelulose como matriz**. 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

FROEHNER, Sandro; LEITHOLD, Juliana; LIMA JÚNIOR, Luiz Fernando. Transesterificação de óleos vegetais: caracterização por cromatografia em camada delgada e densidade. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 8, p.2016-2019, 2007. FapUNIFESP (SciELO).  
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000800037>.

GALEANO, Jonathan David; MITCHELL, David Alexander; KRIEGER, Nadia. Biodiesel production by solvent-free ethanolysis of palm oil catalyzed by fermented solids containing lipases of *Burkholderia contaminans*. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 127, p.77-86, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.008>.

GARCIA, Camila Martins. **Transesterificação de óleos vegetais**. 2006. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GARCIA-GALAN, Cristina et al. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, [s.l.], v. 353, n. 16, p.2885-2904, nov. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201100534>.

GARMROODI, Maryam et al. Covalent binding of hyper-activated *Rhizomucor miehei* lipase (RML) on hetero-functionalized siliceous supports. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 86, p.208-215, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.076>.

GERIS, Regina et al. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.1369-1373, out. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000500053>.

GOG, Adriana et al. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.10-16, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2011.08.007>.

GOMIDE, Jose Livio; FANTUZZI NETO, Humberto; REGAZZI, Adair José. Análise de critérios de qualidade da madeira de eucalipto para produção de celulose Kraft. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 2, n. 34, p.339-344, 2010.

GONÇALVES, Karen M. et al. A Comprehensive Study on the Activity and Deactivation of Immobilized Lecitase Ultra in Esterifications of Food Waste Streams to Monoacylglycerols. **Chemsuschem**, [s.l.], v. 6, n. 5, p.872-879, 19 mar. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/cssc.201300026>.

GUAJARDO, N. et al. Selectivity of R- $\alpha$ -monobenzoate glycerol synthesis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B immobilized on heterofunctional supports. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 50, n. 11, p.1870-1877, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.06.025>.

GULDHE, Abhishek et al. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 41, p.1447-1464, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.035>.

GUO, Yong-sheng; WANG, Jie; SONG, Xi-jin. Characterization of cellulose acetate micropore membrane immobilized acylase I. **Journal Of Zhejiang University-science A**, [s.l.], v. 5, n. 12, p.1608-1612, dez. 2004. Zhejiang University Press. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2004.1608>.

GURGEL, L. V. A., Mercerização e modificação química de celulose e bagaço de cana-de-açúcar com anidrido succínico e trietilenotetramina: Preparação de novos materiais quelantes para adsorção de Pb(II), Cd(II), Cr(VI) e Cu(II). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.



HAIGH, Kathleen F. et al. Kinetics of the pre-treatment of used cooking oil using Novozyme 435 for biodiesel production. **Chemical Engineering Research And Design**, [s.l.], v. 92, n. 4, p.713-719, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2014.01.006>.

HANEFELD, Ulf; GARDOSI, Lucia; MAGNER, Edmond. Understanding enzyme immobilisation. **Chem. Soc. Rev.**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.453-468, 2009. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b711564b>.

HENLEY, James P.; SADANA, Ajit. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.50-60, fev. 1985. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90013-4](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(85)90013-4)

HERNÁNDEZ-MARTÍN, Estela; OTERO, Cristina. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 2, p.277-286, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.024>.

HIRATA, Daniela B. et al. Evaluation of different immobilized lipases in transesterification reactions using tributyrin: Advantages of the heterofunctional octyl agarose beads. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 133, p.117-123, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.08.008>.

HUANG, Weijuan et al. Controllable immobilization of naringinase on electrospun cellulose acetate nanofibers and their application to juice debittering. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 98, p.630-636, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.018>.

HUANG, Xiao-jun et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 70, n. 3-4, p.95-100, jul. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.010>.

HUANG, Ze-lin et al. Enzymatic Production of Biodiesel from *Milletia pinnata* Seed Oil in Ionic Liquids. **Bioenergy Research**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.1519-1528, 17 jun. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-014-9489-6>.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON INFORMATION ENGINEERING FOR MECHANICS AND MATERIALS, 5., 2015, Huhhot. **Separation and purification of bio-diesel : A review**. Nanjing: Atlantis Press, 2015. 4 p.

ITTRAT, Pairat et al. Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.77-82, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.02.002>.

JESIONOWSKI, Teofil; ZDARTA, Jakub; KRAJEWSKA, Barbara. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, [s.l.], v. 20, n. 5-6, p.801-821, 27 jun. 2014. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>.

KAMIDE, Kenji; OKAJIMA, Kunihiro; SAITO, Masatoshi. Nuclear magnetic resonance study of thermodynamic interaction between cellulose acetate and solvent. **Polymer Journal**, Osaka, v. 2, n. 13, p.115-125, 1981.

KIM, Hyun Jung et al. Biocompatible cellulose nanocrystals as supports to immobilize lipase. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 122, p.170-178, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.007>.

KLEMM, Dieter et al. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 44, n. 22, p.3358-3393, 30 maio 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200460587>.

KOSAKA, Priscila Monteiro. **Aplicações e caracterização de ésteres de celulose**. 2007. 151 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

KUCEK, Karla Thomas. **Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino**. 2004. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KUROKAWA, Y. et al. Formation and use in enzyme immobilization of cellulose acetate-metal alkoxide gels. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.1-4, jan. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90083-3](http://dx.doi.org/10.1016/0144-8617(94)90083-3).

LAHMAR, Imen et al. Immobilization and topochemical mechanism of a new  $\beta$ -amylase extracted from *Pergularia tomentosa*. **Process Biochemistry**, [s.l.], p.1-9, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.007>.

LAM, Benjamin et al. Cellulose triacetate doped with ionic liquids for membrane gas separation. **Polymer**, [s.l.], v. 89, p.1-11, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2016.02.033>.

LAM, Man Kee; LEE, Keat Teong; MOHAMED, Abdul Rahman. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.500-518, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.03.002>.

LEUNG, Dennis Y.c.; WU, Xuan; LEUNG, M.k.h.. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, [s.l.], v. 87, n. 4, p.1083-1095, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.10.006>.

LI, Wei et al. Acyl migration and kinetics study of 1(3)-positional specific lipase of *Rhizopus oryzae*-catalyzed methanolysis of triglyceride for biodiesel production. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 45, n. 12, p.1888-1893, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.034>.

LI, Zhemin et al. Enhancing the performance of a phospholipase A1 for oil degumming by bio-imprinting and immobilization. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 123, p.122-131, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.11.018>.

LIU, Ning et al. Immobilisation of lecithase® ultra for production of diacylglycerols by glycerolysis of soybean oil. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 134, n. 1, p.301-307, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.145>.

LIU, Yue; CHEN, Jonathan y. Enzyme immobilization on cellulose matrixes. **Journal Of Bioactive And Compatible Polymers**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.553-567, 27 jul. 2016. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0883911516637377>.

LÓPEZ, Beatriz Castillo et al. Production of biodiesel from vegetable oil and microalgae by fatty acid extraction and enzymatic esterification. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 119, n. 6, p.706-711, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.11.002>.

LOPRESTO, C.g. et al. Enzymatic transesterification of waste vegetable oil to produce biodiesel. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 121, p.229-235, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.028>.

MAGALHÃES, Shayane P.; PESSOA, Fernando L.p.; ALVES, Tito L.m.. Production of Biodiesel via Enzymatic Palm Oil Ethanolysis: Kinetic Study. **12th International Symposium On Process Systems Engineering And 25th European Symposium On Computer Aided Process Engineering**, [s.l.], p.539-544, 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-63578-5.50085-2>.

MANOEL, Evelin A. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 71, p.53-57, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.001>.

MANSIR, Nasar et al. Investigation of heterogeneous solid acid catalyst performance on low grade feedstocks for biodiesel production: A review. **Energy Conversion And Management**, [s.l.], v. 141, p.171-182, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2016.07.037>.

MANURUNG, Renita et al. Enzymatic Transesterification of DPO to Produce Biodiesel by Using Lipozyme RM IM in Ionic Liquid System. **Procedia - Social And Behavioral Sciences**, [s.l.], v. 195, p.2485-2491, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbspro.2015.06.310>.

MARDHIAH, H. Haziratul et al. A review on latest developments and future prospects of heterogeneous catalyst in biodiesel production from non-edible oils. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 67, p.1225-1236, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.036>.

MARX, Sanette. Glycerol-free biodiesel production through transesterification: a review. **Fuel Processing Technology**, [s.l.], v. 151, p.139-147, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.05.033>.

MATEO, Cesar et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 40, n. 6, p.1451-1463, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>.

MEHER, L; VIDYASAGAR, D; NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.248-268, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>.



MEIRELES, Carla da Silva. **Síntese e caracterização de membranas de acetato de celulose, obtido do bagaço de cana-de-açúcar, e blendas de acetato de celulose com poliestireno de copos plásticos descartados.** 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

MELO, Júlio César Perin de. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DA CELULOSE MODIFICADA COM ANIDRIDOS ORGÂNICOS – ADSORÇÃO E TERMODINÂMICA DE INTERAÇÃO COM CÁTIOS METÁLICOS.** 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - Sp, 2007.

MILED, N et al. Interfacial catalysis by lipases. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 11, n. 4-6, p.165-171, jan. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1381-1177\(00\)00041-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1381-1177(00)00041-2).

MISHRA, Mithilesh Kumar et al. Lipase activity of Lecitase® Ultra: characterization and applications in enantioselective reactions. **Tetrahedron: Asymmetry**, [s.l.], v. 20, n. 24, p.2854-2860, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2009.11.012>.

MISHRA, Mithilesh Kumar et al. A porous vessel bioreactor for gel entrapped biocatalysts: Kinetic resolution of trans-methyl (4-methoxyphenyl)glycidate by Lecitase® Ultra in gelatin organogel (Gelozyme). **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 71, n. 1-2, p.56-62, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.03.009>.

MITTAL, Ashutosh et al. Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility. **Biotechnology For Biofuels**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.41-62, 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-4-41>.

MO, Jun et al. Experimental investigation on the effect of n-butanol blending on spray characteristics of soybean biodiesel in a common-rail fuel injection system. **Fuel**, [s.l.], v. 182, p.391-401, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.05.109>.

MOUNGUENGUI, Rédéó Wilfried Moussavou et al. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? **Progress In Energy And Combustion Science**, [s.l.], v. 39, n. 5, p.441-456, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2013.05.003>.

MUMTAZ, Muhammad Waseem et al. Biocatalytic transesterification of Eruca sativa oil for the production of biodiesel. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 5, p.162-167, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.01.003>.

MURTY, V. Ramachandra; BHAT, Jayadev; MUNISWARAN, P. K. A.. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. **Biotechnology And Bioprocess Engineering**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.57-66, abr. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02935881>.

MUSA, Idris Atadashi. The effects of alcohol to oil molar ratios and the type of alcohol on biodiesel production using transesterification process. **Egyptian Journal Of Petroleum**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.21-31, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.06.007>.

NASARUDDIN, Ricca Rahman; ALAM, Md. Zahangir; JAMI, Mohammed Saedi. Evaluation of solvent system for the enzymatic synthesis of ethanol-based biodiesel from sludge palm oil (SPO). **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 154, p.155-161, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.095>.

NASCIMENTO, B. Síntese e caracterização de sulfato de acetato de celulose, obtido de bagaço de cana-de-açúcar, para aplicação como aditivo na construção civil. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

NELSON, Lloyd A.; FOGLIA, Thomas A.; MARMER, William N.. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, [s.l.], v. 73, n. 9, p.1191-1195, set. 1996. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02523383>.

NIGAM, Snigdha et al. Lipase Immobilization Techniques for Biodiesel Production: An Overview. **International Journal Of Renewable Energy And Biofuels**, [s.l.], p.1-16, 14 maio 2014. IBIMA Publishing. <http://dx.doi.org/10.5171/2014.664708>.

NOVOZYMES. **Lipase enzymes**: Immobilized lipase enzymes. 2017. Disponível em: <<https://www.novozymes.com/en/solutions/pharmaceuticals/biocatalysis/immobilized-lipase-enzymes>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

OLIVEIRA, Geandre de Carvalho et al. Synthesis and application of methylcellulose extracted from waste newspaper in CPV-ARI Portland cement mortars. **Journal Of Applied Polymer Science**, [s.l.], p.1380-1385, 3 jun. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/app.32477>.

OLIVEIRA, Rafael L. et al. Synthesis and Characterization of Methylcellulose Produced from Bacterial Cellulose under Heterogeneous Condition. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], p.1861-1870, 2015. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150163>.

PALACIOS-NEREO, Francisco Javier et al. High-yield non-catalytic supercritical transesterification of soybean oil to biodiesel induced by gradual heating in a batch reactor. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [s.l.], v. 111, p.135-142, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.01.022>.

PALOMO, José M et al. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 19-20, p.279-286, dez. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1381-1177\(02\)00178-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1381-1177(02)00178-9).

PALOMO, Jose M. et al. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.447-454, mar. 2005a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.09.013>.

PALOMO, Jose M. et al. Synthesis of enantiomerically pure glycidol via a fully enantioselective lipase-catalyzed resolution. **Tetrahedron: Asymmetry**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.869-874, fev. 2005b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.12.027>.

PENCREACH, Gaëlle; BARATTI, Jacques C.. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the Pseudomonas cepacia lipase: A simple test for the determination of lipase

activity in organic media. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 18, n. 6, p.417-422, maio 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00120-4](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(95)00120-4).

PEREIRA, Marita Gimenez et al. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.561-570, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.027>.

PICHETH, Guilherme Fadel et al. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 104, p.97-106, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171>.

PILISSÃO, Cristiane; NASCIMENTO, Maria da Graça. Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (RS)-methyl mandelate catalyzed by lipases. **Tetrahedron: Asymmetry**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.428-433, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetasy.2006.02.001>.

POPPE, Jakeline Kathiele et al. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. **Applied Catalysis A: General**, [s.l.], v. 490, p.50-56, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2014.10.050>.

PRETTO, Cristine de; TARDIOLI, Paulo Waldir; COSTA, Caliane Bastos Borba. Modelling and Analysis of a Soybean Biorefinery for the Production of Refined Oil, Biodiesel and Different Types of Flours. **Computer Aided Chemical Engineering**, [s.l.], p.925-930, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-63428-3.50159-4>.

PULEO, A.c.; PAUL, D.r.; KELLEY, S.s.. The effect of degree of acetylation on gas sorption and transport behavior in cellulose acetate. **Journal Of Membrane Science**, [s.l.], v. 47, n. 3, p.301-332, dez. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0376-7388\(00\)83083-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0376-7388(00)83083-5).

RAUF, S. et al. Glucose oxidase immobilization on a novel cellulose acetate–polymethylmethacrylate membrane. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 121, n. 3, p.351-360, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.019>.

RIBEIRO, Elaine Angélica Mundim et al. Characterization of asymmetric membranes of cellulose acetate from recycling of residue corn stover for use in ultrafiltration. **Química Nova**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.385-391, 2014. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140070>.

RIBEIRO, Sabrina Dias et al. Cellulose triacetate films obtained from sugarcane bagasse: Evaluation as coating and mucoadhesive material for drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 152, p.764-774, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.069>.

RIBEIRO, Sabrina Dias. **Síntese e caracterização de membranas de triacetato de celulose a partir do aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar para liberação controlada de drogas**. 2012. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

RIGO, Elisandra. **Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja**. 2009. 190 f. Tese

(Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

ROBLES-MEDINA, A. et al. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.398-408, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.008>.

RODRIGUES FILHO, Guimes et al. Release of doxycycline through cellulose acetate symmetric and asymmetric membranes produced from recycled agroindustrial residue: Sugarcane bagasse. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.566-571, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.037>.

RODRIGUES, Rafael C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, [s.l.], v. 42, n. 15, p.6290-6307, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c2cs35231a>.

RODRIGUES, Rafael C. et al. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized–stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 45, n. 8, p.1268-1273, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.04.015>.

RÓS, Patrícia Caroline Molgero da et al. Biodiesel from babassu oil: Characterization of the product obtained by enzymatic route accelerated by microwave irradiation. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 52, p.313-320, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.013>.

RUEDA, Nazzoly et al. Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 128, p.10-18, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.03.002>.

SALIHU, Aliyu; ALAM, Md. Zahangir. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.86-96, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.019>.

SANKARAN, Revathy; SHOW, Pau Loke; CHANG, Jo-shu. Biodiesel production using immobilized lipase: feasibility and challenges. **Biofuels, Bioproducts And Biorefining**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.896-916, 30 set. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.1719>.

SANTÓRIO, Ricardo; VELOSO, Cláudia de Oliveira; HENRIQUES, Cristiane A.. Preparation, basic properties and catalytic activity of Mg/La and Al/La catalysts for biodiesel production from refined and acid soybean oil. **Journal Of Molecular Catalysis A: Chemical**, [s.l.], v. 422, p.234-247, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcata.2015.12.006>.

SANTOS, Jose C.s. dos et al. Stabilizing hyperactivated lecithase structures through physical treatment with ionic polymers. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 49, n. 9, p.1511-1515, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.05.009>.

SANTOS, Regina.c.r.; VIEIRA, Rômulo B.; VALENTINI, Antoninho. Monitoring the conversion of soybean oil to methyl or ethyl esters using the refractive index with correlation

gas chromatography. **Microchemical Journal**, [s.l.], v. 109, p.46-50, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.001>.

SARBU, Andrei et al. New method for the covalent immobilization of a xylanase by radical grafting of acrylamide on cellulose acetate membranes. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.125-130, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.007>.

SASSI, Jean-françois; CHANZY, Henri. Ultrastructural aspects of the acetylation of cellulose. **Cellulose**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.111-127, jun. 1995. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00816384>.

SERIO, Martino di et al. Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production. **Energy & Fuels**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.207-217, jan. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ef700250g>.

SHAH, Shweta; GUPTA, Munishwar N.. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 42, n. 3, p.409-414, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.09.024>.

SHAH, Shweta; SHARM, Shweta; GUPTA, M N. Enzymatic transesterification for biodiesel product ion. **Indian Journal Of Biochemistry & Biophysics**, India, v. 40, p.392-399, dez. 2003.

SIGMA-ALDRICH. **Immobilized Enzymes**. 2017. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-products.html?TablePage=16252242>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

SILVA, Jader Conceição da. **DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE OSMOSE PARA GERAÇÃO DE ENERGIA**. 2015. 107 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de

SILVA, José André Cavalcanti da et al. Enzymatic production and characterization of potential biolubricants from castor bean biodiesel. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 122, p.323-329, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.017>.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J.. Espectrometria no Infravermelho: Absorções características de grupos em moléculas orgânicas. In: SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J.. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Ltc - Livros Técnicos e Científicos Editora S.a., 2007. Cap. 2. p. 80-104.

SOLER, Lorena; ILLANES, Andrés; WILSON, Lorena. Immobilization of *Alcaligenes* sp. lipase as catalyst for the transesterification of vegetable oils to produce biodiesel. **Catalysis Today**, [s.l.], v. 259, p.177-182, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2015.06.025>.

SUAREZ, Paulo A. Z. et al. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química**



Nova, [s.l.], v. 30, n. 3, p.667-676, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO).  
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000300028>.

TACIAS-PASCACIO, Veymar G. et al. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. **Fuel**, [s.l.], v. 200, p.1-10, jul. 2017. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2017.03.054>.

TONOLI, G.h.d. et al. Cellulose micro/nanofibres from Eucalyptus kraft pulp: Preparation and properties. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 89, n. 1, p.80-88, jun. 2012. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.052>.

TURATI, Daniela et al. Immobilization of Lipase from *Penicillium* sp. Section *Gracilentia* (CBMAI 1583) on Different Hydrophobic Supports: Modulation of Functional Properties. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.339-354, 22 fev. 2017. MDPI AG.  
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules22020339>.

ULLAH, Faizan et al. Current advances in catalysis toward sustainable biodiesel production. **Journal Of The Energy Institute**, [s.l.], v. 89, n. 2, p.282-292, maio 2016. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joei.2015.01.018>.

UMMARTYOTIN, Sarute; MANUSPIYA, Hathaikarn. A critical review on cellulose: From fundamental to an approach on sensor technology. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 41, p.402-412, jan. 2015. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.050>.

UNGCHAROENWIWAT, Pakpimol; CANYUK, Bhutorn; H-KITTIKUN, Aran. Synthesis of jatropha oil based wax esters using an immobilized lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 and Lipozyme RM IM. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 51, n. 3, p.392-398, mar. 2016. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.12.019>.

VEIGA, Paula M.; VELOSO, Claudia O.; HENRIQUES, Cristiane A.. Synthesis of Zn,La-catalysts for biodiesel production from edible and acid soybean oil. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 99, p.543-552, dez. 2016. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.07.035>.

VELASCO-LOZANO, Susana et al. Improving enantioselectivity of lipase from *Candida rugosa* by carrier-bound and carrier-free immobilization. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 130, p.32-39, ago. 2016. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.04.006>.

VERDASCO-MARTÍN, Carlos M. et al. Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 111, p.75-86, jul. 2016. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2016.03.004>.

VERMA, Puneet; SHARMA, M.p.. Review of process parameters for biodiesel production from different feedstocks. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 62, p.1063-1071, set. 2016. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.04.054>.

VESCOVI, Vinicius et al. Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino-

glutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 51, n. 12, p.2055-2066, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.016>.

VIEIRA, Júlia G. et al. Synthesis and characterization of methylcellulose from cellulose extracted from mango seeds for use as a mortar additive. **Polímeros**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.80-87, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-14282012005000011>.

VIEIRA, Júlia Graciele et al. Production, characterization and evaluation of methylcellulose from sugarcane bagasse for applications as viscosity enhancing admixture for cement based material. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 78, n. 4, p.779-783, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.016>.

VIPIN, V.c. et al. Enzymatic Transesterification of Rubber Seed Oil Using Rhizopus Oryzae Lipase. **Procedia Technology**, [s.l.], v. 25, p.1014-1021, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.protcy.2016.08.201>.

VIRGEN-ORTÍZ, Jose J. et al. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 96, p.30-35, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.09.010>.

WADA, Masahisa; HEUX, Laurent; SUGIYAMA, Junji. Polymorphism of Cellulose I Family: Reinvestigation of Cellulose IVI. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.1385-1391, jul. 2004. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bm0345357>.

WANG, Y.; HSIEH, Y.-l.. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. **Journal Of Membrane Science**, [s.l.], v. 309, n. 1-2, p.73-81, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2007.10.008>.

WANG, Y.; WU, H.; ZONG, M.h.. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 15, p.7232-7237, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.062>.

WANG, Yong et al. Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase A1 (Lecitase Ultra). **Food Chemistry**, [s.l.], v. 121, n. 4, p.1066-1072, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.051>.

XU, Yuanyuan et al. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 25, n. 15, p.1239-1241, 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1025065209983>.

YAN, Yunjun et al. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. **Applied Energy**, [s.l.], v. 113, p.1614-1631, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.09.029>.

YANG, Ji-guo et al. Degumming of Vegetable Oil by a New Microbial Lipase. **Food Technology Biotechnology**, China, v. 1, n. 44, p.101-104, 2006.

YILDIZ, Hatice; AKYILMAZ, Erol; DINÇKAYA, Erhan. Catalase Immobilization in Cellulose Acetate Beads and Determination of its Hydrogen Peroxide Decomposition Level

by using a Catalase Biosensor. **Artificial Cells, Blood Substitutes, And Biotechnology**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.443-452, jan. 2004. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1081/bio-200027507>.

YOUSEFI, Maryam; MOHAMMADI, Mehdi; HABIBI, Zohreh. Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s.l.], v. 104, p.87-94, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.03.005>.

ZHANG, Baohua et al. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 93, n. 1, p.61-70, 15 nov. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3672-x>.

ZHAO, Kang et al. Synthesis, characterization and optimization of a two-step immobilized lipase. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 103, p.383-387, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.11.035>.

ZHOU, Xingman et al. Effect of the degree of substitution on the hydrophobicity of acetylated cellulose for production of liquid marbles. **Cellulose**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.811-821, 6 jan. 2016. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-015-0856-z>.



## ANEXO 1

### FICHA DE INFORMAÇÃO DA ENZIMA LECITASE ULTRA



## Lecitase® Ultra

Neste produto a atividade enzimática chave é fornecida por lipase, que hidrolisa ligações éster em glicéridos

#### CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO

Enzima Declarada	Lipase
Atividade declarada	10 KLU/g
Cor	Amarelo a levemente marrom
Apresentação	Líquido
A cor pode variar de um lote para outro. A intensidade da cor não é um indicativo da atividade enzimática.	

#### ESPECIFICAÇÃO DO PRODUTO

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Lipase Units KLU	10		/g
Contagem total de viáveis	-	50000	/g
Bactéria Coliforme	-	30	/g
E. coli	Não detectado		/25 g
Salmonella	Não detectado		/25 g
Metais pesados		Máx. 30	mg/kg
Chumbo		Máx. 5	mg/kg
Arsênico		Máx. 3	mg/kg
Cádmio		Máx. 0.5	mg/kg
Mercurio		Máx. 0.5	mg/kg

O método analítico da enzima está disponível no Portal do Cliente (Customer Centre) ou com o seu representante de vendas.

#### COMPOSIÇÃO

Ingredientes	% aprox. (g/p)
Sorbitol, CAS no. 50-70-4	50
Água, CAS no. 7732-18-5	42
Lipase, CAS no. 9001-62-1*	8
Sorbato de potássio, CAS no. 24634-61-5	0.20

\* Definido como enzima conc. (base matéria seca)

#### INFORMAÇÃO SOBRE ALERGIA

Alergênico	Substância contida <sup>1</sup>	Alergênico	Substância contida <sup>1</sup>
Carne bovina	não	Lactose	não
Cenoura	não	Leguminosas	não
Alpico	não	Tremço	não
Cereais contendo glúten <sup>2</sup>	não	Leite	não
Carne de frango	não	Moluscos	não
Cacau	não	Mostarda	não
Coentro	não	Nozes <sup>2</sup>	não
Milho	não	Amendoim	não
Crustáceos	não	Carne de porco	não
Ovo	não	Germe de trigo	não
Peixe	não	Soja	não
Glutamato	não	Dióxido de enxofre/sulfatos, mais que 10 mg por kg ou l	não

<sup>1</sup> Definição de substâncias em conformidade com LeDa/ALBA e Diretrizes da UE 2000/13/CE e 2007/68/CE e as respectivas emendas

<sup>2</sup> Trigo, centeio, cevada, aveia, espelta, kamut

<sup>3</sup> Trigo, amêndoa, avelã, noz, castanha de caju, noz-pecã, castanha do Pará, pistache, macadâmia e noz de Queensland

#### ORGANISMO DE PRODUÇÃO

Organismo de produção	Aspergillus oryzae
Organismo doador	Thermomyces lanuginosus
Produzido por fermentação submersa de um microorganismo geneticamente modificado. A proteína enzimática, que é uma proteína geneticamente modificada, foi separada e purificada do organismo produtor.	

#### CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

A embalagem deve ser mantida intacta, seca e ao abrigo da luz. Siga as recomendações e use o produto antes da data de validade expirar para evitar a necessidade de uma dosagem maior.

Melhor utilizar antes de: A data de validade encontra-se no certificado de análise ou na embalagem do produto.

O produto oferece desempenho ideal se armazenado a 0–10 °C/32–50 °F e usado antes da data de validade. Se armazenado a até 25 °C/77 °F, o produto deve ser usado dentro de 3 meses após a entrega.

# Lecitase® Ultra

## PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA E MANUSEIO

Enzimas são proteínas. A inalação de poeira ou aerossóis pode induzir sensibilização e causar reações alérgicas em indivíduos sensibilizados. Algumas enzimas podem irritar a pele, os olhos e as membranas mucosas em caso de contato prolongado. Veja a RSD ou o Manual de Segurança para mais informações sobre como manusear o produto com segurança e o que fazer em caso de derramamento.

## CONFORMIDADE

O produto está em conformidade com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício definidas pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Food Chemicals Codex (FCC).

Os certificados Kosher e Halal encontram-se disponíveis no Customer Center ou com o representante de vendas.

## CERTIFICAÇÕES

A Novozymes é signatária do Pacto Global das Nações Unidas, da Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade Biológica e reportamos o nosso desempenho de sustentabilidade através da Global Reporting Initiative (GRI). Ver todos os nossos compromissos no âmbito da sustentabilidade em [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com).



## SEGURANÇA ALIMENTAR

A Novozymes conduziu uma análise de risco e preparou um plano APPCC descrevendo os pontos críticos de controle (PCCs). O plano APPCC é respaldado por um amplo programa de pré-requisitos implementado nas Boas Práticas de Fabricação da Novozymes.

O produto é fabricado de acordo com o plano APPCC da Novozymes, as BPF e outros requisitos do Sistema de Gestão de Qualidade Novozymes.



## EMBALAGEM

O produto está disponível em diferentes tipos de embalagem. Entre em contato com o representante de vendas para mais informações.

Novozymes Latin America Ltda.  
Rua professor Francisco Ribeiro 683  
CEP 83707-860 - Araucária - Paraná  
Brasil

Tel: +55 41 641 1000  
Fax: +55 41 643 1443

Para mais informações, ou endereços de nossos escritórios, visite: [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)

A legislação, a regulamentação e/ou os direitos de terceiros podem impedir os clientes de importar, utilizar, processar e/ou revender os produtos aqui mencionados de determinada maneira. Sem um acordo em separado e por escrito entre o cliente e a Novozymes com essa finalidade, este documento não se constitui em uma representação ou garantia de qualquer espécie e está sujeito a alterações sem aviso prévio.

© Novozymes A/S

## ANEXO 2

### CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ALBUMINA BOVINA

