

**Universidade Estadual de Campinas**

**Faculdade de Engenharia de Alimentos**

**Laboratório de Tratamento de Resíduos e Processos Fermentativos**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE LIPASE DE  
*Burkholderia cepacia* NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE  
BIODIESEL**

**Eng<sup>o</sup> Gabriel Luis Castiglioni**

**Ranulfo Monte Alegre**  
Orientador

**Jorge Alberto Vieira Costa**  
Co-orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos

**Campinas - SP**

**Agosto, 2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C278e Castiglioni, Gabriel Luis  
Estudo da produção e utilização de lipase *Burkholderia cepacia* na síntese enzimática do biodiesel: produção de biodiesel via enzimática / Gabriel Luis Castiglioni. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre  
Co-orientador: Jorge Alberto Vieira Costa  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Biodiesel. 2. *Burkholderia cepacia*. 3. Imobilização. 4. Lípase. 5. Transesterificação. I. Alegre, Ranulfo Monte. II. Costa, Jorge Alberto Vieira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Study of the production and use of lipase from *Burkholderia cepacia* in enzymatic synthesis of biodiesel

Palavras-chave em inglês (Keywords): Biodiesel, *Burkholderia cepacia*, Immobilization, Lípase, Transesterification

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Reinaldo Gaspar Bastos  
Gabriela Alves Macedo  
Vanildo Luis Del Bianchi  
Christiane Saraiva Ogradowski

Data de defesa: 20/08/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO – TESE/DISSERTAÇÃO

Eu, GABRIEL LUIS CASTIGLIONI,  
Nacionalidade: BRASILEIRA, estado civil: SOLTEIRO,  
Profissão: ENG. ALIMENTOS residente e domiciliado à (endereço): RUA HELIO  
LEONARDI 97, portador do documento de identidade RG  
número 1811-298, na qualidade de titular dos direitos morais e patrimoniais  
de autor(a) da OBRA (título) ESTUDO DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE  
LIPASE DE BURKHOLDERIA CEPYIA NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BIODIESEL  
Tese de (nível) DOCTORADO, apresentada na Universidade Estadual de Campinas  
em (data) 20/08/2009.

1 -  **AUTORIZO** a Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, a reproduzir, disponibilizar na rede mundial de computadores – Internet – e permitir a reprodução por meio eletrônico, da OBRA, a partir da data da homologação.

2 -  **AUTORIZO**, a partir de um ano após a da data da homologação, a Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, a reproduzir, disponibilizar na rede mundial de computadores – Internet – e permitir a reprodução por meio eletrônico, da OBRA.

Casos excepcionais serão tratados pela CPG.

Campinas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Assinatura do Aluno:

*Gabriel Luis Castiglioni*

Ciente do Orientador:

*Raulo Duarte Alegre*



## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre**

(Orientador – DEA – FEA – Unicamp)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Alves Macedo**

(Membro – DCA – FEA – Unicamp)

---

**Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi**

(Membro – IBILCE – Unesp)

---

**Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos**

(Membro – CCA – UFSCar)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christiane Saraiva Ogradowski**

(Membro – DEQ – Furg)

---

**Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz**

(Suplente – IBILCE – Unesp)

---

**Prof. Dr. Gustavo Paim Valença**

(Suplente – FEQ – Unicamp)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Regina Durrant**

(Suplente – DCA – FEA – Unicamp)



*Que a tua vida não seja uma vida estéril. – Sê útil. – Deixa rastro. – Ilumina com o resplendor da tua fé e do teu amor.*

*(São Josemaria Escriva)*



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter nos dado o dom da vida e a graça concedida de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre; pela orientação, atenção, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa, pela co-orientação neste trabalho.

Aos meus pais, Arnaldo e Nair, por todo amor, amparo e incentivo em que desprenderam para que eu pudesse chegar até aqui.

A minha futura esposa, pelas orações, compreensão e companheirismo.

A FEA e a Unicamp pela minha formação acadêmica.

Ao CNPq pelo incentivo financeiro dado a este projeto.

Enfim, a todos os professores, amigos e colegas que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.



## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	xvii
ÍNDICE DE TABELAS	xxi
RESUMO	xxv
ABSTRACT	xxvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. JUSTIFICATIVA	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
4.1. Contexto geral	8
4.2. Fontes renováveis de energia	9
4.3. Biodiesel	10
4.3.1. Histórico	10
4.3.2. Conceito e propriedades do biodiesel	11
4.4. Formas de obtenção do biodiesel	13
4.4.1. Transesterificação	13
4.4.1.1. Catálise ácida	15
4.4.1.2. Catálise básica	16
4.4.1.3. Catálise enzimática	19
4.4.1.3.1. Contexto geral	19
4.4.1.3.2. Lipases	19
4.4.1.3.2.1. Fontes de obtenção	20
4.4.1.3.3. Produção de lipases microbianas	22
4.4.1.3.3.1. Formas de produção de lipases	23
4.4.1.3.3.1.1. Fermentação em estado sólido	23
4.4.1.3.3.1.2. Fermentação submersa	24

4.4.1.3.4. Aspectos estruturais de lipases-----	24
4.4.1.3.5. Mecanismo de catálise das lipases -----	28
4.4.1.3.6. Purificação de lipases microbianas -----	29
4.4.1.3.7. Imobilização de lipase-----	31
4.4.2. Síntese de biodiesel por via enzimática -----	34
4.4.3. Outras vias de obtenção de biocombustíveis -----	36
4.4.3.1. Pirólise -----	36
4.4.3.2. Microemulsificação -----	37
4.4.3.3. Fluido supercrítico -----	38
4.5. Variáveis que interferem na transesterificação-----	39
4.5.1. Efeito do tempo e temperatura de reação-----	39
4.5.2. Efeito do tipo e razão molar de álcool-----	40
4.5.3. Efeito da concentração de água-----	41
4.5.4. Efeito do tipo de catalisador -----	42
4.5.5. Efeito da adição de co-solvente -----	43
4.5.6. Efeito dos ácidos graxos livres-----	44
5. MATERIAL E MÉTODOS -----	46
5.1. Microrganismos e manutenção -----	46
5.1.1. Fermentação submersa -----	46
5.1.2. Fermentação semi-sólida -----	46
5.2. Preparo do inóculo para fermentação -----	46
5.2.1. Fermentação submersa -----	46
5.2.2. Fermentação semi-sólida -----	47
5.3. Fermentação-----	47
5.3.1. Fermentação submersa -----	47
5.3.1.1. Fermentação em reatores tipo erlenmeyers -----	47
5.3.2. Fermentação semi-sólida -----	48
5.4. Estudo da produção de lipase por Burkholderia cepacia -----	49
5.5. Estudo da produção de lipase de Burkholderia cepacia em diferentes reatores -----	53
5.6. Extração da lipase-----	55

5.7. Atividade enzimática-----	55
5.8. Caracterização físico-química da lipase -----	56
5.8.1. Efeito da temperatura na atividade da lipase-----	56
5.8.2. Efeito do pH na atividade da lipase-----	57
5.8.3. Efeito da temperatura na estabilidade da lipase-----	57
5.8.4. Efeito do pH na estabilidade da lipase-----	57
5.8.5. Eletroforese SDS – PAGE e focalização isoelétrica (Isoelectric Focusing – IEF)	57
5.9. Caracterização da resina para imobilização -----	59
5.10. Efeito do tratamento preliminar das resinas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) na adsorção de lipase-----	59
5.11. Imobilização-----	60
5.12. Reação de transesterificação-----	62
5.12.1. Efeito do pH e da concentração de água na reação de transesterificação com lipase livre de Burkholderia cepacia -----	62
5.12.2. Efeito da adição de agente emulsificante no meio de reação de transesterificação utilizando lipase livre de Burkholderia cepacia-----	63
5.12.3. Efeito do pH e da concentração de lipase imobilizada de Burkholderia cepacia na reação de transesterificação -----	64
5.12.4. Efeito da concentração de etanol na reação de transesterificação-----	65
5.12.5. Efeito da adição de íons metálicos na reação de transesterificação com lipase livre de Burkholderia cepacia-----	66
5.12.6. Efeito da adição de co-solvente na reação de transesterificação com lipase de Burkholderia cepacia imobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB-----	66
5.12.7. Efeito da temperatura na reação de transesterificação com lipase livre de Burkholderia cepacia -----	66
5.12.8. Efeito da temperatura na reação de transesterificação com lipase de Burkholderia cepacia imobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB-----	67
5.12.9. Avaliação do número de uso da lipase de Burkholderia cepacia imobilizada em resina hidrofóbica e de troca iônica-----	68
5.13. Análise do biodiesel por cromatografia de camada delgada -----	70

5.14. Análise do biodiesel por cromatografia gasosa-----	70
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	71
6.1. Seleção de cepas produtoras de lipase-----	71
6.2. Estudo de produção de lipase por Burkholderia cepacia -----	73
6.3. Estudo do tipo de reator na produção de lipase de Burkholderia cepacia -----	84
6.4. Caracterização da lipase de Burkholderia cepacia-----	86
6.4.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da lipase-----	86
6.4.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade da lipase-----	89
6.5. Eletroforese SDS – PAGE e focalização isoelétrica (Isoelectric Focusing – IEF)-----	91
6.6. Imobilização da lipase-----	93
6.6.1. Imobilização em resinas de troca iônica-----	93
6.6.2. Imobilização em resinas hidrofóbicas -----	96
6.6.2.1. Caracterização das micropartículas-----	96
6.6.2.2. Efeito do tipo de tratamento preliminar da resina na adsorção de lipase ---	102
6.7. Reação de transesterificação-----	104
6.7.1. Efeito do pH e da concentração de água na reação de transesterificação com lipase livre de Burkholderia cepacia -----	104
6.7.2. Efeito da adição de agente emulsificante no meio de reação de transesterificação utilizando lipase livre de Burkholderia cepacia -----	108
6.7.3. Efeito do pH e da concentração de lipase imobilizada de Burkholderia cepacia na reação de transesterificação-----	110
6.7.4. Efeito da concentração de álcool na reação de transesterificação-----	113
6.7.5. Efeito de íons metálicos na reação de transesterificação -----	114
6.7.6. Efeito do co-solvente na reação de transesterificação-----	116
6.7.7. Efeito da temperatura na reação de transesterificação com lipase livre de Burkholderia cepacia -----	117
6.7.8. Efeito da temperatura na reação de transesterificação com lipase de Burkholderia cepacia imobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB	118
6.7.9. Avaliação do número de uso da lipase de Burkholderia cepacia imobilizada em resina hidrofóbica e de troca iônica -----	122

7. CONCLUSÕES-----	128
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS -----	131
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	132



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reação estequiométrica global de um triglicerídeo a mono-álquil ésteres de ácidos graxo. -----	14
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de transesterificação por catalise ácida de gorduras e óleos vegetais. R' = Cadeia carbônica do ácido graxo; R = Grupo alquil do álcool. -----	16
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de transesterificação por catalise básica de gorduras e óleos vegetais. -----	17
<b>Figura 4.</b> Diagrama esquemático da estrutura da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> . -----	25
<b>Figura 5.</b> Modelo tridimensional da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> . -----	26
<b>Figura 6.</b> Representação da superfície molecular da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> na região do sítio ativo. -----	27
<b>Figura 7.</b> Mecanismo catalítico proposto para reação de transesterificação por lipase de <i>Humicola lanuginosa</i> . -----	28
<b>Figura 8.</b> Classificação dos suportes para imobilização de enzima quando a sua composição. -----	33
<b>Figura 9.</b> Sistema de transesterificação com fluido supercrítico. -----	38
<b>Figura 10.</b> (a) Reator tipo frasco erlenmeyers sem aeração; (b) Reator tipo erlenmeyers com sistema de aeração controlada; (c) Reator Biolafitte; (d) Representação do sistema de fermentação utilizado para a produção de lipase em Bioflo III. -----	54
<b>Figura 11.</b> Esquema do reator de leito fixo com recirculação do meio de reação. -----	69
<b>Figura 12.</b> Superfície de resposta para a produção de lipase pela <i>Burkholderia cepacia</i>	74
<b>Figura 13.</b> Superfícies de resposta para a produção de lipase por <i>Burkholderia cepacia</i> utilizando planejamento experimental fracionário $2^{4-1}$ com triplicata no ponto central. -----	76
<b>Figura 14.</b> Superfícies de resposta do planejamento experimental fatorial $2^3$ com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> .utilizando água de maceração de milho no meio de cultivo. -----	81

<b>Figura 15.</b> Superfícies de resposta do planejamento experimental fatorial $2^3$ com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> utilizando peptona e extrato de levedura no meio de cultivo.-----	82
<b>Figura 16.</b> Produção de lipase utilizando diferentes tipos de reatores.-----	85
<b>Figura 17.</b> Atividade enzimática de lipase produzida por <i>Burkholderia cepacia</i> utilizando diferentes condições de temperatura.-----	86
<b>Figura 18.</b> Cinética de inativação térmica da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> .-----	88
<b>Figura 19.</b> Atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> , na faixa de pH entre 3 e 11 a 37°C.-----	89
<b>Figura 20.</b> Atividade lipolítica relativa em função do tempo de exposição da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> em diferentes pHs.-----	90
<b>Figura 21.</b> Eletroforese SDS-PAGE em gel de 12,5%, amostra em condições desnaturantes e redutoras.-----	91
<b>Figura 22.</b> Eletroforese de focalização isoelétrica em pHs de 3 a 9.-----	92
<b>Figura 23.</b> Porcentagem de imobilização de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> em diferentes resinas.-----	93
<b>Figura 24.</b> Curva de contorno para porcentagem de imobilização de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> em função do tipo de suporte e razão suporte:enzima.-----	95
<b>Figura 25.</b> Isotermas de sorção de nitrogênio nas micropartículas macrorreticulares. Resinas com 25% de DVB – P2555150-----	97
<b>Figura 26.</b> Curvas cumulativas dos volumes de poros das micropartículas.-----	99
<b>Figura 27.</b> Distribuição de tamanho de poro em função do volume de poro das micropartículas. Resinas com 25% de DVB – P2555150, 35% de DVB – P3555150 e 45% de DVB – P4555150.-----	100
<b>Figura 28.</b> Área superficial cumulativa dos poros referentes as resinas com 25% de DVB – P2555150, 35% de DVB – P3555150 e 45% de DVB – P4555150.-----	101
<b>Figura 29.</b> Cromatografia de camada delgada para experimentos utilizando extrato enzimático e diferentes pHs.-----	104

<b>Figura 30.</b> Cromatografia de camada delgada para experimentos utilizando diferentes concentrações de água no meio reacional de transesterificação.-----	105
<b>Figura 31.</b> Superfície de resposta do planejamento experimental completo $2^2$ para a síntese de biodiesel utilizando lipase livre de <i>Burkholderia cepacia</i> .-----	108
<b>Figura 32.</b> Cromatografia de camada delgada para os experimentos utilizando extrato enzimático e diferentes pHs na presença de goma arábica no meio reacional.-----	109
<b>Figura 33.</b> Superfície de resposta utilizando planejamento fatorial completo $2^2$ com duplicata no ponto central, mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel utilizando lipase imobilizada de <i>Burkholderia cepacia</i> .-----	112
<b>Figura 34.</b> Biodiesel produzido em função da concentração de etanol utilizado no meio reacional-----	113
<b>Figura 35.</b> Cromatografia de camada delgada dos experimentos de transesterificação utilizando íons metálicos no extrato enzimático de reação.-----	115
<b>Figura 36.</b> Biodiesel produzido em função do co-solvente utilizado na reação de transesterificação.-----	116
<b>Figura 37.</b> Cromatografia de camada delgada para experimentos utilizando extrato enzimático a 40, 50 e 60°C-----	117
<b>Figura 38.</b> Conversão de biodiesel em função da temperatura utilizada na reação de transesterificação.-----	118
<b>Figura 39.</b> Curva de contorno gerada a partir do planejamento experimental fatorial $2^2$ com triplicata no ponto central mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel.-----	122
<b>Figura 40.</b> Síntese de biodiesel em função do número de usos da resina com lipase imobilizada.-----	123
<b>Figura 41.</b> Representação cinética da produção de biodiesel utilizando lipase imobilizada de <i>Burkholderia cepacia</i> em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB-----	124
<b>Figura 42.</b> Síntese de biodiesel em função do número de usos da resina Amberlite IRA-900 com lipase imobilizada.-----	126



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Exemplos de lipases comerciais -----	21
<b>Tabela 2.</b> Métodos de purificação de algumas lipases.-----	29
<b>Tabela 3.</b> Técnicas de imobilização de enzimas e suas vantagens e desvantagens.-----	31
<b>Tabela 4.</b> Lipases microbianas utilizadas para a produção de biodiesel -----	35
<b>Tabela 5.</b> Microrganismos utilizados para produção de lipase em fermentação submersa. -----	48
<b>Tabela 6.</b> Variáveis utilizadas no estudo da produção de lipase por <i>Aspergillus</i> . -----	49
<b>Tabela 7.</b> Matriz codificada do planejamento experimental completo $2^2$ com triplicata no ponto central mais os pontos axiais.-----	50
<b>Tabela 8.</b> Níveis de variação utilizados no planejamento experimental completo $2^2$ com triplicata no ponto central mais os pontos axiais.-----	50
<b>Tabela 9.</b> Níveis de variação utilizados no planejamento experimental fracionário $2^{4-1}$ com triplicata no ponto central para a produção de lipase por <i>Burkholderia cepacia</i> . -----	51
<b>Tabela 10.</b> Matriz do planejamento experimental fatorial $2^3$ com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase utilizando água de maceração de milho como substrato de crescimento de <i>Burkholderia cepacia</i> . -----	52
<b>Tabela 11.</b> Matriz do planejamento experimental fatorial $2^3$ com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase utilizando peptona e extrato de levedura como substrato de crescimento de <i>Burkholderia cepacia</i> . -----	53
<b>Tabela 12.</b> Condições de temperatura, aeração e agitação utilizadas nos diferentes reatores utilizados para a produção de lipase por <i>Burkholderia cepacia</i> . -----	55
<b>Tabela 13.</b> Resinas utilizadas nos testes de imobilização da lipase-----	60
<b>Tabela 14.</b> Matriz do planejamento experimental fatorial completo com triplicata no ponto central para avaliar o grau de imobilização de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> presente no extrato bruto. -----	61

<b>Tabela 15.</b> Matriz do planejamento experimental completo $2^2$ com duplicata no ponto central mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel utilizando lipase livre de <i>Burkholderia cepacia</i> . -----	63
<b>Tabela 16.</b> Matriz do planejamento experimental fatorial completo $2^2$ com duplicata no ponto central mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel utilizando lipase imobilizada de <i>Burkholderia cepacia</i> .-----	65
<b>Tabela 17.</b> Matriz do planejamento experimental fatorial $2^2$ com triplicata no ponto central mais os pontos axiais para síntese do biodiesel utilizando lipase imobilizada de <i>Burkholderia cepacia</i> . -----	67
<b>Tabela 18.</b> Atividade lipolítica e de transesterificação da lipase produzida por diferentes microrganismos. -----	71
<b>Tabela 19.</b> Matriz codificada do planejamento experimental completo $2^2$ com triplicata no ponto central mais os pontos axiais.-----	73
<b>Tabela 20.</b> Matriz codificada do planejamento experimental fracionário $2^{4-1}$ com triplicata no ponto central para a produção de lipase por <i>Burkholderia cepacia</i> . -----	75
<b>Tabela 21.</b> Matriz codificada do planejamento experimental fatorial $2^3$ com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> utilizando água de maceração de milho na composição do meio de cultivo. -----	78
<b>Tabela 22.</b> Matriz codificada do planejamento experimental fatorial $2^3$ com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> utilizando peptona e extrato de levedura na composição do meio de cultivo.-----	79
<b>Tabela 23.</b> Efeitos encontrados nos planejamentos experimentais fatoriais $2^3$ para a produção de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> . -----	80
<b>Tabela 24.</b> Composição básica nutricional da água de maceração de milho (MILHOCINA <sup>®</sup> ) usada nos experimentos de produção de lipase pela <i>Burkholderia cepacia</i> . -----	83
<b>Tabela 25.</b> Efeitos e índices de significância encontrados para as variáveis utilizadas no planejamento experimental $2^2$ .-----	94
<b>Tabela 26.</b> Características das micropartículas submetidas à caracterização. -----	96

<b>Tabela 27.</b> Resultados de imobilização de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> em resinas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) submetidas a diferentes formas de ativação. -----	103
<b>Tabela 28.</b> Matriz codificada e resultados do planejamento experimental completo $2^2$ mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel utilizando lipase livre de <i>Burkholderia cepacia</i> .-----	106
<b>Tabela 29.</b> Efeitos do pH e do volume de extrato enzimático encontrados a partir do planejamento experimental fatorial completo $2^2$ para a síntese de biodiesel utilizando lipase livre.-----	107
<b>Tabela 30.</b> Matriz codificada do planejamento experimental fatorial completo $2^2$ com duplicata no ponto central, mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel utilizando lipase imobilizada de <i>Burkholderia cepacia</i> .-----	110
<b>Tabela 31.</b> Efeitos do pH e da concentração de enzima encontrados a partir do planejamento experimental fatorial completo $2^2$ com duplicata no ponto central, mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel utilizando lipase imobilizada de <i>Burkholderia cepacia</i> .-----	111
<b>Tabela 32.</b> Matriz codificada e taxa de conversão de biodiesel para os experimentos do planejamento experimental fatorial $2^2$ com triplicata no ponto central mais os pontos axiais utilizando lipase imobilizada de <i>Burkholderia cepacia</i> .-----	120
<b>Tabela 33.</b> Análise de variância do planejamento experimental fatorial completo $2^2$ com triplicata no ponto central mais os pontos axiais para síntese de biodiesel.-----	121



## RESUMO

Os avanços biotecnológicos na produção industrial de lipases têm proporcionado sua aplicação nos diferentes setores. Este interesse se deve à capacidade destas enzimas catalisarem algumas reações, dentre elas a transesterificação. Esta reação é reversível e resulta em altos rendimentos a partir da otimização de parâmetros experimentais, tais como, temperatura, concentração do catalisador, razão molar álcool:óleo, entre outros. Um grande número de trabalhos voltados para a produção de biodiesel por via enzimática vem sendo feito devido às vantagens a ela associada. Tendo em vista estas observações, o presente trabalho teve por objetivo o estudo da produção de lipase microbiana e sua aplicação na síntese de biodiesel. As etapas envolvidas neste projeto foram: produção de lipase por diferentes microrganismos utilizando fermentação submersa e semi-sólida; uso de diferentes reatores e meios de cultivo; escolha e caracterização da lipase que melhor apresentou vantagens em relação à produtividade e à atividade de transesterificação; estudo de imobilização e reutilização da lipase em diferentes resinas hidrofóbicas e de troca iônica; estudo da influência do tempo de reação, temperatura, pH, concentração de água, etanol e enzima, além da adição de co-solvente, goma arábica e íons metálicos na síntese do biodiesel. Efeitos positivos nos experimentos foram verificados quando se adicionou  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e água de maceração de milho no processo de produção de lipase pela *Burkholderia cepacia*. Esta cepa apresentou maior potencial de produção de lipase com atividade de transesterificação do óleo de soja e etanol comparada com os demais microrganismos estudados. A caracterização da lipase demonstrou que os melhores resultados foram a  $37^\circ\text{C}$  e pH 8,0, seguindo modelo de inativação enzimática de primeira ordem. A resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB juntamente com a Amberlit IRA-900 apresentaram maior potencial de imobilização e utilização para a síntese do biodiesel. Nos experimentos de transesterificação, as variáveis estudadas apresentaram efeito na respostas de síntese de biodiesel. Os melhores resultados encontrados foram: pH igual a 6,0, temperatura em torno de  $50^\circ\text{C}$ , uso de éter de petróleo como co-solvente, concentração de etanol próxima à quantidade estequiométrica e concentração de aproximadamente 42% de água. Por fim, na reutilização das resinas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB e Amberlit IRA-900, foi observada uma diminuição no rendimento da reação devido à perda de parte da enzima por lixiviação. Os resultados referentes à primeira resina mostraram que a perda da atividade está relacionada ao número de usos e segue uma função de primeira ordem. A constante de perda da atividade foi de 3,017 e o tempo de meia vida do processo 18 usos. Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\text{áx}}$  determinados na reação foram de 21,98% e  $14,56\%_p \cdot h^{-1}$ , respectivamente. Já em relação à reutilização da lipase imobilizada na segunda resina, o tempo de meia vida foi de 6 usos. Com isso o presente trabalho apresenta uma contribuição significativa no que diz respeito ao uso de lipase de *Burkholderia cepacia* e agrega soluções para viabilizar o processo de transesterificação com esta enzima.

**Palavras-chave:** Biodiesel, *Burkholderia cepacia*, imobilização, lipase, transesterificação.



## ABSTRACT

The technological advancements in the industrial production of lipases have been making its application viable in different sectors. This interest is due to these enzymes capacity to catalyze some reactions, like the transesterification. This reaction is reversible and the optimization of experimental parameters such as temperature, catalyst concentration and ethanol-to-oil molar ratio results in a high production efficiency. A great number of studies about the enzymatic production of biodiesel have been done due to its related advantages. Considering these observations, the objective of this work was to study the production of microbial lipase and its application in the synthesis of biodiesel. The stages involved in this project were: lipase production by different microorganisms using submerged and semi-solid fermentation; use of different reactors and cultivation media; selection and characterization of the lipase that showed advantages related to the productivity and to the transesterification activity; study of the immobilization and reutilization of the lipase in different hydrophobic and ionic exchange resins; study of the influence of reaction time, temperature, pH, water, ethanol and enzyme concentrations and the addition of co-solvents, arabic gum and metallic ions in the synthesis of biodiesel. Positive effects were verified in the experiments when  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and corn maceration liquor were added to the process of lipase production by *Burkholderia cepacia*. Compared with the other microorganisms studied, that strain showed greater potential for the production of lipase with activity of transesterification of soy oil and ethanol. The characterization of the lipase showed that the best results occurred at 37°C and pH 8.0, following the model of first order enzymatic inactivation. The poly(styrene-co-divinylbenzene) resin with 35% of DVB and Amberlit IRA-900 presented greater potential for the immobilization and synthesis of the biodiesel. In the transesterification experiments, the studied variables affected the response of the biodiesel synthesis. The best results were found at pH 6.0, temperature of 50°C, petroleum ether as co-solvent, ethanol concentration at stequiometric values and water concentration around 42%. Finally, due to the loss of enzyme by lixiviation, it was observed a decrease in the efficiency of the reaction when the poly(styrene-co-divinylbenzene) resins with 35% of DVB and Amberlit IRA-900 were reused. The results referring to the first resin showed that the loss of activity is related to the number of utilizations and it follows a first order function. The activity loss rate was 3.017 and the half-life of the process was 18 uses. The kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  determined for the reaction were respectively 21.98% and  $14.56\%_{\text{p}}\cdot\text{h}^{-1}$ . Referring to the reutilization of the lipase immobilized in the second resin, the half-life was 6 uses. Thus, this work presents a relevant contribution to the use of the lipase of *Burkholderia cepacia* and adds solutions to make the process of transesterification with this enzyme viable.

**Keywords:** Biodiesel, *Burkholderia cepacia*, imobilization, lipase, transesterification.

## 1. INTRODUÇÃO

A maior parte da energia consumida no mundo provém de fontes não renováveis, como é o caso do petróleo, carvão e gás natural. Pelo fato de serem fontes limitadas, a busca por alternativas de energia capaz de atender as necessidades atuais é de suma importância (SHUCHRDT *et al.*, 1998). Um fator agravante em relação à utilização dos combustíveis fósseis é o desequilíbrio ocasionado pela liberação de contaminantes ao meio ambiente, tornando a busca por tecnologias capazes de reduzir os níveis de emissão cada vez mais crescentes. O desenvolvimento de motores de combustão interna menos poluentes e combustíveis renováveis, como é o caso do biodiesel, são algumas das tecnologias mais estudadas (CANAKCI *et al.*, 2006).

O biodiesel é definido como um éster alquílico de ácidos graxos, obtidos a partir da reação de transesterificação de triglicerídeos e alcoóis. Por apresentar propriedades bastante semelhantes ao diesel convencional, o biodiesel vem sendo utilizado com pouca ou nenhuma modificação nos motores de combustão interna (CANAKCI & GERPEN, 2003). A mistura destes combustíveis também pode apresentar vantagens devido ao aumento da lubricidade, proporcionando maior vida útil do motor.

A utilização de biodiesel como combustível vem apresentando um potencial promissor no mundo inteiro (HERRERA, 1995), devido sua contribuição ambiental na redução dos níveis de poluentes e por ser uma fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel. Também se pode dizer que para o Brasil esta é uma tecnologia bastante adequada, devido ao potencial de produção de oleaginosas e de álcool etílico derivado da cana-de-açúcar. No entanto, a comercialização do biodiesel ainda apresenta algumas dificuldades tecnológicas (STOUNAS *et al.*, 1995), como é o caso do preço da matéria-prima e dos custos operacionais (MA & HANNA, 1999).

Do ponto de vista econômico, a viabilidade do biodiesel está relacionada com a substituição das importações e às vantagens inerentes à redução de emissão de material particulado e enxofre, que evitará custos com saúde pública e de gases responsáveis pelo efeito estufa, possibilitando a geração de recursos internacionais no mercado de carbono.

Embora, na indústria, o biodiesel seja produzido praticamente por via química, vários são os problemas associados a essa técnica, restringindo seu desenvolvimento

devido à recuperação do glicerol e a remoção de sais inorgânicos (SHIMADA *et al.*, 2002). DU *et al.* (2005) afirmam que estas desvantagens podem ser prevenidas através do uso de lipases.

Dentre as reações catalisadas por lipases destacam-se as de hidrólise, alcoólise, esterificação e transesterificação. Normalmente estas reações se dão com grande simplicidade e alto rendimento, conferindo um potencial biotecnológico que influencia as pesquisas para otimização da sua produção, caracterização, imobilização e aplicação industrial (FABER, 1997).

Muitos trabalhos para estabelecer metodologias de imobilização de lipase em diferentes suportes têm sido reportados. Isto se deve às vantagens no que se refere ao aumento da estabilidade, facilidade de separação do produto e recuperação da enzima do meio reacional (RESLOW *et al.*, 1988; REETZ *et al.*, 1996).

A literatura menciona que normalmente os melhores suportes para a imobilização de lipases são aqueles que apresentam uma maior interação com a enzima, conhecido como suportes hidrofóbicos (BJÖRKLING *et al.*, 1991). Porém, a escolha do suporte adequado está relacionada com a fixação da enzima ao suporte de maneira irreversível sem afetar significativamente sua atividade no meio reacional (MALCATA *et al.*, 1990). DU *et al.* (2005); LI *et al.* (2006); MODI *et al.* (2006)a; MODI *et al.* (2006)b; TURKAN & KALAY (2006); YANG *et al.* (2006) são alguns pesquisadores que vêm realizando trabalhos de produção de biodiesel por via enzimática em diferentes meios reacionais.

A utilização comercial do biodiesel no Brasil está amparada no marco regulatório, lançado em dezembro de 2004 pelo Governo Federal, que autorizou a mistura de 2% de biodiesel ao diesel (B2 - 2% de biodiesel e 98% de diesel), desde janeiro de 2005, tornando essa mistura obrigatória em 2008, quando foi autorizado o uso 5% de biodiesel.

De modo geral, a diversidade de matérias primas, de processos e usos do biodiesel apresenta grandes vantagens, mas traz consigo a responsabilidade de analisar adequadamente, parâmetros como custo total envolvido na produção da matéria prima, possibilidades de geração de emprego, disponibilidades de área e mão de obra adequada, que variam muito dependendo da escolha feita.

Nesse sentido, a criação de alternativas que contribuam para os benefícios econômicos e sociais, seja pelo próprio processo empregado quanto pela elaboração de componentes ecologicamente atrativos, podem garantir uma estratégia que busca privilegiar não só as regiões onde os incentivos fiscais serão maiores, mas também a qualidade de vida da sociedade.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo principal a produção e aplicação de lipase microbiana na síntese do biodiesel.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Produzir lipase a partir dos processos de fermentação semi-sólido e submersa utilizando diferentes microrganismos;
- Comparar o uso de diferentes lipases na reação de transesterificação de biodiesel;
- Caracterização da lipase escolhida para síntese do biodiesel;
- Estudo de imobilização da lipase que melhor apresentar atividade de reação de transesterificação em óleo de soja e etanol, utilizando diferentes resinas hidrofóbicas e de troca iônica;
- Avaliar o efeito da utilização de lipase livre e imobilizada na reação de transesterificação de biodiesel;
- Avaliar o efeito do tempo, temperatura, concentração de enzima, pH, quantidade de água, concentração de etanol e presença de íons metálicos na reação de transesterificação do biodiesel;
- Avaliar o efeito da adição de co-solvente na reação de transesterificação de biodiesel;
- Determinar o número de usos, da resina com lipase imobilizada para a reação de transesterificação do biodiesel.

### 3. JUSTIFICATIVA

O Brasil, pelas dimensões continentais e pelas características climáticas e territoriais, possui cerca de 25% da biodiversidade do mundo e conseqüentemente grande abundância de biomassa e resíduos agro-industriais. Técnicos do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) fizeram um levantamento e calcularam que esta biodiversidade está em torno de 4 trilhões de reais. Esses fatores mostram quão imperativo é o desenvolvimento de bioprocessos no país, de forma a auxiliar no desenvolvimento de novos produtos e redução de custos de diversos processos biotecnológicos.

Nos últimos anos têm-se observado rápido desenvolvimento na área da Biotecnologia, com o aparecimento de novos processos em nível industrial envolvendo a utilização de microrganismos e enzimas. Dentre os setores de maior aplicação dos processos biotecnológicos destacam-se o alimentício, químico, farmacêutico, energético e ambiental.

Atualmente, há grande interesse da aplicação de enzimas nos processos catalíticos, devido sua capacidade seletiva em várias reações envolvendo um grande número de substratos (STRAATHOF *et al.*, 2002). A biocatálise pode ser importante substituto de muitos processos puramente químicos, e por isso é conhecida como química verde (WARNER *et al.*, 2004).

As enzimas lipolíticas assumem papel importante em diferentes áreas devido à possibilidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como orgânico. Este fenômeno é devido primariamente à sua capacidade de reação em inúmeros substratos, estabilidade frente à temperatura, pH, solventes orgânicos e à sua quimio-regio e enantiosseletividade.

As lipases podem ser obtidas a partir de vegetais, animais e microrganismos. Devido à diversidade e relativa facilidade de produção, os processos envolvendo microrganismos são os mais estudados.

A produção de lipase dispensa o uso de substratos de alto custo, tornando o uso de resíduos agroindustriais, ricos em hidrocarbonetos, uma alternativa de fonte de carbono de grande disponibilidade e baixo custo. ROYCE (1993) afirma que o meio de cultivo utilizado para a produção de metabólitos secundários representa 60 a 90% dos

custos de fermentação. Para a obtenção de metabólitos primários esse custo representa de 40 a 70% do custo total.

A aplicação de lipases é ampla e pode ser utilizada para obtenção de diversos produtos. Do ponto de vista econômico, a produção de compostos quirais tem se mostrado a mais interessante. Além destes, outros produtos de ampla aplicação como poliésteres e policarbonatos podem ser obtidos através de lipases. Uma linha crescente na aplicação destas enzimas é o estudo das reações de transesterificação para a obtenção de biodiesel, um produto promissor que tem ganhado bastante atenção nos últimos anos (SANTOS, 2005).

O Biodiesel é um combustível formulado a partir da transesterificação de óleo vegetal ou animal. Dentre as oleaginosas, destacam-se a mamona, o dendê, o girassol, o algodão, o amendoim, o coco, a soja, entre outros. Com isto, regiões, com características climáticas e de cultivo mais favoráveis a determinadas plantas, apresentam vantagem de poderem cultivar aquelas mais favoráveis à localidade. Desta forma, o biodiesel, além de se tornar uma alternativa mais econômica e acessível, minimizaria a emissão de poluente ao meio ambiente e conseqüentemente o grave problema do aquecimento global.

O aproveitamento energético de óleos vegetais também é benéfico no âmbito social, pois além da geração de emprego, os rejeitos relacionados com a fração protéica destas oleaginosas proporcionariam sua utilização nas indústrias de alimentos e rações.

Nos últimos dez anos, o consumo de diesel no Brasil aumentou numa média de 5% ao ano, índice que tende a crescer em razão da crise energética. Portanto, o biodiesel proporciona um novo mercado com uma série de vantagens, dentre elas, níveis de enxofre menores que 10ppm, nível de emissões gasosas abaixo do diesel tradicional, baixos níveis de cetano, biodegradabilidade, não explosivo, lubricidade otimizada, ausência de aromáticos, entre outros.

Recentes levantamentos demonstraram que apenas 2,2% da energia consumida no mundo é proveniente de fontes renováveis (PESSUTI, 2003), o que evidencia extraordinário potencial e necessidade imediata de expansão. Considerando-se apenas a biomassa proveniente de atividades agroindustriais, ou seja, resíduos agrícolas, florestais e agropecuários, calcula-se que o potencial energético desse material seja equivalente a,

aproximadamente, 6.587 milhões de litros de petróleo ao ano (STAISS & PEREIRA, 2001).

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. Contexto geral

A sociedade está vivenciando uma situação de alerta devido à degradação ambiental. Isso torna necessária, mudanças nos processos de produção de bens, consumo energético e na postura referente à economia de mercado (COSTA NETO, 1993).

O setor petroquímico é um dos grandes responsáveis pelos danos ambientais, onde a queima de combustíveis derivados a partir do petróleo resulta num acúmulo de compostos nocivos ao homem e ao meio ambiente. Estas atividades por não serem auto-sustentáveis, não têm como característica principal a biodegradabilidade de seus produtos (BONN & PEREIRA, 1999.)

Em 1998, 57% do consumo de petróleo no mundo se destinaram ao setor de transportes (IEA, 2000). No caso dos Estados Unidos, 27,7% foi utilizada para este fim, sendo 96,8% deste total, de origem petroquímica (DAVIS, 1999). Já no Brasil, 85,4% desta energia foi derivada do petróleo (MME, 1999). Devido a este fato, o setor de transportes tem por necessidade a redução das emissões de gases que contribuem para o efeito estufa, tornando a produção de biocombustíveis uma das alternativas mais utilizadas para este fim (ANTONI *et al.*, 2007).

Dentre os processos de produção de biodiesel se destacam a catálise química e enzimática (CONTI *et al.*, 2001). Sendo que o estudo da aplicação de lipases na produção de biocombustíveis vem se apresentando como uma nova alternativa de modificação de óleos vegetais para substituição do diesel tradicional (NETO, 2002).

A produção de combustíveis a partir de plantas cultivadas em diferentes localidades é dependente de apoio político devido ser fontes de energia essenciais. Este é um ponto crucial no que diz respeito ao desenvolvimento econômico agrícola destas áreas (ANTONI *et al.*, 2007).

## 4.2. Fontes renováveis de energia

A atual matriz energética mundial compõe-se, principalmente, de fontes não renováveis de carbono fóssil, como petróleo (35%), carvão (23%) e gás natural (21%). Vários estudos prevêem o esgotamento dessas fontes e uma possível escassez, ainda nesse século. Apenas 2,2% da matriz energética está composta por fontes renováveis (PERES *et al.*, 2005).

Em 2003, cerca de 85% da energia consumida no mundo foi obtida de combustíveis fósseis. Do total, 80% da energia foi consumida por cerca de dez países.

As fontes de energias renováveis vêm apresentando importância cada vez maior no que diz respeito a sua dependência mundial. Dentre as fontes de energia e produtos químicos que precisam ser mais bem utilizados para desenvolvimento com sustentabilidade destacam-se o gás natural, bagaço de cana-de-açúcar, álcool, biodiesel, biomassa, eólica e radiação (METZGER, 2001).

O Brasil, apesar de ser rico em oleaginosas, restringe as suas culturas para fins alimentícios, porém existe grande potencial a ser explorado, tanto em relação ao aproveitamento das culturas temporárias e perenes como também de produtos residuais. Por se tratar de fonte de energia renovável, os óleos vegetais têm sido largamente investigados para programas de energia, pois proporcionam geração descentralizada e apoio à agricultura familiar, valorizando potencialidades regionais e oferecendo alternativas a problemas econômicos e socioambientais (URIESTE, 2004).

Segundo o estudo *Projeções do Agronegócio: Mundial e Brasil*, divulgado pelo Ministério da Agricultura, o Brasil assumirá a maior parte do mercado mundial de soja. Até 2017, o país será responsável por 34% da produção e praticamente metade das exportações, 46,5%, contra os 27% de produção e 25% de exportações observadas atualmente. A participação dos Estados Unidos, que hoje ocupam o primeiro lugar na produção (36%) e nas vendas do grão para o exterior (25,7%), deverá se reduzir para 30 e 24,5%, respectivamente (<http://www.agenciabrasil.gov.br>, acessado em 12/2007).

Conforme o estudo, a produção de soja em todo o mundo alcançará 277 milhões de toneladas na safra 2016/2017. Isso representa um volume 27% maior que o da última safra. No entanto, o relatório observa que o cultivo do grão se tornará mais concentrado

com Brasil, Estados Unidos e Argentina representando 85% do mercado produtor (<http://www.agenciabrasil.gov.br>, acessado em 12/2007).

### **4.3. Biodiesel**

#### **4.3.1. Histórico**

Os óleos vegetais e gorduras animais foram investigados como combustíveis, muito tempo antes da crise energética dos anos 70. Rudolf Diesel (1858-1913) foi um dos primeiros investigadores a ter interesse nestes combustíveis e menciona em seu livro que os óleos vegetais já vinham sendo utilizados em máquinas diesel com bons resultados. Durante a Exposição de Paris em 1900, a companhia Otto demonstrou o funcionamento de um pequeno motor diesel com óleo de amendoim. Esta experiência foi tão bem sucedida que apenas alguns dos presentes perceberam as circunstâncias em que a mesma havia sido conduzida. O motor, que havia sido construído para consumir petróleo, operou com o óleo vegetal sem qualquer modificação. Também foi observado que o consumo de óleo vegetal resultou um aproveitamento de calor literalmente idêntico ao do petróleo (KNOTHE *et al.*, 2006).

WALTON (1938) menciona que para se obter maior valor combustível de óleos vegetais seria necessário quebrar suas ligações éster-glicerídicas e utilizar os ácidos graxos liberados. Esta informação foi indicativa do que hoje se denomina biodiesel, dada a recomendação de que o glicerol deveria ser eliminado do combustível, muito embora nenhuma menção tenha sido dada aos ésteres.

Um extenso relatório publicado em 1942 sobre produção de combustível de ésteres etílicos de óleo de palma descreve o que deve ter sido o primeiro teste de campo utilizando biodiesel. Os testes foram realizados no verão de 1938 em uma linha de transporte de passageiros entre Bruxelas e Louvaina (Leuven). Muitas publicações demonstraram que óleos vegetais apresentavam comportamento satisfatório como combustível ou como fonte de combustíveis, embora tenha sido muitas vezes observado que a disseminação de seu uso é comprometida pelo seu custo, quando comparado aos combustíveis derivados do petróleo (KNOTHE *et al.*, 2006).

No Brasil o primeiro relato que se tem sobre biodiesel é da década de 60, nas Indústrias Matarazzo, onde observou a formação de éster etílico em experiências realizadas com óleo de café e álcool de cana (MEIRELLES, 2003).

Durante mais de 40 anos o Brasil vem desenvolvendo pesquisas relacionadas ao biodiesel, sendo um dos pioneiros a registrar, em 1980, a primeira patente sobre seu processo de produção. A partir da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, estabelece a obrigatoriedade da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor, em qualquer parte do território nacional. Esse percentual obrigatório será de 5% oito anos após a publicação da referida lei, havendo percentual obrigatório intermediário de 2% três anos após a publicação da mesma.

(<http://www.biodiesel.gov.br/programa.html> acessado em 04/2008).

#### **4.3.2. Conceito e propriedades do biodiesel**

Pela Lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005 o biodiesel é definido como um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.

De modo geral o biodiesel pode ser definido como combustível renovável obtido a partir de óleos vegetais e gorduras animais. Sua estrutura química é um mono-alquil éster de ácido graxo, produzido comercialmente por reação de transesterificação.

Apesar do biodiesel apresentar uma série de propriedades semelhantes ao diesel de petróleo, algumas diferenças são observadas, dentre elas a ausência de enxofre e compostos aromáticos; maior número de cetano; teor médio de oxigênio em torno de 11%; maior viscosidade e maior ponto de fulgor que o diesel convencional; possui nicho de mercado específico, diretamente associado a atividades agrícolas; e atualmente apresenta preço de mercado relativamente superior ao diesel comercial (RAMOS *et al.*, 2003).

Outras vantagens do biodiesel em relação ao óleo diesel são: não é tóxico, é obtido a partir de fontes renováveis; é biodegradável, menores quantidades de óxidos de carbono, óxidos de enxofre, entre outras. Tais diferenças fazem do biodiesel um combustível com grande potencial de substituição do diesel de petróleo (YOUSEF *et al.*, 2005, JANSSEN *et al.*, 1996)

Embora dificilmente o óleo diesel possa ser substituído completamente pelo biodiesel, GERPEN (2005) afirma as seguintes razões para justificar seu desenvolvimento:

- Provê mercado para produção do excesso de óleos vegetais e gorduras de animais;
- Diminui a dependência de países importadores de petróleo;
- O biodiesel é renovável e não contribui para o efeito estufa devido a seu ciclo fechado de carbono. A análise do ciclo de vida do biodiesel mostra a redução de 78% nas emissões de CO<sub>2</sub> comparados com diesel de petróleo;
- Os produtos de combustão apresentam menores níveis de particulados, monóxido de carbono e hidrocarbonetos provenientes da combustão incompleta. Porém, na maioria dos testes de emissões mostrou leve aumento de óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>);
- Quando adicionado de 1-2% ao óleo diesel, proporciona o aumento da lubricidade no funcionamento dos motores.

TURRIO-BALDASSARRI *et al.* (2004) avaliaram as emissões de hidrocarboneto policíclicos aromáticos (HPAs), o poder mutagênico e a distribuição do tamanho de partículas em diferentes misturas de biodiesel e diesel. Foi observada pequena redução na emissão da maioria dos HPAs, no entanto os melhores resultados foram encontrados quando se adicionou 18% de biodiesel na mistura.

CORRÊA & ARBILLA (2008) mencionam em seu trabalho que, segundo a International Agency for Research on Cancer, na fase gasosa e particulada das emissões do óleo diesel são encontradas centenas de produtos orgânico e inorgânicos. Estas fases contêm moléculas carcinogênicas tais como aldeídos, hidrocarbonetos mono-aromáticos, e HPAs. Por estas razões, as emissões provenientes deste combustível são classificadas como “provavelmente carcinogênica aos seres humanos”.

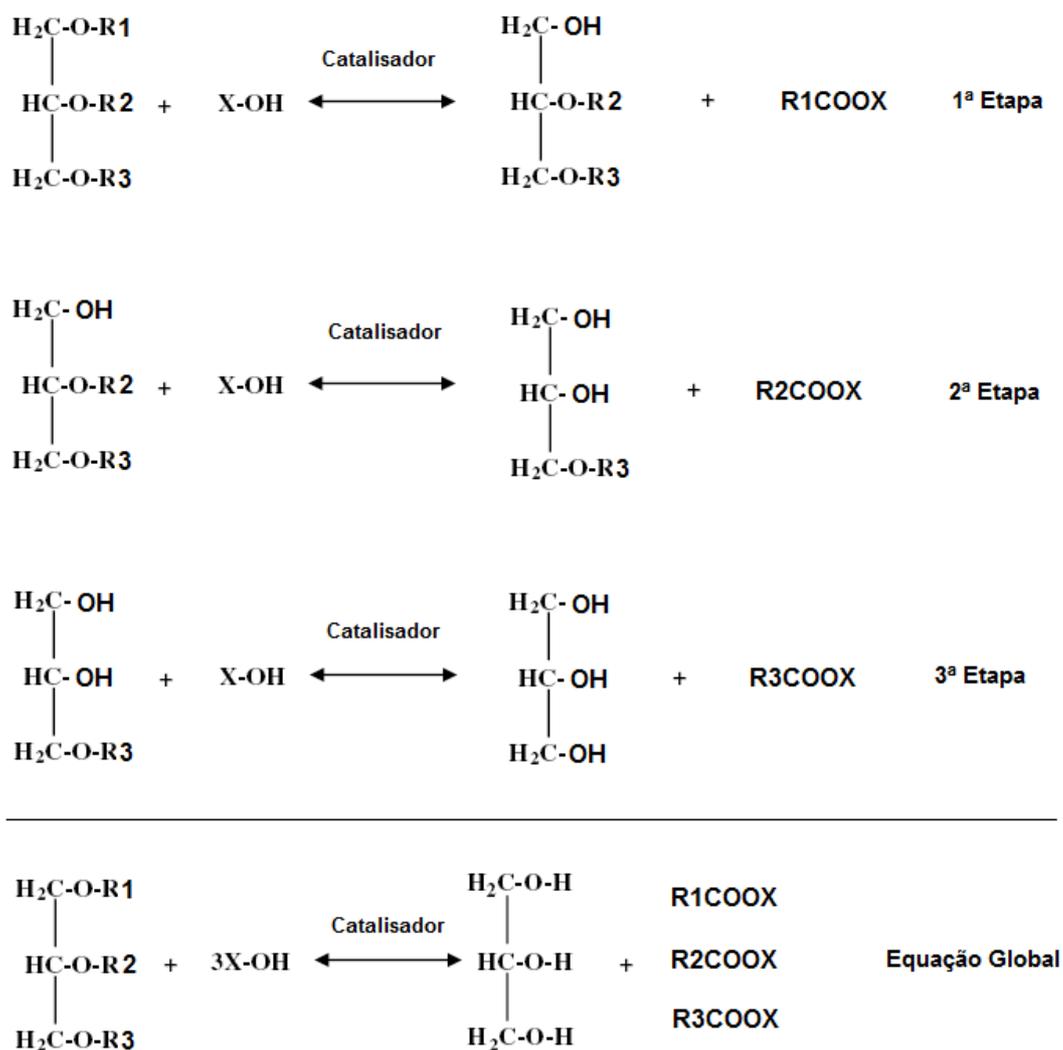
#### 4.4. Formas de obtenção do biodiesel

A inclusão social e o desenvolvimento regional através da geração de emprego e renda devem ser os orientadores básicos das ações direcionadas ao biodiesel, o que implica dizer que sua produção e consumo devem ser promovidos de forma descentralizada e não-excludente em termos de rotas tecnológicas e matérias-primas utilizadas (PENTEADO, 2005).

Os óleos vegetais e as gorduras animais apresentam em sua composição, além de triglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolipídios, esteróis, água e outras impurezas. Estes compostos conferem certas características à matéria prima, que impede o seu uso direto como combustível (KEGL, 2008). Estes problemas podem ser solucionados por modificações químicas, dentre elas a transesterificação do óleo bruto (MEHER *et al.*, 2006), chamada também de alcoólise (OTERA, 1993). A alcoólise é uma reação em equilíbrio e a transformação ocorre com a mistura dos reagentes na presença de um catalisador e do álcool em excesso.

##### 4.4.1. Transesterificação

A reação de transesterificação é também conhecida como o deslocamento do álcool de um éster por outro álcool. Este processo é semelhante à hidrólise, porém o álcool é utilizado em lugar da água (SRIVASTAVA & PRASAD, 2000). Esta reação consiste na transformação do triglicerídeo em presença de um álcool, mais usualmente metanol e etanol, e um catalisador. O processo global de transesterificação de óleos vegetais e gorduras é uma seqüência de três reações reversíveis e consecutivas, em que os mono e os diacilgliceróis são os intermediários (DUBÉ *et al.*, 2007). O esquema da reação é mostrado na Figura 1.



**Figura 1.** Reação estequiométrica global de um triglicerídeo a mono-álquil ésteres de ácidos graxo.

Esta reação é um processo que tem por objetivo modificar a estrutura molecular do óleo vegetal, de forma a fornecer propriedades semelhantes ao óleo diesel (BAGLEY *et al.*, 1998). A grande vantagem desta transformação é a possibilidade de substituição do diesel convencional sem a modificação da estrutura dos motores existentes.

Nesta reação, estequiometricamente são necessários três moles de álcool para cada mol de triglicerídeo, porém na prática o álcool é adicionado em excesso para que o equilíbrio favoreça a formação do produto (DUNN, 2002).

A transesterificação é uma reação reversível e procede apenas misturando os reagentes. Porém, a presença de catalisador acelera sua conversão (MEHER *et al.*, 2006, b).

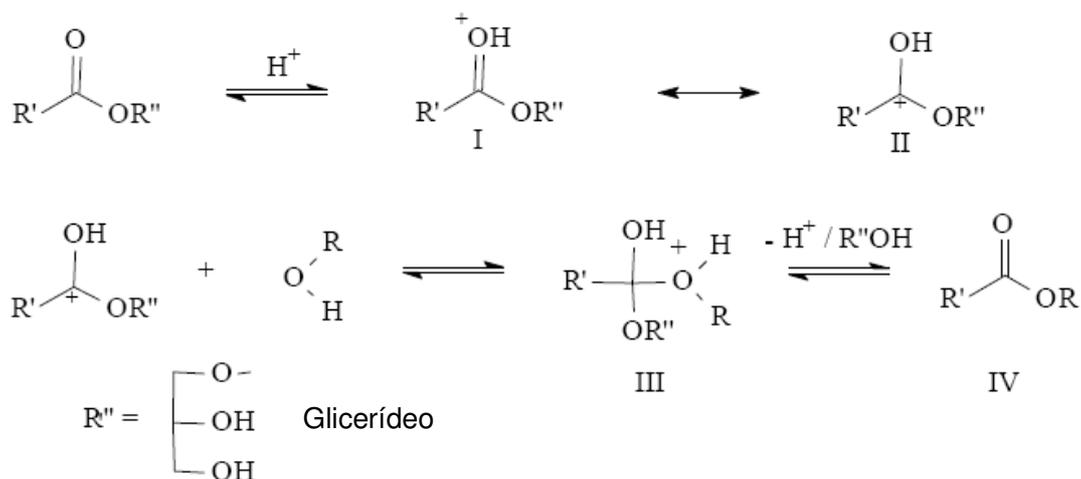
Diversos tipos e combinações de catalisadores podem ser utilizados na transesterificação para a síntese de biodiesel. Dentre estes se destacam os catalisadores ácidos, básicos e enzimáticos.

#### **4.4.1.1. Catálise ácida**

Este método consiste na reação de triglicerídeos e álcool utilizando ácido como catalisador (FREEDMAN *et al.*, 1986). Dentre os ácidos mais utilizados na catálise ácida estão o ácido sulfúrico, fosfórico, clorídrico e sulfônicos orgânicos (MA & HANNA, 1999). Esta catálise normalmente apresenta vantagens quando se utiliza óleos com alto teor de água e ácidos graxos livres (AKSOY *et al.*, 1988).

FREEDMAN *et al.* (1986) admitem que 1mol% de ácido sulfúrico é uma boa quantidade a ser utilizada na catálise ácida. Nas condições de 65°C e razão molar 30:1, rendimentos de até 99% poderiam ser alcançados em 50h. Já uso de butanol a 117°C e o etanol a 78°C o tempo de reação pode apresentar este rendimento em 3 e 18h, respectivamente.

O mecanismo de transesterificação via catálise ácida para óleos vegetais e gorduras animais é mostrado na Figura 2.



**Figura 2.** Mecanismo de transesterificação por catalise ácida de gorduras e óleos vegetais. R' = Cadeia carbônica do ácido graxo; R = Grupo alquil do álcool. **Fonte:** SCHUCHART *et al.* (1998).

Algumas das desvantagens dos catalisadores ácidos são o alto poder corrosivo, diminuindo a vida útil dos equipamentos e utilização de condições drásticas de operação, como temperatura e pressão. Isto faz com que os catalisadores básicos sejam mais largamente utilizados na indústria (SRIVASTAVA & PRASAD, 2000).

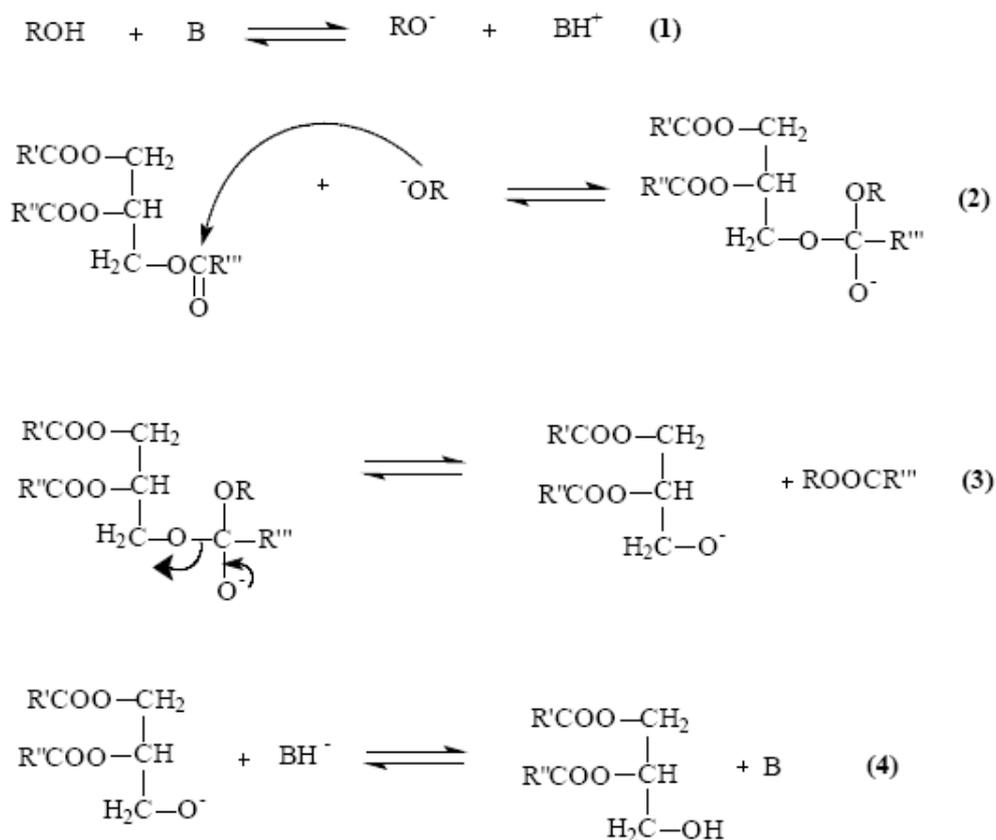
#### 4.4.1.2. Catálise básica

A reação de transesterificação utilizando catalisador básico é a mais largamente utilizada em nível industrial. Sua escolha se deve à maior velocidade de reação em condições amenas. Segundo FORNO (1954) a reação utilizando catalisador básico ocorre 4000 vezes mais rápida comparado com os catalisadores ácidos.

A concentração de catalisador varia entre 0,5 e 1%, podendo alcançar taxas de 94 a 99% de conversão em ésteres. A utilização de maiores concentrações de catalisador além de não aumentar a conversão, proporciona um acréscimo dos custos principalmente devido a necessidade de sua remoção (KRISNANGKURA & SIMAMAHARNNOP, 1992).

Na transesterificação básica os glicerídeos e o álcool devem ser anidros, pois a presença de água favorece a reação de saponificação dos ácidos graxos, formando sabões (MACEDO & MACEDO, 2004). Os sabões consomem o catalisador, reduzindo a eficiência catalítica e aumentando a viscosidade do meio (URIOSTE, 2004). FEUGE & GROS (1949) também mencionam a importância dos óleos estarem livres tanto de água como de ácidos graxos. MA & HANNA (1999) sugerem que a concentração de ácidos graxos livres no óleo refinado deve ser a menor possível, abaixo de 0,5%.

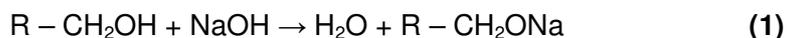
O mecanismo de transesterificação com catálise básica de óleos vegetais e gorduras animais é mostrado na Figura 3.



**Figura 3.** Mecanismo de transesterificação por catálise básica de gorduras e óleos vegetais. **Fonte:** SCHUCHART *et al.* (1998).

Na primeira etapa da reação com o catalisador básico e o álcool, mostrada na Figura 3, ocorre a formação do alcóxido juntamente com o catalisador protonado. O ataque nucleofílico do alcóxido ao grupo carbonila do triglicerídeo, produz um carbono tetraédrico intermediário (segunda etapa da reação), formado pelo éster alquílico e o ânion correspondente do diglicerídeo (terceira etapa da reação). O diglicerídeo é desprotonado pelo catalisador, regenerando assim as espécies ativas (quarta etapa da reação), que poderão então reagir com a segunda molécula de álcool, iniciando outro ciclo catalítico. Os mono e diglicerídeos são convertidos pelo mesmo mecanismo na mistura de ésteres alquílicos e glicerol (SCHUCHART *et al.*, 1998).

Segundo MARCHETTI *et al.* (2005), no processo de transesterificação alcalina utilizando NaOH é aconselhável que a reação seja interrompida antes de se obter a melhor eficiência global, pois pode ocorrer a formação de alcóxido, como mostrado na Equação 1.



Neste processo de transesterificação química, a produção dos ésteres apresenta várias etapas, tais como, a difícil recuperação do glicerol, a remoção do catalisador do produto e tratamento de efluentes líquidos. Outros fatores indesejáveis são a baixa seletividade, conduzindo a reações secundárias indesejáveis e a interferência da água e dos ácidos graxos livres na reação. Para evitar estes problemas, a utilização de lipase vem sendo investigada largamente como biocatalisador para a síntese de biodiesel (SOUMANOU & BORNSCHEUER, 2003).

### **4.4.1.3. Catálise enzimática**

#### **4.4.1.3.1. Contexto geral**

Biologicamente a produção de enzimas parte de duas fontes: uma formada por tecidos animais e vegetais, de onde podem ser extraídas, purificadas e posteriormente utilizadas; a outra são aquelas obtidas a partir da extração de meios de cultivo microbiológicos, desenvolvidos por técnicas fermentativas. Atualmente, em torno de 2000 enzimas são conhecidas e caracterizadas quimicamente, no entanto, não passam de 20 as que são produzidas e aplicadas em escala industrial. O cultivo de microrganismo para obter enzimas com esta finalidade é uma atividade biotecnológica em constante crescimento (REGULY, 2000). Diversos são os setores que utilizam enzimas, entre eles estão as indústrias de alimentos, química, farmacêutica, entre outras (SCRIBAN, 1985).

Embora a utilização de enzimas na indústria esteja aumentando rapidamente, ainda existe grande campo para expansão. Novas enzimas vão criando oportunidades e, em alguns ramos, sua utilização está apenas começando, como é o caso do uso de enzimas em síntese orgânica (ROBERTS & TURNER, 1998)

Os aspectos biológicos, fisiológicos e a aplicação industrial de enzimas lipolíticas têm sido bastante estudados, onde nos últimos anos as pesquisas envolvendo sua utilização têm sido cada vez mais intensificadas (KOBELITZ & PASTORE, 2004).

#### **4.4.1.3.2. Lipases**

Entre os processos químicos de maior interesse pelas indústrias estão as reações catalisadas por lipases, que representam aproximadamente 20% das biotransformações realizadas atualmente (FABER, 1997).

As lipases (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) são responsáveis pela catalise de reações que envolvem hidrólise e síntese de éster a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeias longas, fazendo com que sejam consideradas como um importante grupo de

biocatalisadores (CASTRO & ANDERSON, 1995). A sua atuação se dá na interface óleo-água (HATZINIKOLAOU *et al*, 1996; CHRISTAKOPOULOS *et al*, 1992).

O potencial biotecnológico das lipase se deve à alta estabilidade em solventes orgânicos, não requerer a presença de cofatores, pela ampla especificidade ao substrato e pela alta enantiosseletividade (CASTRO & ANDERSON, 1995).

#### **4.4.1.3.2.1. Fontes de obtenção**

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Inicialmente, eram obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. Esta descoberta feita por Claude Bernard em 1856 foi anos mais tarde sendo substituída pelo interesse das lipases de origem microbiana devido às dificuldades de acesso ao material de origem animal (HASAN *et al.*, 2006). Atualmente as lipases são produzidas, preferencialmente, a partir de microrganismos devido às facilidades de controle e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução do custo de obtenção. Em geral, os microrganismos mais utilizados para a produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor* e leveduras do gênero *Candida* (SOARES, 2000). Dentre as bactérias produtoras de lipase, destacam-se as *Pseudomonas*, por apresentarem a vantagem de produção extracelular.

Particularmente, as enzimas microbianas são mais estáveis que as extraídas de plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente e segura. As lipases constituem um grupo de enzimas com ampla aplicação biotecnológica, devido à versatilidade de suas propriedades no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e facilidade de produção em massa (HASAN *et al.*, 2006).

Comercialmente as lipases são produzidas por diversas empresas e a partir de diversas fontes, conforme ilustrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Exemplos de lipases comerciais

<b>Classe</b>	<b>Fonte</b>	<b>Nome comercial</b>	<b>Empresa</b>
Fungos	<i>Aspergillus niger</i>	Lipase A	Amaro
		Sunyzyme - NLS	Shinnihon Chemicals
	<i>Rhizopus delemar</i>	Talipase	Amaro
		Lipase D	Amaro
	<i>Rhizopus javanicus</i>	Lipase GC – 20	Amaro
		Lipase F – AP15	Amaro
	<i>Rhizopus japonicus</i>	Lipase Saiken	Osaka Saiken
		Lipase Saiken 100	Nagase
	<i>Rhizopus niveus</i>	Newlase F	Amaro
	<i>Mucor javanicus</i>	Lipase M	Amaro
<i>Mucor miehei</i>	Lipozyme 10.000	Novo Nordisk	
Leveduras	<i>Candida antarctica</i>	SP 526	Novo Nordisk
	<i>Candida cylindracea</i>	Lipase OF 360	Meito Sangyo
	<i>Candida lipolytica</i>	Lipase L	Amaro
	<i>Candida rugosa</i>	Tipo VII	Sigma
		Lipase AY30	Amaro
Bactérias	<i>Achromobactor sp.</i>	Lipase AL	Meito
	<i>Alcaligenes sp.</i>	Lipase PL	Meito
		Lipase QL	Meito
	<i>Arthrobactor ureafaciens</i>	Lipase AU	Shinnihon Chemicals
	<i>Chomobacterium viscosum</i>	Lipase – T01	Toyo Jozo
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Lipase PS	Amaro
		Lipase P	Amaro

Fonte: FURUTANI *et al.* (1997)

#### 4.4.1.3.3. Produção de lipases microbianas

Os processos de produção de lipases microbianas extracelulares, por serem excretadas através da membrana externa para o meio de cultura, são de grande interesse nos estudos de otimização. Também deve-se ter em conta que as condições de cultura podem influenciar nas propriedades da enzima, bem como na produção de lipase intra e extracelular (WOOLEY & PETERSON, 1994).

A composição do meio de cultivo deve fornecer nutrientes necessários ao crescimento do microrganismo, bem como a produção de compostos metabólitos adequados para suprir a energia para biossíntese e manutenção celular (SMIT *et al.*, 1996). Estes compostos incluem carbono e nitrogênio (orgânico e inorgânico), sais, vitaminas e, em alguns casos, indutores de produção de lipase (ALONSO, 2001). Estudos mostram que a presença de substratos lipídicos podem induzir a produção de lipases por diferentes microrganismos (DALMAU *et al.*, 2000).

Apesar da versatilidade dos microrganismos, sensíveis variações nas condições ambientais podem influenciar significativamente o seu desenvolvimento. Fatores como composição do meio, pH, temperatura, aeração, entre outros, são variáveis estritamente controladas em processos de produção de lipase (MAREK & BEDNARSKI, 1996).

Cada microrganismo apresenta um valor de pH ótimo para o crescimento e muitas vezes pode variar para a produção de lipase (GAO *et al.*, 2000). Durante a fermentação podem ocorrer variações no pH do meio, ocasionado pelo desenvolvimento do microrganismo, composição do meio e pelos demais parâmetros do processo de fermentação (ALONSO, 2001).

KANWAR *et al.* (2002) estudaram diferentes tipos de lipídios para a produção de lipase por *Pseudomonas* e encontraram resultados de atividade de até 25U.mL<sup>-1</sup>. Os experimentos foram conduzidos em erlenmeyers de 250 mL sob agitação de 200 rpm, pH 8 e 34 °C.

YANG *et al.* (2007) modificando geneticamente uma cepa de *Pseudomonas cepacia* conseguiram obter atividade lipolítica de 863IU.mL<sup>-1</sup> em 36h de fermentação.

#### **4.4.1.3.3.1. Formas de produção de lipases**

O metabolismo celular do microrganismo, resultado do seu mecanismo enzimático e da rota metabólica que este utiliza para o aproveitamento de carboidratos e gorduras, depende da disponibilidade de oxigênio. Em qualquer caso, os microrganismos obtêm sua energia da oxidação da matéria orgânica, que é fundamentalmente para o processo de desidrogenação. Como a queima é um processo gradual e não uma simples oxidação até CO<sub>2</sub>, cada reação enzimática é catalisada por distintas enzimas em múltiplas etapas. Somente os microrganismos cujo metabolismo seja respiratório, isto é, que conduz até o oxigênio receptor para formar a água, é que obtêm máximo rendimento (REGULY, 1996).

Os processos fermentativos, quanto à quantidade e disponibilidade de água no meio, podem ser classificados em submersos e em estado sólido.

##### **4.4.1.3.3.1.1. Fermentação em estado sólido**

O processo de fermentação em estado sólido (SSF) é conhecido desde a antiguidade nos países Asiáticos (COUTO & SANROMÁN, 2005). Este tipo de fermentação foi comumente definida como o cultivo de microrganismos em uma matriz úmida sólida, ausente de uma fase aquosa macroscópica (água livre), que tem a capacidade de manter a água no material sólido. Esta matriz pode ser composta por substratos naturais, usados como fonte de energia, ou meios inertes com solução nutriente (PANDEY, 2003). Entende-se por água livre a não separação ou escoamento da água da matriz sólida, que deve conter umidade suficiente, na forma adsorvida ou complexada, permitindo o crescimento do microrganismo (COSTA, 1996). O teor de umidade máximo é função do tipo de substrato, ou seja, função das propriedades que o mesmo possui em adsorver água, porém, na maioria dos suportes sólidos, a água torna-se aparente antes do nível de 80% de umidade. Níveis de umidade abaixo de 12% praticamente cessa a atividade biológica (MORAES, 1999).

Apesar da fermentação em estado sólido ser antiga, durante os últimos 20 anos houve um maior interesse pelo seu uso. Porém mesmo com todo o potencial de obtenção de produtos em SSF, atualmente há relativamente poucas aplicações comerciais. Esta situação pode ser atribuída à complexidade do sistema, pois as limitações de

transferência de massa são intrínsecas a escala em que o sistema é submetido (MITCHELL *et al.*, 2003).

#### **4.4.1.3.3.1.2. Fermentação submersa**

Após a segunda guerra mundial a indústria de fermentação passou por um período de grande expansão, devido ao rápido desenvolvimento de métodos para a produção de antibióticos por fermentação submersa. Este tipo de fermentação apresentam grande homogeneidade e, conseqüentemente, eficiente transferência de nutrientes, como por exemplo triglicerídeos (CASTILHO *et al.*, 2000).

A fermentação submersa, que tem como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido com nutriente solúveis, é o processo mais utilizado para a produção de lipase (MARTINS, 2001).

A técnica de fermentação submersa possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros de processo (COUTO & SANROMÁN, 2006). Apesar destas vantagens, a maior probabilidade de contaminação, devido a maior quantidade de água, é um inconveniente deste processo. Quando a enzima é produzida de forma extracelular, obtém-se um extrato diluído, onde se deve inserir uma etapa de concentração (ALONSO, 2001).

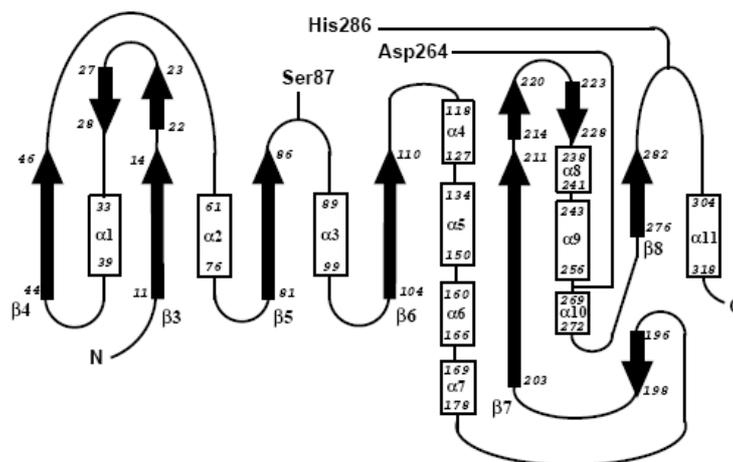
#### **4.4.1.3.4. Aspectos estruturais de lipases**

O interesse pelo estudo das lipases vem aumentando devido à ampla possibilidade de aplicação destas enzimas. As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos de diversas lipases já foram determinadas e depositadas em centros como o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information)

No caso de algumas lipases, como a de *Burkholderia cepacia*, foram cristalizadas na sua conformação aberta (SCHRAG *et al.*, 1997). Estas estruturas, determinada por SCHRAG *et al.* (1997), estão depositadas no Protein Data Bank com o código de

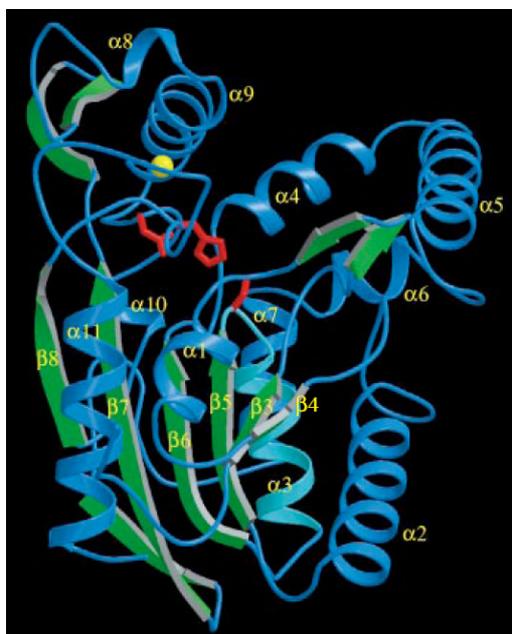
identificação 3LIP. Com tais resultados de cristalografia, foi possível observar que o sítio ativo da lipase de *B. cepacia* fica exposto ao solvente do meio reacional.

As lipases microbianas e até mesmo as dos mamíferos, apresentam em sua estrutura um dobramento característico conhecido como  $\alpha/\beta$  hidrolase, comum a uma grande variedade de outras hidrolases (OLLIS *et al.*, 1992). Estas enzimas são serina hidrolases com a tríade catalítica similar às das proteases serínicas. Especificamente, na lipase de *Burkholderia cepacia*, a tríade é composta pelos resíduos de Ser87, His286 e Asp264, como mostrado na Figura 4 (SCHRAG *et al.*, 1997). Nesta Figura 4 se observa o diagrama esquemático da estrutura, com hélices representadas por retângulos e as fitas  $\beta$  por flechas. Os resíduos do sítio ativo estão destacados nas suas respectivas posições. Na parte central da estrutura, há uma série de folhas  $\beta$  (entre as folhas  $\beta 3$  e  $\beta 8$ ) que estão de acordo com o motivo estrutural de  $\alpha/\beta$  dobramento (OLLIS *et al.*, 1992). Pode-se também observar que as folhas  $\beta$  foram numeradas de acordo com a numeração consensual para o dobramento  $\alpha/\beta$ ; onde, a folha  $\beta 3$  é contada como sendo a primeira.



**Figura 4.** Diagrama esquemático da estrutura da lipase de *Burkholderia cepacia*. **Fonte:** (SCHRAG *et al.*, 1997).

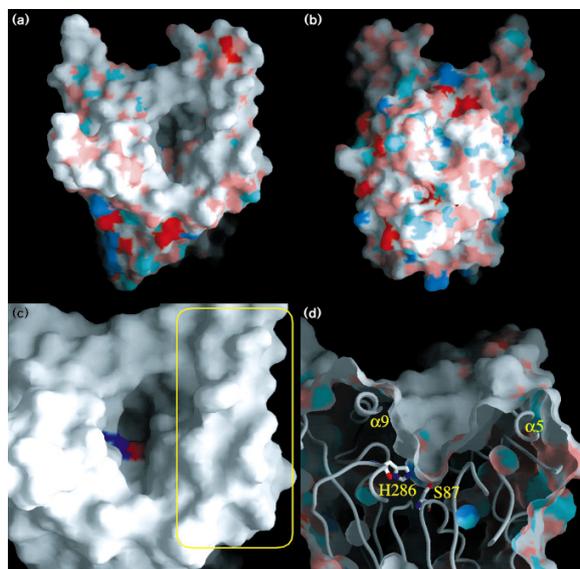
Uma representação na forma de fitas é mostrada na Figura 5. As fitas  $\beta$  estão representadas por flechas verdes e as  $\alpha$ -hélices como espirais azuis.



**Figura 5.** Modelo tridimensional da lipase de *Burkholderia cepacia*. **Fonte:** (SCHRAG *et al.*, 1997).

O íon  $\text{Ca}^{2+}$  no seu sítio de coordenação e as cadeias laterais dos resíduos do sítio ativo são representados pela esfera amarela e pelas estruturas em vermelho, respectivamente. O sítio de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  está coordenado por seis átomos de oxigênio, sendo quatro átomos da proteína e dois de moléculas de água. Acredita-se que este seja um importante sítio para manutenção de algumas ligações peptídicas na conformação *cis*, favorecendo desta forma a manutenção de algumas ligações de hidrogênio (SCHRAG *et al.*, 1997).

A presença de uma série de resíduos hidrofóbicos formando o túnel que cerca o sítio ativo é outra característica marcante na estrutura da lipase. A representação da superfície molecular da proteína é mostrada na Figura 6, as cores foram utilizadas de acordo com a natureza dos átomos. Os oxigênios carregados estão representados pela cor vermelha, oxigênios polares e oxigênios carbonílicos pela cor rosa, nitrogênios por azul e carbonos pela cor branca.



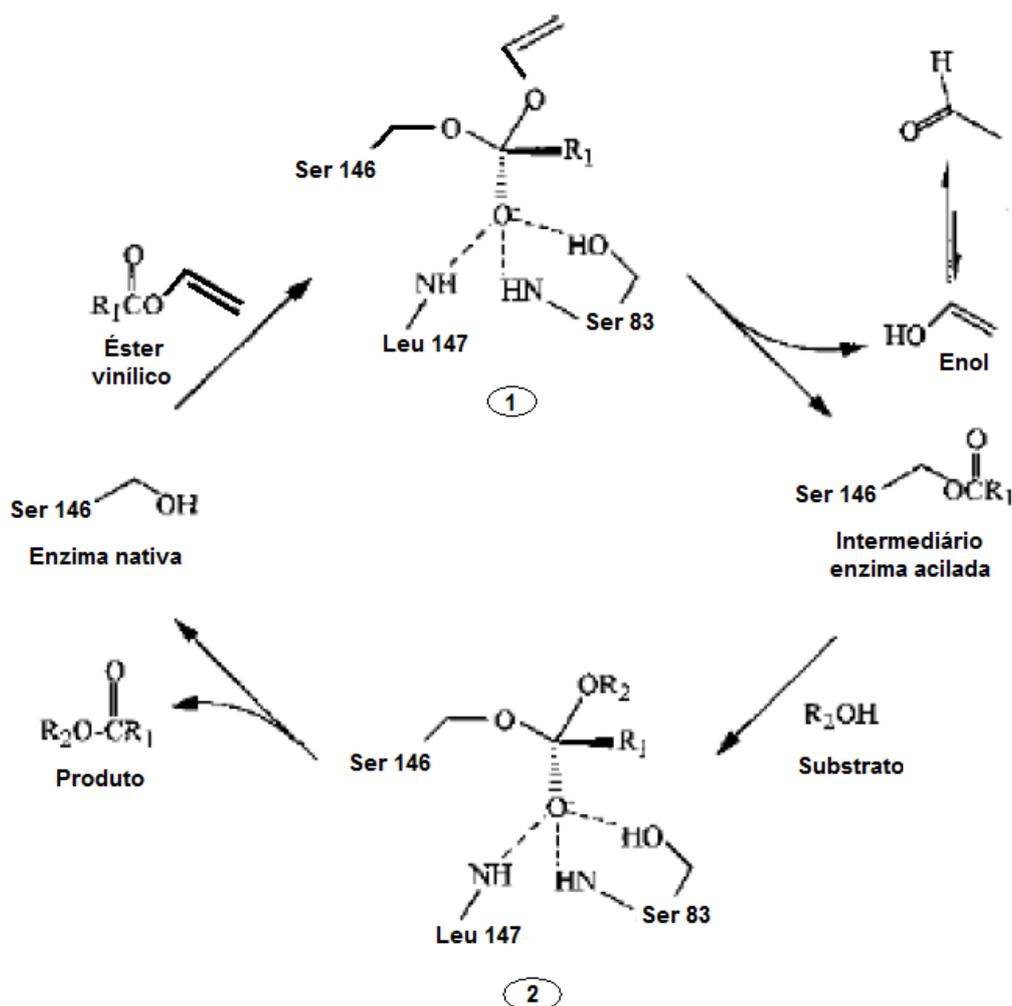
**Figura 6.** Representação da superfície molecular da lipase de *Burkholderia cepacia* na região do sítio ativo. **Fonte:** (SCHRAG *et al.*, 1997).

Na Figura 6a, está representado o sítio ativo visto de cima, a Figura 6b o sítio ativo visto de lado e a Figura 6c, contornado pelo retângulo amarelo, mostra a  $\alpha$ -hélice 5 ou tampa (“lid”) catalítica que cobre o sítio, que é um domínio responsável pela ativação interfacial das lipases (VERGER, 1997). Este fenômeno ocorre devido à mudança conformacional da lipase, quando em contato com a interface água:lipídio. A “lid” interage de forma preferencial com a porção lipídica da mistura, de forma que o sítio ativo fica exposto para reagir com o substrato. Na Figura 6d é mostrado o sítio ativo visto de lado com destaque para os resíduos de Ser<sup>87</sup> e His<sup>286</sup>.

ARPIGNY & JAEGER (1999) publicaram (por similaridade de seqüências de aminoácidos) uma classificação para diferentes lipases bacterianas já seqüenciadas. Grande parte das lipases produzidas por *Pseudomonas* foram classificadas na família I. Todas as lipases da família I.2 são classificadas como lipases verdadeiras, ou seja, aquelas que mostram atividade máxima frente a triacilgliceróis, insolúveis em água.

#### 4.4.1.3.5. Mecanismo de catálise das lipases

As lipases podem atuar como hidrolases em ligações éster de acilgliceróis, liberando conseqüentemente ácidos graxos e glicerol (JAEGER *et al.*, 1994). Um dos modelos proposto para lipase está relacionado com o mecanismo de reação de transesterificação e pode ser observado na Figura 7.



**Figura 7.** Mecanismo catalítico proposto para reação de transesterificação por lipase de *Humicola lanuginosa*. **Fonte:** HOLMQUIST *et al.*, 1995.

A reação pode ser dividida em duas etapas. Na primeira, ocorre durante a transformação do complexo de Michaelis-Menten entre a enzima e o doador acila (espécie intermediária denominada enzima acilada). O enol formado após acilação do resíduo reativo da tríade catalítica é rapidamente transformado em acetaldeído. Com isso, o equilíbrio é deslocado para formação dos produtos, uma vez que ocorre o impedimento da competição nucleofílica entre o álcool formado e o substrato. Na segunda etapa da reação ocorre quando a espécie intermediária enzima-acilada é clivada pelo álcool ( $R_2OH$ ), formando um éster como produto. Nas duas etapas da reação a carga negativa gerada sobre o oxigênio após o ataque nucleofílico é estabilizada através de ligações de hidrogênio pelos resíduos Ser<sup>83</sup> e Leu<sup>147</sup>, que formam o bolsão do oxianion da lipase (LAWSON *et al.*, 1994).

#### 4.4.1.3.6. Purificação de lipases microbianas

A purificação de lipases tem por objetivo a obtenção da enzima pura ou de um produto com maior atividade (que pode ser expressa em unidades de atividade por mg de proteína). Os processos de purificação podem constituir grande parte do preço final do produto (PALEKAR *et al.*, 2000). Uma diversidade de metodologias são empregadas para a purificação de lipases e alguns protocolos para purificação destas enzimas podem ser observadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Métodos de purificação de algumas lipases.

Microrganismo	Método de purificação	R (%)	Referência
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> LP009	Ultrafiltração, Sephadex G-100	74	PRATUANGDEJKUL & DHARMSTHITI, 2000
<i>Bacillus sp 398</i>	Sulfato de amônio 65%; DEAE-Sepharose; Butyl Toyopearl, DEAE-Sepharose	30	KIM <i>et al.</i> , 1994

R = rendimento em atividade.

**Tabela 2.** Métodos de purificação de algumas lipases. (Continuação)

<b>Microrganismo</b>	<b>Método de purificação</b>	<b>R (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>Burkholderia cepacia</i>	Tratamento com acrinol 1%; Ultrafiltração; Macro-Prep metil HIC; Sephacryl S-100 HR	54	SUGIHARA <i>et al.</i> , 1992
<i>Pseudomonas</i> sp.LP7315	Sulfato de amônio 45%, DEAE Toyopearl 650 M, eletroforese preparativa	12	SAKIYAMA <i>et al.</i> , 2001
<i>Staphylococcus aureus</i> 226	Sulfato de amônio 70%, Hidroxiapatita, ultrafiltração, Sephadex G200 e G150	25,3	MURAOKA <i>et al.</i> , 1982
<i>Serratia marcescens</i>	Ultrafiltração, sulfato de amônio 35%, DEAE Toyopearl 650 M, Sephacryl S-300, Phenyl Toyopearl 650 M	20	MATSUMA & SHIBATANI, 1994

R = rendimento em atividade.

Geralmente os processos de separação de lipase envolvem uma primeira etapa de pré-purificação e posteriormente sua purificação por métodos cromatográficos. Na etapa de pré-purificação, agentes precipitantes de proteínas, como o sulfato de amônio, são os mais utilizados, podendo ser aplicadas na seqüência, técnicas de gel filtração. A cromatografia de troca iônica é a técnica mais comum para purificação por métodos cromatográficos. Esta técnica está relacionada com o grau de afinidade da enzima ou dos componentes do extrato com o suporte utilizado, e é também conhecida como imobilização.

Normalmente, para se alcançar rendimentos por volta de 30% e fatores de purificação em torno de 320 vezes, são necessários de quatro a cinco etapas de purificação (GUPTA *et al.*, 2004).

A escolha do método de purificação da lipase é dependente do microrganismo utilizado para sua produção, bem como do tipo de meio, das condições de cultura e das características da enzima. Devido o grande número de variáveis envolvidas, não há um processo de purificação que seja de aplicação geral. Produtos destinados para uso

terapêutico requerem maior grau de pureza e conseqüentemente maior complexidade do processo de purificação. Já o seu uso em biocatálise pode requerer muitas vezes apenas processos parciais de purificação, caso os componentes presentes no extrato enzimático não interfiram na reação e no processo de obtenção dos produtos (KORNBERG, 1990).

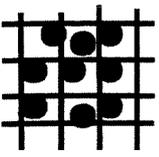
#### 4.4.1.3.7. Imobilização de lipase

Há uma vasta quantidade de trabalhos na literatura que tratam das diferentes técnicas de imobilização de lipases e aplicações em reações que se processam em meios aquosos e não aquosos. Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características, tamanho, forma e densidade, foram estudadas (ARROYO *et al.*, 1999). Desta forma tem-se relatado grande número de resultados referentes à eficiência, estabilidade e atividade destas enzimas (MINOVSKA *et al.*, 2005).

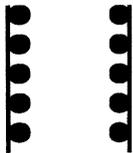
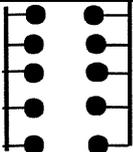
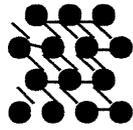
A imobilização de lipase pode ser feita de diversas maneiras. Podem ser microencapsuladas, adsorvidas em materiais insolúveis como as resinas de troca iônica, podem ser copolimerizadas com algum monômero, ligadas à matriz polimérica insolúvel e ainda por ligações covalentes no substrato.

A técnica de imobilização de enzimas pode ser dividida basicamente em quatro métodos, mostrados na Tabela 3 com suas vantagens e desvantagens.

**Tabela 3.** Técnicas de imobilização de enzimas e suas vantagens e desvantagens.

Método	Vantagens	Desvantagens
 <p><b>Aprisionamento</b></p>	<p>Não ocorrem modificações químicas na estrutura da enzima</p>	<p>Limitação de difusão; Pouco efetivo para substratos de alta massa molar; Susceptível à inativação de enzima; Perda contínua da atividade devido à perda de enzimas pelos poros</p>

**Tabela 3.** Técnicas de imobilização de enzimas e suas vantagens e desvantagens. (Continuação)

Método	Vantagens	Desvantagens
 <p><b>Adsorção</b></p>	<p>Apresenta baixo custo</p> <p>Método simples</p> <p>Não ocorrem modificações químicas na estrutura da enzima</p> <p>O suporte pode ser regenerado</p>	<p>A imobilização é superficial</p> <p>Ocorrem mudanças na força iônica, podendo inibir a adsorção</p>
 <p><b>Ligação covalente</b></p>	<p>Normalmente não é afetada pela força iônica, pH e concentração do substrato</p>	<p>Envolve tratamento químico, modificando o sítio ativo da enzima</p> <p>Alto custo</p>
 <p><b>Ligações cruzadas</b></p>	<p>As enzimas são fortemente ligadas, o que dificulta sua perda</p>	<p>Perda da atividade durante o preparo</p> <p>O suporte não pode ser regenerado</p>

Fonte: ATKINSON & MAVITUNA (1983).

Adsorção em suportes hidrofóbicos é uma técnica simples e bastante estudada para imobilização de lipases. Dentre os suportes utilizados destacam-se a celite, celulose, etil-celulose, carvão e polímeros sintético. Com o mesmo propósito, também podem ser utilizado palha de arroz e óxido de alumínio (MINOVSKA *et al.*, 2005).

De acordo com MALCATA *et al.* (1990) e MESSING (1975), os suportes para a imobilização de enzimas podem ser classificados, quanto a sua composição, em orgânicos e inorgânicos (Figura 8). Devido à maior resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e degradação microbiológica, os suportes

inorgânicos apresentam maior potencial de uso a nível industrial. Estes materiais não apresentam modificações na estrutura em ampla faixa de temperatura, pressão e pH.



**Figura 8.** Classificação dos suportes para imobilização de enzima quando a sua composição. **Fonte:** (MESSING, 1975).

Estudos mostram grandes avanços no desempenho de lipases imobilizadas. Isto evidencia que, apesar das várias experiências reportadas na literatura, a imobilização de lipases ainda é um desafio complexo. Uma vez que a extensão da imobilização depende de sua estrutura, método de imobilização e tipo de suporte. Alguns suportes podem proporcionar elevada atividade e estabilidade à enzima, porém limitações de resistência mecânica e de queda de fluxo do substrato os tornam inviáveis para a utilização em alguns tipos de reatores (YAHYA *et al.*, 1998).

A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos de baixa força iônica tem mostrado ser um método simples e eficiente para imobilização, purificação e estabilização destas enzimas (BASTIDA *et al.*, 1998). Em substratos completamente solúveis, as

lipases imobilizadas neste tipo de suporte apresentam elevada atividade comparativamente quando em solução (PALOMO *et al.*, 2002).

Uma das características mais importantes de uma enzima em processos industriais é a sua estabilidade. Com freqüência o aumento da temperatura, requerida por algumas reações para um incremento da produtividade, causa a inativação rápida das enzimas. Ainda que o mecanismo de inativação das enzimas não seja bem conhecido, sabe-se que em sua termoativação apresenta mudanças conformacionais consideráveis. Tendo em vista que o desdobramento é uma característica comum de inativação enzimática, a imobilização também pode atuar aumentando a resistência das enzimas quanto a este fenômeno. (SCRAGG, 2004). Na literatura são relatadas temperaturas, para a síntese de biodiesel utilizando lipase imobilizada, que variam de 25 (SHIEH *et al.*, 2003, NOUREDDINI *et al.*, 2005) a 70°C (KÖSE *et al.*, 2002, SALIS *et al.*, 2005).

#### 4.4.2. Síntese de biodiesel por via enzimática

Neste processo, as lipases são as enzimas utilizadas com a função biológica de catalisar a hidrólise de óleos vegetais e gorduras, com a subsequente liberação dos ácidos graxos, monoglicerídeos, diglicerídeos e glicerol. Também podem catalisar reações de acidólise, aminólise, alcoólise, esterificação e interesterificação (FACIOLI & GONÇALVES, 1998; UOSUKAINEN *et al.*, 1998).

A utilização de lipase na reação de síntese do biodiesel apresenta grande potencial em relação à catálise química convencional devido à facilidade de recuperação do glicerol e de praticamente não requerer tratamento de efluentes líquidos (JANSSEN *et al.*, 1996).

A maioria das lipases utilizadas são de origem microbiana, como *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosa* e *Rhizomucor miehei*. Tais enzimas podem ser obtidas facilmente por fermentação e algumas etapas básicas de purificação (AL-ZUHAIR, 2007). Na Tabela 4, são mostradas algumas lipases utilizadas na síntese de biodiesel em diferentes condições reacionais.

**Tabela 4.** Lipases microbianas utilizadas para a produção de biodiesel

Lipase	Óleo	Álcool	Temperatura ótima (°C)
<i>Novozime 435</i> (*)	Soja	Metanol	
	Soja	Metil acetato	38
	Canola	Metanol	
	Arroz	Metanol	
	Oliva	Metanol	40
	Óleo vegetal	Metanol	
	Resíduo oleoso	Metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, iso-butanol, iso-amílico e n-octanol	
<i>R. delemar</i>	Óleo vegetal	Metanol	
<i>R. miehei</i>	Óleo vegetal	Metanol	
<i>C. rugosa</i>	Resíduo oleoso	Metanol, etanol, 1-propanol, 1-butanol, iso-butanol, iso-amílico e n-octanol	
	Pinhão-Manso	Etanol	
<i>C. lipolytica</i>	Soja	Metanol	
<i>K. oxytoca</i>	Soja	Metanol	
<i>P. camembertii</i>	Soja	Metanol	
<i>P. fluorescens</i>	Soja	Metanol	
	Trioleína	1-propanol	60
	Pinhão-Manso	Etanol	
<i>P. cepacia</i>	Soja	Metanol e etanol	40
	Pinhão-Manso		

(\*) Lipase de *Candida antártica* imobilizada em resina acrílica (obtida comercialmente). **Fonte:** AL-ZUHAIR,

2007

Dentre as pesquisas realizadas para a síntese de biodiesel, verifica-se uma tendência no uso do óleo de soja, lipases imobilizadas e metanol como doador do grupo acila, devido sua elevada hidrofiliçidade (ISO *et al.*, 2001).

Para emprego dos outros alcoóis, como etanol, propanol e butanol, não é necessária a adição de solventes orgânicos no meio reacional, o que viabiliza o processo de obtenção de biodiesel com redução de custos e consumo de energia nas etapas de destilação (ISO *et al.*, 2001). No Brasil, preferencialmente tem sido usado etanol como doador do grupo acila. As vantagens de se utilizar etanol na produção do biodiesel é devido não ser tóxico, ser totalmente biodegradável e produzido em grande escala. Segundo a Renewable Fuels Association, a produção brasileira de etanol foi de 19,02 bilhões de litros e, pela projeção da Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), a produção resultante da moagem da cana de açúcar em 2008 foi cerca de 26,4 bilhões de litros de álcool.

#### **4.4.3. Outras vias de obtenção de biocombustíveis**

##### **4.4.3.1. Pirólise**

A pirólise de gorduras tem sido investigada a mais de 100 anos, especialmente em áreas onde depósitos de petróleo são inexistentes (PIOCH *et al.*, 1993). Este processo refere-se à modificação química do triglicerídeo pela aplicação de energia térmica na presença de ar ou nitrogênio. Muitos investigadores mencionam que a pirólise de triglicerídeos possibilita a formação de produtos com características adequadas para seu uso em motores diesel (GROSSLEY *et al.*, 1962; BILLAUD *et al.*, 1995). A utilização desta técnica com óleos apresentam os níveis aceitáveis de enxofre, água e particulados, porém, os níveis de cinzas, depósitos de carbono e ponto de fugor são bastante elevados (PINTO *et al.*, 2005, SRIVASTAVA & PRASAD, 2000; MA & HANNA, 1999).

A decomposição térmica dos triglicerídeos produz diferentes tipos de compostos, incluindo alcanos, alcenos, alcadienos, ácidos carbonílicos e aromáticos, dependendo da fonte do óleo vegetal decomposto. A pirólise do óleo de soja, por exemplo, contém 79% de carbono e 12% de hidrogênio (SCHWAB *et al.*, 1987).

Estudos realizados por FABBRI *et al.* (2006) demonstram que, no processo de pirólise empregando óleo de soja e metanol, a maioria dos metil ésteres e éster cíclico carbonato de ácido graxo são perdidos da amostra por vaporização térmica. Uma fração pequena destes componentes é degradada termicamente e seus produtos pertencem basicamente a duas classes: uma composta por hidrocarbonetos e outra por metil éster de ácidos carboxílicos alifáticos não saturados. Já em relação aos níveis de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos não foram significativamente diferentes quando comparado aos do biodiesel de metanol.

#### 4.4.3.2. Microemulsificação

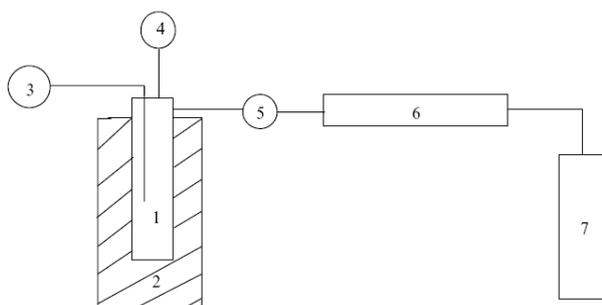
A microemulsão é uma técnica utilizada para resolver problemas de alta viscosidade dos óleos vegetais (SCHWAB *et al.*, 1987; ZIEJEWSKI *et al.*, 1984). Metanol, etanol e butanol são os principais solventes utilizados neste processo. As microemulsões são dispersões termodinamicamente estáveis entre óleo, água e surfactante. Normalmente moléculas anfífilas, denominadas co-surfactantes, podem estar presentes nas microemulsões (SCHWAB *et al.*, 1987). Estudos realizados por ZIEJEWSKI *et al.* (1984) mostram que emulsão preparada com 53,3% (v/v) de óleo de girassol, 13,3% (v/v) de etanol e 33,4% (v/v) de butanol apresentou viscosidade de  $6,31 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s a 40°C, número de cetano de 25, 0,01% de enxofre, 0,01% de ácidos graxos livres e cinzas inferior a 0,01%. A viscosidade obtida foi ainda menor quando se aumentou a concentração de butanol.

Estudos de solubilização micelar de metanol em trioleína e óleo de soja apresentam bons resultados, porém depósitos de carbono e aumento da viscosidade foram observados a nível laboratorial por SCHWAB *et al.* (1987). Apesar das microemulsões apresentarem boas características, a longo prazo podem provocar a decomposição de carbono no motor, combustão incompleta e aumento da viscosidade dos óleos lubrificantes (FELIZARDO, 2003).

#### 4.4.3.3. Fluido supercrítico

O sistema empregando fluido supercrítico é um sistema criado com o objetivo de desenvolver um novo processo de transesterificação de óleos sem o emprego de catalisadores. SAKA & KUSDIANA (2001) mencionam que o processo empregando fluido supercrítico requer tempo de reação reduzido e purificação mais simples por não utilizar catalisador no meio reacional.

Um sistema típico de transesterificação empregando fluido supercrítico é mostrado na Figura 9. As corridas são conduzidas em cilindro, onde a pressão e temperatura são monitoradas simultaneamente.



**Figura 9.** Sistema de transesterificação com fluido supercrítico. 1- Cilindro de alta pressão; 2- Forno elétrico; 3- Monitor de controle de temperatura; 4- Monitor de controle de pressão; 5- Saída de produto; 6- Condensador; 7- Coletor de produto.

MINAMI & SAKA (2006) estudaram o processo de síntese de biodiesel utilizando fluido supercrítico e afirmaram que altos rendimentos podem ser encontrados, comparado com os métodos empregando catalisador básico. Porém, as condições de reação utilizadas são drásticas (350°C e pressões que variam de 20 a 50MPa). Uma hipótese que pode justificar a maior velocidade de reação é que o metanol supercrítico tem natureza hidrofílica com baixa constante dielétrica, dessa forma, os triglicerídeos não polares podem ser bem solvatados, formando um sistema unifásico de metanol/óleo. Além disso, o metanol líquido é um solvente polar e apresenta pontes de hidrogênio entre o OH-

oxigênio e OH-hidrogênio formando “clusters” de metanol, dificultando o acesso do triglicerídeo.

#### 4.5. Variáveis que interferem na transesterificação

A transesterificação pode ser influenciada por diferentes variáveis de processo, afetando significativamente tanto a porcentagem de conversão como o tempo de síntese do óleo em biodiesel.

##### 4.5.1. Efeito do tempo e temperatura de reação

A porcentagem de conversão na reação de transesterificação é influenciada significativamente pelo tempo de reação (MEHER *et al.*, 2006, b). FREEDMAN *et al.* (1984) investigaram a transesterificação de óleo de amendoim, algodão, girassol e soja com razão molar 6:1 (metanol:óleo) e 0.5% de metóxido de sódio a 60°C. Rendimento aproximado de 80% foi encontrado em 1min para os óleos de soja e girassol. Após 1h de reação a conversão dos óleos se manteve entre 93 e 98%.

Estudos envolvendo sebo bovino mostram o efeito do tempo de reação na transesterificação de biodiesel. No primeiro minuto a reação se deu de maneira muito lenta devido à miscibilidade e dispersão do metanol no sebo, porém transcorrido este tempo, a velocidade de reação aumentou significativamente até alcançar máxima conversão em aproximadamente 15min (MA *et al.*, 1999).

Outro fator determinante na velocidade das reações químicas é a temperatura do sistema, sendo esta dependente do óleo utilizado e do tipo de síntese envolvida. FREEDMAN *et al.* (1984) estudaram a transesterificação de óleo refinado e metanol, com razão molar (6:1) e 1% de NaOH. Rendimentos de 94, 87 e 64% foram encontrados em 6min de reação a 60, 45 e 32°C, respectivamente. Em 1h de reação praticamente não houve variação na formação de ésteres, mostrando claramente o efeito da temperatura no rendimento da reação.

#### 4.5.2. Efeito do tipo e razão molar de álcool

Os alcoóis mais freqüentemente empregados na transesterificação de biodiesel são os de cadeia curta, tais como metanol, etanol, propanol e butanol (FERRARI *et al.*, 2005). Estudos realizados por KÖSE *et al.* (2002) demonstraram que a produção de biodiesel por via enzimática com óleo de algodão apresentou melhores resultados utilizando alcoóis primários e secundários.

Devido à reatividade do metanol, este álcool tem sido bastante utilizado na produção do biodiesel. Embora seja mais facilmente produzido que o etanol, atualmente métodos sustentáveis para sua produção não são economicamente viáveis. Além deste fato, o metanol é tóxico e apresenta efeito negativo na biocatálise em comparação a outros alcoóis. Por outro lado, o etanol pode ser facilmente produzido por fermentação a partir de fontes renováveis, o que faz do processo de produção do biodiesel ser totalmente “verde” (AL-ZUHAIR, 2007).

Outra variável importante, que afeta o rendimento de formação dos ésteres, é a razão molar de álcool e triglicérido. A relação estequiométrica na reação de transesterificação são três moles de álcool para um mol de triglicérido com a subsequente formação de três moles de ésteres e um mol de glicerol. Nesta reação de equilíbrio é requerido excesso de álcool para formação dos produtos. Para a máxima conversão em ésteres, TOMASEVIC & MARINKOVIC, (2003) mencionam que deveria ser usada razão molar de 6:1. Porém, altas razões molares de álcool:óleo vegetal podem interferir na separação do glicerol devido o aumento da solubilidade do meio. A presença do glicerol em solução dirige o equilíbrio no sentido contrário à formação dos produtos, abaixando desta forma o rendimento da reação (MEHER *et al.*, 2006a).

Razões molares entre 3:1 e 15:1 foram estudadas por ENCINER *et al.* (2002) utilizando óleo de *Cynara cardunculus* e etanol. O rendimento da reação aumentou com o aumento da razão molar até valor de 12:1. Os melhores resultados foram encontrados entre 9:1 e 12:1. Para razões molares menores que 6:1, a reação foi incompleta e 15:1 ocorreu diminuição do rendimento de ésteres e da separação do glicerol.

#### 4.5.3. Efeito da concentração de água

KOMERS *et al.* (2001) mencionam que na produção de biodiesel os óleo e gorduras devem ser livres de água, pois sua presença pode trazer efeitos negativos na eficiência da catálise básica devido ao consumo do catalisador. A presença de água no meio reacional pode afetar mais a reação que os ácidos graxos livres. Com isso, seu conteúdo deve ser inferior a 0.06% (MA *et al.*, 1998). Estes problemas são principalmente observados com óleos provenientes de rejeitos, pois normalmente apresentam alto conteúdo de água e ácidos graxos livres (TOMASEVIC & MARINKOVIC, 2003).

O efeito do conteúdo de água na produção de biodiesel com lipases de *Rhizopus oryzae* (KAIEDA *et al.*, 1999), *Candida rugosa* e *Pseudomonas fluorescens* (KAIEDA *et al.*, 2001), *Pseudomona cepacia* (NOUREDDINI *et al.*, 2005) e Novozym 435 (SHIMADA *et al.*, 1999) tem mostrado que a diminuição do conteúdo de água interfere de forma negativa na atividade da enzima. Porém, a atividade enzimática diminui gradativamente com o aumento do conteúdo de água no meio reacional. A partir da sua concentração ótima, resultados semelhantes foram encontrados para a produção de biodiesel com trioleína utilizando lipase imobilizada de *P. fluorescens*. O autor também mostra a capacidade da lipase de *R. meihei* manter sua atividade com níveis de até 20% de água. Isso mostra a necessidade de uma quantidade adequada de água para ativação da enzima.

A metanólise do óleo de soja com lipases não regioesletiva e 1(3)-regioespecífica em sistema aquoso foram estudadas por KAIEDA *et al.* (2001). As lipases não regioespecíficas de *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* e *Pseudomonas fluorescens* mostraram elevada atividade catalítica na presença de 4 a 30% de água no sistema reacional.

O efeito da água na atividade da lipase é devido ao fato destas enzimas atuarem na interface entre as fases aquosas e orgânicas. A ativação da enzima envolve a reestruturação do sítio ativo na mudança conformacional da molécula, o que requer a presença de água na interface com o óleo.

A adição de água até determinado limite faz com que parte desta fique disponível para óleo, formando gotículas de óleo-água, aumentando a área interfacial disponível para reação.

O excesso de água atua favorecendo a reação de hidrólise, mostrando que o conteúdo ótimo de água é importante para se estabelecer o mínimo de hidrólise e a máxima atividade na reação de transesterificação (AL-ZUHAIR, 2007).

#### 4.5.4. Efeito do tipo de catalisador

Segundo MA & HANNA (1999) os catalisadores na transesterificação podem ser classificados em:

- Alcalinos: Hidróxido de sódio, Hidróxido de potássio, carbonatos e alcoóxidos como metóxido, etóxido, propóxido e butóxido de sódio.
- Ácidos: sulfúrico, fosfórico, clorídrico e ácidos orgânicos à base de enxofre;
- Enzimáticos ou heterogêneos: As enzimas utilizadas neste tipo de reação são as lipases. Sua obtenção pode ser feita a partir de plantas, animais e microrganismos.

Os catalisadores químicos mais usados são os alquilatos metálicos (metóxido ou etóxido de sódio), seguidos dos metais sódio, liga de sódio-potássio e hidróxidos de sódio ou potássio (ROZENAAL, 1992).

O metóxido de sódio tem sido usado de forma mais efetiva que o hidróxido de sódio, provavelmente devido a pequena quantidade de água produzida pela mistura de NaOH e MeOH (FREEDMAN *et al.*, 1984). ALCANTARA *et al.* (2000) em experimentos realizados com gordura animal, óleos de feijão e resíduo de fritura encontraram resultados satisfatórios com este catalisador, porém o seu uso proporciona a formação de vários subprodutos, principalmente sais de sódio. Outra desvantagem do uso deste catalisador é que o óleo deve ser de boa qualidade (AHN *et al.*, 1995).

Devido o baixo custo dos hidróxidos de sódio e potássio, estes catalisadores tem sido bastante utilizados na produção do biodiesel. Ambos catalisadores foram utilizados por TOMASEVIC & MARINKOVIC (2003) em concentrações de 0.4 a 2% w/w de óleo.

Óleos refinados com 1% hidróxido de sódio e potássio resultou em boa taxa de conversão, porém os melhores resultados foram encontrados com óleo de soja e hidróxido de potássio em concentração de 1%.

Atividades catalíticas com óxido de magnésio, hidróxido de cálcio, óxido de cálcio, metóxido de cálcio e hidróxido de bário foram realizadas por GRYGLEWICZ (1999) para efeito de comparação com o hidróxido de sódio durante a transesterificação de óleo de colza. Em todos os experimentos o hidróxido de sódio apresentou os melhores resultados de atividade catalítica.

Outro tipo de catalisador que vem sendo muito estudado, devido sua boa eficiência em condições brandas de reação, são as lipases.

A maioria das lipases usadas como catalisadores na síntese orgânica são de origem microbiana, dentre elas de *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, entre outras (AL-ZUHAIR, 2007).

As lipases podem efetivamente atuar na reação de transesterificação de triglicerídeos em sistemas aquosos ou não-aquosos (FUDUKA *et al.*, 2001), evitando problemas de formação de subprodutos, recuperação do glicerol e também a conversão de ácidos graxos livres em ésteres. Por outro lado, uma desvantagem deste catalisador é o seu custo significativamente maior em relação os catalisadores alcalinos (MEHER *et al.*, 2006, b).

#### 4.5.5. Efeito da adição de co-solvente

MEHER *et al.* (2006, b) mencionam que o uso do metóxido na catalise de metil éster com óleo de soja apresenta leve aumento na formação dos ésteres a 40°C e razão molar 6:1 (metanol-óleo), quando comparados com os resultados utilizando butanol a 30°C. A baixa razão molar de óleo em metanol faz com que a taxa de reação seja lenta durante o início da reação. Os monoglicerídeos permanecem preferencialmente na fase com metanol, reagindo posteriormente, segundo uma cinética de segunda ordem. Para que a reação seja administrada em uma única fase, co-solventes como tetrahidrofurano, 1,4-dioxano e dietil éter foram testados. Razão molar de 6:1 (metanol-óleo) com adição de

1,25 volume de tetrahidrofurano por volume de metanol produziu uma fase predominante na qual o sistema reage tão rápido quanto com butanol.

Em outro processo de metanolise e etanolise de ácidos graxos provenientes de óleos e gorduras, a solubilização do álcool foi feita pela adição de co-solvente para formação de uma única fase. Os processos aconteceram em menos de 20min a temperatura ambiente, pressão atmosférica e sem agitação. O co-solvente atuou aumentando o taxa de reação, fazendo com que o óleo reagisse rapidamente com os alcoóis (BOOCOOCK, 1996).

LARA (2004) e SOUMANOU (2003) obtiveram alta atividade enzimática na presença de solventes orgânicos relativamente hidrofóbicos, como n-hexano e éter de petróleo. O metanol e o glicerol por apresentarem baixa solubilidade nestes solventes geraram efeitos negativos na atividade e estabilidade da lipase, devido estes não poder ser eliminados do meio reacional (DOSSAT, 1999). Para evitar este problema o *ter*-butanol pode ser utilizado para solubilizar o metanol e glicerol, eliminado totalmente o efeito negativo destes no meio reacional (DU *et al.*, 2005).

#### **4.5.6. Efeito dos ácidos graxos livres**

O conteúdo de ácido graxo é um dos parâmetros fundamentais para determinar a viabilidade do processo de transesterificação de óleos vegetais. Na catálise básica o teor de ácido graxo deve ser inferior a 3%, pois valores mais altos podem atuar diminuindo a eficiência de conversão em biodiesel (DORADO *et al.*, 2002).

Grande número de trabalhos vem sendo desenvolvidos a partir de rejeitos oleosos, devido seu baixo custo. O problema associado ao processamento destes óleos é a alta quantidade de ácidos graxos livres que normalmente apresentam. Uma das alternativas para este problema é o emprego de processo com dois estágios, onde inicialmente os ácidos graxos podem ser convertidos a ésteres por tratamento ácido e posteriormente a reação se completaria por transesterificação alcalina (CANAKCI & GERPEN, 2001).

Experimentos realizados por MA *et al.* (1998) mostram que a produção de biodiesel a partir de gordura bovina e óleos vegetais com alto teor de ácido graxo livre

devem passar primeiro por processo de refino com solução de NaOH. O excesso de NaOH compensaria o alto teor de ácidos graxos dos óleos, porém a formação de sabões resultaria num aumento da viscosidade ou na formação de géis, interferindo na reação e na separação do glicerol (FREEDMAN *et al.*, 1984).

Na reação de transesterificação com lipase os ácidos graxos livres presentes no óleo podem ser convertidos em biodiesel sem o subsequente tratamento do efluente. O uso destas enzimas na produção de biodiesel tem se mostrado como proposta promissora para minimizar os problemas associados à catálise química (JANSSEN *et al.*, 1996).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Microrganismos e manutenção

#### 5.1.1. Fermentação submersa

Os microrganismos utilizados para os experimentos em fermentação submersa foram as cepas *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 (CCT 0593), CCT 1145 (CIP 82.40) e ATCC 10856 (CCT 5307), adquiridos da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello; as cepas de *Bacillus subtilis* NRRL 744 sem e com mutação utilizando irradiação Ultravioleta por 1min, *Bacillus subtilis* NRRL 41044 isolado com estreptomicina, *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, *Bacillus licheniformis* e uma cepa de levedura não identificada, adquiridos no Laboratório de Microbiologia da Unicamp. Com exceção do *Bacillus licheniformis*, as cepas foram mantidas a 4°C em tubos de ensaio, com ágar nutriente pH 7,0. O meio de manutenção para o *B. licheniformis* continha 10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl, 5g de glicose, 15g de ágar e 1L de água destilada. O pH do meio foi ajustado a 7,0.

#### 5.1.2. Fermentação semi-sólida

Os microrganismos utilizados na fermentação semi-sólida foram as cepas de *Aspergillus fumigatus* NRRL 164 e NRRL 166 obtidas da United States Department of Agriculture – Research, Education and Economics Agricultural Research Service e uma cepa de *Aspergillus* não identificada. Os tubos de ensaio contendo os microrganismos foram mantidos a 4°C com ágar batata-dextrose (PDA).

### 5.2. Preparo do inóculo para fermentação

#### 5.2.1. Fermentação submersa

A partir dos tubos de ensaio com ágar inclinado, foi feita a raspagem do microrganismo com alça de platina e transferido para erlenmeyers de 125mL, contendo 5g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 5g.L<sup>-1</sup> peptona e 3% de óleo de soja para propagação do

microrganismo. Os erlenmeyers foram incubados a 30°C e 150rpm por 48h. Após este período a suspensão foi transferida assepticamente para os fermentadores.

Em 100mL de meio de adaptação para *B. licheniformis* havia 0,3g de extrato de carne, 0,5g de peptona, 0,9g de NaCl, 0,25g de tributirina e 0,0001g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O.

### **5.2.2. Fermentação semi-sólida**

A partir de tubos de ensaio contendo os fungos, foi feita a raspagem dos esporos com 5mL de Tween 80 0,2%, onde 0,5mL da suspensão de esporos foi transferida para frascos de Roux para espalhamento contendo ágar PDA

Os frascos de Roux foram incubados a 30°C durante 6 dias, visando o recobrimento completo da superfície e a esporulação total dos microrganismos. Após este período, foi feita a raspagem dos esporos, obtendo uma suspensão que foi utilizada como inóculo para as fermentações.

## **5.3. Fermentação**

### **5.3.1. Fermentação submersa**

#### **5.3.1.1. Fermentação em reatores tipo erlenmeyers**

As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers com capacidade de 125mL, mantidas a 30°C, sob agitação de 150rpm. As soluções nutritivas utilizadas para cada cepa é mostrada na Tabela 5.

**Tabela 5.** Microrganismos utilizados para produção de lipase em fermentação submersa.

<b>Microrganismo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Solução nutriente</b>
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 25416	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	CCT 1145	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 10856	1
<i>Zymomonas mobilis</i>	-	1
<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL 744	1
<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL 744*	1
<i>Bacillus subtilis</i>	NRRL 41044**	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	-	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 7754	3
<i>Levedura</i>	Não identificada	3

\* Cepa mutada com irradiação ultravioleta por 1min; \*\* Cepa isolada com antibiótico ( $500\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  de estreptomicina); **1:**  $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de peptona,  $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura e 3% de óleo de soja; **2:**  $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $5\text{g/L}$  de peptona,  $5\text{g/L}$  de NaCl, 0,05% de  $\text{CaCl}_2$  e 1% de óleo de soja; **3:**  $0,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de peptona,  $0,3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura e 1% de óleo de soja.

Experimentos feitos para estudar melhores condições de produção também foram conduzidos na presença de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , diferentes pHs, concentrações de óleo de soja e água de maceração de milho. As condições estabelecidas estão mostradas no decorrer do trabalho.

### 5.3.2. Fermentação semi-sólida

Esta fermentação foi conduzida utilizando 50g de meio de cultivo em reatores tipo erlenmeyers de 250mL, durante 144h de fermentação a  $30^\circ\text{C}$ . Para cada grama de meio de cultivo foi adicionado 0,35mL de solução nutriente composta de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

<sup>1</sup>),  $\text{NaNO}_3$  ( $3,0\text{g.L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1,0\text{g.L}^{-1}$ ), extrato de levedura ( $1,0\text{g.L}^{-1}$ ) e peptona ( $0,3\text{g.L}^{-1}$ ). A umidade do meio de cultivo foi corrigida para 55%.

Para cada microrganismo foram avaliados três diferentes tipos de farelos (Tyler em torno de 40) com 3% de óleo de soja. Na Tabela 6 são mostradas as cepas de *Aspergillus*, bem como as proporções de casca de arroz e farelo, utilizados na produção de lipase pelo processo de fermentação semi-sólida.

**Tabela 6.** Variáveis utilizadas no estudo da produção de lipase por *Aspergillus*.

Cepas utilizadas	Proporção casca:farelo (w:w)
<i>A. fumigatus</i> NRRL 164	22:110 <sup>*</sup>
<i>A. fumigatus</i> NRRL 166	22:80 <sup>**</sup>
<i>Aspergillus</i> não identificado	15:85 <sup>***</sup>

\* Proporção de casca de arroz e farelo de trigo; \*\* Proporção de casca de arroz e farelo de soja; \*\*\* Proporção de casca de arroz e farelo de arroz.

A produção de lipase pelos microrganismos mencionados nos itens 5.3.1.1 e 5.3.2 foi determinada a partir do extrato enzimático bruto segundo as metodologias de atividade hidrolítica (item 5.7) e de transesterificação (item 5.12.1 sem adição de tampão).

#### 5.4. Estudo da produção de lipase por *Burkholderia cepacia*

Primeiramente para estabelecer algumas condições de cultivo, bem como conhecer alguns comportamentos de produção de lipase pela cepa de *Burkholderia cepacia*, foi proposto um planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  com triplicata no ponto central, mais os pontos axiais. Apesar do tempo de fermentação ser um parâmetro não utilizado como variável de um planejamento experimental optou-se por usá-lo para estabelecer posteriormente um tempo fixo de fermentação. Outra variável do planejamento foi a concentração de óleo de soja no meio de cultivo para induzir a

produção da lipase. A matriz codificada do planejamento bem com seus níveis de variação são mostrados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

**Tabela 7.** Matriz codificada do planejamento experimental completo  $2^2$  com triplicata no ponto central mais os pontos axiais.

Experimento	[OS]	TF
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	-1,4142	0
9	0	1,4142
10	1,4142	0
11	0	-1,4142

[OS]: Concentração de óleo de soja; TF: Tempo de fermentação.

**Tabela 8.** Níveis de variação utilizados no planejamento experimental completo  $2^2$  com triplicata no ponto central mais os pontos axiais.

Variável	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
Tempo (h)	38,06	48,00	72,00	96,00	105,94
Óleo (%)	1,46	2,50	5,00	7,50	8,54

Os cultivos foram conduzidos em erlenmeyers, mantidos a 30°C e 150 rpm. Estabelecida algumas condições de cultivo, esta etapa do trabalho visou aumentar a produção da lipase pela cepa de *Burkholderia cepacia*. Foi utilizado um planejamento experimental fatorial fracionário  $2^{4-1}$  tendo como variáveis o pH e as concentrações de

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e óleo de soja no meio de cultivo. Na Tabela 9 é mostrado os níveis de variação utilizados no planejamento.

**Tabela 9.** Níveis de variação utilizados no planejamento experimental fracionário 2<sup>4-1</sup> com triplicata no ponto central para a produção de lipase por *Burkholderia cepacia*.

Variável	Níveis		
	-1	0	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g/L	3g/L	4g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g/L	0,15g/L	0,2g/L
Óleo de soja	5%	7,50%	10%
pH	7,00	7,25	7,50

Outros dois planejamentos experimentais fatoriais completos 2<sup>3</sup> com triplicata no ponto central também foram utilizados com o intuito de aumentar a produção e minimizar custos na produção. As matrizes dos planejamentos são mostradas nas Tabelas 10 e 11.

**Tabela 10.** Matriz do planejamento experimental fatorial  $2^3$  com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase utilizando água de maceração de milho como substrato de crescimento de *Burkholderia cepacia*.

Água maceração milho (mL)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g.L <sup>-1</sup> )	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g.L <sup>-1</sup> )
2,75	5	0,3
0,55	5	0,3
2,75	3	0,3
0,55	3	0,3
2,75	5	0,1
0,55	5	0,1
2,75	3	0,1
0,55	3	0,1
1,38	4	0,2
1,38	4	0,2
1,38	4	0,2

**Tabela 11.** Matriz do planejamento experimental fatorial  $2^3$  com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase utilizando peptona e extrato de levedura como substrato de crescimento de *Burkholderia cepacia*.

Óleo de soja	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
(mL)	(g.L <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )
3,85	5	0,3
1,65	5	0,3
3,85	3	0,3
1,65	3	0,3
3,85	5	0,1
1,65	5	0,1
3,85	3	0,1
1,65	3	0,1
2,75	4	0,2
2,75	4	0,2
2,75	4	0,2

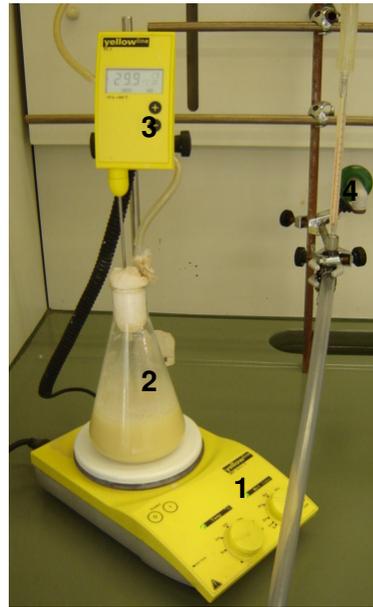
As fermentações foram conduzidas sob agitação em shaker Marconi MA 830 a 150rpm e 30°C durante 96h de fermentação.

### 5.5. Estudo da produção de lipase de *Burkholderia cepacia* em diferentes reatores

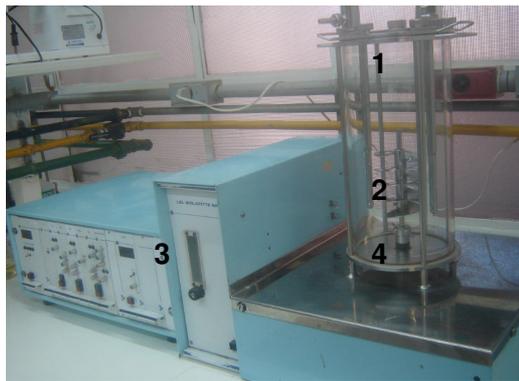
Dentre os reatores utilizados para avaliar o seu efeito na produção de lipase pela *Burkholderia cepacia* foram estudados reatores tipo erlenmeyers (Figura 10a) sem aeração e agitados em shaker Marconi MA 830 e com sistema de aeração (Figura 10b), LSL biolafitte SA (Figura 10c) e New Brunswick Scientific Bioflo III (Figura 10d).



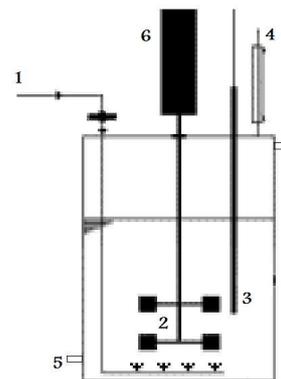
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 10.** (a) Reator tipo frasco erlenmeyers sem aeração; (b) Reator tipo erlenmeyers com sistema de aeração controlada. 1: Placa de aquecimento; 2: Reator; 3: Sistema de controle de temperatura; 4: Rotâmetro; (c) Reator Biolafitte. 1: Reator; 2: Sistema de agitação de rosca helicoidal; 3: Rotâmetro; 4: Orifícios para aeração do meio; (d) Representação do sistema de fermentação utilizado para a produção de lipase em Bioflo III. 1: Fornecimento de ar; 2: Agitador; 3: Termostato; 4: Condensador; 5: Controle de temperatura por circulação de água; 6: Motor.

A solução nutritiva, utilizada para as fermentações foi composta por peptona 5g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5g.L<sup>-1</sup> e 5% (v/v) de óleo de soja. As condições utilizadas nas fermentações são mostradas na Tabela 12.

**Tabela 12.** Condições de temperatura, aeração e agitação utilizadas nos diferentes reatores utilizados para a produção de lipase por *Burkholderia cepacia*.

Reator	Parâmetro		
	Temperatura (°C)	Aeração (vvm)	Agitação (rpm)
Erlenmeyers sem aeração	30	-	150
Erlenmeyers com aeração	30	1	-
Biolafitte	30	1	150
Bioflo	30	1	150

### 5.6. Extração da lipase

A enzima foi separada do meio de fermentação submersa por centrifugação a 1372 g durante 15min, visando a obtenção de lipase extracelular.

No meio de fermentação semi-sólida, a extração da lipase foi feita utilizando tampão fosfato 50mM pH 7,0 adicionado na proporção de 10mL para 1g de meio fermentado. Depois de adicionado o tampão, as amostras foram submetidas à agitação em shaker a 150rpm e 37°C por 30 min. A seguir, as amostras foram filtradas a vácuo em funil de Büchner, obtendo-se o extrato para a avaliação da atividade lipolítica.

### 5.7. Atividade enzimática

O sobrenadante proveniente da extração da lipase foi utilizado como extrato enzimático para análise de Atividade Lipolítica. O método descrito por MACÊDO *et al.*, (1997) foi utilizado com algumas modificações, utilizando emulsão de óleo de oliva e

solução de goma arábica 7% em proporção de 25:75 (v:v), respectivamente. A mistura reacional composta de 5mL de emulsão, 2mL de tampão fosfato 10mM pH 8,0 e 1mL de extrato enzimático foi mantida em shaker a 150rpm e 37°C durante 30min. Os ácidos graxos presentes na emulsão no tempo 0min (branco) e os liberados durante a reação foram titulados com solução de NaOH 0,05N. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de ácido graxo por minuto. Os cálculos de atividade lipolítica foram determinados de acordo com a Equação 2.

$$AL = \frac{(Vt_{30'} - Vt_{0'}) * 1000 * F_d * N_{NaOH}}{t} \quad (2)$$

Onde:

AL = atividade lipolítica (U/mL);

Vt<sub>30'</sub> = Volume de NaOH após 30min de reação;

Vt<sub>0'</sub> = Volume de NaOH no tempo 0min de reação;

N<sub>NaOH</sub> = Normalidade do NaOH;

t = Tempo total de reação;

F<sub>d</sub> = Fator de diluição;

## 5.8. Caracterização físico-química da lipase

### 5.8.1. Efeito da temperatura na atividade da lipase

Para determinação da temperatura ótima de atividade da lipase foi estudada a faixa de 25 a 50°C. A metodologia utilizada para determinação da atividade foi a mesma descrita no item 5.7.

### **5.8.2. Efeito do pH na atividade da lipase**

A determinação do pH ótimo de atividade da lipase foi estudado na faixa entre 3 e 11, com solução tampão 10mM, onde a medida da atividade lipolítica foi feita de acordo com a metodologia descrita no item 5.7.

### **5.8.3. Efeito da temperatura na estabilidade da lipase**

Os testes de estabilidade térmica foram feitos em banho-maria para aumentar a eficiência de troca térmica. As temperaturas estudadas foram 40, 50 e 60°C coletando amostras nos tempos 0, 15, 30, 60, 120min de exposição. A metodologia descrita no item 5.7 foi utilizada para avaliação da atividade lipolítica após o tempo de exposição.

O tempo de meia vida da lipase foi determinado considerando que a atividade da enzima, após o tempo de exposição, era a metade da concentração inicial. A partir destes resultados foi calculado o valor de  $k_d$  (constante de inativação térmica) para cada condição utilizada.

### **5.8.4. Efeito do pH na estabilidade da lipase**

Os testes de estabilidade frente ao pH foram feitos com tampões (0,1N) e pHs de pré-incubação 5, 8 e 11. As amostras foram coletadas entre 0 e 240min de exposição. Após a coleta foi determinada a atividade lipolítica de acordo com a metodologia descrita no item 5.7, porém com tampão fosfato pH 8,0 (0,11N).

### **5.8.5. Eletroforese SDS – PAGE e focalização isoeétrica (Isoelectric Focusing – IEF)**

As amostras de lipase foram purificadas em sistema bifásico aquoso (SBA) PEG/sal. Primeiramente foi construído um diagrama de equilíbrio de fases para caracterizar os sistemas bifásicos aquosos que conteve diferentes concentrações de PEG e dos sais fosfato de potássio monobásico e di-básico (necessário à composição e

formação das fases em equilíbrio, bem como a previsão qualitativa da partição da enzima).

A partir da caracterização dos sistemas foi possível obter linhas de amarração para purificação da lipase. A construção dos diagramas de fases se deu utilizando diferentes proporções de PEG e sal (solução salina a 20% foi gotejada lentamente a temperatura ambiente em solução de PEG até atingir a turbidez).

As diferentes composições permitiram a construção da curva binodal do sistema. Os pontos que deram origem às linhas de amarração (tie-lines) foram obtidos para pH 6,0 e a partir da massa em tubos graduados com 15 mL de solução concentrada de PEG (50% p/p) e sal (20% p/p) foi possível a formação de duas fases de igual volume, na qual a lipase foi purificada através da sua migração para fase inferior.

Após a pré purificação da lipase foi feita análise de eletroforese SDS-PAGE, em Mini Protean III (BioRad, EUA) utilizando gel de poliacrilamida, conforme protocolo apresentado por LAEMMLI (1970). Concentração de 7,5% foi utilizada para as amostras tratadas com tampões contendo SDS em condições desnaturantes e redutoras (com a presença de  $\beta$ -mercaptoetanol). A desnaturação das amostras foi conduzida por aquecimento a 100 °C por 10 min. Alíquotas de 15  $\mu$ L de cada amostra e 5  $\mu$ L de marcador (baixa massa molecular) foram aplicadas nos géis de 7,5%. Estes géis foram submetidos a uma voltagem de 180 V, em cuba vertical. O marcador continha: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa),  $\alpha$ -lactalbumina (14,4 kDa). Os kits foram adquiridos da GE Healthcare (EUA). Para a eletroforese de focalização isoelétrica (*Isoelectric Focusing* - IEF) foi usado PhastSystem (Pharmacia, Sweden) a 410Vh e géis gradientes de acrilamida na concentração de 5% e pH entre 3 e 9, de acordo com o método descrito pelo fabricante. Em ambas as técnicas, a coloração dos géis foi feita com nitrato de prata, de acordo com MORRISSEY (1981).

### 5.9. Caracterização da resina para imobilização

Somente as resinas hidrofóbicas foram caracterizadas, visto que estas foram fabricadas laboratorialmente em parceria com a Faculdade de Ciências Químicas da Universidade de Salamanca na Espanha.

As características estruturais das micropartículas foram determinadas através de isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77K com Micromeritics Gemini V2380.

As superfícies específicas das micropartículas foram calculadas a partir das isotermas de adsorção de nitrogênio, segundo a metodologia Brunauer-Emmet-Teller (BET) de BRUNAUER *et al.* (1938). Posteriormente estes resultados foram utilizados para calcular o volume de microporo de acordo com a metodologia de LIPPENS & BÔER (1965). A distribuição do tamanho de poro, dos volumes de macroporos e mesoporos foi feita segundo a metodologia Barret-Joyner-Halenda (BJH) de BARRET *et al.* (1951). A classificação dos poros foi feita segundo a metodologia de SING *et al.* (1985) de acordo com o proposto pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC).

- Microporos: diâmetro de até 20Å;
- Mesoporos: diâmetro entre 20 e 500Å;
- Macroporos: diâmetro acima de 500 Å.

### 5.10. Efeito do tratamento preliminar das resinas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) na adsorção de lipase

Visto que as resinas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) sem tratamento prévio de ativação impossibilita uma adsorção eficiente de lipase, foram testados diferentes solventes, dentre eles hexano, n-heptano, metanol e água. Soluções enzimática, aquosa e orgânica (n-heptano), também foram testadas para avaliar a influência na ativação da resina.

As resinas foram pesadas (0,15g) e colocadas em seringas adaptadas na saída de funis de separação. As extremidades das seringas foram tampadas com lã de vidro para impedir a perda das micropartículas. Os solventes foram transferidos para os funis de

separação e submetidos a gotejamento lento por 6 horas. Após percorrido este tempo, as resinas foram transferidas para tubos de ensaio com capacidade para 10mL nos quais foram adicionados 5mL de solução enzimática (0,05g de lipase comercial de *Burkholderia cepacia* – 46U.mg<sup>-1</sup> – para cada 50mL de água deionizada). A imobilização da lipase foi conduzida em homogeneizador Phoenix AP 22 a 20rpm durante 12h e temperatura ambiente. Uma vez terminado o processo de imobilização o sobrenadante foi submetido à análise de atividade lipolítica descrita no item 5.7 para observar o grau de imobilização nas resinas com 25, 35 e 45% de DVB.

### 5.11. Imobilização

Na etapa de imobilização, foram testadas diferentes resinas hidrofóbicas e de troca iônica, avaliando a porcentagem de enzima imobilizada e sua atividade de transesterificação com óleo de soja em etanol. As resinas testadas são mostradas na Tabela 13.

**Tabela 13.** Resinas utilizadas nos testes de imobilização da lipase

Resinas			
Hidrofóbicas			Troca iônica
Macroporosas de poli(estireno-co-divinilbenzeno)			Amberlite IRA-900
<b>Diâmetro (Tyler)</b>	<b>DVB</b>	<b>Fm</b>	Amberlite IRC-50
150<d<200	25%	0,50	Ion Exchange Resins (C-106)
150<d<200	35%	0,55	Ionenaustauscher I
150<d<200	45%	0,50	Ionenaustauscher III

**DVB** = Concentração da mistura monomérica ou grau de entrelaçamento; **Fm** = Fração monomérica na fase orgânica.

A imobilização com as diferentes resinas foram conduzidas em tubos de ensaio de 10mL utilizando 5mL de solução enzimática (0,05g de lipase comercial de *Burkholderia*

*cepacia* – 46U.mg<sup>-1</sup> – para cada 50mL de água deionizada) sob agitação de 20rpm (agitador Phoenix AP 22) a temperatura ambiente. Massas de 0,15g foram pesadas para avaliar o grau de imobilização nas resinas hidrofóbicas e Amberlite IRA-900, já as demais resinas foram avaliadas com 2,0g de partículas. Tempos de 40min e 3h também foram utilizados para averiguar o grau de imobilização das resinas de troca iônica.

Um planejamento experimental fatorial completo foi elaborado para estudar o comportamento de imobilização das resinas Ionenaustauscher I e Ionenaustauscher III com extrato enzimático bruto (1,4U.mL<sup>-1</sup>). As variáveis de estudo foram a proporção das resinas e a razão de resina:extrato enzimático. A matriz do planejamento experimental é mostrada na Tabela 14.

**Tabela 14.** Matriz do planejamento experimental fatorial completo com triplicata no ponto central para avaliar o grau de imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* presente no extrato bruto.

Experimento	Resina	Razão resina:extrato
		enzimático
1	R1	2:45
2	R2	2:45
3	R1	2:15
4	R2	2:15
5	R1:R2	2:30
6	R1:R2	2:30
7	R1:R2	2:30

R1: Ionenaustauscher III; R2: Ionenaustauscher I; R1:R2: Resinas Ionenaustauscher III e Ionenaustauscher I na proporção de 1:1; Razão resina:extrato enzimático: Proporção de resina e extrato enzimático (gramas de resina por volume de extrato enzimático em mililitros)

## 5.12. Reação de transesterificação

### 5.12.1. Efeito do pH e da concentração de água na reação de transesterificação com lipase livre de *Burkholderia cepacia*

Tubos de ensaio de 25mL foram utilizados para reação de 5,0mL de óleo de soja e 1,50mL de etanol na presença de 1,5mL de extrato enzimático bruto com atividade  $1,4\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Os experimentos foram mantidos a  $40^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 20rpm. Volume de 0,7mL de tampão fosfato pHs entre 6,0 e 8,0 com 0,2N foram adicionados nos tubos para avaliar a influência do pH durante 24h de reação. As amostras foram analisadas qualitativamente por cromatografia de camada delgada, cuja metodologia está descrita no item 5.13.

Para avaliar a influência da concentração de água na reação de transesterificação, volumes entre 0,5 e 5,0mL de água destilada foram adicionados aos tubos de ensaio com as mesmas quantidades de óleo de soja, etanol e extrato enzimático mencionados anteriormente. As amostras foram conduzidas durante 24h e analisadas qualitativamente por cromatografia de camada delgada, cuja metodologia está descrita no item 5.13.

Um planejamento experimental fatorial completo  $2^2$ , com duplicata no ponto central mais os pontos axiais foi utilizado para avaliar o efeito do pH e volume de extrato enzimático no meio reacional. A atividade da lipase no extrato enzimático bruto utilizado nestes experimentos foi de  $1,12\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A matriz do planejamento experimental é mostrada na Tabela 15.

**Tabela 15.** Matriz do planejamento experimental completo  $2^2$  com duplicata no ponto central mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel utilizando lipase livre de *Burkholderia cepacia*.

Experimento	Variável	
	pH	[E]
1	6	2,5
2	7	2,5
3	6	5
4	7	5
5	6,5	3,75
6	6,5	3,75
7	5,2929	3,75
8	7,7071	3,75
9	6,5	0,73225
10	6,5	6,76775

[E]: volume de extrato enzimático bruto.

As reações foram conduzidas com 5,0mL de óleo de soja, 1,5mL de etanol, 0,7mL de tampão fosfato e 1,5mL de extrato enzimático bruto durante 24h sob agitação de 20rpm e 40°C. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa segundo a metodologia descrita no item 5.14.

#### 5.12.2. Efeito da adição de agente emulsificante no meio de reação de transesterificação utilizando lipase livre de *Burkholderia cepacia*

Para avaliar a influência do agente emulsificante na reação foi adicionado 0,6mL de solução aquosa com 7% de goma arábica. As amostras foram conduzidas durante 24h e analisadas qualitativamente por cromatografia de camada delgada de acordo com a metodologia descrita no item 5.13.

Fez parte do meio reacional 5,0mL de óleo de soja, 1,5mL de etanol e 1,5mL de extrato enzimático bruto (atividade  $1,3\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). As reações foram conduzidas a  $40^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 20rpm variando o pH do meio entre 6,0 e 8,0. Para garantir o pH do meio foi adicionado 0,7mL de tampão fosfato 0,2N para cada condição.

### **5.12.3. Efeito do pH e da concentração de lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia* na reação de transesterificação**

Na preparação deste experimento foram pesadas diferentes massas de resina Ionenaustauscher III e submetida à imobilização da lipase presente no extrato enzimático bruto (atividade  $1,2\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A imobilização foi conduzida durante 12h a temperatura ambiente sob agitação de 20rpm. A razão de resina e extrato enzimático foi mantida constante para todas as amostras. A atividade lipolítica do sobrenadante foi determinada segundo a metodologia descrita no item 5.7, antes e depois da imobilização para observar o grau de imobilização na resina.

As reações foram conduzidas com 5,0mL de óleo de soja, 1,5mL de etanol e 0,7mL de tampão fosfato durante 24h sob agitação de 20rpm a  $40^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa segundo a metodologia descrita no item 5.14.

Para avaliar o efeito do pH e da concentração de enzima imobilizada foi proposto um planejamento experimental  $2^2$  com duplicata no ponto central mais os pontos axiais. A matriz do planejamento é mostrada na Tabela 16.

**Tabela 16.** Matriz do planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  com duplicata no ponto central mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel utilizando lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia*.

Experimento	Variável	
	pH	[E]
1	7	1,5
2	6	1,5
3	7	0,5
4	6	0,5
5	6,5	1
6	6,5	1
7	5,7929	1
8	7,2071	1
9	6,5	0,2929
10	6,5	1,7071

[E]: Atividade enzimática imobilizada ( $\text{U.g}_{\text{resina}}^{-1}$ )

#### 5.12.4. Efeito da concentração de etanol na reação de transesterificação

Para avaliar o efeito da concentração de etanol no meio reacional foram utilizados 2,0g de óleo de soja e 0,15g de enzima Lipozyme RM 1M obtida comercialmente. Posteriormente os resultados foram comparados com sistema reacional utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB mencionado no item 5.11.

Os experimentos foram conduzidos a  $40^{\circ}\text{C}$  durante 24h de reação sob agitação de 20rpm e volume de etanol entre 0,1 e 1,0mL. Amostras coletadas nos tempos 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24h foram analisadas por cromatografia gasosa segundo a metodologia descrita no item 5.14.

#### **5.12.5. Efeito da adição de íons metálicos na reação de transesterificação com lipase livre de *Burkholderia cepacia***

O efeito da adição de íons metálicos foi avaliado utilizando meio reacional com 5,0mL de óleo de soja e 1,5mL de etanol durante 24h sob agitação de 20rpm a 40°C. As amostras foram adicionadas de 0,3mL de solução aquosa (0,03N) de sulfatos de magnésio, manganês, zinco, Sódio, potássio e alumínio, ferroso, cobre, cobalto, amônio e cálcio. Uma reação controle (sem adição de solução com íon) e outras duas adicionadas de 0,3mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,6mL de solução de goma arábica 7%, respectivamente foi conduzidas a título de comparação. As amostras foram analisadas qualitativamente por cromatografia de camada delgada segundo a metodologia descrita no item 5.13.

#### **5.12.6. Efeito da adição de co-solvente na reação de transesterificação com lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB**

Fiz parte do meio reacional 2,1g de óleo de soja, 0,3mL de etanol e lipase imobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB como mencionado no item 5.11. Os co-solventes estudados foram acetona, éter de petróleo, hexano, n-heptano e acetonitrila. Para comparação dos resultados foi feita outra reação denominada controle (sem adição de co-solvente). Os experimentos foram conduzidas a 40°C sob agitação de 20rpm durante 12h e as amostras analisadas por cromatografia gasosa segundo a metodologia descrita no item 5.14.

#### **5.12.7. Efeito da temperatura na reação de transesterificação com lipase livre de *Burkholderia cepacia***

O efeito da temperatura na reação de transesterificação com lipase livre foi conduzida a 40°C sob agitação de 20rpm durante 24h. O meio reacional contve 5,0mL de óleo de soja, 1,5mL de etanol e 1,5mL de extrato enzimático bruto (atividade 1,1U.mL<sup>-1</sup>). A título de comparação também foram avaliados experimentos adicionados de 0,6mL de goma arábica e 0,3mL de Sulfato de potássio e alumínio (0,03N). As amostras foram

analisadas qualitativamente por cromatografia de camada delgada segundo a metodologia descrita no item 5.13.

#### 5.12.8. Efeito da temperatura na reação de transesterificação com lipase de *Burkholderia cepacia* immobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB

A avaliação do efeito da temperatura na síntese do biodiesel foi dividida em duas etapas. Na primeira foram estudadas temperaturas de 45, 50, 55 e 60°C e na segunda foi proposto um planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  com triplicata no ponto central mais os pontos axiais. As variáveis do planejamento foram a temperatura e a concentração de lipase immobilizada. Na Tabela 17 é mostrada a matriz do planejamento experimental.

**Tabela 17.** Matriz do planejamento experimental fatorial  $2^2$  com triplicata no ponto central mais os pontos axiais para síntese do biodiesel utilizando lipase immobilizada de *Burkholderia cepacia*.

Experimento	Temperatura	Atividade immobilizada
1	35	231
2	45	231
3	35	693
4	45	693
5	40	462
6	40	462
7	40	462
8	32,929	462
9	40	788,6802
10	47,071	462
11	40	135,3198

Atividade immobilizada: U.  $0,15g_{resina}^{-1}$

O meio reacional para os experimentos foi composto de 2,1g de óleo de soja e 0,30mL de etanol. A lipase de *Burkholderia cepacia* foi imobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB conforme descrito no item 5.11 e as reações de síntese do biodiesel conduzidas sob agitação de 20rpm durante 12h.

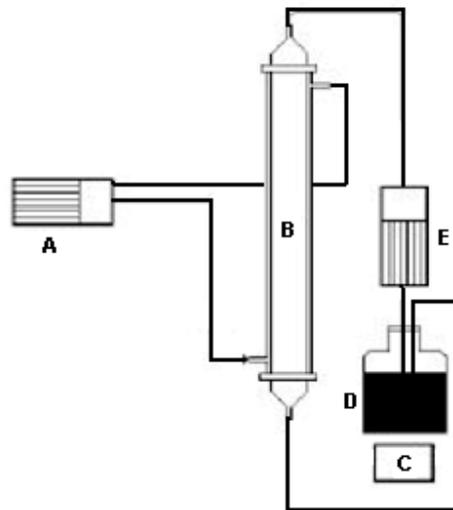
As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa segundo a metodologia descrita no item 5.14.

#### **5.12.9. Avaliação do número de uso da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em resina hidrofóbica e de troca iônica**

A avaliação do número de uso da lipase imobilizada em resina hidrofóbica foi feita a partir de partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB. A enzima foi imobilizada durante 12h de acordo com a metodologia descrita no item 5.11. Para estes experimentos a reação de síntese do biodiesel foi conduzida em tubos de ensaio com capacidade para 5mL sob agitação de 20rpm a 40°C durante 12h. Fez parte do meio reacional 2,1g de óleo de soja e 0,3mL de etanol. Após cada reação a resina foi drenada para garantir o escoamento do meio e iniciar uma nova reação a partir da adição das mesmas quantidades de óleo de soja e etanol.

A resina de troca iônica Amberlite IRA-900 foi utilizada para avaliar o número de usos em sistema reacional com leito fixo e recirculação de meio reacional.

Neste tipo de reator a temperatura do meio reacional foi mantida constante por meio de recirculação de água na parede encamisada do reator. O reciclo do meio reacional foi feito utilizando bomba peristáltica e recipiente para homogeneização do meio. O esquema pode ser observado na Figura 11.



**Figura 11.** Esquema do reator de leito fixo com recirculação do meio de reação. **A:** Sistema termostatzado de recirculação de água; **B:** Coluna de leito fixo com parede encamisada; **C:** Agitador magnético; **D:** Recipiente de homogeneização do meio reacional; **E:** Bomba peristáltica.

O reator representado pelo esquema da Figura 11 apresentou dimensões de 20cm de altura e 1cm de diâmetro interno. O processo foi conduzido em ciclos de 24h a 40°C durante 10 dias para avaliar o rendimento do processo de acordo com o número de usos da resina com a lipase imobilizada. A vazão de reciclo foi mantida em 1,0mL/seg.

Fizeram parte no meio reacional 62mL de óleo de soja e 18mL de etanol. Solução enzimática (0,15g de lipase comercial de *Burkholderia cepacia* – 46U.mg<sup>-1</sup> diluída em 60mL de água deionizada) foi imobilizada em 8,21g da resina Amberlit IRA-900 durante 12h a temperatura ambiente. Após este intervalo a resina foi drenada e transferida para o reator. A atividade lipolítica do sobrenadante foi determinada segundo a metodologia descrita no item 5.7.

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa segundo a metodologia descrita no item 5.14. Amostras após dois dias de armazenamento a 10°C também foram analisadas para verificar ocorrência de perdas da lipase por lixiviação.

### **5.13. Análise do biodiesel por cromatografia de camada delgada**

As análises de cromatografia em camada delgada foram conduzidas em placas Merck Cromatofolha – alumínio CCF – C/25. As amostras foram preparadas diluindo 30µL em 300µL de hexano. Diferentes soluções eluentes e revelantes foram previamente testadas. Após os testes foi escolhido para a análise o éter de petróleo:acetona (97:3) e metanol:ácido sulfúrico (1:1), como solução eluente e revelante, respectivamente. Amostras de 5µL foram aplicadas nas placas, onde estas foram colocadas verticalmente em contato com a solução eluente. Após aproximadamente 25min as placas foram retiradas e deixadas em repouso por mais 5min. Solução revelante foi aplicada nas placas, onde permaneceram em repouso por 5min a 120°C.

### **5.14. Análise do biodiesel por cromatografia gasosa**

As amostras coletadas em diferentes intervalos de tempo foram analisadas em cromatógrafo gasoso Cromacon, modelo Simple Crom, com detector de ionização de chama. As temperaturas do injetor e do detector foram 245 e 250 °C, respectivamente. Foi feita a injeção de 1µL da amostra centrifugada e livre de água (secagem com sulfato de sódio). Em uma primeira etapa a coluna foi mantida a 120°C por 30s e posteriormente elevada até 300°C a uma taxa de 10°C.min<sup>-1</sup>. Os compostos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrão de biodiesel, e quantificados por normalização de áreas.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Seleção de cepas produtoras de lipase

Dentre os microrganismos utilizados para avaliação da produção de lipase, destacaram-se as cepas de *Burkholderia cepacia* (isolada), levedura silvestre, *Aspergillus fumigatus* NRRL 164 (meio contendo farelo de soja e farelo de arroz), *Aspergillus fumigatus* NRRL 166 (meio contendo farelo de trigo) e *Aspergillus fumigatus* não identificada. Já as cepas não apresentaram atividades satisfatórias. Os resultados obtidos nos testes de produção de lipase por fermentação semi-sólida e submersa estão apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18.** Atividade lipolítica e de transesterificação da lipase produzida por diferentes microrganismos.

Microrganismos	Atividade lipolítica (U.mL <sup>-1</sup> )	Biodiesel (%)
<i>Zymomonas mobilis</i>	0,00	0,00
<i>Burkholderia cepacia</i> isolada	0,55	19,50
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	0,14	4,10
<i>Burkholderia cepacia</i> CCT 1145	0,10	2,05
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 10856	0,00	0,00
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL 744	0,00	0,00
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL 744 1' UV	0,00	0,00
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL 41044 com estreptomicina	0,00	0,00
<i>Bacillus licheniformis</i>	0,14	2,20
Levedura silvestre (não identificada)	0,83	6,90
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 7754	0,00	0,00
<i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL 164 (Farelo Arroz)	0,14	1,10
<i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL 164 (Farelo trigo)	0,00	0,00
<i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL 164 (Farelo soja)	0,69	1,55
<i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL 166 (Farelo Arroz)	0,55	1,50
<i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL 166 (Farelo trigo)	1,93	2,90
<i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL 166 (Farelo soja)	0,00	0,00
<i>Aspergillus</i> (não identificado)	1,10	2,10

Além do tipo de microrganismo, a composição do meio e as condições de fermentação são variáveis extremamente importantes para fins de otimização da produção de lipase. (LI *et al.*, 2006). Nos experimentos em que foi utilizado *Aspergillus fumigatus* pode-se observar que a composição do meio foi determinante para a produção de lipase. A adição de farelo de trigo no meio contendo a cepa NRRL 166 influenciou significativamente no aumento da produção da lipase, assim como o farelo de soja para a cepa NRRL 164.

Além da avaliação da atividade da lipase, outro parâmetro estabelecido para a escolha do microrganismo produtor da enzima foi a atividade de transesterificação em óleo de soja e etanol.

Apesar dos valores de atividades da lipase terem apresentado bons resultados com as cepas de *Aspergillus* (com exceção das cepas de *Aspergillus fumigatus* NRRL 164 e *Aspergillus fumigatus* NRRL 166, utilizando respectivamente farelo de trigo e soja no meio de fermentação), os resultados de transesterificação não tiveram bons rendimentos (abaixo de 7%). Isto mostra que as lipases destas cepas podem atuar de forma eficiente na hidrólise dos triglicerídeos, porém com limitações nas reações de transesterificação a que foram submetidas.

A literatura relata que a especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (JENSEN *et al.*, 1983). Dentre os vários tipos de especificidade estão: 1) aquela que se refere ao substrato: uma enzima pode apresentar diferentes taxas de hidrólise sobre triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis; 2) posicional: a hidrólise ocorre diferentemente sobre ésteres primários, secundários ou terciários, ou pode ser inespecífica, liberando ácidos graxos das três posições; 3) quanto aos ácidos graxos que compõem o substrato: preferência por ácidos graxos específicos, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações; 4) estereoespecificidade: discriminação entre enantiômeros no caso de substratos racêmicos. Pode-se observar também a combinação de todos os tipos de especificidades mencionadas.

Quanto aos resultados de transesterificação da lipase de *Burkholderia cepacia*, foram encontrados valores de aproximadamente 20% de conversão em biodiesel com 1mL de extrato enzimático bruto. Sua boa especificidade na reação mostrou que ela é

promissora para a síntese do biodiesel, mesmo com atividade hidrolítica inferior, quando comparada as de *Aspergillus fumigatus*.

## 6.2. Estudo de produção de lipase por *Burkholderia cepacia*

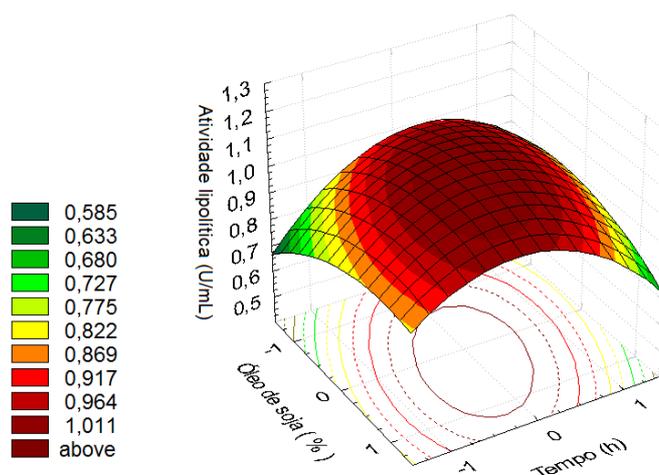
Uma vez selecionada a lipase com maior potencial de uso para a reação de transesterificação, esta nova etapa do trabalho visou estudar o aumento da produção da lipase pela cepa de *Burkholderia cepacia*. Primeiramente foi proposto o uso de um planejamento experimental composto central  $2^2$  com triplicata no ponto central, mais os pontos axiais para avaliar o efeito da concentração de óleo de soja e estabelecer um tempo adequado de fermentação para produção de lipase. A matriz codificada e os níveis de variação do planejamento utilizados para os experimentos foram mostrados no item 5.4. Na Tabela 19 é mostrada a matriz do planejamento juntamente com os resultados encontrados para os experimentos.

**Tabela 19.** Matriz codificada do planejamento experimental completo  $2^2$  com triplicata no ponto central mais os pontos axiais.

Experimento	[OS]	TF	AL
1	-1	-1	0,54
2	1	-1	0,87
3	-1	1	0,77
4	1	1	0,89
5	0	0	1,23
6	0	0	0,89
7	0	0	1,05
8	-1,4142	0	1,15
9	0	1,4142	0,82
10	1,4142	0	0,95
11	0	-1,4142	0,97

[OS]: Concentração de óleo de soja; TF: Tempo de fermentação; AL: Atividade lipolítica.

Apesar dos efeitos do planejamento experimental não terem sido significativos, a Figura 12 mostra claramente a tendência da produção de lipase frente às variáveis de estudo. A região ótima do processo compreende o tempo de fermentação entre 48 e 76h e concentração de óleo de soja entre 7,5 e 8,5%. Os resultados de maior atividade da lipase foram aproximadamente  $1,1\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 12.** Superfície de resposta para a produção de lipase pela *Burkholderia cepacia*

A fase de redução da atividade lipolítica provavelmente se deu como consequência do esgotamento de algum nutriente ou formação de metabólitos indesejáveis. Durante a fermentação foi constatada uma diminuição do pH do meio fermentado de 6,8 para 5,9, podendo ter sido proveniente da produção de alguns ácidos como é o caso do ácido pseudomônico, produzido por *Burkholderia cepacia*.

Algumas fontes de carbono, além de apresentarem vantagens no que diz respeito ao aumento da produção de lipase, sugerem a possibilidade de utilizar produtos oleosos de baixo valor agregado, reduzindo conseqüentemente o custo final de produção da enzima.

Os substratos lipídicos participam da síntese de lipases atuando como excelentes indutores (DALMAU *et al.*, 2000). O microrganismo pode utilizar este substrato de modo

seqüencial, onde inicialmente o óleo é hidrolisado pelas lipases presente no inóculo. Em seguida o microrganismo consome o glicerol e posteriormente os ácidos graxos com a conseqüente indução da produção de lipase (MONTESINO *et al.*, 1996).

Com o objetivo de aumentar a produção de lipase, foram testados sais de potássio e magnésio, bem como diferentes pHs e concentração de óleo de soja. O potássio e o magnésio são compostos de grande importância para o metabolismo de microrganismos, pois dependendo de sua concentração podem atuar favorecendo ou inibindo determinadas rotas. Na Tabela 20 é mostrada a matriz do planejamento experimental para a produção de lipase pela *Burkholderia cepacia*, respectivamente.

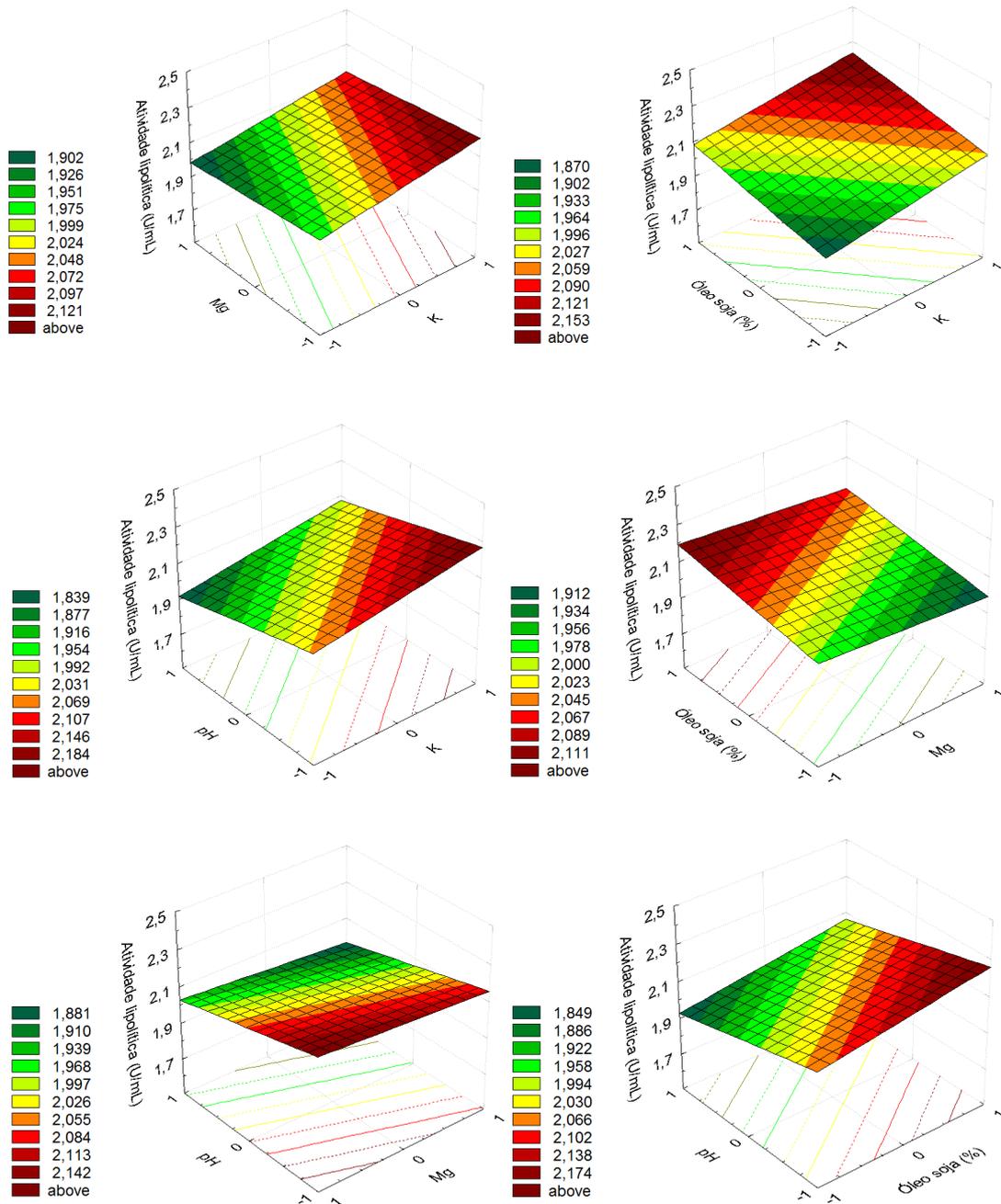
**Tabela 20.** Matriz codificada do planejamento experimental fracionário  $2^{4-1}$  com triplicata no ponto central para a produção de lipase por *Burkholderia cepacia*.

Ensaio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Óleo de soja	pH	AL
1	-1	-1	-1	-1	2,04
2	1	-1	-1	1	1,99
3	-1	1	-1	1	1,56
4	1	1	-1	-1	2,07
5	-1	-1	1	1	1,89
6	1	-1	1	-1	2,22
7	-1	1	1	-1	2,12
8	1	1	1	1	2,07
9	0	0	0	0	2,38
10	0	0	0	0	1,76
11	0	0	0	0	2,02

AL: Atividade lipolítica.

Apesar da produção de lipase não ter apresentado efeitos significativos, verificou-se que o aumento da concentração de óleo de soja e da fonte de potássio influenciou positivamente a produção da enzima no meio de fermentação. Efeito contrário foi

verificado para a fonte de magnésio e pHs mais altos. Os resultados podem ser observados nas superfícies de resposta da Figura 13.



**Figura 13.** Superfícies de resposta para a produção de lipase por *Burkholderia cepacia* utilizando planejamento experimental fracionário  $2^{4-1}$  com triplicata no ponto central.

Vários são os estudos envolvendo a utilização de diferentes substratos na produção de lipase. A adição de determinados nutrientes ao meio de crescimento é considerada por vários autores como essencial para fermentação de hidrocarbonetos (FOGHT *et al.*, 1989, SINGH *et al.*, 1990).

A concentração de K e Mg, embora em quantidades muito menores que carbono e nitrogênio, são requeridos em níveis significativos pelos microrganismos quando comparados aos demais nutrientes.

O acréscimo na demanda de energia exige que os níveis de magnésio estejam adequados, pois a produção de ATP, a partir de carboidratos, lipídeos e proteínas, não é concretizada na falta de magnésio. Considerando que grande parte da energia provém da hidrólise de ATP, baixa concentração de magnésio pode resultar na queda do rendimento de alguns metabólitos, devido à diminuição da produção de energia (AIRAWA, 1981).

O magnésio é um co-fator enzimático essencial para o funcionamento dos microrganismos, mas em excesso, provoca interferências na absorção de cálcio e potássio. Também atua na estabilização de ribossomas e membranas. Já o potássio atua como regulador osmótico necessário à atividade enzimática e à síntese protéica, sendo também um nutriente (AIRAWA, 1981).

Com o intuito de minimização dos custos, foi estudada a utilização de água de maceração de milho como componente do meio de cultivo para avaliar seu potencial na produção de lipase de *Burkholderia cepacia* e comparar com o meio originalmente utilizado. Com isso foram elaborados dois planejamentos experimentais fatoriais  $2^3$  com triplicata no ponto central para estudar melhores condições de produção.

Nas Tabelas 21 e 22 são mostradas as matrizes codificadas dos planejamentos experimentais juntamente com os resultados encontrados. Os níveis de variação para os planejamentos são mostrados no Item 5.4.1.

**Tabela 21.** Matriz codificada do planejamento experimental fatorial  $2^3$  com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase de *Burkholderia cepacia* utilizando água de maceração de milho na composição do meio de cultivo.

Água maceração milho (mL)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g.L <sup>-1</sup> )	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g.L <sup>-1</sup> )	AL (U.mL <sup>-1</sup> )
+1	+1	+1	2,898
-1	+1	+1	0,966
+1	-1	+1	1,288
-1	-1	+1	1,932
+1	+1	-1	2,898
-1	+1	-1	1,288
+1	-1	-1	1,610
-1	-1	-1	0,966
0	0	0	0,966
0	0	0	1,610
0	0	0	1,288

AL: Atividade lipolítica

As lipases apresentam limitações do uso industrial devido ao seu alto custo (KANWAR *et al.* 2002). A aplicação de subprodutos agroindustriais em bioprocessos se torna interessante, pois além da possibilidade de formular outros meios, também ajuda na resolução de problemas de poluição (PANDEY, 2000).

A partir dos resultados encontrados observa-se aumento significativo da atividade da lipase produzida quando comparados com os resultados dos experimentos anteriores.

**Tabela 22.** Matriz codificada do planejamento experimental fatorial  $2^3$  com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase de *Burkholderia cepacia* utilizando peptona e extrato de levedura na composição do meio de cultivo.

Óleo de soja	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	AL
(mL)	(g.L <sup>-1</sup> )	(g.L <sup>-1</sup> )	(U.mL <sup>-1</sup> )
+1	+1	+1	1,288
-1	+1	+1	1,288
+1	-1	+1	0,644
-1	-1	+1	0,644
+1	+1	-1	2,254
-1	+1	-1	1,610
+1	-1	-1	0,644
-1	-1	-1	0,966
0	0	0	0,966
0	0	0	1,288
0	0	0	1,288

AL: Atividade lipolítica

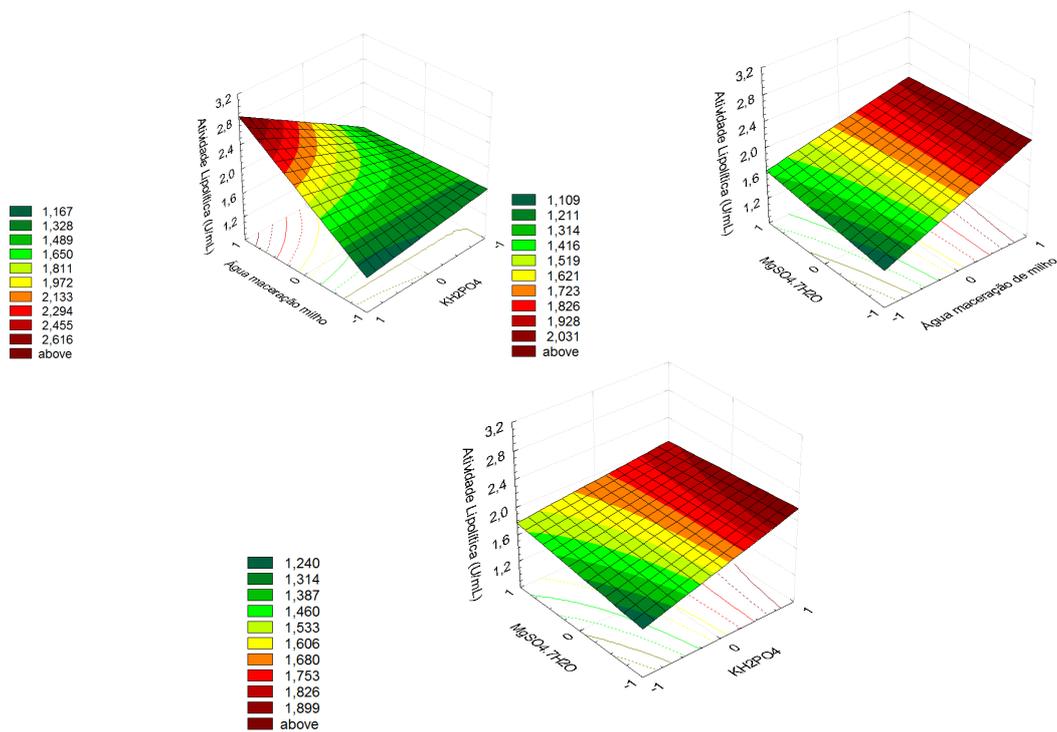
A análise dos resultados mostra que a concentração de água de maceração de milho e sua interação com concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foram significativa a nível de confiança de 90% com coeficiente de correlação 0,807. Já para os experimentos utilizando peptona e extrato de levedura, as variáveis que apresentaram efeitos significativos (coeficiente de correlação de 0,920) foram as concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Na Tabela 23 são mostrados os efeitos encontrados para os planejamentos experimentais.

**Tabela 23.** Efeitos encontrados nos planejamentos experimentais fatoriais  $2^3$  para a produção de lipase de *Burkholderia cepacia*.

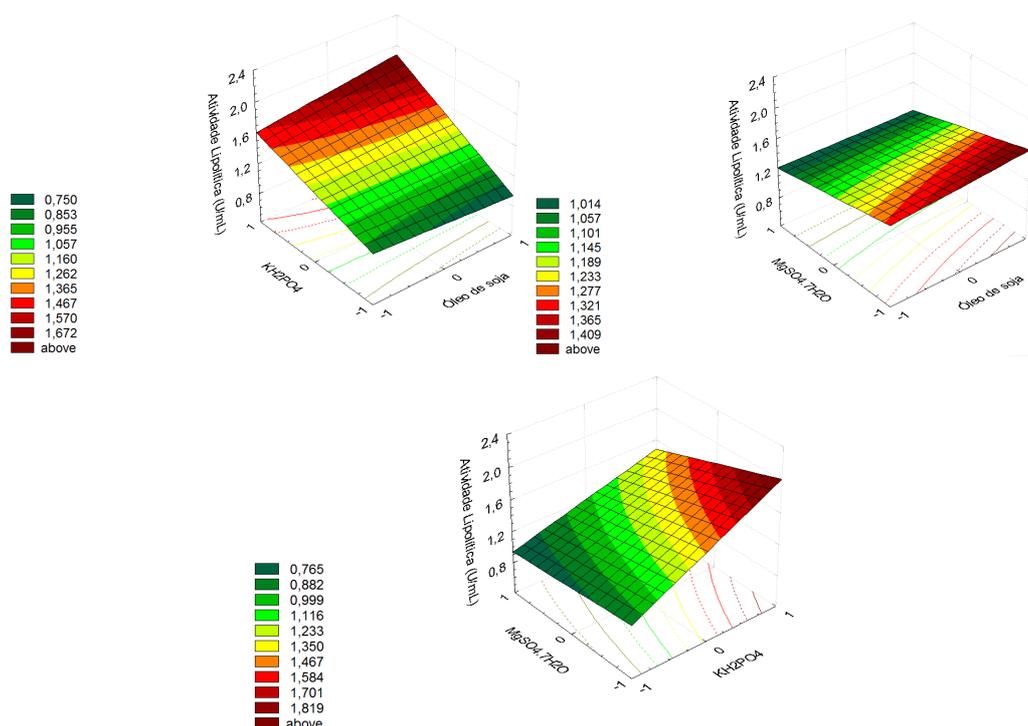
Variáveis	Exp 1		Exp 2		
	Efeito	p	Variáveis	Efeito	p
(1) AMM	0,886*	0,063	(1) OS	0,081	0,626
(2) K	0,564	0,179	(2) K	0,886*	0,004
(3) Mg	0,080	0,828	(3) Mg	-0,403*	0,058
1 com 2	0,886*	0,063	1 com 2	0,242	0,189
1 com 3	-0,242	0,524	1 com 3	-0,081	0,626
2 com 3	-0,242	0,524	2 com 3	-0,242	0,189

**Exp 1:** Experimentos com água de maceração de milho; **Exp 2:** Experimentos com peptona e extrato de levedura; **AMM:** água de maceração de milho; **OS:** Óleo de soja; **K:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; **Mg:**  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; \* Efeitos significativos.

A concentração de água de maceração de milho quando adicionada ao meio de cultivo apresentou efeito positivo de 0,886 vezes na resposta ao passar do nível inferior para o superior. Este mesmo valor foi encontrado para a sua interação com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Nos experimentos em que a água de maceração de milho foi substituída por concentrações fixas de peptona e extrato de levedura e variando a concentração de óleo de soja, as variáveis significativas foram as concentrações de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , apresentando efeito positivo de 0,886 vezes e negativo de 0,403 vezes, respectivamente. Estes resultados podem ser visualizados nas superfícies de resposta das Figuras 14 e 15.



**Figura 14.** Superfícies de resposta do planejamento experimental fatorial  $2^3$  com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase de *Burkholderia cepacia*.utilizando água de maceração de milho no meio de cultivo.



**Figura 15.** Superfícies de resposta do planejamento experimental fatorial  $2^3$  com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase de *Burkholderia cepacia* utilizando peptona e extrato de levedura no meio de cultivo.

O uso de água de maceração de milho propiciou o aumento da produção de lipase, alcançando resultados de até aproximadamente  $2,9\text{U.mL}^{-1}$ . Tais resultados mostram o potencial de utilização deste subproduto na redução dos custos de obtenção de lipase por *Burkholderia cepacia*. Este aumento na produção provavelmente se deu pelo fato da água de maceração de milho ser excelente fonte de nutrientes. Este produto é um concentrado obtido da água de maceração de grãos de milho, contendo em sua composição química carboidratos solúveis, aminoácidos, sais minerais e vitaminas. Pelo fato desta solução concentrada apresentar em sua composição química os principais aminoácidos e nutrientes necessários para o desenvolvimento e metabolismo de vários microrganismos, apresentou-se como bom componente do meio de cultura para a produção de lipase pela *Burkholderia cepacia*. Na Tabela 24 é mostrada a composição da MILHOCINA® (nome comercial do produto) utilizada nos experimentos.

**Tabela 24.** Composição básica nutricional da água de maceração de milho (MILHOCINA<sup>®</sup>) usada nos experimentos de produção de lipase pela *Burkholderia cepacia*.

<b>Aminoácidos</b>	<b>(%)</b>	<b>Minerais</b>	<b>(%) e (mg/kg)</b>	<b>Vitaminas</b>	<b>(mg/kg)</b>
Alanina	9,83	Cálcio	0,14	Biotina	0,3
Arginina	3,68	Cobre	15,0*	Cholina	3.500,0
Ácido aspártico	5,82	Manganês	20,0*	Inositol	6.000,0
Cistina	2,20	Ferro	100,0*	Niacina	80,0
Ácido glutâmico	18,07	Magnésio	0,6	Ácido Pantotênico	15,0
Glicina	5,27	Potássio	2,8	Piridoxina	9,0
Histidina	3,72	Sódio	0,1	Riblofavina	6,0
Isoleucina	3,07	Fósforo	1,8	Tiamina	3,0
Leucina	8,28	Selênio	0,3*		
Lisina	4,75	Zinco	60,0*		
Tirocina	3,09	Enxofre	0,6		
Metionina	1,98				
Fenilalanina	2,85				
Prolina	9,64				
Serina	5,18				
Treonina	4,08				
Valina	5,16				

Matéria seca: 45-50%; Proteína bruta (base seca): 35-40%; Nutrientes digeríveis totais (base seca): 70%; pH: 3,7-4,4. **Fonte:** Corn Products Brasil

MEDEIROS (1999) estudou a influência do óleo de soja, óleo de oliva e glicose como das fontes de carbono e água de maceração de milho e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio para a produção de lipase por *Geotrichum* sp à 30°C e 120 rpm em frascos agitados. A técnica de planejamento experimental e análise da superfície de resposta foram utilizadas para otimização da produção de lipase. Os resultados obtidos com as condições otimizadas foram de 18U.mL<sup>-1</sup> utilizando 2,1-2,5% de nitrato de amônio, 13-15% de água de maceração de milho e 0,6% de óleo de soja.

A utilização de água de maceração de milho para a produção de lipases tem sido estudada e os resultados após a otimização são semelhantes aos obtidos com meio sintético. No entanto, o uso deste subproduto pode tornar inviável a etapa de recuperação e purificação da enzima, necessitando assim uma etapa prévia de clarificação do meio.

### 6.3. Estudo do tipo de reator na produção de lipase de *Burkholderia cepacia*

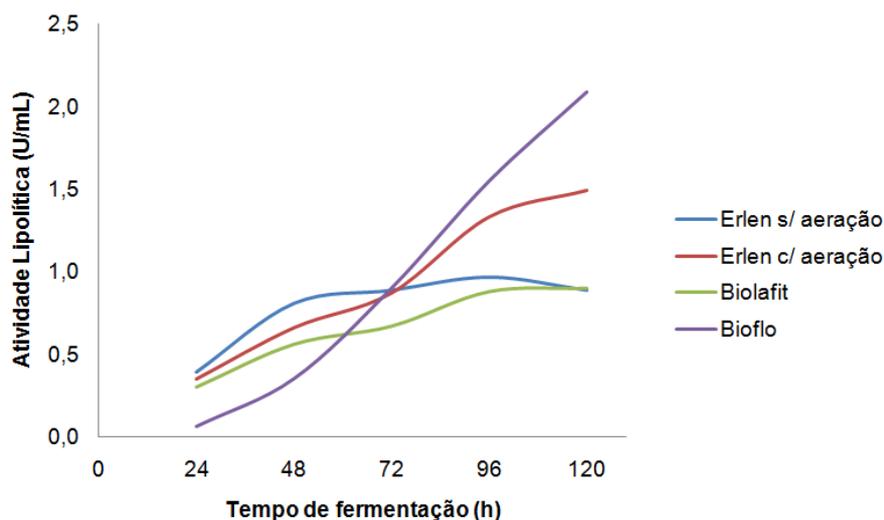
Outro fator importante nos processos de fermentação é o tipo de reator, visto que sua influência na transferência de calor e massa é extremamente significativa. Grande parte dos estudos relacionados a este assunto mostra a influência da geometria no fornecimento do oxigênio, indispensável à atividade microbiana (SCRAGG *et al.*, 1987; MERCHUK & SIEGEL, 1988).

Dependendo do reator, a mistura do meio de cultivo pode não ser eficiente, a menos que o fluxo no recipiente seja turbulento. Todos os fatores que influenciam a mistura podem ser descritos como a combinação de três processos físicos, que são a distribuição, dispersão e difusão. A distribuição se denomina algumas vezes como macromistura e a difusão como micromistura. A dispersão pode ser classificada como micro ou macromistura dependendo da escala do movimento do fluido (DORAN, 1995).

Normalmente quando se injeta ar nos processos de fermentação, pode-se diminuir e até eliminar o uso da agitação. As bolhas causam a diminuição da densidade aparente do fluido bem como no aumento da sua agitação.

Os perfis de atividade lipolítica nos diferentes reatores (Figura 16) mostram que a aeração associada à agitação do meio de cultivo influenciou de forma significativa na produção de lipase. O sistema de agitação de turbinas, com 6 palas planas (turbina Rushton) e aeração distribuída por pequenos orifícios na parte inferior do reator tipo Bioflo apresentou o melhor desempenho para os resultados de produção de lipase. A turbina atuou na quebra e distribuição mais efetiva das bolhas de ar no meio de fermentação. Bons resultados também foram encontrados nos reatores tipo erlenmeyers com aeração. Já para o reator Biolafitte, apesar de dispor de sistema de agitação com rosca helicoidal e aeração na parte inferior do reator, não foi eficiente no processo de produção de lipase. Estes resultados provavelmente sejam devido à diminuição do tempo de residência do ar

no meio de fermentação, afetando a absorção do oxigênio no meio de cultivo. Pelo fato da pequena área superficial, responsável pela incorporação do ar no meio de fermentação, os reatores tipo erlenmeyers sem aeração também não apresentaram bons resultados.



**Figura 16.** Produção de lipase utilizando diferentes tipos de reatores.

A agitação de reatores, apesar de parecer uma técnica simples, pode apresentar várias dificuldades experimentais (BUCHS, 2001), além de auxiliar na escolha da alternativa de agitação mais adequada. A escolha de tipo de reator também é importante devido à eficiente distribuição de gases, aumentando seu tempo de residência no meio, resultando conseqüentemente na diminuição significativa dos custos operacionais (ARJUNWADKAR *et al.*, 1998).

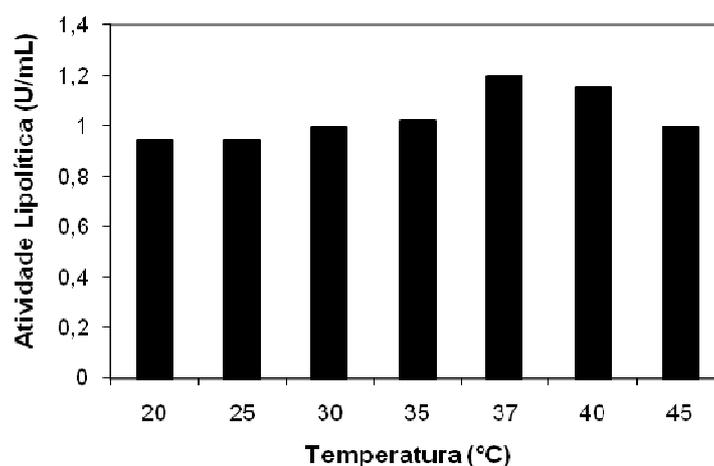
Quase todos os estudos com respeito a influência da geometria em reatores para processos fermentativos mostram que esta variável afeta significativamente o fornecimento de oxigênio à atividade microbiana (GIAVRILESCU & TUDOSE, 1988). A agitação pode afetar positivamente o andamento do processo, por favorecer a transferência dos nutrientes do meio para as células, influenciando diretamente no andamento do processo.

## 6.4. Caracterização da lipase de *Burkholderia cepacia*

### 6.4.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da lipase

Uma vez feita a escolha pelo uso da lipase de *Burkholderia cepacia* nos processos de reação de transesterificação, iniciou-se a fase de caracterização da enzima. Mediante a aplicação de diferentes temperaturas no sistema reacional foi encontrado atividade de  $1,20\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$  como valor máximo. A maior diferença em relação a atividade máxima foi de 20,83% a  $20^\circ\text{C}$ .

Algumas enzimas perdem sua atividade com pequenas variações de temperatura, pois a mudança na sua conformação faz com que os sítios ativos percam a especificidade de reagir com o substrato. O comportamento da atividade da enzima em relação à temperatura é mostrado na Figura 17.



**Figura 17.** Atividade enzimática de lipase produzida por *Burkholderia cepacia* utilizando diferentes condições de temperatura.

Posteriormente foram realizados experimentos utilizando temperaturas mais elevadas em sistema com maior eficiência de troca térmica (banho-maria) para verificar a perda da atividade lipolítica da enzima. Durante esta avaliação o tratamento a  $40^\circ\text{C}$  por 2h apresentou diminuição da atividade lipolítica (15%). No entanto, quando submetida aos tratamentos de  $50$  e  $60^\circ\text{C}$ , foi afetada significativamente durante a primeira hora de

exposição, com redução mais acentuada a 60°C, como já era esperado. A inativação da lipase durante 60, 90 e 120min a 50°C foi respectivamente, 33, 34 e 45%.

De modo geral, a atividade enzimática diminui exponencialmente ao longo do tempo, obedecendo cinética de inativação de 1ª ordem, como mostrada na Equação 3.

$$-\frac{dA}{dt} = k_d \cdot A \quad (3)$$

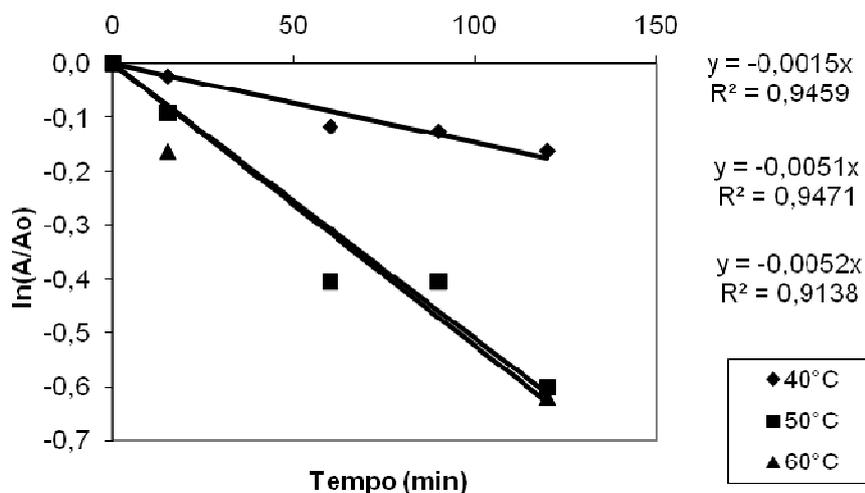
Separando variáveis e integrando:

$$A = A_0 \cdot \exp(-k_d \cdot t) \quad (4)$$

Aplicando a propriedade de logaritmo:

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -k_d \cdot t \quad (5)$$

A partir da construção da Figura 18, determinou-se os valores de  $k_d$  (coeficiente de inativação térmica) para cada temperatura utilizada. Para determinar o tempo de meia vida da lipase, considerou-se que a concentração de enzima ( $A$ ) após o tempo de exposição, foi metade da concentração inicial ( $A_0$ ).



**Figura 18.** Cinética de inativação térmica da lipase de *Burkholderia cepacia*.

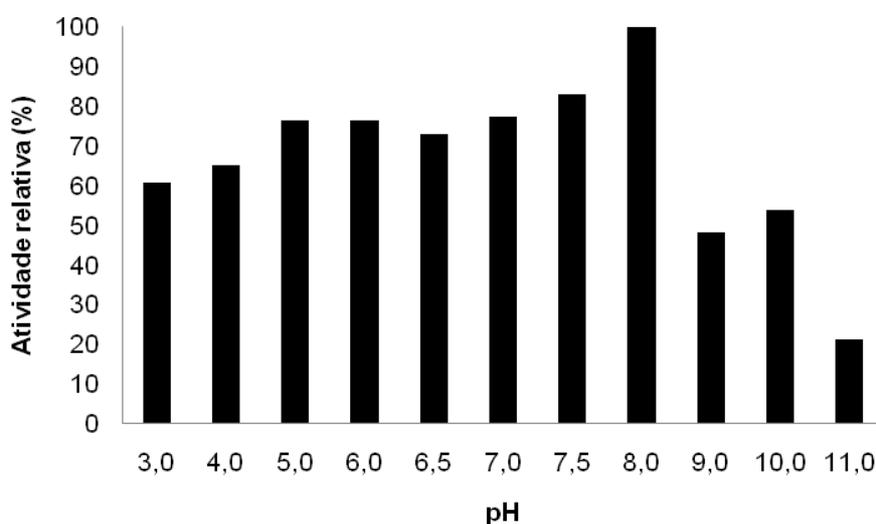
Os resultados encontrados durante a primeira hora de exposição se aproximaram bastante do modelo proposto (Equação 3). Após 60min, a temperatura não teve efeito significativo na perda da estabilidade da lipase (tratamentos a 50 e 60 °C). Os valores de  $K_d$  encontrados foram 0,0015, 0,0051 e 0,0052 $\text{min}^{-1}$  e os tempos de meia vida 462,10, 135,91 e 133,30min para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C, respectivamente.

SAKIYAMA *et al.* (2001) estudaram o efeito da temperatura na atividade de lipase produzida por *Pseudomonas sp.* e observaram que a atividade hidrolítica depende do tipo de glicerídeo. Em seu trabalho observaram boa estabilidade a 70 °C, sendo que após 1h de incubação o extrato enzimático permaneceu com 80% da sua atividade inicial.

Resultados obtidos para lipase de *Penicillium aurantiogriseum* mostram que sua estabilidade é inferior quando comparada com a lipase do *Bacillus megaterium*. Após 10min de incubação nas temperaturas de 45 e 50 °C, observou-se respectivamente somente 45 e 35 % da atividade inicial (LIMA *et al.*, 2004; LIMA, 2000).

#### 6.4.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade da lipase

Avaliando a atividade da lipase em diferentes pHs, observa-se uma variação significativa na faixa estudada. O melhor resultado encontrado foi de  $1,28 \text{ U.mL}^{-1}$  utilizando pH 8,0. Os resultados de atividade enzimática relativa são mostrados na Figura 19.



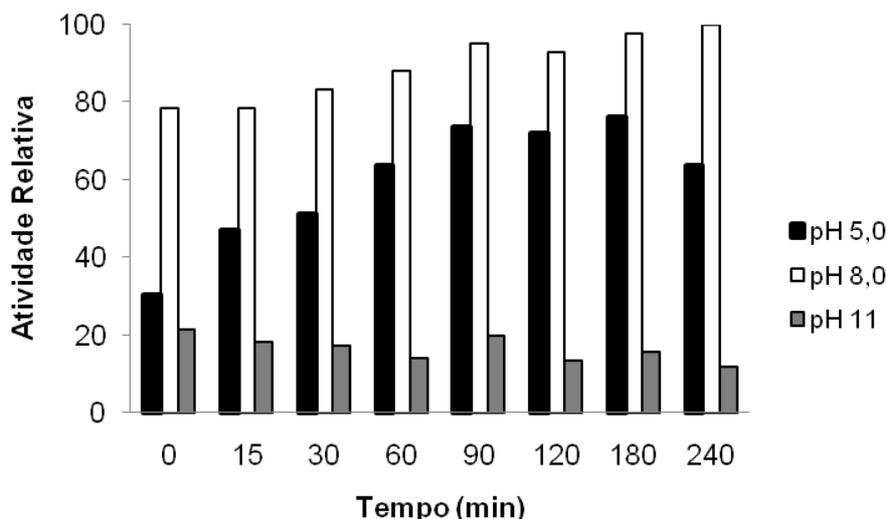
**Figura 19.** Atividade da lipase de *Burkholderia cepacia*, na faixa de pH entre 3 e 11 a  $37^\circ\text{C}$ .

SAKIYAMA *et al.* (2001), quando avaliaram o efeito do pH na atividade de lipase produzida por *Pseudomonas sp.* encontraram os melhores resultados na faixa entre 8 e 9.

Estudo com lipase de *Penicillium aurantiogriseum* apresentou atividade máxima em pH 8,0. Com relação à estabilidade, a enzima manteve 100% da atividade inicial entre pH 5,0 e 9,0 após incubação por uma hora a  $28^\circ\text{C}$  (LIMA *et al.*, 2004; LIMA, 2000).

Na avaliação da estabilidade da lipase de *Burkholderia cepacia*, o tratamento com pH 8,0 e  $37^\circ\text{C}$  apresentou aumento significativo na atividade lipolítica (aproximadamente 27%) após 240min. Estes valores mostram não só a conservação da estabilidade da

enzima em pH 8,0, mas o incremento na sua atividade. Os resultados são mostrados na Figura 20.



**Figura 20.** Atividade lipolítica relativa em função do tempo de exposição da lipase de *Burkholderia cepacia* em diferentes pHs.

No pH 5,0 foi observado comportamento atípico na atividade da lipase. Inicialmente ocorreu incremento da sua atividade, permanecendo praticamente constante entre 90 e 180min, seguido de um declínio após este período. Já no tratamento utilizando pH 11,0 observou-se redução de aproximadamente 55,6% em relação a atividade inicial, devido a inativação da enzima quando submetida a esta condição. O único tratamento que apresentou cinética de 1ª ordem foi a pH 8,0.

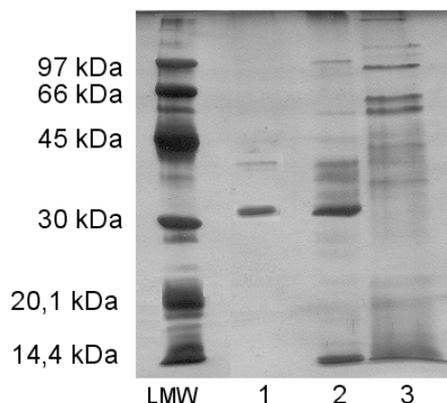
A atividade enzimática é um dos fatores de grande importância na escolha de enzimas para bioprocessos. A seleção de biocatalisadores é dependente dos níveis de atividade catalítica, seletividade e estabilidade para atuar em determinadas condições de temperatura e pH.

Em condições normais, a enzima apresenta estrutura nativa e cataliticamente ativa que é mantida por um balanço de forças não covalentes (pontes de hidrogênio, forças

iônicas, interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, etc). Em temperaturas elevadas ou outras condições extremas, todas estas forças, com exceção das interações hidrofóbicas, diminuem e a enzima perde atividade por adquirir conformação mais desordenada. A inativação enzimática se dá pelo desdobramento da estrutura molecular. Na estrutura tri-dimensional nativa da enzima, o centro ativo consiste em diversos aminoácidos próximos entre si. Assim, o desdobramento resulta na perda da atividade do sítio ativo da enzima (LEHNINGER, 1995).

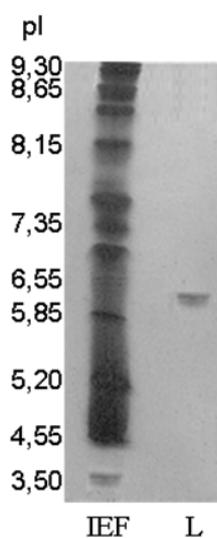
### 6.5. Eletroforese SDS – PAGE e focalização isoeétrica (Isoelectric Focusing – IEF)

Esta técnica de separação envolveu a migração de partículas no gel de poliacrilamida durante a aplicação de uma diferença de potencial. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, onde as de menor massa migram mais rapidamente que as de maior massa. Em alguns casos, o formato das moléculas também pode influir, pois algumas terão maior facilidade para migrar pelo gel. Podemos verificar que o valor da fração protéica encontrado para a lipase foi de aproximadamente 31kDa, mostrando ser uma enzima relativamente pequena. Na Figura 21 é apresentada a eletroforese em gel de poliacrilamida feita para determinação do peso molecular da lipase de *Burkholderia cepacia*.



**Figura 21.** Eletroforese SDS-PAGE em gel de 12,5%, amostra em condições desnaturantes e redutoras. (LMW) marcador de baixa massa molecular; (1) amostra de lipase purificada em sistema bifásico aquoso PEG/sal fosfato em pH 6,0; (2) lipase comercial de *Burkholderia cepacia*; (3) extrato enzimático bruto.

O valor de pH onde a molécula da lipase de *Burkholderia cepacia* apresenta carga elétrica líquida igual a zero (ponto isoelétrico ou pI) também foi determinado. O pI pode ser definido como o pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos da enzima. A diferença entre estas cargas pode ser utilizada para separá-la, submetendo-as à migração eletroforética em gradiente de pH. Esta técnica, denominada focalização isoelétrica, foi feita e os resultados estão mostrados na Figura 22.



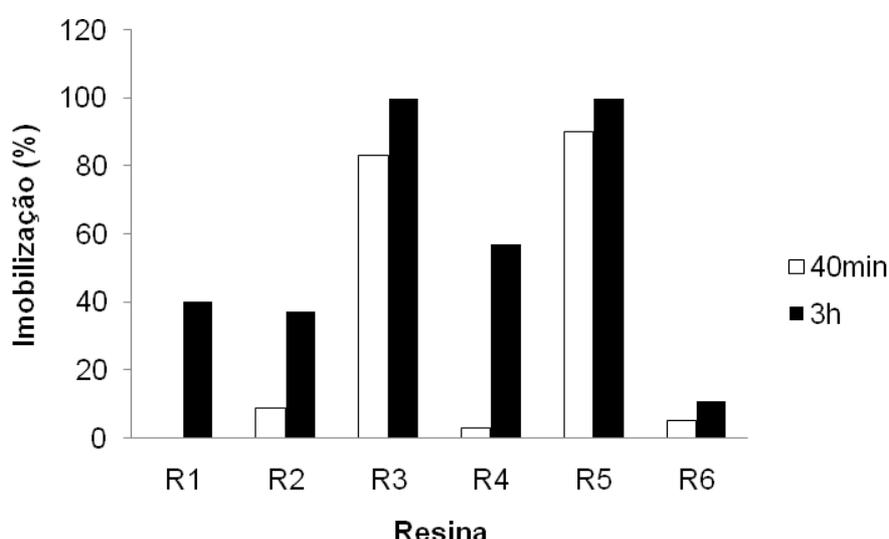
**Figura 22.** Eletroforese de focalização isoelétrica em pHs de 3 a 9. (IEF): marcador de ponto isoelétrico; (L): amostra de lipase purificada em sistema bifásico aquoso PEG/sal fosfato em pH 6,0.

Pode-se observar na Figura 22 que o pI da lipase é de aproximadamente 6,0, mostrando ser um resultado no qual pode ser facilmente alcançado em um processo de separação desta enzima para sua posterior utilização.

## 6.6. Imobilização da lipase

### 6.6.1. Imobilização em resinas de troca iônica

Na primeira etapa do estudo de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* foram testadas em diferentes resinas de troca iônica. Na Figura 23 são mostradas as porcentagens de imobilização da lipase nas resinas.



**Figura 23.** Porcentagem de imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em diferentes resinas. R1: Ion Exchange Resins (C-106); R2: Amberlite IRC-50; R3: Ionenaustauscher III; R4: Ionenaustauscher I; R5: Amberlit IRA-900; R6: Lewatit.

Até 40min, foi observado, respectivamente, 82,9% e 90% de imobilização da lipase nas resinas Ionenaustauscher III e Amberlit IRA-900, enquanto que para Ion Exchange Resins C-106, Amberlite IRC-50, Ionenaustauscher I e Lewatit: 0; 8,78; 3,08 e 5,0%, respectivamente. Ao final de 3h de imobilização, os melhores resultados foram de 100% ( $52,25U/g_{\text{suporte}}$ ) para as resinas com permutador de íons III (Ionenaustauscher III) e Amberlit IRA-900. Imobilização de 57,24% ( $29,91U/g_{\text{suporte}}$ ) foi encontrada para a resina com permutador de íons I (Ionenaustauscher I).

Dentro da engenharia enzimática, o que se busca através da imobilização de enzimas em suportes insolúveis são o prolongamento da vida útil do biocatalisador, o aumento da sua estabilidade e da carga enzimática no reator. Desta forma, além de minimizar os custos de produção do biocatalisador e do processo de separação de produto final, pode-se reduzir significativamente o volume do reator (CARDIAS, 2000). Esta técnica também facilita a recuperação da enzima do meio reacional, possibilitando sua posterior reutilização (YAHYA *et al.*, 1998).

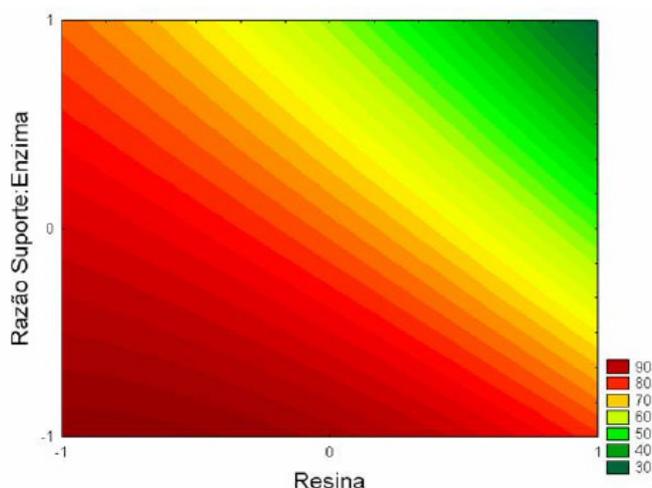
Com base em experimentos preliminares, foi feito, paralelamente aos experimentos de imobilização já mencionados, um estudo utilizando planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  com triplicata do ponto central (Tabela 14 no item 5.11) com as resinas Ionenaustauscher III e Ionenaustauscher I. Na Tabela 25 são mostrados os efeitos e seus respectivos índices de significância (p) encontrados na análise estatística dos resultados.

**Tabela 25.** Efeitos e índices de significância encontrados para as variáveis utilizadas no planejamento experimental  $2^2$ .

Variável	Efeito	p
Resina (L)	0,39	0,011*
Resina (Q)	0,12	0,203
S:E (L)	0,43	0,009*
Resina (L) x S:E (L)	0,16	0,060

\* Valores significativos; **S:E**: Razão suporte e volume de extrato enzimático; **L**: Efeito linear; **Q**: Efeito quadrático.

Através da análise dos resultados, o tipo de resina e a razão suporte:enzima apresentaram efeito significativo na resposta de imobilização. Um incremento de 0,39 unidades foi o resultado observado quando se utilizou a resina Ionenaustauscher III. Na Figura 24 é possível confirmar o maior potencial de imobilização da lipase produzida por *Burkholderia cepacia* por esta resina.



**Figura 24.** Curva de contorno para porcentagem de imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em função do tipo de suporte e razão suporte:enzima.

Na representação gráfica das curvas de contorno (Figura 24), pode ser observado que os bons resultados de imobilização da lipase ocorreram com a resina Ionenaustauscher III. Observa-se redução considerável da quantidade de lipase não imobilizada (proporção suporte:enzima, 2:45), uma vez que a resina Ionenaustauscher I apresentou resultados inferiores na imobilização.

Após a imobilização da lipase, foram feitos alguns testes para verificar sua estabilidade nas resinas. Observou-se que a atividade hidrolítica permaneceu constante, indicando que o tipo de resina e as condições empregadas podem ser utilizados no processo em estudo. Segundo GUIBAN *et al.* (1988), um dos fatores decisivos para que durante o processo de imobilização a enzima não perca sua atividade é a existência de uma congruência geométrica adequada entre enzima e suporte. Em todo processo de estabilização deve existir acoplamento adequado entre as partes reativas para permitir a estabilização da estrutura enzimática por união covalente multipontual, sem provocar distorções graves na mesma.

Geralmente a união covalente multipontual é um método apropriado e suficiente para obter a estabilidade de enzimas de estruturas simples (GUIBAN *et al.*, 1993). Existem muitos outros casos onde as enzimas de interesse são proteínas multiméricas,

que apresentam dificuldades adicionais para serem estabilizadas devido à complexidade de sua estrutura e características específicas de seu mecanismo de desativação. A estabilização deste tipo de enzima requer novos tipos de estratégias dirigidas, fundamentalmente, para evitar a dissociação das subunidades que formam a proteína.

Os resultados encontrados no presente trabalho mostram-se bastante promissores no que se refere à técnica de imobilização de lipase, uma vez que é de extrema importância para catálise de reações.

## 6.6.2. Imobilização em resinas hidrofóbicas

### 6.6.2.1. Caracterização das micropartículas

O suporte polimérico utilizado nos testes de imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* foi produzido por meio de copolimerização com estireno-divinilbenzeno, gerando desta forma micropartículas com diferentes propriedades, dentre elas a porosidade e o grau de entrelaçamento. As micropartículas foram previamente produzidas e caracterizadas no Laboratório de polímeros da Universidade de Salamanca - Espanha.

Na Tabela 26 são mostradas as proporções de divinilbenzeno (DVB),  $S_{BET}$  e os resultados encontrados na etapa de determinação da porosidade das resinas utilizadas para a imobilização da lipase.

**Tabela 26.** Características das micropartículas submetidas à caracterização.

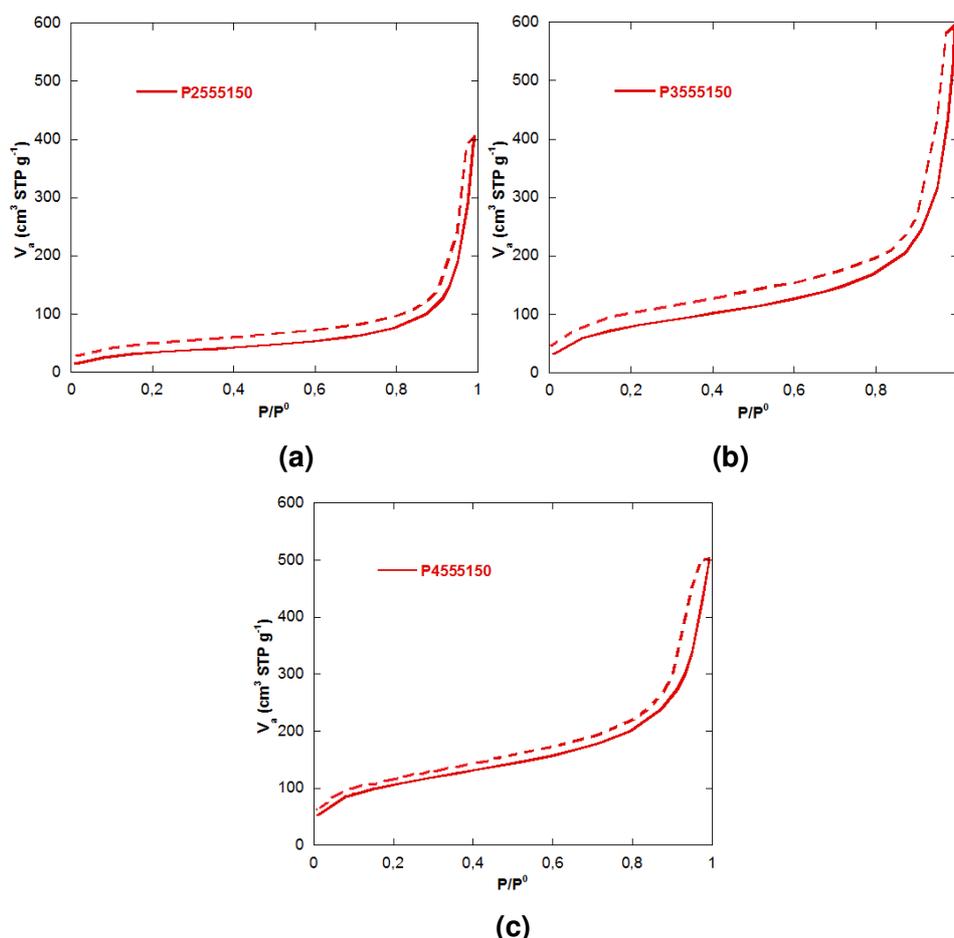
Resina	%DVB	Fm	$S_{BET}$ ( $m^2g^{-1}$ )	$V_{micro}$	$V_{meso}$	$V_{macro}$
				( $cm^3g^{-1}$ )	( $cm^3g^{-1}$ )	( $cm^3g^{-1}$ )
P2555150	25	0,55	115,7	0,007	0,290	0,328
P3555150	35	0,55	279,8	0,026	0,468	0,421
P4555150	45	0,55	361,6	0,064	0,465	0,245

%DVB: proporção de divinilbenzeno (agente de entrelaçamento) na mistura monomérica; Fm: proporção de mistura monomérica na fase orgânica;  $S_{BET}$ : superfície específica das micropartículas;  $V_{micro}$ : volume de microporo;  $V_{meso}$ : volume de mesoporo;  $V_{macro}$ : volume de macroporo.

Se as razões de reatividade dos dois monômeros forem muito diferentes, haverá consumo maior de um dos monômeros e conseqüentemente isto irá afetar a composição do copolímero.

A distribuição do tamanho dos poros é um parâmetro importante para o estudo da estrutura porosa, uma vez que está intimamente relacionada com a área total do sólido, pois quanto maior for a porosidade da partícula maior será sua área superficial. Dessa maneira, a porosidade da partícula pode facilitar o processo de difusão.

As características estruturais das micropartículas foram feitas através de isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77K e suas isotermas estão apresentadas na Figura 25.



**Figura 25.** Isotermas de sorção de nitrogênio nas micropartículas macrorreticulares. Resinas com 25% de DVB – P2555150 (a), 35% de DVB – P3555150 (b) e 45% de DVB – P4555150 (c).  $V_a$ : Volume nitrogênio adsorvido;  $P/P^0$ : Pressão relativa.

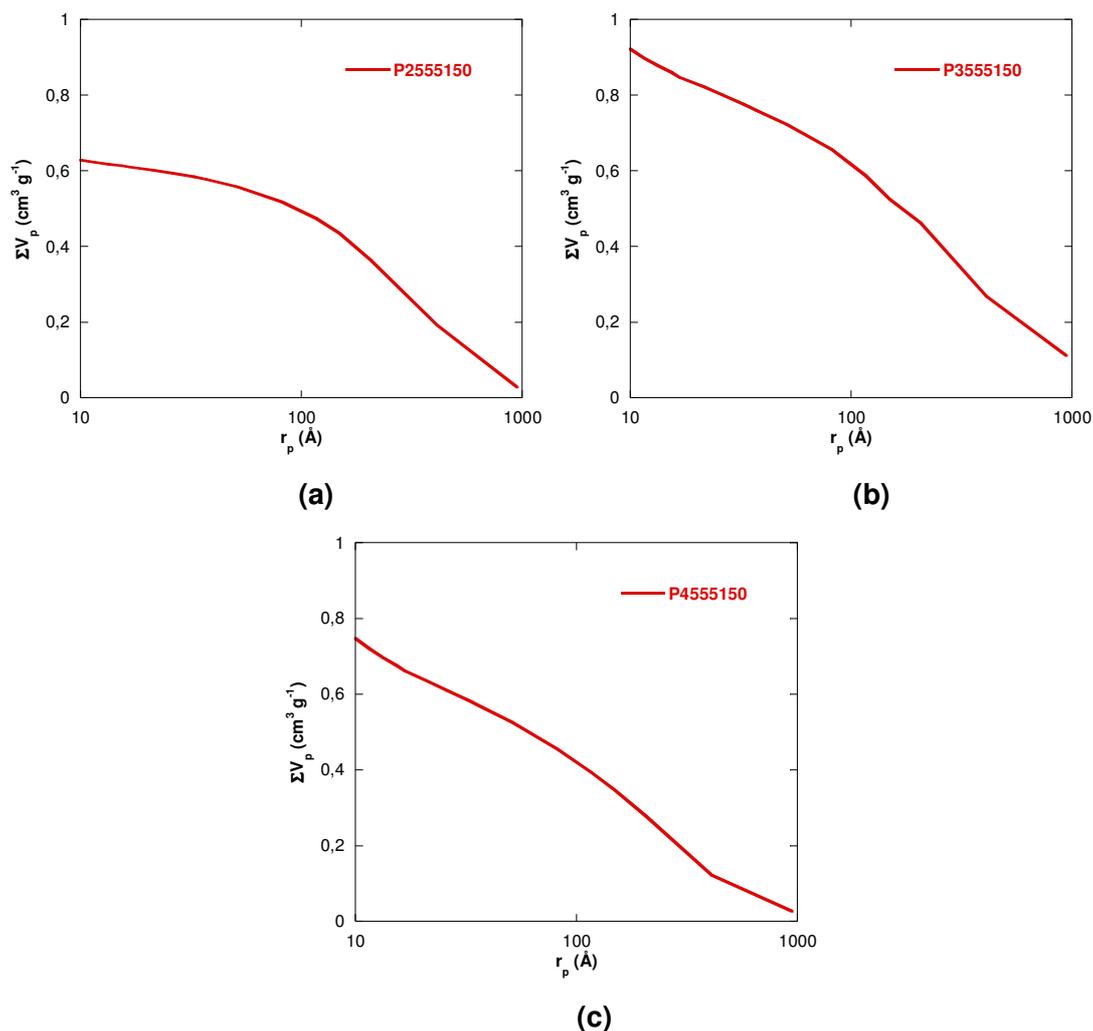
Por meio das isotermas de adsorção e desorção de N<sub>2</sub> foi analisada alterações na estrutura das micropartículas. Este processo é capaz de estudar as mudanças físicas na estrutura da superfície da matriz, bem como as modificações nos poros.

As micropartículas produzidas apresentaram comportamento característico de isotermas do tipo IV. Estas isotermas se caracterizam por apresentar uma curva de histerese que está associada com a condensação por capilaridade. Diferentes tipos de histerese podem ser encontrados (LEE *et al.*, 1996). Já as isotermas do tipo I (reversível) relaciona-se a sólidos microporosos, que apresentam pequena área superficial. O tipo II relaciona-se a adsorventes não porosos ou macroporosos. O tipo III não é comum, entretanto há vários sistemas (por exemplo, nitrogênio em polietileno) que dão isotermas com curvatura gradual com indistinto ponto B. O ponto B é o início da linearidade e freqüentemente indica o estágio na qual a sorção da monocamada está completa e a sorção sobre multicamada começa a ocorrer (BARRETT *et al.*, 1951). O tipo V, obtido com certos adsorventes porosos, também é incomum e está relacionado ao tipo III em que há interação adsorvente–adsorvente. E o tipo VI, em que a agudez das etapas depende do sistema e da temperatura, geralmente representa a sorção de uma multicamada sobre uma superfície não porosa.

Parâmetros como área superficial, volume específico do poro, distribuição do tamanho e área do poro e tamanho de partículas são fundamentais para a caracterização física dos materiais preparados, visto a sua funcionalidade como colunas cromatográficas.

A distribuição de poros dá uma noção sobre a reatividade de grupos silanóis livres disponíveis para reação com outras moléculas (JAL *et al.*, 2004). Isto explica também as características de sorção. A caracterização da porosidade por meio de isotermas de sorção de N<sub>2</sub> permite determinar a distribuição de tamanho de poros de amostras contendo microporos, mesoporos e macroporos.

A tendência do aumento do volume de microporos é observada pelo efeito da adição de DVB no sistema de síntese e pelo aumento da superfície específica das micropartículas. Observa-se que o maior volume de poros foi encontrado nas partículas que sofreram copolimerização com 35% de DVB. As curvas de volume de poros cumulativas são mostradas na Figura 26.



**Figura 26.** Curvas cumulativas dos volumes de poros das micropartículas. Resinas com 25% de DVB – P2555150 (a), 35% de DVB – P3555150 (b) e 45% de DVB – P4555150 (c).  $\Sigma V_p$ : Somatório do volume de poros por massa de resina;  $r_p$ : Raio dos poros.

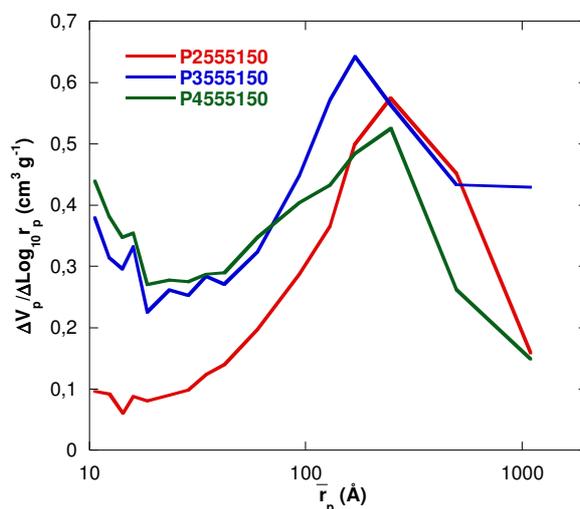
A copolimerização é um tipo de polimerização na qual é formado um polímero derivado de mais de uma espécie de monômero (copolímero) é formado. A copolimerização permite sintetizar grande quantidade de polímeros e é muito usada para obter um melhor balanço de propriedades para aplicações industriais.

Vários polímeros têm sido empregados na preparação de micropartículas. Dentre estes estão os poliésteres alifáticos, copolímeros do ácido metacrílico, dos ésteres

acrilatos, além dos alginatos e as quitosanas e diferentes polissacarídeos, tais como a celulose e seus derivados (LINHARD, 1988).

A distribuição de tamanho e de volume de poros, em função do diâmetro de poro, pode ser calculada a partir da pressão relativa na qual os poros são preenchidos com o líquido proveniente da condensação de um gás. O processo inverso, ou seja, a evaporação do líquido contido no poro também pode ser utilizada (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Na Figura 27 são apresentadas as curvas de distribuição de tamanho de poros para as micropartículas utilizadas.



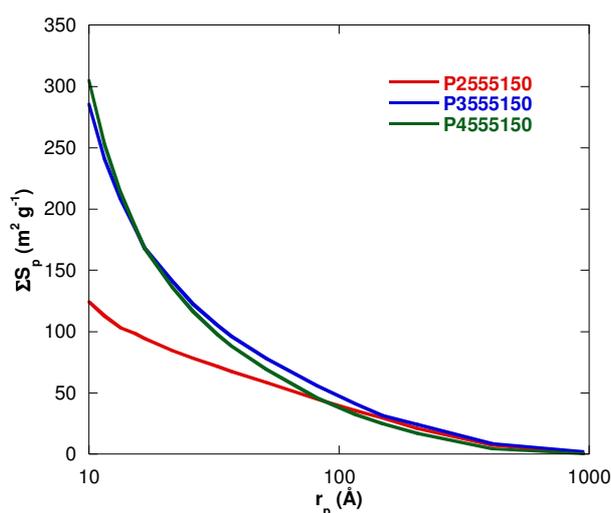
**Figura 27.** Distribuição de tamanho de poro em função do volume de poro das micropartículas. Resinas com 25% de DVB – P2555150, 35% de DVB – P3555150 e 45% de DVB – P4555150.  $\Delta V_p / \Delta \text{Log}_{10} r_p$ : Variação de volume dos poros pela variação do  $\text{log}_{10}$  do raio dos poros;  $r_p$ : Raio dos poros.

O fenômeno de adsorção é feito para de se obter informações sobre a área específica e a estrutura porosa de um sólido e, para tal, a construção de uma isoterma de adsorção é de fundamental importância, pois sua forma revela muitos detalhes sobre as características do material. Assim, a isoterma mostra a quantidade molar de gás

adsorvida ou dessorvida pelo sólido a temperatura constante, em função da pressão de gás. Por convenção, costuma-se expressar a quantidade de gás adsorvida pelo seu volume em condição padrão de temperatura e pressão, enquanto a pressão é expressa pela pressão relativa  $P/P_0$ , ou seja, a relação entre a pressão de trabalho e a pressão de vapor na temperatura utilizada (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Como mostrado na Figura 27, observa-se maior distribuição de tamanho de poro entre 100 e 200Å. A distribuição observada para as micropartículas com 25% de DVB apresentou distribuição unimodal. No entanto, as micropartículas com 35 e 45% de DVB apresentam distribuição bimodal, com contribuição significativa dos poros próximos a 10Å.

A área superficial cumulativa dos poros está mostrada na Figura 28. As áreas superficiais foram obtidas a partir dos resultados de volume cumulativo de poros.



**Figura 28.** Área superficial cumulativa dos poros referentes as resinas com 25% de DVB – P2555150, 35% de DVB – P3555150 e 45% de DVB – P4555150.  $\Sigma S_p$ : Somatório da área superficial por massa de resina;  $r_p$ : Raio dos poros.

A área cumulativa das partículas sintetizadas foi semelhante para poros maiores que 100Å. Já para poros cujos diâmetros estavam abaixo deste valor, a área cumulativa das micropartículas com 35 e 45% de DVB foram muito parecidas e mais altas que quando comparada com resinas adicionadas de 25% de DVB.

CARDOSO *et al.* (2004) observaram que o aumento do teor de DVB nos copolímeros metacrilato de metila:DVB produziu estruturas com maiores valores de área específica, devido à formação de estruturas mais reticuladas com poros de diâmetros menores.

PAYNAM *et al.* (2003) mencionam a importância do estudo da área superficial de micropartículas, correlacionando-as com seu tamanho. A medida que o tamanho das partículas é reduzido, a área da superfície em função do volume de sólido aumenta, facilitando desta forma o contato e a penetração de líquido no seu interior.

Dentro da caracterização de estruturas porosas de micropartículas, a área específica, o tamanho e volume de poros são os principais parâmetros utilizados para determinação quantitativa, em especial a adsorção de nitrogênio. Portanto, quando um sólido é exposto a um gás ou vapor em um sistema fechado à temperatura constante, o sólido passa a adsorver o gás, ocorrendo assim aumento da massa do sólido e decréscimo da pressão do gás. A quantidade de gás adsorvida pode ser calculada pela diminuição da pressão por meio da aplicação das leis dos gases ou pela massa de gás adsorvida pelo sólido (KNAEBEL, 1995).

#### **6.6.2.2. Efeito do tipo de tratamento preliminar da resina na adsorção de lipase**

Na imobilização solução aquosa de lipase em micropartículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB ativadas com metanol foi observada imobilização de 100% da lipase. Os resultados de imobilização utilizando diferentes formas de ativação (Item 5.10) são mostrados na Tabela 27.

A imobilização feita com micropartículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) mostrou que o uso de metanol foi a forma mais eficiente de ativação, quando comparado ao uso de n-heptano e hexano. Este fato se deve a incorporação do metanol nos poros da resina, em lugar do ar. A presença do ar impede a interação da enzima com a área superficial dos poros. No caso das moléculas de hexano e n-heptano, por serem moléculas maiores e de caráter hidrofóbico, favoreceram a formação de uma película na superfície das micropartículas, dificultando a imobilização da lipase. Isto pode ser

verificado através dos experimentos de imobilização da lipase sem a presença destes solventes.

**Tabela 27.** Resultados de imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em resinas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) submetidas a diferentes formas de ativação.

Resina	Forma de ativação	Imobilização (%)	Meio de solubilização da lipase
25% DVB	Hexano	5,4	Água destilada
25% DVB	n-heptano	4,2	Água destilada
25% DVB	Metanol	98,6	Água destilada
35% DVB	Metanol	100,0	Água destilada
35% DVB	Metanol	76,9	n-heptano
35% DVB	Nenhum	20,6	n-heptano
45% DVB	Metanol	49,4	Água destilada

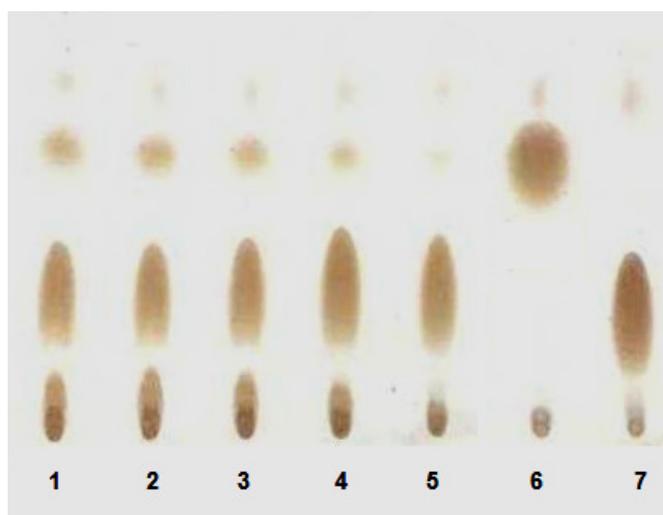
Pode-se observar que, de acordo com a caracterização das micropartículas, a imobilização da lipase está correlacionada com o volume de macroporos, ou seja, quanto maior o volume de macroporo, maior é o grau de imobilização da enzima (0,421 e 0,245  $\text{cm}^3\text{g}^{-1}$  para micropartículas com 35 e 45% de DVB, respectivamente). Para verificar mais precisamente esta correlação, o processo de imobilização deve ser repetido com solução enzimática mais concentrada na resina com 35% de DVB. Isto visando a capacidade máxima de adsorção da lipase, uma vez que de acordo com as condições estabelecidas no item 5.10 ocorreu imobilização completa da enzima nestas micropartículas.

Sabe-se que a imobilização de enzimas é caracterizada pelo confinamento destas em determinado material. Este processo pode ocorrer de diferentes maneiras. Grande número de suportes pode ser utilizado para imobilização de lipases, porém um fator determinante para sua escolha é a capacidade de retenção da enzima e sua atividade após vários usos. Desta forma foram feitos testes de reutilização da lipase imobilizada para verificar seu potencial de reuso.

## 6.7. Reação de transesterificação

### 6.7.1. Efeito do pH e da concentração de água na reação de transesterificação com lipase livre de *Burkholderia cepacia*

Na Figura 29 são mostrados os cromatogramas dos experimentos para avaliar o efeito do pH na reação de transesterificação de acordo com a metodologia descrita no item 5.12.1. Na Figura se verifica que quanto menor o pH, mais favorecida é a reação.



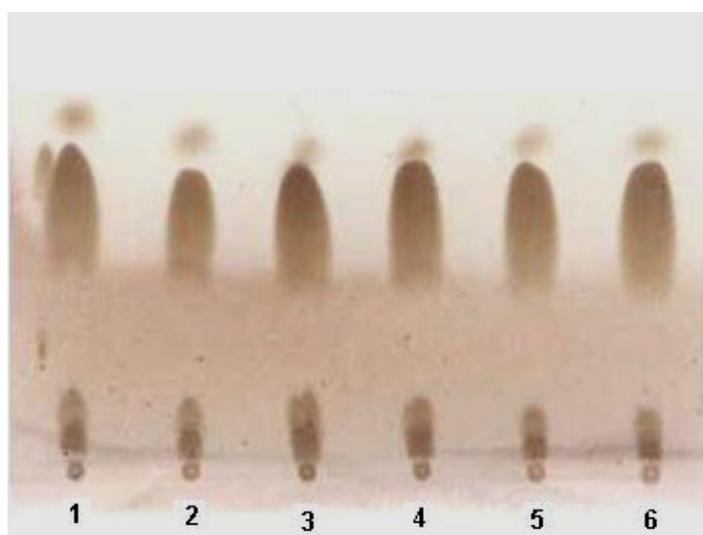
**Figura 29.** Cromatografia de camada delgada para experimentos utilizando extrato enzimático e diferentes pHs. Tampão fosfato pH 6,0 (1), 6,5 (2), 7,0 (3), 7,5 (4), 8,0 (5); Padrão de biodiesel (6) e óleo de soja (7).

As enzimas sofrem os mesmos efeitos estruturais observados com as proteínas globulares pela variação de pH e de temperatura. Mudanças de pH podem alterar a estrutura da enzima devido a uma repulsão de cargas. Por outro lado, as mudanças de pH que não afetam totalmente a estrutura de uma enzima podem diminuir sua atividade apenas por estar afetando resíduos do sítio catalítico.

Outra consideração que se deve ter em conta quando se avalia os resultados da Figura 29 é o fato da possível existência de grupos ionizáveis no sítio ativo, o que pode

afetar as ligações entre o substrato e a enzima, afetando conseqüentemente a velocidade de síntese.

Muitos trabalhos mostram que a presença bem como a concentração de água no meio reacional de transesterificação, é um fator que pode influenciar significativamente o rendimento da reação. A metodologia para avaliação da concentração de água na síntese do biodiesel está descrita no item 5.12.1 e seus cromatogramas são mostrados na Figura 30.



**Figura 30.** Cromatografia de camada delgada para experimentos utilizando diferentes concentrações de água no meio reacional de transesterificação. (1) 0,5mL; (2) 1,0mL; (3) 2,0mL; (4) 3,0mL; (5) 4,0mL e (6) 5,0mL de água destilada.

Visto que a faixa de concentração de água utilizada no meio reacional para a síntese do biodiesel não apresentou aparentemente grande influência no rendimento da reação, foi elaborado um planejamento experimental completo  $2^2$ , com duplicata no ponto central, mais os pontos axiais para avaliar o efeito do pH e do volume de extrato enzimático no meio reacional. Na Tabela 28 é mostrada a matriz codificada, bem como os resultados encontrados para o planejamento experimental.

**Tabela 28.** Matriz codificada e resultados do planejamento experimental completo  $2^2$  mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel utilizando lipase livre de *Burkholderia cepacia*.

Experimento	Variável		Produto (%)
	pH	[E]	
1	-1	-1	21,68
2	+1	-1	40,20
3	-1	+1	24,64
4	+1	+1	36,56
5	0	0	30,03
6	0	0	40,67
7	-1,4142	0	57,03
8	+1,4142	0	23,70
9	0	-1,4142	23,16
10	0	+1,4142	23,16

[E]: Volume de extrato enzimático bruto com atividade de  $1,12\text{U.mL}^{-1}$ .

Na resposta do planejamento experimental foi verificado efeito significativo para as variáveis utilizadas na reação de transesterificação. O efeito linear negativo, observado para o pH (Tabela 29), mostra que o meio reacional em condições mais ácidas favorece a síntese do biodiesel. Já quanto o volume de extrato enzimático, os melhores resultados foram encontrados próximo do ponto central, devido ao efeito da concentração de água presente no meio.

**Tabela 29.** Efeitos do pH e do volume de extrato enzimático encontrados a partir do planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  para a síntese de biodiesel utilizando lipase livre.

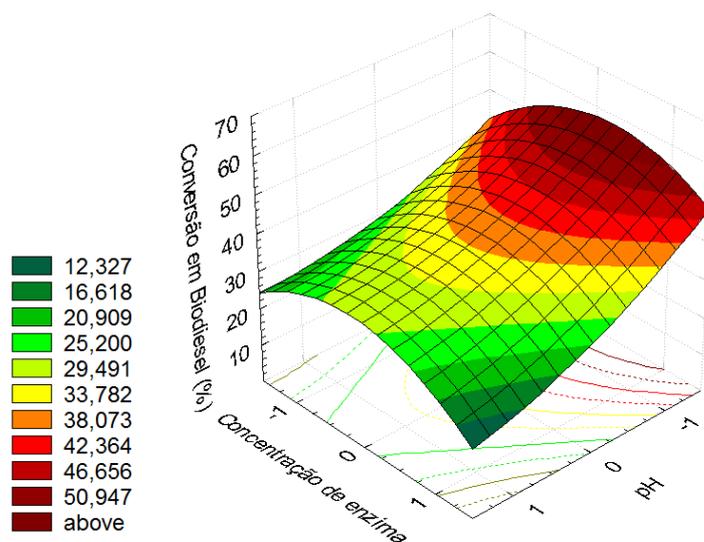
Variáveis	Efeito	p
[E]	-19,39*	0,0047
pH	-12,68**	0,0485

(\*) Efeito linear; (\*\*) Efeito quadrático.

Para obtenção de maiores rendimentos na reação de transesterificação de óleos vegetais é necessário promover o controle da quantidade ótima de água no sistema reacional.

A reação de hidrólise com triglicerídeos envolve a presença de moléculas de água para produzir glicerol e ácidos graxos, porém a concentração ótima de água no meio reacional deve ser suficientemente baixa para minimizar a formação de tais produtos, mas deve ser suficiente para que a enzima permaneça totalmente ativa para transesterificação.

O deslocamento do equilíbrio da reação, no sentido da reação inversa é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional (PANDEY *et al.*, 1999). De acordo com os experimentos, a quantidade de água adequada para a síntese estaria em torno de 42%. Os resultados são mostrados na Figura 31.



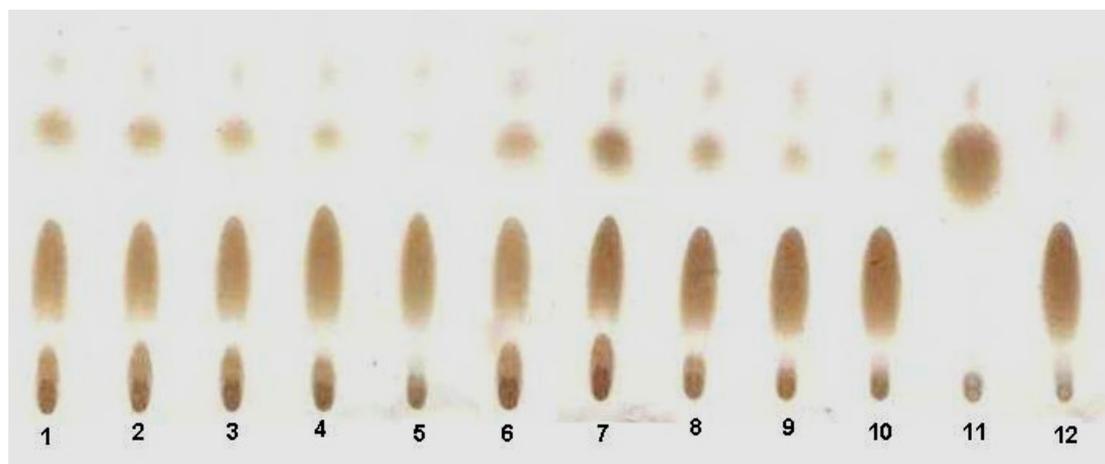
**Figura 31.** Superfície de resposta do planejamento experimental completo  $2^2$  para a síntese de biodiesel utilizando lipase livre de *Burkholderia cepacia*.

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica por muitas vezes não requer co-fatores, atuarem em ampla faixa de pH, serem estáveis e apresentarem especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade (PANDEY *et al.*, 1999). Porém, pode-se observar na Figura 31 que a reação apresentou faixa de pH restrita na síntese do biodiesel. A reação foi favorecida significativamente pela condução da reação em pH 6,0.

#### 6.7.2. Efeito da adição de agente emulsificante no meio de reação de transesterificação utilizando lipase livre de *Burkholderia cepacia*

Outra característica cinética de ativação da lipase na presença de substratos insolúveis em água se dá pela presença de uma interface lipídio/água (SARDA & DESNUELLE, 1958). Segundo SARDA & DESNUELLE (1958), as lipases seriam ativadas na presença destes ésteres sob a forma de emulsão, enquanto que as esterases não. Na Figura 32 podem ser observados os resultados para os experimentos conduzidos sob a

incorporação de goma arábica no meio reacional (Item 5.12.2), de forma a favorecer a formação de uma emulsão e avaliar o efeito desta na reação de transesterificação.



**Figura 32.** Cromatografia de camada delgada para os experimentos utilizando extrato enzimático e diferentes pHs na presença de goma arábica no meio reacional. (1 a 5 – Reações conduzidas com tampão fosfato pHs 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 sem a adição de goma arábica. 6 a 10 – Reações conduzidas com tampão fosfato pHs 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 com a adição de goma arábica; 11 – Padrão de biodiesel; 12 – Óleo de soja).

A presença de solução de goma arábica proporcionou sensível aumento no rendimento da reação (devido ao aumento da intensidade das manchas observadas no cromatograma da Figura 32), devido à alteração da miscibilidade entre o óleo de soja, o álcool e a solução de enzima livre. Esta observação é de extrema importância, visto que a emulsificação dos componentes do meio reacional favoreceu a síntese do biodiesel, devido o aumento da área superficial de contato.

### 6.7.3. Efeito do pH e da concentração de lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia* na reação de transesterificação

Para verificar o efeito do pH na reação de transesterificação utilizando enzima imobilizada, foi elaborado um planejamento experimental completo  $2^2$  com duplicata no ponto central mais os pontos axiais (Tabela 16 do item 5.12.3) utilizando resina Ionenaustauscher III. Diferentes massas de resina com lipase imobilizada foram previamente preparadas para a realização do experimento. A matriz codificada e os resultados encontrados no planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  são mostrados na Tabelas 30.

**Tabela 30.** Matriz codificada do planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  com duplicata no ponto central, mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel utilizando lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia*.

Experimento	Variável		Produto (%)
	pH	[E]	
1	+1	1,5	10,07
2	-1	1,5	36,23
3	+1	0,5	8,42
4	-1	0,5	17,10
5	0	0	20,94
6	0	0	23,10
7	-1,4142	0	32,79
8	+1,4142	0	14,75
9	0	-1,4142	10,91
10	0	+1,4142	39,46

[E]: Atividade enzimática imobilizada.

Através da análise dos resultados verificou-se que tanto a concentração de lipase quanto o pH do meio reacional apresentaram efeitos significativos na resposta. Foi observado que a diminuição do pH e o aumento da concentração lipase favoreceu a

conversão do óleo de soja em biodiesel. NOUREDDINI *et al.* (2005) em estudos realizados com lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia* observaram acréscimo significativo de conversão em biodiesel até concentração de  $150\text{mg}\cdot 10\text{mL}^{-1}$  de óleo de soja. Os efeitos referentes aos resultados do planejamento experimental podem ser observados na Tabela 31.

**Tabela 31.** Efeitos do pH e da concentração de enzima encontrados a partir do planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  com duplicata no ponto central, mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel utilizando lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia*.

Variáveis	Efeito	p
[E] (L)	-15,030*	0,024
[E] (Q)	-1,386	0,816
pH (L)	15,250*	0,023
pH (Q)	0,007	0,998
[E] (L) x pH (L)	-8,736	0,221

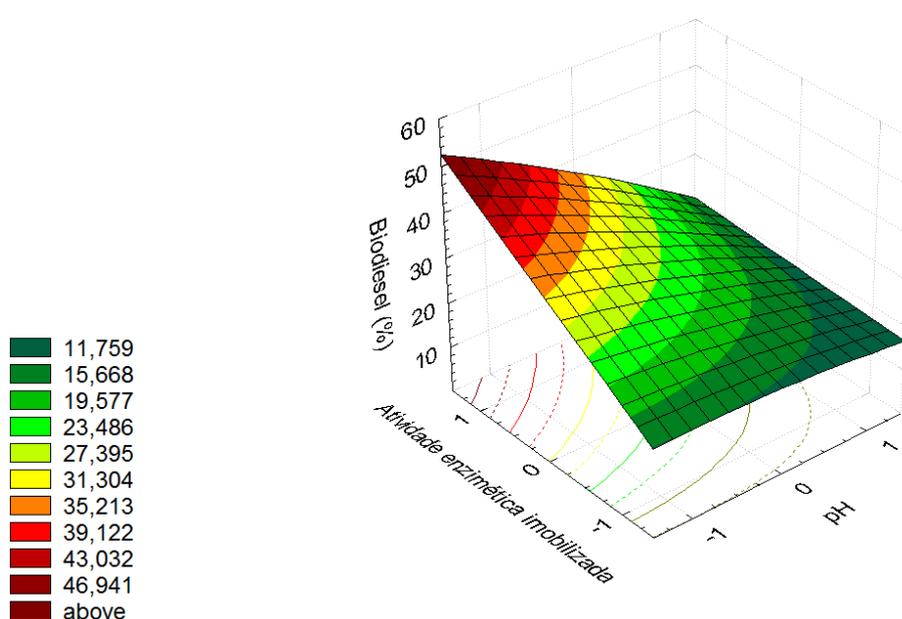
[E]: Concentração de enzima; (L): Efeito linear; (Q): Efeito quadrático; (\*): Efeito significativo.

Além do efeito das variáveis principais do sistema sobre o rendimento da reação, foram também calculados os efeitos decorrentes das interações existentes entre eles. O desvio padrão dos planejamentos feitos com diferentes massas de resina contendo enzima imobilizada e o pH, foram calculados com base nos resultados da duplicata no ponto central, para verificar a repetibilidade do procedimento em relação aos valores de  $R^2$ . Os desvios padrão para o pH e para a concentração de enzima foram 0,28 e 0,20, respectivamente.

O efeito do pH e da concentração de enzima influenciaram estatisticamente sobre o rendimento da reação. Nas melhores condições, os valores de  $R^2$  apresentaram um aumento superior a 0,5% em decorrência do aumento da atividade enzimática imobilizada em pHs inferiores. Portanto, a importância destas variáveis é de grande relevância no estudo de síntese do biodiesel.

Pelo planejamento, foi verificado um aumento de 15,03 pontos percentuais quando a atividade enzimática imobilizada variou do seu nível inferior para o nível superior. Já a diminuição de pH possibilitou aumento de 15,25 pontos percentuais no rendimento da reação, quando este variou do seu nível superior para o nível inferior.

Na Figura 33 é mostrada a superfície de resposta para o planejamento experimental completo  $2^2$  da a síntese do biodiesel.



**Figura 33.** Superfície de resposta utilizando planejamento fatorial completo  $2^2$  com duplicata no ponto central, mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel utilizando lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia*.

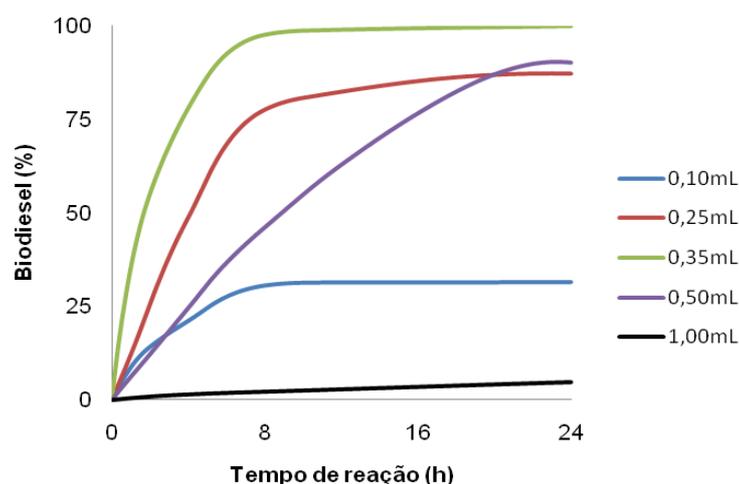
Os resultados da Figura 33 mostram claramente a tendência das melhores condições de síntese do biodiesel. Assim como no uso de lipase livre, a transesterificação com lipase imobilizada teve influência significativa com a variação do pH. Isto mostra que a interação da resina de troca iônica com a enzima não afetou o comportamento da reação em pHs mais baixos.

Estudos relacionados com o efeito do pH no meio reacional para síntese de biodiesel são praticamente inexistentes. As reações de hidrólise são as mais estudadas no que diz respeito a esta variável. Algumas alterações na estrutura da enzima podem ser afetadas, tais mudanças podem influenciar significativamente na atividade enzimática.

Dentre as pesquisas realizadas para a síntese de biodiesel, verifica-se a tendência no uso do óleo de soja e de lipases imobilizadas (ISO *et al.*, 2001). Desta forma esta etapa do presente trabalho vem a contribuir no sentido de enriquecer o tema, devido à utilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em diferentes condições de reação com resinas de troca iônica.

#### 6.7.4. Efeito da concentração de álcool na reação de transesterificação

Para avaliar o efeito da concentração de etanol na reação de síntese do biodiesel foi utilizado Lipozyme RM 1M com diferentes volumes de álcool no meio reacional. Fizeram parte do meio de reação 2,0g de óleo de soja, 0,15g de enzima imobilizada e volume de etanol variando de 0,10 a 1,00mL. Os experimentos foram conduzidos a 40°C durante 24h como descrito no item 5.12.4. Os resultados são mostrados na Figura 34.



**Figura 34.** Biodiesel produzido em função da concentração de etanol utilizado no meio reacional

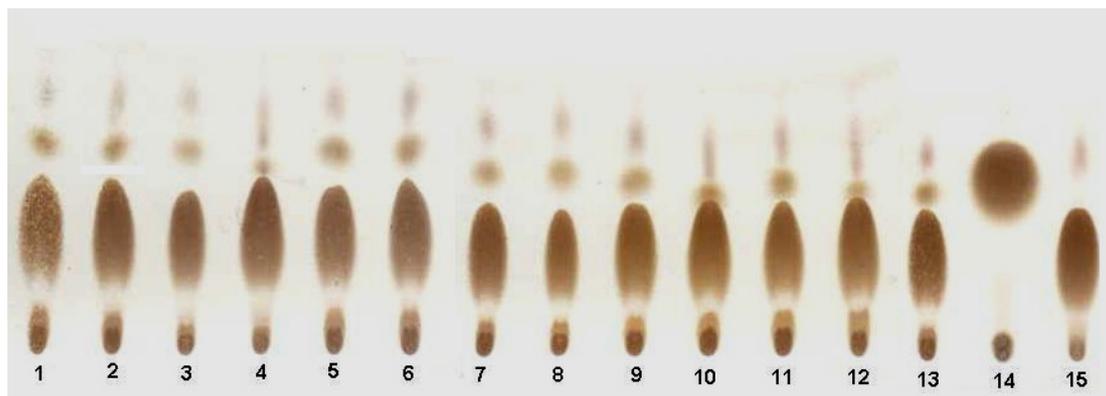
É observado claramente o efeito de inibição que o etanol apresenta em relação a síntese do biodiesel. Esse efeito negativo pode ser atribuído à alta polaridade do álcool, o que ocasiona partição (migração) do álcool para a fase sólida (enzima/suporte), resultando em saturação do microambiente da enzima. Além disso, pode ocorrer redução da disponibilidade do álcool na fase líquida interrompendo a reação de transesterificação. Assim o fenômeno de partição causa modificação do estado original de hidratação enzimática e aparente desequilíbrio entre a eficiência de conversão e disponibilidade do álcool no meio reacional.

Para as condições de reação utilizadas nesta etapa do trabalho, os melhores resultados foram encontrados utilizando 0,25mL de etanol, alcançando praticamente 100% de rendimento em 8h de reação. A utilização de baixas concentrações de álcool, por não ter quantidade estequiométrica necessária para conversão de todo o óleo, apresentou menores rendimentos. Valores muito próximos foram encontrados utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB de acordo como mencionado no item 5.11.

#### **6.7.5. Efeito de íons metálicos na reação de transesterificação**

A catálise enzimática minimiza as reações colaterais de formação de subprodutos, possibilitando a redução de gastos com a posterior purificação do produto final. Porém, algumas enzimas necessitam ou melhoram sua atividade na presença de alguns co-fatores. Estes co-fatores podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas, também chamadas de co-enzimas (CAMPBELL, 1995).

O uso de alguns íons metálicos pode atuar significativamente em algumas reações enzimáticas. Tendo em vistas estas observações, foram realizados testes durante 24h de reação para avaliar o efeito de alguns íons na síntese do biodiesel (Item 5.12.5). Os resultados de cromatografia de camada delgada são mostrados na Figura 35.



**Figura 35.** Cromatografia de camada delgada dos experimentos de transesterificação utilizando íons metálicos no extrato enzimático de reação. Reações na presença de sulfatos de magnésio (1), manganês (2), zinco (3), Sódio (4), potássio e alumínio (5), ferroso (6), cobre (7), cobalto (8), amônio (9) e cálcio (10), reação controle (13), reação controle com  $H_2O_2$  (11), reação controle com goma arábica (12), padrão de biodiesel (14) e óleo de soja (15).

Dentre os íons que apresentaram maior taxa de conversão na reação foram  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $K^+$  e  $Al^{+++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $NH_4^+$  e  $Ca^{++}$ . O sódio foi o único íon que atuou de forma contrária a reação, inibindo desta forma a síntese do biodiesel. Testes na presença de peróxido de hidrogênio e solução de goma arábica apresentaram resultados semelhantes à reação controle.

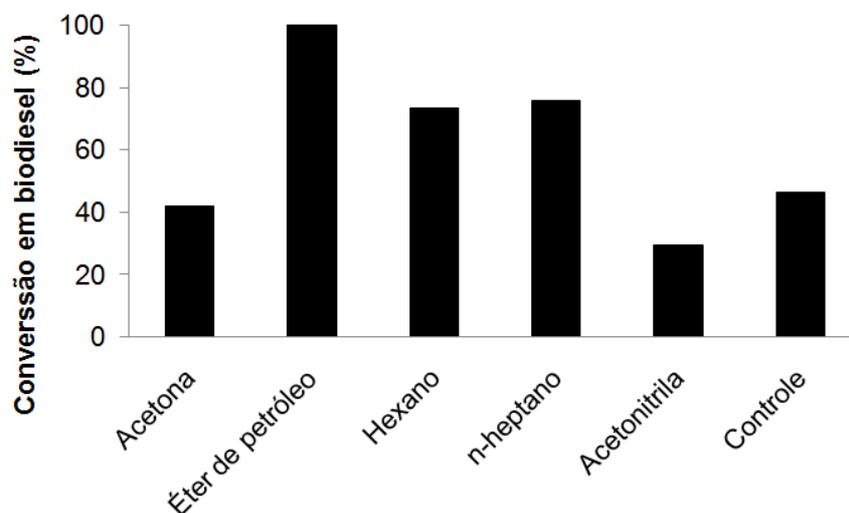
O efeito de alguns íons, como é o caso do íon cálcio, é geralmente considerado benéfico sobre a atividade de lipases. Estes íons são capazes de alterar a conformação da enzima, promovendo o aumento da atividade catalítica (SHARMA *et al.*, 2001). Alguns pesquisadores afirmam a presença do íon pode compensar a repulsão eletrostática na interface orgânica-aquosa entre a enzima e os grupos carboxílicos (SHAHANI, 1975). O acúmulo de ácidos graxos formados pela hidrólise seria outro fator responsável pela repulsão eletrostática na interface.

Muitos estudos com íons metálicos são feitos para minimizar os efeitos negativos associados à reação de síntese do biodiesel por catálise química, porém ainda há poucos estudos relacionados ao uso destes compostos com lipases.

### 6.7.6. Efeito do co-solvente na reação de transesterificação

Estudos com o comportamento das enzimas em sistemas predominantemente aquosos contendo quantidades de solventes orgânicos miscíveis em água vêm sendo cada vez mais pesquisados nos últimos vinte anos. Uma das principais vantagens da catálise enzimática em meio orgânico é a possibilidade de efetuar reações que utilizam substratos pouco solúveis em água. Além disso, é possível deslocar o equilíbrio termodinâmico de reações que não ocorreram em meio aquoso, através da extração dos substratos e/ou dos produtos para a fase aquosa e/ou orgânica ou através da diminuição da quantidade de água do meio reacional.

Visto que a micibilidade dos componentes é de extrema importância nos rendimentos reacionais, esta etapa do trabalho visou estudar diferentes co-solventes para avaliar a sua influência na síntese do biodiesel (metodologia descrita no item 5.12.6). Na Figura 36 são mostrados os rendimentos da reação para os diferentes co-solventes utilizados.



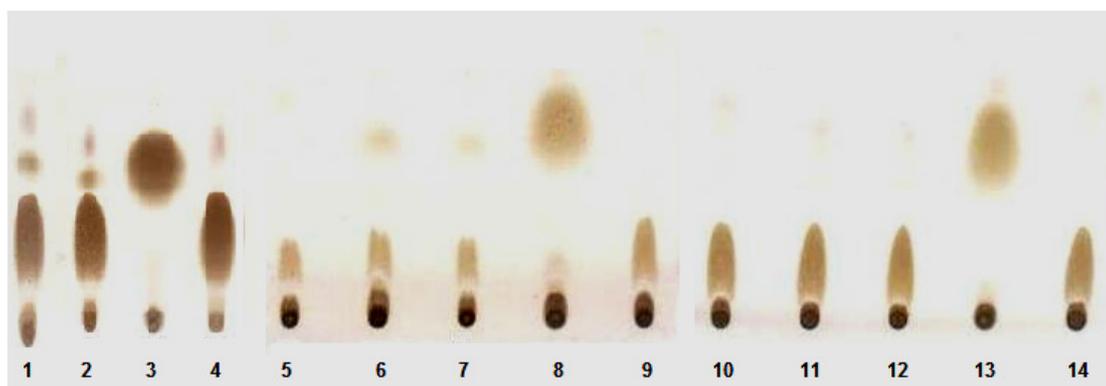
**Figura 36.** Conversão de biodiesel em função do co-solvente utilizado na reação de transesterificação.

Foi observada a conversão total do óleo de soja em biodiesel utilizando éter de petróleo como co-solvente. Os rendimentos da reação nos experimentos utilizando acetona, hexano, n-heptano e acetonitrila foram 41,9, 73,3, 75,9 e 29,5%, respectivamente. Os resultados mostram que a combinação de solventes que compõem o éter de petróleo se mostrou mais adequado para a miscibilidade da mistura reacional, favorecendo desta forma a reação.

Dentro da ordem de polaridade de solventes observa-se que o éter de petróleo assim como o hexano e o n-heptano são os solventes de menor polaridade, sendo estes os que apresentaram os melhores resultados. Na Figura 36 verifica-se que quanto maior a polaridade do co-solvente, menor é o rendimento da reação de síntese do biodiesel.

#### 6.7.7. Efeito da temperatura na reação de transesterificação com lipase livre de *Burkholderia cepacia*

Na Figura 37 observa-se que a temperatura da reação causou uma diminuição considerável na produção de biodiesel. Pode-se notar uma diminuição gradual de síntese de biodiesel em função da inativação da lipase livre presente no meio reacional. A 60°C houve inativação praticamente total da lipase na síntese enzimática.



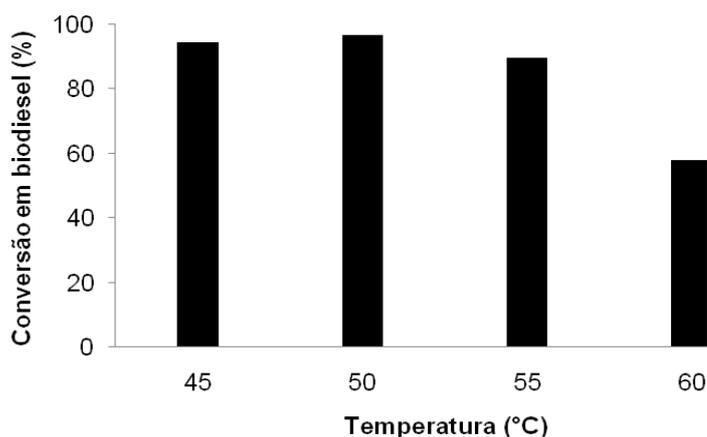
**Figura 37.** Cromatografia de camada delgada para experimentos utilizando extrato enzimático a 40°C (1 e 2), 50°C (5, 6 e 7) e 60°C (9, 10 e 11). Reações controle (1, 5 e 10), adicionadas de goma arábica (2, 6 e 11) e sulfato de potássio e alumínio (7 e 12); Padrão de biodiesel (3, 8 e 13); Óleo de soja (4, 9 e 14).

Qualitativamente observa-se que de 40 a 60°C a atividade de transesterificação diminuiu e isso pode ser explicado devido à inativação da lipase se dar mais facilmente quando presente em meios onde o processo convectivo de transferência de calor se dá de forma mais eficiente. O processo de imobilização normalmente favorece a preservação da atividade do sítio ativo da enzima contra o efeito da temperatura, aumentando desta forma sua estabilidade.

As enzimas são altamente versáteis na catálise de vários tipos de reações, que ocorrem sob condições suaves, normalmente à temperatura ambiente e em pH próximo à neutralidade. As velocidades de algumas reações catalisadas por enzimas podem ser até  $10^{12}$  vezes maiores do que as não catalisadas.

#### 6.7.8. Efeito da temperatura na reação de transesterificação com lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB

Outro teste foi feito utilizando a enzima imobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB para avaliar sua estabilidade após adsorção. Na Figura 38 são mostrados os resultados.



**Figura 38.** Conversão de biodiesel em função da temperatura utilizada na reação de transesterificação.

A partir de 55°C, o rendimento da reação começa a ser prejudicado devido à desnaturação da lipase. Desta forma, observando a influência da temperatura na síntese do biodiesel, optou-se por elaborar um planejamento experimental, tendo como variáveis a concentração de enzima imobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) e a temperatura do meio reacional.

Uma vez que a imobilização da solução aquosa de lipase em resina com 35% de DVB ativada com metanol apresentou os melhores resultados, foi elaborado um planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  mais os pontos axiais (Tabela 17 do item 5.12.8). Os resultados de conversão em biodiesel após 12h de reação do planejamento experimental são mostrados na Tabela 32. A concentração de enzima e a temperatura utilizada nos experimentos variaram respectivamente entre 231 e 693U  $0,1g_{resina}^{-1}$  e 35 e 45°C. Para a imobilização da lipase foi utilizada solução estoque de lipase *Burkholderia cepacia* obtida comercialmente ( $92,0U.mL^{-1}$ ) sob agitação a 12rpm durante 12h. Imobilização de toda a lipase foi observada neste período.

Para todos os ensaios realizados neste experimento, as maiores taxas de conversão foram encontradas nos níveis superiores do planejamento.

**Tabela 32.** Matriz codificada e taxa de conversão de biodiesel para os experimentos do planejamento experimental fatorial  $2^2$  com triplicata no ponto central mais os pontos axiais utilizando lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia*.

Experimento	Temperatura	Atividade imobilizada	Conversão em biodiesel (%)
1	-1	-1	50,18
2	1	-1	53,15
3	-1	1	90,69
4	1	1	99,76
5	0	0	95,23
6	0	0	94,13
7	0	0	94,45
8	-1,4142	0	92,56
9	0	1,4142	99,99
10	1,4142	0	97,11
11	0	-1,4142	28,21

Observando os resultados do planejamento experimental, verifica-se que o efeito da temperatura não foi significativo na resposta de síntese do biodiesel. Esta constatação é de grande importância visto que a enzima manteve-se estável na faixa de temperatura estudada. A partir da análise dos resultados, se verifica que o coeficiente de correlação obtido para o planejamento foi de 0,966, sendo a concentração de enzima a variável significativa no processo a nível de confiança de 95%. A Tabela 33 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o planejamento experimental, onde os parâmetros estatísticos não significativos foram eliminados e adicionados aos resíduos.

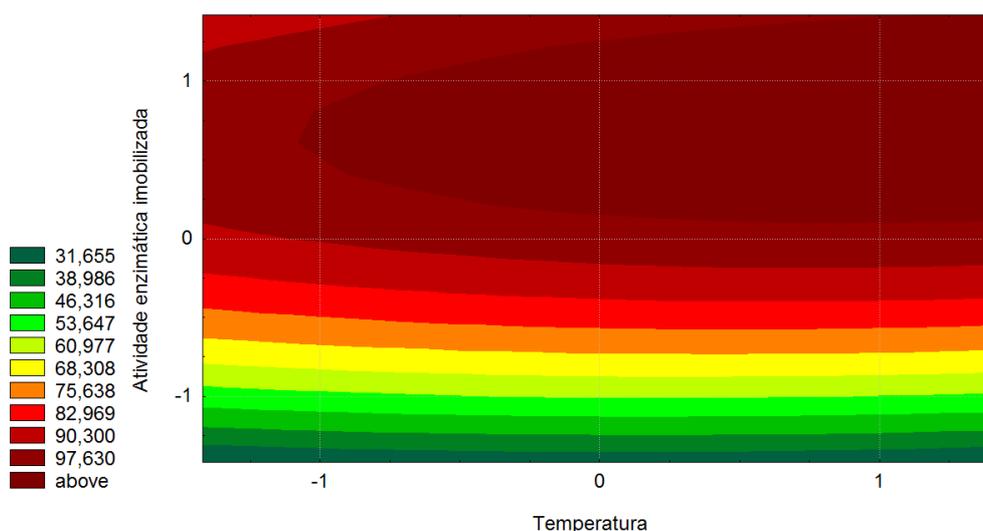
**Tabela 33.** Análise de variância do planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  com triplicata no ponto central mais os pontos axiais para síntese de biodiesel.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F <sub>calculado</sub>	P <sub>calculado</sub>
Regressão	6.100,013	2	3.050,006	147,104	<0,0001
Resíduos	165,869	8	20,733		
Total	6.265,882	10			

Visto que a variação entre os coeficientes de regressão com todos os parâmetros e sem os parâmetros estatisticamente não significativos foi pequena, optou-se por um modelo que não apresentasse parâmetros não significativos. Na Equação 5 é mostrado o modelo das variáveis codificadas representando a conversão de biodiesel (BIO) em função da concentração de enzima (E) e temperatura (T) utilizadas no processo.

$$\text{BIO}(\%) = 93,29 + 23,57E - 16,34T \quad (5)$$

De acordo com os resultados da Tabela 33, o modelo (Equação 5) pode ser validado, mostrando que a porcentagem de variação explicada foi adequada ( $R^2$  95%), onde o  $F_{\text{calculado}}$  para a regressão se apresentou altamente significativo. Uma vez determinado o modelo para o processo de síntese do biodiesel, foi possível construir a curva de contorno da Figura 39 e verificar as melhores condições de reação.

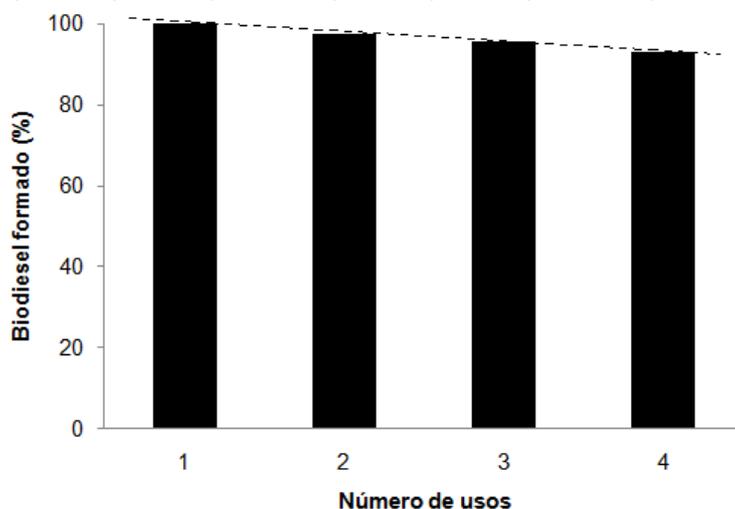


**Figura 39.** Curva de contorno gerada a partir do planejamento experimental fatorial  $2^2$  com triplicata no ponto central mais os pontos axiais para a síntese de biodiesel.

Com relação à atividade enzimática imobilizada, tem-se muito clara a sua influência. O efeito linear positivo de 47,158 vezes na resposta ( $p < 0,0001$ ), mostra o quanto a concentração de lipase imobilizada pode influenciar no rendimento da reação.

#### 6.7.9. Avaliação do número de uso da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em resina hidrofóbica e de troca iônica

O potencial de produção de biodiesel inclui além da atividade e especificidade da enzima a sua reutilização durante vários usos. Experimentos foram feitos com as micropartículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB e mostraram que a sua reutilização apresentou leve decréscimo no rendimento da reação. Este fato deve-se à perda de parte da enzima por lixiviação. Tais resultados puderam ser verificados após segunda determinação dos ésteres sintetizados após manter as amostras (livre do contato com a resina) armazenadas durante dois dias. Na Figura 40, são mostrados os resultados das repetições das micropartículas com lipase imobilizada.



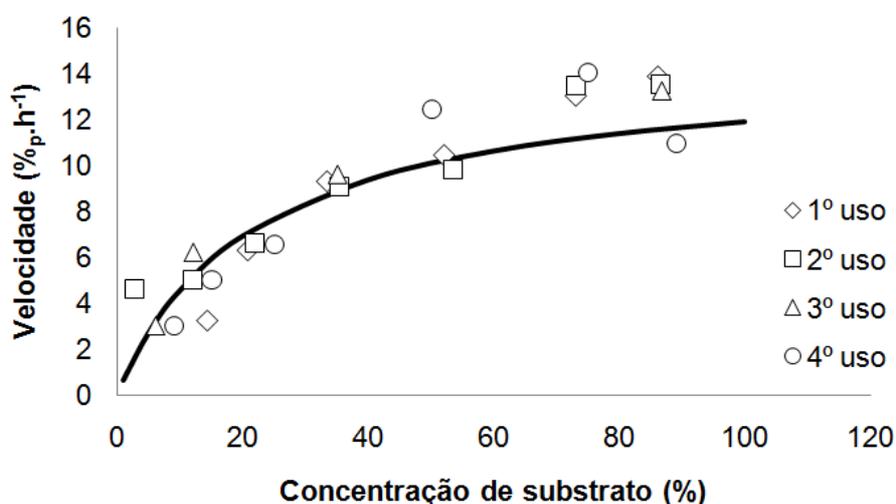
**Figura 40.** Síntese de biodiesel em função do número de usos da resina com lipase imobilizada.

Observa-se na Figura 40 que em todas as reações os rendimentos foram superiores a 90% de conversão. Com a regressão linear feita a partir dos resultados (linha pontilhada na Figura 40), percebemos que a perda de atividade da lipase em função do número de usos seguiu uma função de primeira ordem, como mostrado na Equação 6. Onde  $B_i$  é a porcentagem de conversão em biodiesel referente ao respectivo número de uso da resina ( $U$ ).

$$B_i = -3,017U + 103,1 \quad (6)$$

Apos estabelecer o equacionamento para conversão de biodiesel em função do número de usos da resina, foi possível encontrar valor de 3,017 para constante de perda da atividade enzimática. O tempo de meia vida encontrado para o processo de reutilização da resina com lipase imobilizada foi de aproximadamente 18 usos. Para a determinação deste tempo foi considerado que a conversão em biodiesel após a reutilização da resina foi metade da porcentagem inicial ( $B_i$ ).

Os experimentos realizados nesta etapa do trabalho foram conduzidos com a mesma quantidade substrato (2,1g de óleo de soja e 0,35mL de etanol). A concentração de substrato utilizada para o equacionamento e desenvolvimento dos cálculos foi considerada como sendo 100% subtraídos da quantidade de produto formado num dado momento. Uma vez que os valores de velocidade máxima foram muito próximos, a média destas velocidades foram graficadas em função da concentração de substrato, construindo desta forma a Figura 41.



**Figura 41.** Representação cinética da produção de biodiesel utilizando lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia* em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB. Velocidade: Porcentagem de produto formado em 1h; Linha contínua: Representação esquemática do Modelo de Michaelis-Menten; Pontos: Resultados experimentais.

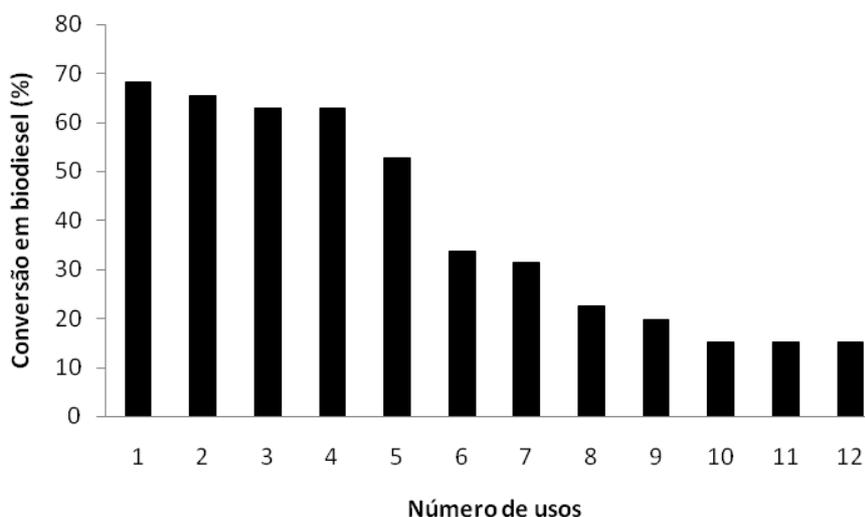
Cabe resaltar que os experimentos não foram feitos da mesma maneira que normalmente se elabora a construção de modelos cinéticos e determinação de seus parâmetros. No modelo de Michaelis-Menten, as reações catalisadas por enzimas são saturáveis, e a sua velocidade inicial de catálise não indica resposta linear face ao aumento de substrato. Se a velocidade inicial da reação é medida sobre uma escala de concentrações de substrato [S], a velocidade de reação (V) aumenta com o acréscimo de

[S]. Todavia, à medida em que a [S] aumenta, a enzima satura-se e a velocidade atinge o valor máximo.

Valores próximos ao modelo de Michaelis-Menten foram encontrados e desta forma o modelo foi derivado de forma análoga para simular as propriedades cinéticas da lipase. A constante  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) e a metade da velocidade máxima da reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ) são os parâmetros cinéticos determinados pela hipérbole. O valor de  $K_m$  representa a concentração de substrato na qual a velocidade máxima e na sua forma mais simples é uma medida da afinidade da enzima pelo substrato. A  $V_{m\acute{a}x}$  é atingida quando todos os sítios ativos estão preenchidos com moléculas do substrato. Porém, fatores como a mudança de viscosidade e a quantidade de produto formada no decorrer da reação são parâmetros que podem ter influenciado nos resultados encontrados, pois são fatores mecânicos que interferem diretamente na atuação da enzima sobre o substrato. Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  determinados na reação foram de 21,98% e 14,56% $\cdot h^{-1}$ , respectivamente. Tais resultados evidenciam afinidade da lipase pelo óleo de soja e conseqüentemente seu potencial de utilização na síntese do biodiesel.

Outro sistema de reutilização da lipase imobilizada foi feito utilizando resina Amberlit IRA-900 em sistema reacional de coluna com leito fixo e recirculação do meio.

Observa-se que à medida que a resina é reutilizada, a conversão do óleo de soja em biodiesel diminui gradativamente. Os resultados são mostrados na Figura 42.



**Figura 42.** Síntese de biodiesel em função do número de usos da resina Amberlit IRA-900 com lipase imobilizada.

Uma das explicações para a perda da atividade observada na Figura 42 é o fenômeno de lixiviação, uma vez que as amostras foram submetidas à mesma análise cromatográfica em diferentes tempos de armazenamento. Após decorrido os intervalos de tempo, a quantidade de biodiesel presente nas amostras foi crescente, mostrando que parte da lipase migrou para o meio reacional.

Considerando que a atividade de transesterificação da lipase imobilizada no tempo inicial, referente ao primeiro uso, era de 100%, tem-se que o número de meia vida do processo de reutilização foi de 6 usos. Este número é considerado baixo para processos industriais que envolvem a obtenção de produtos de valor agregado não muito alto. Alguns fatores importantes e que podem aumentar o número de usos da resina no processo são modificações na vazão de reciclo e geometria do reator.

Dentro da engenharia enzimática o que se busca através da imobilização de enzimas em suportes insolúveis são o prolongamento da vida útil do biocatalisador, o aumento da sua estabilidade e da carga enzimática no reator. Desta forma, além de minimizar os custos de produção do biocatalisador e do processo de separação de produto final, pode reduzir significativamente o volume do reator (CARDIAS, 2000). Esta

técnica também facilita a recuperação da enzima do meio reacional, possibilitando sua posterior reutilização (YAHYA *et al.*, 1998).

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

---

## 7. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram:

- A cepa de *Burkholderia cepacia* foi a que apresentou maior potencial de produção de lipase para transesterificação do óleo de soja e etanol dentre os diferentes microrganismos testados. Os testes de produção de lipase pela *Burkholderia cepacia* mostraram incremento na produção quando o meio de fermentação foi acrescido de óleo de soja. Atividades de 2,29 e 2,43U.mL<sup>-1</sup> em 96 e 120h de fermentação, respectivamente, foram encontradas quando se utilizou fermentador tipo bioflo, sendo este o mais eficiente quando comparados com os demais fermentadores estudados.
- Na produção de lipase também verificou-se que concentrações mais altas de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e água de maceração de milho influenciaram positivamente no processo. Já comportamento contrário foi observado para a adição de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. O tempo e o pH que melhor apresentaram resultados para as fermentações nos erlenmeyers agitados em shaker, foram de 7,0 e aproximadamente 72h, respectivamente.
- Na caracterização da lipase de *Burkholderia cepacia*, os melhores resultados foram encontrados a 37°C e pH 8,0. Avaliando sua estabilidade a 40°C, pode se observar diminuição de 15% na atividade. Já nos tratamentos a 50 e 60°C, a atividade foi afetada significativamente durante a primeira hora de exposição, seguindo modelo de inativação de primeira ordem. A inativação da lipase durante 60, 90 e 120min a 50°C foi respectivamente, 33, 34 e 45%.
- Nos testes de imobilização, os melhores resultados foram encontrados com as resinas Ionenaustauscher I, Ionenaustauscher III e Amberlit IRA-900 (57,24, 100 e 100% de imobilização, respectivamente).
- O peso molecular e o ponto isoelétrico da lipase de *Burkholderia cepacia* foram determinados por eletroforese, foram 31kDa e pH 6,0, respectivamente.
- O volume de microporos foi diretamente proporcional ao aumento da adição de DVB no sistema de síntese das resinas de poli(estireno-co-divinilbenzeno). Observou-se também o aumento da superfície específica e maior volume de poros nas partículas que sofreram copolimerização com 45 e 35% de DVB, respectivamente. Maior distribuição de tamanho de poro permaneceu entre 100 e

200Å, observando distribuição unimodal para as micropartículas com 25% de DVB e bimodal para aquelas com 35 e 45% de DVB, com contribuição significativa dos poros próximos a 10Å. A área cumulativa das partículas sintetizadas foi semelhante para poros maiores que 100Å.

- A imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* feita em micropartículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) mostrou que o uso de metanol foi a forma mais eficiente de ativação da resina, quando comparado ao uso de n-heptano e hexano.
- Nos experimentos de transesterificação, verificou-se que as variáveis estudadas apresentaram efeito na respostas de síntese de biodiesel. O pH, temperatura, concentração de água, concentração de enzima, razão molar de álcool, presença de goma arábica e íons metálicas foram fatores de grande importância no que diz respeito ao rendimento da reação. A diminuição do pH favoreceu a conversão do óleo de soja em biodiesel.
- Em relação ao estudo da concentração de lipase no extrato enzimático, há uma quantidade de água para atingir valor máximo de conversão (aproximadamente 42%). Já a lipase imobilizada em resina Ionenaustauscher III mostrou que, pelo fato da água estar ausente, concentrações mais altas de enzima favoreceu a síntese do biodiesel. Os melhores resultados encontrados no planejamento para estes experimentos foram 39,46 e 57,03% de conversão, utilizando lipase imobilizada e livre, respectivamente. A ausência de água no meio reacional com enzima imobilizada mostra que a sua concentração é o único fator limitante no processo.
- O tipo de co-solvente adicionado no meio reacional para síntese do biodiesel influenciou significativamente no rendimento da reação, mostrando que o éter de petróleo foi o co-solvente que apresentou o melhor resultado de conversão.
- A partir de 55°C o rendimento da reação foi prejudicado devido à desnaturação da lipase. A temperatura mais adequada para a utilização da lipase imobilizada em resina de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com 35% de DVB foi de aproximadamente 50°C. A reutilização desta resina apresentou leve decréscimo no rendimento da reação pela perda de parte da enzima por lixiviação. Estes resultados mostram que a perda da atividade em relação ao número de usos, segue uma função de primeira ordem, na qual a constante de perda da atividade foi de 3,017. O número de usos de meia vida encontrado para o processo foi de

aproximadamente 18 usos e os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  21,98% e 14,56% $_{p.h^{-1}}$ , respectivamente.

- No sistema de reutilização da lipase imobilizada em Aberlit IRA-900, utilizando recirculação do meio reacional, observa-se perda de parte da lipase por lixiviação e o número de usos de meia vida igual a 6.

## **8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Aumento da produtividade de lipase de *Burkholderia cepacia* por meio de modificações genéticas;
- Estudo da viabilidade econômica da produção de lipase em escala industrial utilizando substratos de baixo custo;
- Estudo da viabilidade econômica da produção de biodiesel por via enzimática em escala industrial utilizando lipase de *Burkholderia cepacia*;
- Otimização do processo de produção de biodiesel por via enzimática em escala industrial utilizando lipase de *Burkholderia cepacia* e subprodutos oleosos da indústria de alimentos.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, E.; MITTELBAACH, M.; MARR, R. A low waste process for the production of biodiesel. **Separation Science and Technology**. v. 30, n. 7-9, p. 2021-2033, 1995.

AIRAWA, J. R. **Magnesium: its biological significance**. CRC Press, Boca Raton, 1981.

AKSOY, H.A., KAHRAMAN, I., KARAOSMANOGLU, F., AND CIVELEKOGLU, H. Evaluation of Turkish sulphur olive oil as an alternative diesel fuel. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 65, p. 936-938, 1988.

ALCANTARA, R.; AMORES, J.; CANOIRA, L.; FIDALGO, E.; FRANCO, M.J.; NAVARRO, A. Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow. **Biomass and Bioenergy**. v. 18, p. 515-527, 2000.

ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2001.

AL-ZUHAIR. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**. v. 1, p. 57-66, 2007.

ANTONI, D.; ZVERLOV, V. V.; SCHWARZ, W. H. Biofuels from microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 77, p. 23-35, 2007

ARJUNWADKAR, S.J.; SARVANAN, K.; PANDIT, A.B.; KULKARNI, P.R. Gas-liquid mass transfer in dual impeller bioreactor, **Biochemical Engineering Journal**. v. 1, p. 93, 1998.

ARPIGNY, J.L.; JAEGER, K.E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**. v. 343, n. 1, p. 177-183, 1999.

ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida Antarctica* on different supports: effect of water activity

on enzymatic activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 24, p. 3–12, 1999.

ATKINSON, B.; MAVITUNA, F. (eds). *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. U.K. Macmillan Publishers Ltda. 1983.

BAGLEY, S. T.; GRATZ, L. D.; JOHNSON, J. H.; MCDONALD, J. F. Effects of an oxidation catalytic converter and a biodiesel fuel on the chemical, mutagenic, and particle size characteristics of emissions from an IDI diesel engine. **Environmental Science & Technology**. v. 32, p. 1183 – 1191, 1998.

BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms; **Journal of the American Chemical Society**. v. 73, n. 7, p. 3155-3158, 1951.

BASTIDA A, SABUQUILLO P, ARMISEN P, FERNÁNDEZ-LAFUENTE R, HUGUET J, GUISÁN JM. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 58, p. 486–93, 1998.

BILLAUD, F., DOMINGUEZ, V., BROUTIN, P., AND BUSSON, C. Production of hydrocarbons by pyrolyses of methyl esters from rapeseed oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 72, p. 1149-1154 1995.

BJÖRKLING, F.; GODTFREDSSEN, E.; KIRK, O. The Future Impact of Industrial Lipases. **Trends in Biotechnology**. v. 9, p. 360-363, 1991.

BONN, E.P.S.; PEREIRA JR., N. **Tecnologia enzimática**. Fundação Biblioteca Nacional. Rio de Janeiro. 113 p, 1999.

BOOCOCK DGB. Process of producing lower alkyl fatty acid esters. CA 0112581, 1996.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers; **Journal of the American Chemical Society**. v. 60, p. 309, 1938.

BUCHS, J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. **Biochemical Journal**. v. 7, p. 91–98, 2001.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* Using factorial design. **Bioresource technology**. v. 91, p. 77 – 84, 2004.

CAMPBELL, M. K. **Biochemistry**. 2<sup>a</sup> ed; USA; Saunders Publishing College; 1995.

CANAKCI, M.; ERDIL, A.; ARCAKLIOGLU, E. Performance and Exhaust Emissions of a Biodiesel Engine. **Applied Energy**. v. 83, p. 594-605, 2006.

CANAKCI, M.; GERPEN, J. V. A pilot plant to produce biodiesel from high free fatty acid feedstocks. **Transactions of the ASAE**. v. 46, n. 4, p. 945–954, 2003

CANAKCI, M.; GERPEN, J. V. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acid. **Trans ASAE**. v. 44, n. 6, p. 1429–1436, 2001.

CARDIAS, H. T. C. **Estudo da síntese de antibiótico ( $\beta$ -lactâmicos semi-sintético catalisada por diferentes derivados de penicilina G acilase**. Tese de Doutorado. Universidade de São Carlos, São Carlos – SP, 2000.

CARDOSO, A. M.; LUCAS, E. F.; BARBOSA, C. C. R. Influência das condições reacionais nas características de copolímeros de metacrilato de metila e divinilbenzeno obtidos por polimerização em suspensão. **Polímeros**. v. 14, n. 3, p. 201-295, 2004.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA JR, G. L.; FREIRE, D. M. G. **Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state and submerged fermentations**. Biochemical Engineering Journal. v. 4, p. 239 – 247, 2000.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**. v. 18, n. 5, p. 544-554, 1995.

CHRISTAKOPOULOS, P.; TZIA, C.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 38, p. 194-197, 1992.

CONTI, D. R.; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Biocatálise: Avanços Recentes. **Química Nova**. v. 24; n. 5; p. 672-675, 2001.

CORRÊA, S. M.; ARBILLA, G. Carbonyl emissions in diesel and biodiesel exhaust. **Atmospheric Environment**. v. 42, p. 769-775, 2008.

COSTA, J. A. V. **Produção de Amiloglicosidase por Fermentação em Estado Sólido em Biorreator de Coluna**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP, 1996.

COSTA NETO, P. R. C. **Estudos Preliminares sobre Alterações e Purificação do Óleo de Soja Usado em Frituras Múltiplas**. Curitiba, 114 p. Dissertação de Mestrado; Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química da Universidade Federal do Paraná, 1993.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**. In press, 2006.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**. v. 22, p. 211-219, 2005.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M. CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, p. 657 – 663, 2000.

DAVIS, S. C. **Transportation energy databook**, U. S. Department of Energy, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, U.S.A, 1999.

DORADO, M.P.; BALLESTEROS, E.; ALMEIDA, J. A.; SCHELLET, C.; LOHRLEIN, H. P.; KRAUSE, R. An alkali-catalyzed transesterification process for high free fatty acid oils. **Trans ASAE**. v. 45, n. 3, p. 525–529, 2002.

DORAN, P. M. **Principios de ingeniería de los bioprocesos**. University of New South Wales Sydney, Australia. Editora Acribia, S. A. Zaragoza, Espanha. 1995.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. **Enzyme Microbiology and Technology**. v. 25, p. 194-200, 1999.

DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; LI, Z. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 37, p. 68–71, 2005.

DUBÉ, M.A.; TREMBLAY, A.Y.; LIU, J. Biodiesel production using a membrane reactor. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 639–647, 2007.

DUNN, R. O. Effect of Oxidation Under Accelerated Conditions on Fuel Properties of Methyl Soyate (biodiesel). **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 79, n. 9, p. 915-920, 2002.

ENCINER, J. M.; GONZALEZ, J. F.; RODRIGUEZ, J.J.; TAJEDOR A. Biodiesels fuel from vegetable oils: transesterification of *Cynara cardunculus* L. oils with ethanol. **Energy Fuels**. v. 16, p. 443-450, 2002.

FABBRI, D.; BEVONI, V.; NOTARI, M.; RIVETTI, F. Properties of a potential biofuel obtained from soybean oil by transmethylation with dimethyl carbonate. **Fuel**. n° of Pages 8, Model 5+, 2006.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry: A Textbook**. Berlin: 3<sup>rd</sup> Edition, Spriger-Verlag, 1997, 21p.

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L.A. G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui. **Química Nova**. v. 21, p. 16-19, 1998.

FELIZARDO, P.M.G. **Produção de biodiesel a partir de óleos usados de frituras**. (licenciatura) QUERCUS – Centro de Informação de Resíduos – Instituto Superior Técnico – Departamento de Engenharia Química – Lisboa – Portugal, 2003.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

FEUGE, R. O.; GROS, A. T. Modification of vegetable oils. VII. Alkali catalyzed interesterification of peanut oil with ethanol. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 26, n.3, p. 97-102, 1949.

FOGHT, J. M., GUTNICK D. L.; WESTLAKE, D. W. S. Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed cultures. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 55, p. 36-42, 1989.

FORNO, M. W. Ester reactions of fatty materials. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 31, n. 11, p. 548-559, 1954.

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

FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 61, p. 1638-1643, 1984.

FUDUKA, H.; KONDO, A.; NODA H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 92, n. 5, p. 405-16, 2001.

FURUTANI, T.; OOSHIMA, H.; KATO, J. Preparation of N-, o-diacyl ethanolamine from N-acyl Ethanolamine Using Lipase Preparation. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 20, p. 214-220, 1997.

GAO, X.; CAO, S.; ZHANG, K. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. **Enzyme Microbiology Technology**. v. 27, p. 74 – 82, 2000.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**. v. 86, p. 1097–1107, 2005.

GIAVRILESCU, M.; TUDOSE, R. Z. Concentric-tube airlift bioreactors. III. Effects of geometry on mass transfer. **Bioprocess Engineering**. v. 19, p. 175- 178, 1998.

GROSSLEY, T. D.; HEYES, T. D.; HUDSON, B. J. F. The effect of heat on pure triglycerides. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 39, p. 9-14, 1962.

GRYGLEWICZ S. Rapeseed oil methyl esters preparation using heterogeneous catalysts. **Bioresource Technology**. v. 70, p. 249-253, 1999.

GUISAN, J.M. Agarose-aldehyde gels as supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 10, p. 375–382, 1988.

GUISAN, J.M.; ALVARAO, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C.M.; GARCIA-LOPEZ, J.L.; TAGLIATI, A. Stabilization of a heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization penicillin G acylase from *K. citrophila*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 42, p. 455–464, 1993.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 64, p. 763–781, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. In press, 2006.

HATZINIKOLAOU, D. G.; MACRIS, J. B.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; KOLISIS, F. N.; FOUNTOUKIDIS G. Production and partial characterization of extracellular lipase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**. v. 18, p. 547–552, 1996.

HERRERA, C. G. Esteres Metílicos de Ácidos Grasos como Carburante. Implicaciones Económicas, Ecológicas y Energéticas; **Grasas y Aceites**. v. 46, p. 121, 1995.

HOLMQUIST, M.; CLAUSEN, I.G.; PETKAR, S.; SVENDSEN, A.; HULT, K. Probing a functional role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase through transesterification reactions in organic solvent. **Journal of Protein Chemistry**. v. 14, p. 217-224, 1995.

<http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2006/12/23/materia.2006-12-23.6115763026/view>, acessado em 12/2007

<http://www.biodiesel.gov.br/programa.html> acessado em 04/2008.

IEA. Key world energy statistics from the IEA, International Energy Agency, Paris, France, 2000.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerids and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 16, n. 1, p. 53–58, 2001.

JAEGER, K. E.; RANSACK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**. v.15, p. 29-63, 1994.

JAL, P. K., PATEL, S.; MISHRA, B. K. Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. **Talanta**, Orlando, v. 62, n. 5, p. 1005 – 1028, 2004.

JANSSEN, A. E. M.; VAIDYA, A. M.; HALLING P. J. Substrate specificity and kinetics of *C. rugosa* lipase in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 18, p. 340–346, 1996.

JENSEN, R.G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. **Lipids**, v. 18, p. 650-657, 1983.

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

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; MATSUMOTO, T.; BAN, K.; KONDO, A.; SHIMADA, Y.; NODA, H.; NOMOTOS, F.; OHTSUKA, K.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 88, p. 627-631, 1999.

KANWAR, L.; HAZARIKA, S.; GOSWAMI, A.; DUTTA, N. N.; HAZARIKA, A. K.; GOSWAMI, P. Novel lipase isolated from a *Pseudomonas* strain and its application in the synthesis of S(+)-2-O-benzylglycerol-1-acetate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 77, n. 8, p. 898-902, 2002.

KEGL, B. Effects of biodiesel on emissions of a bus diesel engine. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 863-873, 2008.

KIM, H.K.; SUNG, M.H.; KIM, H.M.; OH, T.K. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. strain 398. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**. v.58, p. 961-962, 1994.

KNAEBEL, K., For your next separation, consider adsorption. **Chemical Engineering**. v. 102, n. 11, p. 92-102, 1995.

KNOTHE, G., GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de Biodiesel**. Editora Edgard Blucher. 340 p. 1ª edição, São Paulo, 2006.

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, n. 2, p. 287-292, 2004.

KOMERS, K.; MACHEK, J.; STLOUKAL, R. Biodiesel from rapeseed oil and KOH 2. Composition of solution of KOH in methanol as reaction partner of oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 103, p. 359-362, 2001.

KORNBERG, A. Why purify enzymes? **Methods Enzimol Journal**. v. 182, p.1-5, 1990.

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

KRISNANGKURA, K.; SIMAMAHARNNOP, R. Continuous transmethylation of palm oil in an organic solvent. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 69, p. 166-169, 1992.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LARA, P.V.; PARK, E.Y. Potential Application of Waste Activated Bleaching Earth on the Production of Fatty Acid Alkyl Esters using *Candida Cylindracea* Lipase in Organic Solvent System. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 270-277, 2004.

LAWSON, D. M.; BRZOZWSKI, A. M.; RETY, S.; VERMA, C.; DODSON, G. G. Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling. **Protein Engineering**. v. 7, p. 543– 550, 1994.

LEE, C. K.; CHIANG, A. S. T.; TSAY, C. S. The characterization of porous solids from gas-adsorption measurements. **Key Engineering Materials**., Londres, v. 115, n. 1, p. 21 – 43, 1996.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. Traduzido por Arnaldo Antônio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. 2ª Ed. São Paulo, Sarvier, 1995.

LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction médium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. In press, 2006.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**. v. 18, p. 65-71, 2004.

LIMA, V.M.G. **Lipase de *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx IOC 4212**. Curitiba, 2000. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LINHARD, R. **Biodegradable polymers for controlled release of drugs** In: ROSOFF, M. *Controlled release of drugs; polymers and aggregate systems*. New York: VCH Publisher Inc. 1988. p. 53-85.

LIPPENS, B. C.; DE BOER, J. H. Studies on pore systems in Catalysts V: The t Method; **Journal of Catalysis**. v. 4, p. 319-323, 1965.

MA, F.; CLEMENTS, L. D.; HANNA, M. A. The effect of catalyst, free fatty acids, and water on transesterification of beef tallow. **Trans ASAE**. v. 41, n. 5, p. 1261-1264, 1998.

MA, F.; CLEMENTS, L. D.; HANNA, M. A. The effect of mixing on transesterification of beef tallow. **Bioresource Technology**. v. 69, p. 289-293, 1999.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**. v. 70, p. 1-15, 1999.

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n. 32, p. 38-46, 2004.

MACÊDO, G.A.; PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**. v. 28, p. 90-95, 1997.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL JR, C. G.; AMUNDSON, C. H. Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils – A review. **Journal American Oil Chemists Society**. v. 67, n. 12, p. 890-910, 1990.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. In press, 2005.

MAREK, A.; BEDNARSKI, W. Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. **Biotechnology Letters**. v. 18, p. 1155 – 1160, 1996.

MARTINS, T. S. **Produção e purificação de lipase *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682**. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.

MATSUMA, H.; SHIBATANI, T. Purification and characterization of the lipase from *Serratia marcescens* SR41-8000 responsible for asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid-esters. **Journal of fermentation and bioengineering**. v. 77, p. 152 - 158, 1994.

MEDEIROS, J.F. **Estudo do meio de cultura para produção de lipase por *Geotrichum sp.*** Campinas, 1999. 109 p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

MEHER, L.C.; DHARMAGADDA, V. S. S.; NAIK, S.N. Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* oil for production of biodiesel. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 1392-1397, 2006, a.

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

MEIRELLES, F. S., Biodiesel, Federação de Agricultura do Estado de São Paulo, Brasília, 2003.

MERCHUK, J.C.; SIEGEL, M.H. Air-lift reactors in chemical and biological technology. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 41, p. 105-120, 1988.

MESSING, R. A. **Immobilized Enzymes for Industrial Reactors**, New York: Academic Press. 63 p, 1975.

METZGER, O. J. "Organic reactions without organic and oils and fats as renewable raw materials for the chemists industry". **Chemosphere**. v. 43, p. 83-87, 2001.

MINAMI, E.; SAKA, S. Kinetics of hydrolysis and methyl esterification for biodiesel production in two-step supercritical methanol process. **Fuel**. v. 85, p. 2479–2483, 2006.

MINOVSKA, V.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. **Journal of the Serbian Chemical Society**. v. 70, n. 4, p. 609–624, 2005.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, B.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State **Bioprocessing**. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. v. 68, p. 61-138, 2003.

MME. **Balanco Energético Nacional**. BEM 1999, Ministério das Minas e Energia, Brasília.

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

MODI, M. K.; REDDY J. R. C.; RAO, B. V. S. K.; PRASAD, R. B. N. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. **Bioresource Technology**. In press, 2006, b.

MONTESINOS, J. L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M. A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLA, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 59, p. 25 – 37, 1996.

MORAES, A. F. **Enriquecimento protéico do farelo de arroz por fermentação semi-sólida em biorreator de coluna com leito fixo**. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos – Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande/RS, 1999.

MORRISSEY, D.H. Silver strain for proteins in polyacrilamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**. v.117, p.307-310, 1981.

MURAOKA, T.; ANDO, T.; OKUDA, H. Purification and properties of a novel lipase from *Staphylococcus aureus* 226. **The Journal of Biochemistry**. v. 92, p. 1933 - 1939, 1982.

NETO, P. R. C. **Obtenção de ésteres alquílicos (Biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja**. 152 p. Dissertação de Mestrado; Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina; 2002.

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

OLLIS, D.L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S.M.; HAREL, M.; REMINGTON, S.J.; SILMAN, I.; SCHRAG J. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Engineering Design and Selection**. v. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

OTERA, J. Transesterification. **Chemical Reviews**. v. 93, n. 4, p. 1449 – 1470, 1993.

PALEKAR, A.A.; VASUDEVAN, P.T.; YAN, S. Purification of Lipase: a Review. **Biocatalysis Biotransformation**. v. 18, p. 177-200, 2000.

PALOMO JM, FERNÁNDEZ-LORENTE G, MATEO C, ORTIZ C, FERNÁNDEZ-LAFUENTE R, GUISÁN JM. Modulation of the enantioselectivity of lipases via

controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 775–83, 2002.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAN, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 29, p. 119-131, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PAYNAM, J.; DALI, M. M.; SAHOO, S. K.; MA, W.; CHAKRAVARTHI, S. S.; AMIDON, G. L.; LEVY, R. J.; LABHASETWAR, V. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoand microspheres. **Journal of Controlled Release**. v. 92, p. 173-187, 2003.

PENTEADO, M. C. P. S. **Identificação dos gargalos e estabelecimento de um plano de ação para o sucesso do programa brasileiro de biodiesel**. Dissertação de Mestrado Profissionalizante em Engenharia Automotiva. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. São Paulo. 169 p, 2005.

PERES, J. R. R.; JUNIOR, E. F.; GAZZONI, D. L. Biocombustíveis: Uma oportunidade para o agronegócio brasileiro. **Reviste de Política Agrícola**. n. 1, Jan./Fev./Mar. 2005.

PESSUTI, O. A biomassa paranaense e sustentabilidade de novos sistemas produtivos. In: Seminário Paranaense de Biodiesel, Londrina. **Anais eletrônicos**. Disponível em: <<http://www.tecpar.br/cerbio/Seminario-palestras.htm>> Acesso em: 23 de agosto de 2003.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M. TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Biodiesel: An Overview. **Journal brazilian chemists society**. v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005

PIOCH, D.; LOZANO, P.; RASOANANTOANDRO, M. C.; GRAILLE, J.; GENESTE, P.; GUIDA, A. Biofuels from catalytic cracking of tropical vegetable oils. **Oléagineux**. v. 48 p. 515-526, 1993.

PRATUANGDEJKUL, J.; DHARMSTHITI, S. Purification and characterization of a lipase from psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. **Microbiological research**. v. 155, n. 2, 95 - 100, 2000.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M. **Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil**. Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento, v. 31, p. 28-37, 2003. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>>.

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient Immobilization of Lipase by Entrapment in Hydrophobic Sol-Gel Materials. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 49, p. 527-534, 1996.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Volume 1. Editora e Gráfica Universitária – UFPEL. Pelotas/RS, 1996.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Volume 3. Editora e Gráfica Universitária – UFPEL. Pelotas/RS, 2000.

RESLOW, M.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASON, B. On the Importance of the Support Material for Bioorganic Synthesis – Influence of Material Partition Between Solvent, Enzyme and Solid Support in Water-Poor Reaction Media. **European Journal of Biochemistry**. v. 172, p. 573-578, 1988.

ROBERTS, S. M.; TURNER, M. K. Synthesis of useful asymmetric compounds using biocatalysis - the chemist's contribution to biotechnology. **Enantiomer**. v. 3, n. 1, p. 9-18, 1998.

ROYCE, P.N. A discussion of recent developments in fermentation monitoring and control from a practical perspective. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 13, p. 117–149, 1993.

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

SAKA S, KUSDIANA D. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. **Fuel**. v. 80, p. 225-231, 2001.

SAKIYAMA, C. C. H.; PAULA, E. M.; PEREIRA, P. C.; BORGES, A. C.; SILVA, D. O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters in Applied Microbiology**. v. 33, p. 117-121, 2001.

SAKIYAMA, T.; YOSHIMI, T.; MIYAKE, A.; UMEOKA, M.; TANAKA, A.; OZAKI, S.; NAKANISHI, K. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from *Pseudomonas* sp. LP7315. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.91, p. 27 - 32, 2001.

SALIS, A., PINNA, M., MONDUZZI, M., SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**. v. 119, p. 291-299, 2005.

SANTOS, M. M. **Utilização de mutagênese aleatória para obtenção da lipase de *Burkholderia cepacia* com variação nas propriedades catalíticas**. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2005.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 30, p. 513, 1958.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; CYGLER, M.; LANG, D.; BURGDORF, T.; HECHT, H.J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T.J.; OLIVER, J.D.; STRICKLAND, L.C.; DUNAWAY, C.M.; LARSON, S.B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**. v. 5, n. 12, p. 187-202, 1997.

SCHUCHART, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal brazilian chemists society**.v. 9, p. 190- 210, 1998.

SCHWAB, A. W.; BAGBY, M. O.; Freedman, B. Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. **Fuel**. v. 66, p. 1372-1378, 1987.

SCRAGG, A. H. **Biotechnology for Engineers: Biological systems in technological processes**. Editorial Limusa S.A. de C.V. Edition Translatio. 1/1/2004.

SCRAGG, A. H., Morris, P., Allan, E.J., Bond, P. & Fowler, M. W. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 9, p. 619-624, 1987.

SCRIBAN, R. - **Biotecnologia**.- Editora Manole Ltda, São Paulo, 1985.

SHAHANI, K. M. **Lipases and Esterases. Enzymes in Food Processing**. 2ª ed., New York: Academic Press, p. 182-214, 1975.

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

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

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 76, p. 789-793, 1999.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 17, p. 133–142, 2002.

SHUCHRDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS M. **Journal Brazilian Chemists Society**. v. 9, p. 190, 1998.

SING, K. S. W.; EVERETT, D. H.; HAUL, R. A. W.; L. MOSCOU, L.; PIEROTTI, R. A.; ROUQUEROL, J.; SIEMIENIEWSKA, T. Reporting physisorption data for gas/solid systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. **Pure and Applied Chemistry**. v. 57, p. 603, 1985.

SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; DESAI, J. D. Production of biomulsifier by a SCP-producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation. **Biotechnology Letters**. v. 12, n. 10, p. 743-746, 1990.

SMIT, J. P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; SCHLOSSER, E. E.; KNOL, W. Accurate determination of process variables in a solid state fermentation system. **Process Biochemistry**. v. 31, n. 7, p. 669 – 678, 1996.

SOARES, C. M. F. **Otimização por planejamento experimental da imobilização de lipase em sílica de porosidade controlada na presença de estabilizantes**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

SOUMANOU, M.M.; BORNSCHEUER, U.T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 33, p. 97-103, 2003.

SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 4, p. 111-133, 2000.

STAISS, C.; PEREIRA, H. Biomassa, energia renovável na agricultura e no sector florestal. **Revista Agros**. n.1, p. 21-30, 2001.

STOUNAS, S.; LOIS, E.; SERDARI, A. Effects of fatty acid derivatives on the ignition quality and cold flow of diesel Fuel. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 72, p. 436-437, 1995.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 548–556, 2002.

SUGIHARA, A.; UESHIMA, M.; SHIMADA, Y.; TSUNASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. **The Journal of Biochemistry**. v. 112, p. 598 - 603, 1992.

TEIXEIRA, V. G., COUTINHO, F. M. B., GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resina à base de divinilbenzeno. **Química Nova**. v. 24, p. 808-818, 2001.

TOMASEVIC, A. V.; MARINKOVIC, S. S. Methanolysis of used frying oils. **Fuel Processing Technology**. v. 81, p. 1-6, 2003.

TURKAN, A.; KALAY, S. Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases. **Journal of Chromatography A**. v. 1127, p. 34-44, 2006.

TURRIO-BALDASSARRI, L.; BATTISTELLI, C. L.; CONTI, L.; CREBELLI, R.; BERARDIS, D. B.; IAMICELI, A. L. Emission Comparison of Urban Bus Engine Fueled with Diesel Oil and 'Biodiesel' Blend. **Science of the Total Environment**. v. 327, p. 147-162, 2004.

UOSUKAINEN, E.; LINKO, Y.; LAMSA, M. Transesterification of Trimethylol-propane and Rapeseed Oil Methyl Ester to Environmentally Acceptable Lubricants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 75, n. 11, p. 1557-1563, 1998.

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

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**. v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

WALTON , J. The Fuel Possibilities of Vegetable Oils. **Gas Oil Power**. v. 33, p. 167-168, 1938.

WARNER, J. C.; Cannon, A. S.; Dye, K. M. Green Chemistry. **Environmental Impact Assessment Review**. v. 24, n. 7-8, p. 775-799, 2004.

WOOLEY, P.; PETERSON, S. B. **Lipases their structure production biochemistry and application**. Cap. 12. Cambridge University Press, 1994.

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

YANG, G.; WEI, T. T.; LI, N. K.; FANG, W. Immobilization of Lipase on Macroporous Resin and Its Application in Synthesis of Biodiesel in Low Aqueous Media. **Chinese Journal of Biotechnology**. v. 22, n. 1, p. 114–118, 2006.

YANG, J.; GUO, D.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 45, p. 91–96, 2007.

YOUSEF, T.; AL-ZUHAIR, S.; AL-ATABI, M. Performance of diesel engine using an emulsion of biodiesel-conventional diesel fuel. **Journal of Mechanical Engineering**. v. 56, n. 3, p. 137-142, 2005.

ZIEJEWSKI, M.; KAUFMAN, K. R.; SCHWAB, A. W.; PRYDE, E. H. Diesel engine evaluation of a nonionic sunflower oil-aqueous ethanol microemulsion. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 61, n.10, p. 1620-1626, 1984.

## ERRATA

- Os termos referentes à “conversão de biodiesel” devem ser substituídos por “conversão de óleo de soja em biodiesel”;
- Quando se estudou o efeito da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada se utilizou em alguns momentos o termo “concentração de lipase”, porém os valores que se tem é da sua “atividade imobilizada”. Sendo assim o termo que deve ser utilizado;
- Os termos “Planejamento completo” devem ser substituídos por “Planejamento Fatorial Completo” e aqueles que apresentam os pontos axiais “Delineamento Composto Central Rotacional”;
- A Figura 13 não poderia ser gerada a partir do planejamento fatorial fracionário, porém para facilitar a visualização dos efeitos optou-se por inserir-la.