



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



Rua Vinte, 1600. Bairro Tupã. CEP 38304-402, Ituiutaba / MG

ANDRESSA VILARINHO GUIMARÃES

**EMPREGO DO OCTANOATO DE CELULOSE COMO SUPORTE PARA LIPASES
VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

ITUIUTABA

2019

ANDRESSA VILARINHO GUIMARÃES

**EMPREGO DO OCTANOATO DE CELULOSE COMO SUPORTE PARA LIPASES
VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à
Comissão Avaliadora como parte das exigências do
Curso de Graduação em Química: Bacharelado
Integral, do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do
Pontal.

Orientadora: Profª. Dra. Rosana Maria Nascimento de
Assunção

ITUIUTABA

2019

ANDRESSA VILARINHO GUIMARÃES

**EMPREGO DO OCTANOATO DE CELULOSE COMO SUPORTE PARA LIPASES
VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Bacharelado Integral, do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal.

12 de julho de 2019

COMISSÃO AVALIADORA:

Prof. Dr. Anízio Márcio de Faria

Prof. Dr. Hugo de Souza Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Maria Nascimento de Assunção

Dedico todas as minhas conquistas aos meus avós Ilodi Pires (*in memoriam*) e João Vilarinho (*in memoriam*), que me ensinaram a ter fé e acreditar em dias melhores. Aos meus pais, Beatriz e Gilberto, que investiram e apoiaram minha educação. Aos meus irmãos, Charles e Leandro, que sempre estiveram comigo, me aconselhando e me apoiando. Aos meus tios, Silvio, Sônia e Sinesi, e aos meus padrinhos, Isa e Ton, que tornam melhor todos os momentos em família. Dedico também ao meu namorado, Alef Brito, por todo apoio e companheirismo, e a todos os meus amigos aos quais sei que posso contar.

Gratidão por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Dr. Rosana pela sua orientação, pelo suporte científico, pelo aprendizado e por permitir que seus alunos de pesquisa ajam com autonomia, incentivando no crescimento pessoal e profissional.

Agradecimento em especial ao Marcos, pela paciência, por toda dedicação e disposição do seu tempo em ajudar na pesquisa, muito obrigada por tudo.

Aos membros da Banca Examinadora, prof. Dr. Anízio e prof. Dr. Hugo, por terem aceito o convite.

Aos colegas Guilherme, Laila, Maycon, e Thaís, do Laboratório de Materiais, Eletroquímica e Polímeros – LAMEP, por todo apoio e contribuição para realização desse trabalho.

Agradeço também aos colegas Allyson, Diele, Lauro, Lynicker, Nathália e Roberto do Laboratório de Pesquisa, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

A toda parceria dos meus amigos de curso: Aldo, Dione, Jeniffer Vaz, Mayara Monteiro, Mirielle Cristina, Leticia Veloso, Lucas Silva e Verônica Zago, que contribuíram no meu desenvolvimento acadêmico e pessoal durante toda minha graduação.

A FAPEMIG, pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa e à FINEP pelo suporte financeiro para a infraestrutura do laboratório de pesquisa (01.11.0135.00) e de equipamentos multiusuários do Pontal - LEMUP (01.13.0371.00).

A Universidade Federal de Uberlândia - UFU, seu corpo docente, direção e administração por toda minha construção acadêmica, e a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, muito obrigada.

"Até a torre mais alta começa do chão". Provérbio Chinês

RESUMO

Polímeros tem sido empregados com suportes para enzimas devido ao fato de apresentarem condições de proteger essas moléculas e evitar sua lixiviação no meio reacional com perda as enzimas sem possibilidade de uso posterior e a contaminação ambiental devido a presença destas moléculas nos resíduos industriais. Neste trabalho, o polímero octanoato de celulose (OC) foi produzido a partir de celulose microcristalina visando a preparação de sistemas para imobilização de lipases. Este polímero apresenta um balanço do caráter hidrofílico/hidrofóbico devido à possibilidade de ser produzido com diferentes graus de substituição. Este aspecto é uma característica importante na imobilização das lipases que ocorrem com maior eficiência em materiais mais hidrofóbicos. O OC foi produzido, em fase heterogênea, a partir da reação da celulose microcristalina dispersa em tolueno com cloreto de octanoila/piridina. A reação de produção do OC foi acompanhada por absorção na região do infravermelho (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN) com resultados que mostraram que a reação foi efetiva e o grau de substituição (DS) encontrado por RMN ^1H foi de 2,20, que indica que em média 2 hidroxilas reagem por unidade de glicose. O OC apresentou boa solubilidade em tolueno e boa capacidade de formação de filme, o que permitiu a preparação do sistema Polímero/Enzima (OC/E), por oclusão da lipase no filme formado. Para aplicação deste sistema, a reação de esterificação do ácido oleico pela lipase livre foi estudada através do emprego do planejamento experimental. Neste estudo, foi possível determinar a quantidade de enzima a ser incorporada no filme de OC, bem como definir as melhores quantidades de metanol e água para a reação que foi acompanhada por FTIR. Na aplicação do sistema OC/E, a reação de esterificação ocorre com baixo rendimento. Observa-se praticamente a mesma condição no reuso. A diminuição do rendimento da enzima se deve a oclusão desta que pode ter levado a uma diminuição de sua atividade enzimática. Entretanto, observou-se boa estabilidade do sistema para aplicações posteriores. Desta forma, o sistema em estudo tem potencial para aplicações futuras com a melhoria dos métodos de imobilização.

Palavras-chave: Octanoato de celulose, imobilização de lipases, esterificação, heterogênea, produção de biodiesel.

ABSTRACT

Polymers have been used as support for enzymes due to the fact of being able to protect these molecules and to avoid their leaching in the reaction medium with loss of the enzymes with no possibility of later use and the environmental contamination due to the presence of these molecules in industrial waste. In this work, the cellulose octanoate (OC) was produced from microcrystalline cellulose to prepare lipase immobilization systems. This polymer shows a balance of the hydrophilic/hydrophobic character due to the possibility of being produced with different degrees of substitution. This aspect is an important feature in the immobilization of lipases that occur more efficiently in more hydrophobic materials. OC was produced, in a heterogeneous phase, from the reaction of microcrystalline cellulose dispersed in toluene with octanoyl chloride/pyridine. The CO production reaction was accompanied by infrared absorption (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR) with results showing that the reaction was effective and the degree of substitution (DS) found by ^1H NMR was 2.20, which indicates that on average two hydroxyls react per unit glucose in the cellulose. OC presented good solubility in toluene and good film forming ability, which allowed the preparation of the Polymer/Enzyme (OC/E) system by lipase occlusion in the formed film. For the application of this system, the reaction of esterification of oleic acid by free lipase was studied using experimental design. In this study, it was possible to determine the amount of enzyme to be incorporated in the OC film, as well as to define the best amounts of methanol and water for the reaction that was accompanied by FTIR. In the application of the OC/E system, the esterification reaction occurs with low yield. The same condition is observed in reuse. The decrease in the yield of the immobilized enzyme is due to occlusion of the enzyme in the polymer which may have led to a decrease in its enzymatic activity. However, good system stability was observed for later applications. In this way, the system under study has potential for future applications with the improvement of immobilization methods.

Keywords: cellulose octanoate, lipase immobilization, esterification, heterogeneous, biodiesel production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura química da celulose.....	13
Figura 2. Representação da estrutura química do octanoato de celulose (OC).....	14
Figura 3. Reações utilizando a lipase como biocatalisador, em que R1, R2 e R3 são cadeias carbônicas.....	18
Figura 4. Reação de esterificação, em que R ¹ referente a cadeias carbônicas.	19
Figura 5. Síntese do octanoato de celulose a partir da reação da CMC com cloreto de octanoíla (CO).	22
Figura 6. Preparo do filme padrão de OC.	24
Figura 7. Produção de biodiesel.	26
Figura 8. Produto da síntese de octanoato de celulose (OC1).	28
Figura 9. Espectro de absorção do cloreto de octanoíla (CO), octanoato de celulose (OC1 e OC2) e da celulose microcristalina (CMC).	30
Figura 10. Representação da estrutura química do octanoato de celulose (OC) para identificação dos picos em RMN de ¹ H.	32
Figura 11. RMN ¹ H do octanoato de celulose (a) da amostra OC1; e (b) da amostra OC2....	32
Figura 12. Representação da estrutura química do octanoato de celulose (OC) para identificação dos picos em RMN de ¹³ C.	33
Figura 13. RMN de ¹³ C do octanoato de celulose (a) da amostra OC1; e (b) da amostra OC2.	34
Figura 14. Curva termogravimétrica para a celulose original e para as amostras de octanoato de celulose OC1 e OC2.	35
Figura 15. Curva de DSC para as amostras de octanoato de celulose OC1 e OC2.	36
Figura 16. Filme padrão de Octanoato de Celulose.....	37
Figura 17. Imagens por MEV da superfície (a) (x100), superfície (b) (x1000), superfície (c) (x10000) e na região fraturada em ampliações (d) (x500), (e) (x5000) e (f) (x1000) do filme padrão de OC.....	38
Figura 18. Espectro na região do Infravermelho (FTIR) do ácido oleico (AO) puro com banda intensa em 1709 cm ⁻¹ e espectro do experimento com a melhor conversão.	39
Figura 19. Acompanhamento das reações de esterificação do ácido oleico por FTIR para a matriz de experimentos do planejamento fatorial 2 ³	40
Figura 20. Acompanhamento das reações de esterificação do ácido oleico por FTIR para triplicata em valores intermediários aos definidos no planejamento experimental.	41
Figura 21. Acompanhamento das reações de esterificação do ácido oleico por FTIR para os experimentos do planejamento axial.....	42
Figura 22. Superfície de resposta em % das variáveis A(Vol MeOH) e B(massa de Enzima).	43
Figura 23. Superfície de resposta em % das variáveis A(Vol MeOH) e C(Vol água).	44
Figura 24. Superfície de resposta em % das variáveis B(massa de Enzima) e C(Vol água). .	44
Figura 25. Filme com a enzima imobilizada utilizando o OC2 como suporte.	46
Figura 26. Espectro de absorção do experimento de imobilização (i) e reuso (r).	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seleção de variáveis/níveis em uma matriz, visando a melhor condição para a produção de biodiesel. (A) volume de metanol em mL; (B) massa de enzima em g e (C) volume de água em mL.	25
Tabela 2. Série de experimentos em diferentes proporções.	25
Tabela 3. Série de experimentos com 3 variáveis em 2 níveis cada.	26
Tabela 4. Porcentagem (%) de OC1 e OC2 dissolvidas nos solventes: (1) diclorometano; (2) tolueno; e (3) THF.	29
Tabela 5. Principais bandas de absorção na região do Infravermelho da Celulose Microcristalina (CMC) e do Octanoato de Celulose (OC1 e OC2).	30
Tabela 6. Razão entre as bandas das absorbâncias para a matriz de experimentos.	40
Tabela 7. Razão entre as bandas das absorbâncias para a segunda série de experimentos.	41
Tabela 8. Razão entre as bandas das absorbâncias para a terceira série de experimentos.	42
Tabela 9. Efeito das variáveis A, B e C.	43
Tabela 10. Razão entre as bandas das absorbâncias para os experimentos com o filme contendo enzima imobilizada (i) e do filme após o reuso (r).	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO	Ácido Oleico
CMC	Celulose Microcristalina
CO	Cloreto de Octanoíla
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GS	Grau de Substituição
LiCl/DMAC	Cloreto de Lítio/Dimetilacetamida
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OC	Octanoato de Celulose
RMN ¹ H	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
RMN ¹³ C	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
TGA	Análise Termogravimétrica
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Celulose.....	13
1.2 Derivados celulósicos de cadeia longa	14
1.3 Utilização de suportes poliméricos para enzimas.....	15
1.4 Emprego de enzimas na produção de biodiesel	17
2 OBJETIVOS	20
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	21
3.1 Produção do octanoato de celulose a partir da reação de modificação da celulose microcristalina.....	21
Etapa 1.1: Produção do octanoato de celulose (OC)	21
Etapa 1.2: Segunda reação de modificação do octanoato de celulose	21
3.2 Teste de Solubilidade do Octanoato de Celulose	22
3.3 Caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	22
3.4 Determinação química do grau de substituição (GS) do OC	23
3.5 Caracterização por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	23
3.6 Caracterização por Análise Termogravimétrica (TGA)	23
3.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	24
3.8 Preparo do filme padrão de OC.....	24
3.9 Caracterização por Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV)	25
3.10 Produção de biodiesel por esterificação utilizando enzimas livres	25
3.11 Imobilização da enzima em filme de OC e produção de biodiesel por esterificação utilizando o suporte para enzimas	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Produção do octanoato de celulose a partir da reação de modificação da celulose microcristalina.....	28
4.2 Teste de Solubilidade do Octanoato de Celulose	28
4.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	29
4.4 Determinação química do grau de substituição (GS) do OC	31
4.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	32
4.6 Análise Termogravimétrica.....	34
4.8 Preparo do filme padrão de OC.....	36
4.9 Microscopia Eletrônica por Varredura	37
4.10 Produção de biodiesel por esterificação utilizando enzimas livres	38
4.11 Imobilização da enzima em filme de OC.....	45

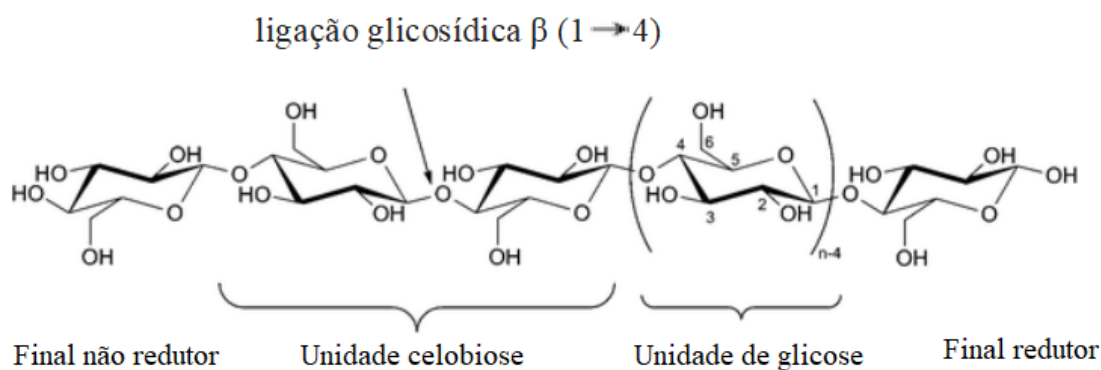
5 CONCLUSÃO	48
6 REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Celulose

A celulose é um polímero natural composto por unidades de D-glicose unidas por ligação glicosídica β (1 $\rightarrow$ 4). Além disso, a celulose pode ser considerada como matéria prima de papéis, têxteis, biomateriais, etc. (EDGAR, *et al.*, 2001). A celulose pode ser extraída de uma ampla variedade de fontes naturais, como a madeira, bambu, bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, caroço de manga (Laboratório de Reciclagem de Polímeros), etc. (SILVA *et al.*, 2017). A estrutura química da celulose está apresentada na Figura 1.

Figura 1. Representação da estrutura química da celulose.



Fonte: (EYLEY e THIELEMANS, 2014).

Nas extremidades da cadeia celulósica há uma unidade terminal de glicose, com uma hidroxila primária e duas secundárias. No final redutor, como apresentado na Figura 1, há um aldeído redutor na forma de um hemiacetal interno, enquanto que no final não redutor há uma unidade de glicose contendo uma hidroxila primária e três secundárias (WURZBURG, 1989).

Um aspecto importante da estrutura da celulose é a possibilidade de produzir derivados celulósicos a partir de reações que ocorrem nas hidroxilas livres, nos carbonos 2, 3 e 6 (descritos na Figura 1). Estes derivados apresentam geralmente propriedades muito diferentes da celulose original e dependendo do tipo de grupo substituinte é possível obter derivados solúveis em água (alguns éteres de celulose como carboximetilcelulose, metilcelulose, entre outros), polímeros termoplásticos (alguns ésteres de celulose, como o acetato de celulose, laurato de celulose, entre outros), materiais com grupos mais hidrofóbicos que ampliam as aplicações da celulose (KLEMM, *et al.*, 2005.)

Neste trabalho, foi investigada a produção de um derivado celulósico com grupo substituinte de cadeia longa, octanoato de celulose, para produção de um suporte para imobilização de lipases, visando a produção de biodiesel.

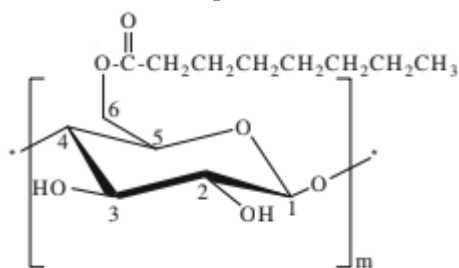
1.2 Derivados celulósicos de cadeia longa

Dentre os vários derivados celulósicos, que são mais hidrofóbicos (dependendo do grau de substituição e/ou do grupo modificador) e são insolúveis em água, os ésteres se destacam devido a sua boa capacidade de processamento na forma de filmes, micropartículas, aerogéis, não só em processos com o emprego de solventes, mas também por processamento via térmica (SILVA, *et al.*, 2017). Neste sentido, para produção de um suporte para imobilização de enzimas como as lipases, o derivado celulósico escolhido foi o octanoato de celulose. Este derivado pode ser produzido em meio homogêneo ou heterogêneo em reações com cloretos de acila (FREIRE, *et al.*, 2006).

O octanoato de celulose pode ser obtido através de uma rota sintética em fase homogênea, neste caso, é frequentemente utilizado o sistema LiCl/DMAC (Dimetilacetamida). Este solvente é eficaz, apesar de ser mais difícil a recuperação devido a utilização do cloreto de lítio. Uma das vantagens da reação ser realizada em fase heterogênea é evitar o uso de solventes para dissolução da celulose (EDGAR, *et al.*, 2001).

Neste trabalho, a celulose microcristalina (CMC) foi utilizada para a síntese do octanoato de celulose. Este derivado celulósico, é produzido a partir da acilação da celulose com cloreto de octanoila, com substituintes de cadeia de grupos de 8 carbonos. A estrutura química do octanoato de celulose (OC) está apresentada na Figura 2.

Figura 2. Representação da estrutura química do octanoato de celulose (OC).



Fonte: Adaptado da referência (WANG, *et al.*, 1994).

Uma das rotas sintéticas para a obtenção de octanoato de celulose é a partir da reação de esterificação da celulose microcristalina com cloreto de octanoíla (CO), utilizando a

piridina como catalisador, em um sistema com aquecimento em refluxo. Após o processo de refluxo, o sistema é resfriado a temperatura ambiente e o derivado celulósico produzido é precipitado no meio reacional pela adição de etanol (CREPY, *et al.*, 2009).

A acilação da celulose com cloretos de ácidos graxos é um processo importante para produção de plásticos biodegradáveis e possibilita a preparação de um material com características mais hidrofóbicas que a celulose original. Com esta mudança, em relação a celulose original, o material produzido se torna termoplástico (pode ser moldado através do fornecimento de energia na forma de calor); pode ser dissolvido em solvente orgânicos convencionais, como o tolueno; é um bom candidato como material de reforço na produção de compósitos com polímeros sintéticos, como polietileno e polipropileno, e, apresenta condições para atuar como suporte para moléculas de interesse biológico, como as enzimas (FREIRE, *et al.*, 2006; SILVA, *et al.*, 2017).

As reações de modificação da celulose podem ocorrer em condições homogêneas ou heterogêneas. Em condições homogêneas, a celulose é inicialmente dissolvida em um solvente apropriado, no caso de reações em vias heterogêneas a celulose é modificada no estado sólido e dependendo do meio de dispersão (solvente) escolhido, o derivado celulósico produzido irá gradualmente dissolver. Em ambos os casos, se o processo for realizado sem controle do processo de síntese, usando condições muito específicas, a estrutura supramolecular da celulose original será destruída e as propriedades do derivado serão muito diferentes da celulose. Dependendo da aplicação desejada, o processo de síntese pode ser controlado para que menor acessibilidade seja dada e a celulose, neste caso, é modificada apenas superficialmente (FREIRE, *et al.*, 2006).

Neste trabalho, foi realizada a escolha da rota heterogênea visando evitar o uso de solventes e/ou sistema solventes para dissolução prévia da celulose, na tentativa de diminuir o número de etapas no processamento do derivado celulósico e buscar caminhos para diminuir os custos na produção.

1.3 Utilização de suportes poliméricos para enzimas

O uso de enzimas em alguns processos ainda é limitado pelo custo das etapas de extração e isolamento frente às dificuldades encontradas quanto à labilidade destes sistemas que são muito sensíveis às condições experimentais. Neste sentido, um caminho alternativo para melhorar o desempenho dos processos enzimáticos é promover sua imobilização em suportes poliméricos através de processos físicos e/ou químicos em espaços vazios que

permitam a acomodação das enzimas com a manutenção da atividade catalítica e permita sua retenção para uso repetitivo. O processo de imobilização tem como aspectos vantajosos a possibilidade de reutilização do sistema catalítico (enzima + suporte polimérico), a fácil separação e purificação dos produtos e o aumento da estabilidade térmica e química das enzimas. Todos estes aspectos ampliam significativamente a possibilidade de processos viáveis economicamente. (GUPTA, *et al.*, 2013).

Alguns materiais são citados na literatura como suportes para a imobilização de lipases: polímeros considerados polares como poli(metacrilato de metila); polímeros sintéticos anfifílicos como polietilenoglicol ou hidrofóbicos, e suportes inorgânicos, como sílica gel alquil modificada e amberlite (LAGE, *et al.*, 2016; UPPENBERG, *et al.*, 1994; BASRI, *et al.*, 1996).

A imobilização das enzimas pode ser realizada em membranas poliméricas, espumas, microesferas, materiais na forma de pó, sendo que as membranas ainda possuem um papel atrativo por poder cumprir duas funções: são substratos para imobilização da enzima e podem atuar em processos de separação e purificação. Além destes aspectos, é importante ressaltar que estes sistemas apresentam algumas vantagens por serem flexíveis e poderem constituir partes de reatores. Ainda, dependendo do polímero empregado, estes materiais podem ser modificados quimicamente para melhorar o processo de imobilização das enzimas por métodos químicos e/ou físicos. A morfologia da membrana é outro aspecto que deve ser avaliado, uma vez que o material com boa porosidade permite que a lipase ligada ao substrato amplie a acessibilidade da enzima através dos poros, minimizando limitações no processo de difusão. O uso destes sistemas também inibe processos de corrosão que pode ocorrer nos reatores. Os suportes avaliados neste trabalho podem ser preparados na forma de pó e possuem boa capacidade de formação de filme e membranas. (ZHANG, *et al.*, 2015)

O desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas tem sido muito importante por: propiciar a reutilização desse catalisador por diversas vezes, sem perda significativa da atividade enzimática; facilitar a separação do catalisador no final da reação e, também, por aumentar a estabilidade frente a solventes orgânicos (HELDT-HANSEN, *et al.*, 1989).

Os processos de imobilização empregados podem ser divididos em: (a) métodos físicos, em que interações fracas são dominantes; (b) métodos químicos, em que ligações covalentes com as lipases e a matriz polimérica são formadas; e (c) em que as moléculas de lipase são ocluídas nos poros do suporte. Existe uma extensa literatura que trata tanto da

sistematização destes processos quanto das técnicas de imobilização, tipo de membranas, fonte de lipase e suas aplicações. Além disto, a escolha apropriada da técnica de imobilização permite um melhor controle da reação e da qualidade dos produtos como melhoria na conversão das reações (GUPTA, *et al.*, 2013).

Em trabalho anterior realizado pelo Laboratório de Reciclagem de Polímeros, SILVA *et al.* (2017), produziram o acetato de celulose (triacetato de celulose - TAC) a partir de polpa celulósica Kraft. O TAC produzido foi empregado para imobilização da fosfolipase Lecitase Utra® por adsorção do extrato enzimático. A porcentagem de imobilização da enzima atingiu 97,1% em 60 minutos de adsorção, com uma atividade enzimática de 975,8 U g⁻¹. A enzima manteve sua atividade enzimática, permitindo a produção de 44% de ésteres metílicos, mesmo não sendo a principal finalidade desta enzima produzir biodiesel, uma vez que as fosfolipases são utilizadas para degomagem do óleo.

Considerando o emprego de derivados celulósicos na imobilização de enzimas, neste trabalho, o suporte empregado foi o octanoato de celulose na forma de filmes, no qual a enzima foi ocluída durante a formação do filme.

1.4 Emprego de enzimas na produção de biodiesel

Na produção de biodiesel a catálise homogênea é o processo mais utilizado, pois apresenta uma série de vantagens devido ao baixo custo e elevada conversão do processo de transesterificação. Além destes aspectos, a reação de transesterificação pode ser realizada em temperatura ambiente levando poucas horas para que o processo se complete. Apesar destas vantagens, a síntese do biodiesel através da catálise homogênea apresenta algumas desvantagens que precisam ser superadas para o emprego do processo de forma mais eficiente e competitiva comercialmente com outras fontes de combustíveis. Uma das principais desvantagens deste processo é a dificuldade de empregá-lo em matérias primas que apresentem elevada acidez e umidade, uma vez que estes materiais podem formar emulsões, que dificultam a separação dos produtos e ainda geram subprodutos indesejados como o sabão (BABAKI, *et al.*, 2016).

Um caminho alternativo as rotas homogêneas é a utilização de enzimas imobilizadas em suportes poliméricos sólidos. As lipases produzidas a partir de microorganismos encontram grande aplicabilidade, uma vez que estas são facilmente extraídas e em elevados teores. Estas enzimas podem ser utilizadas em meios aquosos, em solventes orgânicos e nas

interfaces entre estes dois meios, além destes aspectos estas enzimas apresentam quimiosseletividade, regiosseletividade e estereosseletividade (GUPTA, *et al.*, 2013).

As lipases são enzimas que podem ser encontradas em animais, plantas e microorganismos. As lipases atuam sobre os lipídeos como biocatalisador de óleos e gorduras, produzindo ácidos graxos e glicerol (VILLENEUVE, P. *et al.*, 2000). As lipases possuem atividade tanto hidrolítica quanto sintética, podendo ser utilizadas em reações de esterificação e transesterificação (alcoólise e acidólise) de biodiesel (SHAH, *et al.*, 2003). A Figura 3 apresenta diferentes reações utilizando a enzima como biocatalisador.

Figura 3. Reações utilizando a lipase como biocatalisador, em que R1, R2 e R3 são cadeias carbônicas.

1. Hidrólise

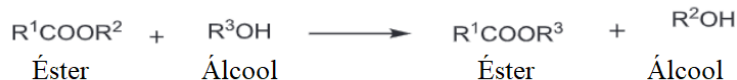


2.a Esterificação



2.b Interesterificação

Alcoólise



Acidólise



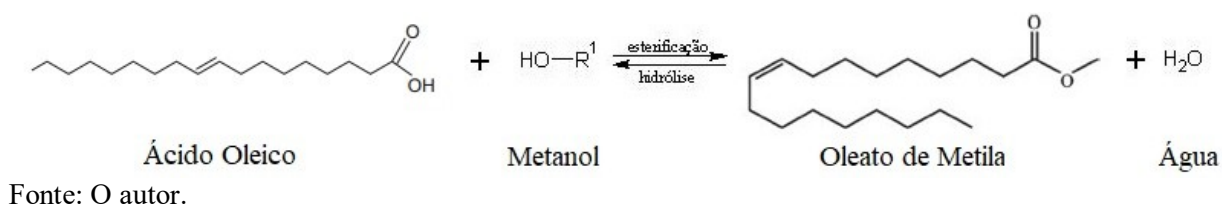
Fonte: Adaptado de (GULDHE, *et al.*, 2015).

A reação de hidrólise envolve ataque na ligação éster do triglicerídeo na presença de moléculas de água para produzir glicerol e ácidos graxos. A reação de esterificação entre álcoois polihídricos e ácidos graxos livres é a reação inversa da hidrólise do glicerídeo correspondente. O termo interesterificação refere-se à troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise) ou um éster e outro éster (transesterificação). Nessas reações, o triglicerídeo reage com um ácido graxo, um álcool ou outro éster, resultando em um rearranjo dos grupos de ácidos graxos do triglicerídeo de forma a produzir-se um novo triglicerídeo. O rearranjo é o resultado de reações concorrentes de hidrólise e esterificação (OLIVEIRA, *et al.*, 2000).

As lipases apresentam diversas propriedades e eficiência catalítica. Em reações de transesterificação, as lipases podem converter efetivamente triglicerídeos em ácidos graxos, tendo interesse na produção de biodiesel (GULDHE, *et al.*, 2015). O rendimento do biodiesel depende de alguns fatores como: a fonte da lipase, técnicas de aplicação, aceitador de acila, temperatura, tipo de solvente, e razão molar de álcool para óleo (LI, *et al.*, 2009; GOG, *et al.*, 2012).

Neste trabalho, o oleato de metila foi produzido por esterificação do ácido oleico, conforme reação geral apresentada na Figura 4. Desta forma, a atividade da enzima foi testada para reação de esterificação (SILVA *et al.*, 2017; LÓPEZ, *et al.*, 2015).

Figura 4. Reação de esterificação, em que R¹ referente a cadeias carbônicas.



A reação de esterificação ocorre entre um ácido e um álcool, gerando éster e água. Esta reação é reversível, onde um éster em meio básico sofre hidrólise. No entanto, a reação inversa é mais lenta. (LOTTERO, *et al.*, 2005). Neste trabalho, os reagentes foram o ácido oleico e o metanol, utilizando a lipase como biocatalizador.

Diante dos aspectos apresentados, neste trabalho foi desenvolvido um suporte a partir do octanoato de celulose para imobilização de lipases visando a produção de biodiesel.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver sistemas estáveis carreadores da enzima lipase para emprego em produção de biodiesel a partir do octanoato de celulose obtido da celulose microcristalina.

De forma a cumprir este objetivo geral, foram estabelecidos como objetivos específicos:

- i)** Estudar uma rota sintética adequada para a produção do octanoato de celulose a partir da celulose microcristalina;
- ii)** Caracterizar os materiais produzidos por **a)** Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR, do inglês “*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*”); **b)** Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV); **c)** Termogravimetria (TGA, do inglês “*Thermogravimetry*”); **d)** Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC, do inglês “*Differential Scanning Calorimeter*”); **e)** Determinação do Grau de substituição (GS); **f)** Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C);
- iii)** Empregar o octanoato de celulose obtido na produção de filmes;
- iv)** Produzir filmes a partir do octanoato de celulose com a enzima lipase imobilizada;
- v)** Otimizar as condições para reações de esterificação do ácido oleico com as enzimas lipases livres.
- vi)** Aplicar as condições reacionais otimizadas para as lipases livres a reações de esterificação de ácido oleico com lipases imobilizadas no filme de octanoato de celulose.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Produção do octanoato de celulose a partir da reação de modificação da celulose microcristalina

Etapa 1.1: Produção do octanoato de celulose (OC)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 0,5 g de celulose microcristalina (CMC) e 12,5 mL de tolueno, ambos reagentes adquiridos pela Synth. A celulose foi dispersa em tolueno através de agitação magnética por 30 min à 60 °C. Ainda sob agitação, foram adicionados à mistura, gota a gota, 12,5 mL da solução de tolueno e 2,0 mL de cloreto de octanoíla da marca Acros Organics. Em seguida, foram adicionados à solução resultante, 2,5 mL de piridina (Synth) e mantida a agitação constante durante 3 h à temperatura de 60 °C. Todo o experimento foi realizado sob um sistema de refluxo.

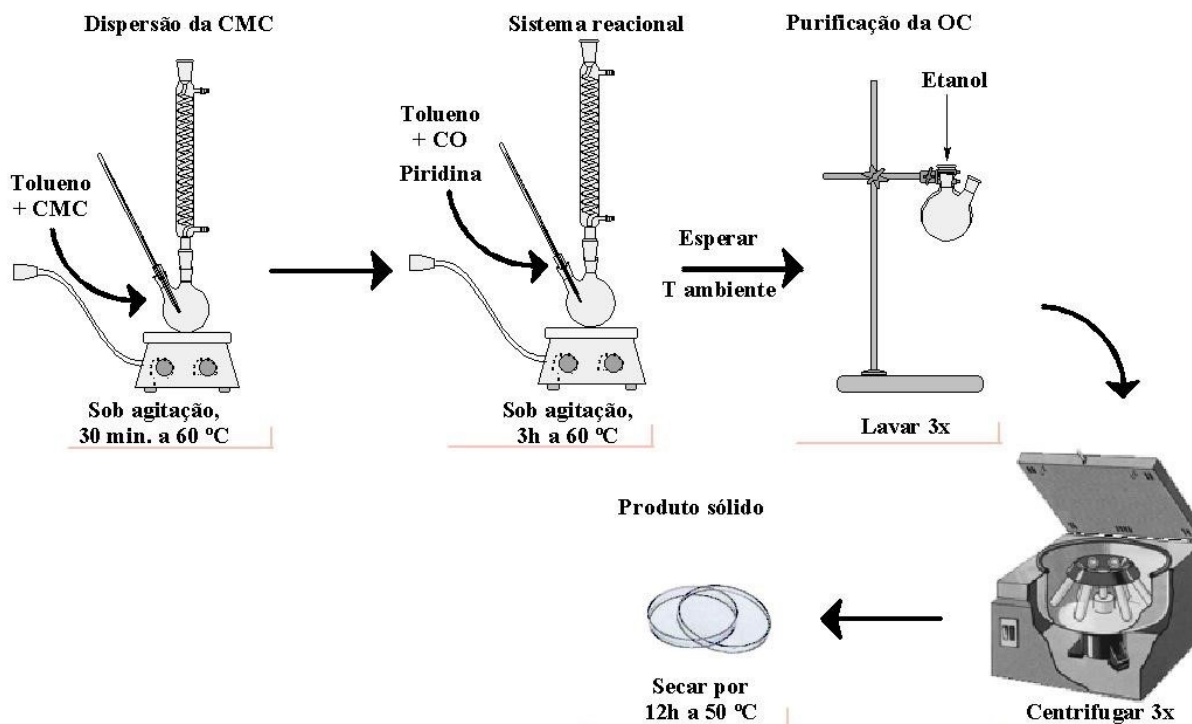
Após o período de reação, o aquecimento e o agitador magnético foram desligados. Esperou-se até que a mistura atingisse a temperatura ambiente (27° C) e o precipitado foi lavado com etanol (Synth), transferido para 4 tubos de ensaio e levados a uma centrífuga da marca Nova Instruments, para separação do produto a uma velocidade de 2000 rpm por 10 min. O precipitado foi transferido para uma placa de Petri, sendo levado para a estufa à 50 °C, durante 12 h. Em seguida, o material sintetizado foi pesado, identificado como OC1 e, posteriormente, caracterizado.

Etapa 1.2: Segunda reação de modificação do octanoato de celulose

Partindo-se da mesma metodologia utilizada na Etapa 1.1, foi realizada uma segunda reação de modificação do octanoato de celulose a partir de aproximadamente 2,0 g do octanoato de celulose produzido na Etapa 1.1 (OC1). O material sintetizado foi pesado, identificado como OC2 e, posteriormente, caracterizado.

A representação esquemática do procedimento experimental realizado nas duas etapas de síntese do octanoato de celulose está apresentado na Figura 5.

Figura 5. Síntese do octanoato de celulose a partir da reação da CMC com cloreto de octanoíla (CO).



Fonte: O autor.

3.2 Teste de Solubilidade do Octanoato de Celulose

O teste de solubilidade foi realizado utilizando-se 0,01 g de OC em 10 mL dos solventes: (1) diclorometano (Vetec), (2) tolueno (Synth) e (3) tetrahidrofurano (THF) (Vetec). As misturas foram submetidas à agitação constante em um agitador magnético por 30 min. Para fins quantitativos, também foi realizado o teste de solubilidade por filtração à vácuo, utilizando-se um funil de placa sinterizada número 4, que foi limpo, seco em estufa e pesado antes e após a filtração à vácuo de cada uma das misturas resultantes. A diferença de massa obtida foi utilizada para avaliar quanto do polímero havia se solubilizado.

3.3 Caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho para cada amostra foram obtidos em um espectrômetro da marca Agilent Technologies, Modelo Cary 630 FTIR, com cristal de ATR (do inglês, Attenuated Total Reflectance) através da adição das amostras diretamente sob o cristal e realização de 140 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} , após coleta de 140 varreduras de plano de fundo, na região de 4000 a 500 cm^{-1} . As análises foram realizadas

no Laboratório de Equipamentos Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Pontal - LEMUP, obtidos com recursos da FINEP/2010 e 2013 (INFR1301.13.0371.00).

3.4 Determinação química do grau de substituição (GS) do OC

Em um erlenmeyer de 125 mL foi adicionado 0,1 g de octanoato de celulose, 5 mL de uma solução padronizada de NaOH a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e 5 mL de etanol. A mistura permaneceu em repouso por 24 h. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de solução padronizada de HCl a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ deixando-a em repouso por mais 30 min. Então, a solução foi titulada com a solução padronizada de NaOH a $0,25 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando a solução de fenolftaleína a 1,0 % m/v como indicador.

3.5 Caracterização por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A caracterização estrutural do octanoato de celulose para confirmação da modificação da celulose foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C em um espectrômetro Bruker AscendTM 400 (400 MHz) (Karlsruhe, Alemanha). As amostras foram preparadas pela dissolução de 20 mg do OC, previamente seco, em 0,5 mL de CDCl_3 . Os deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C foram definidos pelo sinal do tetrametilsilano (TMS) em 0 (zero) ppm. O espectro unidimensional de RMN de ^1H e de ^{13}C foi realizado a temperatura ambiente (27°C) com um tempo de espera entre cada aquisição de 2 s, aquisição de 128 transientes em uma janela espectral de 16 ppm e 32k de número de pontos. Esta medida foi realizada no Laboratório Multiusuários do IQ/UFU.

3.6 Caracterização por Análise Termogravimétrica (TGA)

As Análises Termogravimétricas foram realizadas em um Analisador Térmico, modelo TGA55, da TA Instruments. Em cada ensaio, cerca de 5 mg do material foram aquecidos em porta amostra de platina de 25 até 600°C , na razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio em fluxo de $60 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. As curvas de DTG (Termogravimetria Derivada, do inglês “*Derivative Thermogravimetry*”) foram obtidas a partir do tratamento gráfico de primeira derivada das curvas TGA em software de tratamento gráfico. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Equipamentos Multiusuários da Universidade Federal

de Uberlândia, Campus Pontal – LEMUP, obtidos com recursos da FINEP/2010 e 2013 (INFR1301.13.0371.00).

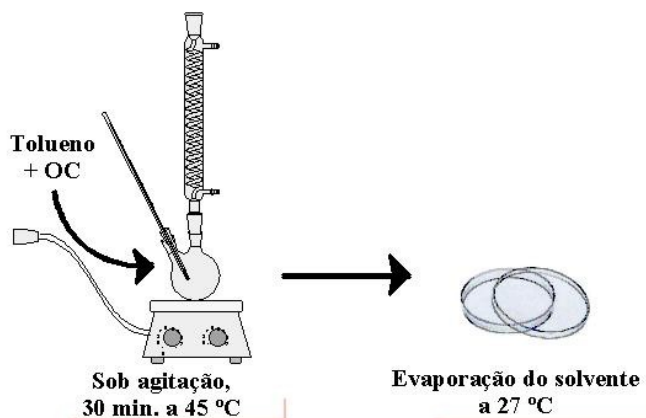
3.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os experimentos foram realizados em um Calorímetro Exploratório Diferencial, modelo DSC25, da TA Instruments. Foram utilizados porta amostras padrão de alumínio com tampa, em que cerca de 3 mg do material foram aquecidos de -90 a 250 °C para registro de uma primeira varredura. Após a primeira varredura, o equipamento foi resfriado à temperatura de -90 °C por um sistema de resfriamento RCS120 e submetido a novo aquecimento de -90 a 250 °C para registro de uma segunda varredura. As amostras foram analisadas na taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 50 cm³ min⁻¹. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Equipamentos Multiusuários da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Pontal – LEMUP, obtidos com recursos da FINEP/2010 e 2013 (INFR1301.13.0371.00).

3.8 Preparo do filme padrão de OC

Em um sistema de refluxo, foram adicionados 0,5 g de octanoato de celulose e 35 mL de tolueno, sendo submetidos a agitação constante e aquecidos à 45 °C, até a completa dissolução do sólido. A mistura foi transferida para uma placa de Petri e mantida em repouso por 72 h, de forma a garantir que todo o solvente fosse evaporado. O filme produzido foi pesado e caracterizado. A representação esquemática do procedimento experimental utilizado na formação do filme está apresentada na Figura 6.

Figura 6. Preparo do filme padrão de OC.



Fonte: O autor.

3.9 Caracterização por Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV)

O filme foi metalizado com uma fina camada de ouro em uma Metalizadora para carbono e ouro modelo Quorum QR 150ES e analisadas quanto à superfície e secção transversal da membrana em um Microscópio Eletrônico de Varredura modelo VEGA3, TESCAN, operando a 10 kV. Os ensaios foram realizados no Laboratório Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU).

3.10 Produção de biodiesel por esterificação utilizando enzimas livres

A fim de determinar a melhor condição para a produção de biodiesel utilizando um suporte para enzimas, inicialmente foram realizados testes com enzimas livres, a partir de uma seleção de variáveis em uma matriz, mantendo o ácido oleico (AO) em uma quantidade fixa de 5 g e temperatura também fixa de 45 °C. As variáveis estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Seleção de variáveis/níveis em uma matriz, visando a melhor condição para a produção de biodiesel. (A) volume de metanol em mL; (B) massa de enzima em g e (C) volume de água em mL.

Variáveis/Níveis	-1	0	+1
A	15,0	17,5	20,0
B	0,2	0,6	1,0
C	0,4	1,2	2,0

A partir dos valores apresentados na Tabela 1, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 , de acordo com a matriz de experimentos apresentada na Tabela 2.

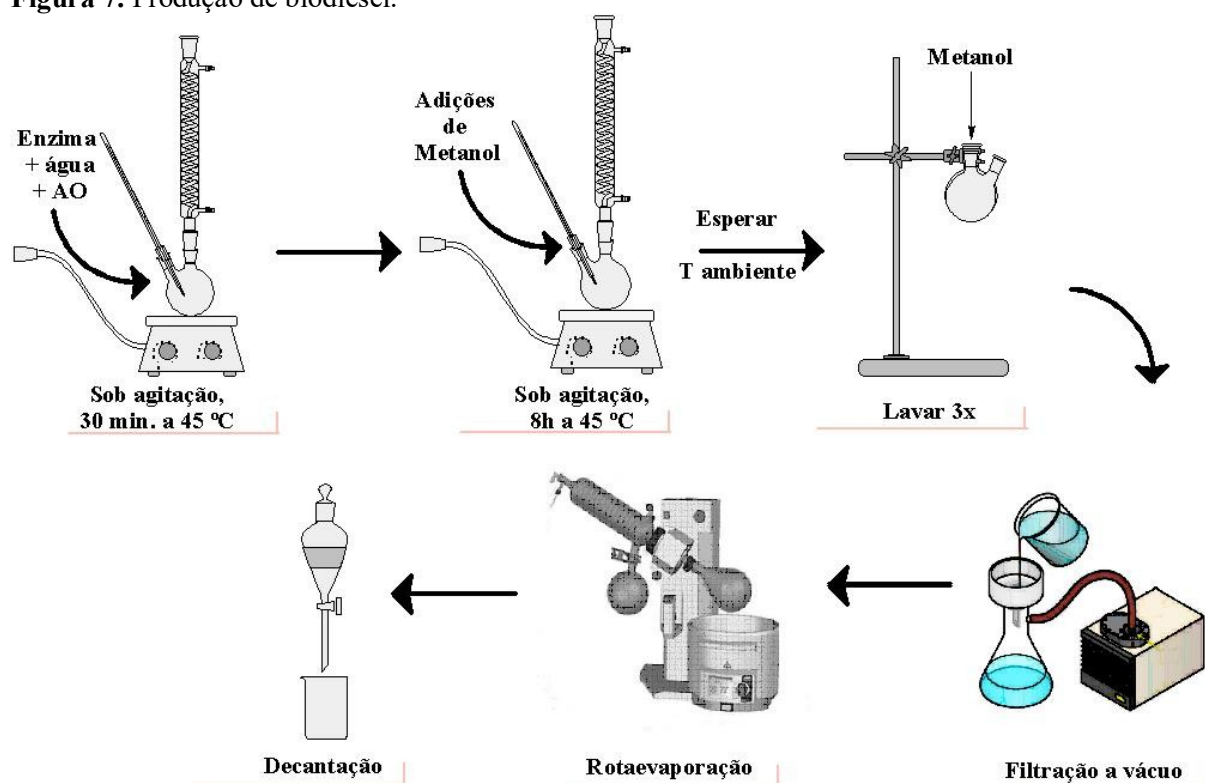
Tabela 2. Série de experimentos em diferentes proporções.

Experimento	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Os experimentos apresentados na Tabela 2, foram realizados em balão de fundo redondo acoplado a um sistema de refluxo, sendo adicionadas as quantidades estipuladas no planejamento e submetidas a pré-incubação por 30 min sob agitação magnética. Após a pré-incubação, foi adicionado 1 mL de metanol, mantendo a agitação por mais 30 min. Em

seguida, foram feitas adições de 2 mL de metanol a cada 1 h até que fosse atingido o volume de metanol estabelecido para cada experimento. A representação esquemática do procedimento experimental realizado na produção de biodiesel está apresentada na Figura 7.

Figura 7. Produção de biodiesel.



Fonte: O autor.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 1, também foram realizados os experimentos 9, 10 e 11, em triplicata em valores intermediários aos definidos, seguindo o mesmo procedimento de temperatura e tempo de pré-incubação descrito anteriormente.

O planejamento de experimentos foi completado com a realização de um planejamento axial. Assim, foram realizados 6 experimentos adicionais, como indicado na Tabela 3.

Tabela 3. Série de experimentos com 3 variáveis em 2 níveis cada.

Experimento	A	B	C
12	-1,73	0	0
13	+1,73	0	0
14	0	-1,73	0
15	0	+1,73	0
16	0	0	-1,73
17	0	0	+1,73

Os experimentos apresentados na Tabela 3, também foram realizados seguindo o mesmo procedimento de temperatura e tempo de pré-incubação, como descrito anteriormente. As condições otimizadas foram utilizadas para realizar a conversão do AO em biodiesel, utilizando-se o filme de octanoato de celulose como suporte para enzimas. A quantidade de enzima imobilizada também foi determinada pelo planejamento experimental.

3.11 Imobilização da enzima em filme de OC e produção de biodiesel por esterificação utilizando o suporte para enzimas

Para o preparo deste filme, foi realizado o mesmo procedimento do item 3.8, sendo adicionados 2 g de octanoato de celulose, 1,0 g da enzima lipase fornecida pela Prozyn Lipomax 500, e 60 mL de tolueno. A produção de biodiesel foi realizada seguindo o mesmo procedimento do item 3.10, a partir da melhor condição definida experimentalmente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção do octanoato de celulose a partir da reação de modificação da celulose microcristalina

O Octanoato de Celulose (OC) é um derivado de celulose geralmente produzido através de uma rota homogênea pela dissolução da celulose no sistema solvente cloreto de lítio/dimetilacetamida. Neste trabalho, o octanoato de celulose foi produzido por meio de uma rota heterogênea, na qual a celulose não é dissolvida no meio, sendo dispersa em um solvente que não dissolve o material de partida, mas é capaz de solubilizar o produto da reação se o grau de substituição for moderado a elevado e a distribuição dos grupos substituintes na cadeia celulósica for relativamente uniforme. Na síntese da Etapa 1.1, foi obtido um sólido na forma de um pó branco, como pode ser observado na Figura 8.

Figura 8. Produto da síntese de octanoato de celulose (OC1).



Fonte: O autor.

O produto obtido na síntese da Etapa 1.1, denominado OC1, foi submetido a testes de solubilidade, caracterizado por FTIR, TGA e DSC. Posteriormente, a amostra OC1 foi então submetida a uma nova síntese, conforme descrito na Etapa 1.2, no intuito de modificar ainda mais a celulose, denominado OC2.

4.2 Teste de Solubilidade do Octanoato de Celulose

No teste de solubilidade foram avaliados o aspecto visual das dispersões e a quantidade de soluto dissolvido por volume dos solventes diclorometano, tolueno e tetrahidrofurano, respectivamente. Para a dispersão do polímero em diclorometano não foi observada a solubilização de ambas amostras OC1 e OC2, observa-se uma suspensão esbranquiçada. No caso do tolueno, observou-se para a amostra OC1 uma dispersão turva com

poucas partículas em suspensão. Para a amostra OC2, no mesmo solvente, observou-se uma solução límpida e viscosa, com poucas partículas. Isto mostra que a amostra OC2 apresenta maior solubilidade neste solvente. Para o tetrahidrofurano (THF) a amostra OC1, apresentou muitas partículas em suspensão, sendo uma solução turva indicando baixa solubilidade do polímero. Já a amostra OC2 apresentou poucas partículas em suspensão, sendo mais solúvel que a primeira.

O teste de solubilidade quantitativo foi realizado por filtração à vácuo do material sólido remanescente. Neste teste, foram adicionados 0,01 g de octanoato de celulose em 10 mL dos solventes: diclorometano, tolueno e THF. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem (%) de OC1 e OC2 dissolvidas nos solventes: (1) diclorometano; (2) tolueno; e (3) THF.

Solvente	OC1 (%)	OC2 (%)
Diclorometano	35,294	43,119
Tolueno	98,530	84,460
Tetrahidrofurano	8,696	49,655

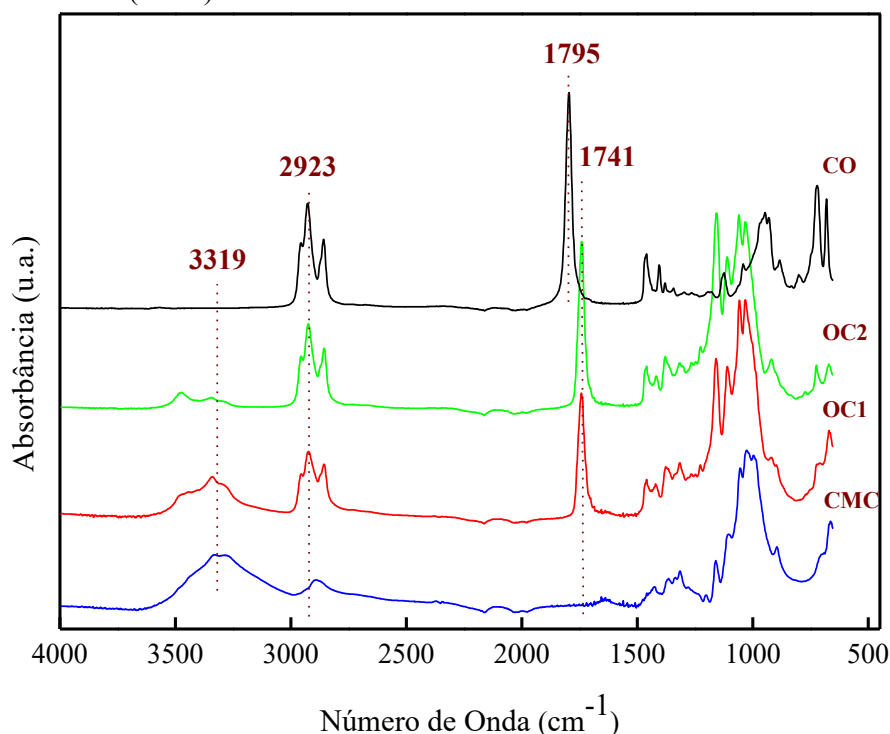
Desta forma, de acordo com os resultados indicados na Tabela 4, foi possível observar que o tolueno é o melhor solvente para o polímero OC, particularmente a amostra OC2, que apresenta maior modificação química, conforme será confirmado nos ensaios posteriores. Assim, definiu-se o tolueno como solvente a ser empregado para a formação do filme padrão de OC2 e do filme contendo a enzima lipase.

Sabe-se da literatura que o derivado celulósico OC apresenta esta solubilidade em tolueno e, portanto, há indícios de que a metodologia de síntese utilizada foi satisfatória para a modificação da CMC, ainda mais quando se considera que a síntese se deu por via heterogênea. Outras técnicas de caracterização foram empregadas para confirmar a produção do OC e seus resultados estão apresentados nos próximos itens.

4.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho

As amostras do reagente cloreto de octanoíla (CO), da celulose microcristalina (CMC) e das celulosas modificadas (OC1 e OC2), foram então submetidas a espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR). Os espectros de absorção em função do número de onda estão indicados na Figura 9 e as atribuições das principais bandas estão descritas na Tabela 5.

Figura 9. Espectro de absorção do cloreto de octanoíla (CO), octanoato de celulose (OC1 e OC2) e da celulose microcristalina (CMC).



Dentre os resultados apresentados na Figura 9 e na Tabela 5, destacam-se as bandas dos estiramentos O-H em 3319 cm^{-1} , atribuídas às hidroxilas da estrutura da celulose, que apresentam uma mudança no seu formato e na sua intensidade relativa às bandas em aproximadamente em 2923 cm^{-1} , que podem ser atribuídas ao estiramento $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ presente tanto na CMC quanto na OC.

Tabela 5. Principais bandas de absorção na região do Infravermelho da Celulose Microcristalina (CMC) e do Octanoato de Celulose (OC1 e OC2).

Número de Onda (cm^{-1})			Assinatura
OC	CO	CMC	
3319	-----	3319	O-H estiramento da ligação
1741	1741	-----	Estiramento C=O
1629	-----	1628	Deformação angular da molécula de H_2O
2923	2923	2923	Estiramento C-H
1022	-----	1022	Estiramento C-O e deformação C-O

Esta mudança de perfil pode indicar um aumento na quantidade de $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{H}$, já que durante a síntese estão sendo adicionadas as cadeias de 8 carbonos, presentes nos grupos octanoato, às hidroxilas livres da CMC. Esta banda O-H em 3319 cm^{-1} e a banda que aparece em 1628 cm^{-1} para o espectro da CMC também estão relacionadas à contribuição da água que

pode estar adsorvida na CMC e, que ao ocorrer a modificação desta para OC, se torna mais hidrofóbica e com isso diminuem suas intensidades. Para OC2, de fato a banda em 1628 cm^{-1} chega a desaparecer. (GUO, *et al.* 2012).

Têm-se ainda as bandas em 1741 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao grupo C=O de éster do OC e que estão ausentes na CMC. Outro fator importante relacionado a estas últimas é que estas estão deslocadas em relação ao grupo C=O do CO e, assim, fornecem mais uma evidência de que o polímero OC foi produzido com sucesso, já que no OC o carbono do grupo C=O já não está mais ligado ao cloro do cloreto de octanoíla e sim aos oxigênios da estrutura celulósica.

A partir dos dados de infravermelho, pode-se observar que, juntamente aos testes de solubilidade, há mais uma evidência de que as sínteses do polímero OC foram satisfatórias.

4.4 Determinação química do grau de substituição (GS) do OC

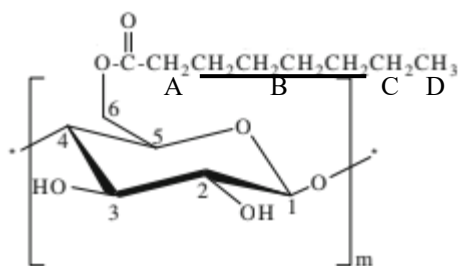
Uma forma de confirmar e quantificar a modificação química da celulose na síntese do OC e ainda determinar o grau de substituição (GS) alcançado é pela determinação química do GS do produto obtido. Este GS é definido como o número médio de grupos hidroxila que foram substituídos por grupos de carbono da cadeia polimérica e pode variar de 0 (para a celulose) a 3 (para o octanoato de celulose trissubstituído). Para os polímeros produzidos neste trabalho, o GS médio obtido pela técnica de determinação química foi de $(0,67\pm0,07)$ para OC1 e de $(0,23\pm0,02)$ para OC2. Este resultado foi de um baixo grau médio de substituição e não é condizente com o nível de modificação observada nos espectros de FTIR. Este resultado pode ser explicado pelo fato que as amostras apresentam pouca uniformidade entre a fração do material que apresenta maior modificação e o material pouco substituído, sendo difícil a determinação do grau de substituição por essa técnica sem fazer uma separação das duas frações.

Uma alternativa que poderia fornecer um melhor resultado seria repetir a análise para somente as porções solúveis em tolueno, de forma a garantir que se analisasse somente os produtos realmente modificados. Porém, preferiu-se tratar esta investigação por outro método, utilizando-se o RMN de ^1H e ^{13}C que serviu também para caracterizar os materiais produzidos.

4.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

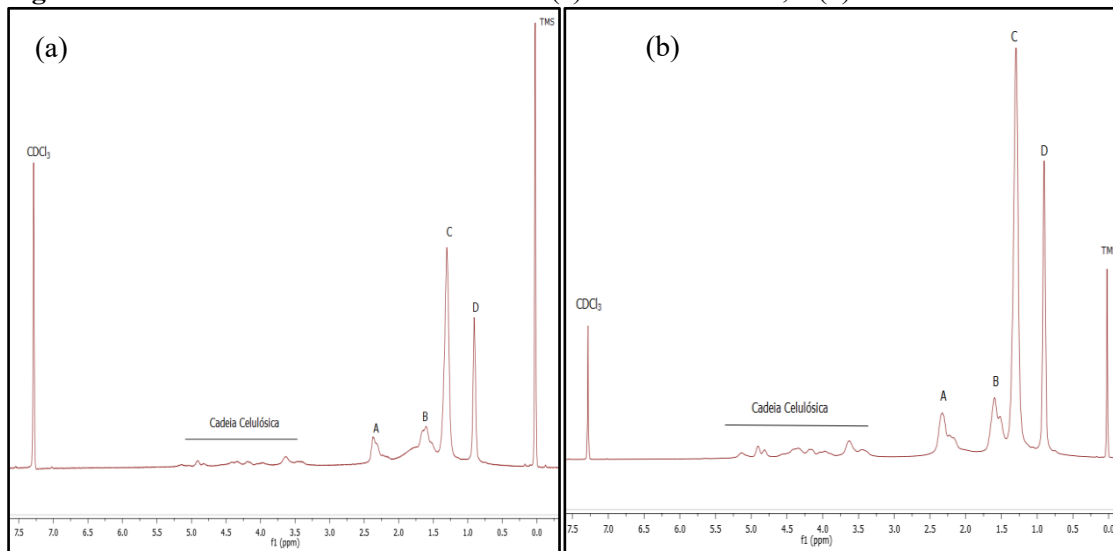
A informação estrutural dos produtos obtidos nas sínteses do octanoato de celulose OC1 e OC2 foram medidas por RMN de ^1H e estão apresentados na Figura 11. A estrutura do OC é apresentada novamente na Figura 10 de forma a facilitar a identificação dos picos interpretados.

Figura 10. Representação da estrutura química do octanoato de celulose (OC) para identificação dos picos em RMN de ^1H .



Fonte: Adaptado da referência (WANG, *et al.*, 1994).

Figura 11. RMN ^1H do octanoato de celulose (a) da amostra OC1; e (b) da amostra OC2.



Uma análise comparada com o trabalho de Hu *et al.* foi empregada para identificar os deslocamentos nos RMNs de ^1H para OC1 e OC2. Tanto para OC1 quanto para OC2, observa-se picos entre 3,25 e 5,75 ppm aos quais os autores associam aos hidrogênios da cadeia celulósica. Destacam-se ainda os picos em cerca de 0,85 ppm que é associado ao grupo CH_3 (D da Figura 10) terminal do octanoato que por estar mais desblindado mais deslocado para um baixo campo. Os picos em cerca de 1,2 ppm se devem aos grupos CH_2 vizinhos aos

CH₃. Estes sinais são seguidos por outros em aproximadamente 1,6 ppm e referem-se aos grupos CH₂ (C) mais internos do octanoato. Finalmente, os picos em 2,3 ppm referem-se ao grupo CH₂ que está mais próximo da carbonila do octanoato e, assim, está deslocado para campo mais alto do que os grupos CH₂ internos.

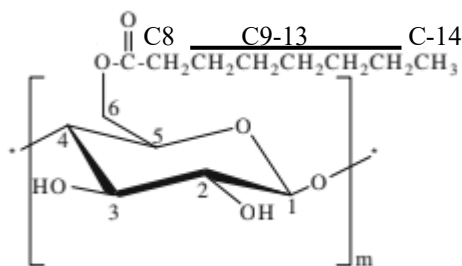
Além de confirmar a síntese do OC, estes RMNs de ¹H permitiram que fosse empregada a Equação 1 para que calcular os GS de ambos OC1 e OC2, de acordo com (HUANG, *et al.*, 2011).

$$GS_{OC} = \frac{I_{octanoato} \times 7}{I_{celulose} \times 3} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que, $I_{octanoato}$ é o valor da integral para o sinal do grupo CH₃ do octanoato; $I_{celulose}$ é o valor da integral para o sinal da celulose; GS_{OC} é o grau de substituição dos grupos octanoato. A partir desta Equação 1 e dos valores das integrais correspondentes a estes picos nos RMNs de ¹H, calculou-se um GS_{OC1} (GS para OC1) igual a 1,23 e um GS_{OC2} (GS para OC2) igual a 2,20. Apesar, destes valores diferirem bastante dos encontrados pelo método de determinação química ((0,67±0,07) e (0,23±0,02), respectivamente) na metodologia utilizada neste trabalho, apresentam um GS mais condizente com as modificações observadas nos espectros de FTIR, nos testes de solubilidade e nos próprios espectros de RMN de ¹H, sendo, portanto, considerados como os valores reais de GS alcançados para os OCs produzidos neste trabalho.

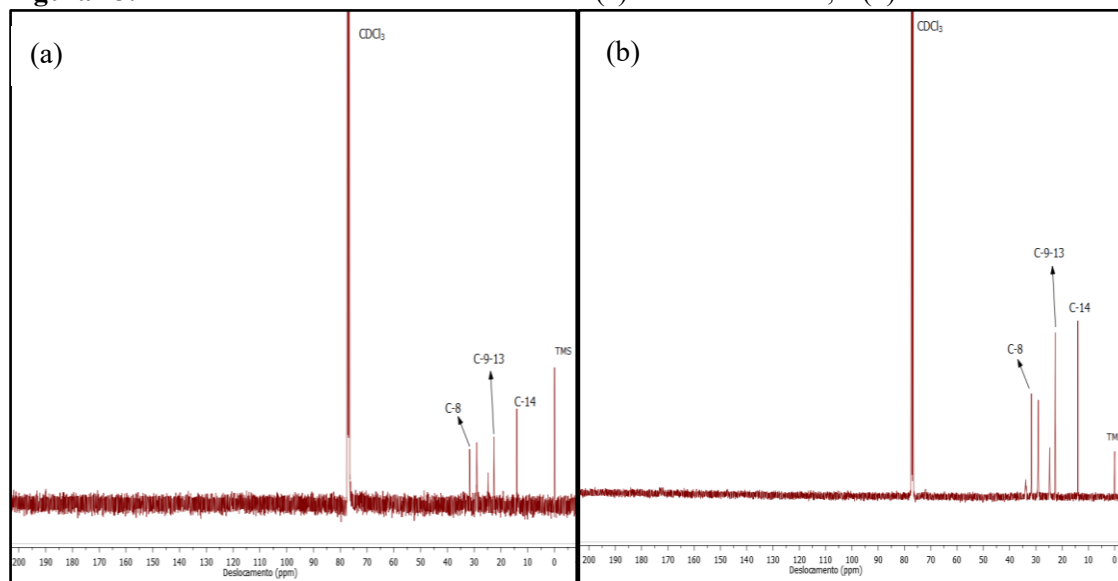
A informação estrutural dos produtos obtidos nas sínteses do octanoato de celulose OC1 e OC2 foram medidas também por RMN de ¹³C e estão apresentados na Figura 13. A estrutura do OC é apresentada novamente na Figura 12 de forma a facilitar a identificação dos picos interpretados.

Figura 12. Representação da estrutura química do octanoato de celulose (OC) para identificação dos picos em RMN de ¹³C.



Fonte: Adaptado da referência (WANG, *et al.*, 1994).

Figura 13. RMN de ^{13}C do octanoato de celulose (a) da amostra OC1; e (b) da amostra OC2.



Observa-se na Figura 13, sinais em aproximadamente 15, 22 e 32 ppm que podem ser associados aos grupos CH_3 (identificado como C14), CH_2 mais internos (identificados como C9-13) e dos CH_2 (identificados como C8) vizinhos ao grupo $\text{C}=\text{O}$ e confirmam as informações obtidas no RMN de ^1H (WEI, *et al.* e HU, *et al.*). Destaca-se a ausência dos sinais característicos dos carbonos presentes na cadeia celulósica e do carbono do grupo $\text{C}=\text{O}$, estes podem estar indistinguíveis do sinal do ruído, uma vez que pela intensidade do sinal do clorofórmio deuterado, nota-se que as amostras estão bem diluídas e, assim, pode não ter sido suficiente para discriminar um sinal relevante para estes carbonos.

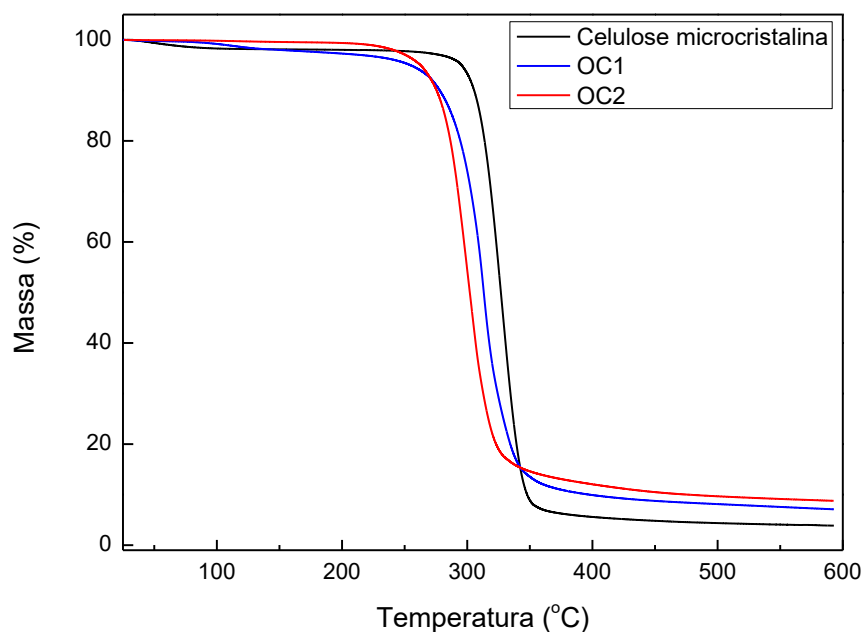
4.6 Análise Termogravimétrica

A estabilidade térmica dos derivados celulósicos foi avaliada por análise termogravimétrica e apresentada na Figura 14.

Observa-se pequena diminuição da temperatura de decomposição da celulose original para as amostras modificadas, cerca de 299 °C para a CMC, 284 °C para a OC1 e 275 °C para a OC2. Este resultado pode estar relacionado ao processo de síntese que pode levar a redução da massa molecular do derivado e reduzir a estabilidade térmica da celulose modificada. Embora seja observada uma pequena alteração na temperatura de decomposição dos derivados celulósicos em comparação com a celulose microcristalina, a estabilidade térmica dos derivados ainda é bastante elevada para a aplicação/destinação da amostra na imobilização das enzimas e reações de esterificação. Estas reações são realizadas em

temperaturas que permitam a esterificação do ácido oleico e a manutenção da atividade enzimática do sistema enzima/polímero, não sendo superiores a 50 °C.

Figura 14. Curva termogravimétrica para a celulose original e para as amostras de octanoato de celulose OC1 e OC2.



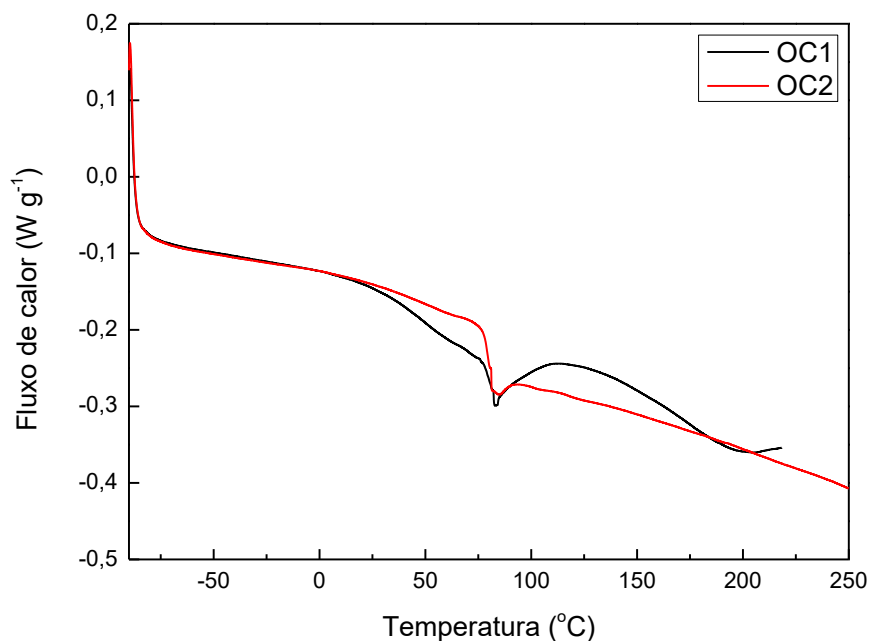
Ainda é importante ressaltar que o perfil da curva observada para a amostra OC2, mostra nitidamente que esta amostra apresenta maior modificação química, uma vez que no primeiro evento onde se observa para materiais celulósicos menos modificados, a dessorção de água adsorvida, não se observa este processo para a OC2.

4.7 Calorimetria Exploratória Diferencial

A calorimetria exploratória diferencial permite avaliar os eventos térmicos associados a mudança no fluxo de calor que chega na amostra. Esta mudança pode ser identificada como uma alteração na linha de base, na qual o ponto de inflexão pode estar associado a temperatura de transição vítrea dos polímeros, ou ao aparecimento de picos que podem ser identificados como processos endotérmicos ou exotérmicos e podem ter a entalpia do processo obtida. Neste caso, é possível observar, processos físicos e químicos dos polímeros avaliados. Neste trabalho, o perfil da curva calorimétrica também é importante para identificar as propriedades dos derivados celulósicos produzidos.

Na Figura 15 estão apresentadas as curvas de DSC para as amostras OC1 e OC2 em primeira varredura.

Figura 15. Curva de DSC para as amostras de octanoato de celulose OC1 e OC2.



O DSC na Figura 15 apresenta um pequeno pico próximo a 75 °C, o pico em questão pode estar associado a pequena fração do polímero quimicamente modificado que apresenta cristalinidade, uma vez que a celulose não apresenta pico de fusão no DSC, sendo decomposta antes de se fundir devido a força das interações intermoleculares nas regiões cristalinas. A posição e a entalpia associada aos picos de fusão de derivados de celulósicos de cadeias laterais longas depende do número de átomo de carbonos nos grupos laterais e do grau de substituição. Considerando estes aspectos, os derivados de celulose de cadeia longa precisam ser investigados para avaliar o aparecimento deste evento. Outro aspecto importante é que ambas as amostras apresentam o pico na mesma região, com pequenas diferenças no perfil, que podem estar relacionadas ao menor grau de modificação da amostra OC1.

4.8 Preparo do filme padrão de OC

O filme padrão de OC produzido conforme metodologia descrita anteriormente, está apresentado na Figura 16.

Figura 16. Filme padrão de Octanoato de Celulose.



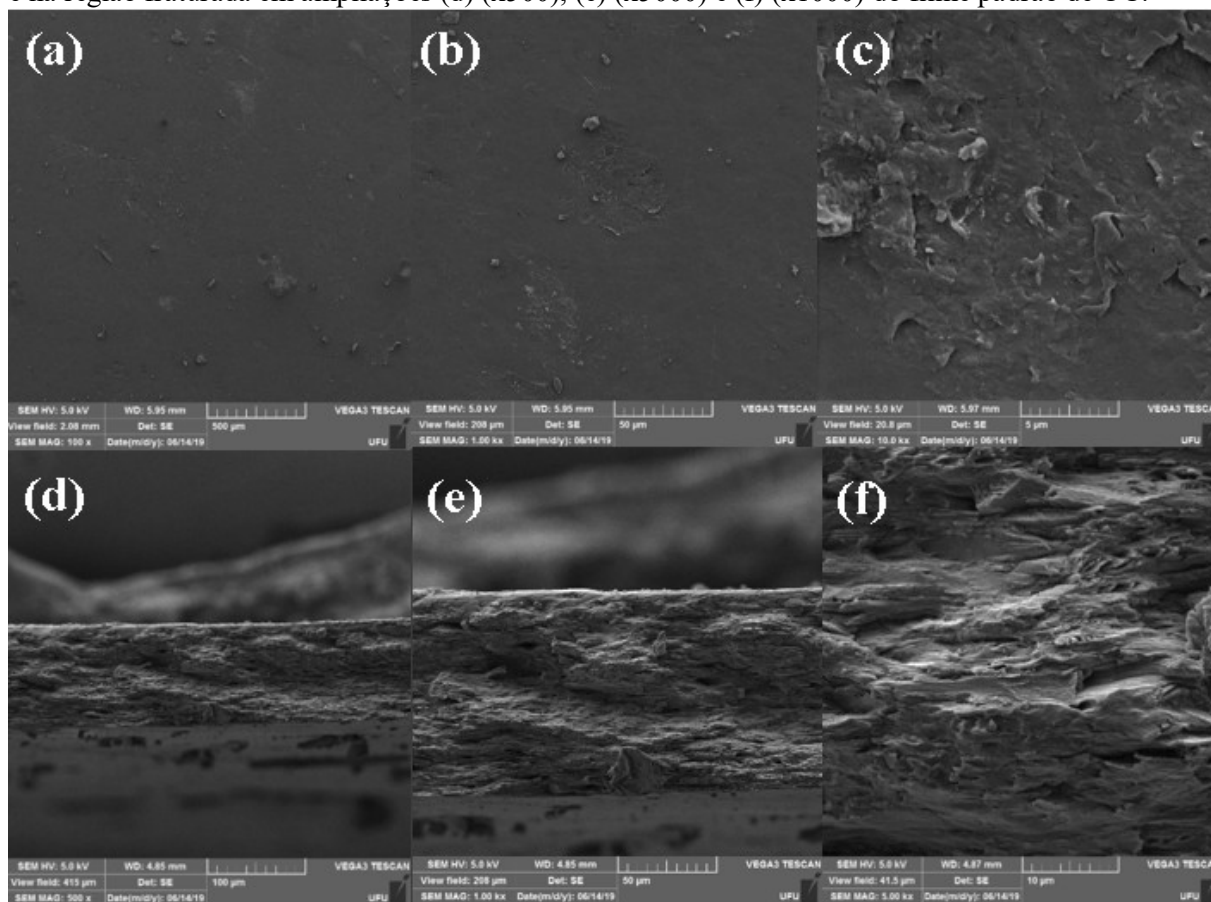
Fonte: O autor.

Através da Figura 16, observa-se que aparentemente o filme não apresenta porosidade e possui coloração transparente. Porém, uma análise mais detalhada foi realizada através da sua caracterização por MEV.

4.9 Microscopia Eletrônica por Varredura

A morfologia da amostra foi avaliada por MEV, sendo as imagens obtidas para o filme da superfície (x100), superfície (x1000), superfície (x10000) e da seção transversal em ampliações (x500), (x5000) e (x1000), apresentadas na Figura 17.

Figura 17. Imagens por MEV da superfície (a) (x100), superfície (b) (x1000), superfície (c) (x10000) e na região fraturada em ampliações (d) (x500), (e) (x5000) e (f) (x10000) do filme padrão de OC.



Fonte: O autor.

A partir das imagens por MEV apresentadas nas Figuras 17a-c, verifica-se que a superfície da membrana é contínua e não apresenta poros aparentes, nas magnificações obtidas. Nas imagens da seção transversal, nas Figuras 17d-f, é possível verificar que o material apresenta reentrâncias e densas camadas devido a superposição de cadeias poliméricas durante a formação da membrana, também sem poros aparentes.

4.10 Produção de biodiesel por esterificação utilizando enzimas livres

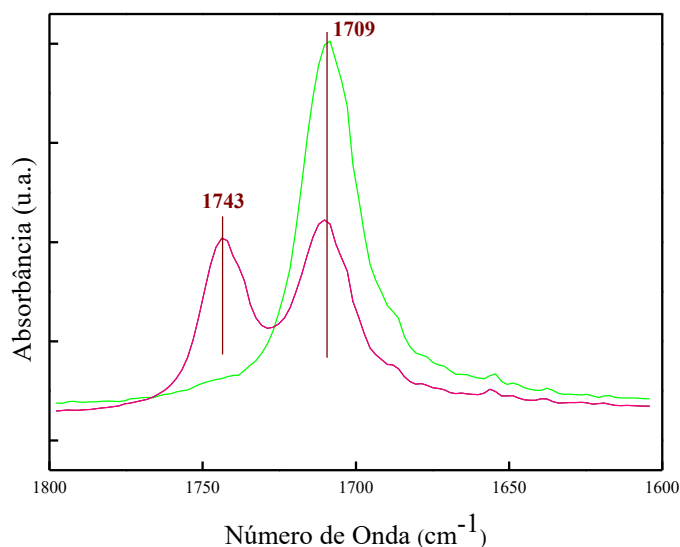
Previamente à utilização do filme com as enzimas imobilizadas para a produção do biodiesel, foram realizados experimentos de otimização das condições de reação das enzimas livres para a produção do biodiesel a partir do ácido oleico, conforme as seguintes etapas: (1) otimização do processo de síntese de biodiesel através da reação de esterificação do ácido oleico com metanol, empregando a enzima livre; e (2) uso do mesmo processo utilizando a enzima imobilizada. Desta forma, foi montado um planejamento experimental com um ponto central (de três repetições) e composto por 3 variáveis em 2 níveis cada, cujo fator de

resposta é discutido a seguir.

Para a determinação do fator de resposta, partiu-se do princípio de que a produção do biodiesel se dá, nas condições deste trabalho, por reações de esterificação do ácido oleico, conforme reação apresentada na Figura 4, e, portanto, podem ser acompanhadas por uma técnica disponível no LEMUP e caracterizada por ser uma análise rápida e eficiente de monitoração da formação dos ésteres metílicos, o FTIR.

O princípio em que se baseia o acompanhamento da reação de esterificação do ácido oleico por FTIR é que, este ao ser convertido a oleato de metila, leva a uma diminuição da banda atribuída ao grupo hidroxila de ácido carboxílico e ao deslocamento da banda de carbonila para maiores números de onda, devido a formação da ligação éster do oleato de metila. Sendo assim, a Figura 18 apresenta o espectro por FTIR do AO antes das reações de esterificação e que serviu para determinação da posição inicial da banda da carbonila do grupo ácido carboxílico.

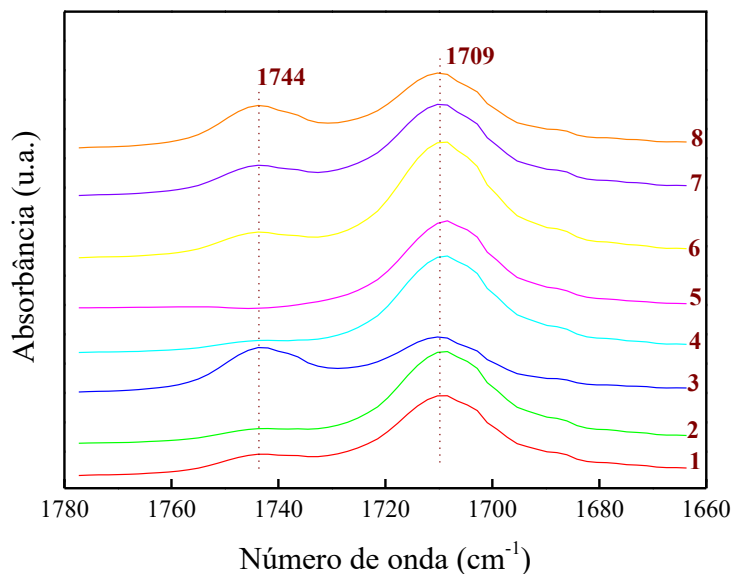
Figura 18. Espectro na região do Infravermelho (FTIR) do ácido oleico (AO) puro com banda intensa em 1709 cm^{-1} e espectro do experimento com a melhor conversão.



A partir da Figura 18, destaca-se a presença de uma banda intensa em $\sim 1710\text{ cm}^{-1}$ atribuída ao estiramento da ligação ($\text{C}=\text{O}$) do grupo carbonila de ácido carboxílico, cujo deslocamento e intensidade foram acompanhados durante as reações de produção do biodiesel. Para tanto, retirou-se a razão entre a intensidade da banda de carbonila do ácido carboxílico (AO) e a da banda de carbonila do éster (oleato de metila) em $\sim 1745\text{ cm}^{-1}$ para obtenção do fator de resposta empregado nos experimentos de otimizações.

De acordo com a Tabela 2, apresentada no item 3.10, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 , de acordo com a matriz de experimentos que consistiam o planejamento experimental montado e cujos espectros por FTIR dos produtos das reações estão apresentados na Figura 19.

Figura 19. Acompanhamento das reações de esterificação do ácido oleico por FTIR para a matriz de experimentos do planejamento fatorial 2^3 .



Como visto na Figura 19, há uma diminuição na intensidade da banda característica do AO em $\sim 1710 \text{ cm}^{-1}$ e o surgimento de uma banda em $\sim 1745 \text{ cm}^{-1}$ característica do oleato de metila para quase todos os experimentos realizados, indicando já previamente uma relação entre as variáveis e os níveis investigados.

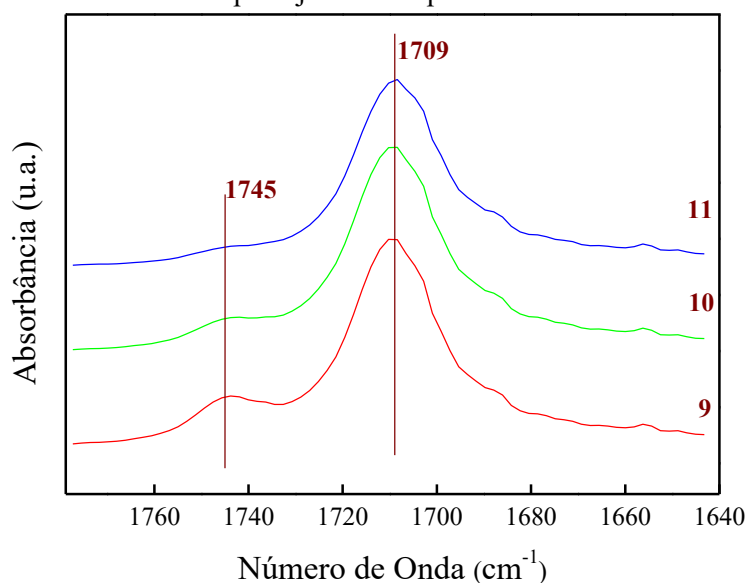
Em seguida, foi calculada a razão entre as bandas das absorbâncias e os resultados destes fatores de resposta estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Razão entre as bandas das absorbâncias para a matriz de experimentos.

Experimento	$A_{1743 \text{ (cm}^{-1})} / A_{1709 \text{ (cm}^{-1})}$
1	0,34
2	0,26
3	0,89
4	0,21
5	0
6	0,30
7	0,41
8	0,63

De posse destes resultados, passou-se para a realização e análise dos experimentos 9,10 e 11, que consistiram em uma triplicata em valores intermediários aos definidos. Pelos dados da Tabela 1, para estes experimentos foram utilizados 17,5 mL de metanol, 0,6 g de enzima e 1,2 mL de água em cada uma das réplicas. Os espectros FTIR dos produtos de cada um destes experimentos estão apresentados na Figura 20.

Figura 20. Acompanhamento das reações de esterificação do ácido oleico por FTIR para triplicata em valores intermediários aos definidos no planejamento experimental.



A partir da Figura 20, foram calculados os fatores de resposta para os experimentos do ponto central, como apresentado na Tabela 7.

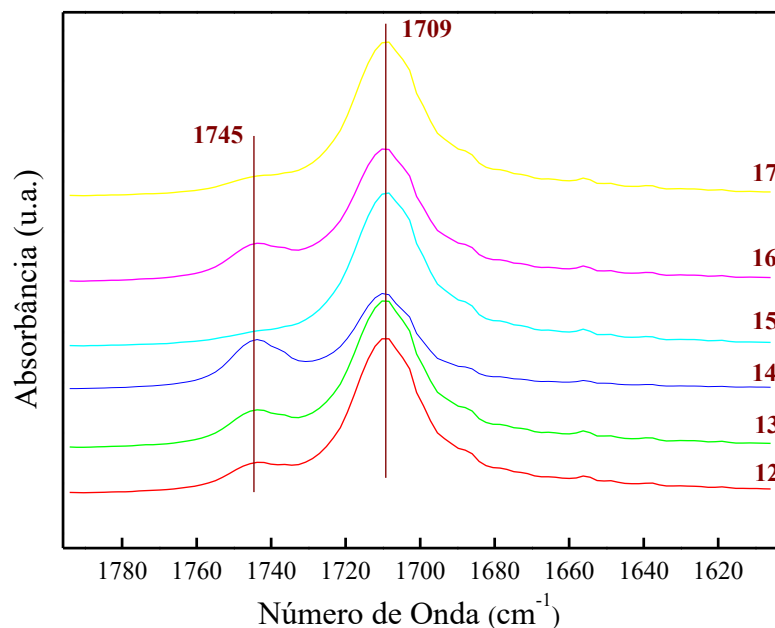
Tabela 7. Razão entre as bandas das absorbâncias para a segunda série de experimentos.

Experimento	$A_{1745 \text{ (cm}^{-1})} / A_{1709 \text{ (cm}^{-1})}$	RSD (%)
9	0,30	29,17
10	0,24	
11	0,17	

Os resultados dos fatores de resposta apresentados nas Tabelas 6 e 7, foram reservados para posterior aplicação em gráficos de superfície de resposta.

Em seguida, para quantificar otimizar a influência das variáveis mais significativas sobre o fator de resposta, o planejamento de experimentos foi completado com a realização de um planejamento axial. Assim, foram realizados 6 experimentos adicionais, como indicado na Tabela 3 (do item 3.10 do Procedimento Experimental) e cujos espectros FTIR dos produtos destas reações estão apresentados na Figura 21.

Figura 21. Acompanhamento das reações de esterificação do ácido oleico por FTIR para os experimentos do planejamento axial.



Para estes espectros, como para os anteriores, calcularam-se os fatores de resposta pela razão entre a banda do ácido carboxílico do AO e a banda do éster oleato de metila. Os resultados seguem apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Razão entre as bandas das absorvâncias para a terceira série de experimentos.

Experimento	$A_{1745 \text{ (cm}^{-1}\text{)}} / A_{1709 \text{ (cm}^{-1}\text{)}}$
12	0,28
13	0,32
14	0,56
15	0,15
16	0,35
17	0,20

Em seguida, os dados obtidos de razão entre as bandas das absorvâncias foram utilizados para calcular o efeito de cada variável, de acordo com a Equação 2.

$$Ef_x = \bar{R}_+ - \bar{R}_- \quad (\text{Equação 2})$$

Em que Ef representa o efeito das variáveis A, B ou C e R_+ e R_- são as médias da razão entre os picos no nível (+) e no nível (-), respectivamente. Os resultados obtidos pela Equação 2 estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Efeito das variáveis A, B e C.

Variável	A	B	C
Efeito	-0,07	+0,32	-0,09

Sabendo-se da Tabela 1 (do item 3.10 do Procedimento Experimental) que as variáveis A, B e C são as quantidades de metanol, enzima e água, respectivamente, e a partir dos resultados apresentados na Tabela 9, observa-se que tanto o metanol quanto a água apresentam valores negativos e já a enzima apresenta um valor de efeito de resposta positivo e maior que as demais variáveis e, portanto, tem um efeito maior na reação de produção de biodiesel.

Posteriormente, foram realizadas análises tridimensionais das variáveis A e B, A e C, e B e C, como indicadas nas Figuras 22, 23 e 24, respectivamente, utilizando-se os dados das Tabelas 6, 7 e 8, onde em cada gráfico foi obtida uma superfície de resposta em porcentagem relativa da razão das absorvâncias nos dois comprimentos de onda avaliados.

Figura 22. Superfície de resposta em % das variáveis A(Vol MeOH) e B(massa de Enzima).

$$\% = 27,2 - 1,2 \cdot V_{\text{MeOH}} + 3,8 \cdot m_{\text{enz}} + 2,6 \cdot V_{\text{MeOH}}^2 - 8,5 \cdot V_{\text{MeOH}} \cdot m_{\text{enz}} + 4,5 \cdot m_{\text{enz}}^2$$

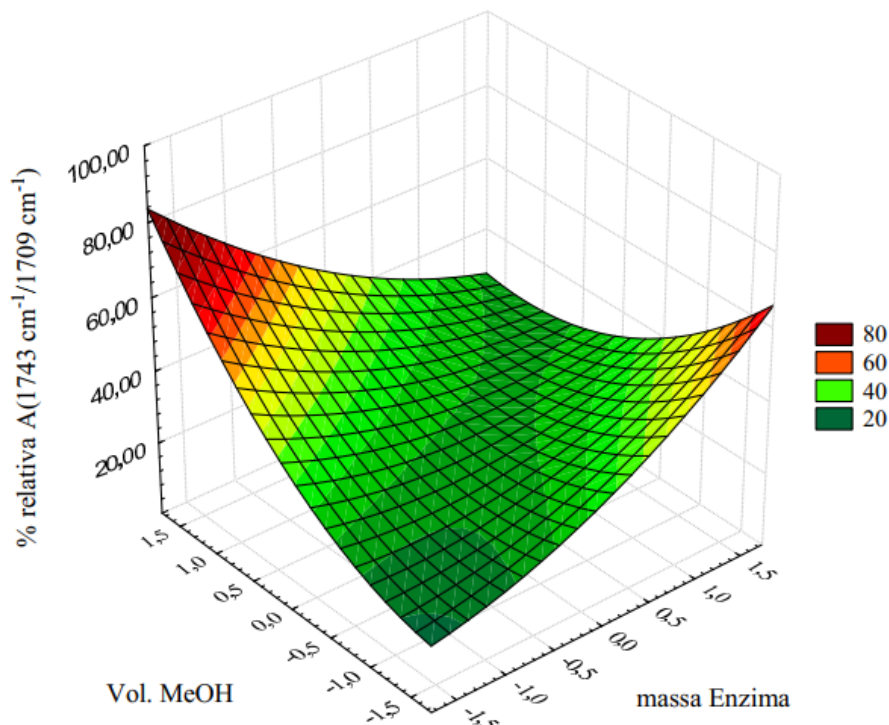


Figura 23. Superfície de resposta em % das variáveis A(Vol MeOH) e C(Vol água).

$$\% = 30,8 - 1,2 \cdot V_{\text{MeOH}} - 4,4 \cdot V_{\text{H}_2\text{O}} + 1,8 \cdot V_{\text{MeOH}}^2 + 16 \cdot V_{\text{MeOH}} \cdot V_{\text{H}_2\text{O}} + 0,9 \cdot V_{\text{H}_2\text{O}}^2$$

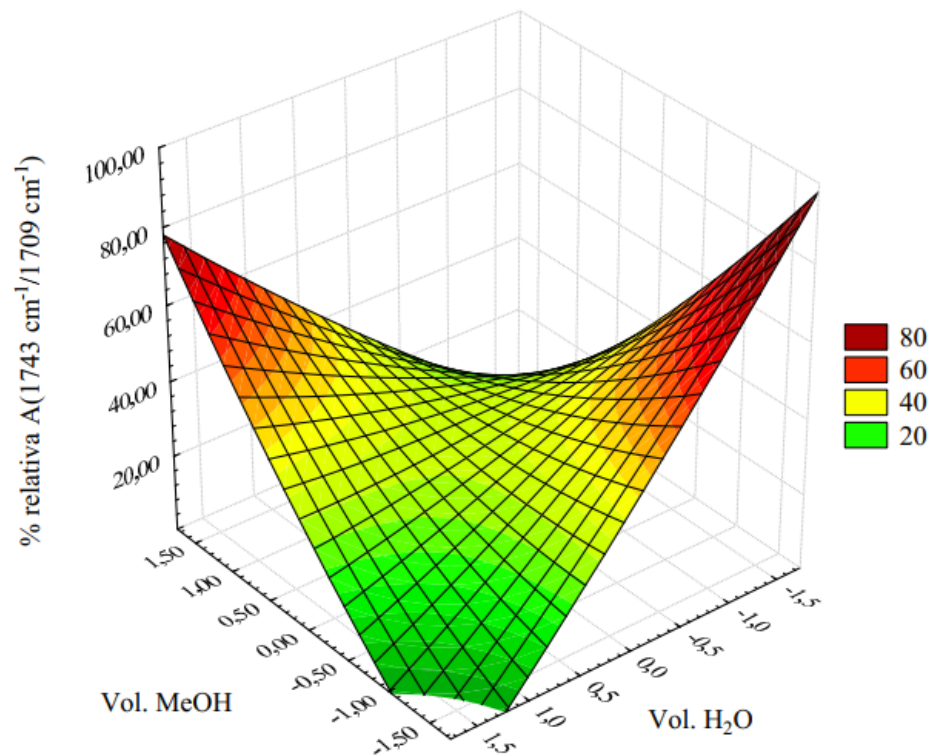
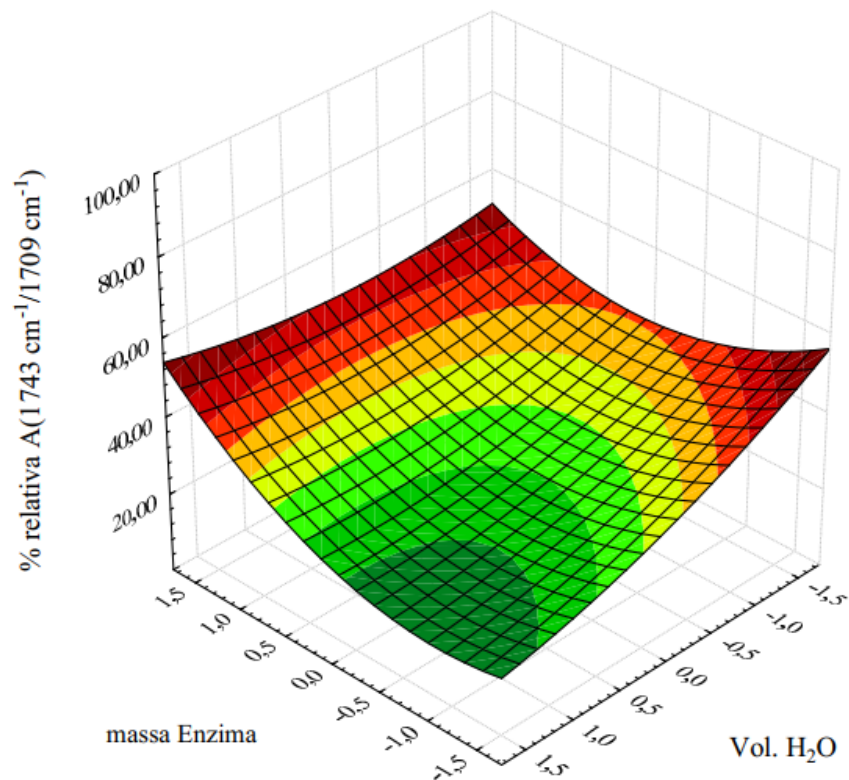


Figura 24. Superfície de resposta em % das variáveis B(massa de Enzima) e C(Vol água).

$$\% = 28,3 + 3,8 \cdot m_{\text{enz}} - 4,4 \cdot V_{\text{H}_2\text{O}} + 4,2 \cdot m_{\text{enz}}^2 + 3,0 \cdot m_{\text{enz}} \cdot V_{\text{H}_2\text{O}} + 1,5 \cdot V_{\text{H}_2\text{O}}^2$$



Analisando as Figuras 22-24, é possível observar tridimensionalmente os efeitos das variáveis A(Vol MeOH), B(massa de Enzima) e C(Vol água) na produção de biodiesel, em termos de porcentagem relativa, onde X e Y variam de -1,73 a +1,73, e Z varia de 0 a 100%. Em todos os casos, observa-se visualmente pela superfície de resposta que os melhores resultados se dão com menor volume de metanol e água, e maior massa de enzima, confirmando os resultados dos efeitos das variáveis A, B e C obtidos na Tabela 9. Portanto, pode se dizer que a enzima apresenta um efeito considerável na produção de biodiesel.

Sendo assim, uma vez que ficou evidente o efeito da enzima na produção do biodiesel pela superfície de resposta das Figuras 22-24, adotou-se uma massa de enzima de 1,0 g (nível +1 neste planejamento, para esta variável). No entanto, como pela Figura 22 a superfície de resposta indica que quanto mais positiva a massa de enzima, mais negativo deve ser o volume de metanol, adotou-se o volume de 15 mL de metanol por (nível -1 neste planejamento, para esta variável). Para a quantidade de água, como pela Figura 24 um valor mais negativo do volume de água ainda é capaz de dar uma razão satisfatória, desde que a quantidade de enzima seja mais positiva, foi escolhido o volume de 0,4 mL e água (nível -1 neste planejamento, para esta variável).

4.11 Imobilização da enzima em filme de OC

Após concluído o planejamento, definiu-se a massa de 1,0 g de enzima para incorporação no suporte polimérico do octanoato de celulose e o volume de 0,4 mL de água foi utilizado na pré-incubação. Durante a reação de produção do biodiesel a partir da massa fixada de 0,5 g de ácido oleico utilizando este filme, foi utilizado o volume definido de 15 mL de metanol, adicionado em porções consecutivas e sob tempos regulares, como descrito no item 3.10 do Procedimento Experimental. A fotografia do filme com a enzima imobilizada utilizando o OC como suporte produzido está indicada na Figura 25.

Figura 25. Filme com a enzima imobilizada utilizando o OC2 como suporte.

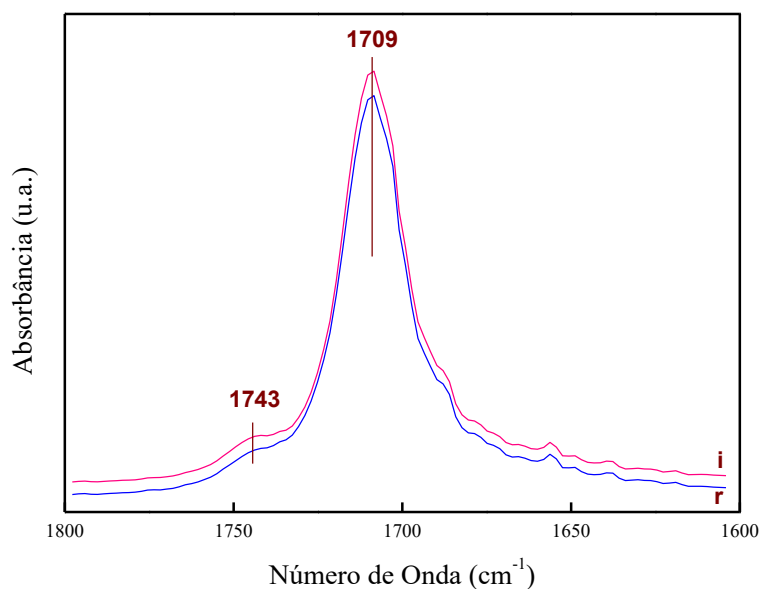


Fonte: O autor.

Como pode ser observado na Figura 25, a imobilização da enzima resultou em uma mudança na coloração do filme e pode indicar que, devido a metodologia empregada para imobilização da enzima, esta pode estar ocluída na estrutura do filme.

Os resultados dos experimentos com a enzima imobilizada no octanoato de celulose (i) e, posteriormente, do reuso deste filme (r) também foram avaliados por FTIR e estão apresentados na Figura 26.

Figura 26. Espectro de absorção do experimento de imobilização (i) e reuso (r).



As razões entre as bandas para as absorbâncias para ambos experimentos estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Razão entre as bandas das absorbâncias para os experimentos com o filme contendo enzima imobilizada (i) e do filme após o reuso (r).

Experimento	$A_{1743\text{ (cm}^{-1}\text{)}} / A_{1709\text{ (cm}^{-1}\text{)}}$
i	0,17
r	0,15

De acordo com os dados obtidos na Tabela 10, observa-se que houve conversão do éster em biodiesel, apesar de ter sido pouco eficiente. Sabendo que a oclusão é um método que assegura a imobilização, pode-se comparar que o valor de conversão tanto da imobilização quanto do reuso foram próximos, o que significa que não houve perda de enzima durante a reação. Em contrapartida, a oclusão pode ter resultado na diminuição da atividade enzimática pela indisponibilidade de alguns dos sítios ativos para fazer a reação de esterificação, portanto era de se esperar um valor menor de conversão em relação aos experimentos utilizando-se a enzima livre.

Assim, considerando-se as condições de imobilização ressalta-se que o material se apresenta bastante promissor para essas reações de esterificação do ácido oleico e, portanto, sugere-se a continuação de investigações no sentido de avaliar outros métodos de imobilização da enzima, bem como aplicar estes sistemas também a reações de transesterificação a partir do óleo de soja, por exemplo.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados das caracterizações por FTIR, RMN de ^1H e ^{13}C , TGA e DSC pode-se afirmar que o polímero octanoato de celulose foi sintetizado com sucesso a partir da CMC, em uma rota heterogênea, chegando a alcançar GS iguais a 1,23 e 2,20 para OC1 e OC2 respectivamente. O OC apresentou ainda propriedades interessantes para formação de filmes identificadas pelos MEVs e capacidade de ocluir a enzima lipase, imobilizando-a.

Após as otimizações das reações de esterificação do ácido oleico pela enzima lipase livre, através do emprego do planejamento experimental, foi possível determinar a quantidade de enzima a ser incorporada no filme de OC, bem como definir as melhores condições de metanol e água que garantissem as condições reacionais requeridas. Destaca-se também que a técnica de FTIR se mostrou de grande valia para uma resposta rápida e eficiente para o acompanhamento de todos os experimentos de produção do biodiesel.

Por fim, o sistema filme de OC/enzima lipase imobilizada se mostrou bastante promissor para reações de esterificação do ácido oleico já que, apesar de uma baixa conversão para a produção do biodiesel, demonstrou estabilidade e potencial para reuso. Estudos posteriores poderão avaliar outros métodos de imobilização das lipases e as melhores condições para este processo visando garantir melhores resultados.

6 REFERÊNCIAS

- AMOTZ, S. inventor; Novo Industri A/S., cessionário. Method for production of an immobilized enzyme preparation by means of a crosslinking agent. United States Patent US4665028; 12 Mai, 1987.
- BABAKI, M.; YOUSEFI, M.; HABIBI, Z.; MOHAMMADI, M.; YOUSEFI, P.; MOHAMMADI, J.; BRASK, J. Enzymatic production of biodiesel using lipases immobilized on silica nanoparticles as highly reusable biocatalysts: effect of water, t-butanol and blue silica gel contents, **Renewable Energy**, v. 91, p. 196-206, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.01.053>
- BASRI, M.; YUNUS, W. M. Z. W.; YOONG, W. S.; AMPON, K.; RAZAK, C. N. A.; SALLEH, A. B. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 169-173, 1996. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199606\)66:2<169::AID-JCTB478>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199606)66:2<169::AID-JCTB478>3.0.CO;2-I)
- CREPY, L.; MIRI, V.; JOLY, N.; MARTIN, P.; LEFEBVRE, J. M. Effect of side chain length on structure and thermomechanical properties of fully substituted cellulose fatty esters, **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1812-1820, 2011. doi:10.1016/j.carbpol.2010.10.045
- CREPY, L.; CHAVERIAT, L.; BANOUB, J.; MARTIN, P.; JOLY, N. Synthesis of Cellulose Fatty Esters as Plastics—Influence of the Degree of Substitution and the Fatty Chain Length on Mechanical Properties, **Chemistry & Sustainability Energy & Materials**, v. 2, n. 2, p. 165-170, 2009. <https://doi.org/10.1002/cssc.200800171>
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros, **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-30, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000400017>.
- EDGAR, K. J.; BUCHANAN, C. M.; DEBENHAM, J. S.; RUNDQUIST, P. A.; SEILER, B. D.; SHELTON, M. C.; TINDALL D. Advances in cellulose ester performance and application. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1605–1688, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00027-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00027-2)
- EYLEY, S.; THIELEMANS, W. Surface modification of cellulose nanocrystals, **Nanoscale**, v. 6, n. 14, p. 7764-7779, 2014. DOI: 10.1039/c4nr01756k
- FREIRE, C. S. R.; Silvestre, A. J. D.; PASCOAL NETO, C.; BELGAGEM, M. N.; GANDINI, A. Controlled heterogeneous modification of cellulose fibers with fatty acids: effect of reaction conditions on the extent of esterification and fiber properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 100, n. 2, p. 1093-1102, 2006. <https://doi.org/10.1002/app.23454>
- GOG, A.; ROMAN, M.; TOS, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification—current state and perspectives. **Renew Energy**, v. 39, p. 10–16, 2012.

GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1447–1464, 2015.

GUO, Y.; WANG, X.; LI, D.; DU, H.; WANG, X.; SUN, R. Synthesis and characterization of hydrophobic long-chain fatty acylated cellulose and its self-assembled nanoparticles, **Polymer Bulletin**, v. 69, p. 389–403, 2012. DOI 10.1007/s00289-012-0729-7

GUPTA, M. N. Applications of crosslinking techniques to enzyme/protein stabilization and bioconjugate preparation. In: *Biocatalyst Design for Stability and Specificity*. Himmel, M.E. and Georgiou, G. (eds). Washington, DC: ACS Symposium Series Am. Chem. Soc., 307–324, 1993.

GUPTA, S.; BHATTACHARYA, A.; MURTHY, C. N. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 171-190, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.04.006>

HELDT-HANSEN, H. P.; ISHI, M.; PATKAR, S. A.; HANSEN, T. T.; EIGTVED, P. A new immobilized positional nonspecific lipase for fat modification and ester synthesis, in J.R. Whitaker and P.E. Sonnet (eds.), *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, ACS symposium Series 389, p. 158-172, 1989. DOI:10.1021/bk-1989-0389.ch011

HU, H.; LI, H.; ZHANG, Y.; YANMENG, C.; HUANG, Z.; HUANG, A.; ZHU, Y.; QIN, X.; LIN, B. Green mechanical activation-assisted solid phase synthesis of cellulose esters using a co-reactant: effect of chain length of fatty acids on reaction efficiency and structure properties of products, **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, p. 20656-20662, 2015. DOI: 10.1039/c5ra02393a

HUANG, K.; WANG, B.; CAO, Y.; LI, H.; WANG, J.; LIN, W.; MU, C.; LIAO, D. Homogeneous preparation of cellulose acetate propionate (CAP) and cellulose acetate butyrate (CAB) from sugarcane bagasse cellulose in ionic liquid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 2011. 5376-5381. <https://doi.org/10.1021/jf104881f>

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material, **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>

LAGE, F. A. P.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; TODERO L. M.; LUIZ, J. H. H.; MENDES A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56-67, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.12.007>

LI, W.; LI, R. W.; LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Acyl migration and kinetics study of 1(3)-positional specific lipase of *Rhizopus oryzae*-catalyzed methanolysis of triglyceride for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1888–1893, 2010.

LÓPEZ, B. C.; CERDÁN, L. E.; MEDINA, A. R.; LÓPEZ, E. N.; VALVERE, L. M.; PEÑA, E. H.; MORENO, P. A. G.; GRIMA, E. M. Production of biodiesel from vegetable oil and microalgae by fatty acid extraction and enzymatic esterification, **Journal of**

Bioscience and Bioengineering, v. 119, n. 6, p. 706-711, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.11.002>

LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D. A.; GOODWIN, J. G. Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, p. 5353-5363, 2005. <https://doi.org/10.1021/ie049157g>

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial, **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000500019>

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

PATKAR, S. A.; BJORKLING, F.; ZUNDEL, M.; SCHULEIN, M.; SVENDSEN, A.; HELDT-HANSEN, H. P.; GORMSEN, E. Purification of two lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors, **Indian Journal of Chemistry Section B Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 76-80, 1993.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Enzymatic transesterification for biodiesel production. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 40, p. 392-399, 2003.

SILVA, F. B.; MORAIS JÚNIOR, W. G.; SILVA, C. V.; VIEIRA, A. T.; BATISTA, A. C. F.; FARIA, A. M.; ASSUNÇÃO, R. M. N. Preparation and characterization of cellulose triacetate as support for Lecitase Ultra immobilization, **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1930, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22111930>

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*, **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293-308, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00031-9)

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

WANG, P.; TAO, B. Y. Synthesis and characterization of long-chain fatty acid cellulose ester (FACE), **Journal of Applied Polymer Science**, v. 52, n. 6, p. 755-761, 1994. <https://doi.org/10.1002/app.1994.070520605>

WEI, Y.; CHENG, F.; HOU, G. Synthesis and properties of fatty acid esters of cellulose, **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 66, p. 1019-1024, 2007.

WURZBURG, O. B. Converted starches. In: Wurzburg, O. B. Modified starches: Properties and uses. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989.

ZHANG, K.; GEISLER, A.; STANDHARDT, M.; MEHLHASE, S.; GALLEI, M.; CHEN, L.; THIELE, C. M. Moisture-responsive films of cellulose stearoyl esters showing reversible shape transitions, **Nature**, p. 1-12, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep11011>.