



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Juliana Bergamasco

Sínteses e caracterização de microesferas de poli (álcool vinílico) e sua utilização como suportes para imobilização de lipase produzida por *Rhizomucor miehei* e seu estudo catalítico na reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel via rota etílica

São José do Rio Preto
2013

Juliana Bergamasco

Sínteses e caracterização de microesferas de poli (álcool vinílico) e sua utilização como suportes para imobilização de lipase produzida por *Rhizomucor miehei* e seu estudo catalítico na reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel via rota etílica

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto – SP.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto
2013

Bergamasco, Juliana.

Sínteses e caracterização de microesferas de poli (álcool vinílico) e sua utilização como suportes para imobilização de lipase produzida por *Rhizomucor miehei* e seu estudo catalítico na reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel via rota etílica/ Juliana Bergamasco. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2013. 116 f.: il.; 30 cm.

Orientador: José Geraldo Nery

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Enzimas. 2. Catálise heterogênea. 3. Biodiesel. I. Nery, José Geraldo. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 620.91

JULIANA BERGAMASCO

Sínteses e caracterização de microesferas de poli (álcool vinílico) e sua utilização como suportes para imobilização de lipase produzida por *Rhizomucor miehei* e seu estudo catalítico na reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel via rota etílica

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto – SP.

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dra. Eleni Gomes
UNESP São José do Rio Preto

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
UFSJ – Sete Lagoas/MG

São José do Rio Preto
24 de maio de 2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha amada família (Sandra, Paulo e Drieli) e ao meu namorado Carlos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus por tudo que Ele representa na minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Geraldo Nery, pela orientação, sugestões, ensinamentos e, sobretudo pela oportunidade e confiança.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia, em especial aos professores e funcionários.

Aos amigos do Lacet, Adriano, Danilo, Vinicius, Glaucia, Alex, Marcelo, Roberto, Alex Miller, Thais, Tarcisio e Janine que sempre me ajudaram em tudo que precisei. Principalmente ao Adriano pela ajuda com a enzima e ao Vinicius pela ajuda com as microesferas de PVA. Obrigada por tudo.

Agradeço imensamente a toda minha família, especialmente aos meus pais e minha irmã que sempre me deram todo apoio e motivação.

Ao meu namorado Carlos, pelos momentos em que me ajudou na correção, pela amizade, pela paciência, pelo carinho e pelo amor.

À Rafaela Rodrigues de Brito, doutoranda em Microbiologia do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (Ibilce - Unesp) pelos zimogramas de atividade e pelo auxílio no planejamento experimental de Box-Behnken.

Ao Rafael Rodrigues Hatanaka, doutorando em Química do Cempec (Instituto de Química Unesp – Araraquara) pelos dados de ATR-FTIR e quantificação de ésteres etílicos.

Ao Dr. Marcus Vinicius Giotto do Institute of Materials Science, University of Connecticut pelos dados de RMN.

À Prof. Dr^a Maria Cristina Nonato e a doutoranda Joane Kathelen Rustiguel da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP – Ribeirão Preto) pela distribuição do potencial eletrostático da enzima.

À doutoranda em Biofísica Natália Leite Bueno pelos dados de potencial zeta.

Aos professores presentes nesta banca, que farão orientações para a melhoria do meu trabalho.

RESUMO

O biodiesel (ésteres de ácidos graxos) tem sido produzido a partir da transesterificação direta de óleos ou de gorduras, em que triglicerídeos reagem com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de um catalisador químico como, por exemplo, certos ácidos ou hidróxidos. Alternativamente, foi utilizada a via enzimática. Nesse caso, empregam-se enzimas lipases como catalisadores. Reações de transesterificação catalisadas por lipases têm se tornado cada vez mais atrativa, uma vez que o glicerol gerado na reação pode ser facilmente recuperado e a purificação de ésteres de ácido graxo é simples. Todavia, as enzimas utilizadas como catalisadores possuem alto custo no mercado, dificuldade de recuperação e, além disso, estão sujeitas à inativação. Desse modo, uma maneira encontrada para superar alguns desses obstáculos é a imobilização das enzimas em um suporte sólido. A imobilização da enzima em uma matriz aumenta sua estabilidade química e térmica, reduz a sua inativação, e facilita a sua recuperação na reação. Microesferas de Poli (álcool vinílico) (PVA) com diferentes graus de cristalinidade foram usados como suportes sólidos para a imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei*. Microesferas de PVA com estrutura amorfa (PVA4) imobilizaram 0,03 mg da enzima/ g de suporte, enquanto que microesferas com estrutura cristalina (PVA12) imobilizaram 0,024 mg/g e a de alta cristalinidade (PVA25) imobilizou 0,029 mg/g. A atividade enzimática das enzimas imobilizadas foi dependente do grau de cristalinidade das microesferas de PVA. O complexo Enzima-PVA4 apresentou uma atividade enzimática de (6,13 U/mg de enzima), o complexo Enzima-PVA12 apresentou uma atividade enzimática de (67,23 U/mg de enzima) e o complexo Enzima-PVA25 revelou uma alta atividade enzimática (149,15 U/mg de enzima). A atividade enzimática da lipase na sua forma livre também foi calculada neste caso (11,6 U/mg de enzima). Um efeito sinérgico também foi observado para os complexos de alta cristalinidade durante a reação de transesterificação. O rendimento de ésteres para o complexo Enzima-PVA25 foi de 66,3%, Enzima-PVA12 foi de 40,7%, enquanto que o complexo Enzima-PVA4 foi de 1,7%. No estudo para otimização da produção de biodiesel, o melhor rendimento em ésteres etílicos foi obtido com as seguintes condições: razão molar O:E de 1:3,

quantidade de catalisador 6,5% a 37,5°C. Uma explicação possível para o efeito sinérgico observado é a interação entre íons presentes na rede polimérica das microesferas de estrutura cristalina, com os aminoácidos residuais pertencentes à lipase. Esta interação conduz a enzima a ser imobilizada em sua forma ativa.

Palavras chaves: lipase, PVA, imobilização, suporte polimérico, biodiesel.

ABSTRACT

*Biodiesel (fatty acid esters) is produced from the direct transesterification of oils or fats in which triglycerides react with a short chain alcohol (methanol or ethanol) in the presence of a chemical catalyst like acids or hydroxides. In the other hand, enzymatic route is used and, in this case, employing lipases as catalysts. Transesterification reactions catalyzed by lipases has become ever more attractive, since glycerol produced in the reaction can be easily recovered and purification of fatty acid esters is simple. One way to overcome these barriers by using free lipases is their immobilization on a solid support. The immobilized enzyme increases its chemical and thermal stability, reduces inactivation, improves handling and facilitates its recovery in the reaction. Microspheres of poly vinyl alcohol (PVA) with different degrees of crystallinity were then used as solid supports for immobilization of lipase from *Rhizomucor miehei*. PVA microspheres with amorphous structure (PVA4) immobilized 0,029 mg of enzyme/ g of support, while crystalline structure microspheres (PVA12) immobilized 0,024 mg/g and high crystallinity microspheres (PVA25) immobilized 0,03 mg/g. The enzymatic activity of the immobilized enzymes was dependent on the degree of crystallinity of PVA microspheres. The enzyme-PVA4 complex revealed an enzymatic activity of (6.13 U/mg of enzyme) while the Enzyme-PVA12 complex an enzymatic activity of (67.23 U/mg of enzyme) and Enzyme-PVA25 complex provided a high activity enzymatic (149.15 U/mg enzyme). The enzymatic activity of the lipase in its free form was also measured and, in this case, was found to be (11.6 U/mg enzyme). A synergistic effect was also observed for the complex Enzyme-PVA25 during the transesterification reaction. The yield of esters for complex Enzyme-PVA25 was 66.3% followed by Enzyme-PVA12 (40.7%) and Enzyme-PVA4 (1.7%). In the study for optimization of biodiesel production, the best performance in ethyl esters was obtained with the following conditions: molar ratio Oil:Enzyme 1:3, amount of catalyst 6.5 % at 37.5°C. A possible explanation for the synergistic effect is the interaction between ions present in the polymeric network of the crystalline structure microspheres with the amino acid residues belonging to the lipase. This interaction leads to enzyme to be immobilized in its active form.*

Keywords: lipase, PVA, immobilization, polymeric support, biodiesel.

Índice de Figuras

Figura 1 Produção de biodiesel mundial em bilhões de litros (2000-2010). Fonte: (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century), 2011.....	28
Figura 2 Consumo de biodiesel em milhões de m ³ nos Estados Unidos, Alemanha, Brasil e Argentina (2008-2012). Fonte: (Ministério de Minas e Energia: Departamento de Combustíveis Renováveis), 2012.....	28
Figura 3 Produção nacional de Biodiesel B100 em metros cúbicos de (2005-2011). Fonte: (Ministério de Minas e Energia: Departamento de Combustíveis Renováveis)	29
Figura 4 Principais matérias-primas utilizadas para produção do biodiesel no Brasil. Fonte: (Brisolara, 2008).....	30
Figura 5 Participação das matérias-primas usadas na produção de biodiesel (2009-2012). Fonte: (Ministério de Minas e Energia: Departamento de Combustíveis Renováveis), 2012	31
Figura 6 Reações (em etapas) envolvidas na transesterificação do triglicerídeo. Fonte: (Suarez, Plentz Meneghetti et al., 2007)b	32
Figura 7 Reações catalisadas por enzimas lipases (hidrólise, esterificação e interesterificação). Fonte: (Carvalho, Campos et al., 2003) adaptada	35
Figura 8 Representação gráfica tridimensional da estrutura da Enzima Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> . Fonte: (Protein Data Bank)	37
Figura 9 Reações catalisadas por lipase do tipo específica e não específica. Fonte: (Paques e Macedo, 2006)	38
Figura 10 Representação gráfica da estrutura da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> na forma aberta (A, C) e forma fechada (B, D). Fonte: (Schmid e Verger, 1998)	40
Figura 11 Mecanismo de catálise da lipase. Fonte: (Jaeger, Dijkstra et al., 1999)...	42
Figura 12 Métodos para imobilização de enzimas. Fonte: (Dalla-Vecchia, Nascimento et al., 2004)	46
Figura 13 Fórmulas estruturais: A) Poli (acetato de vinila) B) Poli (álcool vinílico) ...	52
Figura 14 Representação da cadeia de PVA com suas ligações de hidrogênio. A) PVA totalmente hidrolisado B) PVAc parcialmente hidrolisado. Fonte: (Bassner e Klingenberg, 1998)	53

Figura 15 Reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila por lipases. Fonte: (Winkler e Stuckmann, 1979), (Krieger, 1995)	63
Figura 16 Padrão de difração de raios X das amostras de microesferas de PVA (PVA4, PVA12 e PVA25) antes da imobilização	74
Figura 17 Microscopia eletrônica de Varredura (MeV) das microesferas antes da imobilização: a) PVA4; b) PVA12; c) PVA25	75
Figura 18 Microscopia eletrônica de Varredura (MeV) da amostra Enzima-PVA25	76
Figura 19 Efeito da temperatura na atividade enzimática da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> livre e imobilizada em diferentes suportes de PVA. a) Enzima livre; b) Enzima-PVA4; c) Enzima-PVA12; d) Enzima-PVA25	77
Figura 20 Estabilidade enzimática em 44°C da lipase livre de <i>Rhizomucor miehei</i> e da imobilizada em diferentes suportes de microesferas de PVA a) Enzima livre b) Enzima-PVA4 c) Enzima-PVA12 d) Enzima-PVA25	78
Figura 21 Espectros de ATR-FTIR das microesferas de PVA antes da imobilização a) PVA4 b) PVA12 c) PVA25 e seus aumentos na região amida (região entre 2000-1250 cm^{-1}) (ausência do pico da amida).	80
Figura 22 Espectros de ATR-FTIR das microesferas de PVA após da imobilização a) Enzima-PVA4 b) Enzima-PVA12 c) Enzima-PVA25 e seus aumentos na região amida juntamente com a enzima livre (região entre 2000-1250 cm^{-1}) (presença do pico da amida).....	82
Figura 23 Espectros de ^{13}C CPMAS NMR das microesferas de PVA antes da imobilização a) PVA4 b) PVA12 c) PVA25	84
Figura 24 Modelo teórico das ligações de hidrogênio no PVA. Fonte: (Semenzim, Basso <i>et al.</i> , 2011)	85
Figura 25 Espectros de ^{13}C CPMAS NMR das microesferas de PVA após a imobilização a) Enzima-PVA4 b) Enzima-PVA12 c) Enzima-PVA25.....	86
Figura 26 Espectros ^{23}Na -MAS-NMR das microesferas de PVA antes da imobilização a) PVA4 b) PVA12 c) PVA25	87
Figura 27 Espectros ^{23}Na -MAS-NMR das microesferas de PVA após da imobilização a) Enzima-PVA4 b) Enzima-PVA12 c) Enzima-PVA25.....	88
Figura 28 Dados de Potencial Zeta (mV) das microesferas puras e imobilizadas....	90
Figura 29 Distribuição do potencial eletrostático da superfície da enzima RmL, baseado em sua estrutura cristalográfica (4TGL); vermelho indica superfície de potencial eletrostático negativo e azul indica superfície de potencial eletrostático positivo	90

Figura 30 Relação entre a massa de enzima imobilizada (mg) pela massa do suporte (g) pela reação de Bradford.....	91
Figura 31 Atividade enzimática do complexo polímero-enzima (U/mg de enzima) a) Enzima-PVA4 b) Enzima-PVA12 c) Enzima-PVA25	92
Figura 32 Atividade enzima remanescente na solução (U/mL de enzima remanescente) a) Enzima livre b) Enzima-PVA4 c) Enzima-PVA12 d) Enzima-PVA25	93
Figura 33 Zimogramas obtidos a partir da atividade de hidrólise (a) e de esterificação (b) juntamente com o marcador molecular (M).....	94
Figura 34 Dados de TLC. Produção de Biodiesel a) Enzima-PVA4 b) Enzima-PVA12 c) Enzima-PVA25	95
Figura 35 Produção de ésteres etílicos (%) por cromatografia gasosa a) Enzima-PVA4 b) Enzima-PVA12 c) Enzima-PVA25	96
Figura 36 Produção de ésteres etílicos (%) por cromatografia gasosa a) Enzima livre (total) b) Enzima-PVA25 c) Enzima livre (quantidade imobilizada)	97
Figura 37 Curva de contorno do efeito da razão molar óleo: etanol (mol.Mol^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) sobre a conversão de ésteres etílicos utilizando 5,5% (% p/p) de catalisador	100
Figura 38 Curva de contorno do efeito da razão molar O:E (mol.Mol^{-1}) e quantidade de catalisador (%) sobre a conversão de ésteres etílicos a uma temperatura de $37,5^{\circ}\text{C}$	101
Figura 39 Representação esquemática da lipase de RML na conformação fechada (A) e aberta (B). Os resíduos que formam a rede electrostática e alguns outros resíduos chaves são representados. Fonte: (Herrgard, Gibas et al., 2000)	103
Figura 40 Representação esquemática da estrutura de RmL mostrando o fechamento e a abertura da tampa nas formas: 1) Selvagem (3TGL); 2) Ativa (4TGL). A) Elementos de estrutura secundária mostrando o enovelamento comum as lipases. B) Representação da superfície de potencial eletrostático mostrando a distribuição de cargas da proteína na forma fechada e aberta.	104

Índice de Tabelas

Tabela 1 Aplicações industriais de lipases.....	36
Tabela 2 Reagentes utilizados para a síntese de microesferas e suas funções.....	60
Tabela 3 Variáveis para o planejamento experimental do tipo Box-Behnken	70
Tabela 4 Matriz de planejamento experimental com os rendimentos de ésteres etílicos	98
Tabela 5 Valores de p do modelo quadrático completo determinado para as variáveis	98

Índice de Esquemas

Esquema 1 Formação dos radicais livres a partir do peróxido de benzoíla.....	55
Esquema 2 Iniciação da cadeia polimérica na formação do poli (acetato de vinila) PVAc	55
Esquema 3 Propagação da cadeia polimérica na formação do poli (acetato de vinila) (PVAc)	55
Esquema 4 Terminação da cadeia polimérica, por combinação, na formação do poli (acetato de vinila) (PVAc).....	56
Esquema 5 Hidrólise alcalina do poli (acetato de vinila) (PVAc) para obtenção do poli (álcool vinílico) (PVA), obtendo como subproduto o acetato de sódio (CH ₃ COONa).....	56

Índice de Equações

Equação 1 Determinação de proteínas por Bradford.	62
Equação 2 Determinação da atividade enzimática.....	64
Equação 3 Fórmula do modelo experimental do tipo Box-Behnken	69
Equação 4 Quantificação de ésteres.....	71

Lista de Siglas e Abreviaturas

PVA	Poli (álcool vinílico)
PVAc	Poli (acetato de vinila)
PVA4	Microesferas de PVA saponificado com hidróxido de sódio 4 mol/L
PVA12	Microesferas de PVA saponificado com hidróxido de sódio 12 mol/L
PVA25	Microesferas de PVA saponificado com hidróxido de sódio 25 mol/L
Enzima-PVA4	Complexo formado pela enzima imobilizada em microesferas de PVA 4 mol/L
Enzima-PVA12	Complexo formado pela enzima imobilizada em microesferas de PVA 12 mol/L
Enzima-PVA25	Complexo formado pela enzima imobilizada em microesferas de PVA 25 mol/L
M	Concentração Molar
RML	<i>Rhizomucor miehei</i>
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais
Proálcool	Programa Nacional do Álcool
Pro-óleo	Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Carburantes
Pro biodiesel	Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico de Biodiesel
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
EPA	Agência Proteção do Meio Ambiente
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Combustível
FAME	Ésteres metílicos de ácidos graxos
FAAE	Ésteres etílicos de ácidos graxos
IEA	Agência Internacional de Energia
CO ₂	Dióxido de carbono
CO	Monóxido de carbono
SO ₂	Dióxido de enxofre
NaOH	Hidróxido de Sódio
KOH	Hidróxido de Potássio
NH	Grupamento amina
MPPM	Matriz Polimérica Microporosa
STY e DVB	Matriz polimérica microporosa de copolímeros de estireno-divinilbenzeno
AlgNa/PVA	Microesferas de alginato de sódio/Poli (álcool vinílico)
p-NPP	Palmitato de nitrofenila

DRX	Difração de Raio-X
MeV	Microscopia eletrônica de varredura
ATR-FT-IR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada
CPMAS ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de ^{13}C
RMN ^{23}Na	Ressonância magnética nuclear de ^{23}Na
U	Unidade de atividade enzimática
IS	Padrão interno
O:E	Razão molar óleo: etanol
MM	Massa Molar
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	I
AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	V
Índice de Figuras	VI
Índice de Tabelas	IX
Índice de Esquemas	X
Índice de Equações	XI
Lista de Siglas e Abreviaturas	XII
1 Introdução	22
2 Fundamentação Teórica	24
2.1 Biodiesel	24
2.2 Histórico do Biodiesel no mundo	25
2.3 Histórico no Brasil	25
2.4 Mercado e produção de biodiesel no mundo	26
2.5 Mercado e produção do biodiesel no Brasil	29
2.6 Matérias primas para produção do biodiesel	30
2.7 Reação de transesterificação	31
2.7.1 Transesterificação via catálise ácida	32
2.7.2 Transesterificação via catálise básica	33
2.7.3 Transesterificação via catálise enzimática	33
2.8 Enzimas como Biocatalisadores e sua atuação	34
2.9 Lipases	34
2.9.1 Fontes, propriedades e aplicações	34
2.9.2 Estrutura e Atuação	37
2.9.3 Ativação interfacial	39

2.9.4	Mecanismo de catálise	40
2.10	<i>Imobilização de enzimas em suportes</i>	42
2.10.1	Vantagens na imobilização de enzimas	43
2.10.2	Desvantagens na imobilização de enzimas	44
2.11	<i>Métodos para imobilização de enzimas</i>	45
2.11.1	Adsorção física	46
2.11.2	Ligação iônica.....	47
2.11.3	Ligações covalentes de enzimas:.....	47
2.11.4	Métodos de oclusão ou encapsulação	48
2.11.4.1	Oclusão em gel:.....	48
2.11.4.2	Encapsulação:	48
2.12	<i>Suportes usados como matrizes para imobilização de enzimas</i>	49
2.13	<i>Poli (álcool vinílico)</i>	52
2.13.1	Estrutura e propriedades	52
2.13.2	Síntese de microesferas de PVA/PVAc	54
3	Objetivos	57
3.1	<i>Geral</i>	57
3.2	<i>Específico</i>	57
4	Procedimentos experimentais.....	59
4.1	<i>Materiais e Métodos</i>	59
4.2	<i>Síntese de microesferas de PVA (4, 12 e 25 Molar)</i>	60
4.3	<i>Imobilização de lipases em microesferas de PVA</i>	61
4.4	<i>Determinação de proteína imobilizada – Reação de Bradford</i>	62
4.5	<i>Determinação da atividade enzimática pela hidrólise do palmitato de p-nitrofenila ...</i>	63
4.6	<i>Zimogramas de atividades</i>	64
4.6.1	Zimograma na atividade de hidrólise	65
4.6.2	Zimograma baseado na atividade de esterificação.....	65
4.7	<i>Caracterização física das microesferas de PVA/PVAc</i>	66
4.7.1	Difração de Raios X (DRX).....	66
4.7.2	Microscopia eletrônica de varredura (MeV)	66
4.7.3	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR)	66
4.7.4	Ressonância magnética nuclear	67
4.7.5	Potencial zeta	67

4.8	<i>Produção de Biodiesel utilizando os complexos imobilizados (Enzima-PVA4, Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25) e a enzima livre</i>	68
4.9	<i>Utilização do planejamento experimental de Box Behnken para a otimização da produção de biodiesel</i>	68
4.10	<i>Análise do Biodiesel</i>	70
4.10.1	<i>Análises por Cromatografia de Camada Delgada (TLC)</i>	70
4.10.2	<i>Análises por Cromatografia Gasosa do Teor dos Ésteres Etflicos</i>	70
4.10.2.1	<i>Quantificação de ésteres</i>	71
5	Resultados e Discussões	73
5.1	<i>Caracterização das microesferas de PVA por Difração de Raio-X e MEV</i>	73
5.2	<i>Temperatura e estabilidade enzimática</i>	76
5.2.1	<i>Efeito da imobilização na temperatura ótima da enzima</i>	76
5.2.2	<i>Estabilidade térmica na enzima</i>	77
5.3	<i>Análises de ATR-FTIR das microesferas de PVA e do complexo Enzima-PVA</i>	79
5.3.1	<i>ATR-FTIR das microesferas de PVA4, PVA12 e PVA25</i>	79
5.3.2	<i>ATR-FTIR dos complexos Enzima-PVA4, Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25</i> ...	81
5.4	<i>Ressonância magnética nuclear de ¹³C e ²³Na</i>	83
5.4.1	<i>Espectros de ¹³C CPMAS NMR das microesferas de PVA e dos complexos enzima-polímero</i>	83
5.4.2	<i>Espectros de ²³Na-MAS-NMR das microesferas de PVA e do complexo Enzima-polímero</i>	86
5.5	<i>Potencial Zeta das microesferas puras e imobilizadas</i>	88
5.6	<i>Eficiência da imobilização de lipase em microesferas de PVA</i>	91
5.7	<i>Zimograma baseado na atividade de hidrólise e de esterificação da lipase de RML</i> ..	93
5.8	<i>Produção de Biodiesel</i>	94
5.9	<i>Planejamento experimental de superfície de resposta tipo Box- Behnken</i>	97
6	Possíveis interpretações para o aumento da atividade enzimática dos complexos Enzima-PVA25 e Enzima-PVA12	102
7	Conclusões	105
8	Perspectivas ..	107
9	Referências	108

1 Introdução

O biodiesel surge como um combustível alternativo ao óleo diesel derivado do petróleo. É produzido por meio de fontes renováveis como óleos vegetais e gordura animal. Sua biodegradabilidade e sua não toxicidade, entre outras características, o torna uma das fontes energéticas renováveis mais importantes que tem sido discutidas na atualidade. Quando comparado ao óleo diesel, o biodiesel tem um perfil mais favorável em relação à emissão de gases de combustão, como: monóxido de carbono, dióxido de enxofre, hidrocarbonetos, material particulado entre outros gases. Além disso, o uso de biodiesel, em larga escala, proporciona um aumento no cultivo de culturas que são utilizadas na produção de matéria-prima. Isso resultaria em maiores níveis de reciclagem de dióxido de carbono pela fotossíntese, minimizando, assim, o impacto sobre o efeito estufa (Al-Zuhair, 2007, Zhang, Dube *et al.*, 2003).

A forma mais comum de produção de biodiesel é através da reação de transesterificação, que consiste em uma reação química catalítica entre óleo (origem animal ou vegetal) e um álcool de cadeia curta, resultando em ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol. O triacilglicerol (triglicerídeo) é o principal componente dos óleos vegetais, composto por três ácidos graxos de cadeia longa esterificada a um esqueleto de glicerol. Quando o triglicerídeo reage com um álcool (etanol ou metanol, por exemplo), as três cadeias de ácidos graxos são liberadas do esqueleto do glicerol e se combinam com o álcool para produzir ésteres de ácidos graxos (FAAE ésteres de ácidos graxos etílicos, por exemplo) e glicerol (Fjerbaek, Christensen *et al.*, 2009).

Os catalisadores utilizados na transesterificação podem ser compostos ácidos ou básicos ou enzimáticos, podendo a enzima estar na sua forma livre ou imobilizada. Apesar da transesterificação alcalina ser a mais utilizada industrialmente (relativamente de baixo custo e boa reatividade), possui como desvantagem a formação de sabão durante a reação e difícil recuperação do catalisador. Ao contrário dos catalisadores básicos, as enzimas não apresentam estas desvantagens e ainda possuem uma alta especificidade e condições reacionais moderadas, com baixo consumo de energia. Apesar de eficientes, existem várias desvantagens no uso de enzimas para produção de biodiesel em

escala industrial, como o elevado custo e a possibilidade de inativação ou desnaturação enzimática. Uma alternativa possível e viável para superar algumas destas desvantagens é a imobilização em suportes sólidos (Meher, Sagar *et al.*, 2006, Narasimharao, Lee *et al.*, 2007).

A imobilização da enzima em uma matriz aumenta a estabilidade química e térmica, reduz a inativação, melhora o manuseio e facilita a sua recuperação. Alguns suportes ainda são capazes de aumentar a atividade catalítica da enzima, por meio de um efeito sinérgico. Enzimas têm sido imobilizadas em diferentes tipos de suportes inorgânicos (minerais e fabricados) e orgânicos (naturais e sintéticos). Como exemplo de suportes orgânicos naturais, podem ser citados os polissacarídeos (celulose, quitosana, quitina, entre outros) e as proteínas (colágeno, gelatina, albumina, entre outras). Dentre os sintéticos, encontram-se o poliestireno, os poliacrilatos, os polivinílicos, entre outros. Os suportes inorgânicos minerais mais utilizados são: areia, bentonita, pedra-pomes, entre outros, e dentre os fabricados, pode-se citar vidro, cerâmica e sílica de porosidade controlada, alumino-silicatos, óxido de ferro, níquel, entre outros (Endalew, Kiros *et al.*, 2011, Yucel, Demir *et al.*, 2011, Said e Pietro, 2004, Vasconcellos, Paula *et al.*, 2012, Salis, Pinna *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, pesquisadores têm se esforçado para identificar as características de um catalisador ideal para a síntese do biodiesel. O catalisador, além de ser economicamente viável, não deve causar danos ao ambiente. Além disso, deve ser quimicamente inerte, ter uma boa área superficial, ter resistência mecânica elevada e um baixo custo de produção. Alguns polímeros sintéticos são ideais para serem utilizados como matriz de imobilização, em especial o Poli (álcool vinílico) (PVA) que é uns dos mais versáteis. Existem vários relatos na literatura de seu uso para imobilização de células, proteínas, enzimas e também medicamentos. Dentre algumas vantagens, estão a fácil disponibilidade, a baixa toxicidade e o baixo custo (De Queiroz, Passos *et al.*, 2006, Uhlrich, Ulbricht *et al.*, 1996, Oh, Lee *et al.*, 2007).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho consistiu na síntese e caracterização de microesferas de PVA em diferentes molaridades (4, 12 e 25 M) para o uso como suporte para a imobilização de lipases de *Rhizomucor miehei* (RML), e posterior emprego do complexo Enzima-PVA como catalisador na reação de transesterificação do óleo de soja via rota etílica.

2 Fundamentação Teórica

2.1 Biodiesel

Dentre os biocombustíveis, o biodiesel tem o maior destaque devido à semelhança com o diesel convencional em termos de estrutura química e de conteúdo energético. Além disso, nenhuma modificação do motor a diesel é necessária, isto porque o biodiesel é compatível com os modelos de motores existentes no mercado e, por isso, tem sido misturado com diesel e utilizado comercialmente como combustível para transporte em vários países (Yusuf, Kamarudin *et al.*, 2011).

Segundo a lei número 11.097 de 13 de janeiro de 2005, biodiesel é um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores à combustão interna com ignição por compressão ou utilizado para geração de outro tipo de energia que possa substituir parcial ou totalmente (Brasil, 2005).

A Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM) o define como ésteres mono-alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa derivada de uma matéria-prima renovável lipídica, podendo ser óleo vegetal ou gordura animal. “Bio” representa a sua fonte de energia renovável e biológica em contraste com o combustível diesel tradicional à base de petróleo. “Diesel” refere-se ao seu uso em motores a diesel. Como um combustível alternativo, pode ser utilizado na forma pura ou misturado com diesel derivado do petróleo (Phan e Phan, 2008).

Além de possuir uma viscosidade semelhante ao diesel de petróleo, não é inflamável ou explosivo, possui um ponto de fulgor de 150°C em comparação a 64°C do diesel de petróleo. Ao contrário do óleo diesel, o biodiesel é biodegradável e não tóxico e reduz, significativamente, as emissões tóxicas e outros quando queimado como combustível (Yusuf, Kamarudin *et al.*, 2011).

Devido às suas características, o uso deste biocombustível traz vários benefícios como o aumento da segurança energética, redução de emissões de gases de efeito estufa, melhoria do desempenho do veículo, aumento do desenvolvimento econômico rural e, sob algumas circunstâncias, proteção de ecossistemas e de solos. Diante disto e do possível esgotamento de combustíveis

fósseis, o mercado mundial de biodiesel está em plena expansão e tem buscado formas de inserção desta matriz energética.

2.2 Histórico do Biodiesel no mundo

O motor a diesel funcionou de forma eficiente pela primeira vez em 10 de agosto de 1893. Foi criado por Rudolf Diesel, em Augsburg – Alemanha, que utilizou óleo de amendoim como combustível. O motor foi apresentado oficialmente na Feira Mundial de Paris, França, em 1900 (Yusuf, Kamarudin *et al.*, 2011).

A reação de transesterificação, utilizada para produção do biodiesel, foi estudada inicialmente na Bélgica. Em decorrência disto, no ano de 1937, surgiu a primeira patente relatando a transesterificação de óleos vegetais, utilizando catalisadores básicos, como os hidróxidos de metais alcalinos. Com o fim da Segunda Guerra Mundial, houve uma normalização no mercado mundial de petróleo, fazendo com que o biodiesel fosse temporariamente abandonado. A partir da década de 1980, sucessivas crises conjunturais ou estruturais fizeram com que pesquisadores e governantes se voltassem mais uma vez para a procura de alternativas renováveis para substituir o petróleo, e o biodiesel retornou como a principal alternativa ao diesel. Devido às pressões ambientalistas e ao desenvolvimento sustentável, a pesquisa com óleos vegetais nos anos 1990 ficou ainda mais evidente (Suarez e Meneghetti, 2007^a).

2.3 Histórico no Brasil

Seguindo a tendência mundial, o Brasil também apostou na tentativa de aproveitamento energético a partir de biomassa, de óleos e de gorduras em motores à combustão interna.

Em 1975, o Brasil iniciou um programa patrocinado pelo governo - o maior do mundo em biomassa - para produzir etanol a partir da cana. O objetivo era de reduzir a dependência de produtos importados à base de petróleo. O Programa Nacional do Álcool, ou Proálcool, foi criado em novembro de 1975, pelo Decreto n.º 76.953 (UNCTAD, 2006).

Em 22 de outubro de 1980, foi elaborado pela Comissão Nacional de Energia, por meio da Resolução número 007, o Plano de Produção de Óleos Vegetais para

Fins Carburantes (Pro-óleo). Neste documento, previa-se a regulamentação de uma mistura de 30% de óleo vegetal ou derivado no óleo diesel e uma substituição integral em longo prazo. No escopo deste programa de governo, foi proposta, como alternativa tecnológica, a transesterificação ou alcoólise de diversos óleos ou gorduras oriundos da atividade agrícola e do setor extrativista (Suarez e Meneghetti, 2007)a.

Em 2002, foi instituído o Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico de Biodiesel - Probiobiodiesel, pela portaria MCT número 702, de 30 de outubro de 2002. Este programa teve como intuito promover o desenvolvimento científico e tecnológico do biodiesel, a partir de ésteres etílicos de óleos vegetais puros e ou residuais (Brasil, 2002).

Neste período, o biodiesel deixou de ser um combustível puramente experimental e passou para as fases iniciais de produção industrial. Assim, foi instalada a primeira indústria de ésteres de ácidos graxos no Estado de Mato Grosso em novembro de 2000, começando com uma produção de 1.400 toneladas por mês de éster etílico de óleo de soja (Suarez e Meneghetti, 2007)a.

A Lei nº 11.097, publicada em 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira. Foi proposto um percentual mínimo obrigatório de 5% (cinco por cento), em volume, de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional (Brasil, 2005). Primeiramente, foi aprovada a adição voluntária de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo. A partir de 2008, a mistura seria obrigatória, e, em 2013, a percentagem de biodiesel na mistura subiria para 5%. Em razão do sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), foi antecipado pelo Governo Federal o aumento percentual para 5% em 2010.

2.4 Mercado e produção de biodiesel no mundo

Melhorar a segurança energética e reduzir, ou mesmo eliminar, as emissões de gases causadores do efeito estufa, são os principais objetivos que obrigam os governos a identificar e comercializar alternativas para a substituição dos combustíveis de petróleo que dominam o mercado (IAE, 2004). Desta forma, em muitos países, promoveu um aumento na produção e na comercialização deste tipo de biocombustível.

A produção mundial de biodiesel apresentou um crescimento mais expressivo a partir de 2005, estimulada por legislações favoráveis à entrada dos biocombustíveis como forma de combate ao aquecimento global e para a melhoria do ar nas grandes cidades (Sebrae, 2007).

A produção global de biodiesel aumentou 7,5% em 2010, chegando perto de 19 bilhões de litros, e, em uma média de cinco anos (final de 2005 a 2010), houve um crescimento de 38% (REN 21, 2011).

A União Europeia é um das maiores produtoras de Biodiesel do mundo, sendo seus principais produtores: Alemanha, França, Itália e Espanha. Em 2010, a produção europeia alcançou a marca de 9,5 milhões de toneladas. Porém, houve uma desaceleração no crescimento, com o aumento de apenas 2% em 2010, abaixo da taxa de crescimento de 19% em 2009, isto devido à forte competição no exterior. O maior aumento foi visto no Brasil, nos Estados Unidos e na Argentina (REN 21, 2011).

Os Estados Unidos também detêm grande parte da produção de biodiesel mundial. Realizada, principalmente, com óleo de soja, e, em menor proporção, com óleos variados, como os de reciclagem de óleos de fritura e sebo animal. De acordo com os dados divulgados pela EPA (Environmental Protection Agency), os EUA atingiram a marca de um bilhão de litros de combustível em 2011. Segundo a National Biodiesel Board, a produção de um bilhão de litros de biodiesel gerou aproximadamente 39.027 empregos em todo o país e mais de US\$ 2,1 bilhões em renda familiar. Um adicional de 11.698 postos de trabalho pode ser criado entre 2012 e 2013 só em crescimento contínuo na produção e com uma extensão do incentivo fiscal (NBB, 2011).

Na Figura 1, pode-se observar a produção mundial de biodiesel em bilhões de litros no período de 2000 a 2010. Nota-se que houve um aumento na produção, enquanto que, no ano 2000, foi de 0,8 bilhões de litros, em 2010, alcançou a marca de 19 bilhões de litros.

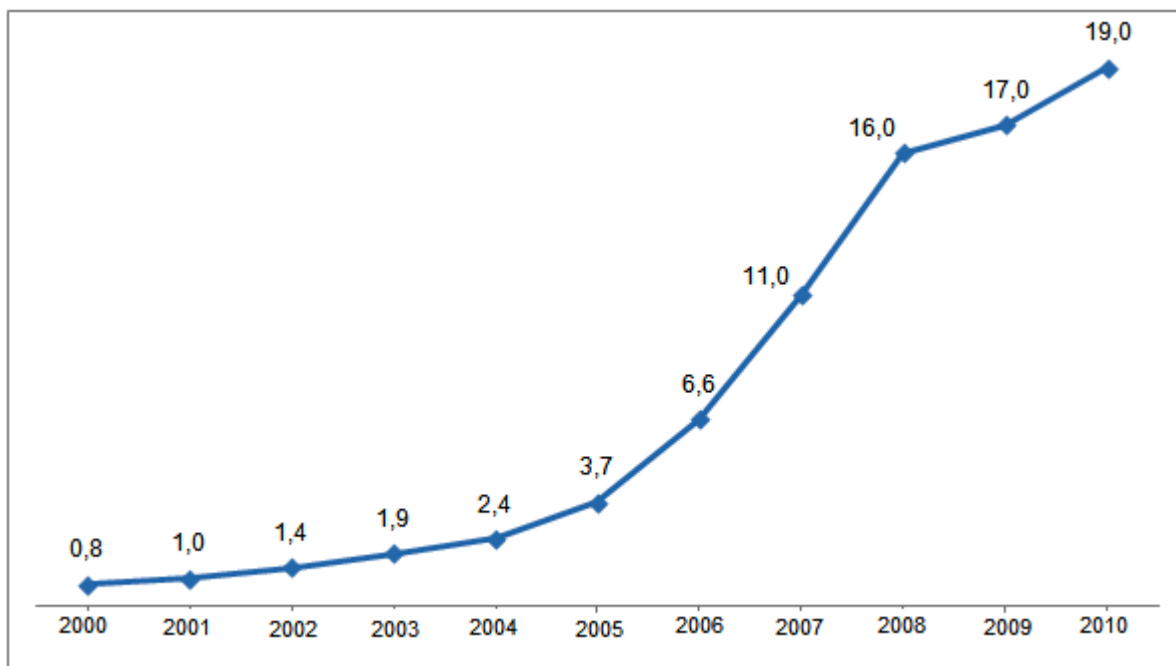


Figura 1 Produção de biodiesel mundial em bilhões de litros (2000-2010). Fonte: (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century), 2011

Na Figura 2, observa-se a quantidade de biodiesel consumido em milhões de m^3 nos EUA, Alemanha, Brasil e Argentina. De 2008 a 2010, o principal consumidor foi Alemanha, seguido do Brasil e, por último, EUA e Argentina. Em 2011, devido a incentivos na produção e na comercialização, os EUA ultrapassaram a Alemanha e o Brasil em consumo. Ainda assim, Brasil, Alemanha e Argentina se destacam entre os principais produtores e consumidores de biodiesel do mundo.

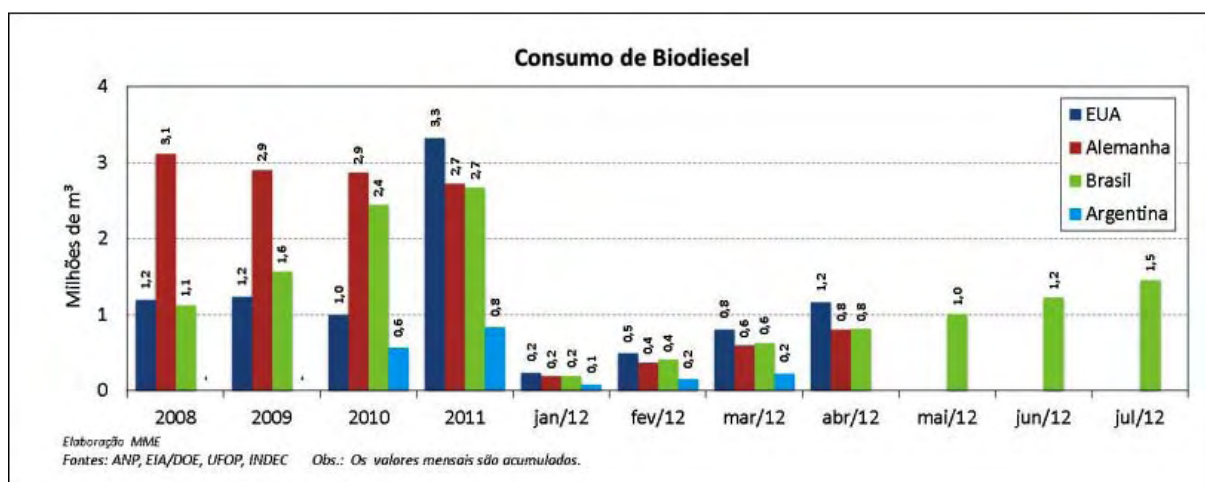


Figura 2 Consumo de biodiesel em milhões de m^3 nos Estados Unidos, Alemanha, Brasil e Argentina (2008-2012). Fonte: (Ministério de Minas e Energia: Departamento de Combustíveis Renováveis), 2012.

2.5 Mercado e produção do biodiesel no Brasil

Existem 65 usinas produtoras de biodiesel autorizadas pela Agência Nacional do Petróleo para operação no país, das quais 61 possuem autorização para comercialização do biodiesel produzido (Brasil, 2012).

Segundo dados da ANP, em 2011, a capacidade nominal de produção de biodiesel (B100) foi de cerca de 6,8 milhões m³. Entretanto, a produção efetiva do Brasil foi de aproximadamente 2,7 milhões m³, o que correspondeu a 39,5% da capacidade total. O óleo de soja é a principal matéria-prima para a produção de biodiesel (B100). A segunda matéria-prima no *ranking* de produção das usinas foi o sebo bovino, seguido pelo óleo de algodão. Além disso, foram gerados 273,4 mil m³ de glicerina como subproduto na produção total de biodiesel (B100) do País (ANP, 2012).

A Figura 3 mostra a evolução na produção de biodiesel no Brasil (m³) nos anos 2005 a 2011. A cada ano, há um aumento na produção do biocombustível, e, apesar de possuir uma grande capacidade industrial ociosa, o Brasil apresenta grande potencial para aumentar a sua produção.

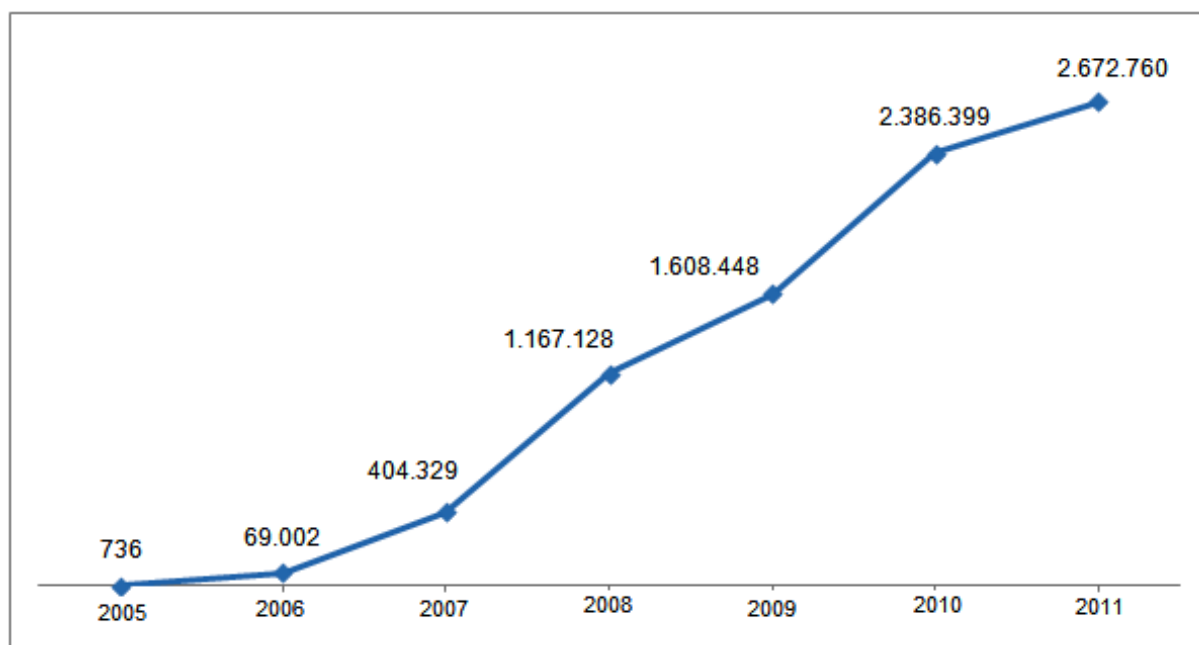


Figura 3 Produção nacional de Biodiesel B100 em metros cúbicos de (2005-2011). Fonte: (Ministério de Minas e Energia: Departamento de Combustíveis Renováveis)

2.6 Matérias primas para produção do biodiesel

Óleos vegetais tais como soja, milho, girassol, algodão, amendoim, óleo de canola, além de gordura e óleos de restaurante reciclados são as principais matérias-primas para a produção de biodiesel. Além disso, as gorduras de origem animal, sebo (bovino) e banha de porco podem ser utilizadas. A expansão do uso e da produção de matéria-prima para biodiesel deve ser avaliada em termos de impacto ambiental. Para este fim, a soja é uma das poucas culturas oleaginosas que adquirem nitrogênio por meio da fixação biológica, o que melhora a qualidade do solo (Kinney e Clemente, 2005).

Na Figura 4, encontram-se classificadas, por regiões, as principais matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil.



Figura 4 Principais matérias-primas utilizadas para produção do biodiesel no Brasil. Fonte: (Brisolara, 2008)

O gráfico a seguir (Figura 5) apresenta a evolução da participação das matérias-primas mais utilizadas na produção de biodiesel no período de janeiro de 2009 a junho de 2012. No último mês, as três principais matérias-primas foram óleo de soja (79,5%), sebo bovino (17,3%) e óleo de algodão (1,6%). (Brasil, 2012)

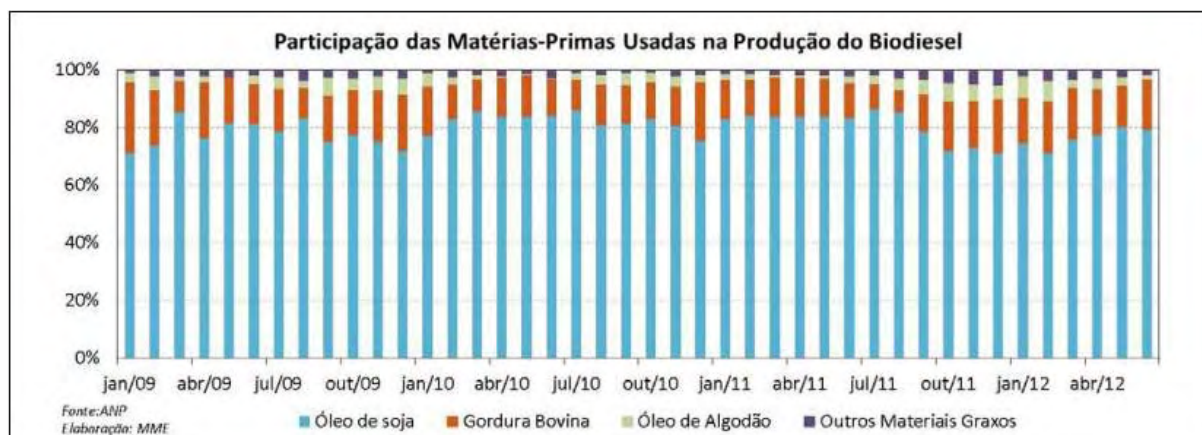


Figura 5 Participação das matérias-primas usadas na produção de biodiesel (2009-2012). Fonte: (Ministério de Minas e Energia: Departamento de Combustíveis Renováveis), 2012

Quanto à escolha entre metanol e etanol, o primeiro é mais reativo, e os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) produzidos são mais voláteis do que de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE). No entanto, o etanol é menos tóxico e é renovável, porque pode ser facilmente produzido a partir de fontes renováveis por fermentação. No que diz respeito às suas características como combustíveis, FAME e FAEE mostram pequenas diferenças, por exemplo, FAEE possui viscosidade ligeiramente mais alta do que o FAME (Yusuf, Kamarudin *et al.*, 2011), (Bozbas, 2008).

2.7 Reação de transesterificação

A forma mais comum de obtenção do biodiesel é mediante à reação de transesterificação. Este mecanismo consiste em três reações consecutivas e reversíveis em que o triglicerídeo é convertido primeiramente em diglicerídeo, em seguida em monoglicerídeo e, finalmente, este é convertido em glicerol. Uma molécula de éster de ácido graxo é liberada em cada etapa. (Figura 6)

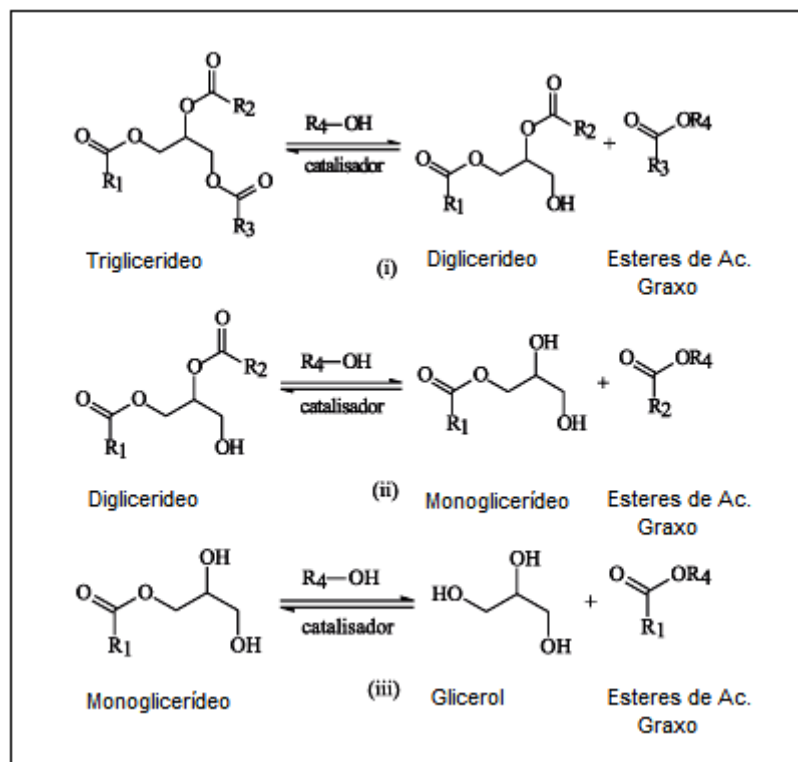


Figura 6 Reações (em etapas) envolvidas na transesterificação do triglicerídeo. Fonte: (Suarez, Plentz Meneghetti et al., 2007b)

A principal desvantagem do óleo vegetal é a sua elevada viscosidade e baixa volatilidade, que faz com que a combustão seja pobre em motores a diesel. A transesterificação reduz a viscosidade para um valor comparável ao diesel e, conseqüentemente, melhora a combustão (Basha, Gopal *et al.*, 2009).

Vários parâmetros, incluindo tipo de catalisador (compostos básicos, ácidos ou enzimáticos), proporção molar entre o álcool e o óleo, pureza dos reagentes, temperatura, agitação, entre outros, influenciam o curso da transesterificação, dos quais o mais relevante é a proporção entre álcool e óleo (Ma e Hanna, 1999; Narasimharao, Lee *et al.*, 2007).

2.7.1 Transesterificação via catálise ácida

Neste processo, a reação é catalisada por um ácido, sendo o mais usado o ácido sulfúrico (Leca, Tcacenco *et al.*, 2010). O rendimento destes catalisadores é elevado, porém a reação é lenta, exigindo, tipicamente, a temperatura acima de 100°C e mais de 3 horas para atingir elevada conversão (Meher, Sagar *et al.*, 2006).

A principal desvantagem da transesterificação ácida é que a formação de ésteres é acompanhada da formação de água que pode inibir o processo. Ao

mesmo tempo, a alta concentração de ácido e a temperatura elevada podem degradar uma parte do óleo, o que reduz o rendimento do biodiesel. Além disso, o ácido por ser corrosivo e, assim, deteriorar os equipamentos (Leca, Tcacenco *et al.*, 2010).

2.7.2 Transesterificação via catálise básica

Os catalisadores alcalinos, como hidróxido de sódio, metóxido de sódio, hidróxido de potássio, metóxido de potássio são os mais eficazes. Além do rendimento de ésteres elevado, os catalisadores básicos são mais facilmente manipuláveis e menos corrosivos às instalações. No entanto, as matérias primas utilizadas para a transesterificação catalisada por compostos básicos devem atender à determinadas especificações (Meher, Sagar *et al.*, 2006). A água presente nas matérias primas faz a reação mudar parcialmente para a saponificação. A saponificação não só consome o catalisador alcalino, mas também os sabões resultantes podem causar a formação de emulsões, o que cria dificuldades na recuperação e na purificação do biodiesel. Assim, o óleo vegetal desidratado com menos de 0,5% em massa de ácidos graxos livres, um catalisador alcalino anidro e um álcool anidro são necessários para este tipo de sistemas (Al-Zuhair, 2007).

2.7.3 Transesterificação via catálise enzimática

A utilização de enzimas na reação de transesterificação tem sido proposta para superar as desvantagens que enfrentam os métodos de produção convencionais em que são utilizados catalisadores químicos, e têm revelado resultados promissores, como é o caso da enzima lipase (Al-Zuhair, 2007).

O interesse em utilizar lipases como biocatalisadores para transesterificação de óleos vegetais é devido à alta eficiência e seletividade. A formação de sabão é evitada, conseqüentemente, a etapa da lavagem do biodiesel é eliminada. Em comparação com métodos químicos que utilizam catalisadores alcalinos ou ácidos, a utilização de lipases para a produção de biodiesel tem as seguintes vantagens:

- Maior compatibilidade com as variações na qualidade da matéria-prima e reutilização (tolera matérias-primas contendo água);

- Capacidade de produzir biodiesel em um menor número de etapas usando menos energia (reação requer condições brandas);
- Formação de baixa quantidade de águas residuais (ambientalmente viável);
- Facilidade na remoção de glicerol e purificação do biodiesel, o que gera produtos de melhor qualidade (Leca, Tcacenco *et al.*, 2010).

2.8 Enzimas como Biocatalisadores e sua atuação

Em processos industriais, a substituição de catalisadores químicos por enzimas, deve-se, principalmente, às condições brandas de pH e temperatura em que estas macromoléculas geralmente atuam. O uso de enzimas pode reverter em benefícios econômicos como consequência da redução do tempo e de energia elétrica gasta, assim como na preservação de tanques reacionais, não mais submetida à alta pressão, à temperatura e à corrosão. Além disso, as enzimas abriram possibilidades de diminuir rejeitos industriais que podem comprometer o meio ambiente (Said e Pietro, 2004).

2.9 Lipases

2.9.1 Fontes, propriedades e aplicações

Lipases (triacilglicerol acil hidrolases, EC 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas de ocorrência natural em animais, vegetais e microrganismos. Sua função biológica é catalisar a hidrólise de triglicerídeos mediante a clivagem de ligações ésteres, resultando em ésteres de ácido graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol (Macrae e Hammond, 1985), (Jaeger, Dijkstra *et al.*, 1999).

As razões para o enorme potencial biotecnológico das lipases incluem as seguintes características:

- São estáveis em solventes orgânicos.
- Não requerem cofatores.
- Possuem uma especificidade de substrato ampla.
- Apresentam uma enantiosselectividade elevada.

Devido à essas propriedades físico-químicas interessante, certo número de lipases tem sido produzido comercialmente, sendo a maioria proveniente de fungos e de bactérias (Jaeger e Reetz, 1998) como, por exemplo, *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosa* e *Rhizomucor miehei* (Al-Zuhair, 2007).

Por serem enzimas versáteis, são capazes de catalisar diversas reações, tais como hidrólise (Phuah, Lai et al., 2012), esterificação (Kraai, Winkelman et al., 2008) (Lorenzoni, Graebin et al., 2012) e interesterificação, (transesterificação, alcóólises e acidólises) (Palla, Pacheco et al., 2012). (Ver Figura 7)

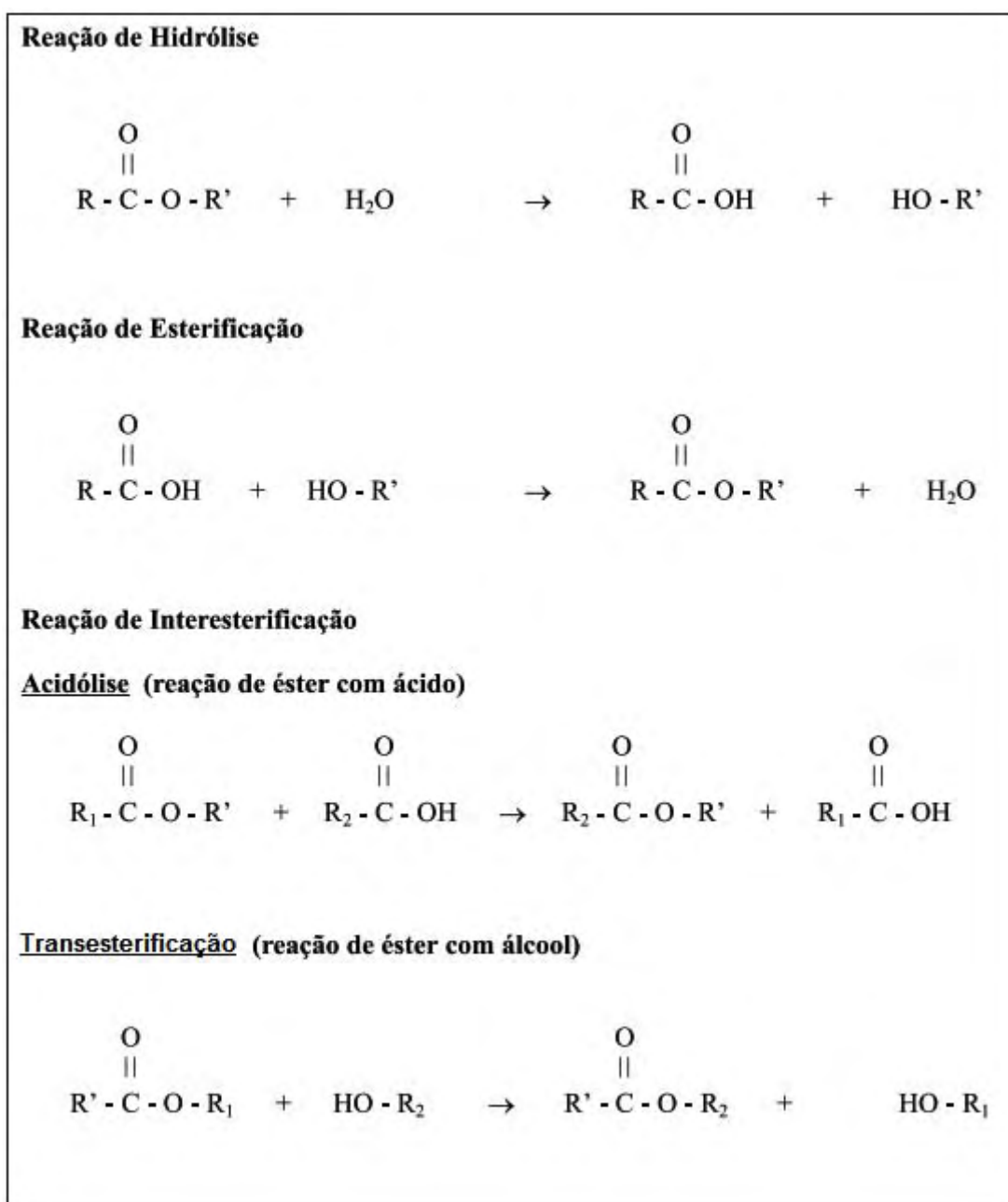


Figura 7 Reações catalisadas por enzimas lipases (hidrólise, esterificação e interesterificação). Fonte: (Carvalho, Campos et al., 2003) adaptada

Devido às suas múltiplas aplicações, as enzimas lipases têm ocupado um lugar de destaque entre os biocatalisadores, tais como na fabricação de detergente (Macrae e Hammond, 1985), em indústria de alimentos (Jaeger e Reetz, 1998), na fabricação de produtos farmacêuticos e cosméticos (Sharma, Chisti *et al.*, 2001), em catálise de produtos de grande interesse industrial (Jaeger, Dijkstra *et al.*, 1999), entre outras inúmeras aplicações.

Na Tabela 1, estão descritas as principais aplicações industriais no setor alimentício e químico da enzima lipase.

Tabela 1 Aplicações industriais de lipases.

Setor	Efeito Utilizado	Produto
Alimentício		
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos
Panificação	Melhoramento do sabor e prolongamento da estabilidade de prateleira.	Confeitos e bolos
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção dos lipídeos.	Bebidas alcoólicas como: saque e vinho
Processamento dos derivados do ovo	Melhoramento da hidrólise do ovo por hidrólise dos lipídeos.	Maionese, molhos e cremes
Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção do excesso de gorduras.	Produtos embutidos
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais e hidrólise de ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos.	Óleos e gorduras modificadas
Química		
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Detergente	Remoção de manchas de óleo e gorduras	Detergentes
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosmético em geral
Curtume	Remoção de gordura da pele dos animais	Produtos de couro
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes, e outros, em combinação com outras enzimas

Fonte: (De Castro, Mendes *et al.*, 2004).

2.9.2 Estrutura e Atuação

A lipase do fungo de *Rhizomucor miehei* foi descrita pela primeira vez na literatura em 1973 (Rodrigues e Fernandez-Lafuente, 2010). É formada por uma cadeia proteica única polipeptídica constituída por 269 resíduos de aminoácidos (Brady, Brzozowski *et al.*, 1990). A enzima purificada possui massa molecular de 31600 Dalton e uma constante isoelétrica de 3,8 (Wu, Jaaskelainen *et al.*, 1996).

Estudos mostram que a lipase de *Rhizomucor miehei* possui uma estrutura com conformação em α/β hidrolase composta de uma sequência específica de α hélices e folhas β pregueadas. Hidrolisam as ligações éster, por meio de uma tríade catalítica, composta por um resíduo de serina (Ser 144) nucleofílico ativado por uma ligação de hidrogênio, em contato permanente com uma histidina (His 257) e um aspartato (Asp 203) (Brady, Brzozowski *et al.*, 1990; Schmid e Verger, 1998) (Figura 8).



Figura 8 Representação gráfica tridimensional da estrutura da Enzima Lipase de *Rhizomucor miehei*.
Fonte: (Protein Data Bank)

As lipases podem ser divididas em dois grupos em relação à sua regioespecificidade exibida com substratos de triglicerídeos (Macrae e Hammond, 1985) (Figura 9). O primeiro grupo pertence às lipases não específicas. Estas não possuem regioespecificidade, por isso catalisam a hidrólise de triglicerídeos para ácidos graxos livres e glicerol, nas três posições. As lipases pertencentes a este grupo não mostram especificidade com relação à natureza do grupo acila ou à posição em que este está esterificado no glicerol. Essas lipases hidrolisam, totalmente, os triglicerídeos em glicerol e ésteres de ácido graxos. Várias espécies de microrganismos produzem lipases não específicas, tais como: *Penicillium cyclopium*, *Corynebacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Candida cylindracea* (Macrae e Hammond, 1985; Carvalho, Campos *et al.*, 2003).

O segundo grupo é constituído pelas lipases que apresentam regioespecificidade nas posições 1- e 3- dos triacilglicerois. Com essas lipases, os triglicerídeos são hidrolisados originando 1,2(2,3) diglicerídeos e 2-monoglicerídeos. A hidrólise dos triglicerídeos é, normalmente, mais rápida que a dos diacilglicéridos, e, conseqüentemente, há o acúmulo de di- e monoglicerídeo durante a reação. Os compostos 1,2(2,3) diacilglicéridos e 2-monoglicerídeos são quimicamente instáveis e são isomerizados espontaneamente para as posições 1 ou 3, transformando em 1,3 diacilglicéridos e 1 monoglicerídeo respectivamente. Conseqüentemente, a enzima consegue hidrolisar completamente os triglicerídeos. As lipases de *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger* e *Rhizomucor miehei* pertencem a este grupo (Macrae e Hammond, 1985; Carvalho, Campos *et al.*, 2003).

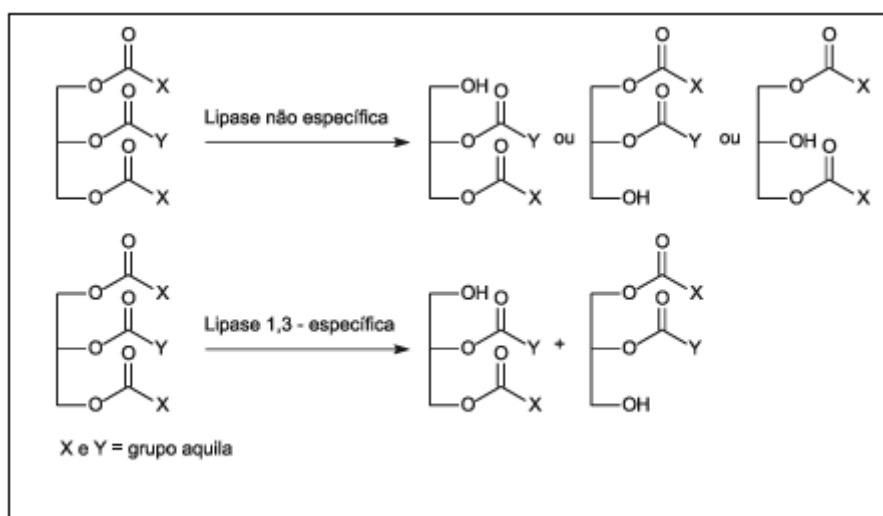


Figura 9 Reações catalisadas por lipase do tipo específica e não específica. Fonte: (Paques e Macedo, 2006)

2.9.3 Ativação interfacial

Embora sejam solúveis em água, as lipases são capazes de catalizar reações envolvendo substratos lipídicos insolúveis na interface óleo-água (Schmid e Verger, 1998). As enzimas lipolíticas são caracterizadas por aumentar, drasticamente, sua atividade catalítica quando atua na interface óleo-água. Este fenômeno é chamado de “ativação interfacial”. Este aumento na atividade enzimática é desencadeado por rearranjos estruturais na região do sítio ativo da enzima que permite o acesso do substrato à região catalítica. Na ausência da interface óleo/água, o sítio ativo é recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ou “*lid*” (Jaeger, Dijkstra *et al.*, 1999), (Rodrigues e Fernandez-Lafuente, 2010). Esta estrutura consiste em uma sequência de proteínas que recobre o sítio ativo, que se move em contato com a interface óleo-água (Villeneuve, Muderhwa *et al.*, 2000) (Figura 10). Na presença de substâncias hidrofóbicas, o *lid* é aberto, tornando os sítios ativos acessíveis ao substrato (Jaeger, Dijkstra *et al.*, 1999).

Na Figura 10, observa-se a estrutura da enzima lipase da *Rhizomucor miehei* em dois momentos: Lipase de forma fechada (A, C) e de forma aberta (B, D). Nos item A e B (vista lateral), podem-se visualizar a tríade catalítica (amarelo) e os elementos de estrutura secundária mostrando a estrutura alfa/beta-hidrolase comum em todas as lipases. Após a abertura da tampa, a tríade catalítica (amarelo) torna-se acessível (D) ao substrato na interface óleo-água.

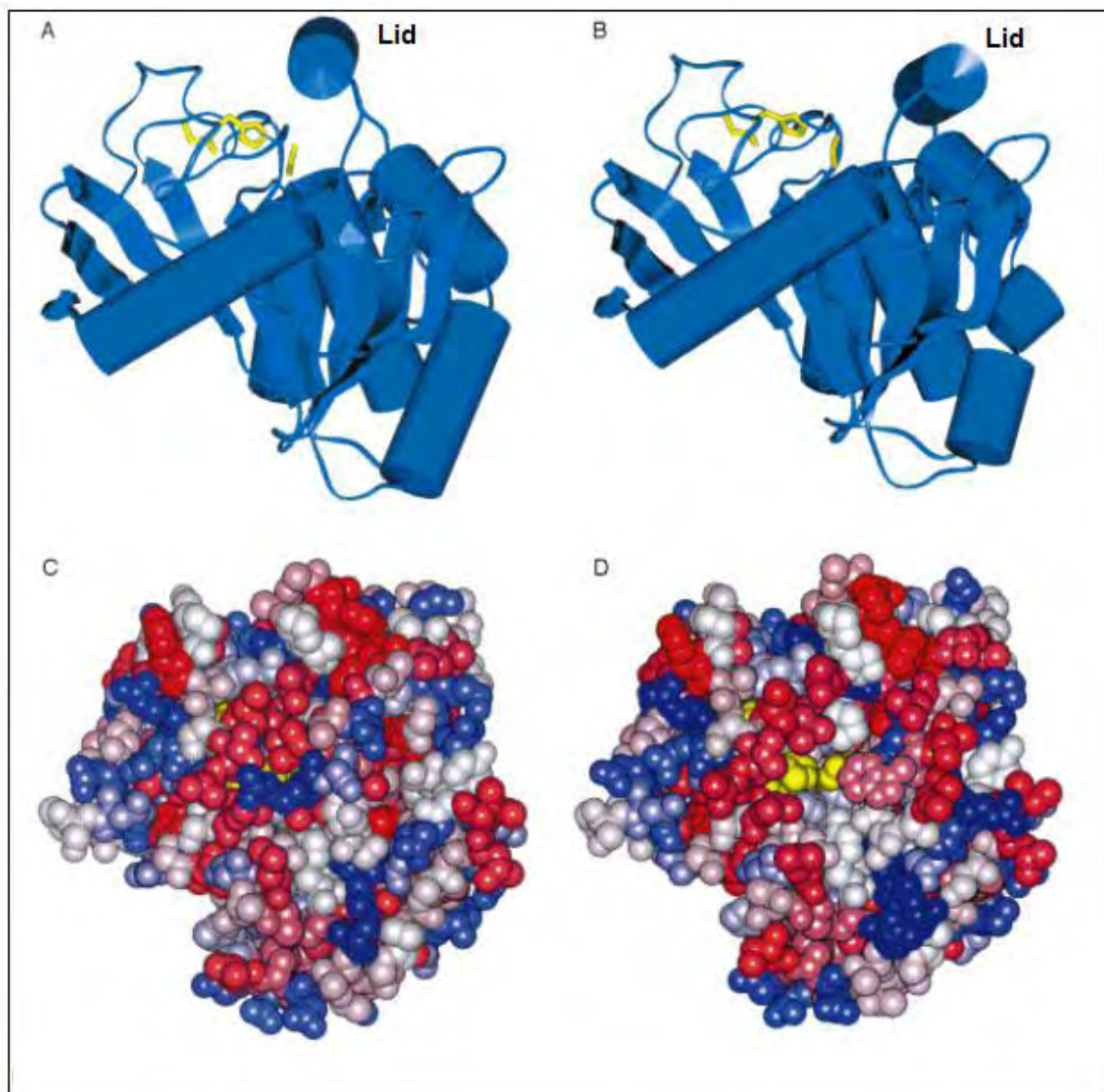


Figura 10 Representação gráfica da estrutura da lipase de *Rhizomucor miehei* na forma aberta (A, C) e forma fechada (B, D). Fonte: (Schmid e Verger, 1998)

2.9.4 Mecanismo de catálise

Uma maior compreensão a respeito do mecanismo de ação das lipases foi obtida a partir da resolução de sua estrutura cristalina. A partir de técnicas de cristalografia de raio-X, Brady *et al* (1990) elucidaram a estrutura de uma lipase extracelular purificada a partir do fungo RML. A tríade catalítica da molécula de lipase se encontra recoberta pelo “lid” estabilizado por extensas interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Suas cadeias laterais formam uma constelação que é estereoquimicamente muito semelhante ao de serinas proteases, e, portanto o mecanismo de catálise das lipases é parecido com as serina proteases (Brady,

Brzozowski *et al.*, 1990). O movimento do “*lid*” traz uma profunda alteração na superfície da enzima. Cerca de doze aminoácidos hidrofóbicos se tornam significativamente mais expostos na ativação, isto acompanhado por uma perda significativa da característica polar da superfície (Derewenda, Brzozowski *et al.*, 1992).

A hidrólise do substrato pela lipase ocorre em quatro etapas. (Ver Figura 11) A reação se inicia com um ataque hidrofílico do grupo hidroxila do resíduo de serina ao carbono carbonila ativado do éster do lipídeo. Um intermediário tetraédrico é formado, sendo o oxiânion (O^-) estabilizado pela interação com dois grupos peptídicos NH. A histidina doa um próton ao componente álcool que está deixando o substrato. Desta forma ocorre a formação de um intermediário covalente (enzima acilada), estando o componente ácido do substrato esterificado pelo resíduo de serina da enzima. Uma molécula de água é ativada pelo resíduo de histidina na vizinhança, e o oxiânion resultante da desprotonação da hidroxila da serina realiza um ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente. O resíduo de histidina doa um próton ao átomo de oxigênio de resíduo de serina ativo, a ligação éster entre a serina e componente acila é clivada, liberando o produto acilado. Consequentemente, a enzima está pronta para receber nova molécula do substrato (Reis *et al.*, 2009).

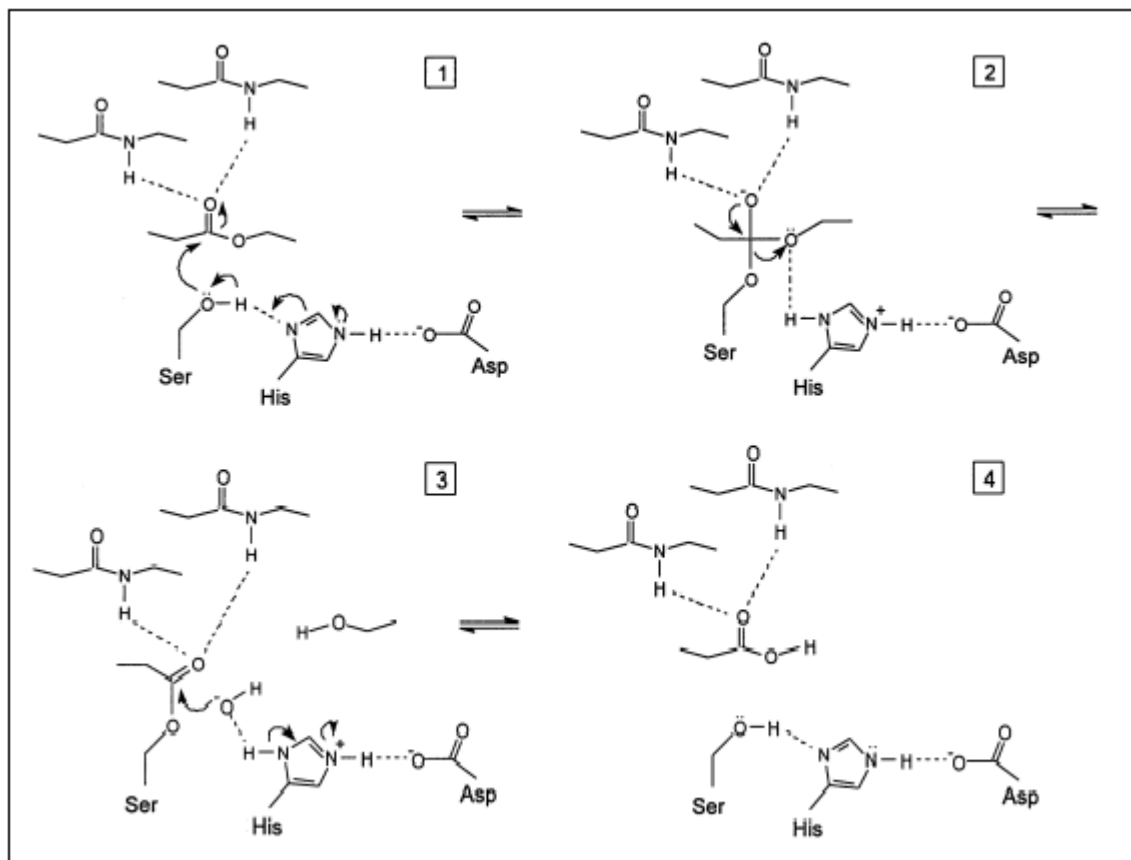


Figura 11 Mecanismo de catálise da lipase. Fonte: (Jaeger, Dijkstra et al., 1999)

2.10 Imobilização de enzimas em suportes

Como já citado anteriormente, as enzimas apresentam importantes características que tornam o seu uso mais vantajoso quando comparadas aos catalisadores químicos. As enzimas requerem temperaturas e pressões normais, com consequente diminuição do risco de inativação térmica dos compostos termolábeis, redução das necessidades energéticas e dos efeitos corrosivos dos processos. Além disso, devido à sua natureza proteica e à sua conformação tridimensional, as enzimas apresentam alta especificidade ao substrato, característica esta que reduz, significativamente, a obtenção de produtos indesejáveis, diminuindo, desta forma, os custos de separação de produtos, bem como os problemas de tratamento de efluentes (Cabral, Aires-Barros *et al.*, 2003).

Alguns aspectos negativos na utilização de enzimas inviabilizam o uso na sua forma livre como, por exemplo, instabilidade em algumas condições devido à inativação, proteólise, formação de agregados, ação de solventes orgânicos, elevado custo de obtenção da enzima (desde o isolamento até a purificação) e

elevado custo para separação do substrato e produto final (Jegannathan, Abang *et al.*, 2008).

Por isso, apesar das vantagens catalíticas, sua utilização em processos industriais tem sido limitada. A fim de reunir todas as vantagens das enzimas aproveitando seu potencial catalítico, mas diminuindo suas desvantagens, tem se estudado a imobilização de enzimas em suportes sólidos. Imobilizar a enzima em suportes insolúveis ao meio reacional a torna mais ativa e estável e, ainda, com boa especificidade ao substrato, conseqüentemente, as enzimas podem ser utilizadas em processos industriais de forma similar aos catalisadores químicos (Cabral, Aires-Barros *et al.*, 2003).

A imobilização de enzimas consiste no confinamento da enzima a uma região restrita, garantindo a retenção da atividade catalítica e assegurando a possibilidade da sua utilização de forma repetida ou contínua (Jegannathan, Abang *et al.*, 2008; Tan, Lu *et al.*, 2010).

Esta metodologia tem sido aplicada à uma vasta gama de biocatalisadores, abrangendo desde extratos enzimáticos purificados à células integras de origem microbianas, tecidos vegetais ou animais (Cabral, Aires-Barros *et al.*, 2003).

É importante que o complexo enzima-suporte mantenha as características físicas do suporte e, ao mesmo tempo, retenha a atividade biológica da enzima em sua forma estável (Said e Pietro, 2004).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem com modificações no sítio ativo (Carvalho, Campos *et al.*, 2003).

2.10.1 Vantagens na imobilização de enzimas

Dentre as principais vantagens na imobilização de enzimas em suportes de diversas naturezas, podemos citar:

- Retenção da enzima: possível reutilização do catalisador, possibilidade de operar a elevadas taxas de diluição e minimização da contaminação do produto.
- Concentração elevada da enzima: maior produtividade volumétrica, bioconversão mais rápida, minimização de reações secundárias.

- Microambiente do biocatalisador controlado: manipulação da atividade e especificidade catalítica, aumento da estabilidade catalítica.
- Fácil separação entre produto e biocatalisador: minimização dos riscos de metabolização do produto e controle preciso do tempo de conversão (Said e Pietro, 2004).

2.10.2 Desvantagens na imobilização de enzimas

As principais desvantagens na imobilização de enzimas são:

- Perda da atividade catalítica durante a etapa de imobilização: dependendo das condições, pode haver uma alteração na estrutura tridimensional da proteína, resultando em uma menor atividade. Ou, ainda, alterações na orientação ou no acesso do substrato ao sítio ativo, podendo reduzir a especificidade ao substrato (Said e Pietro, 2004).
- Perda da atividade catalítica devido à matriz de imobilização: pode ser causada devido às variações locais de pH e às restrições estereoquímicas de acesso ao centro ativo. Ou ainda, devido à alterações na orientação ou no acesso do substrato ao sítio ativo, podendo reduzir a especificidade ao substrato. Também pode haver um acúmulo de produto próximo ao sítio ativo, podendo afetar a cinética da reação, ou provocando alterações no microambiente da enzima (Said e Pietro, 2004).
- Perda de atividade catalítica durante a bioconversão: perda do biocatalisador, susceptibilidade química ou mecânica da matriz levando à destruição, ao envenenamento da matriz ou ao acúmulo de contaminantes (Cabral, Aires-Barros *et al.*, 2003).

A diminuição da atividade catalítica de uma enzima pode ocorrer também, quando se estabelecem ligações cruzadas intermoleculares, geralmente atribuída à modificações conformacionais na sua estrutura terciária. Por exemplo, ligações covalentes entre a enzima e o suporte podem alongar a molécula de enzima e, assim, alterar a estrutura tridimensional do sítio catalítico (Cabral, Aires-Barros *et al.*, 2003).

2.11 Métodos para imobilização de enzimas

Os métodos existentes para imobilização de enzimas em suportes sólidos dividem-se em duas grandes categorias: ligação a um suporte e a oclusão ou encapsulação à matrizes (Carvalho, Campos *et al.*, 2003; Cardoso, De Moraes e Cass, 2009).

Na ligação a um suporte, o biocatalisador é retido na superfície de um sólido mediante interações estabelecidas entre a matriz e o catalisador. Uma vasta gama de interações, abrangendo desde força de Van der Waals a ligações covalentes, pode ser responsável pela retenção do catalisador à matriz. Embora algumas destas interações possam se estabelecer entre o catalisador e a superfície não modificada da matriz, a versatilidade e a efetividade da imobilização a um suporte podem ser incrementadas por meio de modificações químicas introduzidas na matriz, por reações com agentes bifuncionais (glutaraldeído, carbodi-imida) ou metais de transição (óxido de titânio ou zircônio), as quais permitem a formação de ligações covalentes (Cabral, Aires-Barros *et al.*, 2003).

Na imobilização por oclusão ou encapsulação, a solidificação de uma suspensão contendo o catalisador é induzida por meios químicos ou físicos. Deste processo, resulta a formação de um gel insolúvel em água, no interior do qual fica retido o catalisador, numa forma ativa. A formação do gel pode ser provocada pela presença de cátions multivalentes, por ação da temperatura, por polimerização ou precipitação (Said e Pietro, 2004).

Na Figura 12, destacam-se os principais métodos para imobilização de enzimas.

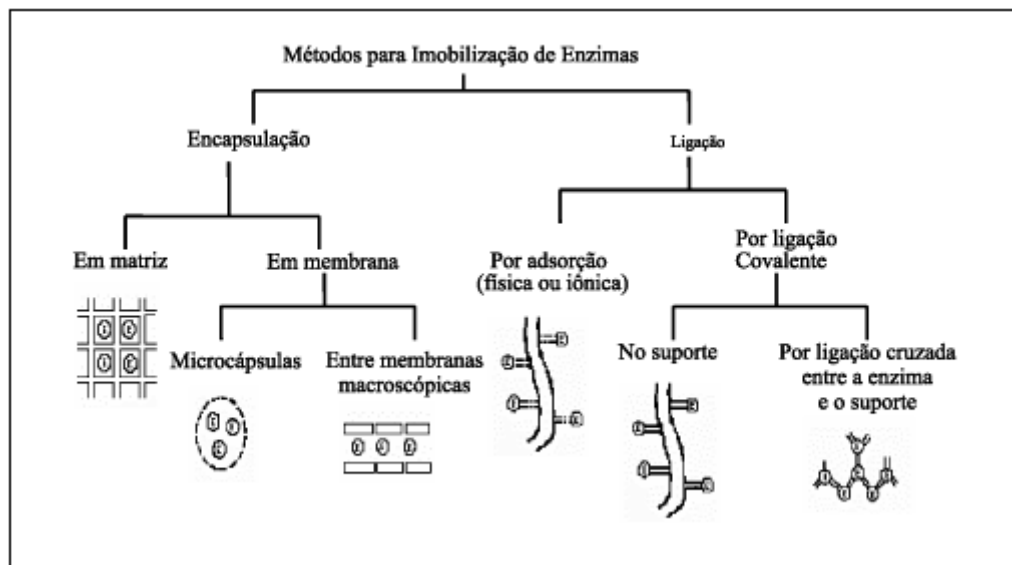


Figura 12 Métodos para imobilização de enzimas. Fonte: (Dalla-Vecchia, Nascimento et al., 2004)

Existem diversas matrizes utilizadas para a imobilização de enzimas. Dentre essas, destacam-se os polímeros orgânicos. A preferência deste tipo de suporte deriva da sua adaptabilidade a diferentes métodos de imobilização por ligação a um suporte ou por oclusão. É relativamente fácil inserir à superfície do suporte grupos funcionais reativos para ligação do biocatalisador. Porém, a sua principal desvantagem reside na resistência química e mecânica relativamente reduzida, limitando as possibilidades da sua regeneração (Cabral, Aires-Barros *et al.*, 2003).

2.11.1 Adsorção física

O método mais antigo e simples para imobilização de catalisadores consiste na adsorção a um suporte sólido, sem qualquer modificação prévia da matriz do catalisador.

A interação enzima-matriz deve-se ao estabelecimento de ligações fracas, do tipo Van der Waals, hidrofóbicas, eletrostáticas ou ligação de hidrogênio. Para a imobilização do catalisador, basta colocá-lo em contato com a matriz, com as características adequadas para a adsorção, em condições selecionadas de pH, força iônica, natureza do tampão e temperatura. O suporte contendo o catalisador é recolhido e lavado. Este método, de custo reduzido, assegura uma retenção elevada da conformação ativa da enzima e da sua atividade catalítica intrínseca (Kharrat, Ben Ali *et al.*, 2011).

A sua aplicação é limitada dada à natureza reversível da ligação entre o catalisador e a matriz, a qual é influenciada pelas condições operacionais, como pH, temperatura, força iônica do meio reacional. Outra desvantagem associada a este método reside na possibilidade de sobrecarga do suporte, de que pode resultar em uma redução da atividade específica, bem como na deposição de espécies carregadas no suporte, que podem originar modificações dos parâmetros cinéticos ou do pH do microambiente (Carvalho, Campos *et al.*, 2003).

2.11.2 Ligação iônica

A utilização de resinas de troca iônica como suporte de imobilização permite o estabelecimento de ligação iônica entre a matriz e o catalisador. A força deste tipo de interação situa-se entre a adsorção física e a ligação covalente. As limitações e vantagens são semelhantes às da adsorção física, podendo inativar o catalisador em meios reacionais com força iônica elevada ou em meios que registrem variações significativas de pH. O método de ligação iônica baseia-se na atração da enzima pelo suporte sólido contendo íons residuais. A força de interação envolvida (interação íon-íon) é mais forte que a força de Van der Waals, porém mais fraca que a ligação covalente (Said e Pietro, 2004).

2.11.3 Ligações covalentes de enzimas:

O procedimento envolve a modificação química de um resíduo de aminoácido, através da formação de uma ligação covalente da enzima com um material insolúvel em água, pela fixação da enzima em matriz por ligação covalente ou pela formação de ligações cruzadas numa matriz, contendo a enzima e usando vários agentes bifuncionais (Dalla-Vecchia, Nascimento *et al.*, 2004).

O grande número de processos existentes visando à ativação da superfície e à formação de ligações covalentes permite a aplicação em uma vasta gama de sistemas (Pahujani, Kanwar *et al.*, 2008; Cao, Bornscheuer *et al.*, 1999; Yucel, Demir *et al.*, 2011).

Os grupos funcionais da enzima que permitem a ligação com o suporte são:

- a) grupos aminos: α -NH₂ da cadeia terminal e o ϵ -amino da lisina;
- b) grupos carboxílicos: β e μ do aspartato e glutamato, respectivamente, e o α -carboxílico;
- c)

grupo fenólico da tirosina; d) grupo tiol da cisteína; e) grupo hidroxílico da serina, treonina e tirosina; f) grupo imidazol da histidina; g) grupo indol do triptofano (Cabral, Aires-Barros *et al.*, 2003).

Todavia, a sua aplicação é, muitas vezes, limitada, devido ao custo elevado de algumas matérias-primas, à complexidade de certos processos de imobilização e a uma considerável perda de atividade catalítica (Cabral, Aires-Barros *et al.*, 2003).

2.11.4 Métodos de oclusão ou encapsulação

2.11.4.1 Oclusão em gel:

Neste processo de imobilização, o biocatalisador é confinado ao interior de uma matriz sem que seja estabelecida qualquer ligação química. Não se observam alterações estruturais ou interações com o centro ativo, enquanto o substrato pode se difundir através da matriz (Cardoso, De Moraes e Cass, 2009).

Neste sistema, cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto pequenas moléculas como substratos e produtos se difundem (Dalla-Vecchia, Nascimento *et al.*, 2004).

As principais limitações associadas ao uso deste método residem na baixa estabilidade mecânica, na reduzida longevidade do gel, além de limitações à transferência de massa. A porosidade do gel, bem como a sua estabilidade mecânica e características difusionais do substrato através do gel, são parâmetros críticos para a implementação de um processo eficaz (Cabral, Aires-Barros *et al.*, 2003).

2.11.4.2 Encapsulação:

A encapsulação do biocatalisador consiste no aprisionamento de enzimas ou células no interior de uma membrana semipermeável como microcápsula e micelas invertidas. A natureza, a porosidade e as dimensões da membrana podem ser definidas de modo a se adaptarem melhor ao sistema reacional escolhido. As micelas invertidas são agregados esféricos de moléculas tensoativas, em que a camada externa é constituída pelas caudas hidrofóbicas das moléculas de

tensioativo e o interior, pelos grupos polares dessas moléculas. As micelas invertidas formam-se, espontaneamente, quando se dissolve um tensoativo num solvente orgânico apolar. No interior das micelas, podem ser solubilizados enzimas e ácidos nucleicos. A concentração elevada de tensoativo, que dificulta a separação e a recuperação da enzima, é uma das limitações deste sistema (Cabral, Aires-Barros *et al.*, 2003).

2.12 Suportes usados como matrizes para imobilização de enzimas

Um suporte sólido ideal para imobilização de enzimas deve possuir certas características que contribuam para manutenção e melhoria da atividade enzimática, tais como (Said e Pietro, 2004):

- Características morfológicas: os suportes devem possuir uma área superficial compatível com a quantidade de enzima para possibilitar a imobilização. É ideal, também, que possua uma grande superfície interna.
- Características químicas: a presença de grupos químicos nos suportes permite que estes possam ser ativados ou modificados de modo que possibilite a ligação da enzima.
- Natureza hidrofílica: é desejável se ter um suporte com características hidrofílicas a fim de se obter uma boa difusividade do substrato, além de permitir a estabilização da enzima.
- Insolubilidade: o suporte insolúvel no meio previne a liberação da enzima no suporte e evita contaminação do produto pelo suporte dissolvido e a enzima.
- Estabilidade química, mecânica e térmica: o suporte deve ser quimicamente resistente durante o processo de imobilização e nas condições em que se processa a reação. A resistência mecânica deve permitir o uso de filtração, centrifugação e agitação, durante todo o processo. A estabilidade térmica é outra característica importante que o suporte deve manter para prevenir a inativação da enzima durante a reação.
- Resistência ao ataque microbiológico: o suporte deve ter resistência à degradação por microrganismos, para evitar a liberação da enzima para a solução.

- Regenerabilidade: é ideal que o suporte possa ser regenerado ou reutilizado ou, ao menos, ser biodegradável evitando, assim, poluição.

Devido às suas características, os suportes à base de polímeros são ideais para a imobilização de enzimas. Na literatura, existem diversos relatos de empregos de polímeros como matrizes de imobilização (Dizge e Keskinler, 2008; Salis, Pinna *et al.*, 2008; Dizge, Keskinler *et al.*, 2009; Yucel, Demir *et al.*, 2011). De fato, o sucesso se deve às propriedades físico-químicas destes materiais, as quais possibilitam que a enzima fique imobilizada de tal maneira que, ainda assim, catalise reações eficientemente.

Dalla-Vechia *et al* (2005) utilizaram diversas fontes de lipases imobilizadas em filmes de carboximetilcelulose, poli (álcool vinílico) e uma mistura dos dois polímeros (50:50% m/m) na esterificação do ácido láurico com n-pentanol em meio orgânico. Os resultados mostraram alta estabilidade na reação de esterificação, e, portanto, podem ser utilizados com sucesso como materiais alternativos para a imobilização da lipase.

Em outra publicação, Dizge *et al* (2009) sintetizaram uma nova matriz polimérica microporosa (MPPM) de baixo custo em três formas: bloco, gota e pó. O polímero foi sintetizado utilizando estireno, divinilbenzeno e poliglutaraldeído. A enzima lipase foi imobilizada no polímero mediante ligação covalente. Por fim, o complexo polímero-enzima foi empregado como catalisador na produção de biodiesel utilizando óleos de girassol, de soja e óleo de cozinha usado via rota metílica. Todas as formas do MPPM foram usadas com sucesso para a produção de biodiesel, porém a forma em pó foi a mais eficiente. Segundo os pesquisadores, isto se deve a uma mistura eficiente dos reagentes com o complexo polímero-enzima durante a reação. Por manter sua atividade estável, o complexo polímero-enzima pode ser usado industrialmente em processos que exigem lipases imobilizadas.

Yucel *et al* (2011) sintetizaram uma matriz polimérica microporosa a partir de copolímeros de estireno-divinilbenzeno (STY e DVB). Enzimas lipases foram imobilizadas neste polímero por meio de adsorção física e de ligação covalente e, em seguida, utilizada para transesterificar a reação de óleo de canola e metanol. Os pesquisadores concluíram que o processo foi eficaz para produção de biodiesel, e, além disso, há possibilidade de reuso do catalisador por até dez vezes.

Enzima lipase, também, foi imobilizada dentro de espumas de poliuretano hidrofílicas utilizando poliglutaraldeído. Em seguida, o suporte com a enzima foi utilizado para produção de biodiesel usando óleo de canola e metanol. O poliglutaraldeído foi empregado como um agente de ligação cruzada entre os grupos aminas e aumentou a estabilidade da enzima. Foi constatado que o catalisador imobilizado foi altamente estável, e pode ser usado, pelo menos, mais 10 vezes sem perda da atividade enzimática (Dizge e Keskinler, 2008).

Salis *et al* (2008) caracterizaram lipases de diversas fontes e as imobilizou em macroporos de polipropileno por adsorção física para a síntese de biodiesel utilizando óleo vegetal e metanol em sistema livre de solvente. Em condições adequadas, também foi possível obter um alto rendimento de ésteres etílicos.

Enzima lipase foi encapsulada em microesferas de Alginato de sódio/Álcool (poli vinílico) (AlgNa/PVA) na presença do agente de ligação cruzada tetraborato de cálcio. Pôde-se observar, nesta pesquisa, que a forma imobilizada da enzima foi mais favorável para a hidrólise do óleo de azeite do que a forma livre, devido às melhores condições interfaciais existentes na microesfera. Além disso, verificou-se que a lipase na forma imobilizada foi mais ativa que na sua forma livre. Neste caso, a diferença nas atividades enzimáticas podem estar relacionados a uma alta hidratação do microambiente da lipase imobilizada nas microesferas de AlgNa/PVA. Por isso, as microesferas porosas de AlgNa/PVA também podem ser uma alternativa interessante para aplicação em catálise heterogênea (De Queiroz, Passos *et al.*, 2006).

Oh *et al* (2007) imobilizou lipase em microesferas de poli (álcool vinílico) utilizando glutaraldeído para induzir a formação de ligações covalentes. A estabilidade e o efeito térmico da enzima no suporte foram observados, bem como a sua atividade depois de várias reutilizações. A forma imobilizada da lipase teve uma estabilidade térmica e de pH melhor do que sua forma livre. Além disso, 90% da atividade enzimática da lipase imobilizada foram mantidas após cinco usos consecutivos. Portanto, há possibilidade de uso da lipase imobilizada em ambientes severos exigidos em muitas aplicações industriais.

2.13 Poli (álcool vinílico)

2.13.1 Estrutura e propriedades

Os poli (álcool vinílicos) (PVA) são polímeros do álcool vinílico. Por ser altamente instável, o álcool vinílico pode se transformar, espontaneamente, em acetaldeído. Consequentemente, o polímero não pode ser obtido diretamente (Tobolsky, 1967; Bassner e Klingenberg, 1998) Por isso, o PVA é obtido por saponificação de um poli (vinil éster) como, por exemplo, o poli (acetato de vinila) (PVAc) (Lee, S. G., Kim, J. P. *et al.*, 2006). O PVA foi descoberto por Haehnel e Herrmann que, por meio da adição de uma base (hidróxido de potássio) na presença de etanol em uma solução de poli (acetato de vinila), foram capazes de obter o PVA. (Figura 13) Os primeiros relatos científicos sobre PVA foram publicados em 1927 (Tobolsky, 1967).

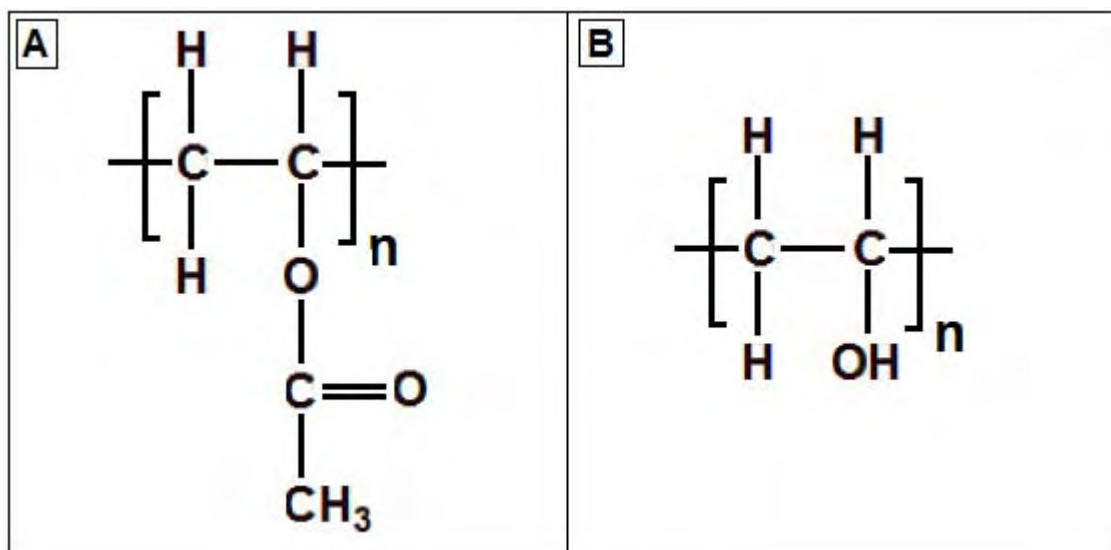


Figura 13 Fórmulas estruturais: A) Poli (acetato de vinila) B) Poli (álcool vinílico)

A excelente resistência química e as propriedades físicas do PVA resultaram em amplo uso industrial (Tobolsky, 1967). Partículas de PVA têm sido um dos materiais mais utilizados devido às suas propriedades vantajosas, tais como biocompatibilidade e elasticidade, compressibilidade elevada, boa resistência química aos ácidos, bases e detergentes, entre outras propriedades (Peixoto, Silva *et al.*, 2006; Semenzim, Basso *et al.*, 2011). São ecologicamente viáveis, pois são biodegradados facilmente e podem ser assimilados por organismos de ocorrência natural no ambiente (Tobolsky, 1967).

Em relação à sua estrutura, o PVAc possui grupos carbonilas característicos dos ésteres, que apresentam polaridade média em comparação aos grupos hidroxilas presentes no PVA. Portanto, o poli (álcool vinílico) é mais solúvel em água do que o poli (acetato de vinila), pois seus grupos hidroxilas podem fazer ligações de H (pontes de H) com a água, aumentando sua solubilidade (Tobolsky, 1967).

O PVAc é predominantemente um polímero amorfo, isto significa que as cadeias do polímero se orientam de uma forma aleatória. A forma cristalina se forma como resultado do alinhamento das cadeias de polímero e da interação de uns com os outros (Bassner e Klingenberg, 1998). O PVA pode ser organizado como uma fibra cristalina, seus grupos hidroxilas são, suficientemente, pequenos para se ajustar dentro de uma rede cristalina. Além disso, a capacidade de cristalizar é a propriedade física mais importante do PVA, uma vez que a cristalinidade controla a solubilidade em água, a resistência à tração e as propriedades termoplásticas. Assim, esse recurso tem sido e continua a ser o ponto focal da pesquisa acadêmica e industrial (Tobolsky, 1967).

A cristalinidade do PVA é resultado de extensas pontes de hidrogênio formadas entre cadeias de polímeros. A cadeia de carbono do PVA pode ser representada como uma linha sólida, contínua com os grupos hidroxilas ligada nos carbonos. Quando duas cadeias se aproximam estreitamente, podem se alinhar de modo que o hidrogênio de um grupo hidroxil, pode interagir com o oxigênio de um grupo hidroxila da cadeia vizinha (Bassner e Klingenberg, 1998). A Figura 14 mostra as pontes de hidrogênio formadas entre cadeias de PVA totalmente hidrolisado (A) e as formadas entre o PVAc parcialmente hidrolisados (B).

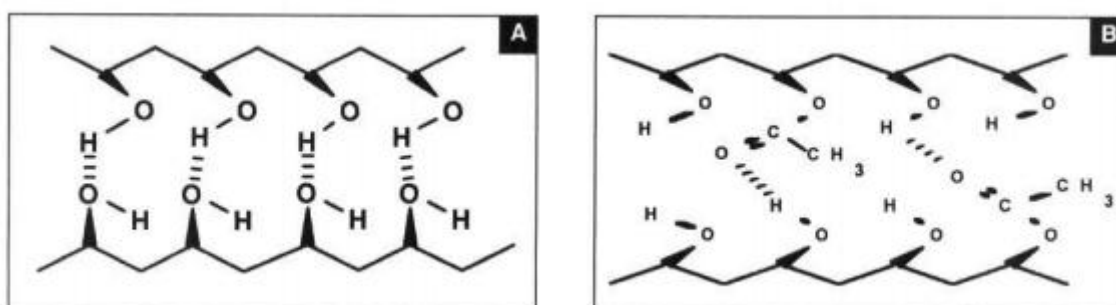


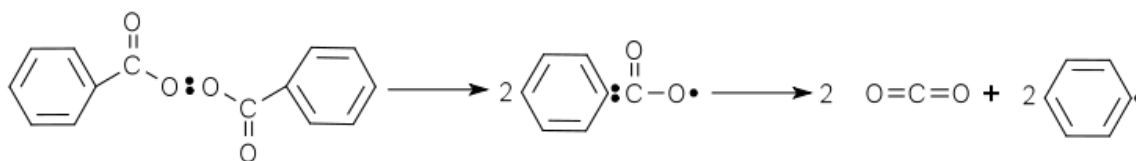
Figura 14 Representação da cadeia de PVA com suas ligações de hidrogênio. A) PVA totalmente hidrolisado B) PVAc parcialmente hidrolisado. Fonte: (Bassner e Klingenberg, 1998)

2.13.2 Síntese de microesferas de PVA/PVAc

O processo de formação do PVAc se dá pela polimerização em suspensão, em que o monômero insolúvel é colocado em água, contendo um iniciador solúvel na fase orgânica. O monômero (acetato de vinila) é disperso na fase aquosa contínua por uma combinação de forte agitação e uso de pequenas quantidades de agentes de suspensão (estabilizantes). Uma condição satisfatória de agitação mecânica é suficiente para manter o monômero na forma de gotículas, que são lentamente convertidas de um estado líquido de alta mobilidade para uma mistura altamente viscosa, e, finalmente, para uma partícula de polímero sólidos. Os estabilizantes impedem a coalescência das gotas orgânicas suspensas na fase aquosa, estabilizando a gota de polímero. Sua função é diminuir a tensão interfacial entre as gotas de monômero e a água, promovendo a dispersão das gotas. Além disso, as moléculas estabilizantes são adsorvidas sobre a superfície das gotas de monômero, produzindo uma fina camada que evita a coalescência das gotas quando ocorre a colisão entre elas. O poli (álcool vinílico) (PVA) é um dos estabilizantes mais utilizados em polimerizações em suspensão. O tamanho médio da partícula e a distribuição de tamanhos das partículas podem ser controlados de forma simples numa faixa relativamente estreita, manipulando-se a velocidade de agitação e a quantidade de agente de suspensão (Machado, Lima *et al.*, 2007).

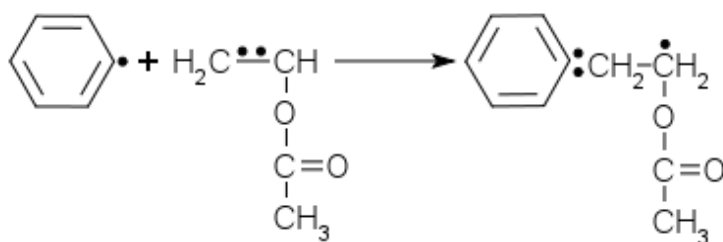
Os iniciadores são indispensáveis na etapa responsável pela formação de radicais livres numa reação de polimerização em cadeia (Machado, Lima *et al.*, 2007). Na polimerização do acetato de vinila, são usados, por exemplo, peróxido de hidrogênio, peróxido de benzoíla, peróxido de laurílico, entre outros. O peróxido de benzoíla tem sido muito usado em polimerizações de emulsão com iniciadores solúveis em água, especialmente quando o monômero foi adicionado continuamente durante a reação (Tobolsky, 1967).

O Esquema 1 mostra a formação dos radicais livres a partir do peróxido de benzoíla, que ocorre quando a ligação entre os oxigênios é rompida devido ao ganho de energia cinética das moléculas.



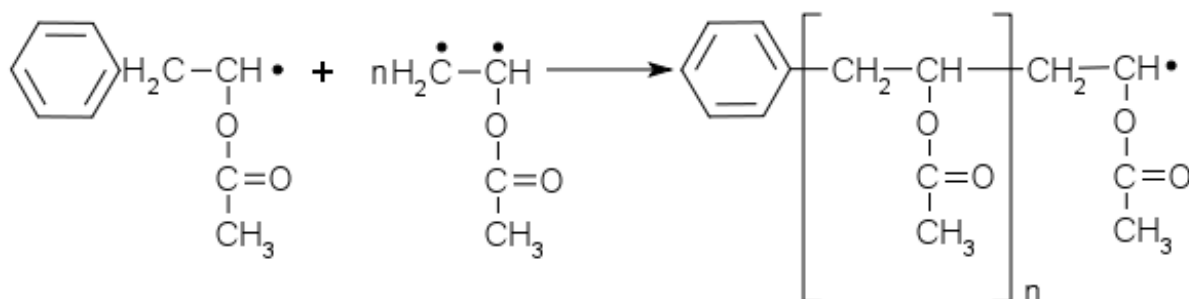
Esquema 1 Formação dos radicais livres a partir do peróxido de benzoíla

Em seguida, o radical livre formado ataca o acetato de vinila, desencadeando a iniciação da cadeia polimérica, conforme mostrado no Esquema 2.



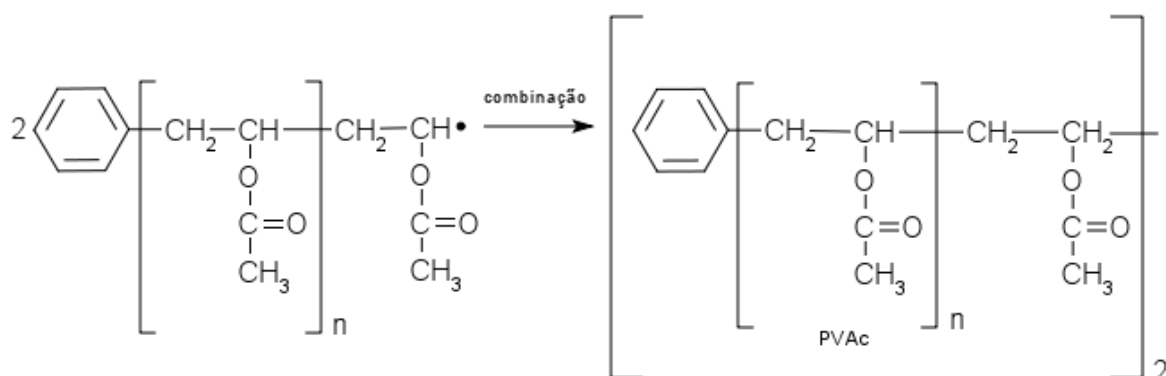
Esquema 2 Iniciação da cadeia polimérica na formação do poli (acetato de vinila) PVAc

Após os radicais livres se ligarem aos monômeros, a polimerização entra no estágio da propagação da cadeia (Esquema 3) com a ligação sequencial das unidades monoméricas.



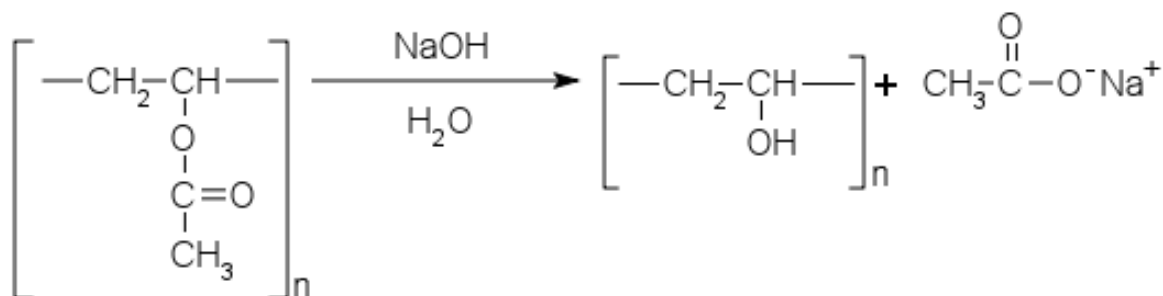
Esquema 3 Propagação da cadeia polimérica na formação do poli (acetato de vinila) (PVAc)

Em seguida, por combinação, a cadeia polimérica é finalizada (Esquema 4). (Solomons e Fryhle, 2001)



Esquema 4 Terminação da cadeia polimérica, por combinação, na formação do poli (acetato de vinila) (PVAc)

O Poli (acetato de vinila) pode ser convertido em Poli (álcool vinílico) por um processo chamado saponificação. Nesta reação, certa quantidade de base é adicionada em quantidades catalíticas para promover a troca do grupamento acetato pelo grupo hidroxil. Os catalisadores, mais frequentemente, descritos na literatura são hidróxido de sódio ou de potássio, metóxido de sódio, etóxido de sódio, entre outros (Tobolsky, 1967). O Esquema 5 abaixo apresenta o processo de saponificação com o hidróxido de sódio (NaOH), que promove a troca do grupo acetato (CH_3COO^-) existente no PVAc, com o grupo hidroxila (OH^-) existente na solução alcalina para a formação do PVA.



Esquema 5 Hidrólise alcalina do poli (acetato de vinila) (PVAc) para obtenção do poli (álcool vinílico) (PVA), obtendo como subproduto o acetato de sódio (CH_3COONa)

O PVA é, frequentemente, utilizado como matriz para a imobilização de várias enzimas e células por causa de sua fácil disponibilidade e baixo preço. Além disso, a sua estrutura química pode causar a estabilização de proteínas por meio da ligação com as cadeias do polímero (Uhlrich, Ulbricht *et al.*, 1996). Por isso, devido às suas importantes características, este material foi escolhido para ser utilizado no processo de imobilização da enzima lipase e subsequente transesterificação a partir do óleo de soja e de etanol para a formação de biodiesel.

3 Objetivos

3.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivos sintetizar e caracterizar microesferas de PVA utilizando diferentes concentrações de base alcalina (NaOH) no processo de saponificação (4, 12 e 25 mol/L); estudar o uso desses suportes para imobilização da enzima lipase de *Rhizomucor meihei* (RML) e, finalmente, avaliar a atividade enzimática dos diferentes complexos polímero-enzima para a transesterificação do óleo de soja a biodiesel, usando a rota etílica.

3.2 Específico

Os objetivos específicos a serem alcançados são os seguintes:

- Síntese de microesferas de PVA (4, 12 e 25 M).
- Caracterização das microesferas de PVA puras pelas técnicas de DRX, SEM, ATR-FTIR, RMN, Potencial Zeta.
- Estudo da imobilização de lipases de *Rhizomucor miehei* em microesferas de PVA.
- Caracterização das microesferas de PVA imobilizadas com enzimas (denominados complexos Enzima-PVA) pelas técnicas de SEM, ATR-FTIR, RMN, Potencial Zeta.
- Caracterização da quantidade de proteína adsorvida no suporte polimérico pela técnica espectrofotométrica em 595nm.
- Avaliação da atividade enzimática na hidrólise do reagente *p*-nitrofenil palmitato pela análise espectrofotométrica em 410nm.
- Avaliação da capacidade da enzima quanto sua natureza hidrolisante ou esterificante por meio de zimograma de atividade.
- Avaliação da temperatura ótima e da estabilidade térmica do complexo (enzima-polímero).
- Estudo catalítico do complexo (Enzima-polímero) para a reação de transesterificação do óleo de soja a biodiesel via rota etílica.

- Estudo para otimização das melhores condições de síntese utilizando o delineamento experimental tipo Box-Behnken, e
- Análise da quantidade de ésteres obtida mediante Cromatografia em camada delgada e Cromatografia de fase Gasosa.

4 Procedimentos experimentais

4.1 Materiais e Métodos

Para a preparação das microesferas de PVA foram utilizados os seguintes reagentes químicos: álcool polivinílico (peso molecular de 78000 Da e grau de hidrólise de 86,5-89,5%) e peróxido de benzoíla (pureza mínima de 99%) obtidos da Vetec Química Fina (Brasil); terc-Butanol, hidróxido de sódio e acetato de vinila (grau de pureza mínimo de 99%) obtidos da Merck Brasil e sulfato de sódio 99,0%, obtido da Sigma Aldrich.

A enzima lipase utilizada foi a PALATASE 20000L (solução líquida, tamanho molecular 31.600 dalton, pI 3.8, 5% em peso de proteína enzimática ativa e 200000 U/g obtido pela Sigma-Aldrich), que é uma lipase purificada a partir de *Rhizomucor miehei* 1,3 específico, produzida por fermentação submersa de um *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado.

Para a imobilização da lipase em microesferas de PVA foi utilizado tampão fosfato (0,05M pH 7,0), preparada a partir de fosfato monobásico de sódio e fosfato dibásico de sódio (grau de pureza mínimo de 99%), obtidos da Sigma Aldrich. Para a determinação da quantidade de proteína imobilizada foi utilizado reagente Bradford obtido da Sigma Aldrich. Os reagentes utilizados para a determinação da atividade enzimática foram 4-nitrofenil palmitato, triton X-100, álcool isopropílico e carbonato de sódio obtidos da Sigma Aldrich.

Para a produção de biodiesel foi utilizado óleo de soja refinado, contendo 0,5% em massa de ácidos graxos livres e 1% de água obtida a partir de Cargill Oil Company (Brasil) e etanol anidro (Sigma-Aldrich, 99,8%).

4.2 Síntese de microesferas de PVA (4, 12 e 25 Molar)

As microesferas de PVA foram sintetizadas de acordo com processo previamente descrito por Semenzim *et al.* (2011). Primeiramente, foram sintetizadas microesferas de PVAc, e em seguida as mesmas foram submetidas ao processo de saponificação, originando as microesferas de PVA. O objetivo foi sintetizar microesferas de PVA 4 mol/L com estrutura amorfa (PVA4), em que foi utilizada uma base alcalina de concentração 4 mol/L (NaOH 4 mol/L); e microesferas de PVA 12 mol/L e 25 mol/L com estruturas cristalinas (PVA12 e PVA25), em que foram utilizadas soluções alcalinas de NaOH nas concentrações de 12 mol/L e 25 mol/L respectivamente.

Na Tabela 2 estão relacionados todos os reagentes químicos utilizados na síntese e sua função no processo.

Tabela 2 Reagentes utilizados para a síntese de microesferas e suas funções

Reagente	Função
Água destilada	Meio de suspensão reacional
Álcool polivinílico	Agente de suspensão e estabilizante que impede a aglutinação das gotas de monômero
Acetato de vinila	Monômero do PVAc
Álcool terc-butanol	Solvente orgânico insolúvel em água adicionado com o monômero
Peróxido de Benzoíla	Iniciador da reação através da formação de radicais livres
Sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄)	Promove a dispersão das microesferas
Hidróxido de sódio (NaOH) em diferentes concentrações (4, 12 e 25 mol/L)	Base utilizada para a hidrólise alcalina das microesferas de PVAc, transformando-as em PVA

A síntese típica foi preparada seguindo as seguintes etapas:

Etapa 1: Síntese de microesferas de PVAc

Em um balão de fundo redondo, equipado com condensador e sob atmosfera de nitrogênio, uma solução de A (0,07 g de álcool polivinílico), dissolvido em 100 mL de água destilada foi lentamente aquecida até 70°C, e mantido a esta temperatura

durante 60 minutos com agitação constante (350 rpm). Depois de 60 minutos, 1 g de peróxido de benzoíla foram adicionados à solução A, e 2 minutos mais tarde, uma solução de B (25 ml de acetato de vinila dissolvido em 25 ml de terc-butanol) foi também adicionada à solução A. A reação foi mantida sob agitação durante 4 horas, resultando em microesferas de poli (acetato de vinila) (PVAc).

Etapa 2: Hidrólise alcalina das microesferas de PVAc

Após as 4 horas de agitação, a temperatura da reação foi reduzida para 35°C. Em seguida, foi adicionado à reação descrita na etapa 1, 20 mL de uma solução salina de (Na_2SO_4 0,1g/mL). Logo em seguida, 100 mL de soluções de NaOH com diferentes concentrações (4 mol/L, 12 mol/L ou 25 mol/L) foram adicionados lentamente com o auxílio de uma bureta às reações. A reação foi mantida sob agitação contínua (200 rpm) “overnight” a 35°C. Em seguida, os produtos finais foram filtrados e lavados várias vezes com água destilada. Por fim, as microesferas foram colocadas em água destilada e congeladas (-20 ° C) durante 12 horas.

Os produtos finais foram liofilizados (Liofilizador Liotop L101), antes da caracterização físico-química.

4.3 Imobilização de lipases em microesferas de PVA

A imobilização da lipase foi realizada utilizando todas as microesferas de PVA preparada na seção 4.2.

Foi realizado um pré - tratamento com as microesferas de PVA, utilizando um método descrito por (Lee, D. H., Kim, J. M. *et al.*, 2006). Neste trabalho, Lee *et al* (2006) enfatizou o pré-tratamento com óleo de soja, a fim de permitir que os ácidos graxos se liguem ao sítio ativo antes de imobilização, prevenindo assim que o polímero interaja com resíduos de aminoácidos importantes relacionados a catálise. A técnica de imobilização utilizada foi adaptada a partir (Dizge, Keskinler *et al.*, 2009).

Em um balão de fundo redondo, foi preparada uma solução 1:20 de enzima lipase (5,87mg/ml) / tampão de fosfato (0,5 M; pH 7,0) e nesta solução adicionou-se 10 mg de óleo de soja. Esta mistura foi incubada a 37°C durante 30 minutos sob agitação constante (250 rpm). Posteriormente, 1g de microesferas de PVA (diâmetro

de 106 a 500µm) foram adicionados à solução inicial. O experimento foi mantido à temperatura ambiente durante 25 horas com agitação suave (250 rpm).

O material resultante foi centrifugado a 7280g por 2 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi retirado e submetido à reação de Bradford (ver adiante item 4.4) e à atividade enzimática determinada pela hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (ver adiante item 4.5).

A enzima imobilizada foi então lavada com tampão fosfato (0,05M; pH 7), e os complexos Enzima-polímeros foram liofilizados (Liofilizador Liotop L101) e armazenados à temperatura de -20 ° C até a utilização. Os complexos Enzima-PVA resultantes foram denominados: Enzima-PVA4, Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25.

4.4 Determinação de proteína imobilizada – Reação de Bradford

A concentração da proteína imobilizada foi determinada através deste método (Bradford, 1976). A concentração de enzima adsorvida na microesfera PVA, P_g (mg/g), foi calculada utilizando a seguinte Equação 1:

$$P_g = \frac{C_o V_o - C_f V_f}{w} \quad (1)$$

Equação 1 Determinação de proteínas por Bradford.

Onde:

C_o é a concentração de proteína inicial (mg / mL),

C_f concentração da proteína do filtrado (mg / mL),

V_o , o volume inicial da solução de lipase (mL),

V_f o volume de filtrado (mL) e,

W é o peso do suporte PVA utilizado (g).

Em uma experiência típica, 950µL de reagente Bradford foi adicionado a um eppendorf, e esta solução foi misturada com 50 uL da fase sobrenadante (ver seção 4.3). Após 20 minutos, as amostras foram medidas num espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 595nm.

4.5 Determinação da atividade enzimática pela hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila

O ensaio para determinação da atividade enzimática da lipase foi realizada pelo método descrito por Winkler & Stuckman (1979) e modificado por Krieger (1995). Este método foi utilizado para se quantificar a atividade enzimática do complexo imobilizado, da microesfera pura (sem enzima imobilizada) e da enzima livre. Também foi quantificada a atividade lipolítica da enzima remanescente no sobrenadante produzido na imobilização. (ver item 4.3) Esta metodologia baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) que é convertido em *p*-nitrofenol de coloração amarela e quantificado por espectrofotometria a 410 nm (Figura 15) (Winkler e Stuckmann, 1979), (Krieger, 1995).

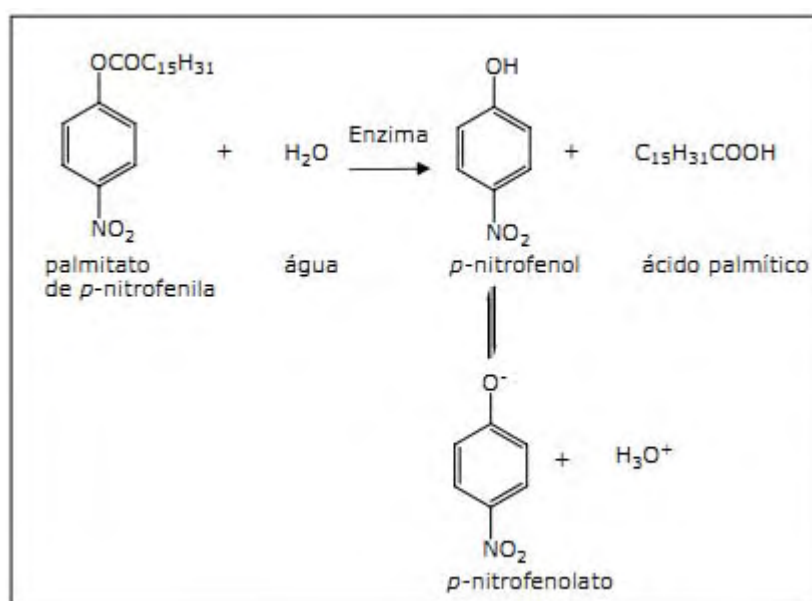


Figura 15 Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases. Fonte: (Winkler e Stuckmann, 1979), (Krieger, 1995)

De acordo com este método, uma solução de *p*-NPP (3 mg/mL) foi preparada em álcool isopropílico (solução A). Outra solução (solução B) composta por 2% de Triton X-100, diluído em tampão de fosfato (0,05 M; pH 7) foi preparada. Em seguida, 1mL de solução A foi adicionado a 9mL de solução B (Solução A+B). A amostra a ser quantificada foi preparada com a adição do complexo (imobilizado ou puro) a 100 μL de tampão fosfato (pH 7; 0,05 M) e homogeneizado em agitador vortex. Para determinação da atividade da enzima livre ou da enzima remanescente

gerado na imobilização, também foi preparada uma solução diluída em tampão fosfato (0,05 M; pH 7). Em 900 µL da solução de substrato (Solução A + B) foram adicionados 100 µL da amostra preparada previamente, em seguida, a mistura foi incubada a 37°C em banho termostatizado. Após 1 minuto, foi adicionado 150µL de paralisador (Carbonato de sódio 0,1M + 5% de triton X-100), em seguida a amostra foi colocada em banho de gelo a fim de paralisar a reação. O *p*-nitrofenol liberado foi quantificado espectrofotometricamente (410 nm) e as medidas foram realizadas em triplicatas.

Uma unidade (U) de atividade de lipase é a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de produto por minuto em condições ótimas de ensaio. A atividade enzimática específica é o número de Unidades de enzima por miligramas de proteína (U/mg-enzima).

A atividade enzimática da enzima, U, foi calculada de acordo com a Equação 2:

$$U = \left(\left\{ \frac{Abs \times Vt}{\epsilon \times Xe \times T} \right\} \times 10^3 \right) \times D \quad (2)$$

Equação 2 Determinação da atividade enzimática

U = Unidade de atividade enzimática que é expressa em U/mL ou U/mg, no qual uma unidade de atividade é definida como a liberação de 1 µmol de *p*-nitrofenol liberado a partir de *p*-NPP/mL.min dentro das condições do ensaio;

Abs = absorbância da amostra à 410nm;

V_t = Volume total da reação (mL);

X_e = Volume da solução da enzima (mL) ou massa da enzima imobilizada;

ε = Coeficiente de Extinção Molar (8,03x10³ L.mol⁻¹.cm⁻¹, pH 7);

T = Tempo de Incubação;

10³ = Fator de correção da unidade de ε;

D = Diluição da amostra, se houver.

4.6 Zimogramas de atividades

Os ensaios de zimograma de atividade foram realizados pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada localizada no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (Unesp).

4.6.1 Zimograma na atividade de hidrólise

Foi realizado um zimograma em eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando um gel de poliacrilamida a 13% e um gel de empilhamento a 5%, utilizando tampão de corrida tris-glicina pH 8,8 (sem SDS). As amostras foram misturadas numa razão 1:1(v.v⁻¹) com um tampão de amostra composto por tampão Tris/HCl a 0,1 mol.L⁻¹, pH 8,0, glicerol a 20%, azul de bromofenol e água ultrapura. Alíquota de 20µL dessa mistura foi aplicada no gel. Após a corrida, o gel foi lavado com tampão Tris/HCl pH 8,0 contendo 2,5% de triton x-100, por 30 min.

Para a detecção de lipases hidrolíticas o gel foi previamente equilibrado em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ a pH 7,0 por 30 min e posteriormente incubado na solução contendo α- e β acetato de naftila e corante fast blue, até o surgimento das bandas.

4.6.2 Zimograma baseado na atividade de esterificação.

Esta metodologia foi modificada a partir do trabalho de Kwon *et al.* (2011). Foi utilizado um gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 13% e gel de empilhamento a 5%, as amostras foram aplicadas nas mesmas condições citadas no item 4.6.1. Posteriormente à corrida, o gel foi lavado com duas soluções tampão Tris/HCl a 25 mmol.L⁻¹ pH8,0, uma contendo 2,5% e outra contendo 1% de triton X-100. O gel também foi submetido a uma lavagem com 2-propanol a 20% por 20 min. e equilibrado no tampão Tris/HCl a 25 mmol.L⁻¹ por 10 min. Para a detecção das lipases com atividade de esterificação o gel foi incubado por 24 horas a 30°C em uma solução contendo ácido oleico (1,5% v.v-1) e dodecanol (1,5% v.v-1) emulsificados em tampão Tris/HCl a 25 mmol.L⁻¹ pH8,0 (Kwon, Kim *et al.*, 2011).

A presença da enzima foi verificada pela formação de uma banda com precipitado de coloração escura que corresponde à precipitação do éster formado.

4.7 Caracterização física das microesferas de PVA/PVAc

As microesferas de PVA e os complexos imobilizados foram caracterizados por DRX, MeV, ATR-FT-IR, CPMAS ^{13}C , RMN ^{23}Na e Potencial Zeta.

4.7.1 Difração de Raios X (DRX)

Os padrões de DRX das partículas sintetizadas foram coletados utilizando um difratômetro Rigaku RotaFlex RU200B (Tóquio, Japão) com uma fonte de ânodo rotativo com uma placa plana na geometria de Bragg-Brentano, operando com radiação Cu-K α (comprimento de onda = 1,5418 Å) À 50 kV e 100 mA, e equipado com um monocromador de grafite. Os padrões de difração em pó foram registados na faixa de 2θ = 5-80 ° com um passo de digitalização de 0,02° e uma taxa de 10 s/step.

4.7.2 Microscopia eletrônica de varredura (MeV)

As imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MeV) foram registrados utilizando um instrumento Phillips XL30 FEG, operando com um feixe de elétrons regulável para tensões de 5 a 25 kV. Antes das análises, um revestimento fino de ouro foi depositado sobre as amostras.

4.7.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR)

Os espectros de ATR-FTIR foram coletados por meio de um Smart Orbit ATR (Thermo Scientific) com acessório de diamante e um espectrôfotometro Nicolet 6700 (Thermo Scientific) equipado com um detector DTGS. Todas as amostras foram analisadas por 64 vezes na capacidade de resolução espectral de 4 cm^{-1} entre 4000 cm^{-1} e 500 cm^{-1} .

4.7.4 Ressonância magnética nuclear

As medidas de RMN foram realizadas utilizando um espectrômetro Bruker DMX operando a intensidade de campo de 7.05T, portanto uma frequência de ressonância de 75,4 MHz para ^{13}C e 79,38 MHz para ^{23}Na (300 MHz para ^1H), usando uma sonda de 4mm (MAS). O CP/MAS foi fixado utilizando a ressonância ^{79}Br de KBr. Aproximadamente 100mg de cada amostra foram acondicionados num rotor de Zircônia com tampas de Kel-F e centrifugou-se a 10 kHz, à temperatura ambiente.

^{13}C RMN: os espectros de RMN de ^{13}C CPMAS foram adquiridos com dois impulsos de fase modulada (TPPM) protões dissociação com 75 kHz de intensidade de campo. A largura de pulso de 90° para ^1H foi de 3,6 ls com um tempo de contato de 1 m/s, tempo de atraso de 5 s, 20.000 varrimentos, 4096 pontos de dados e 30 kHz de largura espectral. Os desvios químicos foram dadas em relação ao tetrametilsilano (TMS), usando uma amostra externa de sólidos glicina (carbonilo a 176,5 ppm) para ^{13}C como uma referência secundária.

^{23}Na RMN: a largura de pulso curto seletiva foi de 1,6 mS ($\pi / 6$) com um tempo de atraso de 2s aplicadas para permitir um equilíbrio térmico. Foram realizados 50.000 scans rendendo 8192 pontos de dados e 50 kHz de largura espectral. Uma linha Lorentziana ampliação de 20 Hz foi aplicada aos dados. Os desvios químicos foram dadas em relação a uma solução de NaCl 0,1 M como uma referência secundária.

4.7.5 Potencial zeta

Para a determinação dos potenciais zeta foi utilizado um Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Worcester Shire, Reino Unido). A condutividade foi determinada usando o mesmo instrumento. Para a medição, os suportes puros e imobilizada foram dissolvidos em água destilada a uma concentração de 1 mg/mL.

4.8 Produção de Biodiesel utilizando os complexos imobilizados (Enzima-PVA4, Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25) e enzima livre

A transesterificação do óleo de soja a biodiesel foi realizada utilizando como catalisadores os complexos Enzima-PVA produzidos conforme descrito no item 4.3.

Antes da reação, foi necessário adicionar cerca de 1 mL de tampão fosfato (0,05M; pH 7) para a ativação do suporte. Segundo Klibanov (1979), para a enzima manter sua conformação, um mínimo de água é necessário para ativa-la (Klibanov, 1979).

As reações de transesterificação com os complexos Enzima-PVA (Enzima-PVA4, Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25) foram realizadas utilizando uma razão molar óleo/etanol de 1:6, a 37°C durante 48 horas sob agitação constante. A quantidade de complexo (diâmetro de 500-106µm) utilizada foi de 4% em massa em relação ao óleo de soja. O etanol foi adicionado à mistura em quatro etapas (0h, 6h, 12hs e 24hs) para evitar a inativação da enzima. Depois da reação, os produtos resultantes foram separados por centrifugação a 7280 g por 5 minutos. Este procedimento para a síntese de biodiesel a partir de óleo vegetal foi adaptado de (Dizge e Keskinler, 2008).

Para demonstrar a especificidade da enzima ao substrato e verificar sua sinergia quando imobilizada no suporte, uma quantidade ótima experimental de enzima obtida através de sucessivas reações (3,71 mg; 153U) foi utilizada como catalisador nas seguintes condições: razão molar O:E 1:6 a 37°C. Esta mesma quantidade de enzima foi imobilizada no suporte PVA25 (ver item 4.3), e em seguida o complexo imobilizado foi utilizado como catalisador para a síntese de biodiesel. Além disso, a massa de enzima imobilizada foi calculada e utilizada na mesma quantidade, porém na sua forma livre. O complexo Enzima-PVA25 foi escolhido para este experimento por apresentar uma melhor atividade enzimática em comparação com os outros complexos (ver adiante item 5.6).

4.9 Utilização do planejamento experimental de Box Behnken para a otimização da produção de biodiesel

Após a seleção do biocatalisador mais ativo na reação de transesterificação , foi realizada a otimização da reação por delineamento experimental pelo método de

Box-Behnken, devido ao fato deste modelo exigir uma quantidade muito menor de experimentos quando comparado com outros métodos, tais como o método fatorial (Charoenchaitrakool e Thienmethangkoon, 2011). Este modelo consiste em um planejamento experimental utilizado para procedimentos de otimização, pela repetição do ponto central, para se medir a variabilidade experimental, e mais um conjunto de pontos fatoriais ancorados no ponto central definindo a região de interesse (Box e Behnken, 1960).

O método foi aplicado utilizando como catalisador o complexo Enzima-PVA25 que apresentou uma melhor atividade enzimática quando comparado aos outros complexos. Foi investigado o efeito da temperatura reacional (x_1), a razão molar óleo: etanol (O:E) (x_2) e a quantidade de catalisador (x_3) no rendimento de ésteres etílicos. As outras condições experimentais utilizadas foram às mesmas para as reações do item 4.8. Um total de 15 experimentos foi necessário para estimar os coeficientes do modelo. O planejamento estatístico e a análise de dados foram realizados utilizando o software Minitab 16, obtendo assim os coeficientes de regressão, as variâncias e as curvas de contornos.

Em um sistema envolvendo variáveis independentes, a relação matemática de resposta destas variáveis com a formação de ésteres pode ser aproximada pela equação polinomial quadrática. A fórmula do modelo é mostrada na equação Equação 3):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_{ij} + \varepsilon$$

Equação 3 Fórmula do modelo experimental do tipo Box-Behnken

,onde Y representa a resposta prevista para o rendimento de ésteres etílicos, x_i e x_{ij} são variáveis independentes, β_0 é o modelo da constante e β_i , β_{ii} , β_{ij} são coeficientes de regressão e ε é o erro.

O delineamento experimental, ou seja, os limites superior e inferior da temperatura ($^{\circ}\text{C}$), razão molar O:E (mol. Mol $^{-1}$) e quantidade de catalisador (% em peso em relação ao óleo) são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 Variáveis para o planejamento experimental do tipo Box-Behnken

Variáveis	-1	0	+1
Temperatura	33°C	37,5°C	42°C
Razão molar O:E	1:3	1:6	1:9
Quantidade de catalisador	4,5%	5,5%	6,5%

4.10 Análise do Biodiesel

4.10.1 Análises por Cromatografia de Camada Delgada (TLC)

O biodiesel obtido nos experimentos foi submetido à análise cromatográfica para a determinação do teor de ésteres etílicos. Primeiramente, foi realizada uma análise por cromatografia em camada delgada (TLC) com base num procedimento descrito por (Yang, Sohn *et al.*, 2009). Um volume (100µL) da mistura reacional foi retirado e misturado com 500 µL de hexano por 2 min. Após a separação por centrifugação, 3 µL do sobrenadante foram aplicados à uma placa de sílica gel. Em seguida, a placa foi introduzida cuidadosamente em uma cuba de vidro fechada (câmara) contendo uma mistura de solvente hexano/acetato de etila/ácido acético (90:10:1). Após a corrida do solvente, as placas foram secas e mergulhadas na solução de revelação, metanol/ácido sulfúrico (1:1), e finalmente aquecidas em temperatura de 200°C e analisadas.

4.10.2 Análises por Cromatografia Gasosa do Teor dos Ésteres Etílicos

A quantificação do teor de éster em amostras de biodiesel foi realizada no CEMPEQC (Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados) localizado no Instituto de Química - Unesp de Araraquara. As análises foram realizadas em triplicada, de acordo com EN 14103 (Determinação dos ésteres totais e éster metílico de ácido linolênico) em um cromatografo de fase gasosa Shimadzu GC 2010 com detector de ionização de chama (GC-FID). O cromatógrafo foi configurado com injetor em modo de divisão acoplado ao amostrador automático AOC 5000 para amostras líquidas. A norma europeia EN 14103 estabelece as condições cromatográficas utilizadas na

quantificação de ésteres de ácidos graxos: volume de injeção da amostra = 1 ml dividida, = 1:20, injetor e as temperaturas do detector = 250°C, temperatura do forno = isotérmica 210°C, pressão do gás de arraste hélio = 83kPa, devido à "split" ou ajustadas para visualizar claramente o pico do padrão de metilo C24: 1.

Devido a dificuldades de visualizar claramente o pico do padrão metílico C24:1, sob condições isotérmicas, neste estudo, a condição isotérmica do forno foi substituído por condições de temperatura programadas. 120°C durante 2 minutos, taxa de aquecimento de 10°C/min até uma temperatura de 180°C, onde se manteve por três minutos, a taxa de aquecimento de novo de 5°C /min até 240°C onde permaneceu durante 10 minutos. Esta modificação foi validada com o Material de Referência Certificado (NIST SRM 2772). A coluna utilizada foi um capilar Restek-Carbowax 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 milímetros de espessura de fase estacionária.

4.10.2.1 Quantificação de ésteres

A quantificação do percentual de ésteres etílicos presente no biodiesel foi realizada da seguinte maneira: 20 mg/mL de uma solução padrão estoque de miristato de metila (C14:0) e nervonato de metila (C24:1) foram preparados, enquanto que os padrões heptadecanoato metílico e etílico foram preparados em soluções padrão estoque de 10 mg / mL. Padrões de ésteres etílicos C14:0 e C24:1 foram usados para identificar o intervalo de integração. Além disso, utilizou-se o éster metílico (C17:0) como padrão Interno (IS). O conteúdo de ésteres foram obtidos através da integração das áreas de pico variam de C14:0 a C24:0 e subtraindo área heptadecanoato, como mostrado na Equação 4:

$$C = \frac{(\sum A) - A_{IS}}{A_{IS}} \times \frac{C_{IS} \times V_{IS}}{m} \times 100$$

Equação 4 Quantificação de ésteres

Onde:

$\sum A$ = soma das áreas de todos os picos que vão desde C14:0 a C24:0.

A_{IS} = área C17:0 IS

C_{IS} = concentração (mg/mL) da solução C17:0.

V_{IS} = volume da solução de C17:0 adicionado a amostra

m = massa da amostra (mg).

5 Resultados e Discussões

5.1 Caracterização das microesferas de PVA por Difração de Raio-X e MEV

As microesferas preparadas (PVA4, PVA12 e PVA25) foram caracterizadas por difração de raio-X, antes da imobilização (Figura 16). A reação de saponificação realizada com solução alcalina de NaOH 4 mol/L resultou em partículas poliméricas cujo o padrão de DRX foram caracterizados por picos de difração de Bragg bem largos nas regiões $2\theta = 7-30^\circ$. A ausência de picos de difração de Bragg bem definidos e intensos, nessas amostras, revela a sua natureza amorfa. Quando a concentração da solução alcalina é aumentada (12 e 25 mol/L), o padrão de difração do raio-X das partículas poliméricas resultou em um espectro totalmente diferente. O caso mais considerável ocorreu em amostras preparadas com uma solução de NaOH 25 mol/L, uma vez que o padrão de difração apresentou quatro diferentes picos de difração de Bragg com os valores de 2θ iguais a $11,5^\circ$, $19,5^\circ$, $23,0^\circ$ e $40,5^\circ$. As reflexões mais fortes do PVA cristalino ocorrem em $2\theta = 19,4^\circ$ e $20,1^\circ$; essas reflexões correspondem à superposição das reflexões equatoriais $(10\bar{1})$ e (101) , respectivamente (Semenzim, Basso *et al.*, 2011).

A amplitude e o formato do pico da amostra (PVA25) indica claramente que este material é mais cristalino quando comparado às outras amostras (PVA12 e PVA4). A análise dos dados mostrou fortes evidências de que a estrutura do polímero alterou conforme o aumento da concentração de NaOH usado durante o processo de saponificação.

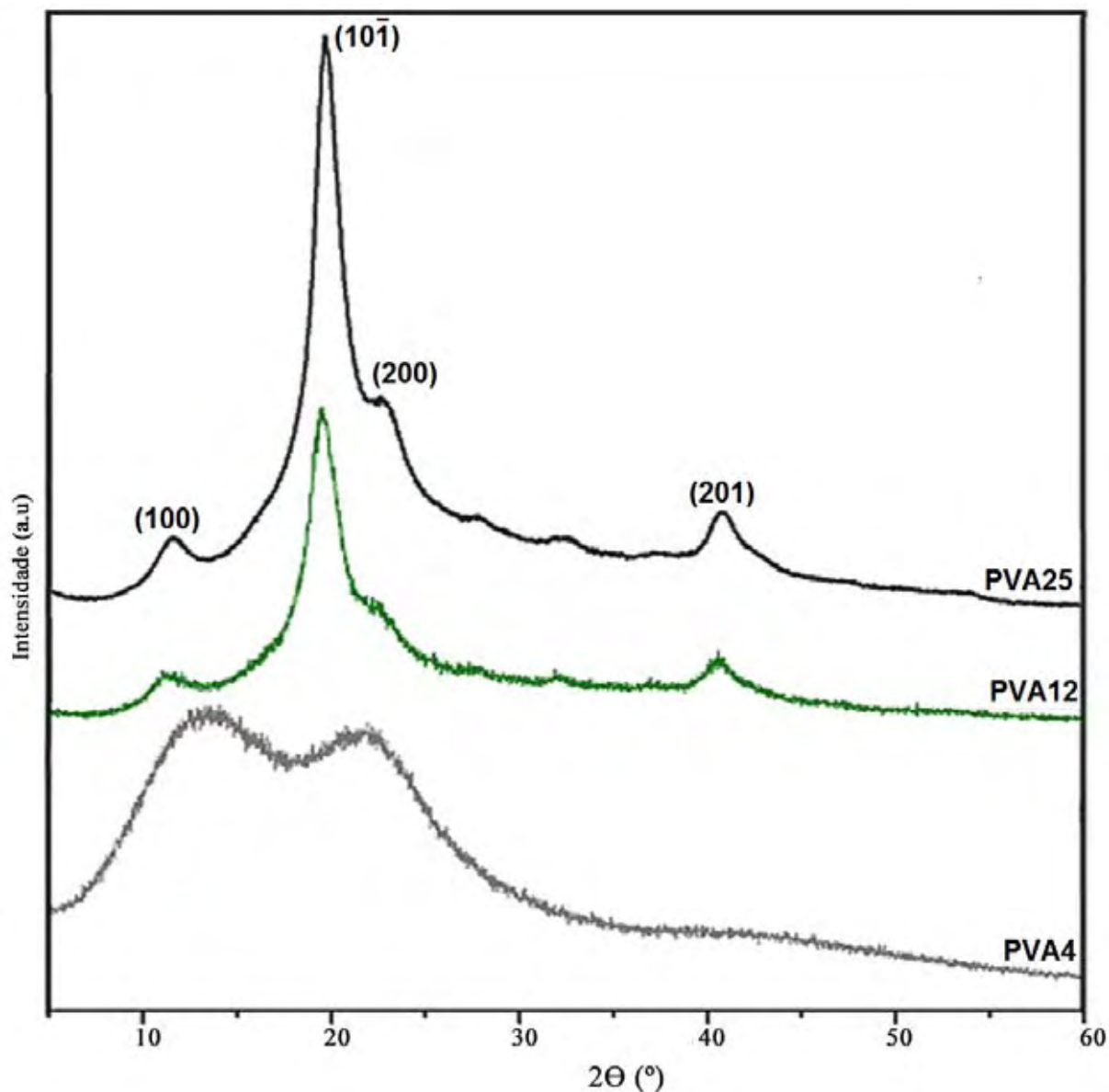


Figura 16 Padrão de difração de raios X das amostras de microesferas de PVA (PVA4, PVA12 e PVA25) antes da imobilização

A Figura 17 mostra as micrografias originadas a partir de microscopia eletrônica de varredura (MEV), em que foi possível produzir imagens de alta resolução das amostras, para em seguida avaliar a sua estrutura superficial. No item A da Figura 17, é possível observar a superfície da microesfera PVA4 antes da imobilização em dois aumentos. Também é possível avaliar a superfícies das amostras PVA12 e PVA25 (item B e C), ambas em dois aumentos.

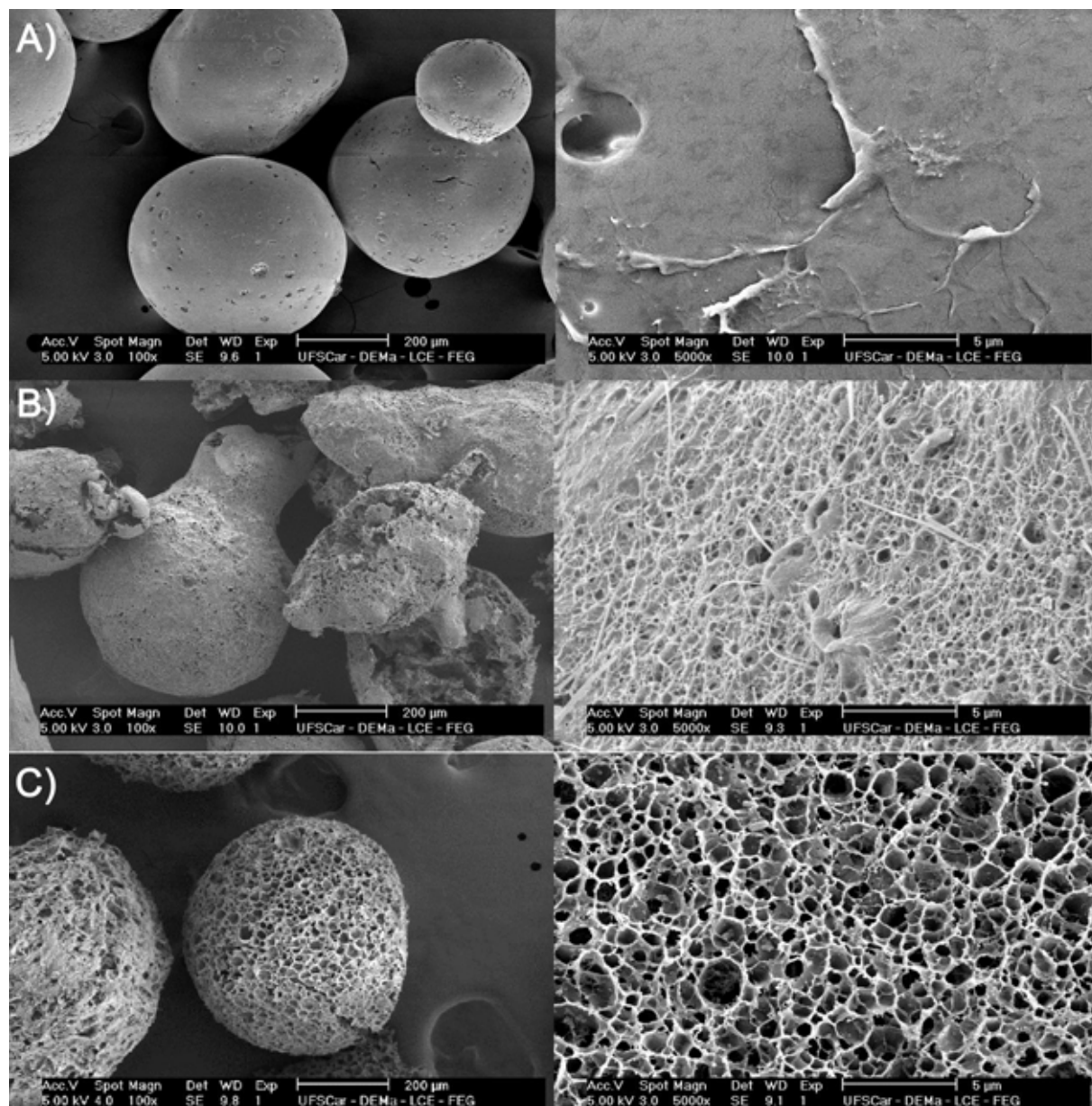


Figura 17 Microscopia eletrônica de Varredura (MeV) das microesferas antes da imobilização: a) PVA4; b) PVA12; c) PVA25

A amostra PVA4, antes da imobilização, é caracterizada por uma superfície lisa e irregular. Na amostra PVA12 pode ser visualizado um grande número de estruturas tipo “scaffold”. Na microesfera PVA25 este tipo de estrutura foi observada, porém em maior número e melhor definição.

Na Figura 18, é possível observar a amostra de PVA25 depois da imobilização em dois aumentos (mesmo aumento observado na Figura 17). Neste caso observa-se uma distribuição aparentemente homogênea da enzima através da microesfera, em que todos os espaços anteriormente livres, foram completamente preenchidos com a enzima.

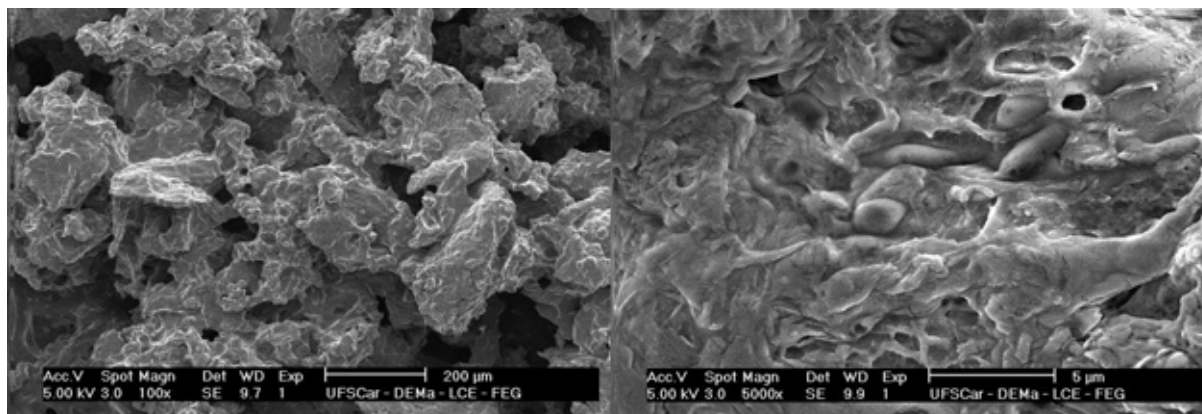


Figura 18 Microscopia eletrônica de Varredura (MeV) da amostra Enzima-PVA25

5.2 Temperatura e estabilidade enzimática

Em um bioprocesso industrial utilizando enzimas, a termoestabilidade se torna essencial. Deste modo, o estudo do comportamento da enzima em função da temperatura é muito importante para caracterização do catalisador enzimático. A taxa de reação aumenta em função da temperatura, contudo quando a temperatura ótima da enzima é ultrapassada ocorre à inativação enzimática. Altas temperaturas afetam significativamente a estrutura terciária da enzima e, conseqüentemente, a estabilidade do complexo enzima-substrato. Imobilização de enzimas em suportes é a forma mais comum de se aumentar a estabilidade da estrutura terciária da enzima (Han, Han *et al.*, 2009). O aumento da estabilidade tem sido associado à rigidez da estrutura, o que previne seu desdobramento e evita a conformação inativa da proteína (Pizarro, Branes *et al.*, 2012).

5.2.1 Efeito da imobilização na temperatura ótima da enzima

Neste estudo, os testes de atividade enzimática foram realizados primeiramente com a lipase livre de *Rhizomucor miehei* com a temperatura variando de 36 a 52°C. A curva de atividade enzimática, (Figura 19), mostra que a atividade máxima da enzima livre na hidrólise do substrato *p*NPP encontra-se na faixa de 42-44°C. A partir de 45°C foi observado uma redução da atividade enzimática. Ao passo que quando atingida a temperatura de 50°C uma grande quantidade de enzima foi inativada. Estes resultados são consistentes com os resultados anteriormente descritos na literatura para a temperatura ótima da enzima de *Rhizomucor miehei* (45°C; pH 8,0). Também foi observado um decréscimo na atividade enzimática

quando a temperatura ultrapassou os 45°C (Moskowitz, Cassaigne *et al.*, 1977). A atividade enzimática foi realizada conforme descrito no item 4.5.

As atividades catalíticas da enzima também foram medidas nas formas imobilizadas, a fim de avaliar se a imobilização das enzimas nas microesferas de PVA afeta a temperatura ótima da enzima. Os ensaios para a determinação da influência da temperatura na atividade catalítica dos biocatalisadores preparados foram realizados em quatro diferentes faixas de temperatura (37, 44, 49 e 52°C) de acordo com os pontos mais importantes obtidos com a enzima na sua forma livre. Os resultados mostraram um perfil semelhante ao obtido com a enzima livre, não apresentando nenhum efeito na temperatura ótima da enzima. Assim como aconteceu com a enzima na forma livre, houve uma diminuição de atividade catalítica quando a temperatura excedeu a temperatura ótima da enzima. Por a enzima estar ligada ao suporte por adsorção física, provavelmente a superfície externa, o comportamento da enzima livre é similar a sua forma imobilizada.

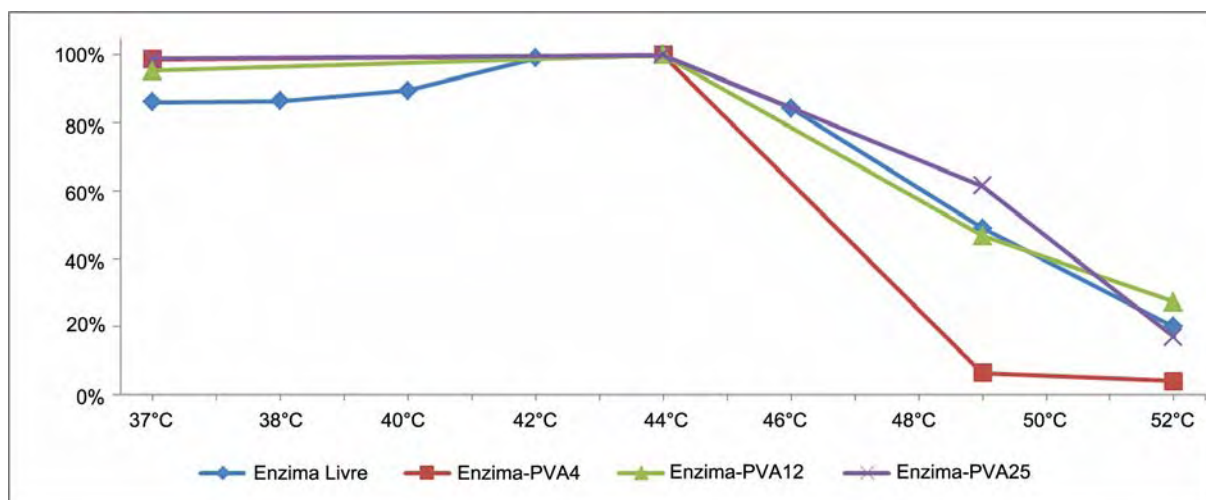


Figura 19 Efeito da temperatura na atividade enzimática da lipase de *Rhizomucor miehei* livre e imobilizada em diferentes suportes de PVA. a) Enzima livre; b) Enzima-PVA4; c) Enzima-PVA12; d) Enzima-PVA25

5.2.2 Estabilidade térmica na enzima

A estabilidade térmica da lipase de *Rhizomucor miehei* foi também estudada para enzima livre e para os complexos imobilizados. Os experimentos foram realizados a 44°C, temperatura ótima encontrada experimentalmente para lipase de *Rhizomucor miehei* (item 5.2.1). Os experimentos foram realizados em seis intervalos de tempo diferentes (0, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos) para a

enzima livre e em quatro intervalos de tempo diferentes (0, 60, 180 e 300 minutos) para os complexos Enzima-PVA.

A Figura 20 mostra o perfil de estabilidade térmica para a enzima livre e para os complexos Enzima-PVA (Enzima-PVA4, Enzima-PVA12, Enzima-PVA25). Pode-se notar que, após 60 minutos, a atividade de enzima livre diminuiu, e em seguida, manteve-se até ao fim do experimento.

Não houve diminuição na atividade enzimática nos complexos imobilizados (Enzima-PVA12, Enzima-PVA25), ambos mostraram o mesmo comportamento em todo o experimento. Isso significa que a imobilização aumentou a estabilidade térmica da enzima em comparação a sua forma livre, com exceção da Enzima-PVA4 que também apresentou acentuada perda de atividade enzimática.

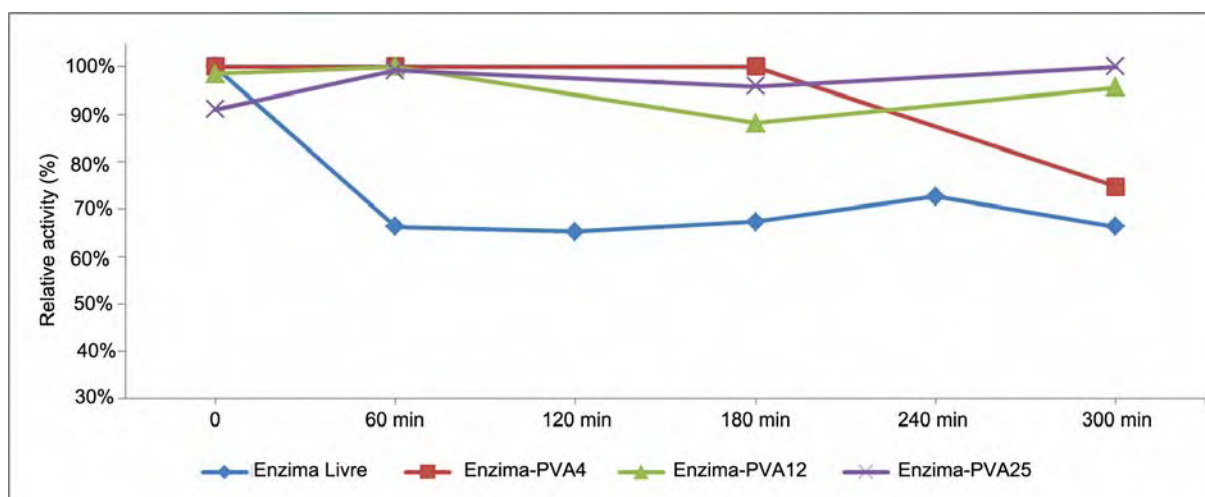


Figura 20 Estabilidade enzimática em 44°C da lipase livre de *Rhizomucor miehei* e da imobilizada em diferentes suportes de microesferas de PVA a) Enzima livre b) Enzima-PVA4 c) Enzima-PVA12 d) Enzima-PVA25

Nouredдини *et al* (2005) também estudaram a estabilidade da enzima lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em um suporte hidrofóbico preparado pela técnica sol-gel. A enzima imobilizada foi inicialmente incubada a 35°C durante até 72 horas, em seguida foi utilizada como catalisador na reação de transesterificação. Não foi observada nenhuma alteração na atividade catalítica da enzima imobilizada incubada. A formação de ésteres metílicos com o catalisador incubado a 24, 48 e 72h foi praticamente o mesmo do catalisador sem incubação prévia. Segundo o autor, aparentemente a conformação estável da lipase é similar ao da ativação interfacial ocorrida devido à interação da enzima a superfície do polímero. Interações físicas e químicas, tais como ligações de hidrogênio e interações iônicas,

provavelmente podem ser responsáveis pela estabilidade térmica melhorada da enzima imobilizada (Noureddini, Gao *et al.*, 2005).

5.3 Análises de ATR-FTIR das microesferas de PVA e do complexo Enzima-PVA

5.3.1 ATR-FTIR das microesferas de PVA4, PVA12 e PVA25

Na saponificação da amostra de PVA4 foi utilizada uma solução alcalina com menor concentração (ver item 4.2), por isso a hidrólise do PVAc foi baixa, consequentemente a estrutura do PVA4 é similar a do PVAc. O espectro da amostra de PVA4 (Figura 21) mostra as principais bandas de absorção dos diferentes grupos funcionais presentes no material. Resultados similares foram descritos na literatura. As principais bandas de PVAc no infravermelho, com seus comprimentos de onda e seus respectivos grupos funcionais são as seguintes: no comprimento de onda de 2925 cm^{-1} (Estiramento C-H), em 1730 cm^{-1} (Estiramento C=O), em 1376 cm^{-1} (Dobramento (CH)-R-CH₃) e em 1130 cm^{-1} (Estiramento C-O-C) (Selvasekarapandian, Baskaran *et al.*, 2006; Okada, Kawanobe *et al.*, 2011). As principais bandas presentes no PVA, conforme descrito na literatura são: em $3550\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ (Estiramento OH...OH), em $2900\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ (Estiramento C-H), em $1650\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ (Dobramento OH...OH), em $1461\text{-}1417\text{ cm}^{-1}$ (Dobramento (CH) – CH₂), em 1141 cm^{-1} (Estiramento C-O) (Stuart, 2004; Okada, Kawanobe *et al.*, 2011).

A Figura 21 mostra todos os espectros de ATR-FTIR das amostras de microesferas antes da imobilização (PVA4, PVA12 e PVA25), com seus respectivos aumentos para uma melhor visualização das principais bandas. Cabe ressaltar que este aumento foi escolhido, pois nesta região ($2000\text{ a }1250\text{ cm}^{-1}$) encontram-se os grupamentos amida da enzima lipase visualizados após a imobilização da enzima no suporte.

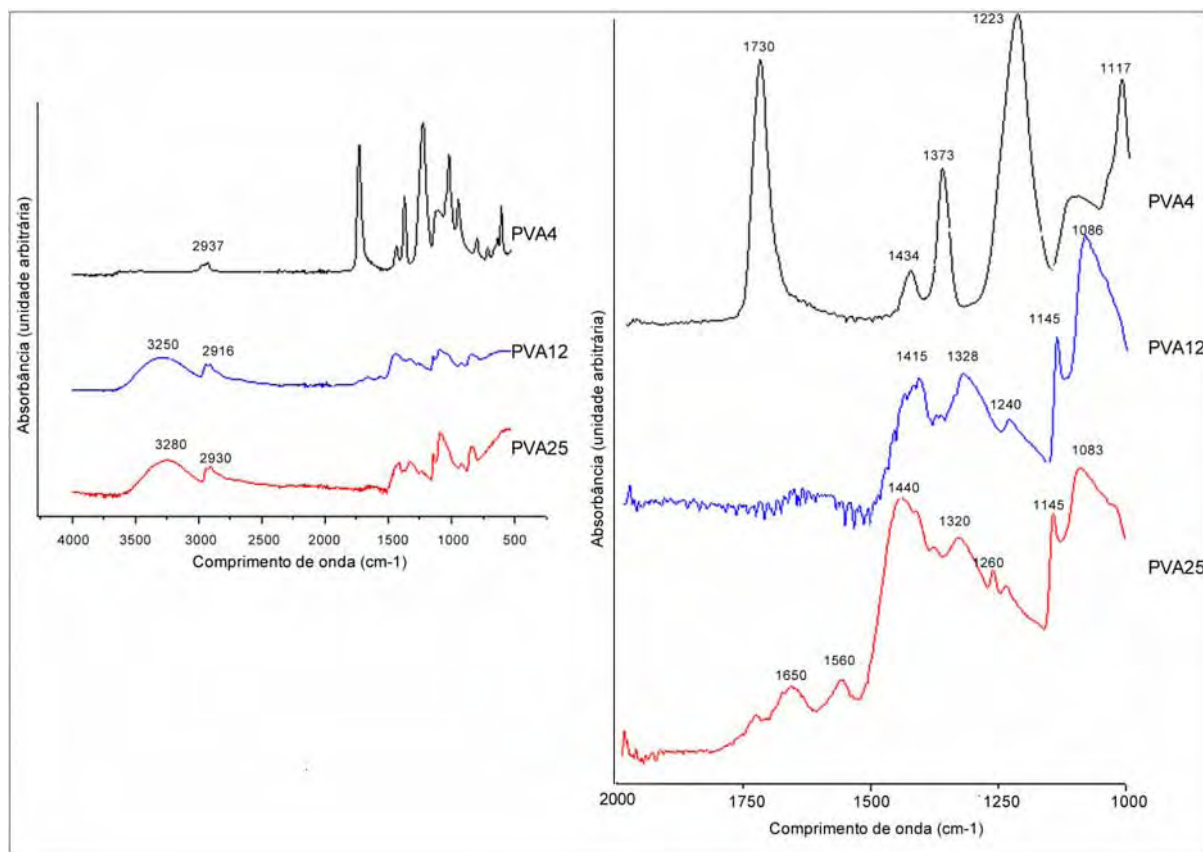


Figura 21 Espectros de ATR-FTIR das microesferas de PVA antes da imobilização a) PVA4 b) PVA12 c) PVA25 e seus aumentos na região amida (região entre 2000-1250 cm^{-1}) (ausência do pico da amida).

É importante notar que somente a amostra PVA25 possui uma banda de absorção na região de 1650 cm^{-1} (Dobramento OH...OH), mesma banda presente na enzima, correspondente à região da amida I. Além disso, somente esta amostra possui uma banda em 1560 cm^{-1} . Segundo Ibrahim *et al.* (2005), esta banda é formada quando um metal (Sódio) se liga ao grupo COO^- ao invés de formar uma ligação de hidrogênio (Ibrahim, Nada *et al.*, 2005). Acredita-se que o sódio utilizado no processo de saponificação (NaOH) estabeleça interações com os grupamentos do PVA.

Outra análise importante é o pico de absorção em 1730 cm^{-1} atribuído ao grupamento acetato (C=O) e presente na estrutura do PVAc (amostra PVA4). A absorção presente na região entre 3200-3550 corresponde ao estiramento do grupo hidroxila (OH) observado na estrutura do PVA (PVA12 e PVA25). O desaparecimento do pico do acetato na amostra de PVA4 e o aparecimento do pico da hidroxila no PVA12 e PVA25 revela que o processo de saponificação foi eficiente.

5.3.2 ATR-FTIR dos complexos Enzima-PVA4, Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25

Os espectros de ATR-FTIR de proteínas fornecem alguns “finger print” que é característico para cada substância, neste caso presente na região de 1200-1700 cm^{-1} . A região de absorção da amida referente à lipase de RML abrange três grupos de espectros com bandas de absorção de infravermelho (Amida I, Amida II e Amida III) (Enrique Collins, Lassalle et al., 2011). A banda mais útil para a análise da estrutura secundária das proteínas em meio aquoso é a banda de amida I. É constituída por um grupo de sinais sobrepostos, que contêm informações estruturais importantes sobre a enzima (Stuart, 2004). A denominação das amidas, bem como seus comprimentos de onda são as seguintes: Amida I (1600-1700 cm^{-1}), Amida II (1530-1550 cm^{-1}), Amida III (1400-1200 cm^{-1}) (Dong, Jones et al., 2006; Branan e Wells, 2007; Baujard-Lamotte, Noinville et al., 2008; Enrique Collins, Lassalle et al., 2011).

Na Figura 22 podem ser observados todos os espectros de ATR-FTIR das amostras de microesferas após a imobilização (Enzima-PVA4, Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25) com os seus respectivos aumentos para uma melhor visualização das principais bandas. Cabe ressaltar que este aumento foi escolhido, pois nesta região (2000 a 1250 cm^{-1}) encontram-se os grupamentos amidas da enzima lipase imobilizados no suporte.

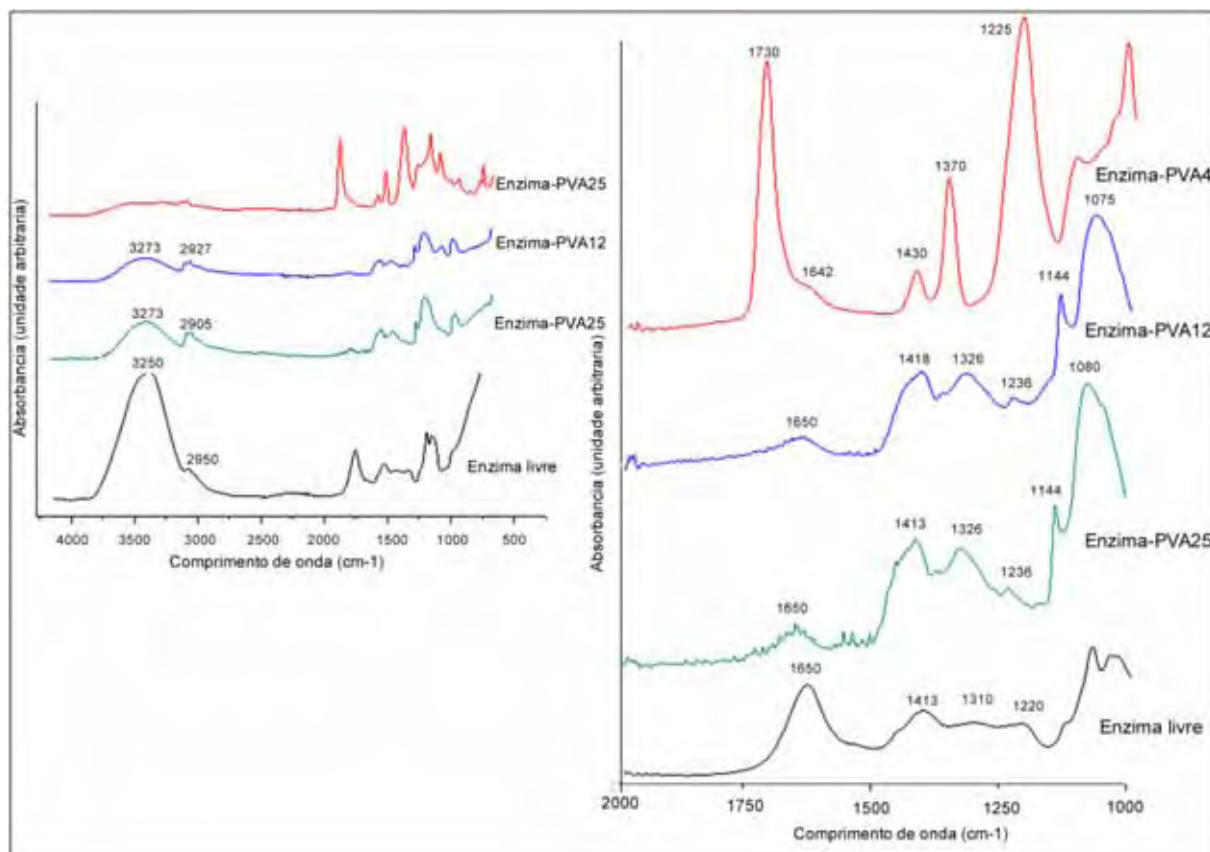


Figura 22 Espectros de ATR-FTIR das microesferas de PVA após da imobilização a) Enzima-PVA4 b) Enzima-PVA12 c) Enzima-PVA25 e seus aumentos na região amida juntamente com a enzima livre (região entre 2000-1250 cm^{-1}) (presença do pico da amida)

Ao imobilizar a enzima no suporte, importantes alterações estruturais são observadas. É nítida a presença em todas as amostras da banda de absorção da amida I (região por volta de 1650). (Figura 22)

Após a imobilização, a enzima manteve a maior parte de sua estrutura nos complexos Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25. O fato de que não existirem diferenças significativas nas posições, intensidade das bandas, e na área de absorção de amida I, sugere fortemente que, quando a lipase é adsorvido a estas microesferas, não alteram o seus principais componentes estruturais. No entanto, o mesmo não ocorreu para o complexo Enzima-PVA4. Neste caso, existem grandes alterações na estrutura de folha- β , principalmente na região de absorção da amida I.

5.4 Ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^{23}Na .

Em virtude da complexidade de estruturas moleculares, a investigação das moléculas e macromoléculas no estado sólido requer boa resolução espectral. Os deslocamentos químicos no espectro de RMN são muito sensíveis à estrutura e conformação da molécula, às interações intermoleculares, à troca química e às mudanças de conformação. Por estes motivos, a Ressonância Magnética Nuclear do estado sólido é uma espectroscopia muito útil ao estudo de polímeros. (Silva, 2005)

5.4.1 Espectros de ^{13}C CPMAS NMR das microesferas de PVA e dos complexos enzima-polímero

Espectros de ^{13}C CPMAS NMR das microesferas de PVA puras (PVA4, PVA12 and PVA25) podem ser visualizados na Figura 23. Estes espectros são similares aos que foram reportados por (Semenzim, Basso *et al.*, 2011). A amostra de PVA4 apresenta dois picos característicos para a esquerda e para a direita com os valores dos desvios químicos de aproximadamente 171 e 21 ppm, respectivamente, e estes dois picos podem ser atribuídos ao PVAc de acordo com a literatura (Terao, Maeda *et al.*, 1983; Wang, Cheung *et al.*, 2001; Lubach, Padden *et al.*, 2004; Semenzim, Basso *et al.*, 2011). O espectro de ^{13}C CPMAS NMR do PVAc (PVA4) no estado sólido apresenta quatro desvios químicos distintos e bem caracterizados de aproximadamente: 40, 67, 171 e 21 ppm; enquanto que para o PVA (PVA12 e PVA25) existem três desvios químicos distintos de aproximadamente 77, 71 e 65 ppm (Lubach, Padden *et al.*, 2004; Semenzim, Basso *et al.*, 2011). Segundo Semenzim *et al.* (2011), pode-se concluir que os dois picos largos na região 30-80 ppm são uma sobreposição de pico dos deslocamentos químicos do PVAc e do PVA, indicando uma mistura de dois polímeros.

Segundo dados da literatura, os desvios químicos 77, 71 e 65 ppm observados para o PVA são originados a partir da ligação de hidrogênio intra e intermolecular do carbono CH aos grupos hidroxilas. O desvio químico em 77 ppm é atribuído ao carbono CH com duas ligações de hidrogênio intramoleculares, com os grupos hidroxilas. O desvio químico de 71 ppm é atribuída ao carbono CH com uma ligação de hidrogênio intermolecular com o grupo hidroxila, enquanto que o desvio químico associado a 65 ppm não está atribuído ou ligado a qualquer ligação de

hidrogênio com os grupos hidroxila pertencente à região de ligações cruzadas (Semenzim, Basso *et al.*, 2011). Um modelo teórico das ligações de hidrogênio presente nestas estruturas poliméricas é mostrado na Figura 24.

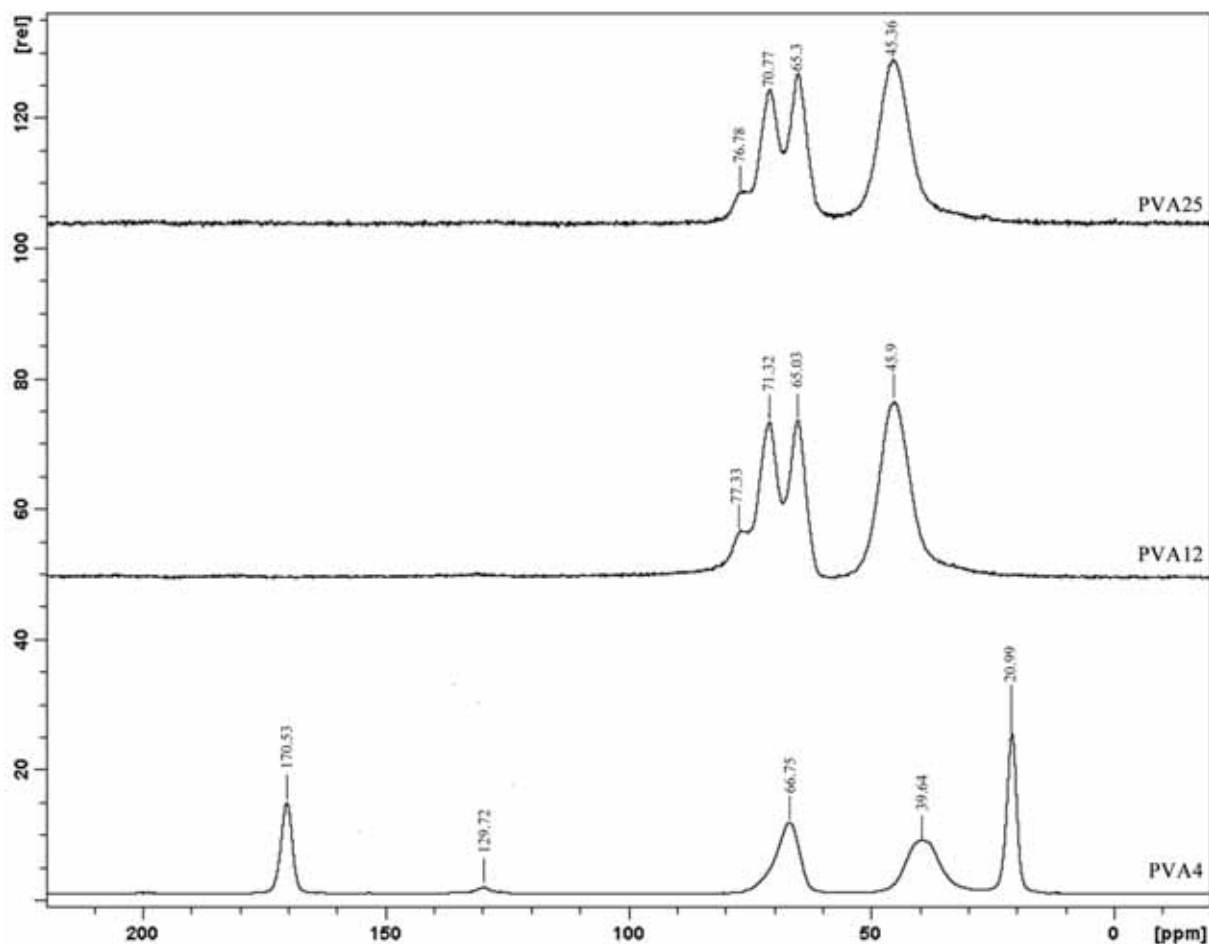


Figura 23 Espectros de ^{13}C CPMAS NMR das microesferas de PVA antes da imobilização a) PVA4 b) PVA12 c) PVA25

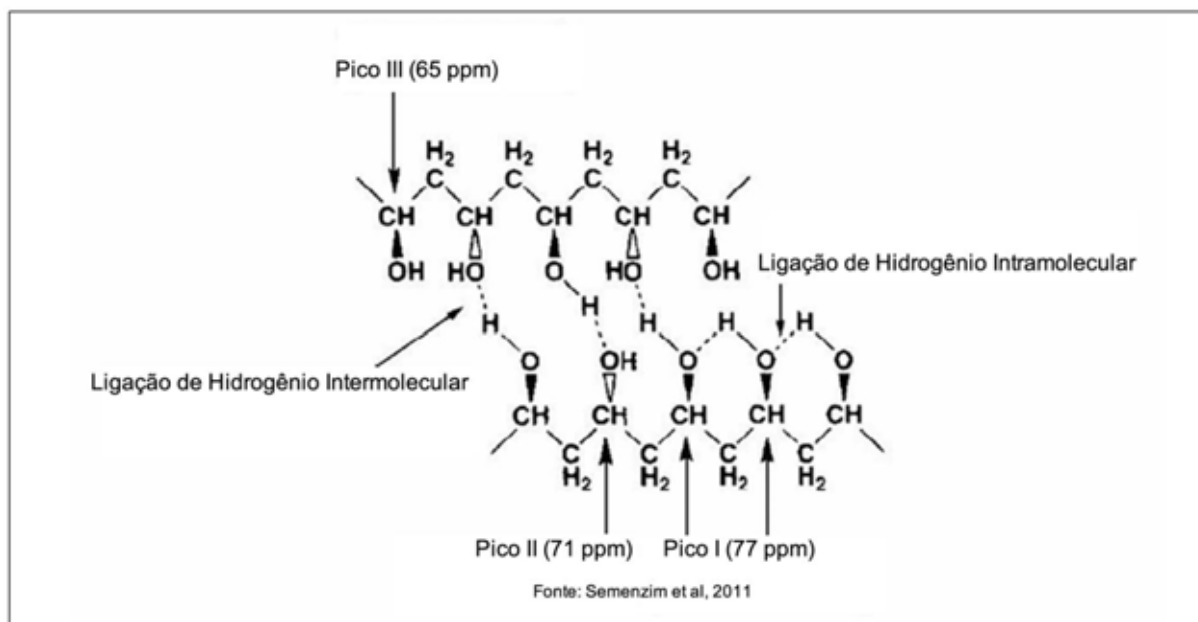


Figura 24 Modelo teórico das ligações de hidrogênio no PVA. Fonte: (Semenzim, Basso *et al.*, 2011)

Na Figura 25 podem ser visualizados os espectros de ^{13}C CPMAS NMR dos complexos Enzima-PVA após a imobilização (Enzima-PVA4, Enzima-PVA12, e Enzima-PVA25). A imobilização da enzima sobre o suporte polimérico não induziu nenhuma modificação estrutural significativa, uma vez que os espectros de ^{13}C -CPMAS RMN dos complexos Enzima-PVA foram semelhantes aos espectros de ^{13}C -CPMAS RMN dos polímeros puros.

Uma possível explicação para este comportamento pode ser devido ao fato de que a técnica não ser suficientemente sensível para detectar pequena quantidade de enzimas imobilizadas nos suportes poliméricos.

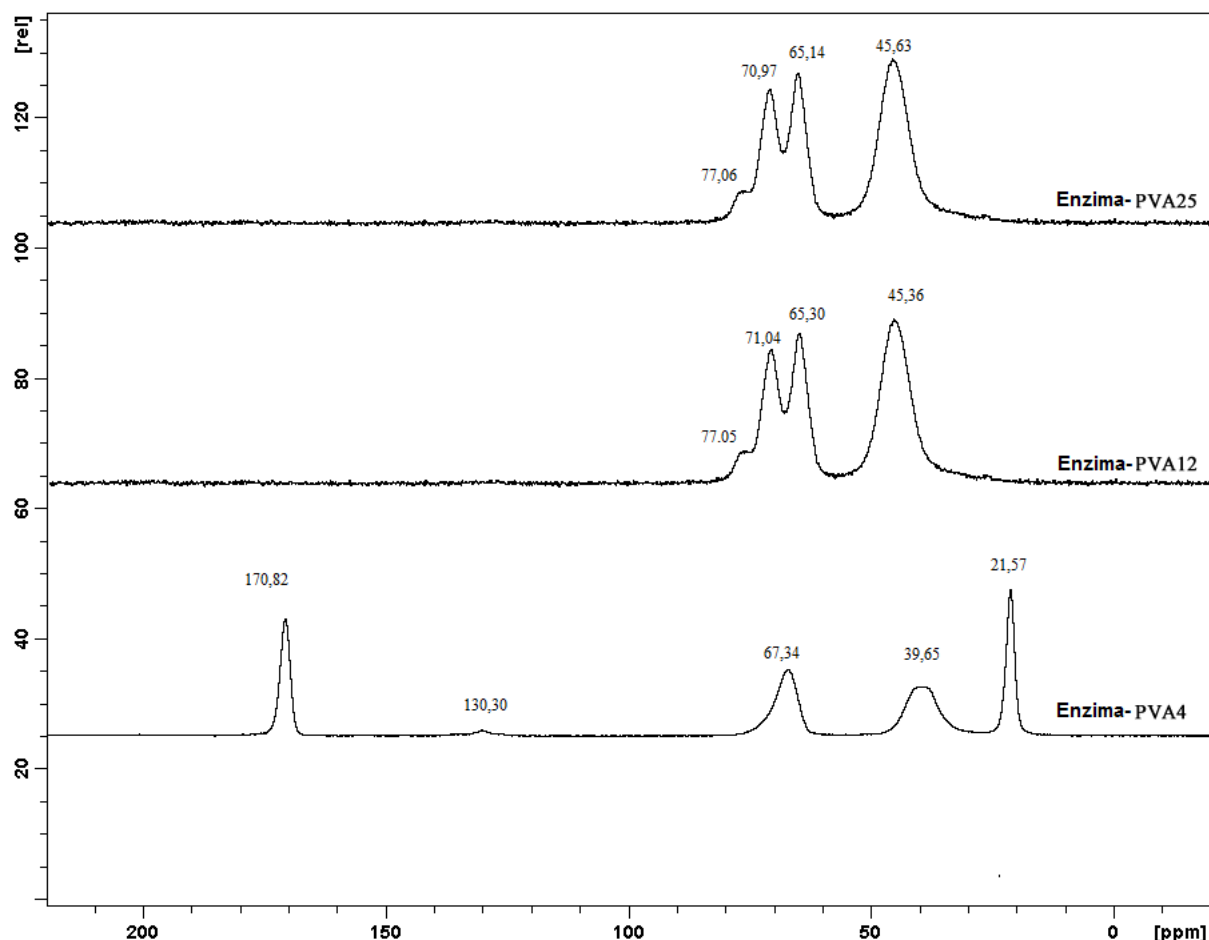


Figura 25 Espectros de ^{13}C CPMAS NMR das microesferas de PVA após a imobilização a) Enzima-PVA4 b) Enzima-PVA12 c) Enzima-PVA25

5.4.2 Espectros de ^{23}Na -MAS-NMR das microesferas de PVA e do complexo Enzima-polímero

Os dados de ^{23}Na -MAS-NMR para ambos os suportes poliméricos puros (PVA4, PVA12 e PVA25) e os complexos Enzima-PVA (Enzima-PVA4, Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25) mostram diferenças muito significativas (ver Figura 26 e Figura 27). Deslocamentos químicos observados para as amostras PVA4 (7,30 ppm, -7,55 ppm), PVA12 (0,50 ppm, -7,80 ppm) e PVA25 (-2,57 ppm, -10,44 ppm) estão associados a ambientes de sódio diferentes. De acordo com a literatura três espécies de íons sódio foram identificados em redes poliméricas: isolados (5,0 a 7,5 ppm), totalmente hidratados (0 a -2,5 ppm) e agregados (-12 a -23 ppm) (Ellen Moc, Thatcher Wr *et al.*, 1994; Ellen Moc, Thatcher Wr *et al.* 1995).

Com base na literatura, o deslocamento observado para PVA4 pode ser atribuído ao íon sódio isolado (7,30 ppm). É interessante notar que o deslocamento químico associado ao íon sódio hidratado e agregado está ausente no espectro

^{23}Na -MAS-RMN de PVA4. Deslocamentos químicos de -2,5 ppm (PVA25) pode ser atribuído aos íons sódio hidratados. Deslocamentos químicos associados com a presença de íons sódio isolados não foram observados para as amostras de PVA12 e PVA25 (Figura 26).

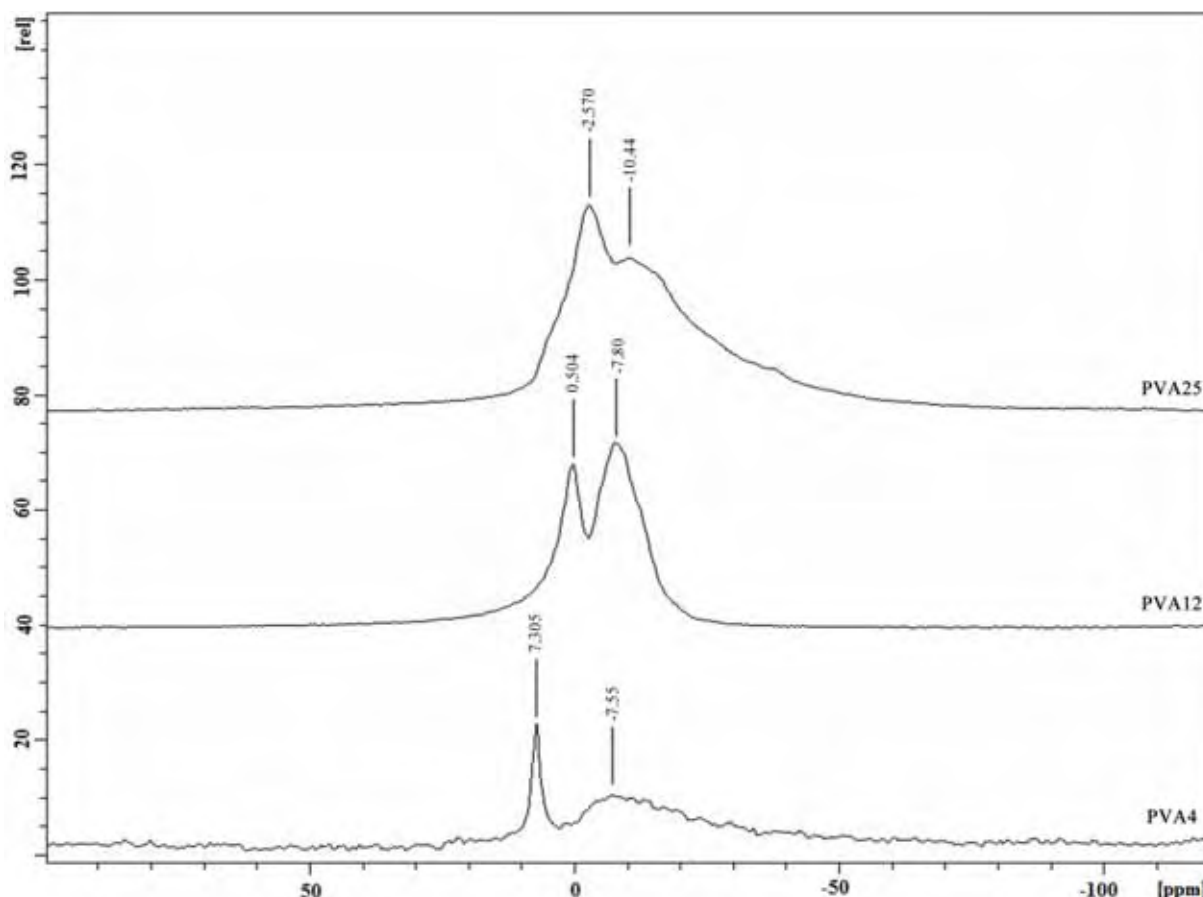


Figura 26 Espectros ^{23}Na -MAS-NMR das microesferas de PVA antes da imobilização a) PVA4 b) PVA12 c) PVA25

Dados de ^{23}Na -MAS-RMN para os complexos Enzima-PVA indicam claramente que a imobilização da enzima *Rhizomucor miehei* sobre a superfície da partícula polimérica causou grandes alterações no ambiente de sódio da rede polimérica. A Figura 27 mostra o ^{23}Na -MAS-RMN do complexo Enzima-PVA4 e revela quatro desvios químicos distintos em 4,78, 1,00 e -5,54, -13,85 ppm. Deve-se notar que os íons sódio isolados observados para a PVA4 puro desapareceram, indicando que a enzima de alguma forma interagiu com os íons de sódio isolados. É possível que todos os íons de sódio existentes no complexo Enzima-PVA4 estão sob a forma de íons de sódio hidratado ou agregados. O complexo Enzima-PVA12 revelou oito deslocamentos químicos em 0,95, -3,58, -6,02, -15,79, -47,86, -55,28, -74,42, -90,45 ppm, enquanto que a enzima PVA25 revelou sete deslocamentos

químicos em 0,49, -6,23, -12,96, - 21,19, -25,18, -74,06, -90,76 ppm (Figura 27). Estes novos deslocamentos químicos indicam que a enzima interage com os íons de sódio da rede polimérica, por consequência, criando novos ambientes complexos. Embora a atribuição correta de todos os deslocamentos químicos observados para a amostra de Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25 não é uma tarefa simples, é aceitável afirmar que os únicos dois ambientes possíveis para a existência de íons de sódio nesses dois complexos são sob a forma de espécies hidratadas ou agregadas (Ellen Moc, Thatcher Wr *et al.*, 1994; Ellen Moc, Thatcher Wr *et al.* 1995).

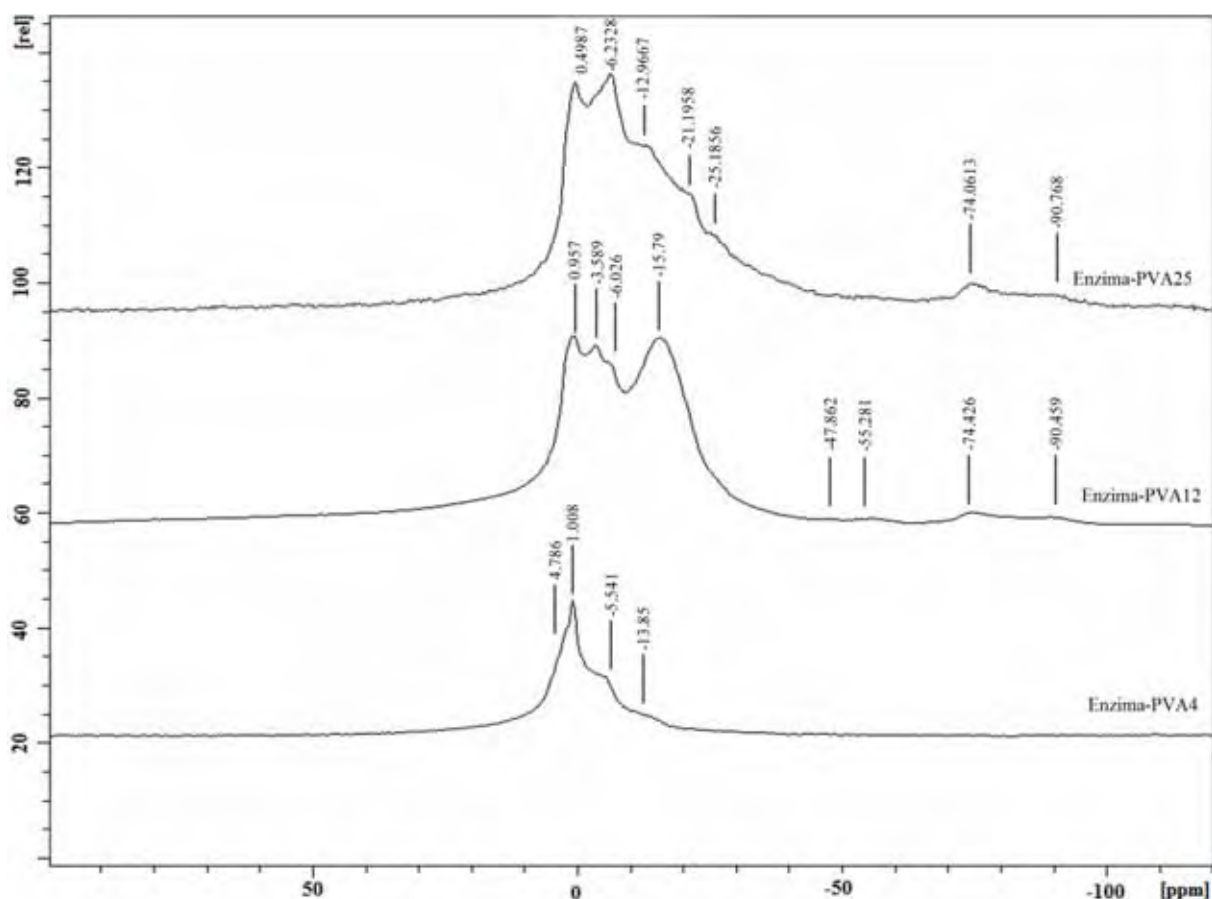


Figura 27 Espectros ^{23}Na -MAS-NMR das microesferas de PVA após da imobilização a) Enzima-PVA4 b) Enzima-PVA12 c) Enzima-PVA25

5.5 Potencial Zeta das microesferas puras e imobilizadas

Alguns polímeros contêm superfícies hidrofílicas (polares), como grupos carboxilas, hidroxilas, aminas e fosfatos em sua superfície que são capazes de criar um potencial eletrostático. Geralmente estes grupos são empregados na

investigação da interação entre proteína e suporte. Variando o grau de hidrofobicidade/hidrofilidade devido à alteração da composição química da superfície do polímero, automaticamente envolve variação na interação entre suporte-proteína (Mikhaylova, Dutschk *et al.*, 2007).

As partículas em uma solução geralmente carregam uma carga elétrica. Os grupos químicos presentes nas superfícies das partículas podem se ionizar e, conseqüentemente, produzir uma superfície ionizada. A quantidade de carga na superfície da partícula é uma característica importante, uma vez que determina as propriedades das partículas em solução. O Potencial Zeta refere-se ao potencial eletrostático gerado pelo acúmulo destes íons na superfície da partícula (ou colóide) organizada em uma dupla camada elétrica constituída pelo *Stern layer* e pela região difusa (Tudorachi e Chiriac, 2011).

A Figura 28 apresenta os dados de potenciais zeta das microesferas antes da imobilização e dos complexos imobilizados.

As microesferas antes da imobilização apresentaram uma superfície carregada negativamente, além disso, o potencial zeta variou de acordo com a concentração de NaOH utilizado na reação de saponificação. Os potenciais zeta para as partículas antes da imobilização foram as seguintes: PVA4 (-23.2mV); PVA12 (-20.4mV); PVA25 (-8.84mV). Uma possível explicação para o menor potencial eletrostático observado para a amostra PVA25 em comparação com as outras, seria, provavelmente, devido ao fato da grande quantidade de íons sódio presentes na rede polimérica que compensa os íons hidroxilas pertencente à microesfera, e, portanto, diminuindo o potencial da superfície eletrostática.

Após a imobilização, houve um aumento das cargas negativas na superfície de todos os complexos imobilizados em comparação com as microesferas puras: Enzima-PVA4 (-38.70mV), Enzima-PVA12 (-31mV), Enzima-PVA25 (-28.90mV) (Figura 28).

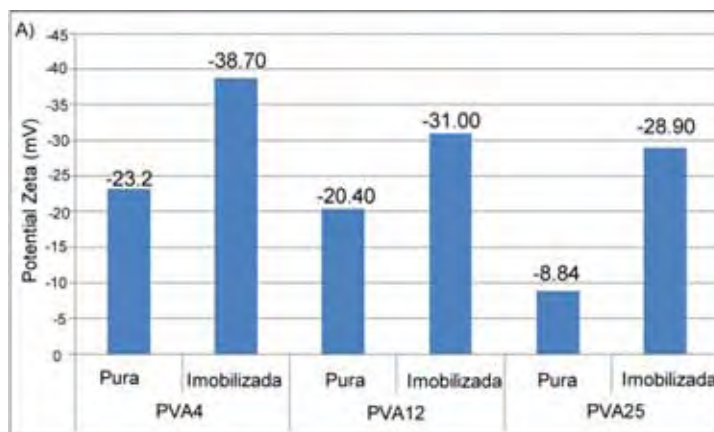


Figura 28 Dados de Potencial Zeta (mV) das microesferas puras e imobilizadas

A distribuição do potencial eletrostático de superfície da lipase de RML foi calculada no Laboratório de Cristalografia de Proteína da Universidade de São Paulo (Figura 29). Foi observado um domínio de cargas negativas (em vermelho) e em menor quantidade cargas positivas (em azul).

Certamente as cargas negativas da enzima possam ter contribuído para tornar o potencial eletrostático do complexo imobilizado ainda mais negativo. É possível que a interação entre suporte e enzima possa ser devido ao estabelecimento de ligações eletrostáticas entre cargas de aminoácidos residuais da enzima com grupos funcionais pertencentes à microesfera, assim como descrito por (Macario, Giordano *et al.*, 2007).

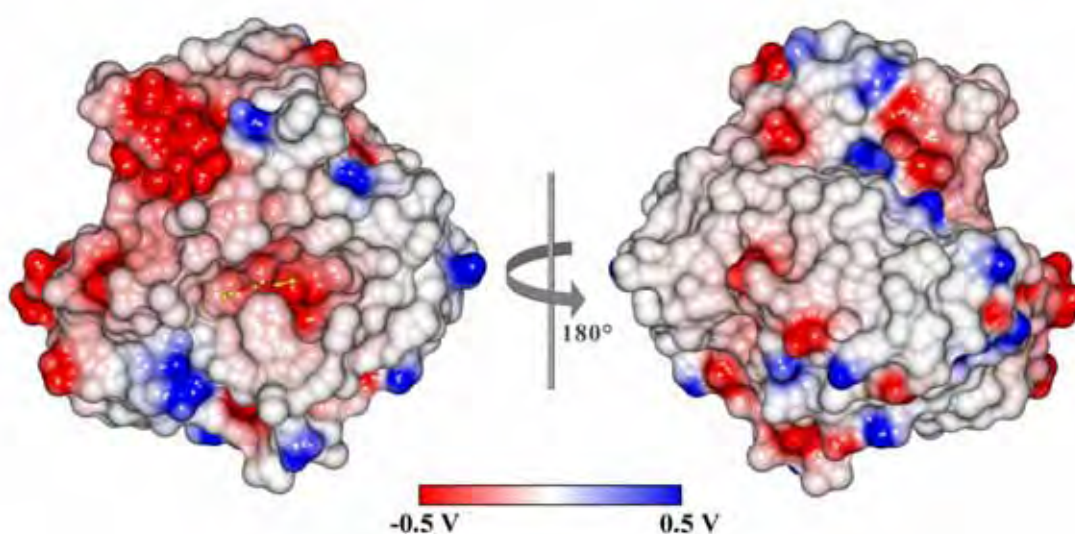


Figura 29 Distribuição do potencial eletrostático da superfície da enzima RML, baseado em sua estrutura cristalográfica (4TGL); vermelho indica superfície de potencial eletrostático negativo e azul indica superfície de potencial eletrostático positivo

5.6 Eficiência da imobilização de lipase em microesferas de PVA

A quantidade de lipase imobilizada no suporte (item 4.4) e a atividade enzimática do complexo e da solução remanescente (item 4.5) foram investigadas.

A quantidade de proteína imobilizada na amostra de Enzima-PVA4 foi (0,03mg de enzima /g de suporte) seguida pela Enzima-PVA25 (0,029mg de enzima /g de suporte) e Enzima-PVA12 (0,024mg de enzima /g de suporte). (Figura 30) Não foram observadas variações da quantidade de enzima imobilizada para os três suportes, portanto não existe uma correlação entre a estrutura da microesfera com a capacidade de imobilização da enzima na matriz polimérica. Isto também sugere que a lipase esteja adsorvida somente na superfície do polímero.

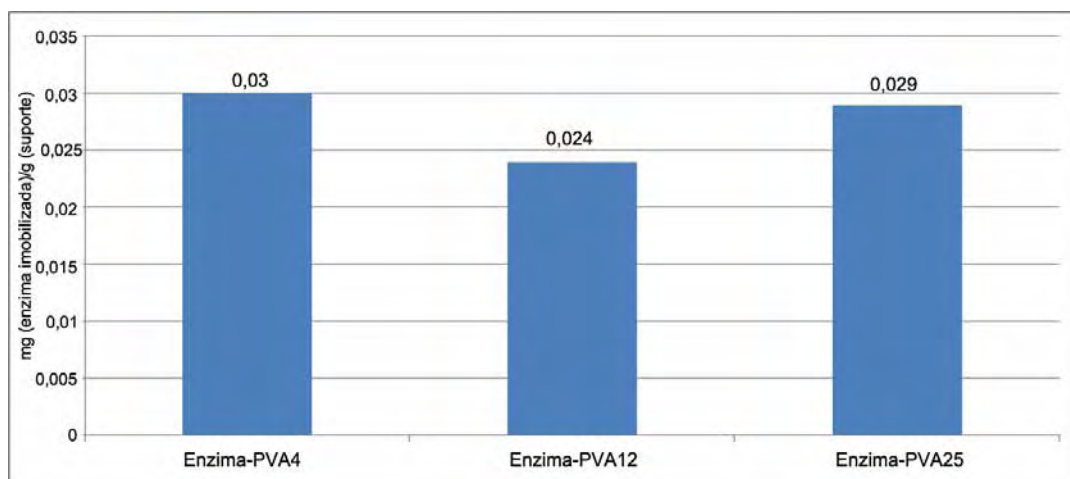


Figura 30 Relação entre a massa de enzima imobilizada (mg) pela massa do suporte (g) pela reação de Bradford

Em relação à atividade enzimática do complexo imobilizado, verificou-se uma atividade lipolítica extremamente elevada na amostra de Enzima-PVA25 (149,15 U/mg de enzima) enquanto que a amostra Enzima-PVA12 apresentou (67,23 U/mg de enzima), seguida pela Enzima-PVA4 (6,13 U/mg de enzima). A massa média da enzima imobilizada foi calculada e, em seguida, a atividade enzimática da enzima livre foi medida utilizando a mesma quantidade, apresentando uma atividade de 11,6 U/mg.

A atividade enzimática das amostras de microesferas antes da imobilização (PVA4, PVA12 e PVA25) também foi realizada. Neste caso não foi observado atividade em nenhuma das três amostras.

De fato neste sistema, podemos afirmar que existe uma potencialização da atividade catalítica quando a enzima é imobilizada no suporte PVA12 e PVA25, sendo mais acentuada com enzima adsorvida no suporte PVA25. (Figura 31) Estas diferenças na atividade enzimática estão de acordo com os dados de ATR-FTIR (item 5.3), em que nos espectros das amostras de Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25, a enzima manteve a maior parte de sua estrutura (ver Figura 22). Os principais componentes estruturais da lipase não são alterados ao serem adsorvidos nestes suportes, porém o mesmo não ocorreu no complexo Enzima-PVA4.

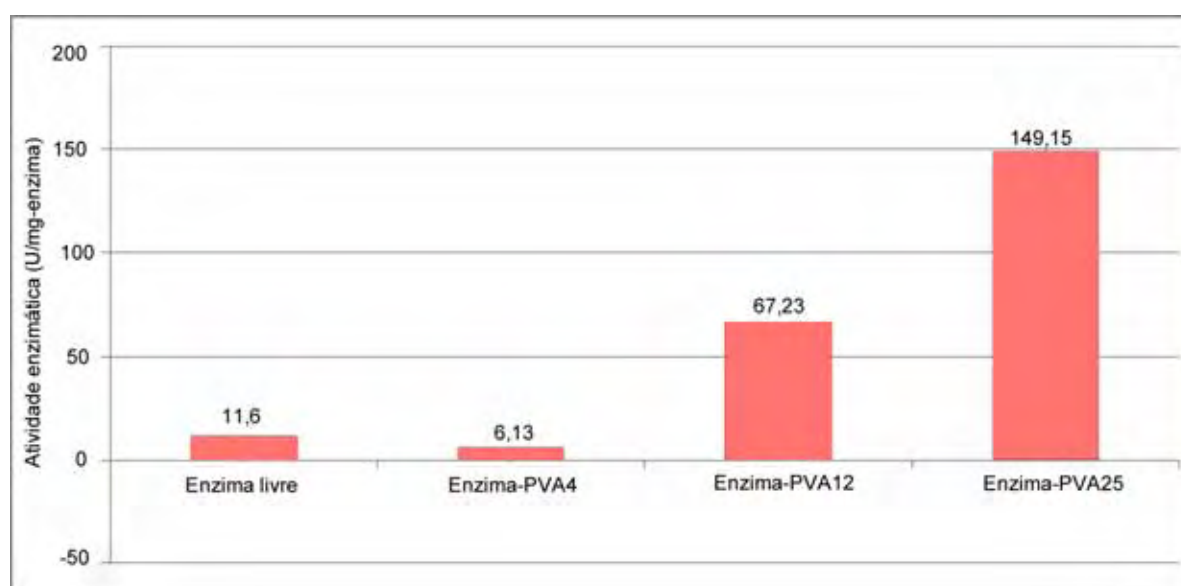


Figura 31 Atividade enzimática do complexo polímero-enzima (U/mg de enzima) a) Enzima-PVA4 b) Enzima-PVA12 c) Enzima-PVA25

Em relação à atividade lipolítica da enzima remanescente no sobrenadante produzido na imobilização, foi observado que a atividade da lipase presente na solução pertence à Enzima-PVA4 permaneceu elevada (21,7 U/ml de enzima), seguido pela Enzima-PVA12 (13,01 U/mL de enzima) enquanto que para o complexo Enzima-PVA25 houve uma considerável redução (6,39 U/mL de enzima). (Figura 32) Foi também realizada a medida da atividade enzimática da enzima livre apresentando uma atividade lipolítica de (28,01 U/mL de enzima).

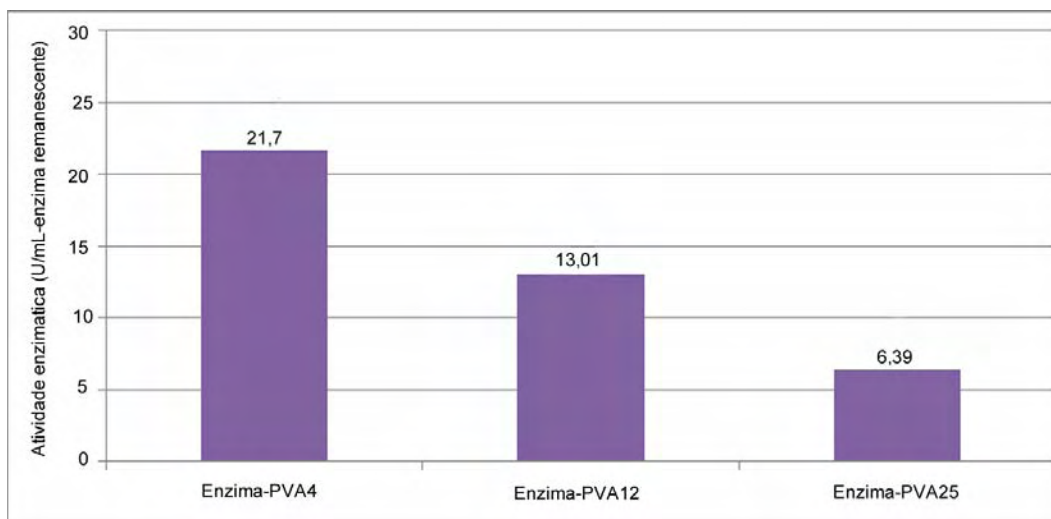


Figura 32 Atividade enzima remanescente na solução (U/mL de enzima remanescente) a) Enzima livre b) Enzima-PVA4 c) Enzima-PVA12 d) Enzima-PVA25

A alta concentração de cátions sódio presente na saponificação das microesferas PVA25 pode ter contribuído para a inibição da enzima livre presente na solução remanescente. Isto também foi observado com a enzima PVA12, porém a redução foi intermediária.

Acredita-se que o excesso de ions sódio originados por lixiviação da amostra de Enzima-PVA25 possa ter sido disperso na solução, afetando a enzima livre restante, o que diminuiu sua atividade. A etapa de saponificação também foi realizada com a Enzima-PVA12, porém a concentração de NaOH foi menor, e por isso houve uma inativação intermediária. Ao passo que na solução de Enzima-PVA4, uma baixa concentração de NaOH foi utilizada, portanto menos íons sódio presente na solução e menos perda de atividade enzimática.

5.7 Zimograma baseado na atividade de hidrólise e de esterificação da lipase de RML

Com o objetivo de verificar se a lipase de RML apresentava atividade hidrolisante ou esterificante, foi realizado zimogramas de atividade. A Figura 33 apresenta um zimograma de atividade de hidrólise (a) e de esterificação (b). Uma banda principal com uma massa molecular em torno de 23 - 30 kDa foi observada no zimograma de atividade hidrolítica (Figura 33a). De fato foi observada atividade de hidrólise no ensaio de atividade enzimática (item 4.5) que consistiu na hidrólise de palmitato de p-nitrofenila.

Para detectar a atividade de esterificação na enzima lipase de RML, foi realizado um zimograma utilizando ácido oleico e dodecanol como substratos (Figura 33b). As bandas escuras que foram obtidas na região de 23 - 31 kDa (região próxima ao observado no zimograma de hidrólise), o que revela que a enzima purificada foi ativa para este tipo de substrato. Nota-se que em ambos zimogramas, a lipase utilizada apresenta uma pequena quantidade de impureza, pois uma banda eletroforética, cuja a massa molecular estimada foi da ordem de 40 kDa pode ser observada. Assim, pode-se afirmar que a lipase utilizada nos ensaios apresenta tanto atividade hidrolítica quanto de esterificação dependendo do tipo de substrato, porém a atividade hidrolítica é mais perceptível por apresentar uma banda eletroforética mais escura.

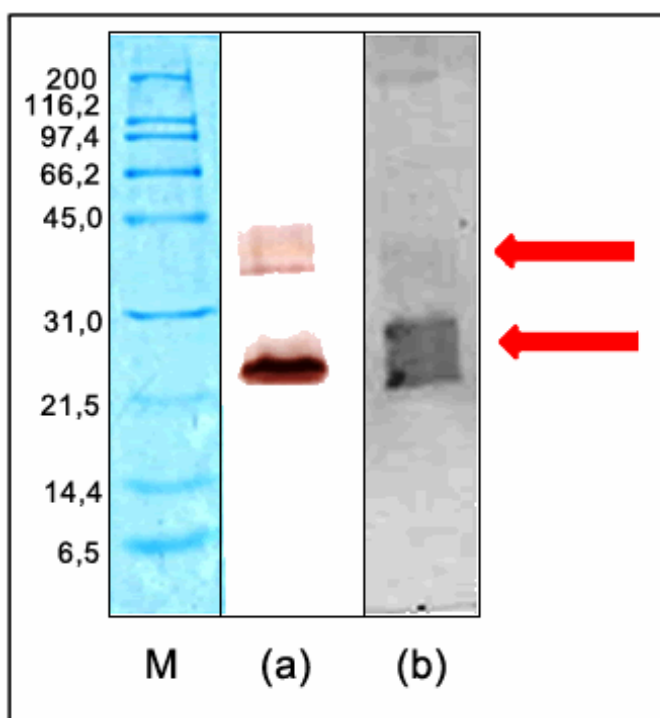


Figura 33 Zimogramas obtidos a partir da atividade de hidrólise (a) e de esterificação (b) juntamente com o marcador molecular (M)

5.8 Produção de Biodiesel

Foram realizadas reações de transesterificação do óleo de soja via rota etílica catalisada pela lipase na forma imobilizada.

Primeiramente, foi realizada a análise por Cromatografia em camada delgada (TLC) para as amostras Enzima-PVA4, Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25. Os resultados revelaram que houve uma conversão significativa de óleo de soja em biodiesel na reação em que foi utilizada o complexo Enzima-PVA25 como catalisador. Houve uma produção intermediária com o complexo Enzima-PVA12 e não houve conversão significativa com a amostra Enzima-PVA4 (Figura 34).

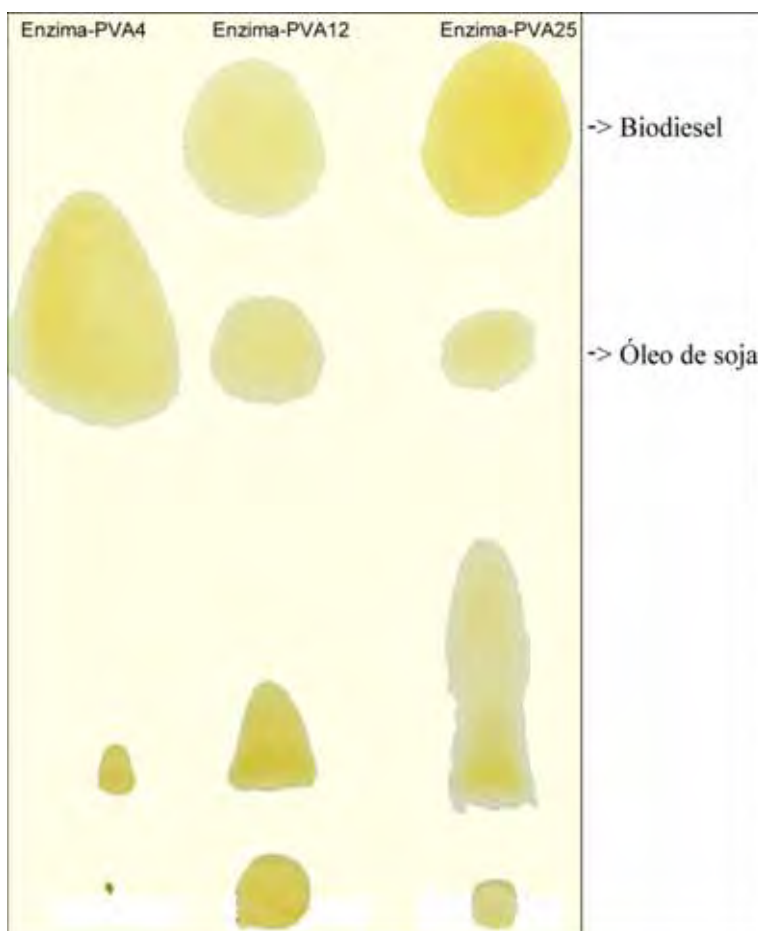


Figura 34 Dados de TLC. Produção de Biodiesel a) Enzima-PVA4 b) Enzima-PVA12 c) Enzima-PVA25

Análises de cromatografia gasosa também foram realizadas para todas as amostras. As reações catalisadas utilizando os complexos imobilizados Enzima-PVA4, Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25 resultaram num rendimento de 1,7%, 40,7% e 66,3%, respectivamente, de ésteres etílicos produzidos sob as mesmas condições. Observa-se que o complexo Enzima-PVA25 apresentou um melhor desempenho quando comparado aos outros suportes (Enzima-PVA12 e Enzima-PVA4). (Figura 35)

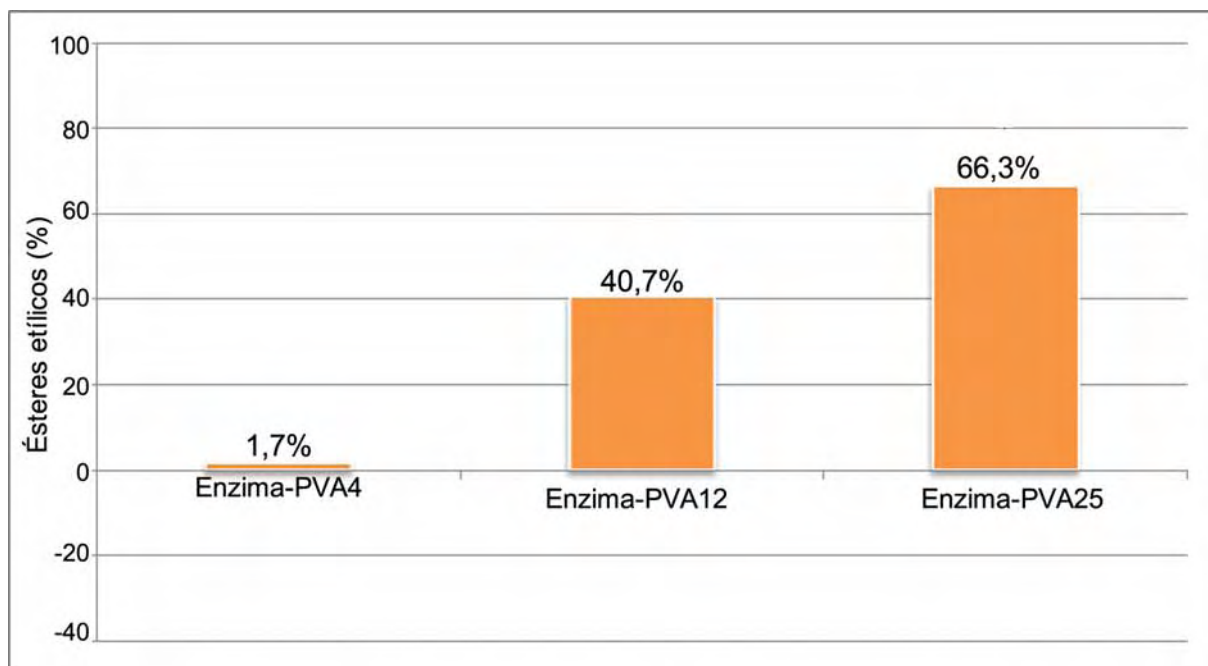


Figura 35 Produção de ésteres etílicos (%) por cromatografia gasosa a) Enzima-PVA4 b) Enzima-PVA12 c) Enzima-PVA25

Para demonstrar a especificidade da enzima ao substrato e verificar sua sinergia quando imobilizada no suporte, uma quantidade ótima experimental de enzima (3,71 mg; 153U) foi utilizada como catalisador, nas mesmas condições das reações realizadas. Uma conversão de 89% em ésteres etílicos foi observada, o que demonstra sua especificidade. A mesma quantidade de enzima utilizada nesta reação foi imobilizada em microesferas de PVA25, e posteriormente, quantificada pela reação de Bradford (item 4.4) resultando em uma imobilização de 23% (0,016 mg de enzima/g de suporte). O complexo imobilizado obtido foi, em seguida, utilizado como catalisador na reação de transesterificação nas mesmas condições das demais reações, em que resultou em uma conversão de 62% em ésteres etílicos. A mesma quantidade de enzima imobilizada no suporte foi posteriormente utilizada como catalisador na sua forma livre, obtendo uma conversão de 13%. Esta significativa diferença de rendimento entre a enzima livre (13%), o complexo Enzima-PVA25 (62%) e a ausência de atividade enzimática no suporte puro (item 5.6) indica claramente uma sinergia muito interessante para este sistema (ver Figura 36).

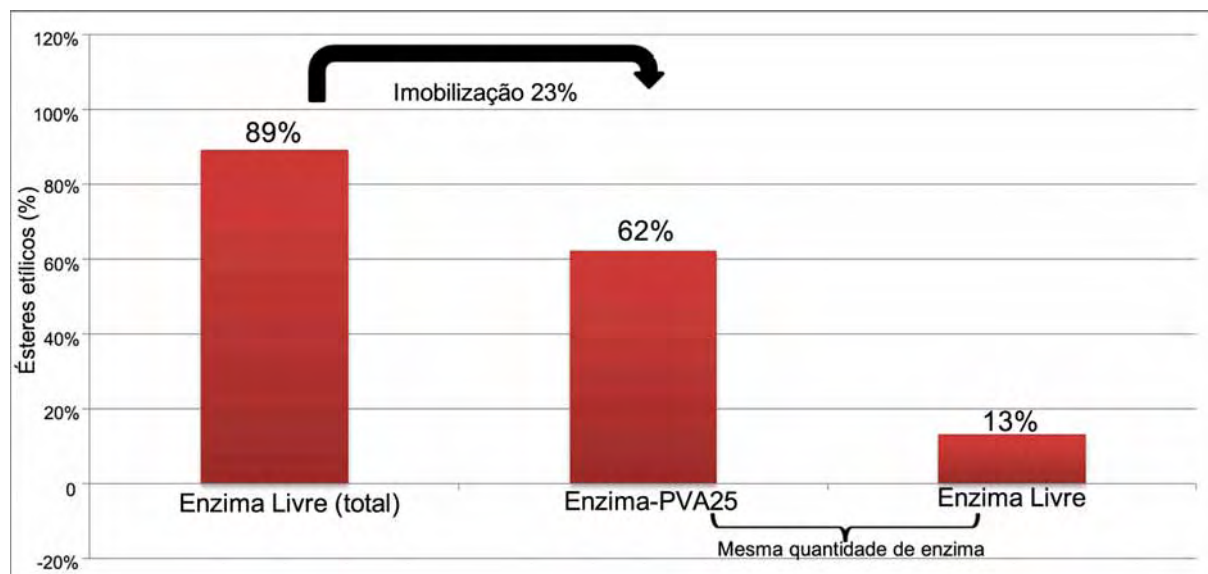


Figura 36 Produção de ésteres etílicos (%) por cromatografia gasosa a) Enzima livre (total) b) Enzima-PVA25 c) Enzima livre (quantidade imobilizada)

Estudos de imobilização em diversos sistemas poliméricos como, por exemplo: imobilização de lipase de *Aspergillus oryzae* em matriz polimérica de copolímeros de estireno-divinilbenzeno (STY e DVB) (Yucel, Demir et al., 2011); imobilização de lipases de diversas fontes em polipropileno macroporoso (Salis, Pinna et al., 2008); e imobilização lipase de *Thermomyces lanuginosus* em espumas de poliuretano (Dizge e Keskinler, 2008), embora tenham demonstrado aumento da estabilidade das enzimas e ótimo desempenho na produção de biodiesel, não reportaram ocorrência de efeitos sinérgicos em seus sistemas.

5.9 Planejamento experimental de superfície de resposta tipo Box- Behnken

Foram realizados 15 ensaios com 3 repetições do ponto central variando parâmetros que influenciam a reação de transesterificação, como a temperatura (T), razão molar (O:E) e quantidade de catalisador (C).

A Tabela 4 mostra a matriz de planejamento de Box-Behnken com as três variáveis, juntamente com a porcentagem de rendimento obtido em ésteres etílicos. Os coeficientes de regressão e as constantes são mostrados na Tabela 5, estes foram obtidos através do software MINITAB 16 que preveu o modelo quadrático para o rendimento de ésteres etílicos.

Tabela 4 Matriz de planejamento experimental com os rendimentos de ésteres etílicos

Ensaio	Variáveis			Rendimento de ésteres etílicos (%)
	Temperatura (°C)	Razão óleo:etanol (mol. Mol ⁻¹)	Quantidade de catalisador (%)	
1	33	1:6	6,5	63,07
2	33	1:9	5,5	57,00
3	37,5	1:3	4,5	79,50
4	37,5	1:3	6,5	86,34
5	42	1:3	5,5	68,04
6	42	1:6	4,5	59,81
7	37,5	1:6	5,5	68,80
8	33	1:6	4,5	59,14
9	37,5	1:9	4,5	55,50
10	37,5	1:9	6,5	58,62
11	37,5	1:6	5,5	69,92
12	33	1:3	5,5	61,57
13	37,5	1:6	5,5	70,50
14	42	1:9	5,5	56,50
15	42	1:6	6,5	77,31

Tabela 5 Valores de p do modelo quadrático completo determinado para as variáveis

Termos	Valor de p
T (Temperatura)	0,281
O:A (Razão óleo: etanol)	0,011
Q (Quantidade de catalisador)	0,129
T*T	0,077
O:A*O:A	0,575
Q*Q	0,528
T*O:A	0,593
T*Q	0,317
O:A*Q	0,773

$R^2 = 84,73\%$, $R^2(\text{adj}) = 57,24\%$, p do Falta de ajuste 0,012

A precisão do modelo polinomial pode ser avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2) (Liao e Chung, 2011). Este coeficiente informa para os dados de reação catalítica que 84,73% da variação no rendimento de ésteres etílicos podem ser explicados pelo modelo (Tabela 4). O valor do coeficiente de determinação ajustado (R^2 adj. = 57,24%), também suporta a significância do modelo. Os valores de p são utilizados como ferramenta para avaliar o significado de cada um dos coeficientes, que, por sua vez, são necessários para compreender o padrão das interações entre as melhores variáveis (Lin, Li *et al.*, 2012). Caso o valor de p para o modelo for menor do que 0,05, uma relação estatisticamente significativa entre a resposta e a variável selecionada com um nível de confiança de 95% é observado. Isto indica que a regressão é estatisticamente significativa (Singh, Birla *et al.*, 2012).

A falta de ajuste mede a inadequação do modelo nas variações das respostas. Neste caso, foi menor que 0,05 (0,012), assim há evidências de que o modelo não explicou adequadamente as variações de respostas. Apesar da significativa falta de ajuste aos dados, a aplicação deste modelo foi satisfatória, isto porque a condição ótima foi alcançada e razoavelmente ajustado para a variável de otimização.

Considerando o efeito linear, somente a razão molar (O:E) com $p = 0,011$ foi significativa no aumento do rendimento de ésteres etílico. Isto é, a variação da razão molar O:E influencia no rendimento de ésteres etílicos.

O maior rendimento na formação dos ésteres foi obtido na condição de reação com razão molar O:E de 1:3, utilizando a maior quantidade de catalisador 6,5% (% em peso em relação ao óleo) a 37,5°C, sendo o rendimento de 86,34% de biodiesel.

Na literatura constam alguns relatos a respeito da eficiência da utilização de uma baixa razão molar O:A para a produção de biodiesel. Segundo Verdugo *et al* (2011) a otimização realizada pela metodologia de superfície de resposta mostrou que a melhor razão molar O:E para a reação de produção de biodiesel foi 1:3.4. Na transterificação enzimática do óleo de canola via rota metílica, Yucel *et al* (2011) encontrou a melhor condição para a produção de ésteres, utilizando uma razão molar de 1:4. Charpe *et al* (2011) observaram que na transesterificação enzimática obteve uma melhor conversão em ésteres quando utilizou uma razão molar de 1:3. Segundo este autor, em reações catalisadas por compostos alcalinos, uma alta razão molar O:A aumenta a conversão de ésteres, isto porque o álcool em excesso desloca o equilíbrio para a produção do biodiesel. No entanto, uma diminuição na conversão em reações com alta razão molar O:A foi observado em transesterificação enzimática, possivelmente devido à inibição da lipase pelo álcool.

O gráfico de contorno (contour plot) descrito pelo modelo de regressão é apresentado nas Figura 37 e Figura 38 mostram os efeitos das variáveis na produção de biodiesel. A interação entre a razão molar O:E e temperatura na síntese de ésteres etílicos são apresentados na Figura 37. O efeito da razão molar sobre a produção de biodiesel foi significativo. Foi observado que o aumento da razão molar diminui a produção de ésteres etílicos. Isto pode ser explicado pela inativação do sítio ativo da lipase pelo álcool na reação de transterificação (Li e Yan, 2010).

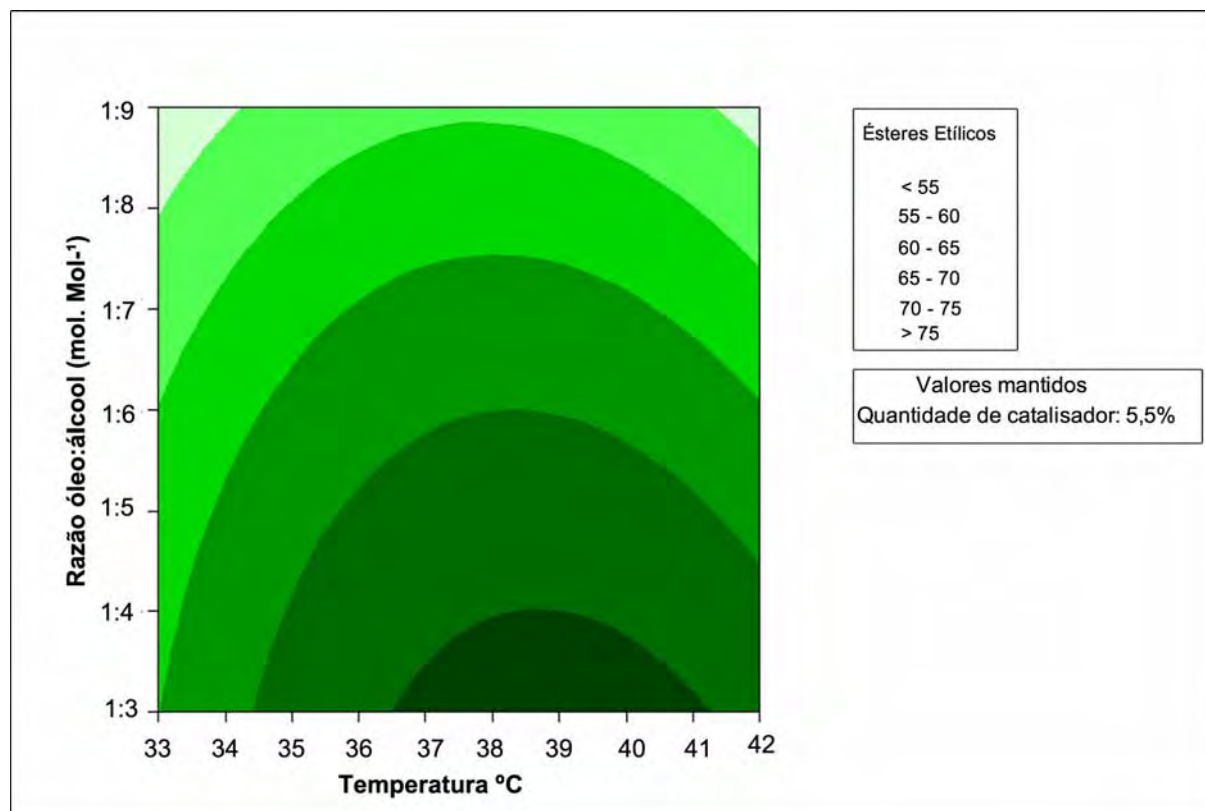


Figura 37 Curva de contorno do efeito da razão molar óleo: etanol (mol.Mol^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) sobre a conversão de ésteres etílicos utilizando 5,5% (% p/p) de catalisador

O efeito da interação entre razão molar O:E e quantidade de catalisador foram mostrados na Figura 38. Foi observado que a baixa razão molar juntamente com a maior quantidade de catalisador foi determinante para a produção de biodiesel e que máximo rendimento em ésteres foi alcançado para os ensaios conduzidos com máxima concentração de enzima (6,5% em massa).

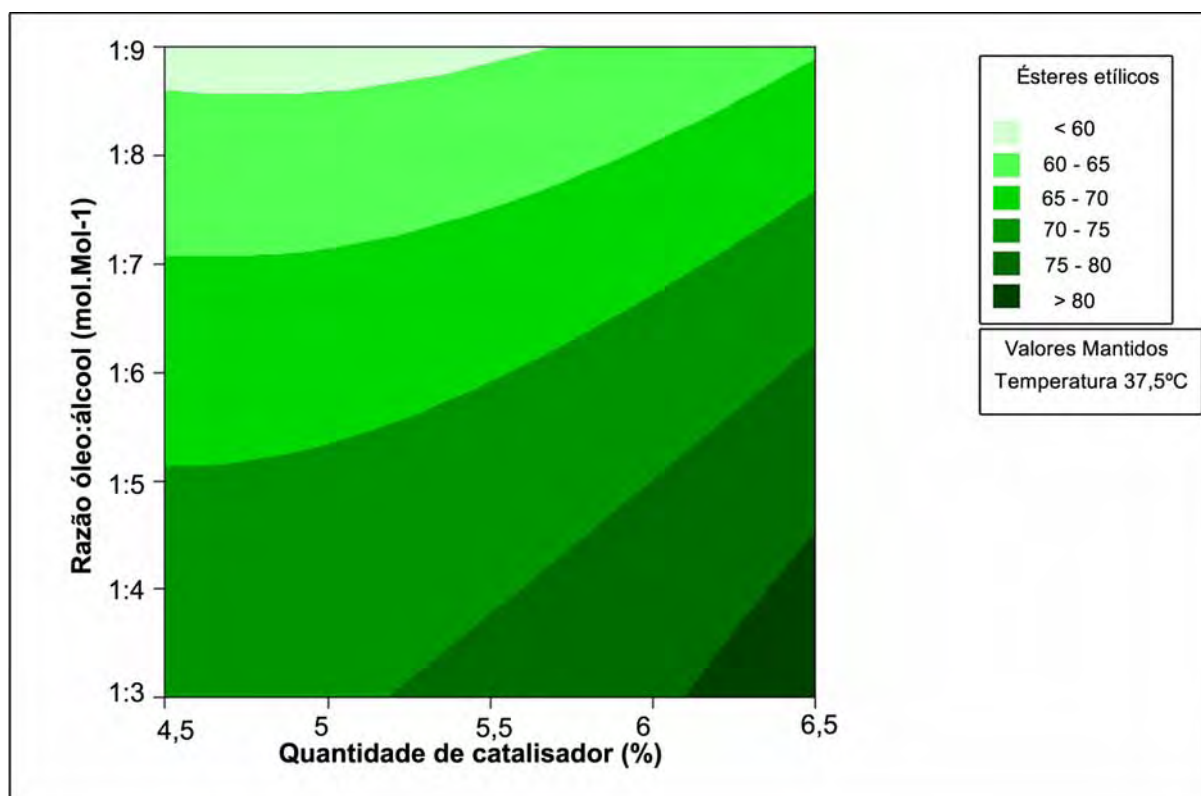


Figura 38 Curva de contorno do efeito da razão molar O:E (mol.Mol⁻¹) e quantidade de catalisador (%) sobre a conversão de ésteres etílicos a uma temperatura de 37,5°C.

6 Possíveis interpretações para o aumento da atividade enzimática dos complexos Enzima-PVA25 e Enzima-PVA12

O aumento da atividade enzimática nos complexos Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25 pode ser atribuído à interação dos resíduos de aminoácidos da enzima com os grupos presentes na superfície das microesferas. Esta adsorção promoveu uma alteração na estrutura da enzima, conduzindo a uma forma mais ordenada e, aparentemente, conferiu uma geometria mais adequada para a imobilização da lipase.

Por outro lado, o PVA4 possui a superfície recoberta principalmente pelo grupo acetato. A enzima ao interagir com este suporte bloqueia a região do sítio ativo, o que evita o acesso do substrato. Segundo Salis *et al* (2008), o processo de imobilização pode levar à inativação de certa fração da molécula de lipase devido à distorção causada pela interação entre enzima e polímero (Salis, Pinna *et al.*, 2008).

Herrgard *et al* (2000) identificou uma rede eletrostática importante que incluem os resíduos dos seguintes aminoácidos: Ser144, Asp203, His257, His143, Tir260, Tir28, Arg80 e Asp91 (numeração de resíduos de aminoácidos pertencente ao RML (Figura 39)). Esta rede eletrostática consiste nos resíduos pertencentes à tríade catalítica (Ser144, Asp203, His257); resíduos localizados na proximidade do sítio ativo (Tir260); resíduos que estabilizam a configuração adequada do sítio ativo (Tir28, His143), e de resíduos localizados na tampa (Asp91) ou perto da primeira articulação (Arg80). De acordo com os estudos, os resíduos localizados na tampa (Asp91) e na primeira articulação (Asp80) estão associados com a ativação interfacial de lipases, que ocorre quando o “lid” abre-se através da rotação em torno de duas regiões de dobradiça. A estabilização da enzima na sua conformação aberta está relacionada com a interação eletrostática entre os resíduos Arg86 e Asp61, Asp113 e Glu117 (Herrgard, Gibas *et al.*, 2000). Provavelmente são estes os resíduos que participam da interação com o polímero.

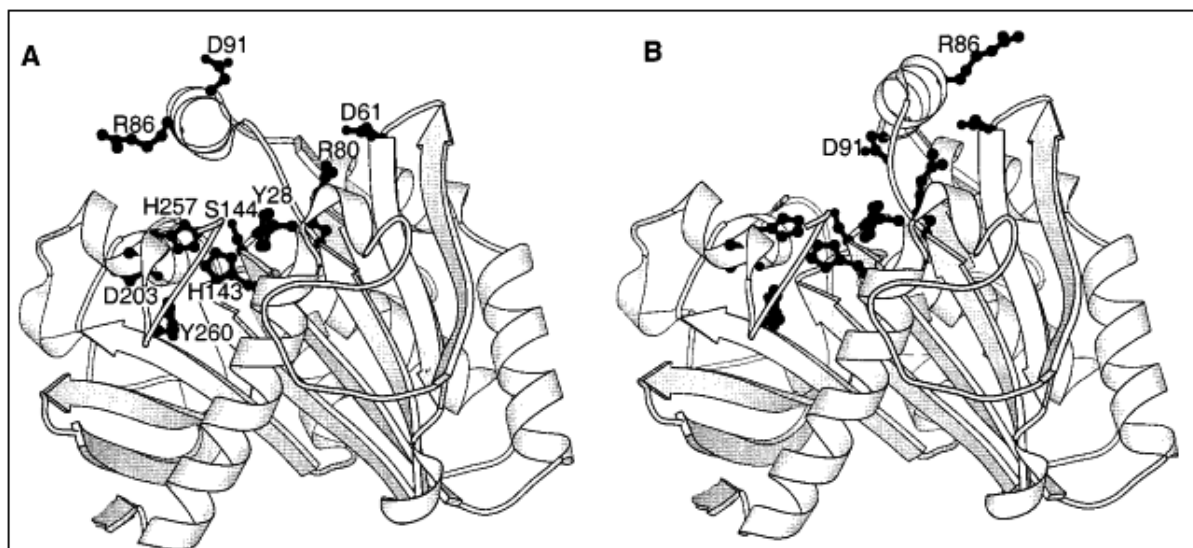


Figura 39 Representação esquemática da lipase de RML na conformação fechada (A) e aberta (B). Os resíduos que formam a rede electrostática e alguns outros resíduos chaves são representados. Fonte: (Herrgard, Gibas et al., 2000)

Assim sendo, é possível que a Arg-86 (arginina com carga positiva) se interaja com os grupos hidroxilas presentes na superfície dos polímeros de PVA25 e PVA12 (Figura 40), através de um mecanismo de interação eletrostática, como relatado por (Macario, Giordano *et al.*, 2007), assim a enzima seria imobilizada em sua conformação aberta e ativa. Os dados de ATR-FTIR e os altos rendimentos de ésteres etílicos obtidos com estes complexos estão de acordo com esta afirmação (ver itens 5.3.2 e 5.8). Ao mesmo tempo, é possível que, devido ao fato da superfície de PVA4 ser dominada por grupos acetatos, a interação deste suporte polimérico com a enzima poderia ocorrer com aminoácidos residuais que não estabilizariam a enzima na sua conformação aberta e ativa.

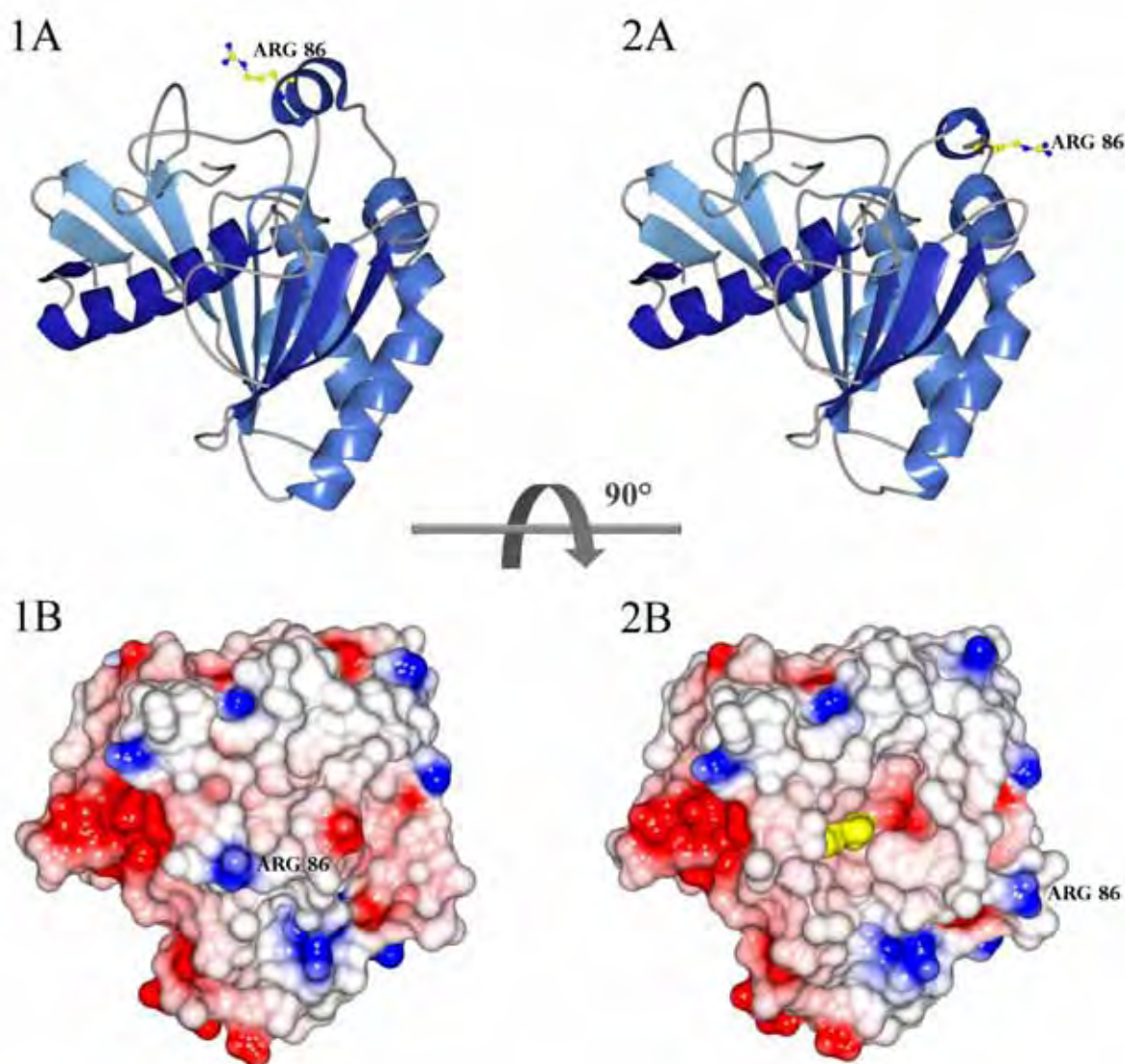


Figura 40 Representação esquemática da estrutura de RmL mostrando o fechamento e a abertura da tampa nas formas: 1) Selvagem (3TGL); 2) Ativa (4TGL). A) Elementos de estrutura secundária mostrando o enovelamento comum as lipases. B) Representação da superfície de potencial eletrostático mostrando a distribuição de cargas da proteína na forma fechada e aberta.

Outro fato interessante são as alterações significativas no ambiente de sódio observado na rede polimérica ao imobilizar a enzima (item 5.4.2). Estas alterações mostram claramente que foram estabelecidas novas interações entre a matriz e a enzima que culminou na alteração drástica do núcleo de sódio principalmente nos complexos Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25. A diferença que para esses complexos (Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25) a alteração na estrutura da enzima foi favorável ao acesso do substrato, ao contrário do complexo Enzima-PVA4.

7 Conclusões

O principal objetivo deste trabalho foi a síntese de um suporte à base de PVA para a imobilização de lipase de RML e sua utilização na reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel via rota etílica. Inicialmente, foram sintetizadas e caracterizadas microesferas de PVA (4, 12 e 25 mol/L) e utilizadas como matriz de imobilização para lipase de RML. Os resultados foram os seguintes:

- Resultados observados na difração de Raio-X mostraram que quanto maior a concentração de base utilizada na saponificação da microesfera, maior a sua cristalinidade (PVA12 e PVA25). Baixa concentração de solução alcalina resulta em microesfera de estrutura amorfa (PVA4). PVA25 foi considerado mais cristalino, pois apresentou picos mais intensos e mais bem definidos.
- Dados de MEV revelaram que microesferas de estruturas cristalinas (PVA12 e PVA25) possuem estruturas tipo “scaffold”. PVA4 (estrutura amorfa) apresentou uma superfície lisa e irregular com ausência total dos “scaffold”.
- A imobilização enzimática em microesferas de estruturas cristalinas (PVA12 e PVA25) resultou em aumento da estabilidade térmica, exceto para a amostra PVA4 que, do começo ao fim dos experimentos, apresentou uma baixa atividade.
- Em relação à quantidade de enzima imobilizada, ficou evidente que não existe uma correlação com a estrutura (cristalina ou amorfa), pois a capacidade de imobilização nos três suportes foi próxima.
- Dados de análises de ATR-FTIR das microesferas puras mostraram bandas característica para o polímero: grupo acetato (1730 cm^{-1}) em PVA4 e hidroxilas ($3550\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$) em PVA12 e PVA25. Ao imobilizar a enzima, foi observada, nas amostras Enzima-PVA12 e Enzima-PVA25, a presença de banda na área de absorção de amida I, o que sugere que a lipase é adsorvida a microesferas, além disso, não há alteração nos principais componentes estruturais da enzima. O mesmo não ocorreu com o complexo Enzima-PVA4; neste caso, existem

alterações estruturais devido à sobreposição das bandas do grupamento acetato com a região de absorção da amida I.

- Os deslocamentos observados nos espectros de ^{23}Na -MAS-NMR para ambos os suportes poliméricos puros e complexos Enzima-PVA mostraram diferenças significativas. Os dados indicaram que a imobilização causou alterações no ambiente de sódio da rede polimérica, o que levou ao estabelecimento de novas interações entre polímero e enzima. Os deslocamentos químicos após a imobilização indicam que enzima de alguma forma interagiu com os íons sódio.
- Segundo dados de zimograma de atividade, pode-se afirmar que a lipase utilizada nos ensaios apresenta tanto atividade hidrolítica quanto esterificação dependendo do tipo de substrato, sendo a atividade hidrolítica mais evidente.
- Os suportes cristalinos (PVA12 e PVA25) exibiram uma maior atividade enzimática quando comparado a enzima imobilizada no suporte de estrutura amorfa (PVA4) que apresentou uma baixa atividade. Estes resultados foram confirmados com o rendimento de ésteres etílicos: Enzima-PVA25 (66%), Enzima-PVA12 (40,7%) e Enzima-PVA4 (1,7%).
- Em relação ao planejamento experimental de superfície de resposta do tipo Box-Behnken, a melhor condição de reação foi obtida com uma razão molar O:E de 1:3, quantidade de catalisador 6,5% a 37,5°C, alcançando um rendimento de 86,34%.

De fato, pode-se observar que os resultados deste estudo foram satisfatórios. A imobilização de lipase de RML em suporte polimérico resultou em um aumento da estabilidade térmica, dificultou a desativação, além de ter melhorado a atividade enzimática do catalisador.

O principal objetivo em imobilização de enzima foi obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetados durante o processo, em comparação à sua forma livre. De maneira ideal, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. De acordo com os dados apresentados neste trabalho, o complexo Enzima-PVA25 atingiu o objetivo proposto como catalisador para a reação de transesterificação do óleo de soja a ésteres etílicos de ácidos graxos.

8 Perspectivas

Para dar continuidade ao estudo realizado, recomendam-se a seguinte etapa:

- Estudos para a utilização de forma repetida ou contínua do mesmo catalisador, para que possam ser realizadas sucessivas reações com a mesma matriz, para determinação do tempo de vida útil de cada catalisador;
- Determinação da área superficial dos suportes preparados pelo método de BET;
- Realização dos testes de estimativa das condições de preparação do suporte sobre a hidrobicidade por adsorção de corantes hidrofóbicos.

9 Referências

- AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 1, n. 1, p. 57-66, 2007.
- ANP, AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL, Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2012. Rio de Janeiro: **Centro de Documentação e Informação da ANP**, p. 245, 2012.
- BASHA, S. A.; GOPAL, K. R.; JEBARAJ, S. A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6-7, p. 1628–1634, 2009.
- BASSNER, S. L.; KLINGENBERG, E. H. Using poly(vinyl alcohol) as a binder. **American Ceramic Society Bulletin**, v. 77, n. 6, p. 71-75, 1998.
- BAUJARD-LAMOTTE, L.; NOINVILLE, S.; GOUBARD, F.; MARQUE, P.; PAUTHE, E. Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 63, n. 1, p. 129-137 2008.
- BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Simplex-sum designs - A class of 2nd order rotatable designs derivable from those of 1st order. **Annals of Mathematical Statistics**, v. 31, n. 4, p. 838-864, 1960
- BOZBAS, K. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 2, p. 542–552, 2008.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantitation os protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRADY, L.; BRZOZOWSKI A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; et al. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 767-770, 1990.
- BRANAN, N.; WELLS, T. A. Microorganism characterization using ATR-FTIR on an ultrathin polystyrene layer. **Vibrational Spectroscopy**, v. 44, n. 1, p. 192–196, 2007.
- BRASIL. Portaria MCT Nº 702, de 30 de outubro de 2002. Instituir o Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico de Biodiesel - PROBIODIESEL. Brasília: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. p. 1, 2002.
- BRASIL. MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA-SECRETARIA DE PETRÓLEO, **Boletim Mensal dos Combustíveis renováveis. Agosto de 2012**. Brasília: n. 55, p. 23, 2012.

BRASIL. LEI Nº 11.097, DE 13 DE JANEIRO DE 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Brasília: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 142: 8 p. 2005.

BRISOLARA, C. S. O impacto do programa nacional do biodiesel na estruturação da cadeia de produção agrícola. **Federação da agricultura do Estado de São Paulo**. Departamento econômico. 17 p. 2010.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. Engenharia Enzimática. Lisboa: **Editora Lidel**, 2003.

CAO, L. Q.; BORNSCHEUER, U. T.; SCHMID, R. D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 6, n. 3, p. 279-285, 1999.

CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

CARVALHO, P. D.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; DA SILVA, D. M. Application of microbial lipases to concentrate polyunsaturated fatty acids. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CHAROENCHAITRAKOOL, M.; THIENMETHANGKOON, J. Statistical optimization for biodiesel production from waste frying oil through two-step catalyzed process. **Fuel Processing Technology**, v. 92, n. 1, p. 112-118, 2011.

CHARPE, T. W.; RATHOD, V. K. Biodiesel production using waste frying oil. **Waste Management**, v. 31, n. 1, p. 85-90, 2011.

COLLINS, E. S.; LASSALLE, V.; LUJAN FERREIRA, M. FTIR-ATR characterization of free *Rhizomucor meihei* lipase (RML), Lipozyme RM IM and chitosan-immobilized RML. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 220-228, 2011.

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

DALLA-VECCHIA, R.; SEBRAO, D.; NASCIMENTO, M. G. Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2677-2682, 2005.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C; AGUIARI, C. L. Modification of oils and fats by biotransformation. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

DE QUEIROZ, A. A. A.; PASSOS, E. D.; ALVES, S. B.; SILVA, G. S; HIGA, O.Z; VITOLO, M. Alginate-poly(vinyl alcohol) core-shell microspheres for lipase immobilization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, n. 2, p. 1553-1560, 2006.

DEREWENDA, U.; BRZOZOWSKI A. M.; LAWSON D. M.; DEREWENDA Z. S. Catalysis at the interface - the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1532-41, 1992.

DIZGE, N.; AYDINER C.; IMER, D. Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. et al. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 6, p. 1983-1991, 2009.

DIZGE, N.; KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1274-1278, 2008.

DIZGE, N.; KESKINLER, B.; TANRISEVEN, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2-3, p. 220-225, 2009.

DONG, A. C.; JONES, L. S.; KERWIN, B. A.; KRISHNAN, S.; CARPENTER, J. F. Secondary structures of proteins adsorbed onto aluminum hydroxide: Infrared spectroscopic analysis of proteins from low solution concentrations. **Analytical Biochemistry**, v. 351, n. 2, p. 282-289, 2006.

ELLEN, M. O. C.; THATCHER, W. R.; STAURT, L. C. Studies of lightly sulfonated polystyrene using ^{23}Na -NMR. 1. Effects of sample compositions. **Macromolecules**, v. 27, p. 5803-5810, 1994.

ELLEN, M. O. C.; THATCHER, W. R.; STAURT, L. C. Studies of lightly sulfonated polystyrene using ^{23}Na -NMR. 1. Effects of solution casting. **Macromolecules**, v. 28, p. 3995-3999, 1995.

ENDALEW, A. K.; KIROS, Y.; ZANZI, R. Inorganic heterogeneous catalysts for biodiesel production from vegetable oils. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 9, p. 3787-3809, 2011.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.

HAN, Z.-L.; HAN, S. Y.; ZHENG, S. P.; LIN, Y. et al. Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 1, p. 117-26, 2009.

HERRGARD, S.; GIBAS, C. J.; SUBRAMANIAM, S. Role of an electrostatic network of residues in the enzymatic action of the *Rhizomucor miehei* lipase family. **Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 2921-2930, 2000.

IAE, INTERNATIONAL AGENCY ENERGY. Biofuel for transport: an international perspective. Paris: **IEA publications**, p. 216, 2004.

IBRAHIM, M.; NADA, A.; KAMAL, D. E. Density functional theory and FTIR spectroscopic study of carboxyl group. **Indian Journal of Pure & Applied Physics**, v. 43, n. 12, p. 911-917, 2005.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315, 1999.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JEGANNATHAN, K. R.; LUA, J.; KAILI, N.; DENG, L.; WANG, F. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase: A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253-264, 2008.

KHARRAT, N.; ALIA, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURIA, Y. T.; CHÂABOUNI, M. K. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1083–1089, 2011.

KINNEY, A. J.; CLEMENTE, T. E. Modifying soybean oil for enhanced performance in biodiesel blends. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1137–1147, 2005.

KLIBANOV, A. M. Enzyme stabilization by immobilization. **Analytical Biochemistry**, v. 93, n. 1, p. 1-25, 1979.

KRAAI, G. N.; WINKELMAN, J. G. M.; VRIES, J. G. DE; HEERES, H. J. Kinetic studies on the *Rhizomucor miehei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 1, 2008.

KRIEGER, N. **Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum***. 1995. 260 (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KWON, M.-A.; HYUN, S. K.; HAHM, D.-H.; SONG, J. K. Synthesis activity-based zymography for detection of lipases and esterases. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 4, p. 741-746, 2011.

LECA, M.; TCACENCO, L.; MICUTZ, M.; STAIU, T. Optimization of biodiesel production by transesterification of vegetable oils using lipases. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 5, 2010.

LEE, D. H.; KIM, J. M.; KANG, S. W.; LEE, J. W.; KIM, S. W. Pretreatment of lipase with soybean oil before immobilization to prevent loss of activity. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 23, p. 1965-1969, 2006.

LEE, S. G.; KIM, J. P.; KWON, I. C.; PARK, K. H.; NOH, S. K.; HAN, S. S.; LYOO, W. S. Heterogeneous surface saponification of suspension-polymerized monodisperse

poly(vinyl acetate) microspheres using various ions. **Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 3567–3576, 2006.

LI, Q.; YAN, Y. Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase. **Applied Energy**, v. 87, n. 10, p. 3148-3154, 2010.

LIAO, C. C.; CHUNG, T. W. Analysis of parameters and interaction between parameters of the microwave-assisted continuous transesterification process of *Jatropha* oil using response surface methodology. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 89, n. 12A, p. 2575-2581, 2011.

LIN, L. et al. Transesterification of Rapeseed Oil to Biodiesel on CaO/ α -Fe Hollow Fiber Catalyst: Optimization by Response Surface Methodology. **Bioenergy Research**, v. 5, n. 4, p. 949-957, 2012.

LORENZONI, A. S. G.; GRAEBIN, N. G.; MARTINS, A. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Optimization of pineapple flavour synthesis by esterification catalysed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 2, p. 196-200, 2012.

LUBACH, J. W.; BE, P.; WINSLOW, S. L.; SALSBUURY, J. S.; MASTERS, D. B.; TOPP, E. M.; MUNSON, E. J. Solid-state NMR studies of pharmaceutical solids in polymer matrices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 6, p. 1504-1510, 2004.

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

MACARIO, A.; GIORDANO, G.; SETTI, L.; PARISE, A.; CAMPELO, J. M.; MARINAS, J. M.; LUNA, D. Study of lipase immobilization on zeolitic support and transesterification reaction in a solvent free-system. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, n. 2-4: p. 328-335, 2007.

MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. A review on suspension polymerization processes. **Polimeros-Ciencia E Tecnologia**, v. 17, n. 2, p. 166-179, 2007.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 3, 1985.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248–268, 2006.

MIKHAYLOVA, Y.; DUTSCHK, V.; MÜLLER, M.; GRUNDKE, K.; EICHHORN, K. J.; VOIT, B. Study of the solid-liquid interface of hydroxyl-terminated hyperbranched aromatic polyesters (HBP-OH) in aqueous media II. Adsorption of model proteins. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 297, n. 1-3, p. 19-29, 2007.

MOSKOWITZ, G. J.; CASSAIGNE, R.; WEST, I. R.; SHEN, T.; FELDMAN, L. I. Hydrolysis of animal fat and vegetable oil with *mucor-miehei* esterase - Properties of enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 1146–1150, 1977.

NARASIMHARAO, K.; LEE, A.; WILSON, K. Catalysts in production of biodiesel: A review. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 19-30, 2007.

NBB, NATIONAL BIODIESEL BOARD, Production Statistics. **Biodiesel American's Advanced Biofuel**, 2011. Disponível em: <http://www.biodiesel.org/production/production-statistics>. Acesso em: 13 de set de 2012.

NOINVILLE, S.; REVAULT, M.; BARON, M. H.; TISS, A.; YAPOUDJIAN, S.; IVANOVA, M.; VERGER, R. Conformational changes and orientation of Humicola lanuginosa lipase on a solid hydrophobic surface: An in situ interface Fourier transform infrared-attenuated total reflection study. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 5, p. 2709–2719, 2002.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 7, p. 769-777, 2005.

OH, J. M.; LEE, D. H.; SONG, Y. C.; LEE, S. G.; KIM, S. W. Stability of immobilized lipase on poly(vinyl alcohol) microspheres. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 429-433, 2007.

OKADA, Y.; KAWANOBE, W.; HAYAKAWA, N.; TSUBOKURA, S.; CHUJO, S.; FUJIMATSU, H.; TAKIZAWA, T.; HIRAI, T. Whitening of polyvinyl alcohol used as restoration material for Shohekiga. **Polymer Journal**, v. 43, n. 1, p. 74–77, 2011.

OZCAN, B.; OZYILMAZ, G.; COKMUS, C.; CALISKAN, M. Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 105-110, 2009.

PAHUJANI, S.; KANWAR, S. S.; CHAUHAN, G.; GUPTA, R. Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2566-2570, 2008.

PALLA, C. A.; PACHECO, C.; CARRIN, M. E. Production of structured lipids by acidolysis with immobilized *Rhizomucor miehei* lipases: Selection of suitable reaction conditions. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 76, p. 106-115, 2012.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Plant lipases from latex: Properties and industrial applications. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PEIXOTO, L. S.; SILVA, F. M.; NIEMEYER, M. A. L.; ESPINOSA, G.; MELO, P. A. M. NELE; PINTO, J. C. Synthesis of poly(vinyl alcohol) and/or poly(vinyl acetate) particles with spherical morphology and core-shell structure and its use in vascular embolization. **Macromolecular Symposia**, v. 243, p. 190-199, 2006.

PETERSEN, M. T. N.; FOJAN, P.; PETERSEN, S. B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. **Journal of Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 115-147, 2001.

PHAN, A. N.; PHAN, T. M. Biodiesel production from waste cooking oils. **Fuel**, v. 87, n. 17-18, p. 3490–3496, 2008.

PHUAH, E.-T.; LAIA, O. M.; CHOONG, S. T.; TAND, C. P.; LOE, S. K. Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 78, p. 91-97, 2012.

PIZARRO, C.; BRAÑESB, M. C.; MARKOVITSB, A.; FERNÁNDEZ-LORENTEC, G.; GUISÁND, J. M.; CHAMYA, R.; WILSON, L. Influence of different immobilization techniques for *Candida cylindracea* lipase on its stability and fish oil hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 78, p. 111-118, 2012.

RAO, L.; ZHAO, X.; PAN, F.; LI, Y.; XUE, Y.; MA, Y. Solution Behavior and Activity of a Halophilic Esterase under High Salt Concentration. **Plos One**, v. 4, n. 9, 2009.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-48, p. 237-250, 2009.

REN 21, RENEWABLE ENERGY POLICY NETWORK FOR THE 21ST CENTURY, Renewables 2011 Global Status Report, **Worldwatch Institute**, Paris: version 2.1, p.116, 2011.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 64, n. 1-2, p. 1-22, 2010.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos. **Editora Legis Summa**, 2004.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilized lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 54, n. 1-2, p. 19-26, 2008.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608–1633, 1998.

SEBRAE, SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. Biodiesel. Brasília: **Sebrae Publicações**, p. 68, 2007.

SELVASEKARAPANDIAN, S.; BASKARAN, R.; KAMISHIMA, O.; KAWAMURA, J.; HATTORI, T. Laser Raman and FTIR studies on Li⁺ interaction in PVAc-LiClO₄ polymer electrolytes. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 65, n. 5, p. 1234-1240, 2006.

SEMENZIM, V. L.; BASSO, G. G.; DA SILVA, D. A.; VASCONCELLOS, A.; AGRELI, G.; LIMA-OLIVEIRA, A. P. M.; KAWASAKI-OYAMA, R. S.; BRAILE, D. M.; NERY, J. G. Synthesis and Characterization of Novel, Highly Crystalline Poly(vinyl alcohol) Microspheres for Chemoembolization Therapy. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, n. 3, p. 1417-1423, 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-62, 2001.

SILVA, A. L. B. E. Princípios Básicos de Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido. São Carlos: **Instituto de Física de São Carlos - USP**, p. 50, 2005.

SINGH, B. et al. Synthesis of biodiesel using potassium fluoride (KF) supported by hydrotalcite and process optimization by Box–Behnken design. **Biomass Conv. Bioref.**, v. 2, p. 317–325, 2012.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. Química Orgânica. Rio de Janeiro: **LTC - Livros Técnicos e Científicos**. Editora S/A, 2001.

STUART, B. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. Austrália: **John Wiley & Sons** 2004.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. 70th anniversary of biodiesel in 2007: Historical evolution and current situation in Brazil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2068-2071, 2007. a

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformation of triglycerides into fuels, polymers and chemicals: Some applications of catalysis in oleochemistry. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 667-676, 2007. b

TAN, T.; LUA, J.; NIEA, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 628-634, 2010.

TERAO, T.; MAEDA, S.; SAIKA, A. High-resolution solid-state C-13 NMR of polyvinyl-alcohol - Enhancement of tacticity splitting by intramolecular hydrogen-bonds. **Macromolecules**, v. 16, n. 9, p. 1535–1538, 1983.

TOBOLSKY, A. V. MARK, H. F. - ENCYCLOPEDIA OF POLYMER SCIENCE + TECHNOLOGY. **American Scientist**, v. 55, n. 2, 1967.

TUDORACHI, N.; CHIRIAC, A. P. Poly(vinyl alcohol-co-lactic acid)/Hydroxyapatite Composites: Synthesis and Characterization. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 19, n. 2, p. 546-558, 2011.

UNCTAD, CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT. The emerging biofuels market: Regulatory, Trade and Development implications. New York and Geneva: **United Nations Publications**, p. 52, 2006.

UHLRICH, T.; ULBRICHT, M.; TOMASCHEWSKI, G. Immobilization of enzymes in photochemically cross-linked polyvinyl alcohol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 2, p. 124-131, 1996.

VASCONCELLOS, A. D.; SILVA, A. S.; FILHO, R. A. L.; FARIAS, L. A.; GOMES, E.; ARANDA, D. A. G.; NERY, J. G. Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.163, p. 343-355, 2012.

VERDUGO, C.; POSADILLO, A.; SANCHOC, E. A. *et al.* Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. **Catalysis Today**, v. 167, n. 1, p. 107-112, 10 2011.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWAB, J. M.; GRAILLEA, J.; HAASC, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, 2000.

WANG, J.; CHEUNG, M. K.; MI, Y. Miscibility of poly(ethyl oxazoline)/poly(4-vinylphenol) blends as investigated by the high-resolution solid-state C-13 NMR. **Polymer**, v. 42, n. 5, p. 2077-2083, 2001.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *serratia-marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

WU, X. Y.; JAASKELAINEN, S.; LINKO, Y. Y. Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, n. 2, p. 145-158, 1996.

YANG, K. S.; SOHN, J.-H.; KIM, H. K. Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 6, p. 599-604, 2009.

YUCEL, Y.; DEMIRA, C.; DIZGEB, N.; KESKINLERB, B. Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola oil using immobilized lipase. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1496-1501, 2011.

YUSUF, N. N. A. N.; KAMARUDIN, S. K.; YAAKUB, Z. Overview on the current trends in biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 7, p. 2741-2751, 2011.

ZHANG, Y.; DUBÉA, M. A.; MCLEANA, D. D.; KATESB M. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 1-16, 2003.