

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI - ERECHIM
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CÂMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

NÁDIA LIGIANARA DEWES NYARI

**APLICAÇÃO DA LIPASE DE *Candida antarctica* B IMOBILIZADA *IN SITU* EM
POLIURETANO EM REAÇÕES DE SÍNTESE DE ÉSTERES EM SISTEMA LIVRE
DE SOLVENTE**

ERECHIM, RS

2017

NÁDIA LIGIANARA DEWES NYARI

**APLICAÇÃO DA LIPASE DE *Candida antarctica* B IMOBILIZADA *IN SITU* EM
POLIURETANO EM REAÇÕES DE SÍNTESE DE ÉSTERES EM SISTEMA LIVRE
DE SOLVENTE**

**Tese apresentada como quesito para à
obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de
Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos, Departamento de Ciências
Agrárias da Universidade Regional
Integrada do Alto Uruguai e das Missões –
Campus de Erechim.**

**Orientadores: Prof^a Dr. Rogério Marcos
Dallago
Prof^a Dr^a. Jamile Zeni**

ERECHIM, RS

2017

NÁDIA LIGIANARA DEWES NYARI

**APLICAÇÃO DA LIPASE DE *Candida antarctica* B IMOBILIZADA *IN SITU* EM
POLIURETANO EM REAÇÕES DE SÍNTESE DE ÉSTERES EM SISTEMA LIVRE
DE SOLVENTE**

**Tese apresentada como quesito para à
obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de
Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos, Departamento de Ciências
Agrárias da Universidade Regional
Integrada do Alto Uruguai e das Missões –
Campus de Erechim.**

Erechim, março de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Rogério Marcos Dallago, D. Sc.
Universidade Regional Integrada do Alto
Uruguai e das Missões - URI - Erechim - RS
(Orientador)

Jamile Zeni, D. Sc.
Universidade Regional Integrada do Alto
Uruguai e das Missões - URI - Erechim - RS
(Orientadora)

Clarissa Dalla Rosa, D. Sc.
Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Natália Paroul, D. Sc.
Universidade Regional Integrada do Alto
Uruguai e das Missões - URI - Erechim - RS

Ilizandra Aparecida Fernandes, D. Sc.
Universidade Regional Integrada do Alto
Uruguai e das Missões - URI - Erechim - RS

Rosicler Colet, D. Sc.
Instituto Federal do Rio Grande do Sul - IFRS

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA TESE DE DOUTORADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI - ERECHIM.

Dedico esta conquista em especial aos amores da minha vida: meu pai Celi José, minha mãe Maria Cirilei, meu irmão Vanderlei e toda a minha família que me apoiaram e acreditaram nos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A todas as forças do universo...

À minha família, aos meus pais Celi e Maria Cirilei pela motivação e por trazer-me apoio incondicional, meu guia e pilar nos momentos difíceis e por acreditar nos meus sonhos e por tantos momentos de amor, alegria e felicidade.

Ao meu irmão Vanderlei, por acreditar e me apoiar em meu objetivo.

Aos professores Rogério Marcos Dallago e Jamile Zeni, pela valorosa orientação, paciência, compreensão e amizade, mas principalmente, pelos ensinamentos, confiança, apoio e compreensão em todas as vezes que em suas salas fui em busca de uma palavra de incentivo. Obrigado por acreditarem em mim e me induzirem a pensar criticamente.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Erechim, por os conhecimentos compartilhados e amizade.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios de Biotecnologia de Alimentos e Laboratório de Termodinâmica. Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos e o pessoal da Central de Materiais pela disponibilidade

À URI- Erechim, que forneceu todas as ferramentas para a realização deste trabalho.

À FAPERGS pela concessão da bolsa que permitiu a realização dos estudos.

À UFRJ através do projeto PROCAD, pela oportunidade de desenvolver uma parte do trabalho em sua infraestrutura.

À banca examinadora, pela disponibilidade, interesse e valiosas contribuições.

A todos que de uma forma ou de outra, contribuíram e incentivaram para a conclusão deste trabalho.

Meu muito obrigada!

"Nada se obtém sem esforço; tudo se pode conseguir com ele."

(Ralph Waldo Emerson)

RESUMO

O emprego de enzima, livres ou imobilizadas, como catalisadores para a síntese de produtos já é uma realidade e está em constante desenvolvimento. O interesse pela indústria deve-se principalmente ao alto valor dos produtos obtidos biotecnologicamente, uma vez que os mesmos são considerados similares aos naturais, além de poderem ser obtidos em condições brandas e sem o uso de catalisadores químicos. A produção de ésteres por processos biotecnológicos tem aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêuticos e química, demanda de catalisadores específicos e produtivos. A Lipase B de *Candida antarctica* (CALB) apresenta um papel importante, sobretudo quando esta imobilizada em um suporte inerte, de baixo custo, que aumente sua estabilidade em diferentes condições de processo, e que permita sua reutilização. Nesse contexto, o objetivo dessa pesquisa consiste em imobilizar a lipase de *Candida antarctica* B *in situ* em suporte rígido de poliuretano (PU) e verificar a sua aplicação em reações de síntese dos ésteres de acetato de isoamila, butanoato de etila e oleato de etila em sistema de batelada (agitação mecânica e ultrassônica) e de fluxo contínuo, livre de solvente orgânico. A otimização para os sistemas em batelada (mecânica e ultrassônica), foi obtida mediante o emprego do delineamento composto central rotacional (DCCR). O processo de imobilização aplicado apresentou rendimento superior a 1.000%, sendo considerado adequado para o catalisador imobilizado (CALB *in situ* em imobilizada em poliuretano - PU). A maximização da conversão foi apresentada em sistema de agitação em fluxo contínuo, com 95% de conversão para o éster de acetato de isoamila em 24,5 min reacionais e 28 ciclos contínuos de reutilização e 75% de conversão para o éster de oleato de etila em 61,5 min com 26 ciclos. Enquanto para o sistema de agitação em batelada ultrassônica, a conversão para o acetato de isoamila foi de 95% em 60 min reacionais com 13 ciclos contínuos de reutilização, para o oleato de etila de 66% em 15 min com 22 ciclos e para o butanoato de etila com 95% em 180 min com 14 ciclos. E para o sistema de agitação em batelada mecânica a conversão para o acetato de isoamila foi de 94% em 360 min reacionais com 28 ciclos contínuos de reutilização, para o oleato de etila de 58 em 40 min e 28 ciclos e para o butanoato de etila com 96% em 180 min com 16 ciclos. Além disso, com o intuito de aumentar a viabilidade técnica e econômica da utilização do catalisador imobilizado, investigou - se a ativação em alta pressão, empregando fluidos pressurizados de GLP (Gás Liquefeito de Petróleo) e CO₂ (Dióxido de Carbono), a qual considerou a atividade inicial, sem ativação de 789 U/g. A maximização da ativação foi apresentada empregando o fluido de CO₂ com atividade enzimática de 2.261,7 U/g (311% de atividade residual), nessa condição realizou - se a síntese de ésteres de oleato de etila, com conversão de 77% em sistema de agitação batelada ultrassônica em 30 min reacionais e 23 ciclos contínuos de reutilização. Os resultados apresentados nesse estudo, indicaram o grande potencial de utilização do catalisador imobilizado na síntese de ésteres, tanto em sistema batelada (agitação mecânica e ultrassônica) quanto em fluxo contínuo, além de demonstrar a importância da avaliação de diferentes processos quando se busca a otimização da produção de um determinado produto, além, de demonstrar a viabilidade técnica e econômica, minimizando perdas de produtos e ser considerada uma tecnologia “limpa”, sem o emprego de solventes orgânicos e a produção de resíduos industriais, além de possuírem aplicações interessantes em uma vasta gama de processos industriais.

Palavras-chave: Ésteres de Acetato de isoamila. Oleato de etila. Butanoato de etila. Agitação mecânica e ultrassônica. Fluxo Contínuo. Alta pressão.

ABSTRACT

The use of enzymes, free or immobilized, as catalysts for the synthesis of products is a reality and is in constant development. The interest in the industry is due to the high value of the products obtained biotechnologically, since they are considered similar to the natural ones, besides they can be obtained in soft conditions and without the use of chemical catalysts. The production of esters by biotechnological processes has applications in the food, cosmetics, pharmaceutical and chemical industries, the demand for specific and productive catalysts. The lipase from *Candida antarctica* B (CALB) has an important role, especially when this immobilized on an inert support, low cost, to increase its stability under different process conditions, and allows its reuse. In this context, the objective of this study was to immobilize lipase from the *Candida antarctica* B *in situ* in rigid polyurethane (PU) support and verify its application in the synthesis reactions of the esters of isoamyl acetate, ethyl butanoate and ethyl oleate in a batch system (mechanical and ultrasonic agitation) and continuous flow, free of organic solvent. The optimization for batch systems (mechanical and ultrasonic agitation) was obtained using the central rotational compound design (DCCR). The maximization of the conversion was presented in a continuous flow stirring system with 95% conversion to the isoamyl acetate ester in 24.5 min reaction and 28 continuous cycles of reuse and 75% conversion to the ethyl oleate ester in 61.5 min with 26 cycles. The maximum conversion obtained in the ultrasonic batch agitation system for isoamyl acetate was 95% in 60 min reaction with 13 continuous cycles of reuse, 66% in 15 min with 22 cycles for ethyl oleate and 95% in 180 min with 14 cycles for ethyl butanoate. In the mechanical batch stirring system the maximum conversion of isoamyl acetate was 94% in 360 min reaction with 28 continuous cycles of reuse, 58% in 40 min and 28 cycles for ethyl oleate and 96 cycles in 180 min With 16 cycles for ethyl butanoate. In addition, in order to increase the potential for the use of the immobilized catalyst, high-pressure activation was investigated using pressurized LPG fluids (Liquefied Petroleum Gas) and CO₂ (Carbon Dioxide), considering the initial activity of 789 U/g (no activation). The highest enzymatic activity, 2,261.7 U / g (311% residual activity), was obtained when CO₂ fluid was used. Using the enzyme activated with CO₂ in the synthesis of ethyl oleate esters in an ultrasonic batch stirring system, 77% conversion was observed in 30 reaction minutes and 23 continuous cycles of reuse. The results presented in this study indicated the great potential for the use of the immobilized catalyst in the synthesis of esters, both in batch system (mechanical and ultrasonic agitation) and in continuous flow. In addition to demonstrating the importance of evaluating different processes when optimizing the production of a given product.

Keywords: Lipase. Isoamyl acetate. Ethyl oleate. Butanoate of ethyl. Mechanical and ultrasonic agitation. Continuous flow. High pressure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma das etapas realizadas no presente estudo.....	27
CAPÍTULO I	28
Figura 1.1 - Estrutura tridimensional da lipase CALB, com os respectivos resíduos dos aminoácidos do sítio ativo.....	29
Figura 1.2 - Poliuretano Genérico, reação geral de obtenção.....	32
Figura 1.3 - Etapas de formação da espuma de PU.....	33
Figura 1.4 - Esquema genérico de um sistema de banho de ultrassom.....	36
Figura 1.5 - Esquema geral de um reator de fluxo contínuo.....	38
Figura 1.6 - Aparato experimental para reação em fluxo contínuo (Equipamento Asia – Syrris).....	22
Figura 1.7 - Esquema geral da reação de esterificação.....	40
CAPÍTULO II	46
Figura 2.1 - Processo de imobilização da CALB em poliuretano (PU).....	48
Figura 2.2 - Análise de Rohapect® DA6L lipase CALB por SDS-PAGE.....	51
Figura 2.3 - Aspecto da CALB imobilizada <i>in situ</i> em poliuretano (PU): (a) forma integra (b) corte longitudinal e (c) triturado.....	52
Figura 2.4 - Difractogramas de raios X das amostras de poliuretano (PU) (a) e do catalisador imobilizado (b).....	54
Figura 2.5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de poliuretano (PU) (a) e do catalisador imobilizado (b).....	55
Figura 2.6 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras do catalisador imobilizado, após reação de síntese de ésteres: (a) acetato de isoamila e oleato de etila e (b).....	56
Figura 2.7 - Estabilidade de estocagem do catalisador livre (1) e imobilizado (b) submetido a temperaturas de e -80 e -4 a 0 (a), 2 a 8 e 10 a 25°C (b) e nas de 40, 60 e 80°C (c), respectivamente.....	57
CAPÍTULO III	60
CAPÍTULO 3.1	63
Figura 3.1.1 - Fórmula molecular do éster de acetato de isoamila.....	65
Figura 3.1.2 - Coluna de leito fixo empregada no sistema de fluxo contínuo.....	67

Figura 3.1.3 - Evolução da conversão do éster de acetato de isoamila em função do tempo reacional (minutos) empregando catalisador livre e imobilizado para os sistemas em batelada de agitação mecânica e ultrassônica.....	70
Figura 3.1.4 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando catalisador livre para a síntese do éster de acetato de isoamila em sistema de agitação mecânica.....	77
Figura 3.1.5 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) para a síntese do éster de acetato de isoamila para o catalisador imobilizado em sistema de agitação mecânica.....	78
Figura 3.1.6 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado para a síntese do éster de acetato de isoamila em sistema de agitação ultrassônica.....	81
Figura 3.1.7 - Conversão em função do tempo de residência empregando massa de catalisador imobilizado de 0,34 g e 0,660 g pela reação de síntese do éster de acetato de isoamila em sistema de fluxo contínuo.....	83
Figura 3.1.8 - Estabilidade operacional em sistema de agitação mecânica (360 minutos), ultrassônica (60 minutos) e de fluxo contínuo (24,6 minutos) para a síntese de acetato de isoamila.....	88
CAPÍTULO 3.2.....	93
Figura 3.2.1 - Fórmula molecular do éster de oleato de etila.....	95
Figura 3.2.2 - Evolução da conversão do oleato de etila em função do tempo reacional (minutos) empregando catalisador livre e imobilizado para os sistemas em batelada de agitação mecânica e ultrassônica.....	99
Figura 3.2.3 - Gráfico de Pareto empregando o catalisador livre para a síntese de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....	104
Figura 3.2.4 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado para a síntese de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....	106
Figura 3.2.5 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado para a síntese de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.....	109
Figura 3.2.6 - Tempo de residência em função da velocidade de reação empregando o catalisador imobilizado para a síntese do oleato de etila em sistema de fluxo contínuo.....	112
Figura 3.2.7 - Estabilidade operacional para a síntese de oleato de etila em sistema batelada de agitação mecânica (40 minutos), ultrassônica (15 minutos) e de fluxo contínuo (61,5 minutos) para a síntese de oleato de etila.....	115
CAPÍTULO 3.3.....	119

Figura 3.3.1 - Fórmula molecular do éster de éster de butanoato de etila.....	121
Figura 3.3.2 - Evolução da conversão do oleato de etila em função do tempo reacional (minutos) empregando catalisador livre e imobilizado para os sistemas em batelada de agitação mecânica e ultrassônica.....	124
Figura 3.3.3 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador livre para a síntese de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....	132
Figura 3.3.4 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado para a síntese do butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.	133
Figura 3.3.5 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado para a síntese de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.....	137
Figura 3.3.6 - Estabilidade operacional em sistema de agitação mecânica (180 minutos) e ultrassônica (180 minutos) para a síntese de butanoato de etila.....	139
 CAPÍTULO IV	 142
Figura 4.1 - Propriedades críticas dos solventes.....	143
Figura 4.2 - Fluxograma da sequência desta etapa do estudo.....	148
Figura 4.3 - Diagrama esquemático do aparato utilizado na ativação do catalisador imobilizado em fluidos supercríticos.....	149
Figura 4.4 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP.....	157
Figura 4.5 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de CO ₂	162
Figura 4.6 - Evolução da conversão do oleato de etila em função do tempo reacional (minutos) empregando catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP e CO ₂ para a síntese do oleato de etila em sistema de agitação mecânica e ultrassônica.....	164
Figura 4.7 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP para a síntese do oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....	167
Figura 4.8 - Gráfico de Pareto empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de CO ₂ para a síntese de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....	168
Figura 4.9 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP para a síntese do oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.....	173

Figura 4.10 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de CO ₂ para a síntese do oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.....	174
Figura 4.11 - Estabilidade de estocagem empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP e CO ₂	176
Figura 4.12 - Estabilidade operacional empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP e CO ₂ em sistema de agitação mecânica (40 minutos) e ultrassônica (30 minutos) para a síntese de oleato de etila.....	178

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I.....	28
CAPÍTULO II.....	46
Tabela 2.1 - Atividade de esterificação e massa de catalisador na forma livre (CALB livre) e imobilizado (CALB em poliuretano).....	53
CAPÍTULO III.....	60
CAPÍTULO 3.1.....	63
Tabela 3.1.1 - Exemplos de lipases aplicadas na síntese de ésteres de acetato em sistema de agitação mecânica e ultrassônica.....	64
Tabela 3.1.2 - Matriz do DCCR 2² completo empregando catalisador livre e imobilizado em função das variáveis estudadas razão molar (ácido:álcool) e temperatura (°C) para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação mecânica.....	74
Tabela 3.1.3 - Matriz do DCCR 2³ completo empregando o catalisador imobilizado, em função das variáveis razão molar (ácido:álcool), temperatura (°C) e potência ultrassônica (%) para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação ultrassônica.....	79
CAPÍTULO 3.2.....	93
Tabela 3.2.1 - Exemplos de lipases aplicadas na síntese de ésteres de oleato em sistema de agitação mecânica e ultrassônica.....	94
Tabela 3.2.2 - Estudo da razão molar (ácido:álcool) na síntese de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....	101
Tabela 3.2.3 - Matriz do DCCR completo 2² em função das variáveis estudadas massa de catalisador (g) e temperatura (°C) para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....	102
Tabela 3.2.4 - Matriz do DCCR completo 2³ em função das variáveis estudadas temperatura (°C), massa de catalisador (g) e potência ultrassônica (%) para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....	107
CAPÍTULO 3.3.....	119
Tabela 3.3.1 - Exemplos de lipases aplicadas na síntese de ésteres de butanoato em sistema de agitação mecânica e ultrassônica.....	120
Tabela 3.3.2 - Matriz do DCCR completo 2³ empregando o catalisador livre e imobilizado, em função das variáveis estudadas razão molar (ácido:álcool), temperatura (°C) e potência	

ultrassônica (%) para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.....227

Tabela 3.3.3 - Matriz do DCCR 2³ completo empregando o catalisador imobilizado, em função das variáveis estudadas temperatura (°C), razão molar ácido:álcool e potência ultrassônica (%) para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação ultrassônica.....135

CAPÍTULO IV.....142

Tabela 4.1 - Propriedades críticas dos solventes.....143

Tabela 4.2 - Exemplos de enzimas ativadas em fluidos supercríticos.....144

Tabela 4.3 - Matriz do DCCR 2³ completo em função das variáveis estudadas pressão (bar), tempo de reação (minutos) e taxa de despressurização (kg/m³.min) para o catalisador imobilizado ativado em fluído pressurizado de GLP.....154

Tabela 4.4 - Matriz do DCCR 2³ completo em função das variáveis estudadas pressão (bar), tempo de reação (minutos) e taxa de despressurização (kg/m³.min) para o catalisador imobilizado ativado em fluído pressurizado de CO₂.....160

Tabela 4.5 - Matriz do DCCR 2² completo em função das variáveis estudadas temperatura (°C) e massa de catalisador (g) empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP e CO₂ para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....165

Tabela 4.6 - Matriz do DCCR 2³ completo em função das variáveis estudadas temperatura (°C) e massa de catalisador (g) empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP e CO₂ para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.....170

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1.....	218
CAPÍTULO I	
Apêndice 1.1 - Suportes utilizados para imobilização de lipase CALB.....	218
Apêndice 1.2 - Síntese de ésteres submetidos ao sistema de agitação ultrassônica.....	220
Apêndice 1.3 - Síntese de ésteres submetidos ao sistema de fluxo contínuo.....	223
Apêndice 1.4 - Síntese de ésteres por via enzimática.....	224
Apêndice 1.5 - Exemplos de lipases aplicadas na síntese de ésteres de acetato de isoamila e butanoato.....	226
Apêndice 1.6 - Exemplos de lipases aplicadas na síntese de ésteres de oleato.....	228
APÊNDICE 2.....	230
CAPÍTULO II	
Apêndice 2.1 - Aspecto conformacional das espumas de poliuretano formadas empregando diferentes proporções dos monômeros poliol e isocianato, respectivamente, sendo (a) 95 e 5%, (b) 90 e 10%, (c) 75 e 25%, (d) 65 e 35%, (e) 60 e 40%, (f) 50 e 50%, (g) 25 e 75% e (h) 10 e 90%.....	230
APÊNDICE 3.....	230
CAPÍTULO III	
CAPÍTULO 3.1	
Apêndice 3.1.1 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador livre para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação mecânica.....	230
Apêndice 3.1.2 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta análise de variância empregando o catalisador livre para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação mecânica.....	230
Apêndice 3.1.3 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação mecânica.....	231
Apêndice 3.1.4 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação mecânica.....	231

Apêndice 3.1.5 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação ultrassônica.....231

Apêndice 3.1.6 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação ultrassônica.....231

CAPÍTULO 3.2

Apêndice 3.2.1 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....232

Apêndice 3.2.2 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....232

Apêndice 3.2.3 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.....232

Apêndice 3.2.4 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.....232

CAPÍTULO 3.3

Apêndice 3.3.1 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador livre para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.....233

Apêndice 3.3.2 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta análise de variância empregando o catalisador livre para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.....233

Apêndice 3.3.3 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.....233

Apêndice 3.3.4 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.....234

Apêndice 3.3.5 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2 ³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de <i>p</i> e <i>t</i> empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação ultrassônica.....	234
Apêndice 3.3.6 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2 ³ completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação ultrassônica.....	234
APÊNDICE 4	235
CAPÍTULO IV	
Apêndice 4.1 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2 ³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de <i>p</i> e <i>t</i> empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP.....	235
Apêndice 4.2 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2 ³ completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP.....	235
Apêndice 4.3 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2 ³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de <i>p</i> e <i>t</i> empregando o catalisador imobilizado ativado com CO ₂	235
Apêndice 4.4 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2 ³ completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado ativado com CO ₂	236
Apêndice 4.5 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2 ³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de <i>p</i> e <i>t</i> empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....	236
Apêndice 4.6 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2 ³ completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.....	236
Apêndice 4.7 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2 ³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de <i>p</i> e <i>t</i> empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.....	236
Apêndice 4.8 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2 ³ completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.....	237

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem	DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional
ΣA - Área total do pico do branco	DRX - Difração de Raio X
ΣA - Área total de picos entre os padrões	EITF - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
ΣA - Área total do pico da amostra	FID - detector de ionização de chama
°C - Graus Celsius	FSP - Fluidos supercríticos pressurizados
μL - Microlitros	Fluidos supercríticos pressurizados – Fluidos pressurizados – Fluidos supercríticos – Meio pressurizado
ARR - Atividade residual relativa (%)	g - Gramas
AEE total teórica (U_T) - Atividade enzimática de esterificação total teórica (U_T)	g/mol - peso molecular
AEE total experimental ($U_{TExp.}$) - Atividade enzimática de esterificação total experimental ($U_{TExp.}$)	GLP - Gás Liquefeito de Petróleo
AEE total oferecida ($U_{To.}$) - Atividade enzimática de esterificação total da solução enzimática para imobilização ($U_{To.}$)	h - Horas
AEE específica (U/mg^{-1}) - Atividade enzimática de esterificação específica (U/mg^{-1})	H2 - gás de arraste (56 kPa) P - Pressão
Agitação mecânica - shaker	HPL - Lipase de pâncreas do porco
C - Conversão (%)	Imobilizado - Lipase CALB imobilizada <i>in situ</i> em poliuretano (PU)
CALB - Lipase <i>Candida antarctica</i> tipo B	K - temperatura crítica
CALB em PU - CALB imobilizada <i>in situ</i> em Poliuretano – Catalisador imobilizado	Kg/L - densidade
Cei - Concentração (mg/mL) da solução de padrão interno	LCR - Lipase <i>Cândida rugosa</i>
CG - Cromatografia Gasosa	Lipase <i>Candida antarctica</i> L - Lipozyme
CO ₂ - Dióxido de Carbono	CALB L Lipase <i>Rhizopus oligosporus</i> - NRRL 5905
CRL - Lipase <i>Candida rugosa</i>	Lipozyme TL IM - Lipase <i>Rhizomucor miehei</i> -
d - Dias	Lipozyme TL IT - Lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i> -
	LPS - Lipase de <i>Pseudomonas sp.</i>
	M - Molaridade da solução de NaOH

MEL - Peso da CALB livre imobilizada em PU	t - tempo (minutos)
MEI - Peso da CALB imobilizada em PU	U - Unidade de atividade enzimática de esterificação
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura	U imobilizado - Atividade enzimática de esterificação do imobilizado
Mg - Miligramas	U inicial - Atividade enzimática de esterificação no tempo 0
mL - Mililitros	U/g - Atividade de enzimática - esterificação
Mpa - Pressão crítica	UX - Atividade enzimática de esterificação após ciclos de reutilização
NaOH - Hidróxido de Sódio	Va - Volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos (mL)
NCO - Isocianato	Vb - Volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL)
Novozym 435 - Novozym 435 (CALB)	% - Porcentagem
OH - Hidroxila	Vei - Volume da solução de padrão interna adicionada a amostra
Padrão interno - heptadecanoato de metila	Vc - Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL)
pH - Potencial de hidrogênio iônico	Vf - Volume final de meio reacional (mL)
Potência ultrassônica - agitação ultrassônica (% - 132 W)	W - Whats
PPL - Lipase pancreática	
PU - Poliuretano	
R ² - Coeficiente de correlação	
RI - Rendimento da atividade enzimática de esterificação do imobilizado (%)	
Rpm - Rotação por minuto	
T - Temperatura (°C)	

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE APÊNDICES.....	xxvi
LISTA DE ABREVEIATURAS E SIGLAS.....	xix
SUMÁRIO.....	xxi
INTRODUÇÃO.....	24
OBJETIVO GERAL.....	25
Objetivos Específicos.....	25
ESTRUTURA DO ESTUDO.....	26
 CAPÍTULO I.....	 28
1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	28
1.1 LIPASE DE <i>Candida antarctica</i> B (CALB).....	28
1.1.1 Aplicações Industriais.....	29
1.2 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE CALB.....	30
1.2.1 Suporte de espuma rígida de poliuretanos (PU).....	32
1.2.2 Imobilização da CALB em poliuretanos (PU).....	34
1.2.2.1 Imobilização por confinamento.....	35
1.3 SISTEMA DE AGITAÇÃO ULTRASSÔNICA.....	35
1.4 SISTEMA DE FLUXO CONTÍNUO.....	38
1.5 SÍNTESE DE ÉSTERES.....	40
1.6 REAÇÕES EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE.....	44
1.7 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS.....	45
 CAPÍTULO II.....	 46
2. IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO CATALISADOR IMOBILIZADO.....	46
2.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
2.2.1 Determinação do perfil molecular por eletroforese (SDS-PAGE) da lipase comercial CALB.....	48
2.2.2 Imobilização <i>in situ</i> da CALB em poliuretano (PU).....	47
2.2.3 Determinação da atividade enzimática específica.....	48

2.2.4 Imobilização <i>in situ</i> da lipase CALB em poliuretano (PU).....	48
2.2.5 Caracterização do catalisador imobilizado.....	50
2.2.6 Avaliação da estabilidade de estocagem.....	50
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
2.3.1 Perfil proteico e determinação do peso molecular da CALB.....	51
2.3.2 Imobilização da CALB em Poliuretano (PU).....	52
2.3.3 Caracterização do imobilizado.....	54
2.3.4 Avaliação da estabilidade de estocagem	56
2.4 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS.....	59
 CAPÍTULO III.....	 60
3. SÍNTESE DE ÉSTERES.....	60
3.1 ACETATO DE ISOAMILA.....	63
3.1.1 Materias e Métodos.....	65
3.1.2 Síntese do éster acetato de isoamila.....	65
3.1.3 Resultados e Discussões.....	69
3.1.4 Considerações Parciais.....	91
3.2 OLEATO DE ETILA.....	93
3.2.1 Materias e Métodos.....	95
3.2.2 Síntese do éster oleato de etila.....	95
3.2.3 Resultados e Discussões.....	98
3.2.4 Considerações Parciais.....	117
3.3 BUTANOATO DE ETILA.....	119
3.3.1 Materias e Métodos.....	121
3.3.2 Síntese do éster butano de etila.....	121
3.3.3 Resultados e Discussões.....	124
3.3.4 Considerações Parciais.....	141
 CAPÍTULO IV.....	 142
4. ATIVAÇÃO ENZIMÁTICA COM FLUÍDOS SUPERCRÍTICOS.....	142
4.1 Materias e Métodos.....	148
4.2 Ativação do catalisador imobilizado em fluídos supercríticos.....	148
4.3 Síntese de éster de oleato de etila.....	151
4.4 Resultados e Discussões.....	153

4.5 Considerações Parciais.....	179
CAPÍTULO V.....	181
5. CONCLUSÕES.....	181
CAPÍTULO VI.....	184
6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	184
CAPÍTULO VII.....	185
7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	185
CAPÍTULO VIII.....	218
8. APÊNDICES.....	218

1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas a nível industrial é crescente, devido ao aumento da preocupação com questões ambientais, qualidade do produto e redução de custos. Dentre as enzimas mais utilizadas está a lipase, que é um excelente biocatalisador para vários tipos de reações, tais como hidrólise, esterificação e transesterificação, apresentando uma elevada especificidade e seletividade, além de reduzir significativamente a produção de reações indesejáveis (DALLA VECCHIA et al., 2004; ANDUALEMA e GENESSESSE, 2012; SHARMA e KANWAR, 2014; SCHREIBER et al., 2017).

A sua versatilidade conduz a várias aplicações industriais, como na indústria farmacêutica, de cosméticos, de detergentes, de couro, médica, química, tratamento de efluentes e principalmente na indústria de alimentos, entre outros (BRUSAMARELO et al., 2010; MENDES et al., 2011a,b; XIAO et al., 2015; TRBOJEVIĆ IVIĆ et al., 2016; FILICE et al., 2017).

A lipase comercial de *Candida antarctica* B (CALB) pode ser utilizada em condições brandas, permitindo um menor consumo energético, evitando a degradação ou decomposição de produtos e reagentes. No entanto, por se tratar de uma enzima, a mesma, é suscetível à inativação (por inibição ou desnaturação) por fatores físicos (temperatura, pressão, choque mecânica) ou químicos (interação de compostos com a enzima) (MENDES et al., 2011a,b; IDRIS e BUKHARI, 2012; NYARI et al., 2016; PUSKAS et al., 2017; SCHREIBER et al., 2017).

Uma das formas encontradas para minimizar a inativação, e até mesmo eliminar alguns destes problemas, possibilitando assim sua aplicação industrial, é a imobilização, a qual a torna mais estável e ativa, permitindo a reutilização e facilidade de separação do produto do meio reacional, bem como sua aplicação em fluxo contínuo (IDRIS e BUKHARI, 2012; WANG et al., 2012; RANGEL et al., 2015).

As técnicas de imobilização, assim como as condições empregadas durante a imobilização (tipo de suporte, natureza do solvente), podem influenciar nas propriedades dos catalisadores imobilizados (CHEN et al., 2012; WANG et al., 2012; BARBOSA et al., 2015; ZHANG et al., 2015). No que se refere a suportes, o poliuretano (PU) vem se destacando, devido a sua versatilidade de síntese (suas propriedades podem ser influenciadas pelo tipo de isocianatos e polióis utilizados no processo de polimerização), estando seu desempenho diretamente relacionado com sua densidade, resistência e flexibilidade, oriundos do tipo e

proporção de polímero empregado (CADENA et al., 2010; LIU et al., 2016; NYARI et al., 2016; SCHREIBER et al., 2017).

Outra característica relevante é que o PU permite a incorporação da enzima *in situ* na etapa de polimerização do suporte, como demonstrado em trabalho pioneiro pelo grupo de pesquisa (NYARI et al., 2016), permitindo assim a agregação de toda a enzima oferecida ao suporte. Além disto, a elevada presença de grupos funcionais nos monômeros (hidroxila, cianato (OCN-) e isocianatos) ampliam as possibilidades de ocorrerem interações químicas entre a enzima e suporte, aumentando a estabilidade em relação à lixiviação (BUSTAMANTE-VARGAS et al., 2015; GROVER et al., 2016).

No que tange o processo produtivo de ésteres, um dos principais fatores a ser considerado é o arranjo reacional empregado na etapa da síntese, o qual envolve desde a homogeneização do sistema até a obtenção do produto final (MACHADO et al., 2014; MATTE et al., 2016).

Face ao exposto, torna-se necessário o desenvolvimento de estudos, além da imobilização de enzimas, visando potencializar a atividade catalítica da mesma, referente aos efeitos dos arranjos reacionais (batelada e fluxo contínuo), empregando diferentes técnicas de agitação (mecânica e ultrassônia) na condução do processo reacional, bem como do efeito de tratamento em fluidos pressurizados sobre a ativação da enzima, visando sua utilização na síntese de diferentes ésteres.

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da lipase comercial de *Candida antartica* B (CALB) imobilizada *in situ* em suporte rígido de Poliuretano (PU) na síntese de ésteres em sistema em batelada de agitação mecânica e ultrassônica e de fluxo contínuo, livre de solvente orgânico.

Objetivos Específicos

A partir do objetivo geral, alguns objetivos específicos foram traçados:

- Determinar o perfil molecular por eletroforese (SDS-PAGE) da lipase comercial CALB;
- Avaliar o processo de imobilização em termos de atividade enzimática de esterificação (U/g) e de rendimento (%);
- Caracterizar o suporte de poliuretano (PU puro) e o catalisador imobilizado (lipase

- comercial de *Candida antarctica* B - CALB imobilizada em poliuretano – PU) de acordo com a densidade aparente e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a estabilidade de estocagem do catalisador imobilizado;
 - Otimizar o processo em sistema batelada submetido à agitação de mecânica, na conversão (%) de ésteres de acetato de isoamila, butanoato de etila e oleato de etila, empregando o catalisador livre e imobilizado em sistema livre de solvente;
 - Otimizar o processo em sistema batelada submetido à agitação ultrassônica, na conversão (%) de ésteres de acetato de isoamila, butanoato de etila e oleato de etila, empregando o catalisador imobilizado em sistema livre de solvente;
 - Otimizar o processo em sistema em fluxo contínuo na conversão (%) de ésteres de acetato de isoamila, butanoato de etila e oleato de etila, empregando o catalisador imobilizado em sistema livre de solvente;
 - Avaliar a estabilidade operacional do catalisador imobilizado na síntese de ésteres em sistema de agitação em batelada (mecânica e ultrassônica) e de fluxo contínuo;
 - Otimizar o processo de ativação do catalisador imobilizado (CALB imobilizada em poliuretano PU), empregando fluidos pressurizados de Dióxido de carbono (CO₂) e Gás Liquefeito de Petróleo (GLP);
 - Otimizar o processo de síntese de éster de oleato de etila empregando o catalisador imobilizado ativado em fluidos pressurizados de CO₂ e GLP em sistema de agitação mecânica e ultrassônica.
 - Avaliar a estabilidade de estocagem e operacional catalisador imobilizado ativado em fluidos pressurizados de CO₂ e GLP.

ESTRUTURA DO ESTUDO

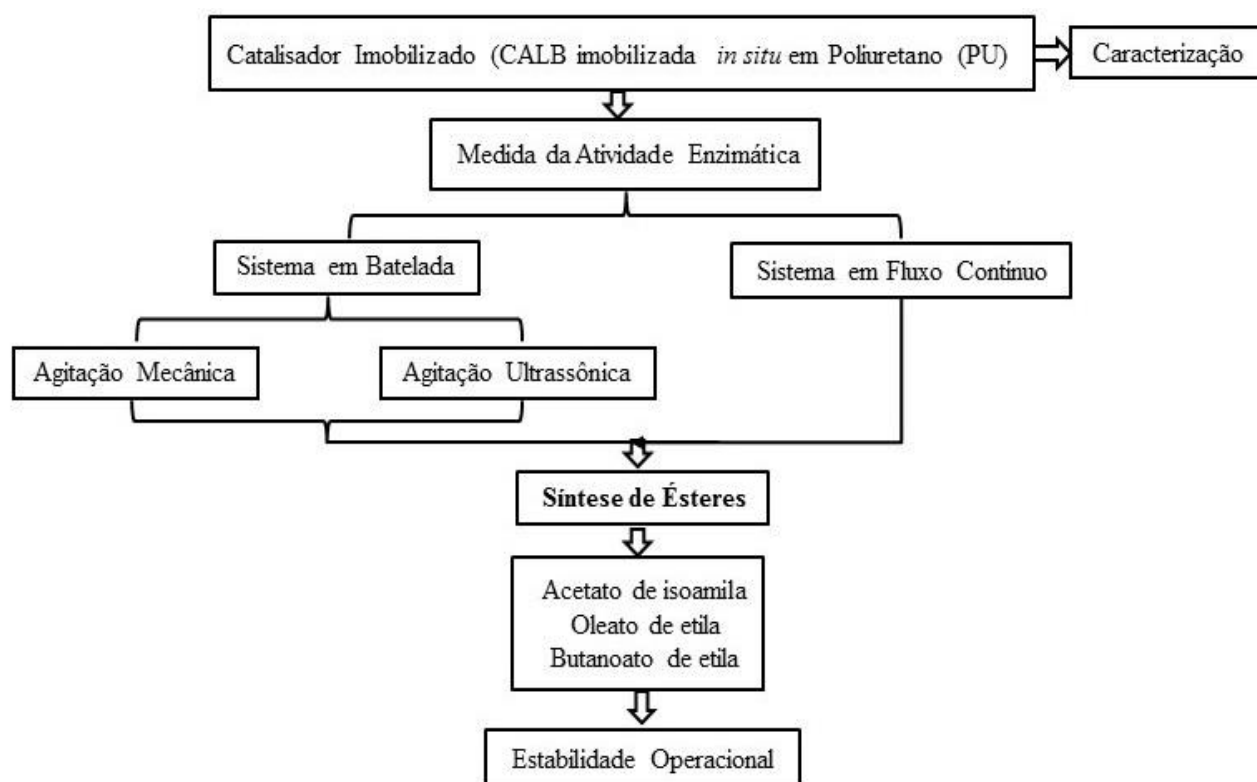
O presente estudo foi dividido em capítulos de acordo com os assuntos abordados.

- Capítulo 1 apresenta a revisão da literatura acerca dos temas relevantes ao desenvolvimento deste estudo.
- Capítulos 2, 3 e 4 expõem uma breve introdução, objetivos específicos, metodologia, resultados discussões e as considerações parciais pertinentes.
 - O capítulo 2: o processo de imobilização e caracterização do catalisador imobilizado (CALB imobilizado em PU) e seu comportamento perante a estabilidade de estocagem em diferentes temperaturas.

- O capítulo 3: a aplicabilidade do catalisador imobilizado na síntese dos ésteres. Os subcapítulos 3.1, 3.2 e 3.3 apresenta a síntese de ésteres de acetato de isoamila, oleato de etila e butanoato de etila, respectivamente, em sistema em batelada de agitação mecânica e ultrassônica e de fluxo contínuo, livre de solvente orgânico.
- O capítulo 4: a importância da utilização de fluidos pressurizados na ativação de enzimas e uma provável aplicação na síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica e ultrassônica.
- O capítulo 5 evidencia as conclusões do estudo.
- O capítulo 6 enumera as sugestões para trabalhos futuros.
- O capítulo 7 exibem as referências bibliográficas consultadas ao longo do presente estudo.
- O capítulo 8 traz os apêndices do presente estudo.

A Figura 1 apresenta o fluxograma das etapas realizadas no presente estudo.

Figura 1 - Fluxograma das etapas realizadas no presente estudo.



CAPÍTULO I

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 LIPASE DE *Candida antarctica* B (CALB)

No imenso universo das enzimas, a família das lipases (E.C.3.1.1.3) destaca-se pela sua elevada atividade e seletividade, além de possuírem estabilidade relativamente elevada e não necessitarem de cofatores dispendiosos, por operarem em condições de temperatura, pH e pressão relativamente moderadas e, principalmente, por proporcionam uma grande variedade de reações de bioconversão, tais como de hidrólise, esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise, acidólise e aminólise (DALLA VECCHIA et al., 2004; ANDUALEMA e GENESSESSE, 2012; SHARMA e KANWAR, 2014; NYARI et al., 2016; SCHREIBER et al., 2017).

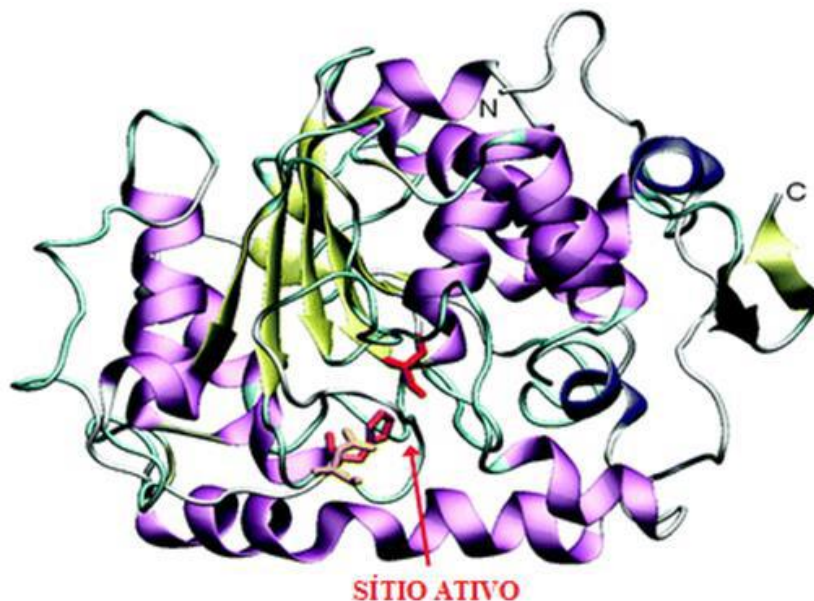
Dentre as lipases, a de *Candida antarctica* B (CALB) tem se destacado no cenário científico na última década. Seu emprego como biocatalisador tem aumentado constantemente, sendo considerada nos últimos anos, uma das enzimas mais amplamente utilizadas e estudadas (LIU et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2016; ČOROVIĆ et al. 2017).

A lipase de *Candida antarctica* B (CALB) possui estrutura α/β hidrolase globular, constituída por 317 resíduos de aminoácidos com massa molar de 33.273 KDa, e apesar de não ser específica, é mais termoestável com pH ótimo entre 7 e 8.

Sendo que valina, leucina, isoleucina, glicina e alanina correspondem a 40,1% de sua sequência proteica, serina e treonina constituem 18,3%. Os 41,6% dos aminoácidos restantes são constituídos por ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glutamina (15,8%), prolina (9,46%); triptofano, tirosina e fenilalanina (7,6%); arginina, lisina e histidina (5,6%), cisteína e metionina (3,15%). O seu sítio ativo é composto pela tríade catalítica (Ser 105 - His 187 - Asp 224), serina, histinina e ácido aspártico (UPPENBERG et al., 1994 e 1995).

A estrutura tridimensional da CALB e seus respectivos resíduos de aminoácidos do sítio ativo são demonstrados na Figura 1.1 (RAMIREZ, 2013). Pode se observar que a sequência ao redor do resíduo de aminoácidos tem alta similaridade com a sequência consensual. A primeira glicina conservada é substituída por treonina, gerando TWSQG na CALB. Como na sequência inteira só existe uma histidina, é fácil localizar o sítio ativo. No entanto, os resíduos de ácido aspártico e glutâmico não puderam ser identificados pela sequência e sim pela estrutura cristalina (KLÄHN et al., 2011; COSTA, 2014).

Figura 1.1 - Estrutura tridimensional da lipase CALB, com os respectivos resíduos dos aminoácidos do sítio ativo.



*Onde: Resíduos dos aminoácidos: Ser 105 (vermelho), His 224 (laranja) e Asp 187 (amarelo).

Fonte: RAMIREZ (2013) (adaptado).

A estrutura parece ser uma conformação "aberta", com uma entrada bastante restrita ao sítio ativo, o que provavelmente explica a especificidade de substrato, flexibilidade e elevado grau de estereoespecificidade desta lipase. Essa ativação interfacial pode ser explicada pela abertura de uma estrutura de tampa que forma α 5 (141-147: AGPLDAL) e α 10 (280-288: PAAAAIVAG), composta de um canal hidrofóbico no seu centro, com resíduos catalíticos clássicos no seu interior (UPPENBERG et al., 1994 e 1995; VENTURA et al., 2011; GANJALIKHANY et al., 2012; RAMIREZ, 2013), contudo, na parte superior do sítio ativo há apenas uma pequena área hidrofóbica (UPPENBERG et al., 1994), o que favorece a CALB a não formar bioagregados.

1.1.1 Aplicações industriais da CALB

A aplicação da CALB como biocatalisadores vem conquistando uma faixa crescente do mercado industrial, principalmente em processos industriais (DALLA VECCHIA et al., 2004; GOTOR-FERNÁNDEZ e VICENTE, 2007; BRÍGIDA et al., 2008; LEE et al., 2010; SUN et al., 2010; SHARMA et al., 2011; KAPOOR e GUPTA, 2012; MÜLLER e FREY, 2012; NYARI et al., 2016; PUSKAS et al., 2017; SCHREIBER et al., 2017).

Este fato se dá principalmente em função da possibilidade de reverter sua forma de atuação em meio orgânico em reações de esterificação e interesterificação. Tais reações são

de extrema importância para o desenvolvimento de novas rotas de processo e para obtenção de produtos novos ou conhecidos a custos mais competitivos, ampliando simultaneamente seu potencial de aplicação (CASTRO et al., 2004; IDRIS e BUKHARI, 2012; KHAN et al., 2015; SCHREIBER et al., 2017).

Na indústria, as lipases são empregadas principalmente para a geração de bens de consumo (BRUSAMARELO et al., 2010; PAROUL, 2011; SALIHU et al., 2012; MENDES et al., 2011a,b; ALVES et al., 2014; ALVES et al., 2015; LI et al., 2015; JIN et al., 2015; RAVELO et al., 2015; XIAO et al., 2015; BRASK e NULSEN, 2016; KERM et al., 2016; SERRANO - ARNALDOS et al., 2016; ČOROVIĆ et al., 2017; MEHRASBI et al., 2017; MOLINA-GUTIÉRREZ et al., 2017), tais como:

- o **Indústria de Alimentos:** Síntese de ésteres, empregados como aromas, emulsificantes, esfoliantes e agentes flavorizantes; síntese de vitaminas (solúveis em óleo) para adição em produtos alimentícios; modificação de gorduras; esterificação de açúcares, manufatura de fermento e queijo, biossensores, entre outros.
- o **Indústria Química:** Transesterificação de óleos vegetais, remoção de manchas/gordura, pre-tratamento de efluentes oriundos de abatedouros e indústrias de laticínios e síntese de ésteres (biodiesel, aromas e emulsificantes).
- o **Indústria Médica:** Dosagem de triglicerídeos do sangue e resolução enantioseletiva: Kits diagnósticos (R, S) - ibuprofeno e (R,S)-naproxeno.
- o **Indústria de Cosméticos:** Síntese de ésteres: Fragância para perfumes.

1.2 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE CALB

As aplicações citadas anteriormente são frequentemente limitadas em termos de estabilidade, e também por dificuldades na recuperação e reuso do biocatalisador. O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador facilmente recuperável, assegurando o seu reuso e com isso, minimizando o custo de separação dos produtos e o inconveniente econômico associado ao seu uso. Paralelamente é necessário a manutenção de sua atividade, bem como suas propriedades cinéticas e especificidade, além de proporcionar ampliação de suas condições operacionais relacionadas a valores de pH, temperatura e estocagem, bem como de suas propriedades mecânicas favoráveis, em comparação à sua forma livre (PEREIRA et al., 2010; CHEN et al., 2012; WANG et al., 2012; CHEN et al., 2014; PEIRCE et al., 2016; HE et al., 2017).

Em alguns casos a imobilização pode inibir ou aumentar a atividade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (CHEN et al., 2012; SILVA et al., 2012a; POOJARI e CLARSON, 2013; GUAJARDO et al., 2015; MA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016). Além de ser uma excelente abordagem para química verde, aumentando a possibilidade de redução do custo do processo e da quantidade necessária desses biocatalisadores (GUAJARDO et al., 2015; NYARI et al., 2016; SCHREIBER et al., 2017).

As técnicas e as condições empregadas durante a imobilização, o tipo de suporte, a natureza do solvente e as variações de reatores podem influenciar nas propriedades finais do imobilizado (enzima + suporte). No Apêndice 1.1 são apresentados alguns suportes utilizados para imobilização de lipase CALB.

Não há um suporte universal para todas as enzimas e suas aplicações, mas um número de características desejáveis comuns deve existir, pois a imobilização ainda é um desafio complexo, uma vez que a extensão da imobilização depende da estrutura da enzima, método de imobilização e do tipo de suporte (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Assim, para que o emprego de lipase CALB imobilizada torne-se um processo economicamente viável é necessário levar em conta à escolha das características do suporte para imobilização como: resistência mecânica e microbiana, estabilidade térmica, funcionalidade química, caráter hidrofóbico ou hidrofílico, facilidade de regeneração, morfologia (porosidade), afinidade, presença de grupos funcionais para modificações químicas, força iônica, estabilidade física e química, capacidade de adsorção de enzima, força mecânica, regenerabilidade, interação irreversível, custo, hiperativação e reutilização (PEREIRA et al., 2010; IDRIS e BUKHARI, 2012; MENDES et al., 2013; KHAN et al., 2015).

O suporte também deve impor a menor quantidade de limitações, seja física ou química, para a ocorrência da reação, permitindo assim o acesso da enzima aos substratos, mantendo sua atividade por um longo período e permitindo que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, preferencialmente sem perdas na atividade enzimática (DALLA-VECCHIA et al., 2004; PEREIRA et al., 2010; MENDES et al., 2011b; IDRIS e BUKHARI, 2012; MENDES et al., 2013; GUAJARDO et al., 2015; KHAN et al., 2015; MA et al., 2016; SCHREIBER et al., 2017).

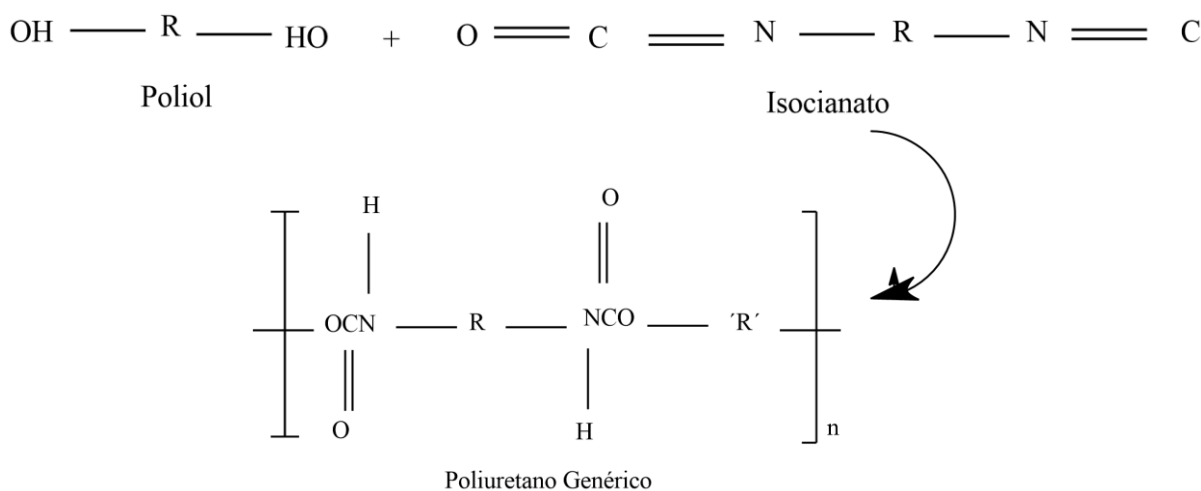
A utilização de um método de imobilização rápido, fácil, de baixo custo e que apresente resistência a solventes orgânicos aumentaria e facilitaria a aplicação da lipase. Dentro deste

contexto, as espumas de poliuretano (PU) demonstraram, em estudos recentes, ser um suporte a ser avaliado (NYARI et al., 2016).

1.2.1 Suporte de espuma rígida de poliuretano (PU)

Os poliuretanos podem ser definidos como um material sintético, obtidos através de reações químicas entre substâncias de origem mineral e petroquímica, se encontrando geralmente na forma líquida, e quando misturados reagem entre si dando origem a um material composto de grupos hidroxilas e ligações cruzadas, criando uma célula (espuma) rígida (VILAR, 2016). Uma espuma de poliuretano é formada basicamente pela reação de adição entre um isocianato (composto que contém o grupo $[-N=C=O]$) e um hidrogênio ácido (H^+), como o existente nos polióis, sendo a mesma normalmente de caráter exotérmica. A Figura 1.2 apresenta a reação genérica de formação do poliuretano.

Figura 1.2 - Poliuretano genérico, reação geral de obtenção.



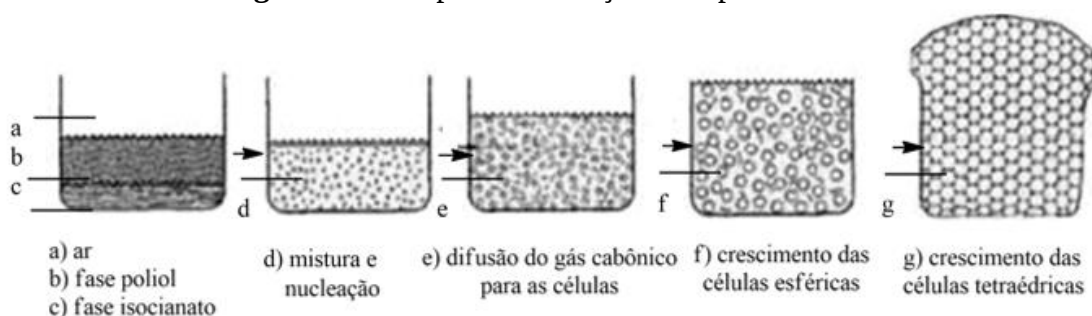
Fonte: VILAR (2016).

A reação de adição ocorre através da dupla ligação $C=N$ presente no isocianato. A reação ocorre entre um isocianato e um composto que contenha o grupo $-OH$ (hidroxila), formando ésteres carbônicos, denominados uretanos (CADENA et al., 2010). Na síntese do PU normalmente faz-se o emprego de outros reagentes (com dois ou mais grupos de hidrogênio reativos) como: água, agentes de cura ou extensores de cadeia, contendo dois ou mais grupos reativos; catalisadores; agentes de expansão; surfactantes; cargas; agente antienvelhecimento; corantes e pigmentos; retardantes de chama; desmoldantes; etc. (SANTOS et al., 2012; VILAR, 2016).

Segundo Shelke et al. (2014), os poliuretanos (PU) têm sido utilizados devido a sua versatilidade e por apresentarem propriedades mecânicas e biológicas diversas, passíveis de serem alteradas em função da composição dos constituintes empregados durante a sua síntese. Merece destaque também sua durabilidade, flexibilidade e bioestabilidade, fazendo com que os PUs ocupem posição importante no mercado mundial de polímeros sintéticos de alto desempenho (GUNCHEVA et al., 2011; GROVER et al., 2016).

A formação da espuma de PU ocorre em duas fases, à primeira fase é de dispersão dos reagentes, onde o primeiro passo no processo de espumação consiste em compatibilizar vários ingredientes, alguns dos quais imiscíveis. Em seguida, ocorre a segunda fase, a de nucleação, onde as bolhas de ar são introduzidas durante a etapa de mistura dos reagentes (VILAR, 2016). A Figura 1.3 apresenta as etapas de formação da espuma de poliuretano.

Figura 1.3 - Etapas de formação da espuma de PU.



Fonte: VILAR (2016).

Na ausência do emprego de um surfactante o volume de ar introduzido é muito pequeno, fazendo com que haja poucas bolhas, ocorrendo aumento da tensão superficial do surfactante e do volume dos núcleos de ar, diminuindo assim a tendência do gás em difundir, resultando assim em uma espuma com células mais uniformes e melhor distribuídas. A reação entre água e isocianato produz gás carbônico simultaneamente com calor, vaporizando o agente de expansão, proporcionando o crescimento da espuma durante a polimerização (GUNCHEVA et al., 2011; NYARI et al., 2016).

1.2.2 Imobilização da CALB em poliuretano (PU)

A imobilização de enzimas em espumas flexíveis de poliuretano é um método muito simples, que pode aumentar a atividade, estabilidade e principalmente o reuso das enzimas. Devido às propriedades mecânicas inerentes ao suporte formado, o processo de imobilização em PU tende a influenciar positivamente nos custos do processo, uma vez que permite a

reutilização da enzima por vários ciclos reacionais (SILVA et al., 2013a; CHIARADIA et al., 2016; GROVER et al., 2016; NYARI et al., 2016; SCHREIBER et al., 2017).

O sucesso e a eficiência da incorporação de uma enzima em um suporte dependem de vários parâmetros, tais como: tipo de suporte, área superficial do suporte, processo de incorporação, tamanho da proteína a ser adsorvida, concentração enzimática desejada e insolubilidade enzimática. As condições devem ser selecionadas de acordo com o mecanismo de imobilização proposto ou desejado (adsorção, encapsulamento ou mediante ligações químicas), visando sempre manter a integridade estrutural do sítio ativo, bem como sua estabilidade da proteína (SUSLA et al., 2007).

Segundo García-Arrazola et al. (2009) e Cadena et al. (2010) a imobilização em PU deve ocorrer, preferencialmente, pelo método de confinamento (inclusão de matriz), que consiste no aprisionamento das moléculas de enzimas entre as malhas do polímero, criando uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa, onde as moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, difundem-se facilmente através desta malha. Durante o processo de imobilização, devido à composição química dos monômeros, os quais apresentam diversos grupos funcionais reativos frente à estrutura composicional da enzima, podem ocorrer, concomitantemente ao confinamento, ligações químicas, covalente ou iônicas, entre a enzima e o suporte, favorecendo a fixação da mesma ao suporte (NYARI et al., 2016).

Estudos recentes desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram a potencialidade do emprego do poliuretano como suporte para diferentes enzimas (FERNANDES, 2013; SILVA, 2013; NYARI et al., 2015; BUSTAMANTE - VARGAS et al., 2016; NYARI et al., 2016; NYARI et al., 2017). Cabe salientar que o método empregado, diferentemente do referenciado por outros autores, que fazem uso da adsorção como mecanismo principal, o método desenvolvido pelo grupo faz a incorporação da enzima *in situ* durante a etapa de imobilização, mediante diluição prévia da mesma no monômero poliols.

Esta metodologia, pioneira neste aspecto, permite a agregação de toda a enzima oferecida na etapa de imobilização. Além disto, independente da enzima empregada no processo, às pesquisas demonstraram que o processo proporciona um aumento significativo no rendimento de imobilização, bem como na estabilidade operacional (NYARI et al., 2015; BUSTAMANTE - VARGAS et al., 2016; NYARI et al., 2016).

1.2.2.1 Imobilização por Confinamento

Inúmeros métodos de imobilização têm sido descritos na literatura e investigados para contornar os possíveis problemas de instabilidade das enzimas e otimizar suas aplicações (MENDES et al., 2013). Além disso, diferentes técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer estabilidade às enzimas, facilitar a sua recuperação e reutilização (GARCÍA-ARRAZOLA, et al., 2009; MENDES et al., 2013).

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do imobilizado, características de regeneração e desativação, custo do procedimento, toxicidade dos reagentes e propriedades finais desejadas (DALLA-VECCHIA et al., 2004; MENDES et al., 2011b; MENDES et al., 2013).

O método de imobilização por confinamento aplicado em nosso estudo, trata – se de um método onde a enzima é adicionada no momento de preparação ou formação do suporte (polimerização), onde seu interior consiste na formação de uma matriz porosa envolvendo enzima em uma estrutura tridimensional, podendo ocorrer ligações covalentes (formação de uma ligação dita ‘forte’ (estável) entre os grupos funcionais presentes na superfície da enzima e do suporte, a qual não permite que a molécula de enzima se desprenda do suporte em presença do substrato.

A vantagem mais significativa desse processo, é a ocorrência de grande uma área superficial de contato ocorrida entre o substrato e a enzima no interior do suporte. No entanto existem algumas desvantagens que devem ser levadas em consideração, como a possível inativação da enzima durante o processo de imobilização, como inibição por produtos no interior da matriz e a alta concentração de enzima necessária (DALLA-VECCHIA et al., 2004; MENDES et al., 2011a).

1.3. SISTEMA DE AGITAÇÃO ULTRASSÔNICA

O interesse na utilização de ultrassom em processos biotecnológicos deve-se, principalmente, ao fato de sua aplicação tender em acelerar as velocidades com que as reações (sejam químicas ou biológicas) se processam. No caso das reações enzimáticas, constatou-se também um aumento em suas eficiências catalíticas em comparação com as técnicas convencionais normalmente utilizadas (BATISTELLA et al., 2012a; MATTE et al., 2016).

O sistema ultrassônico, seja na forma de banho ou sonda, são basicamente aparelhos geradores de ondas ultrassônicas, tendo como fonte de energia uma cerâmica disposta entre duas chapas metálicas, denominado sistema de transdutor piezoelétrico. O sinal gerado pelas

chapas é levado à cerâmica que transforma as ondas elétricas em ondas mecânicas, sendo amplificadas e transmitidas em impulsos ultrassonoros ao meio reacional (KWIATKOWSKA et al., 2011; BATISTELLA et al., 2012a; NADAR e RATHOD, 2016; ROJAS et al., 2016a,b; SANCHETI e GOGATE, 2017).

Nos banhos, este sistema fica diretamente preso ao fundo da cuba do aparelho acoplado na extremidade do equipamento, em contato direto com o sistema reacional, liberando a energia que é transmitida através de um líquido, normalmente água (CENI et al., 2011; PALUDO et al., 2015; MATTE et al., 2016).

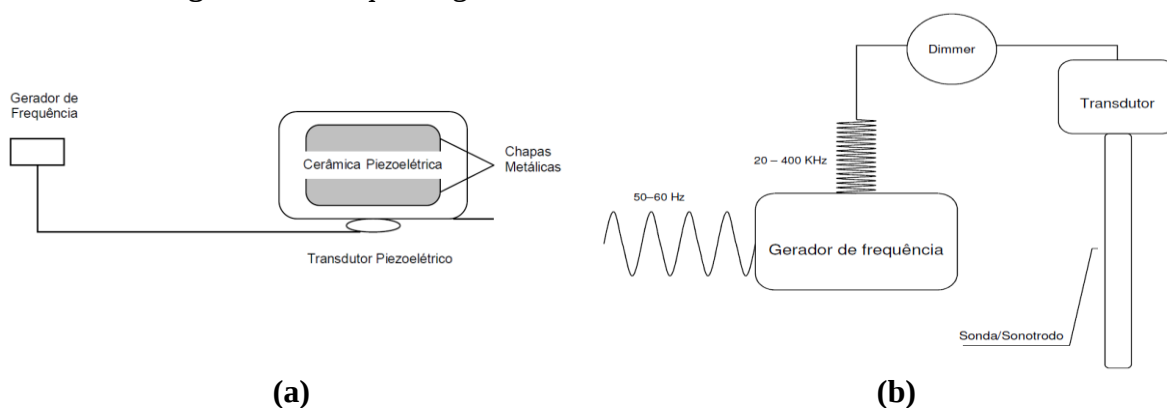
As Figuras 1.4 (a) e (b) apresentam, esquematicamente, um sistema de banho ultrassônico e de sonda ultrassônica, respectivamente.

O principal responsável pelos efeitos sono químicos em uma reação é a cavitação, fenômeno de formação e subsequente colapso de microbolhas de gás em um líquido, e está relacionado ao calor e pressão elevados liberado em intervalos curtos de tempo e em locais específicos do líquido (BOLDY VER, 1995; RASO et al., 1999; BATISTELLA et al., 2012a; BALEN et al., 2015; SUBHEDAR et al., 2015).

Os fatores que afetam diretamente a cavitação, são a presença de gás dissolvido, frequência de irradiação, temperatura, viscosidade, tensão superficial, pressão externa e presença de partículas em solução (RASO et al., 1999).

Em sistemas homogêneos existem duas regiões de reatividade, a primeira corresponde à fase gasosa dentro da bolha, denominada “ponto quente” (implosão cuja eficiência depende da volatilidade do solvente), e a segunda, refere-se à fina camada líquida em volta da bolha (LIU et al., 2008).

Figura 1.4 - Esquema genérico de um sistema de banho de ultrassom.



*Onde: (a) banho ultrassônico e (b) sonda ultrassônica.

Fonte: AWADALLAK (2012).

Enquanto, em sistemas heterogêneos, a destruição da bolha ocorre assimetricamente originando um jato de líquido em direção à superfície sólida, podendo causar erosão localizada (BALEN et al., 2015; SUBHEDAR e GOGATE, 2016). Existe ainda os micros fluxos de líquidos que favorecem o transporte de massa entre a fase líquida e a superfície sólida, acelerando algumas reações químicas (LIU et al., 2008; BALEN et al., 2015; SUBHEDAR e GOGATE, 2016).

A irradiação por ultrassom também pode ser um método alternativo para reduzir as limitações de transferência de massa substrato-enzima, assim como pode proporcionar mudanças conformacionais em função do efeito cavitacional na estrutura de proteínas, cujo efeito físico consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do microambiente (HO et al., 2016).

O sistema de ultrassom pode ser classificado de acordo com o seu nível: alta frequência/baixa potência (2-10 MHz de ultrassom) e baixa frequência/alta potência (20-100kHz de ultrassom). Em reações químicas, a baixa frequência/alta potência é o mais usado, por proporcionar cavitação e formação de micro fluxos em líquidos, aquecimento e ruptura de sólidos, além de conferir instabilidade nas interfaces líquido-vapor, líquido-líquido e líquido-sólido (SUBHEDAR et al., 2015; NADAR e RATHOD, 2016; ROJAS et al., 2016).

O sistema de agitação ultrassônica também é utilizado nas áreas da biologia (homogeneização e rompimento de células), engenharia (limpeza de metal, soldagem, refinamento de metal e perfuração), física (cavitação, fenômeno de ondas acústicas e velocidade do som), polímeros (polimerização, despolimerização e degradação da massa molecular), industrial (filtração, de gaseificação, cristalização, dispersão de sólidos e emulsificação), entre outros (CENI et al., 2011; PALUDO et al., 2015; MATTE et al., 2016).

No Apêndice 1.2 são apresentados alguns exemplos de aplicação da agitação ultrassônica na síntese enzimática de ésteres, empregando lipases como biocatalisadores.

No entanto, o real potencial do sistema ultrassônico em aplicações enzimáticas, tem se mostrado muito promissora, principalmente por proporcionar um aumento significativo na atividade catalítica, estabilidade e longevidade dos biocatalisadores enzimáticos (CENI et al., 2011; PALUDO et al. 2015; MATTE et al., 2016).

1.4. SISTEMA DE FLUXO CONTÍNUO

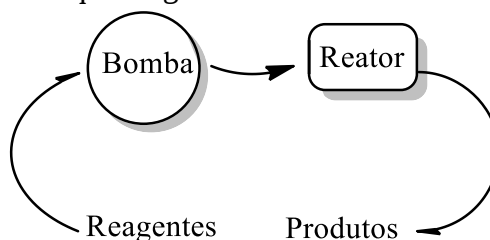
Os processos biocatalíticos envolvendo fluxo contínuo surgem como uma alternativa aos processos convencionais em batelada (ITABAIANA JUNIOR et al., 2013),

principalmente em função da facilidade de automação e operação, com destaque para o controle de parâmetros reacionais e mistura dos reagentes, segurança e controle de processo, bem como eficiência.

Paralelamente também podemos considerar: a manutenção da integridade do suporte pela ausência de agitação, propiciando um maior tempo de vida do biocatalisador; a reutilização da enzima sem a necessidade de uma separação prévia; o emprego de substratos com baixa solubilidade mediante o emprego de grandes volumes de solventes contendo baixas concentrações de substrato; melhor eficiência na transferência de massa e ainda, a não inibição do sistema biocatalítico pelo produto, uma vez que o fluxo laminar retira o produto do contato da enzima, o que conduz a maiores conversões, tornando assim o processo mais rentável em escala industrial (COLOMBO, 2011; SOUZA e MIRANDA, 2013).

Além disto, é um dos sistemas com maior potencial de aplicação visando o aumento de escala em processos industriais (SOUZA e MIRANDA, 2013; LÓPES LÓPES et al., 2014), seja para a indústria de química, cosmética, farmacêutica ou de alimentos. Em reações sob regime de fluxo contínuo o meio reacional flui pelos reatores e as reações químicas ocorrem de maneira contínua (Figura 1.5).

Figura 1.5 - Esquema geral de um reator de fluxo contínuo.



Fonte: SOUZA e MIRANDA, 2013.

Neste caso, o tempo de reação, determinado pelo fluxo e o volume do reator, é chamado de tempo de residência ou tempo espacial e corresponde ao tempo necessário para processar um volume de alimentação correspondente ao volume livre do reator, medido em condições específicas. O inverso é a velocidade espacial e corresponde ao número de volumes de reator que foram alimentados em condições especificadas e que podem ser tratados na unidade de tempo.

Em outras palavras, os substratos são bombeados para o interior dos reatores em fluxos controlados, e as reações químicas ocorrem de maneira contínua, onde o tempo de reação é determinado pelo fluxo e o volume do reator, sendo chamado de tempo de residência (SOUZA e MIRANDA, 2013; RICO, 2015), o qual é calculado pela equação a seguir:

$$\text{Tempo de Residência} = \frac{\text{Volume do reator}}{\text{Velocidade do fluxo dos reagentes}}$$

A Figura 1.6 apresenta o sistema em fluxo contínuo, emprego no presente estudo.

Figura 1.6 - Aparato experimental para reação em fluxo contínuo (Equipamento Asia – Syrris).



*Onde: (a) bomba peristáltica de vazão, (b) aquecedor de temperatura controlada, (c) coluna com o catalisador imobilizado, (d) entrada dos reagentes e (e) saída do produto.

Essa tecnologia é muito versátil, pois permite fazer uso de uma grande variedade de reatores tubulares, com volumes de trabalho variando de 5 μL a 1000 μL . Em relação ao volume do reator o mesmo pode ser classificado como: macro (10 μL – 1000 μL); meso (100 μL – 1000 μL); mini (50 μL – 200 μL); micro (10 μL – 100 μL) e nano (15 μL – 10 μL) (SOUZA e MIRANDA, 2013; MACHADO et al., 2014).

As colunas e cartuchos normalmente são acoplados a um termorregulador aquecido ou resfriado a gás (GLASNOV e KAPPE, 2011; GUMEL e ANNUAR, 2011) e a um módulo regulador da pressão (BPR, do inglês: back pressure regulator), capaz de pressurizar o sistema para que quando temperaturas superiores ao ponto de ebulição dos solventes sejam alcançadas, não ocorra à formação de bolhas no reator (COLOMBO, 2011; ITABAIANA JUNIOR et al., 2013; SOUZA e MIRANDA, 2013).

Na área de biocatálise, a aplicação de regime em fluxo contínuo com leito fixo tem sido amplamente explorada nos últimos anos, especialmente empregando lipases imobilizadas. No

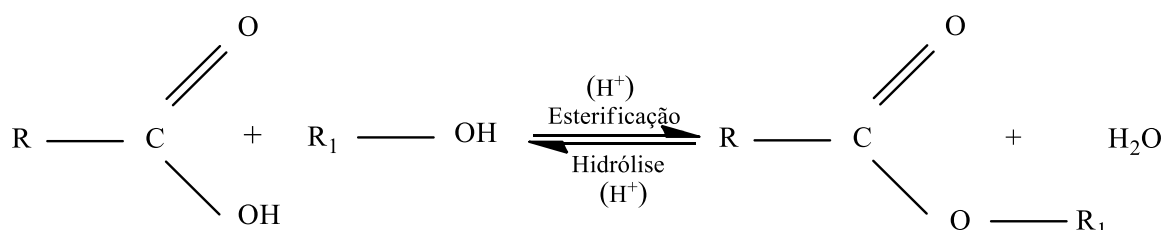
Apêndice 1.3 são apresentados alguns exemplos utilizando lipases na síntese de ésteres via sistema de fluxo contínuo.

1.5 SÍNTESE DE ÉSTERES

As reações de formação de ésteres geralmente acontecem em sistemas com teor de água muito baixo, usando diferentes solventes ou mesmo em meios sem solvente, e necessitam da utilização de um catalisador adequado. Além disso, diversos fatores como a natureza do substrato e do solvente, temperatura e quantidade de água afetam a atividade da lipase, influenciando no processo de síntese (EISENMENGER e REYES-DE-CORCUERA, 2010; DOS SANTOS et al., 2016; NOVAK et al., 2016; NARWAL et al., 2016).

O método mais simples de obtenção de ésteres é a partir da reação de esterificação de Fisher, onde um ácido carboxílico sofre um ataque nucleofílico de um álcool para a formação do éster (Figura 1.7) (MCMURRY, 2010).

Figura 1.7 - Esquema geral da reação de esterificação.



Apesar de ser um sistema reacional simples, apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de excesso de um dos reagentes ou retirada de um dos produtos para deslocar o equilíbrio. O fato do ácido mineral, empregado muitas vezes como catalisador, permanecer dissolvido no meio reacional, além de causar corrosão de reatores industriais e ser prejudicial ao meio ambiente, não poder ser reutilizado. O emprego de elevadas temperaturas para a reação acontecer, conduzem, em muitos casos, à geração de produtos de baixa qualidade (MCMURRY, 2010; OLIVEIRA et al., 2014; KHAN et al., 2015).

Devido a estas desvantagens, faz-se necessária a busca por novas formas de sintetizar ésteres para a indústria, e uma das melhores alternativas encontradas foi à síntese biocatalisada por lipases.

As lipases se destacam pela sua facilidade de obtenção – origem animal, vegetal e microbiana – e sua elevada estereo-, quimio- e regioseletividade, além de alta eficiência na síntese de ésteres, mesmo empregando reagentes em quantidades equimolares e sem a

presença de ácidos minerais, seguindo assim os princípios da química verde (KHAN et al., 2015).

Além disso, o emprego de biocatalisadores (enzimas) imobilizados permitem sua reutilização, diminuindo assim o desperdício de reagentes e a minimização de geração de resíduos, além de proporcionar uma elevada eficiência catalítica em condições operacionais brandas (temperaturas e pressões moderadas), mantendo a seletividade dos catalisadores naturais.

Seu emprego proporciona uma rota muito atraente e promissora, devido principalmente a sua maior aceitabilidade ecológica, a qual conduz a benefícios econômicos, impulsionando assim o desenvolvimento de diferentes processos industriais (MCMURRY, 2010; CVJETKO et al., 2012; PALUDO et al., 2015).

Seu emprego no desenvolvimento de novos produtos, bem como na melhoria no desempenho de processos de vários produtos já existentes, como na síntese de ésteres, é constantemente relatado na literatura (HASAN et al., 2006).

O interesse pela síntese de ésteres deve-se principalmente à sua ampla aplicação em diferentes segmentos industriais, tais como: químico, de alimentos, de cosméticos, farmacológica e de biocombustíveis (BICAS et al., 2010; OLIVEIRA, 2014; MUHAMMAD et al., 2015; ZHAO et al., 2015; MATEO, 2017; REN e LAMSAL, 2017).

Nestas indústrias os ésteres podem ser empregados como biossolventes (ésteres do álcool isopropílico) (BOUAID et al., 2007), surfactantes (ésteres de açúcares) iônicos biodegradáveis e com propriedades antimicrobianas (GUMEL et al., 2011), fármacos enantiopuros (ésteres de glicidol - glicidol quiral), incluindo beta-bloqueadores e substâncias antivirais (LOZANO et al., 2004), produtos de higiene pessoal como emolientes (ésteres do ácido mirístico) em cremes para a pele e óleos de banho (HASAN et al., 2002), cosméticos (ésteres de glicerina, chamados glicerídios), aditivo biológico e fluido hidráulico (ésteres de oleato de etila) (HAZARIKA et al., 2002), plastificantes (ftalatos de dialquila) que evitam que os plásticos se tornem quebradiços, biodiesel (ésteres de ácidos graxos de cadeia longa) (TAN et al., 2010), perfumes (isopropila, benzila e metila) (RADZI, et al., 2011), flavorizantes e aromatizantes (butanoato de metila e etila, acetatos de etila, butila, amila, isoamila e isopentila), produtos de beleza (ésteres de acetato de etila), removedor de esmalte de unha (MCMURRY, 1997), entre outros.

Alguns estudos de obtenção de ésteres, através de via enzimática utilizando lipases como biocatalisadores são apresentados no Apêndice 1.4.

Tanto nas aplicações, quanto nas reações de síntese descritas na literatura, destacam-se os ésteres com propriedades aromatizantes.

Os aromas podem ser classificados em naturais (obtidos através de métodos físicos, microbiológicos e enzimáticos), sintéticos (processos químicos) e terpenícos (oxifuncionalizados ou terpenoides - responsáveis pelo aroma dos óleos essenciais). Estes podem ser comercializados nas formas sólida (pós, grânulos e tabletes) e líquida (soluções ou emulsões) (BICAS et al., 2010; KHAN et al., 2015).

Segundo Aragão et al. (2009), o aroma típico de cada produto é resultado da combinação de dezenas de substâncias voláteis representantes de diversas classes químicas, como ésteres, cetonas, alcóois, aldeídos, éteres de fenóis, heterocíclicos nitrogenados, heterocíclicos oxigenados e ácidos carboxílicos (LINDEN e LORIENT, 1996; ARAGÃO et al., 2009; BICAS et al., 2010; BEZBRADICA et al., 2017), com diferentes propriedades físico-químicas. Nenhum constituinte individual é totalmente responsável pelo aroma característico de um alimento, mas em alguns produtos existem um ou mais componentes que, sozinhos, lembram a qualidade característica de seu aroma (GAVA et al., 2009).

Normalmente, os aromas são misturas muito complexas de origem natural e/ou sintética possuindo propriedades olfativas e gustativas bastante definidas, no qual podem conter até 100 constituintes (SCHWAB et al., 2008), dentre as mais de 10.000 moléculas odoríferas identificadas. Este número basta, por si só, para ilustrar a complexidade desta família de substâncias (LINDEN e LORIENT, 1996), as quais ao serem incorporadas aos produtos alimentícios lhes conferem um odor característico, sendo assim, um fator importante e indispensável para a fabricação de determinados produtos (LINDEN e LORIENT, 1996; KHAN et al., 2015; BEZBRADICA et al., 2017).

Para Hall e Merwin (1981) a principal função do aroma consiste em fornecer suas características organolépticas na sua totalidade ou parte, em qualquer alimento ou outro produto levado à boca.

De acordo com o Código de Boas Práticas da International Organization of the Flavor Industry (IOFI, 2010), aromas são compostos ou misturas de compostos adicionados aos produtos alimentícios para conferir, modificar ou intensificar o sabor dos alimentos.

Cabe destacar que, segundo a Resolução RDC nº. 2 de 15 de janeiro de 2007 (ANVISA, 2007), substâncias aromatizantes são consideradas “semelhantes aos naturais” quando obtidas por via biotecnológica (ARAGÃO et al., 2009; MAHAPATRA et al., 2009; MCMURRY, 2010), classificação esta que agrega valor aos ésteres obtidos via enzimática.

Os “aromas naturais” são obtidos de matérias-primas aromatizantes naturais, de origem animal ou vegetal, aceitáveis para consumo humano, em seu estado natural ou após um tratamento adequado como torrefação, cocção, fermentação, enriquecimento enzimático, entre outros. Compreendem os produtos voláteis de origem vegetal, extratos obtidos a partir de produtos de origem animal, vegetal ou microbiana com solventes permitidos, bálsamos, oleoresinas ou oleogomaresinas oriundas de espécies vegetais e substâncias aromatizantes naturais isoladas (substâncias quimicamente definidas obtidas por processos físicos, microbiológicos ou enzimáticos) segundo a Resolução RDC nº. 2 de 15 de janeiro de 2007 (ANVISA, 2007).

Dentre as várias classes de compostos vinculadas aos aromas, a dos ésteres aparece em destaque em função de sua diversidade, tanto de seus compostos quanto de suas aplicações.

Destes, os ésteres de baixo peso molecular, constituídos principalmente por ácidos e seus derivados de cadeia curta como acetatos, propionatos e butanoatos (MACEDO e PASTORE, 1997), natureza hidrofóbica e de baixa polaridade são os que apresentam potencial muito interessante para a indústria (BARZCA et al., 2011).

Em relação aos ésteres etílicos, chama a atenção o caso do biodiesel (ésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos) (KNOTHE, 2009), um combustível proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais, gorduras animais ou resíduos industriais, amplamente produzido e já incorporado em nosso sistema industrial.

Os ésteres também apresentam propriedades repelentes à água, sendo uns eficientes lubrificantes e emolientes (NETA, 2007), além de um importante ingrediente em formulações de cosméticos como emulsionantes, fornecem propriedades de agentes de condicionamento e hidratantes (PETER e ROBERT, 2001).

Dentre os ésteres a síntese do Acetato de isoamila, Butanoato de etila e Oleato de etila, foi avaliada neste trabalho. A seguir é apresentado um breve relato sobre os mesmos.

- ✓ Os ésteres de acetato de isoamila (empregado como aroma de banana) e butanoato de etila (empregado como aroma de abacaxi) desempenham um papel importante na indústria, sendo empregados como aditivos cujo principal objetivo é fornecer o odor de frutas, realçando o aroma e sabores característicos de diferentes produtos, seja na indústria química, de alimentos ou de cosméticos (NETA et al., 2015; SERRA, 2015; GAMAYUROVA et al., 2016; BEZBRADICA et al., 2017).

No Apêndice 1.5 apresentam-se alguns exemplos de lipases empregadas na síntese de ésteres de acetato e butanoato.

- ✓ O oleato de etila é muito empregado nas indústrias farmacêutica, sendo capaz de atuar como substância solvente de esteroides (NETA et al., 2012) e alimentícia, para aumentar a taxa de secagem (aumento da velocidade) de frutos (DOYMAZ, 2008) e outros alimentos, tais como raiz de gengibre (DESHMUKH, 2013). Além de ser utilizado como aditivo biológico, na indústria química (plastificantes, fluidos hidráulicos, emoliantes e lubrificantes), na indústria farmacêutica (solvente de esteroides), na indústria de cosmética e alimentícia (estabilizantes, flavorizante e emulsificantes) e na indústria de biocombustíveis (biodiesel) (ITSEKSON et al. 2011; NETA et al., 2012; DESHMUKH, 2013).

No Apêndice 1.6 apresentam-se alguns exemplos de lipases e suportes utilizados empregados para a síntese de ésteres de oleato.

1.6 REAÇÕES EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

Reações de esterificação em sistema livre de solvente orgânico apresenta-se como uma vertente bastante promissora, conforme atestam os processos já implantados industrialmente. Inúmeros ésteres são considerados de grande importância na vida cotidiana, principalmente pela possibilidade onde o próprio reagente atua como solvente, eliminando processos posteriores como de purificação e recuperação, uma vez que ocorre a diminuição no número de compostos no meio reacional ao final da reação.

Nos últimos anos essa técnica tem recebido cada vez mais atenção, principalmente pelo seu uso comercial, por ser um sistema onde ocorre a possibilidade do uso de altas concentrações de substratos, manutenção da estabilidade e pontencialidade da enzima, além de ser um processo ambientalmente favorável, uma vez que vários solventes são agentes poluidores, diminuição do impacto ambiental e redução significativa nos custos de produção (GÜVENÇ et al., 2002).

Em sistemas catalisados por lipases, são geralmente reações heterogêneas, onde o substrato (reagente solúvel) e as lipases (insolúveis) são no solvente, resultando na transferência de massa, causado pela baixa taxa de difusão do reagente para o sítio ativo da enzima, a qual ocorre uma reação de interface entre a lipase e o solvente (KUMAR et al., 2004).

1.7 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Na revisão bibliográfica apresentada neste capítulo, pode-se observar que há um grande interesse na imobilização de lipase de *Candida antarctica* (CALB), devido ao seu amplo potencial de aplicação em reações de interesse industrial (alimentos, fármacos, cosméticos, química, combustível, detergentes, efluentes e de alimentos).

Além disso, a procura por compostos com conotação natural, tem resultado num aumento de pesquisas referentes à bioprodução de ésteres. Os sistemas de agitação ultrassônica e de fluxo contínuo empregado em reações visam contribuir para a bioprodução dos ésteres, principalmente considerando a necessidade de redução de custos de produção e aumento de rendimento de conversão.

Neste sentido, o presente estudo, visa contribuir de forma inovadora para a síntese de ésteres, justificando assim, a sua importância sobre a bioprodução em sistema de agitação em batelada (mecânica e ultrassônica) e em fluxo contínuo, empregando como catalisador imobilizado (CALB imobilizada em poliuretano PU).

CAPÍTULO II

2. IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO CATALISADOR IMOBILIZADO

A tecnologia enzimática é uma alternativa que visa substituir os processos químicos, uma vez que os biocatalisadores envolvem processos com menor impacto ambiental e são mais específicos, apresentando-se como uma ferramenta promissora para a síntese de compostos de alto valor agregado (ANDUALEMA e GENESSESSE, 2012; MATTE et al., 2016).

As lipases constituem um grupo importante de biocatalisadores devido às características de obtenção, elevada seletividade (químio, regio e anantio) e especificidade (SHARMA e KANWAR, 2014).

Com a finalidade de aproveitar o potencial catalítico das lipases e reunir as vantagens dessas proteínas tem-se estudado formas de torná-las insolúveis ao meio reacional (KAPOOR e GUPTA, 2012b).

A imobilização apresenta-se como uma alternativa atraente, possibilitando produzir biocatalisadores mais estáveis e com boa especificidade ao substrato, eliminando assim, algumas restrições do uso das enzimas em processos industriais (RODRIGUES et al., 2010; MENDES et al., 2011a,b; POPPE et al., 2015; XIAO et al., 2015).

A escolha de um biocatalisador imobilizado está relacionada com a possibilidade de aplicação, atividade catalítica, viabilidade de operação contínua do processo, maior facilidade de separação do produto final, além do aumento de estabilidade ao meio reacional, pH e à temperatura, entre outros (IDRIS e BUKHARI, 2012; POOJARI e CLARSON, 2013; NYARI et al., 2016; PEIRCE et al., 2016).

Para auxiliar na interpretação de futuros resultados de suas aplicações, é imprescindível sua caracterização, tanto do extrato enzimático empregado na etapa de imobilização, quanto do imobilizado gerado.

Neste contexto, o objetivo desta etapa do trabalho, além de descrever a etapa de imobilização da lipase de *Candida antarctica* do tipo B (Novozymes) em poliuretano (PU), foi caracterizar o extrato enzimático quanto ao seu perfil molecular, bem como o imobilizado gerado, este em relação a suas propriedades estruturais, rendimento de imobilização e estabilidade a estocagem.

2.1 MATERIAS E MÉTODOS

Nesta etapa serão descritos os procedimentos laboratoriais realizados no laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI - Erechim – RS.

A enzima utilizada neste estudo foi a lipase CALB (Novozyme NZL-102), adquirida na forma liofilizada da empresa Novozymes Latin América Ltda. Os monômeros comerciais poliol e isocianato, com uma formulação específica para colchões e espumas injetadas, foram adquiridos da Empresa Flexível Poliuretanos – Mannes. Os reagentes e solventes utilizados foram acetona (FMaia), ácido oleico (Vetec), dodecil sulfato de sódio, poliacrilamida (SDS-PAGE), álcool etílico (etanol 95%) (Merck) e hidróxido de sódio (Nuclear).

Os equipamentos utilizados foram agitador magnético com potência 650 W (Fisatom); agitador orbital (Marconi MA-410); balança analítica (Shimadzu); bomba a vácuo TE-0,58 (Tecnal); Difratorômetro de raios-X Miniflex II (Rigaku), com tubo emissor de Cu-1,54; estufa (Fanem, modelo 320SE); pH metro MA- 522 (Marconi); microscópio eletrônico de varredura (MEV - Modelo DSM960); refrigerador (Consul); liquidificador (Walita) e difratorômetro de raio-X (Rigaku, Miniflex II com tubo emissor de Cu-1,54).

2.2.1 Determinação do perfil molecular por eletroforese (SDS-PAGE) da lipase comercial CALB

O perfil molecular da CALB foi determinado por eletroforese em condições desnaturantes, como citado por Laemmli (1970). As amostras no gel foram realizadas sob corrente constante de 300 mA e voltagem de 250 V durante 60 minutos. As bandas de proteína foram visualizadas utilizando uma solução de corante Azul Brilhante de Coomassie R-250 (0,1%).

2.2.2 Determinação do conteúdo de proteína

O conteúdo de proteína foi determinado de acordo com método proposto por Bradford (1976), utilizando curva padrão de albumina de soro bovino. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm, com adição de 0,1 mL de amostra em 5 mL do reagente de Bradford (NICOLETTI, 2014).

2.2.3 Determinação da atividade enzimática específica

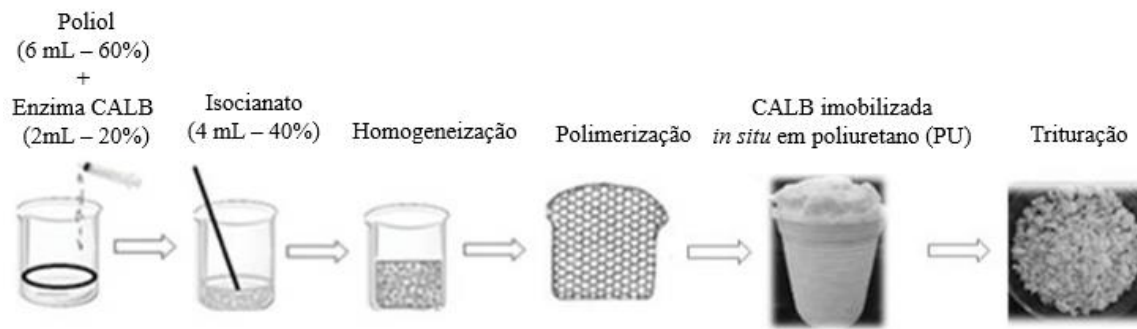
A atividade específica (U.mg^{-1}) do catalisador livre (CALB livre) foi calculada pelo quociente entre a atividade enzimática de esterificação da CALB (U.g^{-1}) e conteúdo de proteína total (mg.mL^{-1}) (NYAR et al. 2016).

2.2.4 Imobilização *in situ* da CALB em poliuretano (PU)

O procedimento de imobilização da CALB *in situ* em suporte rígido de poliuretano (PU) (imobilizado) foi realizada de acordo com Nyari et al. (2016), adicionando 20% em peso da enzima diluída (20% v/v em água destilada) ao monômero poliálcool poliéter (6 mL = 60%).

Após homogeneização, adicionou-se o isocianato (tolueno diisocianato - TDI) (4 mL = 40%) ao recipiente de polietileno (copo plástico) o qual foi agitado com auxílio de um bastão de vidro por 5 minutos, deixando-se a espuma expandir (5 minutos). Após a expansão da espuma e completa solidificação do imobilizado, este foi deixado em repouso por 24 horas e em seguida triturado para a quantificação da atividade enzimática, conforme ilustrado na Figura 2.1.

Figura 2.1 - Processo de imobilização da CALB em poliuretano (PU).



O método consiste em imobilização por aprisionamento (confinamento) da enzima em uma estrutura porosa (estrutura tridimensional) semipermeável, com porosidade adequada para reter o biocatalisador. Durante a polimerização podem ocorrer ligações covalentes da enzima com o suporte, promovendo aumento da termoestabilidade (GUNCHEVA et al., 2011; NYARI et al., 2016).

Posteriormente a imobilização o catalisador imobilizado foi submetido a diferentes técnicas de caracterização: Densidade Aparente, Difração de Raio-X, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), bem como de rendimento de processo de imobilização e estabilidade.

Determinação da atividade enzimática de esterificação

A atividade enzimática de esterificação (U.g^{-1}) do catalisador imobilizado foi quantificada empregando como reação modelo, a síntese do éster oleato de etila (definida pelo grupo de estudo para determinação da atividade lipolítica), a qual foi conduzida empregando 0,1 g de catalisador imobilizado e 5 g de substrato (razão molar ácido oleico:álcool etílico de 1:1). A reação foi conduzida a 40°C , por 40 minutos em agitação mecânica de 160 rpm. Após este período, alíquotas de 500 μL foram retiradas do meio reacional e adicionadas a alíquotas de 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1 v/v), sendo posteriormente titulada com NaOH 0,05 M até pH 11 (FERRAZ, 2014).

As análises foram realizadas em triplicata, onde uma unidade de atividade enzimática de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio, sendo calculada empregando a Equação 2.1.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \cdot M_{EL} \times V_c} \quad (2.1)$$

Onde: AE = atividade enzimática de esterificação (U/g), V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos (mL), V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL), M = molaridade da solução de NaOH, V_f = volume final de meio reacional (mL), t = tempo (minutos), M_{EL} = peso do catalisador imobilizado e V_c = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

Determinação do rendimento de imobilização

O rendimento do catalisador imobilizado foi calculado considerando a atividade enzimática de esterificação total do catalisador livre (enzima) (CALB livre em solução, considerando o volume de extrato enzimático empregado no ensaio de imobilização) e a atividade enzimática de esterificação total do catalisador imobilizado (o qual considera a massa total de imobilizado produzido) de acordo com a Equação 2.2.

$$RI(\%) = \frac{UT_{\text{imobilizado}}}{UT_o} \times 100 \quad (2.2)$$

Onde: $RI(\%)$ = Rendimento de imobilização, $UT_{\text{imobilizado}}$ = atividade de esterificação total do imobilizado e UT_o = atividade de esterificação da solução enzimática oferecida no processo de imobilização.

2.2.5 Caracterização do catalisador imobilizado

Densidade aparente

A densidade aparente foi avaliada de acordo com Nicoletti (2014) com modificações, a qual é baseada na metodologia descrita pela American Society for Testing and Materials (ASTM) na norma ASTM D 3574-03. A medida das amostras foi realizada com o auxílio de um paquímetro. O corte teve dimensões de 5 x 5 x 5 mm. Após foi verificado o peso, em balança analítica com precisão de 0,0001 g. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em g/cm³.

Difração de raio-X

A morfologia do suporte e do imobilizado foi verificada por Difração de Raio-X (DRX) em difratometro da marca Rigaku, Miniflex II, com tubo emissor de Cu-1,54, para a observação dos picos indicativos de cristalinidade. Visando inspecionar a morfologia do suporte e do imobilizado (com e sem ativação em fluidos pressurizados e após reações de síntese de ésteres), as amostras foram submetidas à análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Embrapa SP, utilizando um microscópio modelo DSM960. Para o recobrimento da superfície das amostras com ouro foi utilizado um metalizador Balzer, SCD 050. As micrografias foram obtidas na tensão de 10 e 15kV.

2.2.6 Avaliação da estabilidade de estocagem

A avaliação da estabilidade de estocagem do catalisador livre e imobilizado foi avaliada em temperaturas de -80 a 80°C (-80; -4 a 0; 2 a 8; 10 a 25; 40; 60 e 80°C) em função do tempo (dias) de armazenamento. Os resultados foram expressos em termos de atividade residual (Atv. Res.%), considerando a atividade enzimática de esterificação inicial como 100%.

Determinação da atividade residual

A atividade residual (Atv. Res %) empregada para avaliar a estabilidade de estocagem, foi calculada empregando como referência a atividade enzimática de esterificação (U.g⁻¹) inicial de acordo com Equação (2.3).

$$ARR(\%) = \frac{U_x}{U_{inicial}} \times 100 \quad (2.3)$$

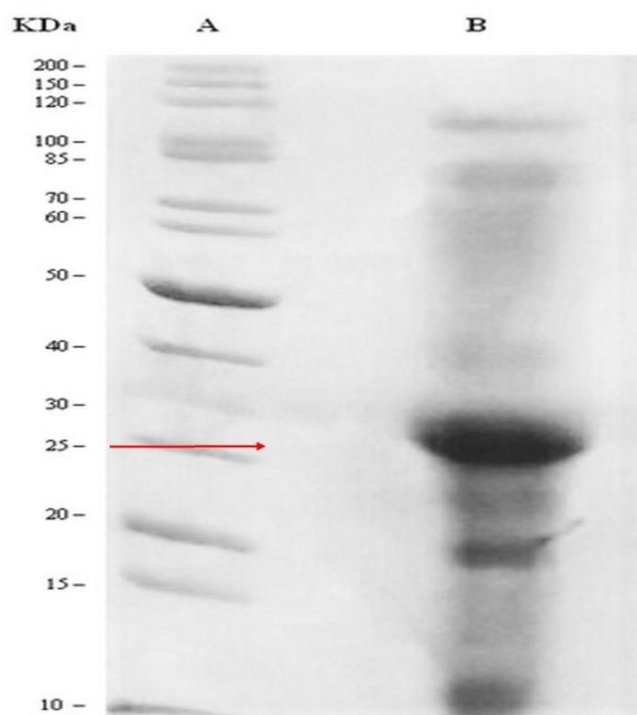
Onde: $ARR (\%)$ = Atividade residual, U_x = Atividade enzimática de esterificação após o tempo de armazenamento e $U_{inicial}$ = Atividade enzimática de esterificação inicial (referência – tempo 0) (U/g).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1 Perfil proteico e determinação do peso molecular da CALB

A CALB utilizada neste trabalho foi caracterizada em relação ao seu teor proteico e perfil molecular (SDS-PAGE) em condições de desnaturação. O teor de proteína verificado foi de $0,2618 \pm 0,1025$ g.mL e o perfil molecular são apresentados na Figura 2.2.

Figura 2.2 - Análise de Rohapect® DA6L CALB por SDS-PAGE.



*Coluna A - marcadores de peso molecular; coluna B - CALB.

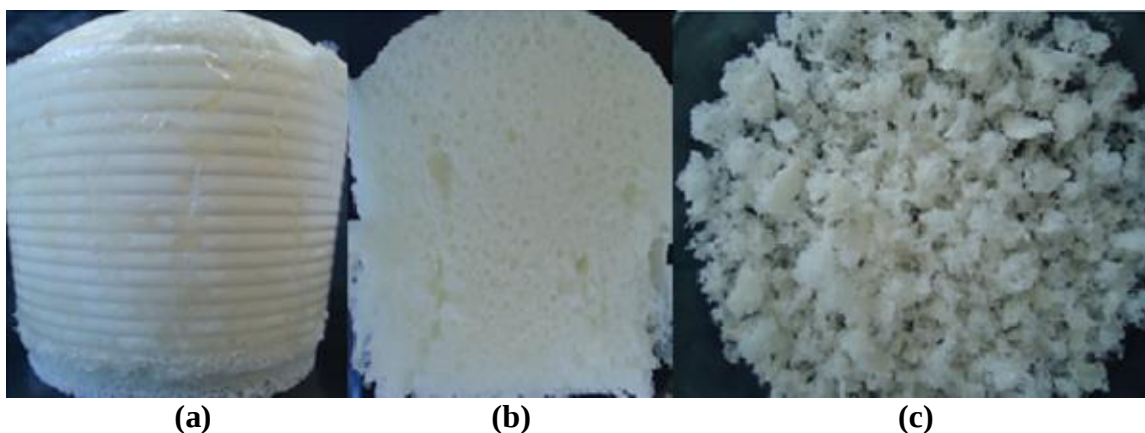
A partir do gel de SDS-PAGE (coluna A - padrão albumina de soro bovino com 200 kD de peso molecular e coluna B - solução de CALB), pode-se observar que há um elevado nível de pureza, apresentando bandas nos valores entre 10 e 120 kDa, com uma prevalência entre 25 e 30 kDa, a qual pode ser observada em 25, 28 ou 30kDa.

Perfis similares com bandas entre 23 e 65 kDa foram relatados por outros autores para lipases CALB procedentes de outras fontes (SUN e XU, 2009; PRLAINOVIĆ et al., 2011; SILVA et al., 2013; NYARI et al., 2016).

2.3.2 Imobilização da CALB em Poliuretano (PU)

O processo de imobilização foi realizado de acordo com metodologia definida por Nyari et al. (2016) com a relação de polioli e isocianato de 6:4 (v/v) (Apêndice 2.1) levando-se em conta a análise visual do imobilizado, como a consistência, estabilidade quanto ao efeito de retração do volume, defeitos de conformação, maleabilidade e conformação dos poros da espuma. A Figura 2.3 representa o catalisador imobilizado, o qual apresenta uma espuma uniforme, com boa homogeneidade nos poros (b).

Figura 2.3 - Aspecto do catalisador imobilizado: (a) forma íntegra (b) corte longitudinal e (c) triturado.



Ferreira-Dias et al. (1999) enfatizam que no processo de polimerização (poliuretano) *in situ*, ocorre incorporação total da enzima no suporte, aprisionando a mesma na matriz da espuma. Este aprisionamento pode ocorrer com ou sem ligações covalentes. A presença de grupos funcionais, tanto na enzima (ácido carboxílico e amina) quanto no suporte (álcool e isocianato) proporciona condições propícias à formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, característica esta que favorece o aprisionamento da enzima ao suporte.

O processo de imobilização por confinamento é atualmente um dos métodos mais empregados, devido à simplicidade, rapidez, baixo custo e que, normalmente, menos influencia na atividade catalítica da enzima. Pode ocorrer em alguns casos a formação de “caminhos”, direcionando a estrutura com a conformação aberta, fazendo com que ocorra uma interação maior entre enzima/suporte/produto e, conseqüentemente, ocorrendo uma maior eficiência do processo, devido a um aumento na atividade, estabilidade e resistência do catalisador imobilizado (FORDE et al., 2010; POPPE, 2012; NYARI et al., 2016).

O rendimento de imobilização é definido de acordo com a relação entre a atividade total oferecida (UT_0), sendo calculada considerando a quantidade de catalisador livre (CALB livre)

(0,2 g) utilizada no passo de incorporação. A atividade total experimental (U_{TEp}) leva - se em conta a atividade total do suporte de PU incorporada com a enzima (10,8 g) e os valores de U_{T0} e U_{TEp} são obtidos para o catalisador imobilizado.

A Tabela 2.1 apresenta as massas de catalisador na forma livre e imobilizada, bem como suas respectivas atividades enzimáticas de esterificação e de rendimento de imobilização.

Tabela 2.1 - Atividade de esterificação e massa de catalisador na forma livre (CALB livre) e imobilizado (CALB em poliuretano).

CALB livre				
Atv. esterif. ($U.g^{-1}$)	Massa de enzima (g)	Atv. esterif. oferecida (U_{T0})	Atv. esterif. específica ($U.mg^{-1}$)	-
3.057,5	0,2	611,5	1.753,2	-
CALB Imobilizada em PU				
Atv. esterif. imobilizado ($U.g^{-1}$)	Massa imobilizado (g)	Atv. esterif. Total (U_{TEp})	Atv. esterif. específica ($U.mg^{-1}$)	Rendimento (%)
789,0	10,8	8.521,2	1.002,9	1.400,00%

*Onde: teor de proteína: $0,2618 \pm 0,1025 \text{ g.ml}^{-1}$, Atv. esterif. = Atividade enzimática de esterificação ($U.g^{-1}$), catalisador imobilizado = CALB imobilizada em PU ($U.g^{-1}$) e catalisador livre = CALB livre ($U.g^{-1}$).

Através dos resultados apresentados podemos observar um aumento significativo na atividade enzimática do catalisador após o processo de imobilização, com rendimento de 1.400%, esses resultados apresentam o efeito benéfico do processo de imobilização sobre a atividade enzimática.

Esse fato pode estar associado à exposição de novos sítios ativos da enzima, devido a ligações químicas covalentes entre a enzima e o suporte, o qual durante sua expansão pode proporcionar o esticamento, bem como o desenrolar da hélice proteica, expondo os sítios ativos ocultos no interior de sua estrutura, além de indicar que toda a enzima adicionada ao suporte foi incorporada ao suporte de PU.

Esses resultados estão melhor explanados de acordo com Nyari et al. (2016) dados obtidos na primeira fase dos estudos realizados no decorrer do Mestrado (NYARI, 2013).

Os resultados obtidos no presente estudo são superiores aos anteriormente reportados na literatura, segundo Bustamante-Vargas et al. (2015) estudando a pectinase comercial

(Rohapect® DA6L) de *Aspergillus niger* imobilizada em *in situ* em espuma rígida de poliuretano (RFPU), obtiveram rendimento de 200%.

Cipolatti et al. (2014) utilizando poliuretano e PEG (400, 4000 e 6000 Da) para imobilização de lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL) obtiveram rendimento de 100%. Fernandes et al. (2014), no processo de imobilização da *Candida antarctica* B em poli-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHBV), apresentou rendimento de imobilização de 91%.

2.3.3 Caracterização do catalisador imobilizado

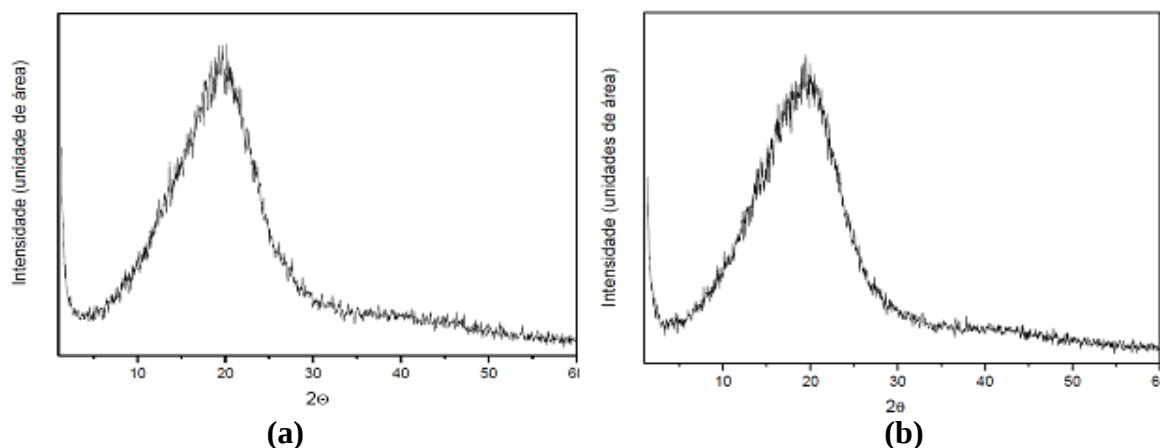
Densidade aparente

A densidade aparente é a razão entre a massa e o volume geométrico do corpo de prova, incluindo a porosidade. O valor calculado para densidade aparente do imobilizado foi de aproximadamente $0,029 \pm 0,010$ g/cm³. Nicoletti (2014) obteve uma densidade aparente, para a lipase imobilizada em PU de $0,627 \pm 0,140$ g/cm³. Esta diferença pode ser devido a vários fatores, tais como: tipo e quantidade (massa) de polímero (poliol + isocianato), modo de preparo, homogeneização e processo de secagem utilizado durante o processo de imobilização.

Difração de raio-X (DRX)

As Figuras 2.4 (a) e (b) apresentam os difratogramas de raios X das amostras de poliuretano (PU) com e sem a incorporação da CALB, respectivamente. Pode-se observar que ambas as amostras exibem um pico alargado em $2\theta - 20^\circ$, característico de material amorfo, ou seja, não têm estrutura definida, esse comportamento também foi relatado por Fiorio (2011) e Fernandes (2013) em estudo com poliuretano, a qual confirma essa caracterização.

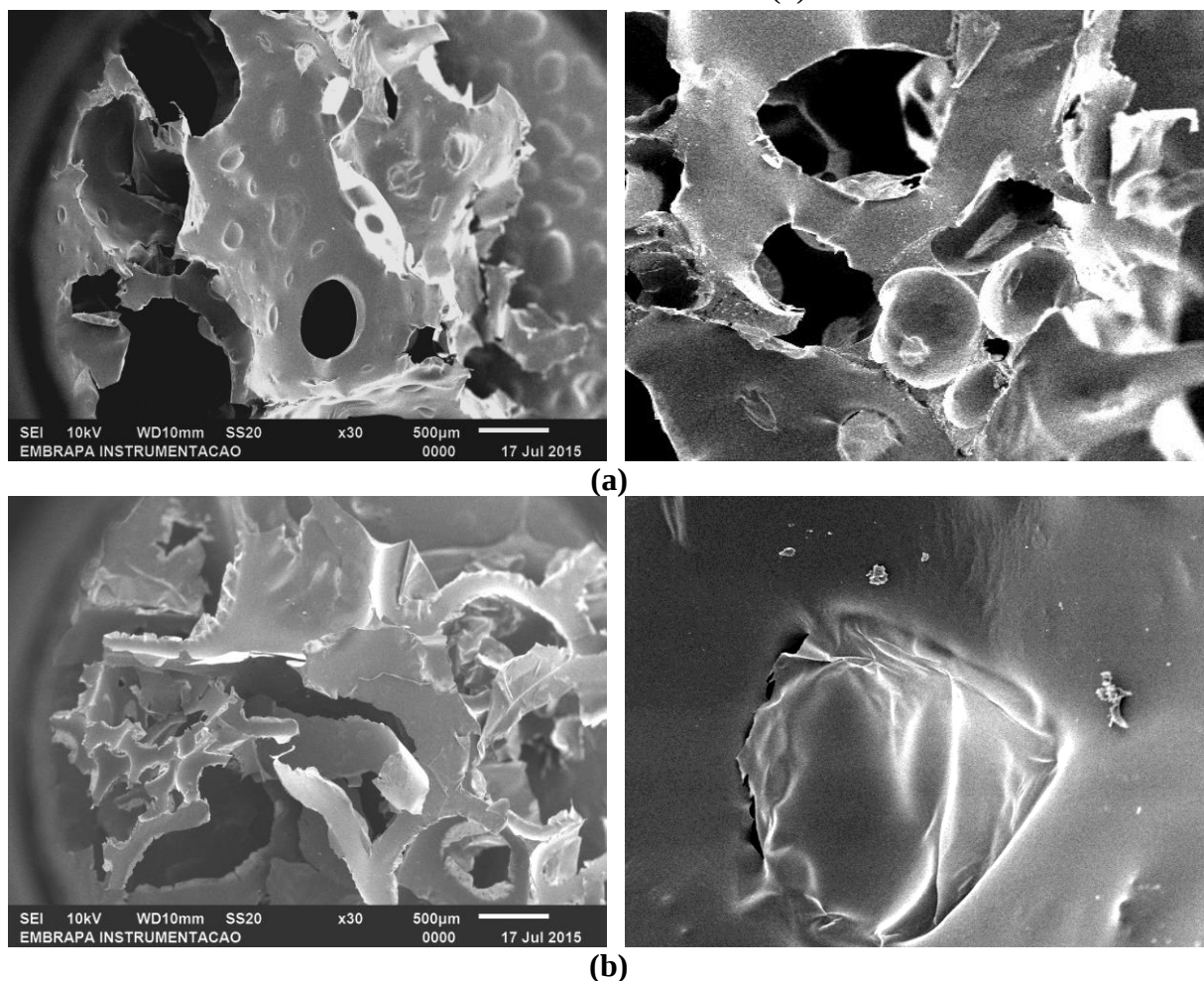
Figura 2.4 - Difratogramas de raios X das amostras de poliuretano (PU) (a) e do catalisador imobilizado (b).



Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

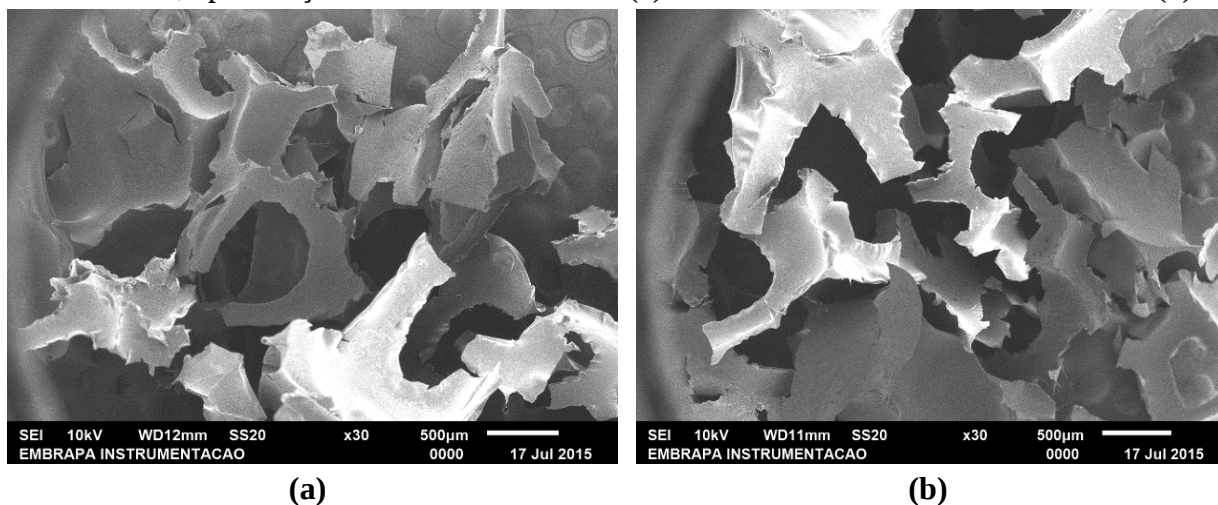
As Figuras 2.5 (a) e (b) referem-se aos MEV (Microscopia eletrônica de varredura) das amostras de PU e do catalisador imobilizado (CALB imobilizada em PU).

Figura 2.5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de poliuretano (PU) (a) e do catalisador imobilizado (b).



De acordo com os MEVs a incorporação da CALB não afetou aparentemente a estrutura do PU. Comportamento semelhante, em termos estruturais, foi observado para as amostras submetidas aos ensaios reacionais (Figura 2.6), indicando que o catalisador imobilizado submetido ao meio reacional a que foi exposto (ácidos carboxílicos mais álcool), não afetaram a integridade física do suporte, o que pode levar a uma maior estabilidade durante o período de estocagem.

Figura 2.6 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras do catalisador imobilizado, após reação de síntese de ésteres: (a) acetato de isoamila e oleato de etila e (b).



2.3.4 Avaliação da estabilidade de estocagem

As Figuras 2.7 (1) (2) representam a estabilidade de estocagem do catalisador livre e imobilizado, respectivamente, nas temperaturas de -80, -4 a 0, 2 a 8 e 10 a 25°C e nas de 40, 60 e 80°C, concomitantemente.

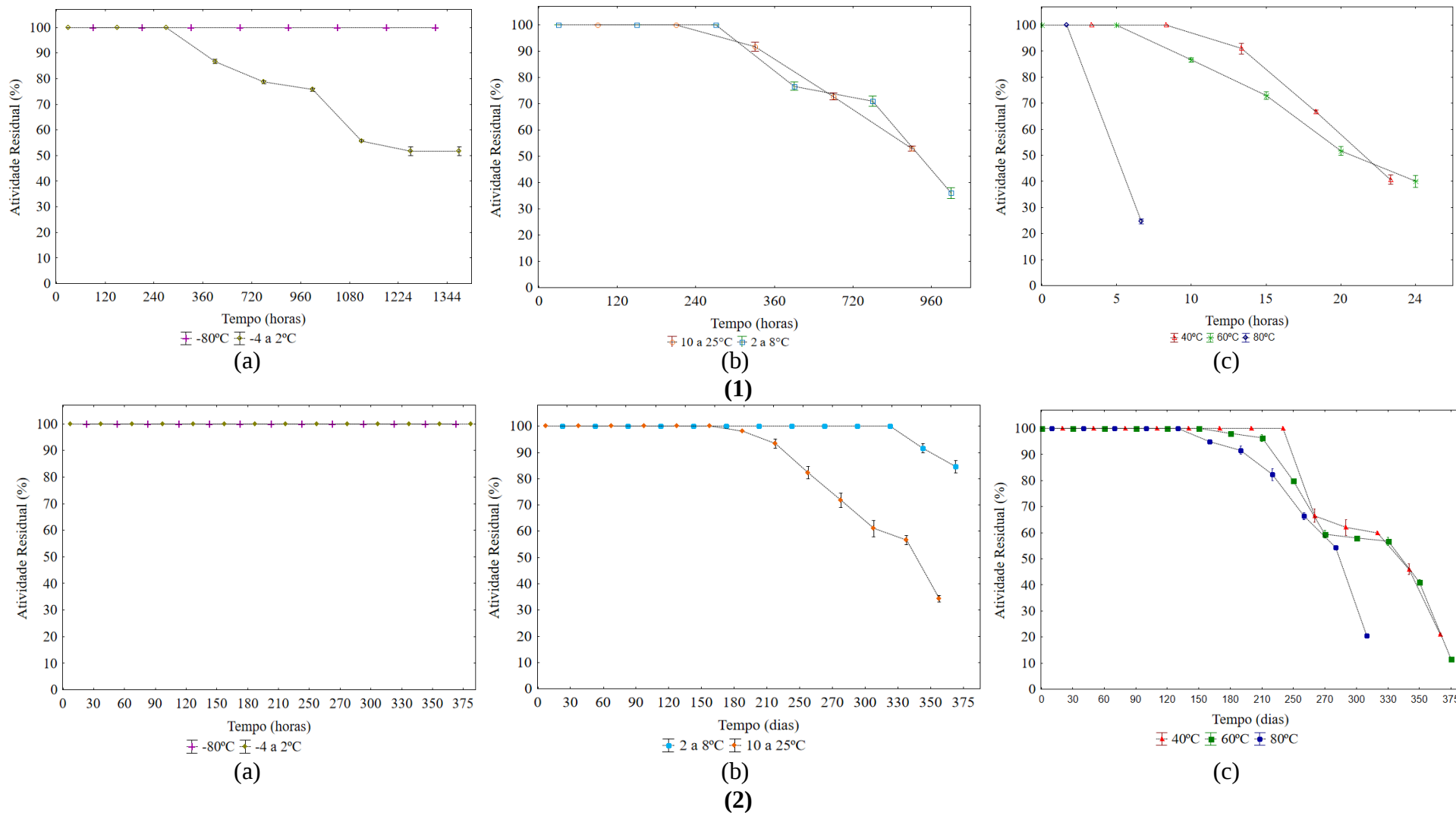
Observa-se através da Figura 2.7 (1) empregando o catalisador livre (apresentado em horas de incubação ou estocagem) uma diminuição da atividade em relação ao tempo de exposição em todas as temperaturas avaliadas, a qual pode ser explicada devido à relação direta entre atividade enzimática e temperatura de exposição avaliada.

Nas temperaturas superiores (a), ou seja superiores a 40°C podemos observar um declínio significativo em relação a atividade enzimática, apresentando em inativação quase completa de 83% em relação a inicial em 5 horas de exposição à 80°C, enquanto em 60 e 40°C a inativação começou a ocorrer após 20 horas de contato, com 33 e 22% em relação a inicial em 24 horas (1 dia) de estocagem.

As enzimas na sua forma solúvel são moléculas proteicas complexas e de certa flexibilidade, sua atividade catalítica prove uma estrutura altamente ordenada, muito delicada e frágil. Se a molécula absorve muita energia, ela pode sofrer mudanças conformacionais nos seus sítios ativos, muitas vezes irreversíveis, podendo até desnaturar ou inativar totalmente enzima (OLIVEIRA, 2008).

Para as temperaturas intermediárias de 2 a 8 e 10 a 25°C (b) em 960 horas (40 dias) de contato, com 52 e 40% em relação a inicial ao final desse período, respectivamente.

Figura 2.7 - Estabilidade de estocagem do catalisador livre (1) e imobilizado (b) submetido a temperaturas de -80 e -4 a 0 (a), 2 a 8 e 10 a 25°C (b) e nas de 40, 60 e 80°C (c), respectivamente.



Enquanto nas temperaturas inferiores de -80 e -4 a 2°C (c) após 1344 horas (56 dias) de estocagem a atividade se manteve inalterada quando armazenada a -80°C, enquanto a temperatura de -4 a 2°C, apresentou um declínio de 53% em relação a inicial no decorrer do período.

Para o catalisador imobilizado apresentado na Figura 2.7 (2) a estabilidade de estocagem para todas as temperaturas avaliadas (-80, -4 a 0, 2 a 8 e 10 a 25, 40, 60 e 80°C) apresentaram uma atividade residual inalterada, igual a 100% no decorrer de 180 dias de exposição. Enquanto para as temperaturas de -80 e -4 a 0°C (a) em 375 dias de armazenagem a atividade em relação a inicial se manteve em 100%, comportamento semelhante ao observado quando submetidos nas temperaturas de 2 a 8 e 10 a 25°C (b), a qual permaneceu estável a essas temperaturas por 155 dias de incubação, após esse período apresentou uma diminuição de 52 e 87% na atividade residual em relação a inicial, respectivamente.

Enquanto para as temperaturas de 40, 60 e 80°C (c) a atividade residual permaneceu inalterada em 130 dias de armazenagem, após esse período, submetidas a estocagem a 40 e 60°C a atividade residual foi de 45 e 40% em relação a inicial após 350 dias e de 53% em relação a inicial após 270 dias de estocagem a uma temperatura de 80°C.

Os resultados demonstram um ganho significativo de estabilidade a altas temperaturas empregando o catalisador imobilizado em relação ao catalisador livre, novamente enfatizando a potencialidade do efeito benéfico do processo de imobilização sobre a estabilidade da enzima, tanto a baixas com a altas temperaturas, sugerindo a potencialidade em processos industriais.

Segundo Oliveira (2008), a variação da estabilidade de estocagem em diferentes temperaturas, pode ser devido ao tipo de catalisador empregado ou até mesmo das modificações ocasionadas na estrutura do suporte.

Nesse sentido, como já mencionado anteriormente a seleção do suporte ideal para o processo de imobilização depende da natureza própria da enzima e de algumas características do material do suporte, com isso o suporte de poliuretano tem muitas vantagens, como podemos comprovar nos resultados citados a cima, onde enzima fica retida na estrutura porosa da matriz e proporcionando vantagens como: área superficial, estabilidade térmica de estocagem e resistência mecânica.

Silva et al. (2013a), ao estudarem a estabilidade da atividade de inulinase comercial de *Aspergillus niger* imobilizada em espuma de poliuretano, observaram 49,7% de atividade residual após 59 dias de incubação a 70°C. Cipolatti et al. (2014) ao avaliarem a estabilidade

da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) imobilizada em poliuretano e polietilenoglicol (PEG 400 e PEG 6000) a uma temperatura de 50°C, constataram uma atividade residual de 90% após 20 horas de estocagem.

As diferentes variáveis empregadas nos estudos repostados pela literatura para o processo de avaliação da estabilidade de estocagem, como tipo de suporte, gêneros e espécies de micro-organismos produtores de lipases, temperatura, tipo de incubação e tempos de estocagem, diferem significativamente entre si, dificultando maiores comparações.

2.4 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

O processo de imobilização da *Candida antarctica* B *in situ* em PU, além de apresentar-se como uma metodologia simples e rápida, proporciona um excelente rendimento de 1.400%, mostrando-se superiores aos reportados pela literatura.

O processo de polimerização manteve a atividade da enzima, indicando que a proteína não foi desnaturada nem ocasionou alterações indesejáveis de conformação, além de permitir a permeabilidade do substrato entre a matriz do suporte e a saída do produto.

O processo de imobilização proporcionou um bom desempenho frente à estabilidade de estocagem para todas as temperaturas avaliadas (-80, -4 a 0, 2 a 8 e 10 a 25, 40, 60 e 80°C) apresentaram uma atividade residual inalterada, igual a 100% quanto submetido as temperaturas de -80 a -4 a 0°C no decorrer de 375 dias, nas temperaturas de 2 a 8 e 10 a 25°C por 155 dias e nas temperaturas de 40, 60 e 80°C em 130 dias de estocagem.

Os resultados demonstram um ganho significativo de estabilidade a altas temperaturas empregando o catalisador imobilizado em relação ao catalisador livre, enfatizando a potencialidade do efeito benéfico do processo de imobilização em poliuretano sobre a estabilidade da enzima a baixas e altas temperaturas, criando um microambiente para a enzima no suporte, protegendo esta do ambiente exterior e da desnaturação pelo efeito da temperatura.

Além disso, os resultados obtidos podem ser uma base de referência para pesquisas posteriores, como o *scale up* do processo de imobilização, com elevado potencial em reações de esterificação e para a concepção de biorreatores, sendo uma alternativa viável de aplicação de processos industriais.

CAPÍTULO III

3. SÍNTESE DE ÉSTERES

A demanda mundial por aromas e fragrâncias, de acordo com a pesquisa da Global Industry Analysts, teve um aumento de 4,3% em 2014, chegando a US \$ 23,5 bilhões, e deverá ultrapassar US \$ 36 bilhões em 2017 (WORLD FLAVOURS e FRAGRANCES MARKET, 2017).

Os ésteres podem ser obtidos através da extração direta de fontes naturais, ou mediante uma reação de esterificação, entre um ácido e um álcool, com formação de água como subproduto a qual pode se dar por via química ou biotecnológica (síntese enzimática) (MADALOZZO, 2011).

A obtenção por extração direta de fontes naturais é ainda muito limitada, devido à baixa concentração de materiais desejados nas matérias-primas, sendo necessários processos de extração e purificação mais rigorosos, o que torna este processo bastante oneroso. Além disso, a produção de matéria-prima em grande escala é dependente de fatores climáticos, nem sempre favoráveis, e de difícil controle (LONGO e SÁROMAN, 2006; DOS SANTOS et al., 2016; NARWAL et al., 2016; NOVAK et al., 2016).

A síntese química, ainda é o processo mais utilizado atualmente, visto que as reações são geralmente conduzidas na presença de catalisadores inorgânicos como ácidos, bases ou compostos à base de metais (BATISTELLA et al., 2012b), se caracterizando como não seletivas e agressivas, com a formação de produtos secundários, requerendo assim extensivas etapas de purificação e de pré-concentração para a obtenção dos produtos desejados (BICAS et al., 2010).

Além disso, o valor econômico do produto obtido quimicamente tem diminuído consideravelmente nas últimas décadas devido à grande exigência do mercado consumidor por substâncias de origem mais ecologicamente corretas (BICAS et al., 2010; BATISTELLA et al., 2012b; KHAN e RATHOD, 2015; KHAN et al., 2015).

A utilização de processos biotecnológicos, especialmente a catálise enzimática mediada por lipases tem sido apontada como um grande salto tecnológico na obtenção destes compostos, principalmente por reunir propriedades muito singulares, como a alta seletividade e especificidade, condições brandas de reação, ampla faixa de pH, além de o sistema poder operar na ausência de solvente orgânico, permitindo a obtenção de produtos com elevada pureza, gerando a diminuição de subprodutos e/ou resíduos tóxicos, e, conseqüentemente,

diminuindo o impacto ambiental (TOMIN et al., 2010; KAPOR e GUPTA, 2012b; DHAKE et al., 2013, HIRATA et al., 2016).

No entanto, em relação às enzimas, principalmente as livres, devemos considerar que as mesmas estão mais suscetíveis à inativação (por inibição ou desnaturação) por fatores físicos (temperatura, pressão, choque mecânica entre outros) ou químicos, resultantes da interação de certos compostos com a enzima (OZYILMAZ e GEZER, 2010; POPPE et al., 2015).

Para que a sua utilização seja economicamente viável e eficiente, o processo de imobilização vem como alternativa ao uso de enzima livre, principalmente pelo aumento das propriedades cinéticas, estabilidade térmica, química e operacional, permitindo maior controle do processo, qualidade do produto, recuperação e reutilização, além da possibilidade de utilização em processos contínuos (BICAS et al., 2010, GARCIA-GALAN et al., 2011; MENDES et al., 2013).

Resultados preliminares demonstraram o potencial do emprego do poliuretano como suporte para a lipase CALB, proporcionando um aumento significativo no rendimento (> 250%), na estabilidade térmica e operacional da enzima (NYARI et al., 2016).

Outro fator de extrema importância em reações de esterificação catalisadas por lipases é o emprego ou não de solvente orgânico no processo de síntese de ésteres, pois estes quando presentes podem apresentar inúmeras desvantagens no processo, entre elas, podemos citar: baixa estabilidade enzimática, desequilíbrio termodinâmico da reação, alta toxicidade, inflamabilidade e altos custos de recuperação e reutilização (CASTRO et al., 2004; GÜVENÇ et al., 2007).

Enquanto em reações *inseto* (livre) de solvente, proporciona vantagens como: possibilidade de purificação (menos componentes presentes no meio reacional ao final da reação), eliminação de solventes (produção), redução significativa nos custos de produção e no impacto ambiental, sendo considerados processos ambientalmente favoráveis (CASTRO et al., 2004; KUMAR et al., 2010).

No que tange o processo produtivo, um dos principais fatores a ser considerado é o modo/arranjo reacional, o qual pode ser realizado em sistema em batelada, com agitação mecânica (MACHADO et al., 2014) ou ultrassônica (MATTE et al., 2016) para a homogeneização do meio reacional e/ou ativação/indução do sistema reacional, bem como em sistema de fluxo contínuo (SOUZA e MIRANDA, 2013; MACHADO et al., 2014).

No sistema de agitação mecânica, a mistura dos reagentes não é uniforme e a transferência irregular de calor para a mistura reacional pode resultar em baixa reatividade,

seletividade (possibilidade de formação de subprodutos) e conversões (WEGNER et al., 2011; MACHADO et al., 2014).

O sistema de agitação ultrassônica, apesar de pouco explorado, vem como uma tecnologia alternativa para o sistema de agitação mecânica, principalmente por proporcionar reduções significativas do tempo de processamento e consumo energético, além de um aumento considerável nos rendimentos de conversão (ABOU-OKEIL et al, 2010; MATTE et al., 2016).

Tais características podem ser ocasionadas pela melhor transferência de massa entre os substratos (tornando a mistura mais homogênea), facilitando a dispersão do substrato através da enzima, além de ser considerada uma tecnologia “verde” (ABOU-OKEIL et al, 2010; MATTE et al., 2016).

O sistema em fluxo contínuo apresenta-se como uma alternativa ao sistema em batelada, principalmente por apresentar vantagens como: facilidade de automação, controle, segurança e confiabilidade do processo, possibilidade de escalonamento das reações e isolamento do produto formado (retira o produto do contato da enzima), além de proporcionar, em alguns casos, aumentos significativos no rendimento e na manutenção da eficiência catalítica do biocatalisador, diminuindo a taxa de cisalhamento e dos custos do processo (GLASNOV e KAPPE, 2011; HARTMAN et al., 2011; WEGNER et al., 2011; MACHADO et al., 2014).

Considerando as peculiaridades (vantagens e desvantagens) de cada processo, as quais, dependendo das condições operacionais empregadas, podem interferir/contribuir de maneira positiva ou negativa na síntese biocatalítica de ésteres em função de suas características e propriedades, além do seu alto valor agregado.

Nesse sentido o objetivo desse estudo foi avaliar a síntese enzimática dos ésteres de acetato de isoamila, butanoato de etila e oleato de etila, empregando o catalisador imobilizado (CALB imobilizada *in situ* poliuretano), em três sistemas distintos, dois sistemas em batelada (mecânico e ultrassônico) e de fluxo contínuo, em meio livre de solvente orgânico.

3.1 ACETATO DE ISOAMILA

O acetato de isoamila, em função de seu aroma e fragrância característico de banana, tem sido amplamente empregado como aditivo em diferentes processos produtivos, principalmente nos setores farmacêuticos, de cosméticos e de alimentos (flavorizantes e aromatizantes). Sua síntese se dá via reação de esterificação entre o ácido acético e o álcool isoamílico. A mesma pode ser obtida quimicamente ou enzimaticamente (DOS SANTOS et al., 2016; NARWAL et al., 2016; NOVAK et al., 2016).

A rota química normalmente emprega catalisadores homogêneos, como o ácido sulfúrico (NATALINO et al., 2014), ácido clorídrico, tolueno, ácido palmítico (DOS SANTOS et al., 2015), ácido propionico (XU e CHUANG, 1997), ácido tungstofosfórico (KHDER et al., 2008) e líquidos iônicos (YANG et al., 2015).

Também podem ser empregados catalisadores heterogêneos, tais como: sílicas (MIAO e SHANKS, 2011), óxidos metálicos, zeólitas (ALTIOKKA et al., 2013) argilas (CHITNIS e SHARMA, 1997), Lewatit MonoPlus S-100 e resinas (JAGADEESH et al., 2011; BAMUNUSINGHA et al., 2016; DE SILVA et al., 2016).

No entanto, a rota enzimática, empregando lipases como biocatalisadores, apresenta determinadas vantagens sobre a química, como por exemplo: condições brandas de reação, ampla faixa de pH, além de o sistema poder operar na ausência de solvente orgânico, diminuindo assim a geração de resíduos e, conseqüentemente, o impacto ambiental (TOMIN et al., 2010; KAPOR e GUPTA, 2012; DHAKE et al., 2013, HIRATA et al., 2016).

Na literatura diferentes processos, empregando lipases de diferentes fontes, são encontrados para a síntese do acetato de isoamila, os quais apresentam os mais variados resultados, seja de rendimento, conversão e estabilidade operacional (Tabela 3.1.1) (WOLFSON et al., 2010; MARTINS et al., 2013; SINGH et al., 2014; TOMKE e RATHOD, 2015; NARWAL et al., 2016).

Nesse contexto, o presente estudo, empregando o catalisador imobilizado (CALB imobilizada *in situ* poliuretano), teve como objetivo maximizar o processo de síntese de ésteres de acetato de isoamila em sistema de agitação em batelada de agitação (mecânica e ultrassônica) e um em fluxo contínuo em sistema livre de solvente e verificar sua capacidade de reutilização em repetidos ciclos de utilização.

Tabela 3.1.1 - Exemplos de lipases aplicadas na síntese de ésteres de acetato em sistema de agitação mecânica e ultrassônica.

Enzima	Temp. (°C)	ME (g/%)	T. (h/min)	Sistema	Conversão (%)	Autor
<i>Cepacia sp</i>	30	12,5%	5 h	agitação mecânica	77,1	Silva et al. (2013)
<i>Bacillus aerius</i>	55	1%	-		68	Narwal et al. (2016)
CALB	30	12%	8 h		80	Güvenç et al. (2007)
	45,8	-	36,5 s	-	35	Pohar e Plazl (2009)
	60	-	24 h	agitação mecânica	100	Romero et al. (2005a)
	80	0.1 g	5 h	-	73	Wolfson et al. (2010)
	30	10%	8,6 h	agitação mecânica	49	Singh et al. (2014)
					65	
<i>Rhizomucor miehe</i>	55	-	24 h	agitação mecânica	40	de Maria et al. (2005)
	40	-			35	
	40	-	72 h		95	Kanwar et al. (2002)
<i>Pseudomonas sp.</i>	30	-	12 h	agitação mecânica	-	
<i>Mucor miehei</i>	60	-	48 h		53	Ved e Pai (1996)
Novozym 435	34,8	1,04%	0,5 h		100	Azudin et al. (2013)
	30	-	-	75	Güvenç et al. (2007)	
	46	7%	2,5 h	agitação ultrassônica	94	Martins et al. (2013)
	50	0,4%	5-10 min	95	Mat Radzi et al. (2005)	
	40	-	20 min	agitação mecânica	99	Tomke e Rathod (2015)
	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme)	40	3%	3 h	agitação ultrassônica	96,1

*Parâmetros fixos: Temp. (°C) = Temperatura (°C); ME = Massa de Enzima (g/% ou mg/mL ou g/L) e T = Tempo (horas/minutos) e o sistema de agitação mecânica (rpm).

3.1.1 Materiais e Métodos

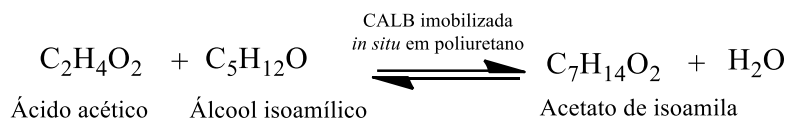
Além da enzima lipase B de *Candida antarctica* - CALB (Novozyme NZL-102) imobilizada em poliuretano, foram utilizados os seguintes solventes ácido acético (ou ácido etanoico) (Vetec), álcool isoamílico (Quimex), diclorometano (Vetec) e acetona (FMaia).

Os equipamentos utilizados foram agitador orbital (Marconi MA-410); balança analítica (Shimadzu); bomba a vácuo TE-0,58 (Tecnal); estufa (Fanem, modelo 320SE); pH metro MA- 522 (Marconi); refrigerador (Consul); ultrassom (Unique ultraSonic Cleaner, modelo: USC- 1800A, frequência US 40 KHz, potência de até US 132 W); sistema Ásia 110 de fluxo contínuo (Syrris); CG-FID Hewlett–Packard (HP) - Modelo CG-6890C, coluna Sigma-Aldrich β -DEX 325 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m) e coluna RT-WAX - 30 m (0,32 mm).

3.1.2 Síntese do éster acetato de isoamila

A Fórmula molecular do éster de acetato de isoamila está demonstrada através da Figura 3.1.1.

Figura 3.1.1 - Fórmula molecular do éster de acetato de isoamila.



A síntese de acetato de isoamila via reação de esterificação entre o ácido acético e o álcool isoamílico foi realizado em triplicata, em frascos de 50 mL, livre de solvente orgânico, mantendo-se fixa a massa total de substrato (ácido acético + álcool isoamílico) (5 g), massa de catalisador (CALB livre ($\approx 10\%$ de enzima em pó - 1 g de enzima para 9 g de H_2O) e CALB imobilizada *in situ* poliuretano PU ($\approx 2\%$ de enzima)) (0,5 g).

Após cada reação, o meio reacional foi submetido a uma etapa de filtração simples para separação do catalisador imobilizado do meio reacional, o qual foi armazenado em refrigerador (2 a 8°C) para posterior análise por cromatografia gasosa (CG).

Paralelamente, foi realizado um ensaio em branco, o qual foi conduzido na ausência do catalisador, nas mesmas condições reacionais (razão molar, agitação e temperatura), minimizando assim possíveis efeitos do processo.

3.1.2.1 Reações em sistema de batelada: agitação mecânica e ultrassônica

Avaliação do tempo de reação

Inicialmente foi realizado um estudo cinético para avaliar o efeito do tempo reacional (0 a 400 minutos) em relação ao rendimento em termos de conversão em acetato de isoamila. A condição reacional empregada nesta etapa foi a do ponto central do Delineamento Composto Central Rotacional DCCR que será empregado posteriormente para a etapa de otimização do processo e corresponde a uma razão molar ácido acético:álcool isoamílico de 1:7 e temperatura de 50°C.

Para o sistema mecânico a agitação foi fixada em 160 rpm, já para o sistema ultrassônico a potência foi fixada em 60% em relação a potência do banho que é 132 W, ou seja, em 79,2 W e as análises foram realizadas em triplicata.

3.1.2.2 Otimização do processo de síntese do acetato de isoamila

O processo de otimização da síntese do acetato de isoamila foi conduzido mediante o emprego de um DCCR e as análises foram realizadas em triplicata.

Reações em batelada

Sistema de agitação mecânica

Para o sistema mecânico as variáveis estudadas foram à razão molar ácido acético:álcool isoamílico (1:4,18 - 1:9,82) e a temperatura reacional (35,9 - 64,1°C), mantendo-se fixa o sistema de agitação mecânica (Shaker - modelo MA 420 - 600 Watts, Modelo Marconi), em 160 rpm e o tempo reacional de 360 minutos, de acordo com metodologia de Ferraz (2014) com modificações.

Sistema de agitação ultrassônica

Para o sistema ultrassônico as variáveis estudadas foram à razão molar ácido acético:álcool isoamílico (1:3,64 - 1:10,36), a temperatura reacional (24,8 - 75,2°C) e a potência ultrassônica (26,4 - 93,6%) (Unique ultraSonic Cleaner, USC-1800A, US 40 KHz, US 132 W), mantendo-se fixo o tempo reacional de 60 minutos.

Reações em sistema de fluxo contínuo

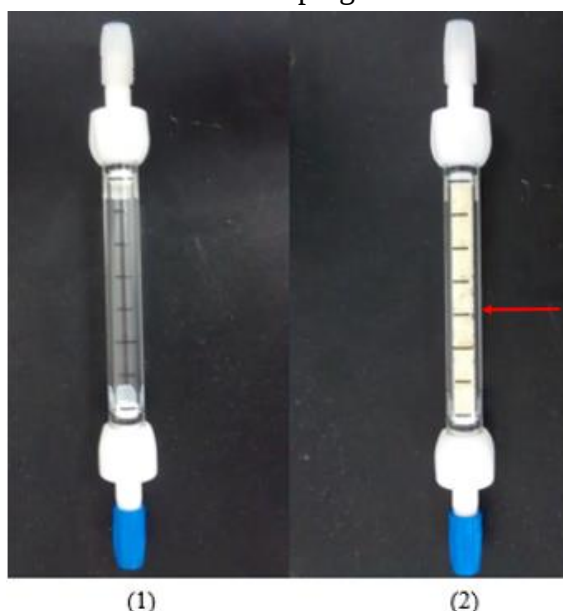
Para a reação de síntese em fluxo contínuo optou por escolher as condições reacionais referentes à condição otimizada no sistema em batelada submetido à agitação mecânica,

(temperatura de 64,1°C e razão molar ácido:álcool de 1:7), pois o reator utilizado no sistema de fluxo contínuo não apresenta sistema ultrassônico acoplado.

Primeiramente o substrato (meio reacional) foi preparado mediante a mistura do ácido acético e o álcool isoamílico na razão molar desejada. Após uma etapa de homogeneização do sistema mediante agitação por 15 minutos (agitação mecânica de 160 rpm) o mesmo foi aquecido até a temperatura desejada para o ensaio e as análises foram realizadas em duplicata.

O reator utilizado foi de escoamento ascendente, com coluna Omnifit (6.6mm x 10mm) com 0,3421cm² de base e altura variada em função da massa de imobilizado empregada. Essa coluna, empacotada com o catalisador imobilizado (0,34 e 0,66 g), ilustrado Figura 3.1.2.

Figura 3.1.2 - Coluna de leito fixo empregada no sistema de fluxo contínuo.



*Coluna de leito fixo utilizada no sistema de fluxo contínuo, onde (1) detalhe do lúmen da coluna onde o catalisador imobilizado é adicionado e (2) apresenta a seta representando a altura que o catalisador foi preenchido ao longo da coluna, em centímetros (cm), para cálculo do volume da coluna.

Esta é alimentada com o meio reacional de forma ascendente através de uma bomba de vazão controlada (10 a 1000 µL/minuto), que é determinada através do tempo de residência (tempo de reação), onde o produto recolhido em alíquotas na saída da coluna (SILVA et al., 2015). O tempo reacional, denominado tempo de residência, foi definido pela razão entre o volume livre do reator e a velocidade do fluxo do meio reacional pelo reator, como demonstrado Equação 3.1.1 (SOUZA e MIRANDA, 2013).

$$TR = \frac{V_r}{V_f} \quad (3.1.1)$$

Onde: TR = Tempo de Residência, V_r = volume livre do reator e V_f = velocidade do fluxo (solução dos reagentes).

Cálculo da porosidade do leito

A fração de vazios ou porosidade média é definida como a razão entre o volume vazio em relação ao volume total do leito, a qual pode influenciar os perfis de velocidade, podendo causar perda de carga ao longo do leito. Esta é uma propriedade estrutural global do leito, sendo utilizado para caracterizar o espaço total disponível para o fluxo, como apresentado de acordo com a Equação 3.1.2 (DALLA ROSA, 2009).

$$\varepsilon_l = 1 - \left(\frac{P_2 - P_1}{V \times \rho_s} \right) \quad 3.1.2$$

Onde: ε_l = porosidade do leito, P_1 = peso de uma proveta, P_2 = peso da proveta com o catalisador imobilizado, V = volume lido na proveta (V) e ρ_s = densidade catalisador imobilizado.

3.1.2.3 Determinação da conversão (%)

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa (GC) com detector de ionização de chama (CG-FID), empregando uma coluna capilar apolar (modelo RT-WAX) de 30 m de comprimento, com diâmetro interno de 0,32 mm. A temperatura inicial da coluna foi de 40°C, permanecendo por 5 minutos, com elevação constante, a uma taxa de 14°C/minuto, até 180°C, permanecendo nesta temperatura por mais 5 minutos. A quantidade de amostra injetada foi de 1 µL. Previamente a análise, as amostras do meio reacional (100 µL) foram diluídas a 1 mL mediante a adição de 900 µL de diclorometano.

A porcentagem de conversão foi calculada com base na redução da área de reagente limitante, considerando a estequiometria da reação (Equação 3.1.3).

$$C = \frac{Ab - Aa}{Ab} \times 100 \quad (3.1.3)$$

Onde: C (%) = Conversão, Ab = área do sinal referente ao ácido no ensaio em branco (corresponde ao ensaio sem enzima no tempo zero) e Aa = área do sinal referente ao ácido na amostra submetida a condição de síntese.

3.1.2.4 Estabilidade Operacional

O número dos ciclos operacionais do catalisador imobilizado para a síntese do éster acetato de isoamila, foi avaliada empregando a condição otimizada do DCCR, onde após cada reação o catalisador foi submetido a um processo de filtração simples (papel filtro), retirando-se o excesso de meio reacional, e submetido a uma nova etapa reacional. Este processo foi realizado sucessivamente até obter resultados de conversão inferiores a 50% da conversão inicial e as análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados foram expressos em forma conversão, a qual considera a conversão inicial como 100%. (Equação 3.1.4).

$$CR(\%) = \frac{C_{final}}{C_{inicial}} \times 100 \quad (3.1.4)$$

Onde: $CR(\%)$ = Conversão residual, C_{final} = Conversão final e $C_{inicial}$ = Conversão inicial.

3.1.2.5 Análise Estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamento de experimentos, com auxílio do software Statistica versão 5.0, com nível de significância de 95% de confiança.

3.1.3 Resultados e Discussões

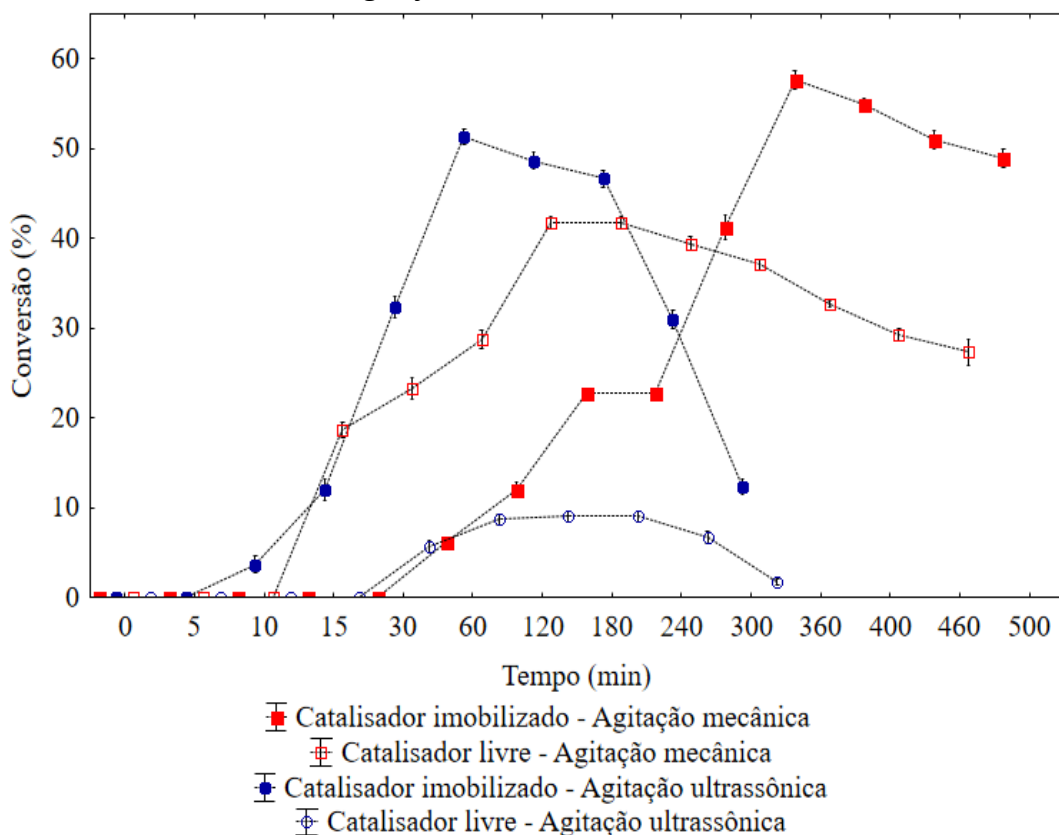
Avaliação do tempo de reação

Segundo Shih et al. (2007) a seleção de intervalo de tempo de reação necessita ser extremamente precisa nos estudos de otimização empregando o DCCR, caso contrário, a condição ideal da síntese, através da análise estatística e dos gráficos de contorno, pode não ser encontrada dentro da região experimental avaliada.

Para tanto, avaliou-se a síntese de éster de acetato de isoamila na condição do ponto central do Delineamento Composto Central Rotacional DCCR, em função do tempo de reação (de 0 a 400 minutos).

A evolução da conversão em acetato de isoamila em função do tempo reacional empregando catalisador livre e imobilizado para os sistemas em batelada submetidos à agitação mecânica e ultrassônica encontram apresentados na Figura 3.1.3.

Figura 3.1.3 - Evolução da conversão do éster de acetato de isoamila em função do tempo reacional (minutos) empregando catalisador livre e imobilizado para os sistemas em batelada de agitação mecânica e ultrassônica.



A conversão máxima, com aproximadamente ≈ 10 a 40% e de ≈ 50 a 60% empregando catalisador livre e imobilizado, apresentando comportamento similar para ambos os catalisadores, tendo apenas a principal diferença o tempo de reação necessário para obtê-la.

Este comportamento está coerente com o rendimento de imobilização ($> 1.000,0\%$), a qual indica o efeito positivo do processo imobilização sobre a atividade (conversão) do catalisador livre, no que se refere às reações de esterificação avaliadas.

Cabe salientar que os ensaios foram realizados com a mesma massa de catalisador (livre e imobilizado). Neste contexto, este efeito é mais pronunciado se considerarmos que na massa do imobilizado ($0,5\text{ g}$) empregado no ensaio temos 5 vezes menos massa de enzima ($0,01\text{ g}$) em relação ao ensaio conduzido com a enzima livre (suspensão aquosa contendo $0,05\text{ g}$ de enzima).

A principal diferença entre os catalisadores livre e imobilizado, está presente nos tempos reacionais (≈ 120 e 360 minutos, respectivamente) com as melhores conversões (≈ 40 e 60% , respectivamente) para sistema de agitação mecânica. Enquanto que para o sistema de

agitação ultrassônica, para ambos os catalisadores, livre e imobilizado apresentaram conversões (≈ 55 e 10% , respectivamente) em 60 minutos reacionais.

O sistema ultrassônico, com 60 minutos reacionais, apresentou uma redução significativa (aproximadamente 80%) do tempo reacional quando comparado com o sistema mecânico, a qual necessitou de 360 minutos de reação para ter aproximadamente a mesma taxa de conversão para o catalisador imobilizado.

Esta tendência está coerente com o observado por outros autores, os quais demonstram que o emprego do ultrassom favorece o aumento da velocidade das reações, quando comparado a outros sistemas de agitação em batelada, como a mecânica ou magnética empregando catalisador livre e imobilizado.

Além disso, o emprego do catalisador livre para esse sistema de agitação ultrassônico, não apresentou resultados satisfatórios em termos de conversão, obtendo – se assim, em estudar seu comportamento apenas em sistema mecânico. Esse fato pode ser devido a reação que ocorreu entre os radicais hidroxila ou de hidrogênio formadas na reação com a estrutura da proteína, obstruindo os sítios ativos (enzima) da proteína, que no caso o catalisador livre está mais suscetível e ao mesmo tempo, diminuir a estabilidade, provocando até a sua inativação ou desnaturação.

Zheng et al. (2012) conseguiram reduzir o tempo reacional para a síntese de flavonóides com ésteres de ácidos graxos insaturados, catalisada por lipase Novozym 435, de 48 para 24 horas reacionais, substituindo o sistema em batelada de agitação mecânica e ultrassônica. Em ambos os casos os rendimentos observados foram superiores a 83% .

Bansode e Rathod (2014) empregando o ultrassom na reação de esterificação entre o ácido butanoico e o álcool isoamílico, com a lipase imobilizada Novozym 435 (potência ultrassônica de 70 W (25 kHz), 60°C , razão molar de ácido:álcool (1:2) e massa de enzima imobilizada de 2%), observaram uma conversão de 83% em 10 horas de reação em sistema mecânico. A conversão do butirato de isoamila aumentou para 96% , em 3 horas reacionais, quando o sistema em batelada de agitação mecânica foi substituído pelo sistema de agitação ultrassônico.

Martins et al. (2011b) na reação de esterificação de ácido acético e álcool etílico para a síntese de acetato de etila, catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* (Novozym 435), obtiveram conversão de $91,5\%$ em sistema mecânico, após 2,5 horas de reação (40°C , razão molar de substrato de 1:3 (ácido:álcool), teor de enzima de $7,5\%$ e de água de $0,25\%$). Os mesmos autores, realizando outro estudo empregando o sistema de batelada ultrassônico para

a síntese de acetato de etila obtiveram conversão de 96% após de 0,5 horas de reação (MARTINS et al., 2013).

Alves et al. (2014) observaram, para a síntese enzimática do acetato de butila empregando a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em esferas de estireno-divinilbenzeno, um aumento na conversão de 50% para 90% mediante o emprego do ultrassom. Efeito similar foi observado por Graebin et al. (2012) para este mesmo éster empregando como catalisador a lipase Novozym 435.

Zenevicz (2015) empregando a lipase Lipozyme TL IM na hidrólise enzimática do óleo de soja, na presença e ausência do ultrassom (potência ultrassônica de 132 W). O autor observou uma conversão de aproximadamente 60% em 16 horas reacionais para o sistema mecânico e, em 14 horas para o sistema ultrassônico, indicando um efeito promotor do ultrassom em reações de ésteres.

Martins (2012) observou para a lipase B de *Candida antarctica* (Novozym 435) um aumento na conversão do acetato de butila de 90 para 94% quando o sistema foi submetido à irradiação ultrassônica.

Segundo Liu et al. (2008) a tecnologia ultrassônica pode ser reconhecida como um método eficaz em reações de esterificação, podendo ser um recurso eficaz tanto na mistura dos ácidos e álcoois, quanto nos aumentos na velocidade de formação de gotículas, da superfície de contato e das forças coesivas no meio reacional, além de proporcionar uma energia de ativação suficiente para iniciar a reação mais rapidamente.

O sistema ultrassônico também pode atuar na estrutura da enzima, promovendo alterações, as quais proporcionam uma absorção maior de energia, favorecendo a reação sem interromper a função da enzima, aumentando assim significativamente sua estabilidade, bem como sua atividade catalítica e, conseqüentemente, a conversão do éster (KWIATKOWSKA et al., 2011; MARTINS et al., 2013; ZHAO et al., 2016).

Outra característica observada, é que ambos os ensaios apresentam uma mesma tendência, um aumento da conversão do ácido precursor até um determinado tempo reacional, o qual difere entre os sistemas, seguido de uma diminuição desta conversão. Esta tendência sugere à presença de dois mecanismos reacionais (esterificação e hidrólise) vinculadas as lipases. Inicialmente, nos minutos iniciais, temos a predominância da reação de esterificação, a qual gera como produto, além do éster, a água. Com o aumento da concentração de água no sistema reacional, a reação de hidrólise se manifesta, mediante o consumo do éster, levando a uma diminuição da taxa de conversão (LI et al., 2015), mais facilmente observada no sistema

ultrassônico devido a água ficar disponível mais rapidamente proporcionado pelo aumento na velocidade de reação,

A queda mais acentuada na conversão é observada no sistema ultrassônico empregando o catalisador imobilizado, atingindo 15% de conversão, o qual corresponde a uma perda de aproximadamente 70% na mesma, em 300 minutos reacionais, estando coerente com o efeito promotor ou promissor do ultrassom em reações, seja de síntese quanto de hidrólise.

Ao analisar os resultados obtidos, dentro de um contexto geral, percebe-se que em um processo de produção de ésteres via esterificação, devido à reação ser reversível, é extremamente importante à otimização dos tempos reacionais, uma vez que a mesma interfere significativamente no rendimento reacional, bem como nos gastos energéticos e, portanto, na viabilidade econômica do processo (CHIARADIA et al., 2012; AZUDIN et al., 2013; SBARDELOTTO, 2015).

A partir dos resultados obtidos para síntese do acetato de isoamila para os ensaios de otimização, optou-se em fixar os tempos reacionais de 360 e 60 minutos, para os sistemas de agitação em batelada, mecânica e ultrassônica, respectivamente.

3.1.3 Reações de batelada

3.1.3.1 Sistema de agitação mecânica

A matriz do DCCR 2² completo para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema batelada de agitação mecânica em função das variáveis estudadas razão molar (ácido:álcool) e temperatura (°C), bem como a resposta acompanhada (conversão do ácido acético), encontra-se apresentado na Tabela 3.1.2.

De acordo com os resultados apresentados empregando o catalisador imobilizado, as maiores conversões, sendo superiores a superiores (> 87%), foram observadas para os ensaios conduzidos empregando elevadas temperaturas e razão molar ácido:álcool (ensaios 4, 6, 8, 9, 10 e 11), indicando um efeito positivo destas variáveis, com a maximização da conversão de 94,4% foi observado no ensaio 6 (temperatura de 64,1°C e razão molar ácido:álcool 1:7) em 360 minutos reacionais.

Comportamento semelhante foi apresentado empregando o catalisador livre, com conversões superiores (> 50%) nos mesmos ensaios empregando elevadas temperaturas e razões molares ácido:álcool (ensaios 4, 6, 8, 9, 10 e 11), com a maximização da conversão de 57% observado no ensaio 6 (temperatura de 64,1°C e razão molar ácido:álcool 1:7) em 120 minutos reacionais.

Tabela 3.1.2 - Matriz do DCCR 2² completo empregando catalisador livre e imobilizado em função das variáveis estudadas razão molar (ácido:álcool) e temperatura (°C) para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação mecânica.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão molar (ácido:álcool)	Conversão do ácido acético (%)	
			Livre	Imobilizado
1	-1 (40)	-1 (1:5)	12,7 ± 2,4	32,8 ± 2,1
2	1 (60)	-1 (1:5)	25,3 ± 0,3	44,3 ± 1,5
3	-1 (40)	1 (1:9)	24,0 ± 2,7	62,0 ± 0,3
4	1 (60)	1 (1:9)	59,3 ± 1,7	90,5 ± 0,8
5	-1,41 (35,9)	0 (1:7)	35,6 ± 0,0	21,4 ± 1,9
6	1,41 (64,1)	0 (1:7)	57,7 ± 1,6	94,4 ± 1,3
7	0 (50)	-1,41 (1:4,18)	9,5 ± 1,0	38,8 ± 2,2
8	0 (50)	1,41 (1:9,82)	57,1 ± 0,6	88,6 ± 1,1
9	0 (50)	0 (1:7)	51,1 ± 0,2	86,9 ± 1,6
10	0 (50)	0 (1:7)	54,5 ± 0,2	88,4 ± 1,4
11	0 (50)	0 (1:7)	53,0 ± 0,3	87,0 ± 1,2

*Parâmetros fixos: massa de substrato (5 g) (Livre = $\approx$ 10 % de enzima em pó - 1 g de enzima para 9 g de H₂O) (Imobilizado = $\approx$ 2% de enzima), massa de catalisador (0,5 g), tempo de reação de 360 minutos (catalisador imobilizado) e 120 minutos (catalisador livre) e 160 rpm de agitação mecânica.

Nesse sentido é possível observar que a conversão do ácido acético quando usado o catalisador imobilizado, independentemente do ensaio, apresentou maiores conversões em relação o catalisador livre. Esta tendência está coerente com os resultados observados para os estudos cinéticos e do rendimento de imobilização, destacando o efeito promotor do processo de imobilização sobre a conversão CALB para a síntese do éster.

Pois o processo de imobilização da CALB em poliuretano trata – se de um método de confinamento (inclusão de matriz), onde a enzima é adicionada no momento do preparo do suporte, onde as moléculas de enzimas ficam aprisionadas entre as malhas do polímero, por ligações covalentes entre enzima e suporte, as quais favorecem muito a estabilidade da enzima, evitando assim a possibilidade de sua desnaturação e alterações indesejáveis, permitindo a permeabilidade do substrato entre a matriz do suporte e a saída do produto (GARCÍA-ARRAZOLA et al., 2009).

Além disso, a velocidade de difusão dos substratos e dos produtos é um fator limitante para enzimas imobilizadas, pois influenciam diretamente, contribuindo na integridade

estrutural, polaridade e estabilidade da proteína (enzima) (LIU, et al., 2007). Esta tendência esta relacionada com varias fatores como, a disponibilização facilidade do acesso de novos sítios ativos, possibilidade da reutilização do catalisador imobilizado, facilidade na separação do meio reacional, sem contaminação do produto final e facilidade no controle do processo (NYARI et al., 2016).

O efeito positivo observado para o aumento da temperatura na reação está coerente com relatados observados na literatura, e devem-se principalmente as propriedades endotérmicas (ΔH positivo) das reações de esterificação. Entalpias positivas (ΔH) foram observadas por diferentes autores para a síntese enzimática de ésteres, como o 6-O-glucosil decanoato (GUMEL et al., 2011), o oleato de isoamila (LAGE et al., 2016), palmitato de metila, estearato de metila, oleato de metila, levulinato de hexila (BADGUJAR e BHANAGE, 2015) e na acilação do flavonóide rutina com ácido láurico, empregando como catalisador as lipases de *Candida antarctica B*, *Thermomyces lanuginosus*, *Mucor miehei* e *Aspergillus niger* imobilizadas em diferentes suportes, algumas comerciais e outras sintetizadas em laboratório.

A natureza endotérmica da reação de esterificação, a qual se caracteriza por ser reversível, ou seja, apresenta um equilíbrio químico entre reagentes e produtos, indica que a mesma ocorre com absorção de calor. Neste contexto, o aumento da temperatura proporcionará no sistema reacional em equilíbrio um deslocamento para os produtos (ATKINS, 2011), aumentando o rendimento ou conversão reacional, como as observadas neste estudo, independente da razão molar avaliada (ensaio 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6), para ambos os catalisadores empregados.

Outro fator que pode estar contribuído com o efeito positivo da temperatura é o aumento da indução da transferência de massa devido, principalmente, a diminuição da densidade e viscosidade do meio reacional proporcionada pelo aumento da temperatura. A viscosidade é uma propriedade que varia proporcionalmente com a força de atração entre as moléculas aumento das distâncias intermoleculares, diminuindo assim as forças atrativas entre as moléculas, tornando o substrato mais difusível, bem como homogêneo, devido ao aumento da solubilidade entre os reagentes (GRANJEIRO et al., 2007).

O efeito da concentração dos reagentes, bem como da razão molar tem sido reportada como um importante parâmetro a ser considerado nas reações de esterificação (GUILLÉN et al., 2012). Seus efeitos podem estar vinculados a dois fatores: i) deslocamento do equilíbrio químico e ii) diminuição da acidez do meio (MARTINS et al., 2014).

Por ser uma reação reversível (esterificação), o excesso de álcool por si só pode afetar positivamente o processo de conversão, observados para ambos os catalisadores (ensaios 1 e 3, 2 e 4, 7 e 8), mediante o deslocamento do equilíbrio para os produtos, ou seja, produção do éster.

Além disto, altas concentrações de álcool (nucleófilo/receptor de acila) geralmente levam a níveis mais elevados de conversão devido à disponibilidade de excesso de nucleófilo para transferência do substrato, porém, existe um limite para adição do mesmo, seu excesso, ou seja, acima de seu nível crítico, pode resultar em taxas iniciais de reação mais baixas, reduzindo as propriedades intrínsecas de desnaturação de ácidos em lipases. A estrutura do álcool isoamílico, por ser uma cadeia ramificada, podendo dificultar a formação de micelas em volta da enzima imobilizada, facilitando assim a solubilidade do produto e a transferência de massa no sistema reacional (CHIARADIA et al., 2012; AZUDIN et al., 2013; SBARDELOTTO, 2015).

O excesso de álcool também proporciona uma redução da acidez (aumento do pH) e das propriedades intrínsecas de desnaturação da lipase pelo ácido, a qual está relacionada ao seu acúmulo na camada de hidratação da enzima (PAROUL, 2011). Alterações de pH têm sido relatadas por alguns pesquisadores como um fator importante na atividade das enzimas, pois altera o microambiente onde a enzima está inserida. Neste aspecto, as enzimas imobilizadas apresentam mais resistência a essas variações (MARTINS et al., 2014) e conseqüentemente apresentam maiores conversões como observados em nosso estudo.

Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O modelo foi validado pela análise de variância ($F_{cal}(13,04) > F_{tab}(4,1)$) com um coeficiente de correlação (R^2) = 0,96 (Equação 3.1.5) (Apêndices 3.1.1 e 3.1.2) para o catalisador livre em sistema de agitação mecânica.

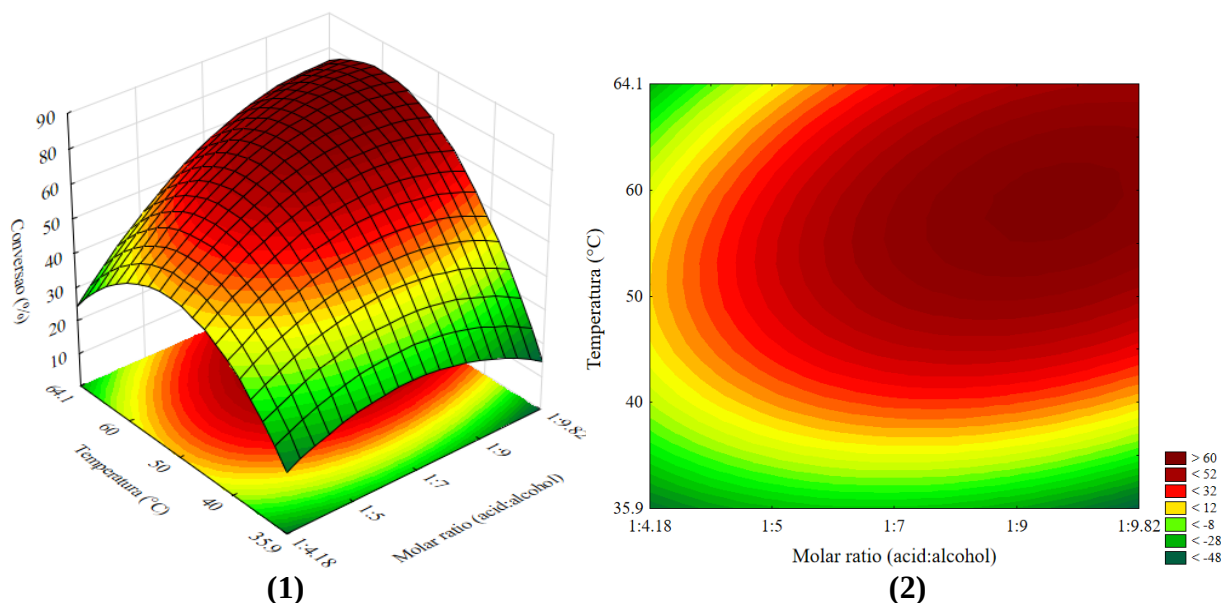
$$\text{Conversão (\%)} = 52,90 + 9,58T - 5,55T^2 + 14,41R - 12,26R^2 + 5,67T.R \quad (3.1.5)$$

Onde: T = temperatura (°C) e R = razão molar (ácido acético:álcool isoamílico).

As Figuras 3.1.4 (1) e (2) apresentam a superfície de resposta e a curva de contorno empregando o catalisador livre referente aos efeitos das interações entre a variável razão molar (ácido acético:álcool isoamílico) e da temperatura em sistema de agitação mecânica. Observa-se que as maiores conversões dos ésteres de acetato de isoamila empregando o

catalisador livre foram alcançados na região em temperaturas (entre 56 e 61°C) e razão molar de ácido acético:álcool isoamílico ($\approx 1:9$).

Figura 3.1.4 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando catalisador livre para a síntese do éster de acetato de isoamila em sistema de agitação mecânica.



Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O modelo foi validado pela análise de variância ($F_{\text{cal}} (30,97) > F_{\text{tab}} (4,01)$) com um coeficiente de correlação (R^2) = 0,98 (Equação 3.1.6) (Apêndices 3.1.3 e 3.1.4) para o catalisador imobilizado em sistema de agitação mecânica.

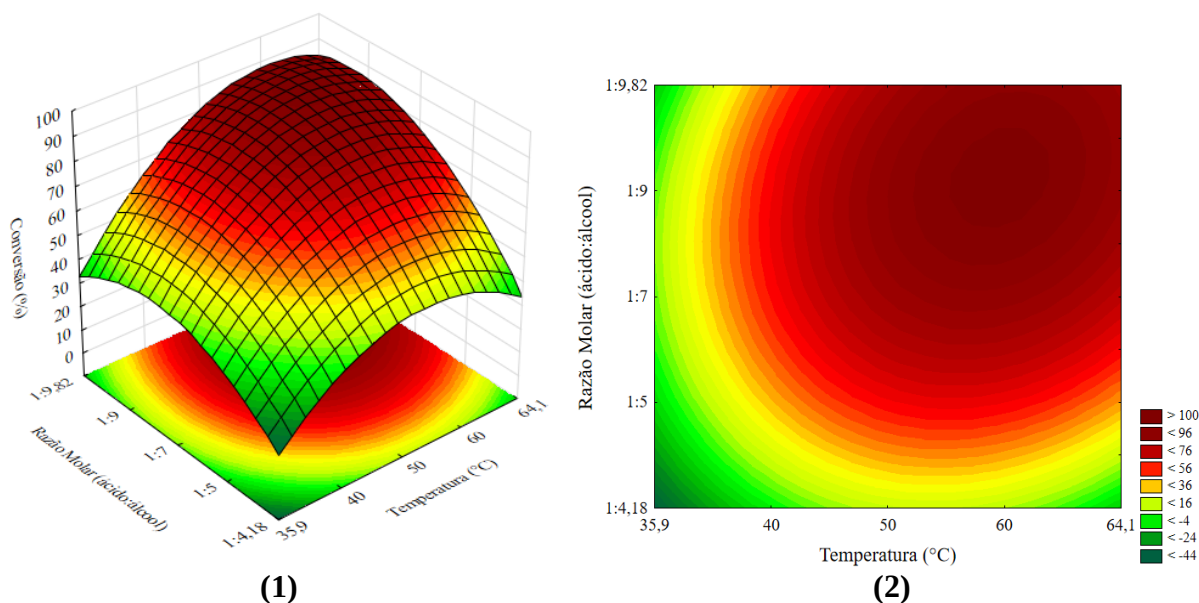
$$\text{Conversão (\%)} = 84,74 + 16,49R - 9,19R^2 + 16,86T - 11,24T^2 + 4,25T.R \quad (3.1.6)$$

Onde: T = temperatura (°C) e R = razão molar (ácido acético:álcool isoamílico).

As Figuras 3.1.5 (1) e (2) apresentam a superfície de resposta e a curva de contorno para o catalisador imobilizado referente aos efeitos das interações entre a variável razão molar (ácido acético:álcool isoamílico) e da temperatura em sistema de agitação mecânica.

Observa-se que as maiores conversões dos ésteres de acetato de isoamila empregando o catalisador imobilizado foram alcançados na região em razão molar de ácido acético:álcool isoamílico (entre 1:88 a 1:91) e temperatura (entre 56 e 61°C).

Figura 3.1.5 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) para a síntese do éster de acetato de isoamila para o catalisador imobilizado em sistema de agitação mecânica.



Em relação à conversão, os valores encontrados ($> 87\%$), apesar de significativos e em concordância com a literatura para a síntese do acetato de isoamila frente a diferentes lipases livres e imobilizadas em diferentes suportes (Tabela 3.1.1) (KARAGOZ et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010; WOLFSON et al., 2010; SILVA et al., 2013a,b; AFSHAR et al., 2015; KHAN e RATHOD, 2015; YANG et al., 2015; NARWAL et al., 2016; NOVAK et al., 2016; ROJAS et al., 2016a,b, entre outros), demandam elevados tempos reacionais (> 360 minutos). Uma das formas de redução deste tempo, o qual pode ser acompanhado por um aumento da conversão, pode ser mediante o emprego de novas tecnologias, como a agitação ultrassônica, ou de desenhos reacionais, como em fluxo contínuo.

3.1.3.2 Sistema de agitação ultrassônica

A matriz do DCCR 2^3 completo para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema batelada com agitação ultrassônica, empregando o catalisador imobilizado, em função das variáveis estudadas razão molar (ácido:álcool), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e potência ultrassônica (%), bem como a resposta acompanhada (conversão do ácido), encontra-se apresentado na Tabela 3.1.3.

Os resultados apresentam uma tendência similar à observada para o sistema batelada, com agitação mecânica, com as maiores conversões ($> 90\%$) sendo observadas para os ensaios conduzidos empregando, as condições referentes aos níveis positivos destas variáveis,

ou seja, condições de temperaturas e razão molar (ácido:álcool) superiores (ensaios 8, 10, 12 e 14) ou iguais a do ponto central (ensaios 15, 16 e 17) em 60 minutos reacionais.

Tabela 3.1.3 - Matriz do DCCR 2³ completo empregando o catalisador imobilizado, em função das variáveis razões molares (ácido:álcool), temperatura (°C) e potência ultrassônica (%) para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação ultrassônica.

Ensaios	Temperatura (°C)	Razão molar (ácido:álcool)	Potência ultrassônica (%)	Conversão do ácido acético (%)
1	-1 (35)	-1 (1:5)	-1 (40)	32,5 ± 1,4
2	-1 (35)	-1 (1:5)	1 (80)	72,9 ± 3,1
3	-1 (35)	1 (1:9)	-1 (40)	60,2 ± 3,7
4	-1 (35)	1 (1:9)	1 (80)	78,6 ± 0,4
5	1 (65)	-1 (1:5)	-1 (40)	63,3 ± 0,2
6	1 (65)	-1 (1:5)	1 (80)	80,6 ± 1,8
7	1 (65)	1 (1:9)	-1 (40)	83,3 ± 2,2
8	1 (65)	1 (1:9)	1 (80)	95,4 ± 0,8
9	- 1,68 (24,8)	0 (1:7)	0 (60)	43,8 ± 3,8
10	1,68 (75,2)	0 (1:7)	0 (60)	92,0 ± 0,6
11	0 (50)	- 1,68 (1:3,64)	0 (60)	72,7 ± 0,5
12	0 (50)	1,68 (1:10,36)	0 (60)	92,8 ± 1,1
13	0 (50)	0 (1:7)	- 1,68 (26,4)	57,7 ± 2,3
14	0 (50)	0 (1:7)	1,68 (93,6)	91,9 ± 0,9
15	0 (50)	0 (1:7)	0 (60)	92,7 ± 0,2
16	0 (50)	0 (1:7)	0 (60)	94,6 ± 0,7
17	0 (50)	0 (1:7)	0 (60)	92,9 ± 1,2

*Parâmetros fixos: massa de substrato (5 g), massa de catalisador (0,5 g) e tempo de reação de 60 minutos em agitação ultrassônica.

Esta tendência sugere um efeito positivo com aumento das condições das variáveis estudadas, o qual pode ser mais bem visualizado quando analisadas independentemente: temperatura (ensaios 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8), razão molar ácido:álcool (ensaios 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, 6 e 8) e potência do ultrassom (ensaios 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8). Corroborando com esta tendência o fato de que quando, no mínimo, uma das variáveis foi inferior ao ponto central foi observada uma diminuição nas conversões.

Cabe destacar que este efeito positivo para cada variável é mais pronunciado nos níveis inferiores das demais variáveis. Por exemplo, o efeito da potência ultrassônica foi mais pronunciado nas menores temperatura (35°C) e razão molar (1:5); para a temperatura, nas menores razões molares (1:5) e potência (40%) e para a razão molar, nas mínimas temperaturas (35°C) e potência ultrassônicas (40%), proporcionando um aumento significativo na conversão do éster.

Os resultados observados para o sistema ultrassônico, com uma região de elevada conversão (> 90%) próxima ao ponto central, sugere uma otimização do sistema, a qual é obtida em um tempo de aproximadamente 60 minutos, ou seja, 6 vezes menor que o observado para o sistema com agitação mecânica (360 minutos), com uma conversão 6% superior, considerando a do ponto central.

Este aumento na conversão de 88 para 94%, ou seja, de 6% em relação à observada para a agitação mecânica, apesar menos significativas quanto à observada para a redução do tempo reacional, além de estar coerente com os relatos da literatura, contribui para reafirmar/destacar as potencialidades da irradiação ultrassônica como agente promotor das reações químicas. Destacando que a maximização da conversão foi apresentada no ensaio 8 com 95,4% (temperatura de 65°C, razão molar ácido:álcool 1:9 e potência ultrassônica de 80%) sendo próximas ao ponto central de 94% (temperatura de 50°C, razão molar ácido:álcool 1:7 e potência ultrassônica de 60%).

A irradiação ultrassônica através da cavitação acústica de suas ondas provoca, além da redução no tamanho das partículas do substrato, uma turbulência que auxilia na eficiente transferência de massa, aumentando a probabilidade de contato dos substratos com o catalisador, acelerando assim a taxa de reação (HOSHINO et al., 2006; POPIOLSKI, 2011; BANSODE e RATHOD, 2014; COWIE et al., 2014; LERIN et al., 2014).

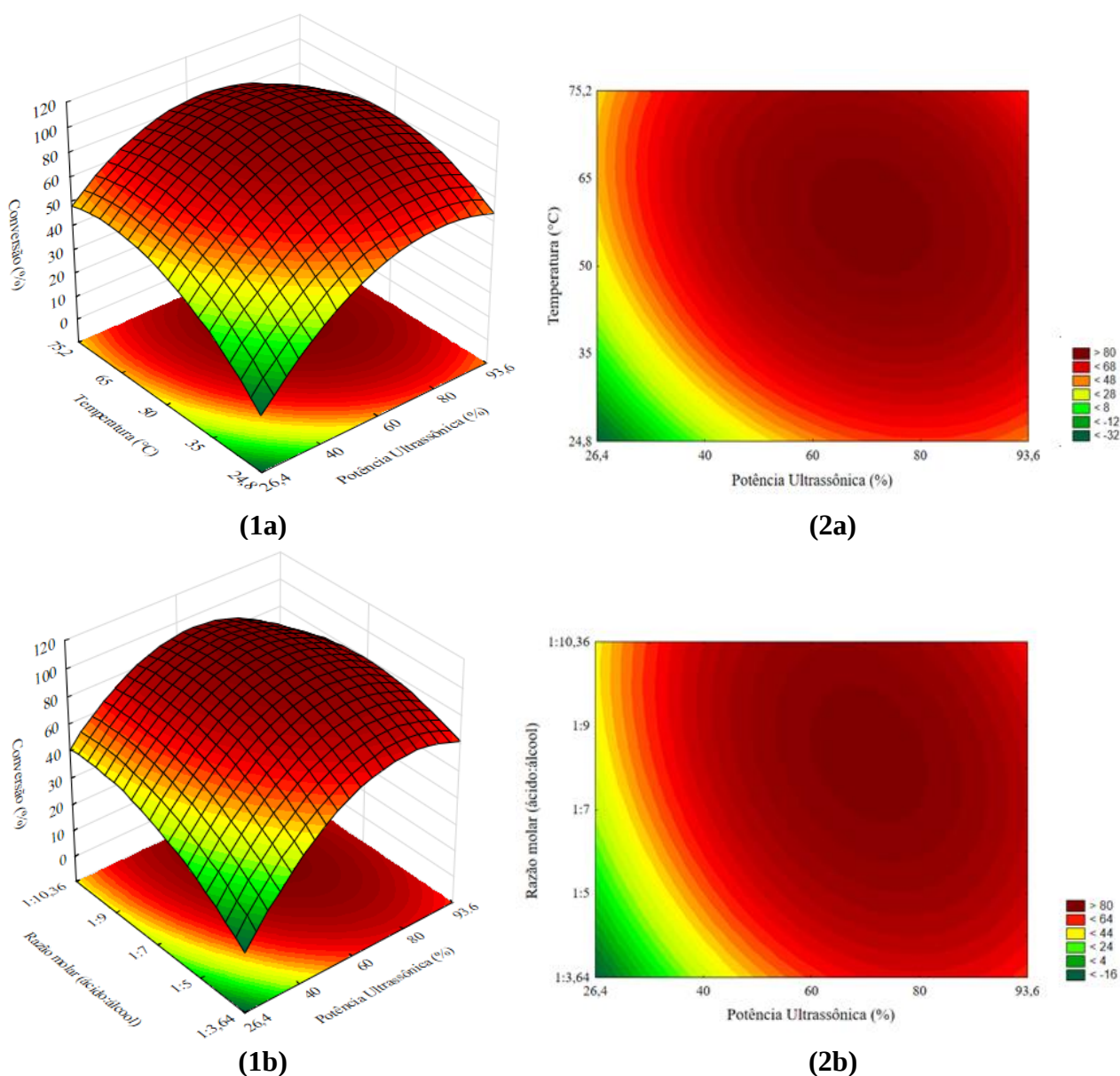
Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O modelo foi validado pela análise de variância ($F_{\text{cal}} (35,27) > F_{\text{tab}} (3,63)$) com coeficientes de correlação (R^2) = 0,98 (Equação 3.1.7) (Apêndices 3.1.5 e 3.1.6), para o catalisador imobilizado em sistema de agitação ultrassônica.

$$\text{Conversão (\%)} = 93,61 + 11,68T - 9,73T^2 + 7,47R - 4,47R^2 + 10,67P - 7,29P^2 - 3,67T.P - 3,40T.R \quad (3.1.7)$$

Onde: T = temperatura (°C), R = razão molar (ácido acético:álcool isoamílico) e P = potência ultrassônica (%).

As Figuras 3.1.6 (a) e (b) apresentam a superfície de resposta e a curva de contorno empregando o catalisador imobilizado referente aos efeitos das interações entre a variável razão molar (ácido acético:álcool isoamílico), temperatura e potência ultrassônica em sistema de agitação ultrassônica.

Figura 3.1.6 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado para a síntese do éster de acetato de isoamila em sistema de agitação ultrassônica.



Como sugerido pelos resultados apresentado na matriz, as maiores conversões (> 90%) para a síntese do acetato de isoamila são observadas na região próxima ao ponto central, com tendência para os maiores níveis das variáveis estudadas, ou seja, para uma razão molar de ácido acético:álcool isoamílico entre 1:6,5 e 1:10, temperatura entre 52 e 70°C e potência ultrassônica entre 60 e 83%.

Os resultados apresentados neste estudo demonstram a potencialidade desta tecnologia, apresentando vantagens principalmente em termos de aumento da velocidade inicial e nas taxas de rendimento de conversão, justificando assim seu emprego como agente promotor das reações (LERIN et al., 2014) apresentando altas conversões em tempos reacionais extremamente baixos, quando comparada com os métodos tradicionais.

Neste contexto, este estudo mostra-se promissor para a síntese do acetato de isoamila obtido via catálise enzimática em meio ausente de solvente, ou seja, reações de sínteses de ésteres sob condições em sistema livre de solvente, são definidas em que o reagente por si próprio atua como solvente na reação, ou seja, uma escolha benéfica contra algum possível efeito prejudicial na estabilidade/atividade/conversão da enzima ou equilíbrio termodinâmico da reação (SANTOS et al., 2007).

Reação executada em condições livre de solvente, são processos ambientalmente favoráveis, uma vez que vários solventes são agentes poluidores e alto grau de toxicidade, inflamabilidade e custos de recuperação/reciclagem, nesse sentido tem apresentado um crescente aumento nos últimos anos (KUMAR et al., 2010).

No entanto, com o intuito de diminuir ainda mais o tempo reacional (< 60 minutos) e, conseqüentemente, o custo de produção, optou-se em avaliar a síntese de ésteres acetato de isoamila em sistema em fluxo contínuo.

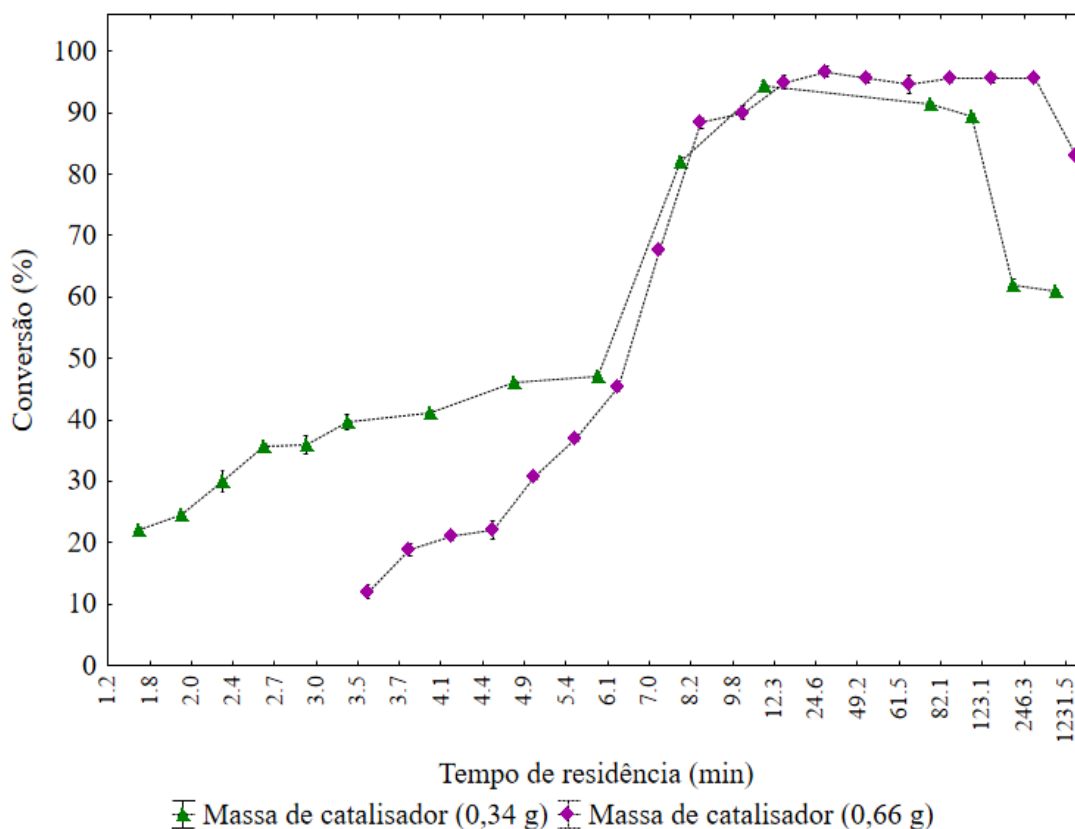
3.1.3.3 Reações em sistema de fluxo contínuo

O processo de fluxo contínuo foi conduzido empregando o catalisador imobilizado, nas condições maximizadas no sistema em batelada com agitação mecânica, ou seja, uma razão molar ácido:álcool de 1:7 e temperatura de 64,1°C.

Os ensaios em fluxo contínuo foram conduzidos empregando duas massas de catalisador imobilizado, 0,34 g e 0,66 g (de acordo com o volume do reator), variando o tempo de residência entre 1 e 1.231,1 minutos (0,01 a 20,51 horas) (que foi calculado de acordo com a vazão do fluxo do reator), mediante o controle do fluxo, entre 10 e 1000 µL/minuto, onde a porosidade do leito foi de $\epsilon_L = 0,38$, obtida levando em conta o volume do

reator. A evolução da conversão em função do tempo de residência está apresentada na Figura 3.1.7.

Figura 3.1.7 - Conversão em função do tempo de residência empregando massa de catalisador imobilizado de 0,34 g e 0,660 g pela reação de síntese do éster de acetato de isoamila em sistema de fluxo contínuo.



Os resultados referentes aos ensaios do efeito do tempo de contato (tempo de residência) entre o substrato e o imobilizado para as massas de 0,34 g e 0,66 g, apresentam conversões máximas de 94 e 97%, em tempos reacionais em ≈ 12 e 24,6 minutos, respectivamente. Ou seja, empregando uma massa de catalisador de 0,34 g com vazão de 875 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 1,2 minutos com conversão de 23,9%, a vazão de 175 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 6,1 minutos com conversão de 40%, a vazão de 50 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 24,6 minutos com conversão de 94% e para a vazão de 10 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 82,1 minutos com conversão de 88%.

Para a massa de catalisador de 0,66 g com vazão de 575 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 3,5 minutos com conversão de 11,1%, vazão de 275 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 7 minutos com conversão de 66%, vazão de 200

$\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 9,8 minutos com conversão de 90% e para uma vazão de 40 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 49,2 minutos com conversão de 97%.

Outro fator que podemos observar que, para fluxos superiores a ($< 250 \mu\text{L}/\text{minuto}$) o tempo que a mistura permanece em contato com o catalisador é maior do que para o fluxo inferiores a ($> 250 \mu\text{L}/\text{minuto}$), porém, como a velocidade de escoamento é menor, as gotas de produto formadas são maiores diminuindo a área de contato com o catalisador.

Para fluxos maiores que ($> 250\mu\text{L}/\text{minuto}$), devido a maior velocidade de escoamento as gotículas de produto formadas seriam menores, o tempo que esta emulsão ficaria em contato com o catalisador também é menor, proporcionando uma queda no rendimento da reação.

Para ambas as condições (0,34 e 0,66 g de massa de catalisador) exibem uma mesma tendência entre si e com o estudo cinético, apresentando um aumento da conversão com o tempo de residência, até atingir um máximo de conversão ($> 94\%$), o qual varia com a massa de imobilizado, seguido de um leve decaimento, o qual foi vinculado à perda da eficiência catalítica da enzima, seja por desnaturação, lixiviação ou até mesmo obstrução física do sítio ativo, a qual limita a transferência de massa entre enzima e substrato (TEPE e DURSUN, 2008).

O ensaio conduzido com a maior massa (0,66 g), com uma maior região de estabilidade para elevadas conversões ($> 90\%$), foi o que apresentou resultados um pouco superior ao empregado usando massa (0,34 g), esse fato pode ser devido ao maior número de sítios ativos presente na no meio, podendo colaborar para o aumento da conversão reação, até certo limite, pois o excesso pode provocar efeito contrario, ou seja, o excesso de lipase muitas moléculas podem agregar-se ao sítio ativo e com isso este, não ficar exposto aos substratos, conduzindo a uma formação de agregados e uma distribuição não homogênea (COLOMBO, 2011).

Em relação ao decaimento de conversão observado em ambos os ensaios após (≈ 123 minutos – tempo de residência), os quais estão coerentes com resultados observados anteriormente para a evolução do tempo de reação do éster de acetato de isoamila em função do tempo reacional (minutos) empregando catalisador imobilizado em sistema de agitação em batelada mecânico e ultrassônico.

Esta tendência sugere a presença de dois mecanismos reacionais: i) de esterificação (aumento da conversão) a qual gera o éster, como produto e a água como subproduto; ii) de

hidrólise (diminuição da conversão) aumento da concentração de água mediante o consumo do éster no sistema reacional (LI et al., 2015).

O mecanismo comum de hidrólise de ésteres, consiste em cinco etapas: i) ligação ao substrato éster; ii) formação do primeiro intermediário tetraédrico por ataque nucleofílico da serina catalítica, com o oxiânion estabilizado por duas ou três ligações de hidrogênio; iii) quebra da ligação éster; iv) saída da porção alcoólica e por fim a reação de hidrólise (LI et al., 2015).

Também podemos observar que conversões inferiores a 50% foram obtidas em tempos de residência inferiores há 6 minutos, onde o fluxo volumétrico é maior. Esta baixa conversão está relacionada ao pouco tempo de contato entre a enzima e o substrato, impedindo que a reação se processe por completo (TRENTIN et al., 2014).

Outro fator pode estar relacionado a existência de um valor crítico, em relação ao tempo de residência, pois este, ultrapassando esse valor proporcionará uma redução na conversão do éster, podendo ocorrer outras reações, dando origem a outros produtos.

A tendência observada nesta região (< 6 minutos), com a maior massa (0,66 g), apresentando resultados de conversão inferiores ao ensaio conduzido com menor massa (0,34 g), foram vinculadas a maior compactação do catalisador dentro do reator, proporcionando um efeito difusional, o qual em função do elevado fluxo ($> 250 \mu\text{L}$), provavelmente apresente uma restrição em relação ao acesso efetivo do substrato ao sítio catalítico da enzima, e consequentemente no rendimento/conversão do éster.

Em termos gerais, os resultados demonstram como nos ensaios cinéticos para os outros sistemas, que o tempo de residência se apresenta como um fator limitante na conversão do éster e que neste caso em específico, independentemente da massa de catalisador imobilizado empregada no reator, às conversões foram superiores a 80% em uma ampla faixa de tempo de residência, entre 10 e 1.231 minutos (0,01 a 20,51 horas).

Comparativamente com os outros sistemas avaliados, os tempos de residência, ou seja, reacionais, com maiores conversões observados para o sistema contínuo (independentemente da massa de catalisador), entre 12 e 24 minutos, são significativamente inferiores aos observados para os sistemas conduzidos em batelada, seja submetido à agitação mecânica, com 360 minutos (6 horas) , ou ultrassônica, com 60 minutos (1 hora).

Este desempenho superior significativo observado para o sistema em fluxo contínuo em relação ao sistema em batelada, de agitação mecânica ou ultrassônica, pode estar vinculado a

diferentes fatores, como a inibição pelo produto e dissipação do calor (LOPES, 2015; GOMES, 2016).

Lopes (2015) destaca o fato do produto formado não permanecer por muito tempo em contato com o biocatalisador, diminuindo assim a possibilidade de inibição do mesmo pelo produto, fato que não ocorre no sistema de agitação em batelada, na qual o produto formado permanece no meio reacional e com concentrações cada vez maiores até o término da reação, retardando assim a reação, devido a problemas difusionais.

O fato da área superficial de troca de calor em reatores em fluxo contínuo normalmente ser muito superior à área superficial de métodos convencionais (batelada), proporciona um elevado transporte de calor e massa. Esse aumento da área de troca térmica juntamente com a menor gradiente de temperatura devido ao pequeno diâmetro da tubulação permite a obtenção de melhores resultados (GOMES, 2016).

Souza e Miranda (2013) sugerem que o aumento no rendimento de conversão possa estar relacionado a uma maior dissipação de calor e diminuindo a formação de subprodutos. Em termos de rendimento os resultados observados, com conversões superiores a 90%, são similares aos observados para os demais sistemas e por outros relatos pela literatura para outros ésteres.

Cvjetko et al. (2012) para a acilação de álcool isoamílico com anidrido acético a 55°C, catalisado por *Candida antarctica* lipase B imobilizada em líquidos iônicos (ILS) (imidazólia com alquila), (vazão de 61 mmol L⁻¹/minuto⁻¹) obtiveram uma conversão de 92% a um tempo de residência de 15 minutos. Trentin et al. (2010) para a esterificação em fluxo contínuo de ácidos graxos de sojas comerciais (vazão de 2,5 mL/min⁻¹) com a lipase Novozym 435, observaram conversões de aproximadamente 97% em um tempo de residência de 6 minutos.

Além deste melhor desempenho reacional em termos de produtividade, o sistema em fluxo contínuo pode apresentar, em relação à batelada, vantagens como: facilidade de automação, controle, possibilidade de escalonamento das reações, manutenção da eficiência catalítica do biocatalisador e diminuição da taxa de cisalhamento (GLASNOV e KAPPE, 2011; WEGNER et al., 2011; HARTMAN et al., 2011; SOUZA e MIRANDA, 2013; MACHADO et al., 2014), demonstrando assim a potencialidade deste sistema.

Além disso, trata-se de um estudo inédito, visto que não possui na literatura aberta trabalhos que reportam a produção de éster de acetato de isoamila em sistema de fluxo contínuo, principalmente pela viabilidade de utilização em reações de síntese, empregando de lipases imobilizadas. Sendo assim, esse estudo foi motivado pela crescente demanda

industrial por novas alternativas de sínteses em meios livres de solventes orgânicos, as quais proporcionarão principalmente uma redução significativa de perda de catalisador, reagentes e solventes, além de minimizar etapas posteriores de separação e purificação, além da redução de custos com o emprego de solventes orgânicos.

3.1.3.4 Estabilidade operacional

A possibilidade de reciclagem e/ou reutilização em vários ciclos é um dos principais atrativos dos catalisadores imobilizados, pois em muitos casos é o fator que determinará a viabilidade do processo. Neste contexto sua avaliação apresenta-se com um dos principais parâmetros a serem estudados.

As condições operacionais empregadas para cada sistema em batelada: de *agitação mecânica* (razão molar ácido acético:álcool isoamílico de 1:7, 64,1°C, massa de catalisador de 0,5 g, 360 minutos reacionais), *agitação ultrassônica* (razão molar ácido acético:álcool isoamílico de 1:9, 65 °C, massa de catalisador de 0,5 g, potência ultrassônica de 80% e 60 minutos reacionais) e de *fluxo contínuo* (razão molar ácido acético:álcool isoamílico 1:7, massa de catalisador de 0,34 g, 64,1°C e tempo de residência de 24,6 minutos)}, foram as otimizadas, ou seja, que apresentaram as melhores conversões.

A Figura 3.1.8 apresenta a estabilidade operacional (número de ciclos de utilização) empregando o catalisador imobilizado, na síntese do acetato de isoamila para os três sistemas avaliados (agitação mecânica e ultrassônica e de fluxo contínuo).

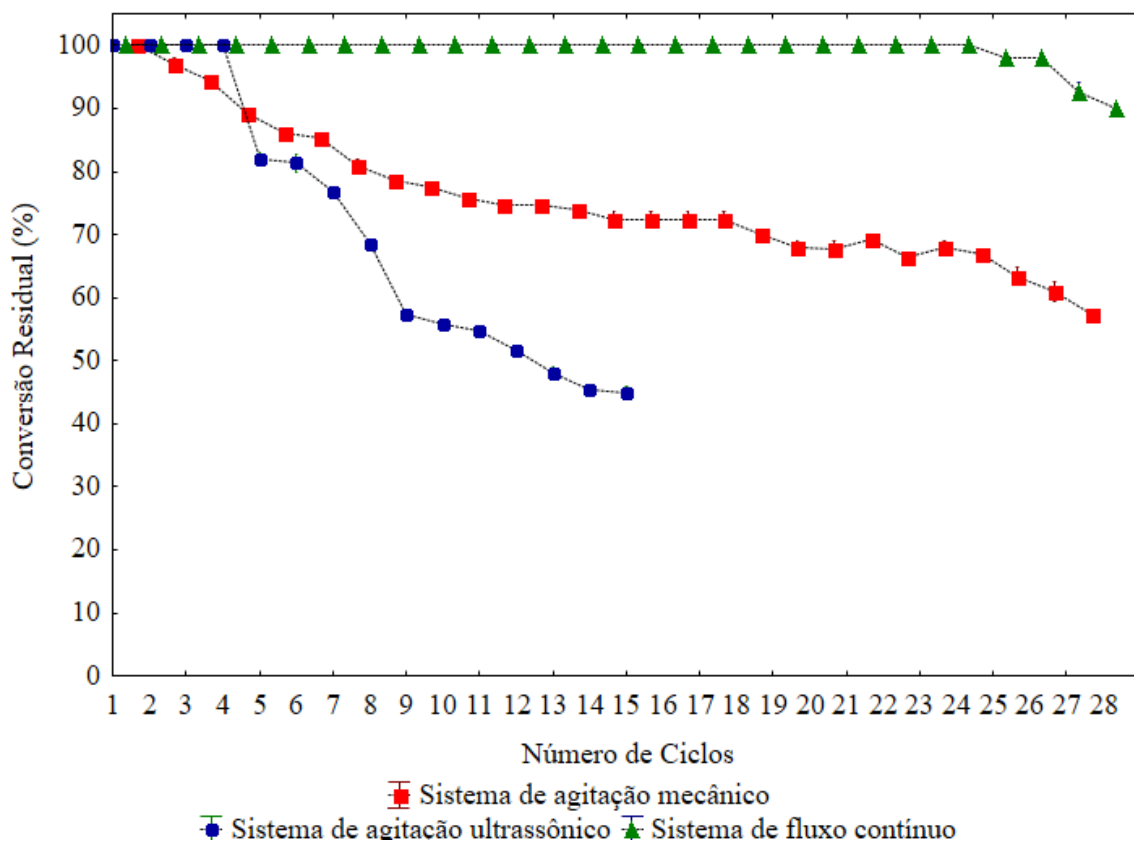
O sistema de fluxo contínuo foi acompanhado por um período de 688 minutos reacionais (considerando um ciclo a cada 24,6 minutos, tempo este equivalente ao tempo de residência). No entanto, para fins comparativos com os demais sistemas, os resultados serão apresentados na forma de ciclos. O sistema em batelada de agitação mecânica (considerando um ciclo a cada 360 minutos reacionais) e de agitação ultrassônica (considerando um ciclo a cada 60 minutos reacionais).

Para os sistemas em batelada (agitação mecânica e ultrassônica), observam-se uma mesma tendência, com resultados bem similares, ambos apresentando 5 ciclos com 100% de conversão, seguido de uma acentuada diminuição da conversão nos ciclos subsequentes, apresentando em 13 ciclos conversões inferiores a 50%.

O processo de síntese de éster de acetato de isoamila empregando sistema de agitação mecânica apresentaram 28 ciclos contínuos de reutilização de $\approx 60\%$ de conversão em relação a inicial (61% de conversão final) em 360 minutos reacionais e de 13 ciclos contínuos de

reutilização de $\approx 48\%$ de conversão em relação a inicial (45% de conversão final) em 60 minutos reacionais para o sistema de agitação ultrassônica.

Figura 3.1.8 - Estabilidade operacional em sistema de agitação mecânica (360 minutos), ultrassônica (60 minutos) e de fluxo contínuo (24,6 minutos) para a síntese de acetato de isoamila.



*Onde: Para o sistema de batelada: agitação mecânica (razão molar ácido acético:álcool isoamílico de 1:7, 64,1°C, massa de catalisador de 0,5 g em 360 minutos reacionais), agitação ultrassônica (razão molar ácido acético:álcool isoamílico de 1:9, 65 °C, massa de catalisador de 0,5 g, potência ultrassônica de 80% em 60 minutos) e de fluxo contínuo (razão molar ácido acético:álcool isoamílico 1:7, massa de catalisador de 0,34 g, 64,1°C e tempo de residência de 24,6 minutos) para a síntese de acetato de isoamila.

Dentre os três sistemas, o fluxo contínuo, com uma conversão superior a 90% de conversão (78% de conversão final), ou seja, um desempenho de 5 vezes superior em relação aos sistemas em batelada foi o sistema que apresentou os melhores resultados, proporcionando um maior reaproveitamento do catalisador, com tempo reacional reduzido há 24,6 minutos, conduz a um aumento significativo de produtividade.

A perda de conversão (atividade) e/ou eficiência catalítica do imobilizado entre os ciclos é uma tendência esperada em processos catalíticos e pode estar vinculada a diferentes fatores, tais como: i) inativação da enzima por desnaturação, ii) lixiviação do suporte e iii)

obstrução física do sítio ativo da enzima, os quais podem se manifestar independentemente ou associativamente (CARVALHO et al., 2015).

A intensidade desta perda de conversão pode estar diretamente relacionada com os tipos de suportes e as condições operacionais (temperatura, pressão, tempo reacional, tipo e velocidade de agitação, etc.) empregadas nos ensaios reacionais (ITABAIANA JUNIOR, 2013).

Neste sentido, o ensaio em fluxo contínuo, conduzido empregando o menor tempo reacional em cada ciclo (24,6 minutos) (utilizando-se a mesma coluna inicial (preenchida com 0,34 g de catalisador imobilizado) durante todo este estudo. Sem agitação, apresentou o melhor desempenho quando comparado aos sistemas em batelada, com os maiores tempos reacionais (60 minutos para agitação ultrassônica e 360 minutos para agitação mecânica).

Tempos reacionais maiores tendem a acentuar a perda de conversão (atividade/eficiência) entre os ciclos. O aumento do tempo de contato entre o suporte e o meio reacional favorece a solvatação do suporte, proporcionando uma flexibilização estrutural, bem como dilatação dos poros e, com isso, favorece a lixiviação da enzima. Em alguns casos, principalmente onde a ancoragem da enzima ao suporte ocorre via ligações covalentes pode conduzir a mudanças conformacionais na estrutura da enzima, afetando sua conversão (atividade) (YU et al., 2010; CENI et al., 2011; BANSODE e RATHOD, 2014; CARVALHO et al., 2015).

Em relação à agitação, a mesma irá afetar principalmente a estrutura física do suporte, proporcionando através de choques mecânicos entre as partículas de imobilizados dispersos no meio reacional, desgaste de sua superfície e rompimento de sua estrutura, favorecendo assim a perda da enzima em seu interior mediante lixiviação.

Alguns fatores como elevação da pressão, emprego de micro-ondas e ultrassom podem acelerar o processo (KHAN et al., 2015; PALUDO et al., 2015; WAGHMARE e VETAL, 2015), o que justifica a similaridade dos resultados observados entre o sistema ultrassônico, com 60 minutos reacionais, e a agitação mecânica, com 360 minutos reacionais, mesmo este tendo empregado um tempo reacional 6 vezes inferior.

Em termos comparativos o ensaio em fluxo contínuo apresentou um melhor desempenho que o sistema de batelada, tanto entre os sistemas estudados quanto com os relatados pela literatura para o acetato de isoamila, cujos ciclos com 100% de conversão (atividade) residual variaram entre 20 a 100%, independentemente do tipo de agitação e

temperatura empregada (OSORIO-VIANA et al., 2013a,b,c; OSORIO-VIANA et al., 2014; SINGH et al., 2014; YANG et al., 2015).

Novak e Žnidaršič-Plazl (2013) na síntese de acetato de isoamila (ácido acético e álcool isoamílico), empregando solução aquosa de lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em sistema de solvente (1-butil-3-metilpiridínio dicanamida e n-heptano) em sistema de fluxo contínuo, obtiveram 3 ciclos contínuos (tempo de 12,3 minutos) com produtividade acima de 90% e 8 ciclos com 80% em relação a inicial.

Martins et al. (2013) estudaram a síntese de acetato de etila, via esterificação do ácido acético e álcool etílico, com lipase comercial B imobilizada de *Candida antarctica* (Novozym 435), em sistema de batelada ultrassônica (frequência ultrassônica de 40 kHz, 46°C e 7% de catalisador) e mecânica (40°C e 7,5% de catalisador) em 2,5 horas de reação, com e sem lavagem em hexano. No sistema de batelada ultrassônica, foram observados 14 ciclos de reutilização com 70% em relação a inicial e na mecânica em apenas 2 ciclos de reutilização a enzima foi completamente inativada.

Feher et al. (2008) empregando a CALB imobilizado (Novozym 435) juntamente com líquido iônico (Bmim - PF6) na síntese de acetato de isoamila, verificaram 7 ciclos, com rendimentos próximos a 100%.

Kanwar et al. (2008) utilizando a lipase de *Bacillus Coagulans* MTCC-6375, imobilizada em hidrogel de poli (MAc-co-DMA-cl-MBAm) sintético, para a síntese de acetato de isoamila via acetato de vinilo: álcool isoamílico em n-heptano (0,5 g de catalisador e 55°C) observaram 4 ciclos de reutilização com < 40% em relação a inicial, onde após o primeiro ciclo a conversão foi inferior a 70%. Ghamgui et al. (2006) empregando a enzima *Staphylococcus simulans* (37°C em 8 horas de reação com agitação mecânica de 160 rpm) obteve 10 ciclos (76% em relação a inicial).

Dhake et al. (2012) investigaram a aplicação de lipase de steapsina para a determinação cinética de álcoois secundários (1-fenil etanol e seus derivados) utilizando acetato de vinila em n-hexano como solvente (55°C, 70 mg de catalisador, agitação de mecânica 160 rpm, 24 horas), e constatarem 8 ciclos consecutivos sem qualquer perda significativa na sua eficiência catalítica.

Cabe ressaltar que o método em fluxo contínuo, além de ter apresentado os melhores resultados, destacando a potencialidade do método, não necessita de uma etapa posterior de filtração para separação do catalisador, além de permitir o emprego de maiores volumes de solventes contendo baixas concentrações de substrato (COSTA et al., 2014).

3.1.3 Considerações Parciais

Os estudos cinéticos sugerem a manifestação de duas reações durante o processo, uma de esterificação e outra de hidrólise, as quais se manifestam com intensidades distintas durante o ensaio. Ambas as reações estão coerentes com as propriedades das lipases, e sua presença em um mesmo processo demonstra a importância desta etapa nos processos de esterificação quando se busca a otimização do sistema.

O sistema de agitação ultrassônica apresentou uma redução de 6 vezes no tempo reacional em relação à mecânica, o que está coerente com suas características, acelerarmos a velocidade das reações, além de indicar a potencialidade do sistema.

Em termos de otimização, o sistema em batelada de agitação mecânica, empregando o catalisador livre e imobilizado, apresentaram efeitos positivos para a temperatura e a razão molar, apresentando a maximização da conversão de 57% (razão molar ácido:álcool de 1:9 e 60°C) em 120 minutos reacionais e de 94% (razão molar ácido:álcool de 1:7 e 64,1°C) com 28 ciclos contínuos de reutilização em 360 minutos reacionais, respectivamente para a síntese de acetato de isoamila.

Para o sistema de agitação ultrassônica os efeitos positivos para a variável temperatura, razão molar dos substratos e potência ultrassônica (razão molar ácido:álcool de 1:9, 65°C e potência ultrassônica de 80%) com 13 ciclos contínuos de reutilização ($\approx 50\%$ em relação a inicial) em 60 minutos reacionais.

Para ambos os sistemas em batelada, tanto sob agitação mecânica e ultrassônica, apresentaram tendências coerentes com a literatura, uma vez que as reações de esterificação são de natureza endotérmica (proporcionado pelo aumento da temperatura) e favorece a velocidade da reação (aumento da razão molar do substrato).

A partir dos resultados obtidos em batelada, as condições foram transpostas para um sistema de fluxo contínuo, onde foi possível observar a influência da tempo e da velocidade (vazão) de fluxo, onde foi possível notar a influência da velocidade do fluxo (tempo de residência) como aumento da conversão.

O sistema em fluxo contínuo demonstrou que o tempo de residência (vazão) é uma variável importante no processo, pois afeta diretamente a conversão, com apenas 24,6 minutos reacionais foi observado o melhor desempenho catalítico, quando comparado aos demais sistemas avaliados (agitação mecânica e ultrassônica) com 97% de conversão e 28 ciclos contínuos de reutilização ($\approx 90\%$ em relação a inicial).

Esse teste que leva em conta a conversão ao longo de vários ciclos de reutilização do catalisador imobilizado, mostrando que o sistema em fluxo contínuo degradou menos e aumentou a vida útil do catalisador. Sendo possível aumentar a produtividade ≈ 2 vezes em relação ao tempo de reação do éster de acetato de isoamila, quando comparada com o sistema em batelada.

Entretanto, através dessa metodologia é possível observar a viabilidade da utilização de lipase CALB em reação na síntese de éster de acetato de isoamila, por se tratar de uma enzima com possibilidade de imobilização e sua utilização em produtos de interesse em um sistema isento de solvente orgânico.

Além de ser um processo que visa uma maior segurança e melhor, tornam o fluxo contínuo uma ferramenta atrativa para uso em biocatálise.

Em suma, os resultados obtidos neste estudo trazem uma importante contribuição para o desenvolvimento do processo em escala piloto, pois se mostraram promissores no que se refere o nosso estudo a possibilidade de um aumento de escala, principalmente tendo em vista que comportamentos observados em processos otimizados em pequena escala serão favorecidos quando reproduzidos nas mesmas condições em escala maior, possibilitando assim o emprego em processos industriais.

3.2 OLEATO DE ETILA

Os ésteres de oleato de etila (etil cis-9-octadecanoato) é um éster formado pela reação de esterificação do ácido oleico com um álcool (GUNSTONE, 1999), se caracterizando como um líquido límpido, de cor amarela pálido a incolor, sendo praticamente insolúvel em água, mas miscível com clorofórmio, cloreto de metileno, etanol, éter de petróleo e óleos fixos, com a fórmula molecular $C_{20}H_{38}O_2$ (WIKIPEDIA, 2016).

Possui propriedades repelentes à água, sendo empregado como solvente em vários processos industriais, como na indústria química (plastificantes, fluidos hidráulicos, emolientes e lubrificantes), na indústria farmacêutica (solvente de esteroides), na indústria de cosmética e alimentícia (estabilizantes, flavorizante e emulsificantes) e na indústria de biocombustíveis (biodiesel) (ITSEKSON et al. 2011; NETA et al., 2012; DESHMUKH, 2013).

A utilização de oleato de etila, em aplicações comerciais, tem sido dificultada devido às baixas quantidades que podem ser recuperadas a partir de fontes naturais (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2008). Portanto, a maioria dos ésteres disponíveis é produzida por síntese química ou enzimática, com esta última tendo recebido atenção especial, devido principalmente às condições brandas de reação envolvidas, ao alto grau de pureza alcançado e à aceitação desses produtos na indústria de alimentos (ITSEKSON et al., 2011) por serem considerados biodegradáveis biocompatíveis e não tóxicos (NETA, 2007; NETA et al., 2012; NETA et al., 2015).

Na literatura diferentes processos, empregando lipases de diferentes fontes, são encontrados para a síntese do oleato de etila, os quais apresentam os mais variados resultados, ou seja, em termos de atividade, rendimento, conversão ou estabilidade de estocagem ou operacional (Tabela 3.2.1).

Nesse contexto, o presente estudo, utilizando o catalisador imobilizado (CALB imobilizada in situ poliuretano), teve como objetivo maximizar o processo de síntese de ésteres de oleato de etila em sistema de agitação em batelada de agitação (mecânica e ultrassônica) e um em fluxo contínuo em sistema livre de solvente e verificar sua capacidade de reutilização em repetidos ciclos de utilização.

Tabela 3.2.1 - Exemplos de lipases aplicadas na síntese de ésteres de oleato em sistema de agitação mecânica e ultrassônica.

Enzima	Temp. (°C)	ME (g/%)	T. (h/min)	Sistema	Conversão (%)	Autor
<i>Candida rugosa</i>	-	0,23%	1,5 h	agitação ultrassônica	90% biodiesel (óleo de canola e metanol)	Bhangu et al. (2016)
CALB™ 10000	60	5%	30 min	agitação ultrassônica e agitação mecânica	95,9% de oleato de cetila	Khan et al. (2015)
CALB	55	0,01g	96 h	agitação mecânica	7,82% de oleato de etila	Neta et al. (2012)
		6%	20 min	agitação ultrassônica	85,6% de oleato de cetila (biodiesel)	Adewale et al. (2015)
	60	0,01 g	1 h	agitação mecânica	90% de oleato de etila (biodiesel)	Souza (2013)
	32		24 h		93% oleico e glicerol (biodiesel)	Rosset et al. (2013)
		14%	1 h		68% de oleato de etila	Torres et al. (2014)
	60	5%	30 min	agitação ultrassônica	95% oleato de cetila	Khan et al. (2015)
	-	6%	20 min		85,6% de oleato de cetila para biodiesel	Adewale et al. (2015)
	-	6%	20 min		96,8% biodiesel	Adewale et al. (2016)
Novozym - 435	50	0,4 g	5-10 min	agitação ultrassônica	95% de oleato de etila	Mat Radzi et al. (2005)
	30	90 g	-	agitação mecânica	90% de oleato de etila	Mat Radzi et al. (2005)b
	70	20%	12 h	agitação ultrassônica	87% de ascorbil oleato	Balen et al. (2015)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL-IM)	40	6%	24 h		90,1% de biodiesel	Subhedar e Gogate (2016)
<i>Rhizopus</i> sp	45	1 g	60 min	agitação mecânica	100% de oleato de etilo em n-hexano	Martínez-Ruiz et al. (2008)

* CALB = *Candida antarctica* B; Temp. (°C) = Temperatura (°C); ME = Massa de Enzima (g/% ou mg/mL ou g/L) e T = Tempo (horas/minutos) e o sistema de agitação mecânica (rpm).

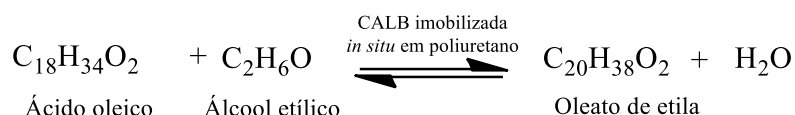
3.2.1 Materiais e Métodos

Além da enzima lipase B de *Candida antarctica* - CALB (Novozyme NZL-102) imobilizada em poliuretano e os solventes utilizados foram ácido oleico (Vetec), álcool etílico (Merck) e diclorometano (Vetec).

3.2.2 Síntese do éster oleato de etila

A Fórmula molecular do éster de oleato de etila está demonstrada através da Figura 3.2.1.

Figura 3.2.1 - Fórmula molecular do éster de oleato de etila.



A síntese de oleato de etila via ácido oleico e álcool etílico foi realizada, em triplicata, em frascos de 50 mL e livre de solvente orgânico, mantendo-se fixa a massa total de substrato na razão molar ácido oleico:álcool etílico (1:1) (5 g). Após cada reação, o meio reacional foi submetido a uma etapa de filtração simples para separação do catalisador enzimático do meio reacional, o qual foi armazenado em refrigerador (2 a 8°C) para posterior análise por cromatografia gasosa (CG).

Paralelamente, foi realizado um ensaio em branco, o qual foi conduzido na ausência de enzima, nas mesmas condições reacionais (razão molar, agitação e temperatura), minimizando assim possíveis efeitos do processo.

3.2.2.1 Reações em sistema de batelada: agitação mecânica e ultrassônica

Avaliação do tempo de reação

Inicialmente foi realizado um estudo cinético para avaliar o efeito do tempo reacional (0 a 90 minutos) em relação ao rendimento em termos de conversão em oleato de etila. A condição reacional empregada nesta etapa foi a do ponto central do DCCR com a massa de catalisador imobilizado de 0,3 g e temperatura de 50°C, que será empregado posteriormente para a etapa de otimização do processo.

Para o sistema de agitação mecânica, a agitação foi fixada em 160 rpm e para o sistema de agitação ultrassônica a potência foi fixada em 60% em relação à potência do banho que é 132 W, ou seja, em 79,2 W e as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.2.2 Otimização do processo de síntese do oleato de etila

O processo de otimização da síntese do oleato de etila foi conduzido mediante o emprego de um DCCR e as análises foram realizadas em triplicata.

Reações em batelada

Sistema de agitação mecânica

Para o sistema mecânico as variáveis estudadas foram a massa de catalisador (0,018 - 0,582 g) e a temperatura reacional (35,9 - 64,1°C), mantendo-se fixa a agitação mecânica (Shaker - modelo MA 420 - 600 Watts, Modelo Marconi) em agitação de 160 rpm e o tempo reacional em 40 minutos segundo metodologia descrita por Neta et al. (2012), com modificações.

Sistema de agitação ultrassônica

Para o sistema ultrassônico as variáveis estudadas foram a massa de catalisador (0,068 - 0,532 g), temperatura reacional (24,8 - 75,2°C) e potência ultrassônica (26,4 - 93,6%) (Unique ultraSonic Cleaner, USC-1800A, US 40 KHz, US 132 W), mantendo-se fixo o tempo reacional de 15 minutos de acordo com metodologia empregada no sistema de agitação mecânica.

Reações em sistema de fluxo contínuo

Para o sistema em fluxo contínuo, optou-se em empregar as condições reacionais otimizadas no sistema batelada submetidos à agitação mecânica (razão molar ácido oleico:álcool etílico (1:1) e temperatura reacional de 50°C), pois o reator utilizado no sistema de fluxo contínuo não apresenta sistema ultrassônico acoplado.

Primeiramente o substrato (meio reacional) foi preparado mediante a mistura do ácido oleico e o álcool etílico na razão molar desejada, para uma eficiente homogeneização o sistema foi agitado por 15 minutos (160 rpm) e posteriormente aquecido até a temperatura desejada.

O reator utilizado foi de escoamento ascendente, com coluna Omnifit (6.6mm x 10mm) com 0,3421cm² de base e altura variada em função da massa de imobilizado empregada. Essa

coluna, empacotada com o catalisador imobilizado (0,34 g) e alimentada com o meio reacional de forma ascendente através de uma bomba de vazão controlada (10 a 1000 µL/minuto), sendo o produto recolhido em alíquotas na saída da coluna (SILVA et al., 2015).

O tempo reacional, denominado tempo de residência, foi definido pela razão entre o volume livre do reator e a velocidade do fluxo do meio reacional pelo reator, como demonstrado Equação 3.2.1 (SOUZA e MIRANDA, 2013) e as análises foram realizadas em duplicata.

$$TR = \frac{Vr}{Vf} \quad (3.2.1)$$

Onde: TR =Tempo de Residência, Vr = volume livre do reator e Vf = velocidade do fluxo (solução dos reagentes).

3.2.2.3 Determinação da conversão (%)

As amostras foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC-Mass Shimadzu 2010) utilizando um banco de dados 5 (Agilent, J & W. Scientific, EUA) em coluna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As amostras foram preparadas por dissolução de 10 µl do produto final em 98 mL de heptano e 10 µl de MSTFA (N-Metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida). 1 µl desta amostra foi então injetada no equipamento.

A temperatura do injetor e do detector era de 250°C, e a temperatura do forno era constante a 60°C durante 1 minuto, e, em seguida aumentada em 10°C/minuto até 250°C, onde foi mantida constante durante 3 minutos segundo metodologia adaptada de Souza et al. (2015).

A conversão da reação foi calculada com base na redução da área de reagente limitante na base de estequiometria da reação (Equação 3.2.2).

$$C = \frac{Ab - Aa}{Ab} \times 100 \quad (3.2.2)$$

Onde: C (%) = Conversão, Ab = área do sinal referente ao ácido no ensaio em branco (corresponde ao ensaio sem enzima no tempo zero) e Aa = área do sinal referente ao ácido da amostra submetida à condição de reação de síntese.

3.2.2.4 Estabilidade Operacional

O número dos ciclos operacionais para o catalisador imobilizado para a síntese de éster de oleato de etila foi avaliada empregando a condição otimizada do DCCR, onde após cada reação o catalisador foi submetido a um processo de filtração simples (papel filtro), retirando-se o excesso de meio reacional e submetida a uma nova etapa reacional. Este processo foi realizado sucessivamente até obtermos resultados em termos de conversão inferiores a 50% da conversão inicial e as análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados foram expressos em forma conversão, a qual considera a conversão inicial como 100%. (Equação 3.2.3).

$$CR(\%) = \frac{C_{final}}{C_{inicial}} \times 100 \quad (3.2.3)$$

Onde: $CR(\%)$ = Conversão residual, C_{final} = Conversão final e $C_{inicial}$ = Conversão inicial.

3.2.2.5 Análise Estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamento de experimentos, com auxílio do software Statistica versão 5.0, com nível de significância de 95% de confiança.

3.2.3 Resultados e Discussões

Avaliou-se a síntese de éster de oleato de etila na condição do ponto central do Delineamento Composto Central Rotacional DCCR em função do tempo de reação (0 a 90 minutos).

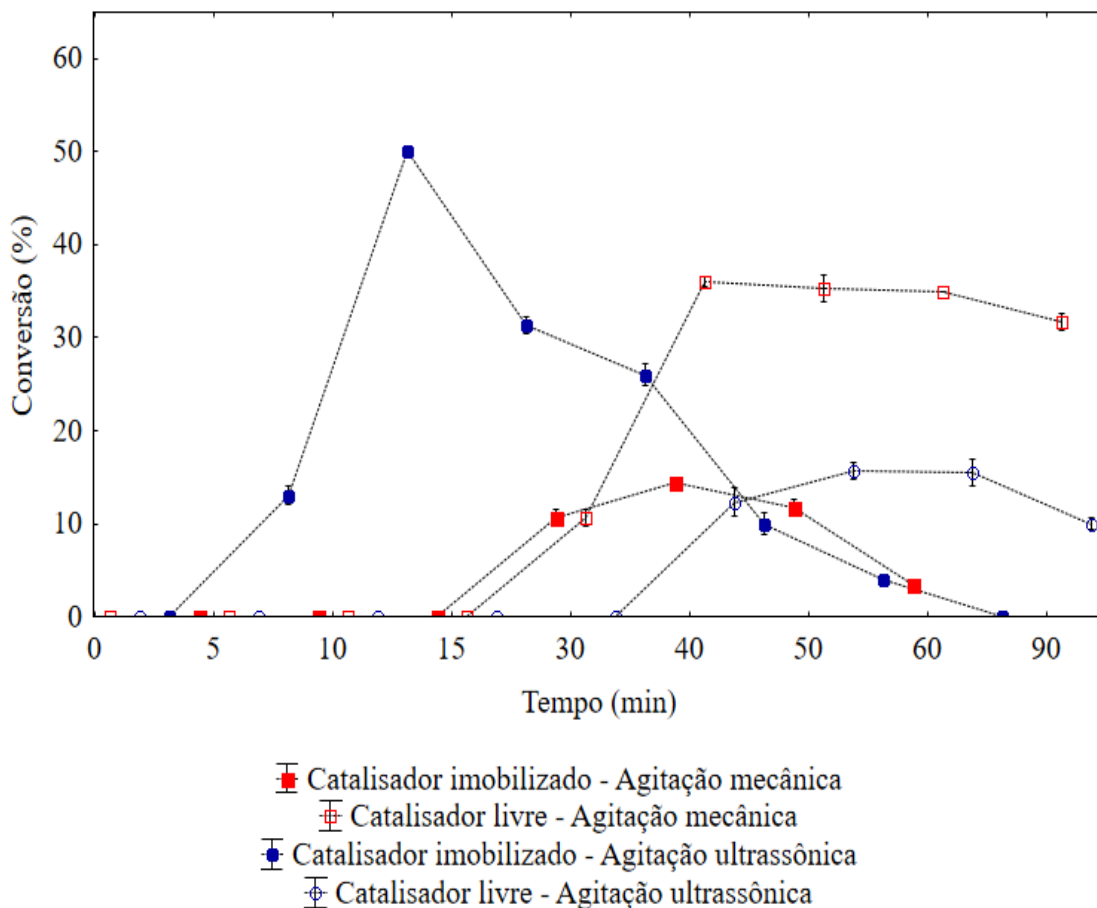
A evolução da conversão em oleato de etila em função do tempo reacional empregando catalisador livre e imobilizado para os sistemas em batelada submetidos à agitação mecânica e ultrassônica encontra-se apresentados na Figura 3.2.2.

Através dos resultados apresentados, podemos observar que a reação em sistema em batelada de agitação mecânica e ultrassônica, no decorrer de 90 minutos apresentou sua maximização em termos de conversão com ≈ 19 e 50% para os catalisadores imobilizados em 40 e 15 minutos reacionais, respectivamente. Enquanto para o catalisador livre a maximização na conversão se apresentou em 40 e 50 minutos reacionais, com ≈ 45 e 18%, respectivamente.

Neste contexto, este efeito é mais pronunciado se considerarmos que na massa do imobilizado (0,5 g) empregado no ensaio temos 3 vezes menos massa de catalisador

imobilizado ($\approx 0,005$ g) em relação ao ensaio conduzido com a catalisador livre (suspensão aquosa contendo 0,03 g de enzima).

Figura 3.2.2 - Evolução da conversão do oleato de etila em função do tempo reacional (minutos) empregando catalisador livre e imobilizado para os sistemas em batelada de agitação mecânica e ultrassônica.



Cabe salientar que a principal diferença entre os catalisadores livre e imobilizado, está presente no tempo reacional (≈ 40 minutos) com as melhores conversões (≈ 15 e 35% , respectivamente) para o sistema mecânico. Enquanto que para o sistema de ultrassônico para ambos os catalisadores, livre e imobilizado apresentaram conversões (≈ 50 e 18% , respectivamente) em tempos reacionais de 15 e 50, respectivamente.

Este comportamento está vinculado à velocidade inicial da reação, sendo distintos entre si, mostrando que em sistema de agitação mecânica é mais lento. Este comportamento está coerente com o observado por outros autores, os quais compararam o sistema em batelada em agitação mecânica ou ultrassônica em reações de síntese, como já mencionado anteriormente para a síntese de ésteres de acetato de isoamila.

De acordo com Liu et al. (2008) a redução no tempo reacional pode estar vinculada ao aumento na velocidade de reação, que é obtida em reações empregando o sistema de agitação ultrassônica, ocasionado principalmente pela formação de gotículas microscópicas no sistema, ampliando assim a área interfacial e aumentando a superfície de contato, reduzindo as limitações de transferência entre substrato/catalisador. Além disto, pode estar ocorrendo mudanças conformacionais benéficas na estrutura das proteínas sem interromper a sua função. Intensificando assim as taxas de rendimento de conversão (JI et al., 2006; SILVEIRA, 2015; ZHAO et al., 2016),

Essas características foram reportadas por Yu et al. (2010) na síntese de ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel) com óleo de soja e metanol através da transesterificação utilizando Novozym 435 em sistema ultrassônica (40°C, potência ultrassônica de 50%, 6% de massa de catalisador) apresentando um aumento significativo no rendimento de conversão de 96% em 4 horas de reação.

Batistella et al. (2012a) realizaram o estudo da síntese de biodiesel por meio de transesterificação do óleo de soja com etanol, utilizando lipases comerciais imobilizadas (Novozym 435 e Lipozyme RM IM) em n-hexano (60°C e potência ultrassônica de 100 W) com conversões próximas a 90 e 60% para a Lipozyme RM IM e Novozym 435, respectivamente em 4 horas.

Popielski (2011) e Trentin et al. (2014) realizaram a síntese de biodiesel empregando como substrato óleo de soja e etanol em ultrassom livre de solvente (70°C, 40% de potência do ultrassom de 132 W e 20% de Novozym 435) com 68% de conversão em 60 minutos.

A partir dos resultados obtidos optou-se para os ensaios de otimização da síntese do oleato de etila fixar os tempos reacionais em 40 minutos para o sistema em batelada de agitação mecânica e de 15 minutos para o sistema de agitação ultrassônica.

3.2.3 Reações de batelada

3.2.3.1 Sistema de agitação mecânica

Primeiramente para síntese de éster de oleato de etila na condição do ponto central do Delineamento Composto Central Rotacional DCCR, avaliou-se o efeito da razão molar ácido oleico:álcool etílico (1:0,5, 1:1, 1:2 e 1:3) do substrato na reação, mantendo-se fixa a temperatura (50°C), massa de catalisador (0,3 g), tempo reacional em 40 minutos reacionais e agitação mecânica em 160 rpm apresentado na Tabela 3.2.2.

Tabela 3.2.2. Estudo da razão molar (ácido:álcool) na síntese de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.

Razão Molar (ácido:álcool)	Conversão do ácido oleico (%)	
	Livre	Imobilizada
1:0,5	40,1 ± 0,8	51,2 ± 0,4
1:1	41,5 ± 1,9	52,0 ± 1,3
1:2	37,8 ± 1,4	37,8 ± 0,9
1:3	31,2 ± 0,9	35,6 ± 1,2

*Parâmetros fixos: massa de substrato de 5 g, temperatura de 50°C, massa de catalisador (0,3 g), tempo reacional em 40 minutos reacionais e agitação mecânica em agitação de 160 rpm,

Essa variável é de extrema importância, visto que os estudos apresentados na literatura mostram um significativo efeito no aumento das concentrações de ácido e álcool na atividade enzimática em reações de esterificação.

De acordo com os resultados observados, o aumento da razão molar ácido:álcool, influenciou negativamente na conversão, com os maiores valores sendo observados empregando a razão molar ácido:álcool de 1:1, com conversão de 41,5 e 52% para os catalisadores livre e imobilizado, respectivamente, comportamento esse, distinto ao observado para a síntese do éster de acetato de isoamila.

Esse comportamento, influenciado pela temperatura, deve-se provavelmente ao fato de que o álcool etílico empregado na reação pode estar sofrendo uma evaporação, quando empregado em concentrações superiores, concentrando mais o meio reacional e afetando diretamente a estabilidade da enzima, além de estar proporcionando o início de um processo de desnaturação ou inativação enzimática, ou seja, esta dependência pode ser atribuída ao estado termodinâmico do meio (CAMBON et al., 2009).

Depois de fixada a razão molar ácido:álcool dos substratos, realizou – se de acordo com a matriz do DCCR 2² completo a síntese de éster de oleato de etila em modo batelada: sistema de agitação mecânica, em função das variáveis estudadas massa de catalisador imobilizado (g) e temperatura (°C), bem como a resposta acompanhada (conversão do ácido oleico), encontram-se apresentados na Tabela 3.2.3.

Após observar que o aumento da conversão foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura (ensaios 1 e 2, 3 e 4, 7 e 8), independentemente da massa de catalisador imobilizado empregado, indicando um efeito positivo da temperatura sobre a conversão. Cabe destacar que as maiores conversões (superiores a 50%) foram observadas nas maiores

temperaturas $\geq 50^{\circ}\text{C}$. Com a maximização da conversão do ácido oleico em 58,8% (massa de catalisador de 0,582 g e 50°C de temperatura- ensaio 6) em 40 minutos de reacionais para o catalisador imobilizado.

Tabela 3.2.3 - Matriz do DCCR 2² completo empregando catalisador livre e imobilizado, em sistema de agitação mecânica em função das variáveis estudadas massa de catalisador (g) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para a síntese de éster de oleato de etila em sistema batelada de agitação mecânica.

Ensaio	Massa de catalisador (g)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Conversão do ácido oleico (%)	
			Livre	Imobilizado
1	-1 (0,1)	-1 (40)	$28,3 \pm 2,1$	$14,8 \pm 2,0$
2	-1 (0,1)	1 (60)	$26,8 \pm 1,7$	$23,1 \pm 1,9$
3	1 (0,5)	-1 (40)	$35,3 \pm 1,8$	$29,6 \pm 2,4$
4	1 (0,5)	1 (60)	$28,8 \pm 2,5$	$55,7 \pm 0,3$
5	-1.41 (0,018)	0 (50)	$46,6 \pm 2,2$	$15,5 \pm 1,3$
6	1.41 (0,582)	0 (50)	$53,8 \pm 0,1$	$58,8 \pm 0,5$
7	0 (0,3)	-1.41 (35,9)	$37,8 \pm 2,7$	$23,4 \pm 1,9$
8	0 (0,3)	1.41 (64,1)	$46,9 \pm 1,7$	$56,8 \pm 0,7$
9	0 (0,3)	0 (50)	$54,8 \pm 2,4$	$54,8 \pm 0,6$
10	0 (0,3)	0 (50)	$56,5 \pm 2,1$	$52,0 \pm 0,7$
11	0 (0,3)	0 (50)	$54,9 \pm 1,9$	$55,6 \pm 0,5$

* Parâmetros fixos: massa de substrato de 5 g, razão molar ácido:álcool de 1:1, tempo de reação de 40 minutos e 160 rpm de agitação mecânica.

Este efeito positivo da temperatura está de acordo com a natureza endotérmica das reações de esterificação. Além disto, o aumento da temperatura pode estar influenciado no processo mediante o aumento da solubilidade dos substratos e diminuição da viscosidade do meio, proporcionado assim uma melhora na difusibilidade do meio reacional até o sítio ativo da enzima.

Outra variável de extrema importância, combinada com temperatura empregada é a massa de catalisador imobilizado utilizado, pois é possível observar um crescente aumento da conversão do ácido oleico com o acréscimo da massa de catalisador empregue (ensaio 1 e 3, 2 e 4, 5 e 6), por exemplo, com 0,1 g de catalisador a conversão foi de $\approx 20\%$, com 0,5 g foi de $\approx 55\%$ e com 0,582 g foi de 58%. O aumento da massa de catalisador imobilizado amplia o número de sítios ativos presentes no meio, favorecendo a conversão (COLOMBO, 2011).

De acordo com Orellana-Coca et al. (2005) um excesso de enzima é necessário a fim de manter a elevada atividade enzimática ao longo da reação. Este aspecto também foi relatado por Colombo (2011) que observou que o aumento da massa de catalisador empregado na reação afeta diretamente, e de forma positiva, o processo de conversão em reações de esterificação.

Cabe destacar que os extremos superiores, tanto para a temperatura (ensaio 8), quanto para a massa de catalisador (ensaios 6), foram os ensaios que apresentaram as maiores conversões (superiores a 56%), sendo estas muito próximas às conversões observadas na condição no ponto central (ensaios 9 a 11) de 55% para o catalisador livre em 40 minutos de reação.

Comportamento distinto foi observado quando empregado o catalisador livre, onde para a maioria dos ensaios a temperatura o efeito negativo ou inibidor provocado pelo aumento da temperatura na maioria dos ensaios, apresentando decréscimos nas conversões do ácido oleico independente da massa de enzima (catalisador) empregada (ensaios 1 e 2, 3 e 4).

Esta tendência pode estar vinculada ao processo de início da inativação térmica da enzima proporcionado pelo aumento da temperatura. De acordo com Inouque et al. (2011) as enzimas na sua forma solúvel (livre) são muito delicadas e frágeis. Se a molécula absorve muita energia, pode ocorrer mudanças conformacionais nos seus sítios ativos, muitas vezes irreversíveis, podendo até desnaturar totalmente a enzima.

Enquanto que o aumento da massa de catalisador teve efeito positivo, proporcionando um aumento significativo na conversão. Com a maximização da conversão do ácido oleico de $\approx 56\%$ (ensaios do ponto central, 9, 10 e 11 - 0,3 g de massa de catalisador e 50°C) em 40 minutos reacionais.

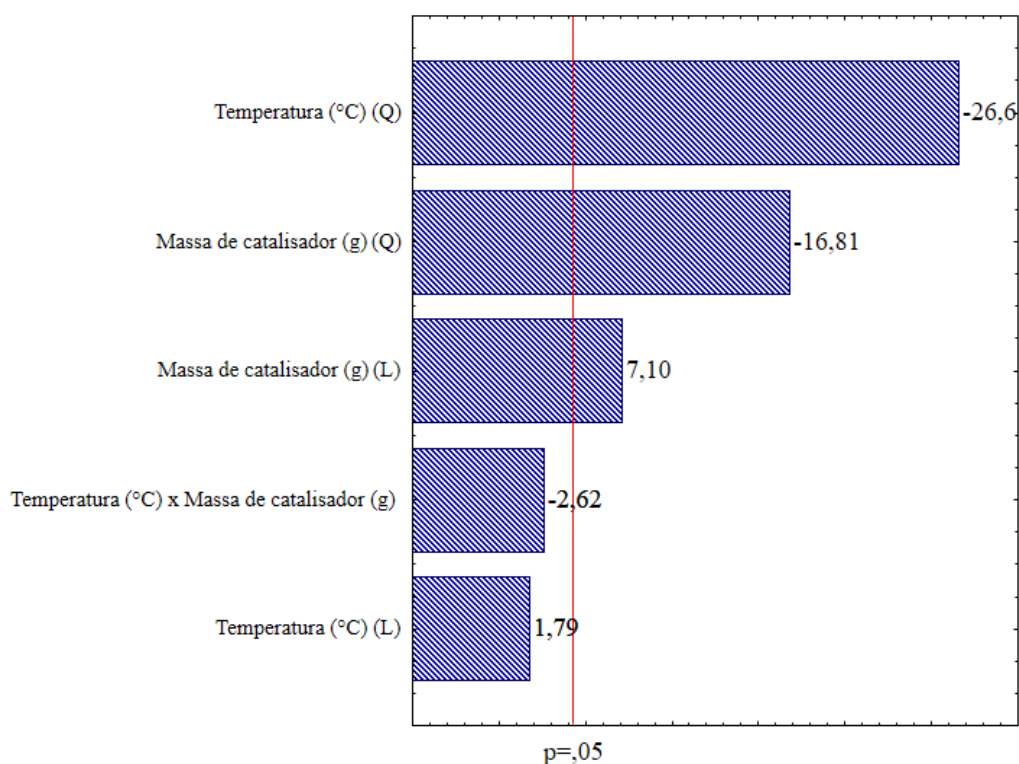
Nesse sentido é possível observar que a conversão do ácido oleico quando usado o catalisador imobilizado, independentemente do ensaio, apresentou maiores conversões em relação o catalisador livre. Esta tendência está coerente com os resultados observados para os estudos cinéticos e do rendimento de imobilização, destacando o efeito promotor do processo de imobilização sobre a conversão CALB para a síntese do éster.

Pois o processo de imobilização da CALB em poliuretano trata – se de um método de confinamento (inclusão de matriz), onde a enzima é adicionada no momento do preparo do suporte, onde as moléculas de enzimas ficam aprisionadas entre as malhas do polímero, por ligações covalentes entre enzima e suporte, as quais favorecem muito a estabilidade da enzima, evitando assim a possibilidade de sua desnaturação e alterações indesejáveis,

permitindo a permeabilidade do substrato entre a matriz do suporte e a saída do produto (GARCÍA-ARRAZOLA et al., 2009).

Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Onde de acordo com a Figura 3.2.3, na forma de Gráfico de Pareto apresenta os efeitos absolutos das interações entre a variável massa de catalisador livre (g) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) empregando o catalisador livre em sistema de agitação mecânica.

Figura 3.2.3 - Gráfico de Pareto empregando o catalisador livre para a síntese de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.



Podemos observar que ambas as variáveis massa de catalisador (g) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) apresentaram efeito quadrático significativo negativo, ou seja, quanto maior a massa de enzima e temperatura no meio reacional, menor será a conversão obtida. E para a massa de catalisador (g) (linear) apresentou um efeito significativo positivo, apresentando quantidade suficiente para que a reação ocorra. Temperatura (linear) e a interação entre a variável massa de catalisador e temperatura não apresentaram efeito significativo.

Levando-se em consideração que a reação de esterificação envolve equilíbrio termodinâmico, é possível que, com concentração elevada de enzima no meio reacional, esta

tenha usado não apenas o ácido oleico como substrato, mas também a água formada durante a reação de esterificação.

Esse raciocínio está de acordo com as observações de Rodriguez e Fernandez-Lafuente (2010), os quais afirmaram que uma das condições experimentais de maior relevância nesse tipo de reação está relacionada com a atuação da água, que por ser um dos produtos da reação, deve ser removida com o intuito de deslocar o equilíbrio termodinâmico para que a síntese do éster ocorra com maior eficiência.

Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O modelo foi validado pela análise de variância ($F_{\text{cal}}(18,83) > F_{\text{tab}}(4,1)$) com coeficiente de correlação (R^2) = 0,97 (Equação 3.2.4) (Apêndices 3.2.1 e 3.2.2) para o catalisador imobilizado em sistema de agitação mecânica.

$$\text{Conversão (\%)} = 53,96 + 13,59M - 10,40M^2 + 10,21T - 9,01T^2 + 4,45M.T \quad (3.2.4)$$

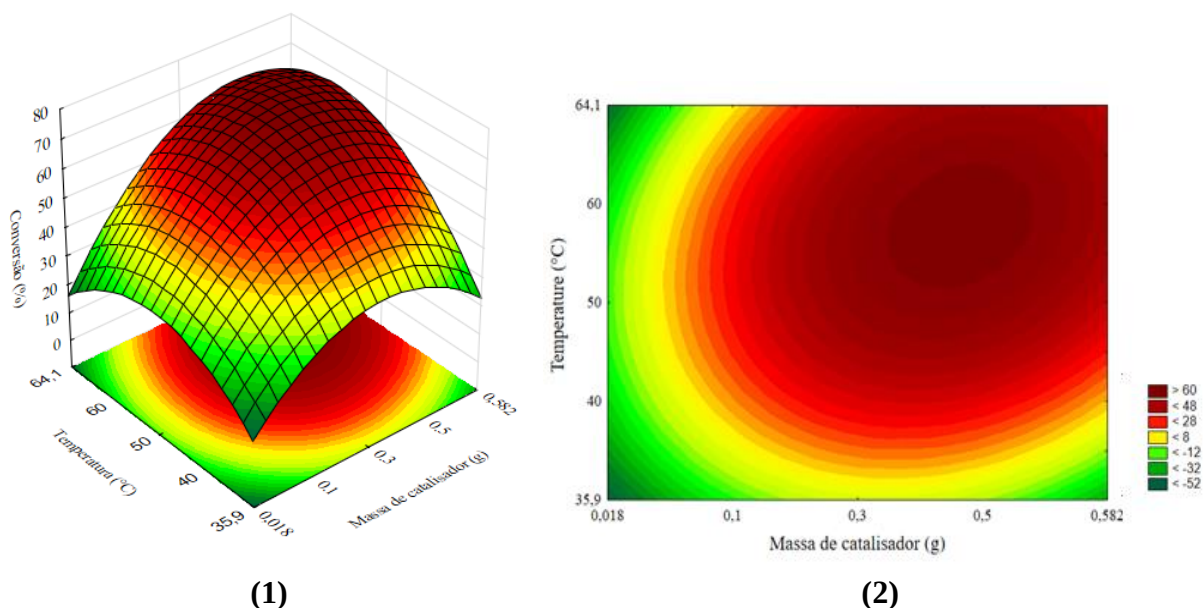
Onde: M = massa de catalisador (g) e T = temperatura (°C).

Através da Figura 3.2.4 (1 e 2) é possível observar a superfície de resposta e da curva de contorno empregando o catalisador imobilizado referente às interações entre a variável massa de catalisador e temperatura em sistema de agitação mecânica. Observa-se que as maiores conversões para a síntese de oleato de etila foram alcançadas na região compreendida entre 50 e 60°C e massa de catalisador entre 0,3 e 0,55 g, ou seja, próximas à condição do ponto central.

O processo de síntese apresentado em nosso estudo é um sistema livre de solvente orgânico, sendo assim um processo mais simples, econômico, sem desperdício e de baixa toxicidade. Desse modo, é uma excelente alternativa de reação pura (*neat reaction*), pois é uma estratégia de diminuição de resíduos, que é muito utilizado, principalmente na indústria, e se define como a quantidade de resíduo gerado para cada quilograma de produto formado (SHELDON, 2007).

Resultados distintos foram reportados por Zago (2010) empregando *Rhizopus microsporus* oriundo de bagaço de cana e de semente de girassol para sintetizar o éster de oleato de etila (30°C e 10% de catalisador) em n-heptano, apresentando uma maximização da conversão de 98% em 3 horas de reação em sistema de agitação mecânica.

Figura 3.2.4 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado para a síntese de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.



Madalozzo et al. (2011) nas mesmas condições utilizando a *Rhizopus oryzae* imobilizado em Accurel MP-1000 apresentou a maximização da conversão de 93% em 0,4 horas. Salum et al. (2008) com a *Burkholderia cepacia* (LTEB 11) imobilizada em Accurel EP-100 obteve uma conversão de 67% em 3 horas e Fernandes et al. (2007) uma conversão foi de 94% em 18 horas.

Em relação à conversão, o valor encontrado, apesar de significativos e em concordância com a literatura para a síntese do oleato de etila frente a diferentes lipases livres e imobilizadas em diferentes suportes, demanda elevados tempos reacionais (40 minutos). Uma das formas de redução deste tempo, o qual pode ser acompanhado por um aumento da conversão, pode ser mediante o emprego de novas tecnologias, como a agitação ultrassônica, ou de desenhos reacionais, como em fluxo contínuo.

3.2.3.2 Sistema de agitação ultrassônica

A matriz do DCCR 2^3 completo para a síntese de éster de oleato de etila em modo batelada: sistema de agitação ultrassônica, em função das variáveis estudadas massa de catalisador imobilizado (g), temperatura (°C) e potência ultrassônica (%), bem como a resposta acompanhada (conversão do ácido oleico), encontram-se apresentados na Tabela 3.3.4.

Tabela 3.3.4 - Matriz do DCCR 2³ completo empregando o catalisador imobilizado, em função das variáveis estudadas temperatura (°C), massa de catalisador (g) e potência ultrassônica (%) para a síntese de éster de oleato de etila em sistema batelada de agitação ultrassônica.

Ensaio	Temperatura (°C)	Massa de catalisador (g)	Potência ultrassônica (%)	Conversão do ácido oleico (%)
1	-1 (35)	-1 (0,1)	-1 (40)	18,4 ± 0,6
2	-1 (35)	-1 (0,1)	1 (80)	26,6 ± 1,8
3	-1 (35)	1 (0,5)	-1 (40)	19,0 ± 0,2
4	-1 (35)	1 (0,5)	1 (80)	59,2 ± 1,4
5	1 (65)	-1 (0,1)	-1 (40)	31,3 ± 0,5
6	1 (65)	-1 (0,1)	1 (80)	41,3 ± 4,6
7	1 (65)	1 (0,5)	-1 (40)	51,2 ± 5,3
8	1 (65)	1 (0,5)	1 (80)	65,2 ± 0,3
9	- 1,68 (24,8)	0 (0,3)	0 (60)	39,2 ± 1,7
10	1,68 (75,2)	0 (0,3)	0 (60)	60,6 ± 1,0
11	0 (50)	-1,68 (0,068)	0 (60)	18,1 ± 2,1
12	0 (50)	1,68 (0,532)	0 (60)	56,2 ± 2,9
13	0 (50)	0 (0,3)	- 1,68 (26,4)	39,6 ± 0,8
14	0 (50)	0 (0,3)	1,68 (93,6)	66,7 ± 0,6
15	0 (50)	0 (0,3)	0 (60)	61,8 ± 1,3
16	0 (50)	0 (0,3)	0 (60)	63,0 ± 2,8
17	0 (50)	0 (0,3)	0 (60)	64,2 ± 2,5

*Parâmetros fixos: massa de substrato de 5 g, razão molar dos substratos de 1:1 e tempo de 15 minutos de reação em agitação ultrassônica.

A maior conversão, com 66,7% foi observada para o ensaio 14, o qual foi conduzido empregando temperatura de 50°C, massa de catalisador de 0,3 g e potência ultrassônica de 93,6%.

De uma maneira geral, como no estudo conduzido anteriormente empregando a agitação mecânica, o sistema ultrassônico de acordo com as variáveis avaliadas, quando analisadas de forma independente, apresentaram efeito positivo. A variável massa de catalisador apresentou um aumento na conversão, independente da temperatura e da potência utilizada (ensaio 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, 6 e 8, 13 e 14). O mesmo comportamento foi observado para a potência

ultrassônica (ensaio 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, 11 e 12) e temperatura (ensaio 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8, 9 e 10), independente das outras variáveis estudadas.

Independente da variável, as principais diferenças em termos de conversão foram observadas entre os ensaios conduzidos empregando os pontos extremos (9 e 10, 11 e 12, 13 e 14). Cabe destacar que os ensaios empregando as condições extremas superiores, dentro da região avaliada para cada variável, foram os que apresentaram, juntamente com o ponto central, as maiores conversões, superiores a 56% em 15 minutos reacionais.

Como já mencionado anteriormente, o estudo dos parâmetros temperatura e massa de catalisador apresentam importantes papéis em um sistema reacional. A temperatura normalmente influencia no equilíbrio químico dos sistemas endotérmicos, como a síntese de éster, e na difusibilidade dos substratos, enquanto que a massa de enzima atua proporcionando o aumento de sítios ativo no meio reacional.

Em ambos os experimentos o casos seus aumentos, dentro de faixas aceitáveis, as quais devem ser definidas experimentalmente, pois variam em função da enzima, suporte e meio reacional, tendem a favorecer o processo reacional, normalmente na forma de melhores conversões.

Para avaliação do efeito da frequência/potência ou energia ultrassônica sobre a síntese de éster de oleato de etila, foi possível observar através dos resultados obtidos, que o rendimento de conversão foi proporcional ao aumento da energia ou potência ultrassônica empregada.

Choudhury et al. (2013) chamam a atenção para esse fato, pois o efeito das bolhas de cavitação acelera consideravelmente o poder dissipação das moléculas e solubilidade dos reagentes, aumentando a intensidade, energia liberada e, conseqüentemente a velocidade reacional (KHAN et al., 2015), além de proporcionar um baixo consumo energético (KWIATKOWSKA et al., 2011; MARTINS et al., 2013).

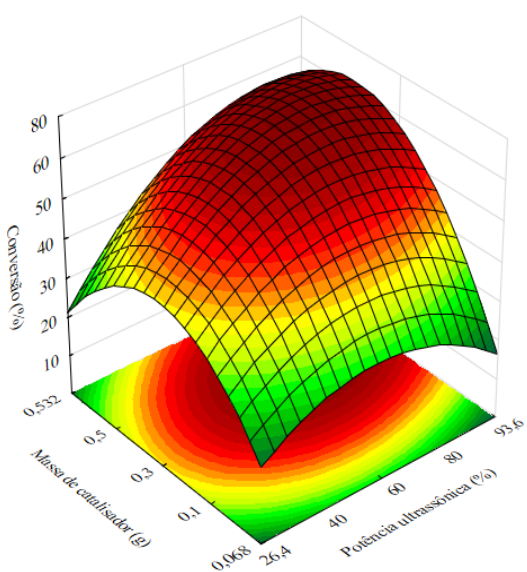
Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O modelo foi validado pela análise de variância ($F_{cal}(17,34) > F_{tab}(3,63)$) com coeficiente de correlação (R^2) = 0,97 (Equação 3.2.5) (Apêndices 3.2.3 e 3.2.4), a qual foi adicionado na falta de ajuste para a interação entre temperatura e massa de catalisador, empregando o catalisador para o sistema de agitação ultrassônica.

$$\text{Conversão (\%)} = 63,44 - 7,45T - 6,13T^2 + 10,33M - 10,65M^2 + 8,15P - 4,98P^2 + 4,50T.P - 3,05M.P \quad (3.2.5)$$

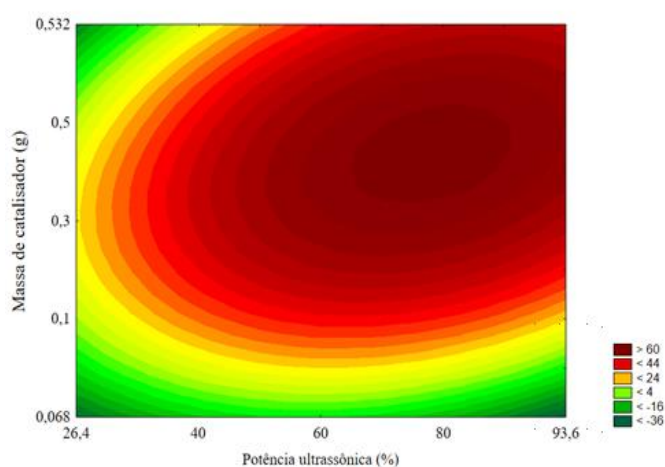
Onde: T = temperatura (°C), M = massa de catalisador (g) e P = potência ultrassônica (%).

A superfície de resposta e curvas de contorno empregando o catalisador imobilizado para as interações entre a variável massa de catalisador, temperatura e potência ultrassônica (%) em sistema de batelada com agitação ultrassônica é apresentada nas Figuras 3.2.5 (1 e 2).

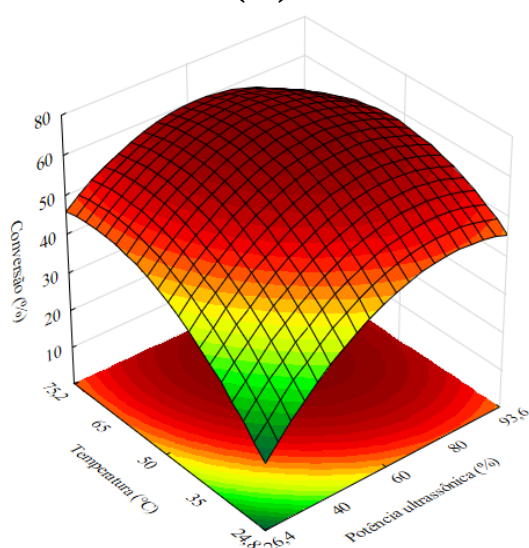
Figura 3.2.5- Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado para a síntese de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.



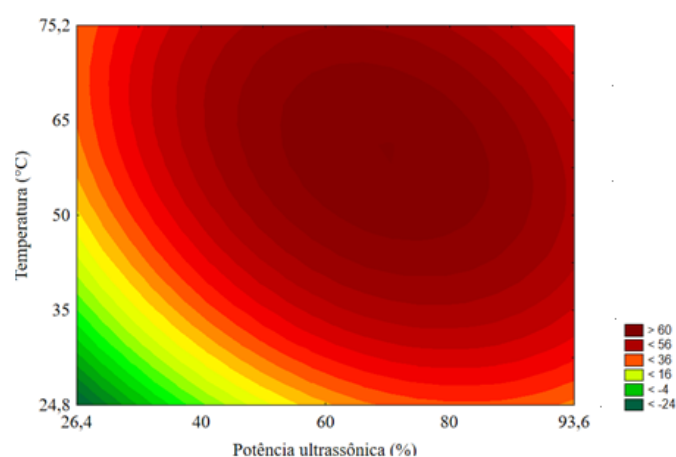
(a1)



(a2)



(b1)



(b2)

As maiores conversões (> 50%) para a síntese de ésteres de oleato de etila foram alcançadas na região correspondente a elevada massa de catalisador, entre 0,3 a 0,51 g, temperatura, entre 45 a 70°C e potência ultrassônica, entre 56 a 85%.

A literatura reporta várias situações referentes à aplicação do sistema ultrassônico como ferramenta para auxiliar nas reações, tanto de síntese (KUMAR et al., 2010; BATISTELLA, 2011; POPIOLSKI, 2011; FEITEN et al., 2014), quanto de hidrólise (BABICZ et al., 2010), cujos resultados apresentam variações distintas tanto para o rendimento quanto para o tempo, indicando a necessidade de estudos de otimização como os realizados no presente trabalho.

Feiten et al. (2014) para a síntese de ácidos graxos livres a partir de óleo de soja, empregando as lipases comerciais de pâncreas suíno e Lipozyme, obteve conversões de 25%, em 24 horas de reação, e de 89% em 2 horas, respectivamente, para o sistema reacional submetido ao ultrassom (100% da potência do ultrassom (132 W)).

Kumar et al. (2010) na produção de biodiesel através da transesterificação do óleo de *Jatropha curcus* obtiveram conversões de 98,53% em 15 minutos reacionais, empregando como catalisador o Na/SiO₂ e metanol como insumo, ao submeterem o sistema ao ultrassom. Silveira (2015) para a síntese de ascorbil oleato (potência do ultrassom de 132 W, razão molar de 1:9 e 70°C) observou conversão de 66% em 3 horas de reação.

Popiolski (2011) na síntese de biodiesel em sistema livre de solvente, empregando a Novozym 435 (razão molar 1:3, 70°C, 40% de potência de 132W) obteve conversão de 68% em 60 minutos reacionais. Batistella (2011) obteve em seu estudo um rendimento de 57% em ésteres etílicos (potência ultrassônica e catalisador de 27,1% e 63°C) utilizando a enzima Novozym 435 em sistema com solvente orgânico.

Kumar et al. (2010) avaliaram a síntese de ésteres metílicos através da metanólise do óleo de pinhão manso empregando a lipase *Chromobacterium viscosum* imobilizada como catalisador (razão molar óleo:álcool metílico de 1:4, massa de catalisador de 5% e potência ultrassônica de 50%), alcançando conversão de 84,5% em 30 minutos de reação.

Yu et al. (2010) na síntese de biodiesel com óleo de soja e metanol (50% de potência ultrassônica, 1:6 de óleo:álcool metílico, 6% de catalisador e 40°C) empregando a Novozym 435 obtiveram conversão de 96% em 4 horas de reação.

Babicz et al. (2010) na hidrólise de óleo de soja empregando a Lipozyme TL IM (massa de catalisador de 2%, frequência de 47kHz e potência de 125W) obtiveram 40% em 3 horas reacionais.

De maneira geral, através dos resultados obtidos nesse estudo, mostrou-se que com o auxílio da irradiação ou potência ultrassônica é possível se obter ésteres de oleato de etila em um tempo reacional relativamente curto (15 minutos), principalmente quando comparado com o sistema em batelada, sem perder em rendimento de conversão, apresentando-se como um processo alternativo, que em função de sua simplicidade, qualifica-se como promissor para melhorar, tanto as condições reacionais, quanto do rendimento em conversão.

3.2.3.3 Reações em sistema de fluxo contínuo

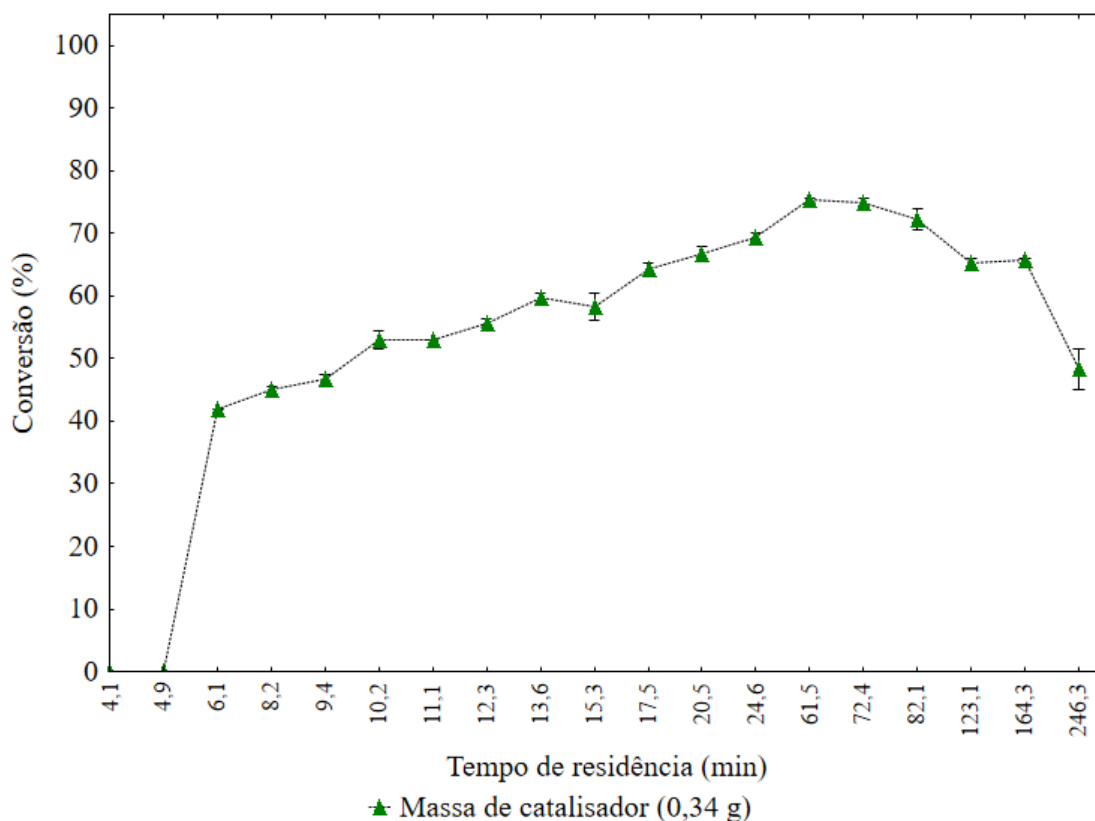
O processo de fluxo contínuo foi conduzido empregando as condições otimizadas no sistema em batelada com agitação mecânica, ou seja, uma razão molar ácido:álcool de 1:1 e temperatura de 50°C. Os ensaios em fluxo contínuo foram conduzidos empregando 0,34 g de catalisador (massa de catalisador otimizado na etapa de síntese de éster de acetato de isoamila), variando o tempo de residência entre 1 e 243,6 minutos, mediante o controle do fluxo, entre 10 e 1000 $\mu\text{L}/\text{minuto}$. A evolução da conversão em função do tempo de residência está apresentada na Figura 3.2.6.

De acordo com a figura a maximização da conversão foi de 75% em 61,5 minutos de contato, o qual corresponde a um fluxo de 0,01 mL/minuto , lembrando que o tempo de residência (tempo de contato entre o substrato e o imobilizado), de acordo com a massa de catalisador (volume do reator) pela vazão do fluxo (fluxo dos reagentes).

Nesse sentido podemos observar que os resultados empregando uma vazão de 225 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ com um tempo de residência corresponde a 4,9 minutos com conversão de 43,8%, a vazão de 125 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 9,4 minutos com conversão de 48%, a vazão de 75 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 13,6 minutos com conversão de 60%, a vazão de 25 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 64,1 minutos com conversão de 75%, a vazão de 5 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 123,1 minutos com conversão de 70% e para a vazão de 10 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ o tempo de residência corresponde a 246,3 minutos com conversão de 48%,

Estes resultados são muito promissores, visto que se obteve um aumento de aproximadamente 11% em termos de conversão do ácido oleico quando comparado aos métodos tradicionais, os quais apresentaram 58,8% de conversão em 40 minutos de reação para o sistema em batelada com agitação mecânica e 66% em 15 minutos de reação para o sistema em batelada submetido ao sistema ultrassônico.

Figura 3.2.6 - Tempo de residência em função da velocidade de reação empregando o catalisador imobilizado para a síntese do oleato de etila em sistema de fluxo contínuo.



Como relatado anteriormente, este melhor desempenho observado para o sistema em fluxo contínuo em relação ao sistema de agitação em batelada, mecânica ou ultrassônica, pode estar vinculada a diferentes fatores, como a inibição pelo produto (devido a problemas difusionais), dissipação do calor (LOPES, 2015; GOMES, 2016) e maior tempo de contato com o catalisador (COLOMBO, 2011).

Associativamente, além da melhora na conversão, normalmente aos sistemas em fluxo contínuo está relacionada a uma série de características desejáveis quando se deseja uma aplicação industrial, tais como: (i) facilidade de contato e posterior separação do catalisador; (ii) remoção contínua de substâncias inibidoras; (iii) reutilização de catalisadores sem a necessidade de uma separação prévia; (iv) permite lidar com substratos de baixa solubilidade, utilizando grandes volumes contendo baixas concentrações de substrato; (v) eleva a qualidade do produto consistente e estabilidade do catalisador, melhorados devido à facilidade de automatização e de controle; (vi) é adequado para a produção de longo prazo e em escala industrial, diferentemente de outros tipos de sistemas, onde o catalisador está sujeito à

agitação e susceptíveis quebras, provocadas pela tensão de cisalhamento mecânica; (vii) é mais rentável que a operação em batelada (COLOMBO, 2011; VELJKOVIĆ et al., 2012).

Outro ponto de extrema relevância é a distribuição do tempo de residência, pois permite diagnosticar problemas de escoamento, entre os quais se destacam: i) existência de zonas de estagnação do fluido ou zonas mortas e segregação, resultante das condições de mistura no reator (FARIA, 2014).

Em termos gerais, os resultados de conversão reportada pela literatura obtidos em sistema de fluxo contínuo na síntese de ésteres, mostram-se contraditórios, pois existem diversas possibilidades de utilização, que vão do melhoramento de processos a estudos visando o aumento de escala (OLIVEIRA, 2015).

Poucos trabalhos são apresentados na literatura referentes à eficiência na utilização de sistemas contínuos, dentre eles destacam-se os estudos de Yoshida et al. (2012), que utilizaram células íntegras na produção de biodiesel em fluxo contínuo com uma mistura de óleo de soja, alcançando 96,1% de rendimento de ésteres metílicos.

Arumugam e Ponnusami (2014) utilizaram o óleo de *Callophyllum inophyllum*, originado da árvore *Magnoliophyta*, juntamente com metanol e células íntegras imobilizadas (*Rhizopus oryzae*) em espumas de poliuretano, para a síntese de biodiesel (razão molar 1:12 óleo: álcool e 35°C) em sistema contínuo, alcançando 92% de conversão em ésteres metílicos.

Faria (2014) na síntese de monoésteres de etila (biodiesel) com óleo de coco, catalisada por células de *Mucor circinelloides* URM 4182 cultivadas e imobilizadas *in situ* em espuma de poliuretano, em sistema contínuo (razão molar de 1:8 (óleo:álcool), vazão volumétrica de 0,06 µL/minuto e 35°C) obtiveram, em 96 horas, uma conversão de 96%.

Lee et al. (2010) na síntese de biodiesel em modo contínuo (vazão, 0,8 µL/minuto), utilizando lipases *Candida rugosa* e *Rhizopus oryzae* imobilizadas obtiveram rendimentos de conversão de 97,98% em 3 horas reacionais.

O mais importante, porém, é entender que a tecnologia de fluxo contínuo não é uma solução universal. Nem todos os processos podem ser beneficiados pela utilização desta tecnologia, sendo o processo de batelada ainda o mais recomendado na maioria dos casos. Sendo assim, a comparação entre os processos é ainda a maneira mais inteligente de buscar a solução de cada problema, ampliando os horizontes da química e expandindo as ferramentas que podem ser utilizadas para tal.

Nesse contexto, os resultados obtidos foram promissores e demonstraram a necessidade de estudos mais aprofundados em relação à potencialidade de lipase imobilizadas na síntese

de ésteres de oleato de etila em sistema em fluxo contínuo, pois se trata de uma ferramenta muito promissora e eficiente para o desenvolvimento de novas metodologias reacionais.

3.2.3.4 Estabilidade operacional

As condições operacionais empregadas para cada sistema {*agitação mecânica* (razão molar ácido oleico:álcool etílico de 1:1, massa de catalisador de 0,582 g, 50°C e 40 minutos reacionais), *agitação ultrassônica* (razão molar ácido oleico:álcool etílico de 1:1, massa de catalisador de 0,3 g, 50°C, potência ultrassônica de 93,3% em 15 minutos reacionais) e *fluxo contínuo* (razão molar ácido oleico:álcool etílico 1:1, 50°C, 0,34 g de massa de catalisador e tempo de residência de 61,5 minutos)}, foram as otimizadas, ou seja, que apresentaram as melhores conversões.

O sistema em fluxo contínuo foi acompanhado por um período de 1.601,1 minutos reacionais, onde cada ciclo é foi de 61,5 minutos reacionais, o que equivale ao tempo de residência ou tempo reacional.

A Figura 3.2.7 apresenta a estabilidade operacional (número de ciclos de contínuos de utilização) na síntese do oleato de etila, para os três sistemas avaliados (agitação mecânica e ultrassônica e de fluxo contínuo).

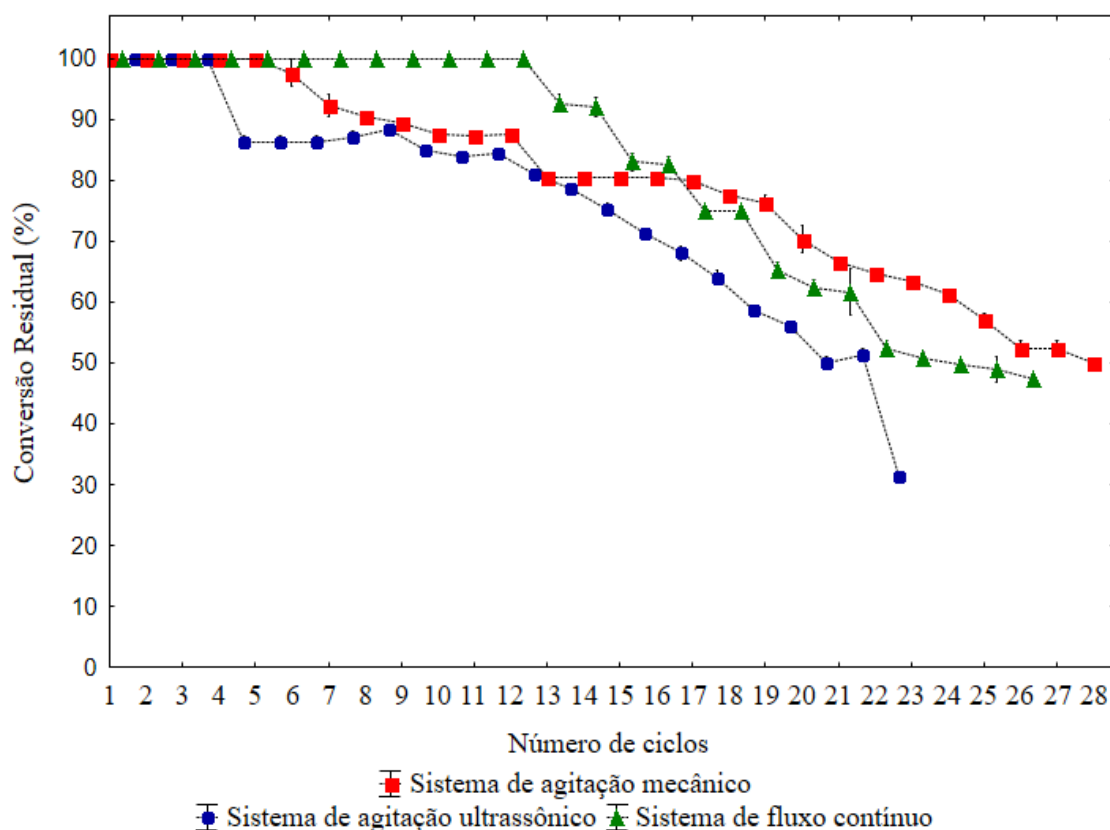
Considerando a conversão residual de 100%, com 13 ciclos contínuos de reutilização, o sistema em fluxo contínuo foi o que apresentou o melhor desempenho. Na sequência aparece a agitação mecânica com 5 ciclos e por último a agitação ultrassônica com 3 ciclos contínuos de reutilização.

Em uma análise mais ampla observamos que o fluxo contínuo e o modo batelada submetido à agitação mecânica apresentam 28 ciclos com conversão de $\approx 50\%$ em relação a inicial (conversão final de 43 e 41%, respectivamente), enquanto que o sistema batelada submetido à agitação ultrassônica apresenta somente 22 ciclos contínuos de reutilização com conversão residual superior a 53% em relação a inicial (conversão final de 29%).

A queda de conversão observada para os três sistemas no decorrer dos ciclos pode estar vinculada a diferentes causas, como perda de massa entre os ciclos, lixiviação da enzima do suporte e até mesmo a desnaturação do catalisador (CARVALHO et al., 2015).

Em relação ao fluxo contínuo, este melhor desempenho irá proporcionar um aumento significativo de produtividade. Além disto, este sistema não apresenta a necessidade de uma etapa posterior de filtração para separação do catalisador, além de permitir o emprego de maiores volumes de solventes contendo baixas concentrações de substrato (COSTA, 2014).

Figura 3.2.7 - Estabilidade operacional em sistema batelada de agitação mecânica (40 minutos), ultrassônica (15 minutos) e de fluxo contínuo (61,5 minutos) para a síntese de oleato de etila.



Onde: Para o sistema de batelada: agitação mecânica (razão molar ácido oleico:álcool etílico de 1:1, massa de catalisador de 0,582 g, 50°C e 40 minutos reacionais), agitação ultrassônica (razão molar ácido oleico:álcool etílico de 1:1, massa de catalisador de 0,3 g, 50°C, potência ultrassônica de 93,3% em 15 minutos) e fluxo contínuo (razão molar ácido oleico:álcool etílico 1:1, 50°C, 0,34 g de massa de catalisador e tempo de residência de 61,5 minutos) para a síntese de oleato de etila.

Esta tendência observada pode ser vinculada às características inerentes a cada processo em relação a fraturas no suporte. Entre os sistemas, o fluxo contínuo, o imobilizado por estar confinado dentro de um reator é menos suscetível a rupturas estruturais provocadas pela tensão de cisalhamento mecânica, a tal ponto que a própria literatura considera este sistema o mais adequado para a produção de longo prazo em escala industrial (COLOMBO, 2011).

Entre os sistemas em batelada, a agitação mecânica, apesar de uma agitação mais intensa, apresentou melhor desempenho que a agitação ultrassônica. Este desempenho inferior observado para o sistema ultrassônico, em relação à mecânica, foi vinculado à exposição do biocatalisador à irradiação ultrassônica, a qual além de intensificar o rompimento físico do suporte, facilitando a lixiviação da enzima, pode estar alterando a conformação da enzima,

contribuindo para a perda de atividade do imobilizado (CENI et al., 2011; BANSODE e RATHOD, 2014; WAGHMARE e VETAL, 2015).

Os resultados são promissores em relação aos resultados observados na literatura para diferentes lipases imobilizadas em diferentes suportes e aplicados na síntese de ésteres distintos, cujos ciclos variaram entre 1 a 15, considerando atividades residuais entre 4 e 90% de conversão. Matos (2014) em sistema mecânica, empregando a CALB imobilizada em polimetilmetacrilato epoxilado (IMMOBEAD 350, ChiralVision) e a Novozym 435 para a síntese de oleato de etila (37°C em 24 horas reacionais) observaram 10 ciclos de reutilização para ambos os catalisadores com $\approx$ 90 e 70% em relação a inicial. O mesmo autor empregando a lipase tipo B de *Candida antarctica* imobilizada em octil-sílica obteve 10 ciclos com 77% de conversão do oleato de etila, em relação a inicial.

Adewale et al. (2015) em sistema ultrassônico empregando a lipase de *Candida antarctica* B (CALB) na transesterificação de biodiesel (6% de catalisador, 20 minutos e potência ultrassônica de 40% a 5 Hz) apresentou 3 e 5 ciclos com 40% em relação a inicial. Jadhav e Gogate (2011) relataram para a hidrólise (catalisador de 0,4 mg para Lipozym Z e 0,8 mg para Lipozym 2 em 6 horas reacionais) e esterificação (catalisador de 0,1 g em um tempo de reação de 7,5 horas) de ésteres metílicos, assistida por ultrassom 7 ciclos com rendimento superior a 50% em relação a inicial.

Michelin et al. (2015) na síntese de ésteres etílicos a partir de ácidos graxos (FAEE) por meio de óleo de Macaúba (*Acrocomia Aculeata*) e de óleo de coco (MCO), sem solvente, usando a lipase imobilizada (Novozym 435) sob a influência do ultrassom (frequência de $\approx$ 132 W, 100% de potência ultrassônica, 20% de catalisador, 65°C em 30 minutos de reação) com 5 ciclos de reutilização com 50% em relação a inicial.

Hajar et al. (2009) na metanólise de óleo de canola livre de solventes orgânico em reator empregando a lipase Novozym 435, observaram que após 5 ciclos e 432 horas de reação a conversão foi mantida a 97% em relação a inicial. Poppe et al. (2013b) na síntese de ésteres metílicos (25% de catalisador em 72 horas reacionais em agitação mecânica empregando Novozym - 435 e CALB obtiveram 8 ciclos, com 70% em relação a inicial.

Khan et al. (2015) na síntese de oleato de cetila em sistema ultrassônica (60°C, 5% de catalisador, potência ultrassônica de 60%, frequência de ultrassom de 25 kHz em 30 minutos) e mecânica (2 horas) empregando a lipase comercial *Candida antarctica* lipase B CALB TM 10000 obteve 1 ciclo com 80% em relação a inicial no sistema ultrassônica.

Mat Radzi et al. (2005) síntese de oleato de etila (60 minutos, 37°C, massa de catalisador de 0,3 g e velocidade de agitação de 150 rpm) obteve 9 ciclos com 100% e de 13 ciclos com 90% em relação inicial empregando a Novozym – 435.

Batistella et al. (2012a) em sistema ultrassônica na transesterificação do óleo de soja com etanol utilizando duas lipases Lipozyme RM IM e Novozym 435 (potência ultrassônica de 90%, frequência de 100 W, 60°C e o tempo de reação de 4 horas), com 2 e 8 ciclos contínuos de reutilização com 57% em relação a inicial.

Dias (2015) na produção de ésteres etílicos de biodiesel em reatores de leito fixo com sólido fermentado por *Burkholderia lata* (SFBL) para catalisar a esterificação etílica de ácidos graxos, com 6 ciclos (48 horas cada) consecutivos de síntese (total de 288 horas) com 51% em relação a inicial.

Em termos de fluxo contínuo há poucos dados reportados na literatura em termos de estabilidade operacional (número de ciclos) como enfatizamos em nosso estudo, visto que na maioria deles referem-se em termos de tempo (horas ou dias), dificultando assim maiores comparações.

3.2.4 Considerações Parciais

Assim como na síntese do acetato de isoamila, os estudos cinéticos para a síntese de oleato de etila sugerem a manifestação de duas reações durante o processo, uma de esterificação e outra de hidrólise, as quais se manifestam com intensidades distintas durante o ensaio.

Em termos de otimização da síntese de oleato de etila em sistema de agitação mecânica e ultrassônica, as variáveis temperatura e massa de catalisador imobilizado apresentaram efeitos positivos, apresentando conversões superiores a 58 e 66% (0,582 g de massa de catalisador e 50°C) para o sistema mecânico em 40 minutos reacionais (0,3 g de massa de catalisador, 50°C e potência ultrassônica de 96,6%) para o sistema ultrassônico em 15 minutos reacionais, respectivamente.

Quando realizada a síntese do oleato de etila em sistema de fluxo contínuo, observou-se que o tempo de residência (vazão do fluxo dos reagentes) é uma variável importante no processo, pois afeta diretamente na conversão, atingindo o melhor desempenho catalítico ($\approx$ 75% de conversão) em 61,5 minutos reacionais.

O processo de reutilização do catalisador imobilizado apresentou 28 ciclos no sistema de fluxo contínuo e em batelada sob agitação mecânica, e de 22 ciclos no sistema batelada de agitação ultrassônica.

Visto que até o momento não foram encontrados trabalhos disponíveis na literatura sobre a síntese de ésteres catalisada por lipase imobilizada em poliuretano em sistema de fluxo contínuo, os resultados aqui apresentados podem incentivar a auxiliar e até mesmo serem tomados como base para estudos e pesquisas científicas futuras, juntamente com o referente à estabilidade operacional (ciclos e reciclos de utilização) do biocatalisador demonstram a potencialidade de aplicação.

3.3 BUTANOATO DE ETILA

Ésteres de ácido butanoico (em particular o butanoato de etila obtida via esterificação do ácido butanoico e do álcool etílico) são de grande importância comercial, pois são empregados normalmente como aditivos nas indústrias de bebidas, cosméticos, farmacêuticos e de alimentos, dando aroma e fragrância característico de abacaxi (KHAN et al., 2015; ZHANG e NAKAJIMA, 2015; MATTE et al., 2016).

Ésteres formadores de aroma são obtidos por dois processos principais, a síntese química e extração de fontes naturais. O processo clássico para produção de ésteres ocorre através da catálise ácida, onde os resíduos de ácido graxo e do catalisador podem ser removidos através de um tratamento alcalino, o que aumenta o impacto ambiental por emitirem certa carga de resíduos não biodegradáveis, ser de elevado custo energético de produção. Podendo ainda, a síntese química levar à formação de produtos secundários indesejáveis e impurezas, limitando seu uso principalmente na indústria de alimentos, bebidas e de fármacos (DHAKE et al., 2012; ZHANG e NAKAJIMA, 2015).

Nesse sentido, a catálise enzimática vem sendo utilizada como alternativa para a obtenção de ésteres aromáticos, como o butanoato de etila, reduzindo a produção de reações indesejáveis, não sendo necessário o uso de solventes, além de reduzir o custo de produção (JIN et al., 2015; KHAN et al., 2015; ZHANG e NAKAJIMA, 2015; MATTE et al., 2016).

Os ésteres obtidos via enzimática, ainda tem a vantagem de receberem a conotação de aromas naturais, cuja demanda está crescendo rapidamente, em resposta aos consumidores, que estão solicitando produtos mais naturais, bem como os perfumistas e flavoristas, que estão à procura de novos ingredientes (MATTE et al., 2016; RAHMAN e WAHAB, 2016).

Na literatura diferentes processos, empregando lipases de diferentes fontes, são encontrados para a síntese do butanoato de etila, os quais apresentam os mais variados resultados, seja de rendimento, conversão e estabilidade operacional (Tabela 3.3.1).

Nesse contexto, o presente estudo, empregando CALB imobilizada em poliuretano, teve como objetivo maximizar o processo de síntese de ésteres de butanoato de etila em sistema de batelada de agitação (mecânica e ultrassônica) em sistema livre de solvente e verificar sua capacidade de reutilização em repetidos ciclos.

Tabela 3.3.1 - Exemplos de lipases aplicadas na síntese do butanoato em sistema de agitação mecânica e ultrassônica.

Enzima	Temp. (°C)	ME (g/%)	T (h/min)	Sistema	Conversão (%)	Autor
<i>Candida rugosa</i> (Lipase AY-30)	37	31,7%	8,7 h	agitação mecânica	72,6% butanoato de L-mentila	Shih et al. (2007)
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	24 h	agitação ultrassônica	99,1% butanoato de etila	Guillén et al. (2012)
<i>Rhizomucor miehei</i> (RML)	25	200 mg	6 h	agitação mecânica	92% butanoato de etila	Oliveira (2012)
		100 mg			89% butanoato de metila	
<i>Cepacia sp.</i>	50		2 h		93% butanoato de butila	Silva et al. (2014b)
CALB	50	40 mg	2 h		80% butanoato de butila	Brígida et al. (2008)
		40 mg			50% butanoato de metila	
Novozym - 435	30	-	6 h	agitação mecânica	56% isobutanoato de butila	Yadav e Lathi (2007)
	46	7	2,5 h	agitação ultrassônica	94% acetato de butila	Martins et al. (2013)
	60	2	10 h	agitação ultrassônica	83% butanoato de isoamila	Bansode e Rathod (2014)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL-IM)	30	-	6 h	agitação ultrassônica	90% butanoato de etila	Paludo et al. (2015)
	30	35	6 h		61% butanoato de etila	Paludo et al. (2015)
	Lipozyme®	50	200 mg	24 h	agitação mecânica	60% butanoato de butila
79% butanoato de isoamila						
57% butanoato de butila						Matte et al. (2016)
58% butanoato de isoamila						
25		100 mg	6 h	86% butirato de metila		Oliveira (2012)
	200 mg	89% butirato de etila				
Lipozyme 435	30	12%	4 h	agitação mecânica	95% butanoato de etila	Piazza et al. (2016)
	50	5%	60 min			

*Parâmetros fixos: CALB = *Candida antarctica* B; Temp. (°C) = Temperatura (°C); ME = Massa de Enzima (g/% ou mg/mL ou g/L) e T = Tempo (horas/minutos) e sistema de agitação mecânica (rpm).

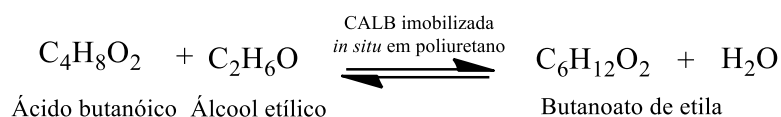
3.3.1 Materiais e Métodos

Além da enzima lipase B de *Candida antarctica* - CALB (Novozyme NZL-102), imobilizada em poliuretano (PU) foram utilizados os seguintes solventes ácido butanoico (Quimex), álcool etílico (Merck) e diclorometano (Vetec).

3.3.2 Síntese do éster butanoato de etila

A Fórmula molecular do éster de butanoato de etila está demonstrada através da Figura 3.3.1.

Figura 3.3.1 - Fórmula molecular do éster de butanoato de etila.



A síntese de butanoato de etila via reação de esterificação entre o ácido butanoico e álcool etílico foi realizado em triplicata, em frascos de 50 mL, livre de solvente orgânico, mantendo-se fixa a massa total de substrato (ácido butanoico e álcool etílico) (5 g). Após cada reação, o meio reacional foi submetido a uma etapa de filtração simples para separação do catalisador enzimático do meio reacional, o qual foi armazenado em refrigerador (2 a 8°C) para posterior análise por cromatografia gasosa (CG).

Paralelamente, foi realizado um ensaio em branco, o qual foi conduzido na ausência de enzima, nas mesmas condições reacionais (razão molar, agitação e temperatura), minimizando assim possíveis efeitos do processo.

3.3.2.1 Reações em sistema de batelada: agitação mecânica e ultrassônica

Avaliação do tempo de reação

Inicialmente foi realizado um estudo cinético para avaliar o efeito do tempo reacional (0 a 400 minutos) em relação ao rendimento em termos de conversão em butanoato de etila. A condição reacional empregada nesta etapa foi a do ponto central do DCCR 2³ completo (Tabela 3.3.2) com a massa de catalisador imobilizado de 0,3 g, temperatura de 50°C e razão molar ácido butírico:álcool etílico de 1:5, que será empregado posteriormente para a etapa de otimização do processo. Para o sistema de agitação mecânica, a agitação foi fixada em 160 rpm e para o sistema de agitação ultrassônica a potência foi fixada em 60% em relação à

potência do banho que é 132 W, ou seja, em 79,2 W e as análises foram realizadas em triplicata.

3.3.2.2 Otimização do processo de síntese do butanoato de etila

Reações em batelada

O processo de otimização da síntese do butanoato de etila foi conduzido mediante o emprego de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Sistema de agitação mecânica

Para o sistema de agitação mecânica as variáveis estudadas foram a massa de catalisador (0,036-0,564 g), temperatura reacional (24,8-75,2°C) e razão molar ácido butirico:álcool etílico (1:1,64-1:8,36), mantendo-se fixa a agitação mecânica (Shaker - modelo MA 420 - 600 Watts, Modelo Marconi) em 160 rpm e o tempo reacional (180 minutos) de acordo com metodologia de Ferraz (2014) com modificações.

Sistema de agitação ultrassônica

Para o sistema de agitação ultrassônica as variáveis estudadas foram temperatura reacional (24,8 - 75,2°C), razão molar ácido butirico:álcool etílico (1:1,64 - 1:8,36) e potência ultrassônica (26,4 - 93,6%) (Unique ultraSonic Cleaner, USC-1800A, US 40 KHz, US 132 W), mantendo-se fixo a massa de catalisador (0,5 g) e o tempo reacional (180 minutos).

Reações em sistema de fluxo contínuo

Para o sistema de fluxo contínuo, os ensaios não foram realizados pois foram encontrados alguns problemas operacionais para o desenvolvimento do mesmo, para a síntese de éster de butanoato de etila. Pois essa etapa foi realizada através do projeto PROCAD onde este proporcionou 20 dias úteis para a realização no Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica está situado no 7º Andar do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob coordenação de Rodrigo O. M. A. de Souza.

3.3.2.3 Determinação da conversão (%)

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa (GC) com detector de ionização de chama (CG-FID), empregando uma coluna capilar apolar (modelo RT-WAX) de 30 m de comprimento, com diâmetro interno de 0.32 mm. A temperatura inicial da coluna foi de 40°C, permanecendo por 5 minutos, com elevação da temperatura até 180°C a uma taxa de

14°C/minuto, permanecendo nesta temperatura por mais 5 minutos. A quantidade de amostra injetada foi de 1 µL. Previamente a análise as amostras do meio reacional (100 µL) foram diluídas a 1 mL mediante a adição de 900 µL de diclorometano. As análises foram realizadas em triplicata.

A porcentagem de conversão foi calculada com base na redução da área de reagente limitante, considerando a estequiometria da reação (Equação 3.3.1).

$$C = \frac{Ab - Aa}{Ab} \times 100 \quad (3.3.1)$$

Onde: C (%) = Conversão, Ab = área do sinal referente ao ácido no ensaio em branco (corresponde ao ensaio sem enzima no tempo zero) e Aa = área do sinal referente ao ácido na amostra submetida à condição de síntese.

3.3.2.4 Estabilidade Operacional

O número dos ciclos operacionais para a lipase imobilizada na síntese de éster de butanoato de etila foi avaliada empregando a condição otimizada do DCCR, onde após cada reação o imobilizado foi submetido a um processo de filtração simples (papel filtro), retirando-se o excesso de meio reacional e submetida a uma nova etapa reacional. Este processo foi realizado sucessivamente até obtermos resultados em termos de conversão inferiores a 50% da conversão inicial e as análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados foram expressos em forma conversão, a qual considera a conversão inicial como 100% (Equação 3.3.2).

$$CR(\%) = \frac{C_{final}}{C_{inicial}} \times 100 \quad (3.3.2)$$

Onde: CR (%) = Conversão residual, C_{final} = Conversão final e $C_{inicial}$ = Conversão inicial.

3.3.2.5 Análise Estatística

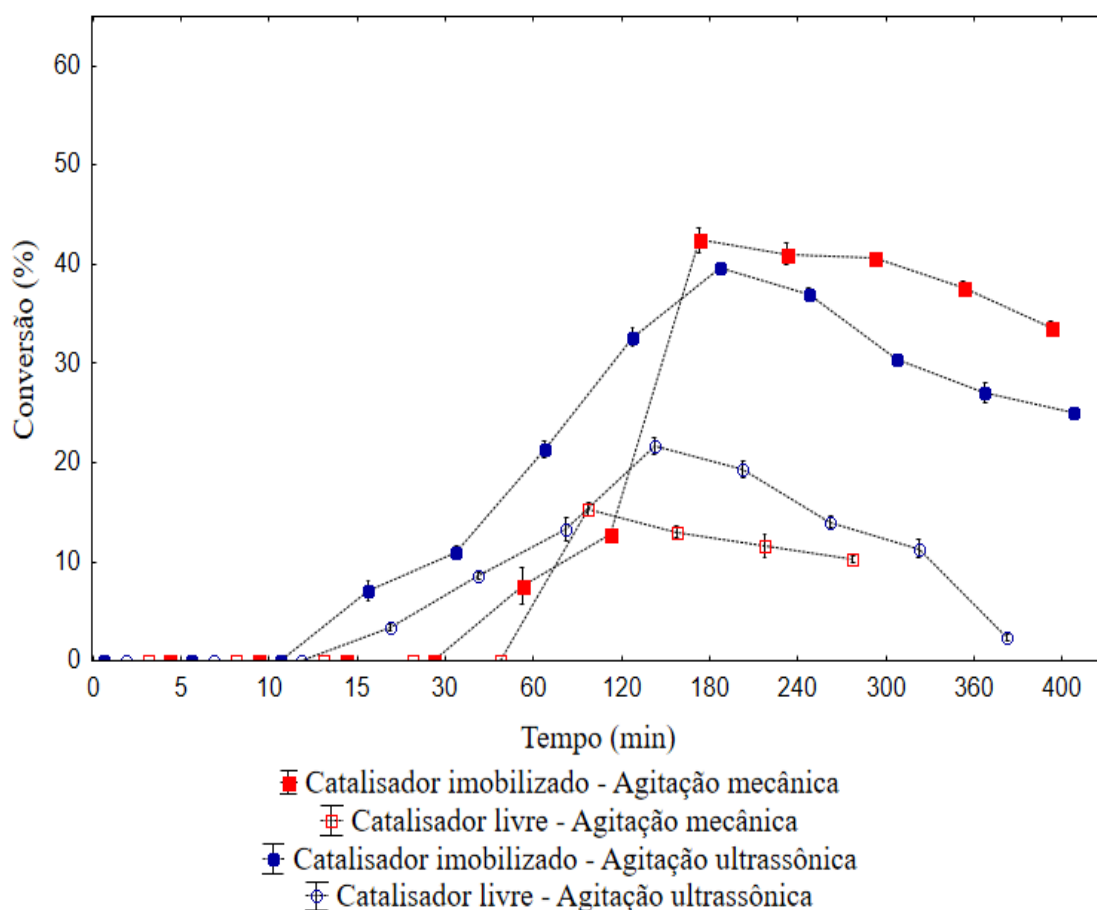
Os resultados foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamento de experimentos, com auxílio do software Statistica versão 5.0, com nível de significância de 95% de confiança.

3.1.3 Resultados e Discussões

Avaliação do tempo de reação

Para tanto, avaliou-se a síntese de éster de butanoato de etila na condição do ponto central do Delineamento Composto Central Rotacional DCCR, em função do tempo de reação (de 0 a 400 minutos), empregando catalisador livre e imobilizado para os sistemas em batelada submetidos à agitação mecânica e ultrassônica encontram se apresentados na Figura 3.3.2.

Figura 3.3.2- Evolução da conversão do éster de butanoato de etila em função do tempo reacional (minutos) empregando o catalisador livre e imobilizado para os sistemas em batelada submetidos à agitação mecânica e ultrassônica.



A conversão máxima, com aproximadamente ≈ 15 a 45% empregando o catalisador livre e imobilizado, em torno de 180 minutos reacionais, para o sistema de agitação mecânica e ultrassônica, respectivamente.

A principal diferença entre os catalisadores livre e imobilizado, está presente nos tempos reacionais (≈ 60 e 180 minutos, respectivamente) com as melhores conversões (≈ 15 e

45%, respectivamente) para sistema de agitação mecânica. Enquanto que para o sistema de agitação ultrassônica, para ambos os catalisadores, livre e imobilizado apresentaram conversões (≈ 20 e 45%) em tempos reacionais ≈ 120 e 180 minutos, respectivamente.

Cabe salientar que os ensaios foram realizados com a mesma massa de catalisador (livre e imobilizado). Neste contexto, este efeito é mais pronunciado se considerarmos que na massa do imobilizado (0,5 g) empregado no ensaio temos 5 vezes menos massa de enzima (0,01 g) em relação ao ensaio conduzido com a enzima livre (suspensão aquosa contendo 0,05 g de enzima).

Outro fator observado para os sistemas avaliados apresentaram comportamento semelhante com os ésteres já citados anteriormente, onde o aumento da conversão do ácido ocorre até um determinado tempo, seguido de uma diminuição da conversão, este fato pode estar relacionado com a inativação enzimática proporcionada pelo efeito térmico ao longo do tempo, da concentração do produto no meio reacional e até mesmo da inversão da reação de esterificação pela liberação de moléculas de água (hidrólise) (YU et al., 2010; LERIN et al., 2011b).

No entanto, no processo de agitação ultrassônica observa-se conversões maiores em tempos reacionais inferiores, tempos de 15 a 120 minutos, quando comparados com o sistema de agitação mecânica, indicando um efeito promotor do processo ultrassônico (LEONELLI e MASON, 2010; MARTINS et al., 2011b; LERIN et al., 2014) para ambos os catalisadores.

Este fato pode ser explicado segundo Liu et al. (2008) com o aumento na velocidade de formação de gotículas microscópicas, da superfície de contato e das forças coesivas que podem proporcionar a formação de microemulsões, podendo ser um recurso eficaz na mistura dos ácidos e álcoois em reações de esterificação, proporcionando uma energia de ativação suficiente para iniciar a reação mais rapidamente, com uma diminuição no tempo de reação e aumento nas taxas de conversão. Além de proporcionar alterações na estrutura da enzima, provocando uma maior absorção de energia potencial, favorecendo assim a reação, aumentando a conversão (KWIATKOWSKA et al., 2011; MARTINS et al., 2013; ZHAO et al., 2016).

Mahapatra et al. (2009) investigaram a influência da velocidade de agitação sobre a transferência de massa e observaram que um aumento da velocidade de agitação produz uma redução na espessura da película em torno das partículas sólidas, e em seguida, a resistência de transferência de massa diminui, causando uma maior dispersão da enzima e evitando a sua agregação.

Esse comportamento também foi observado por outros autores em estudos comparativos de sistemas de agitação ultrassônica, mecânica e magnética em reações de síntese. Paludo et al. (2015) obtiveram 61% de conversão do butanoato de etila em 6 horas de reação, em sistema ultrassônico, utilizando lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) (razão molar ácido: álcool 1:1 e 30°C).

Bansode e Rathod (2014) empregando a lipase de *Candida antarctica* (Novozym – 435) na esterificação do ácido butanoico: álcool isoamílico para a síntese de butanoato de isoamila (ácido: álcool de 1:2, 60°C e 2 g de peneiras moleculares e de catalisador imobilizado) observaram 96% de conversão em 3 horas de reação em sistema ultrassônica (83% de potência ultrassônica (70 W) e 25 kHz de frequência), em comparação a 83% de conversão em sistema mecânica (7 g de catalisador imobilizado) após 10 horas reacionais.

Aragão et al. (2009) na esterificação de ácido butanoico com álcool isoamílico para a síntese de butanoato de isoamila, utilizando as lipases Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM (3 g de catalisador, razão molar ácido: álcool isoamílico de 1:1 e 30°C) obtiveram conversões de 4% em 72 horas e 80% em 24 horas reacionais, respectivamente em sistema de agitação mecânica.

Gomes et al. (2004) na esterificação direta do ácido butanoico e do álcool butílico, na síntese de butanoato de butila empregando a lipase de *Candida rugosa* (ácido: álcool de 1:2,5, 30°C e 80 mg de catalisador), relataram conversão de 50% em 18 horas de reacionais em sistema de agitação mecânica.

Paludo et al. (2015) para o mesmo sistema utilizando lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) (razão molar ácido: álcool 1:1 e 30°C), obtiveram 61% e 90% de conversão do butanoato de etila, em sistema mecânico e ultrassônica, respectivamente em 6 horas de reacionais.

A partir dos resultados obtidos optou para os ensaios de otimização da síntese do butanoato de etila fixar os tempos reacionais em 180 minutos para ambos os sistemas de agitação: mecânica e ultrassônica.

3.1.3 Reações de batelada

3.1.3.1 Sistema de agitação mecânica

Na tentativa de otimizar o processo de síntese do éster butanoato de etila em sistema de agitação mecânica foi realizado um DCCR 2³ completo, variando a razão molar ácido

butírico:álcool etílico, temperatura (°C) e massa de catalisador (livre e imobilizado) (g), conforme Tabela 3.3.2.

Tabela 3.3.2 - Matriz do DCCR completo 2^3 empregando o catalisador livre e imobilizado, em função das variáveis estudadas razão molar (ácido:álcool), temperatura (°C) e potência ultrassônica (%) para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão molar (ácido:álcool)	Massa de catalisador (g)	Conversão do ácido butanoico	
				Livre	Imobilizado
1	-1 (35)	-1(1:3)	-1 (0,1)	28,5 ± 1,2	16,1 ± 2,8
2	-1 (35)	-1(1:3)	1 (0,5)	46,3 ± 2,6	24,8 ± 1,3
3	-1 (35)	1 (1:7)	-1 (0,1)	46,9 ± 1,6	21,6 ± 0,6
4	-1 (35)	1 (1:7)	1 (0,5)	67,1 ± 1,4	46,8 ± 2,9
5	1 (65)	-1(1:3)	-1 (0,1)	69,3 ± 3,9	67,6 ± 0,3
6	1 (65)	-1(1:3)	1 (0,5)	65,2 ± 1,6	90,2 ± 3,0
7	1 (65)	1 (1:7)	-1 (0,1)	48,7 ± 3,4	61,4 ± 2,7
8	1 (65)	1 (1:7)	1 (0,5)	75,9 ± 1,5	96,2 ± 1,6
9	-1,68 (24,8)	0 (1:5)	0 (0,3)	58,8 ± 2,5	58,5 ± 2,0
10	1,68 (75,2)	0 (1:5)	0 (0,3)	66,5 ± 1,2	89,2 ± 0,9
11	0 (50)	-1,68 (1:1,64)	0 (0,3)	30,9 ± 4,5	28,9 ± 1,7
12	0 (50)	1,68 (1:8,36)	0 (0,3)	68,1 ± 1,2	45,6 ± 3,5
13	0 (50)	0 (1:5)	-1,68 (0,036)	67,9 ± 1,9	26,5 ± 1,2
14	0 (50)	0 (1:5)	1,68 (0,564)	75,3 ± 0,8	91,9 ± 1,4
15	0 (50)	0 (1:5)	0 (0,3)	48,3 ± 0,9	92,2 ± 0,8
16	0 (50)	0 (1:5)	0 (0,3)	47,4 ± 1,3	95,6 ± 1,2
17	0 (50)	0 (1:5)	0 (0,3)	45,0 ± 1,8	94,9 ± 0,7

* Parâmetros fixos: massa de substrato de 5 g, tempo de reação de 180 minutos e 160 rpm de agitação mecânica.

Podemos observar que o aumento da temperatura de maneira geral apresenta uma influência positiva em reações de síntese de ésteres (ensaio 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8, 9 e 10), empregando o catalisador livre e imobilizado.

Pois este pode afetar diretamente os vários equilíbrios envolvidos em reações de esterificação notadamente os equilíbrios de ligação enzima-substratos e enzima-éster, envolvidos na reação. Além disso, exerce um efeito diretamente na solubilidade e a dissociação da reação, além de reduzir a viscosidade e a densidade, evitando a prescrição na

transferência de massa (LI et al, 2011; RAHMAN et al., 2011; GUILLÉN et al., 2012; MARTINS et al., 2014; WAGHMARE et al., 2015), aumentando as distâncias intermoleculares, diminuindo assim as forças atrativas entre as moléculas através das propriedades de natureza endotérmica (ΔH positivo) reversíveis e de equilíbrio químico, ou seja, com uma maior absorção de calor ocorrerá um deslocamento maior para os produtos, aumentando o rendimento/ conversão reacional (OZYILMAZ e GEZER, 2010; ATKINS, 2011).

Outra variável de extrema importância é o efeito das proporções relativas de razão molar dos substratos, sendo um ponto crítico em uma reação de esterificação, pois através dele se define as propriedades físicas e químicas de um sistema, afetando diretamente a solubilidade, polaridade e pH do meio, refletindo na capacidade do ácido de distorcer a camada proteica da enzima, desativando-a (MAT RADZI et al., 2005; GUMEL et al., 2011).

Uma vez que a reação de esterificação é reversível, o aumento da concentração de um dos reagentes pode deslocar o equilíbrio no sentido da formação de produtos, resultando em altas conversões ou por efeitos de inibição tanto dos substratos como dos produtos da reação podem diminuir drasticamente o rendimento das mesmas (CENI et al., 2010).

Em nosso estudo, o excesso de álcool afetou positivamente o processo de conversão, (ensaio 1 e 3, 2 e 4, 6 e 8, 11 e 12) tanto empregando o catalisador livre como imobilizado, pois este, evitou que o excesso de ácido, alterasse o pH do microambiente em torno da enzima, ocasionando uma possível diminuição na atividade/conversão catalítica da enzima.

Além disso a massa de catalisador enzimático empregado na reação é outra variável de extrema importância, pois afeta principalmente para a rentabilidade do processo (ensaio 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, 13 e 14) para o catalisador imobilizado e (ensaio 1 e 2, 3 e 4, 7 e 8, 13 e 14) para o catalisador livre, proporcionaram aumentos na conversão do ácido butanoico em éster.

As massas do catalisador empregado, que variaram de 0,036 a 0,564 g, e pode-se observar que o aumento da massa (ensaio 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 13 e 14) resultou em um aumento significativo na produção ou síntese de ésteres.

De acordo com Colombo (2011) o aumento da massa de catalisador (enzima) é necessário a fim de proporcionar uma elevada taxa de conversão em reações de esterificação, pois aumenta o número de sítios ativo no meio reacional.

Em geral todos os ensaios empregando o catalisador imobilizado apresentaram maiores conversões do ácido butanoico em relação ao catalisador livre, sendo esta a principal

vantagem através de um método eficiente de imobilização, como apresentado em nosso estudo, além da possibilidade de reutilização e redução da inativação por distorção da sua estrutura nativa, pela influência da temperatura, pH e de solventes.

Para Nyari et al. (2016) esse desempenho envolve fatores como: toda enzima adicionada no processo de imobilização fica aderida ao suporte, não ocorrendo lixiviação provocada pelo meio reacional e a interação do material de suporte com o centro ativo da enzima, levando a abertura da tampa hidrofóbica e deixando o local exposto, proporcionando um aumento na atividade/conversão da reação de esterificação.

Catalisadores livres, ou seja, forma solúvel, a principal desvantagem é a sua separação para posterior aplicação, assim como a contaminação do produto desejado, pois estas são compostos solúveis em água.

Além disso, através dos resultados o efeito positivo das variáveis apresentados, (maior temperatura, razão molar ácido:álcool e massa de catalisador) para a enzima livre proporcionaram na maioria dos ensaios, aumentos nas taxas de conversão do ácido butanoico em éster, ou seja, conversão (> 60%) nos (ensaios 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 e 14). Destacando que a maximização da conversão foi apresentada observada (razão molar ácido:álcool 1:7, massa de catalisador de 0,5 g e temperatura de 65 °C - ensaio 8) com 75,9% de conversão para o butanoato de etila em 180 minutos reacionais.

De maneira geral, comportamento similar foi observado empregando o catalisador imobilizado, onde as maiores conversões observadas (> 90%) nos (ensaios 6 e 8, 15, 16 e 17) observados. A maximização da conversão foi exibida no ensaio 8 (razão molar ácido butirico:álcool etílico de 1:7, temperatura de 65°C e massa de catalisador de 0,5 g) com 96,2% de conversão em 180 minutos reacionais.

Os resultados apresentados neste estudo mostram-se promissores (96%) em relação aos valores de conversão (entre 50 e 99%) reportados pela literatura aplicando diferentes lipases, nas formas livre ou imobilizada e em diferentes suportes, para a obtenção de ésteres (Tabela 3.3.1).

Piazza et al. (2016) na esterificação do ácido butanoico e do álcool butílico, na síntese de butanoato de butila empregando a lipase de Lipozyme 435 (*Candida antarctica*) (12% de catalisador, 30°C e razão molar (ácido:álcool de 1:8) conseguiram aproximadamente 95% de conversão em 4 horas de reação em sistema de mecânica de agitação (150 rpm).

Todero et al. (2015) na esterificação do ácido butanoico e do álcool isoamilico, na síntese de butanoato de isoamila empregando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL)

imobilizada em partículas de poli-metacrilato mesoporoso (PMA) (30% de catalisador e 40% de peneira molecular) obtiveram uma conversão de 96,1 e 73,6% após 50 e 90 minutos de reação, respectivamente em sistema de agitação mecânica (200 rpm).

Matte et al. (2016) na esterificação do ácido butanoico e do álcool butílico, na síntese de butanoato de butila utilizando a lipase de *Thermomyces* imobilizada em Immobead 150 (ImmTLL) (40% de catalisador, 40°C, razão molar (ácido:álcool de 1:3) e 2,5% de água) em meio de solvente orgânico (hexano), obtiveram uma conversão de 84% após 4 horas de reação para o mesmo sistema de agitação.

Salleh et al. (2016) na esterificação do ácido butanoico e álcool butílico, na síntese de butanoato de butila empregando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em casca do ovo (massa de catalisador de 3,0% e 38°C), apresentaram conversão de 92% em 24 horas reacionais.

Jin et al. (2015) utilizando a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) na síntese de butanoato de geranila com ácido butanoico e geraniol (20,9 g de catalisador, razão molar de ácido:geraniol de 1,21:1), obtiveram conversão de 98,5% após 9 horas de reação. Salleh et al. (2016) empregando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em casca do ovo para produzir o éster de butanoato de butila (massa de catalisador de 3,0%, 38°C em 24 horas), apresentaram conversão de 92%.

Friedrich et al. (2013) em duas preparações imobilizadas de B de *Candida antarctica* (CALB) Novozym 435 imobilizada em esferas de estireno-divinilbenzeno na síntese de butanoato de etila (37°C; razão molar ácido:álcool de 1:4, massa de catalisador de 7,5% e 0,25% de água) com rendimentos mais elevados de conversão de cerca de 85% em 1,5 horas de reação.

Oliveira (2012) empregando a lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) imobilizada em suporte quitosana com glutaraldeído na presença de surfactantes e Lipozyme® comercial, para a produção de butirato de metila e butirato de etila (25°C e agitação mecânica de 150 rpm) utilizando n-heptano como solvente, o rendimento máximo de conversões para o butirato de metila foi de 89% (razão molar ácido:álcool 1:1,5, massa de catalisador de 100 mg) para a lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) e de 86% para a lipase comercial Lipozyme®. Para o butirato de etila a lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) obteve conversão de 92% (razão molar ácido:álcool 1:1, massa de catalisador de 200 mg e 20% de peneiras moleculares 4^a) e de 89% para a lipase Lipozyme® em 6 horas reacionais.

Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O modelo foi validado pela análise de variância ($F_{\text{cal}}(1,035) > F_{\text{tab}}(3,63)$) com coeficiente de correlação (R^2) = 0,90 (Equação 3.3.3) (Apêndices 3.3.1 e 3.3.2) a qual foi adicionado na falta de ajuste para a razão molar ácido:álcool (quadrático) e interação da variáveis entre a razão molar ácido:álcool e da massa de catalisador para o catalisador livre em sistema de agitação mecânica.

$$\text{Conversão (\%)} = 47,09 + 6,10T + 4,10T^2 + 6,72R + 5,38M + 7,37M^2 - 6,13T.R - 4,21T.M \quad (3.3.3)$$

Onde: T = temperatura (°C), R = razão molar (ácido:álcool) e M = massa de catalisador (g).

Através da Figura 3.3.3 (1 e 2) é possível observar a superfície de resposta e da curva de contorno empregando o catalisador livre referente às interações entre as variáveis: massa de catalisador, temperatura e razão molar (ácido:álcool) em sistema de agitação mecânica.

Podemos observar que as maiores conversões empregando o catalisador livre foram alcançados para a variável razão molar de ácido butirico:álcool etílico superior a 1:7, temperatura superior a 68°C e massa de catalisador superior a 0,55g.

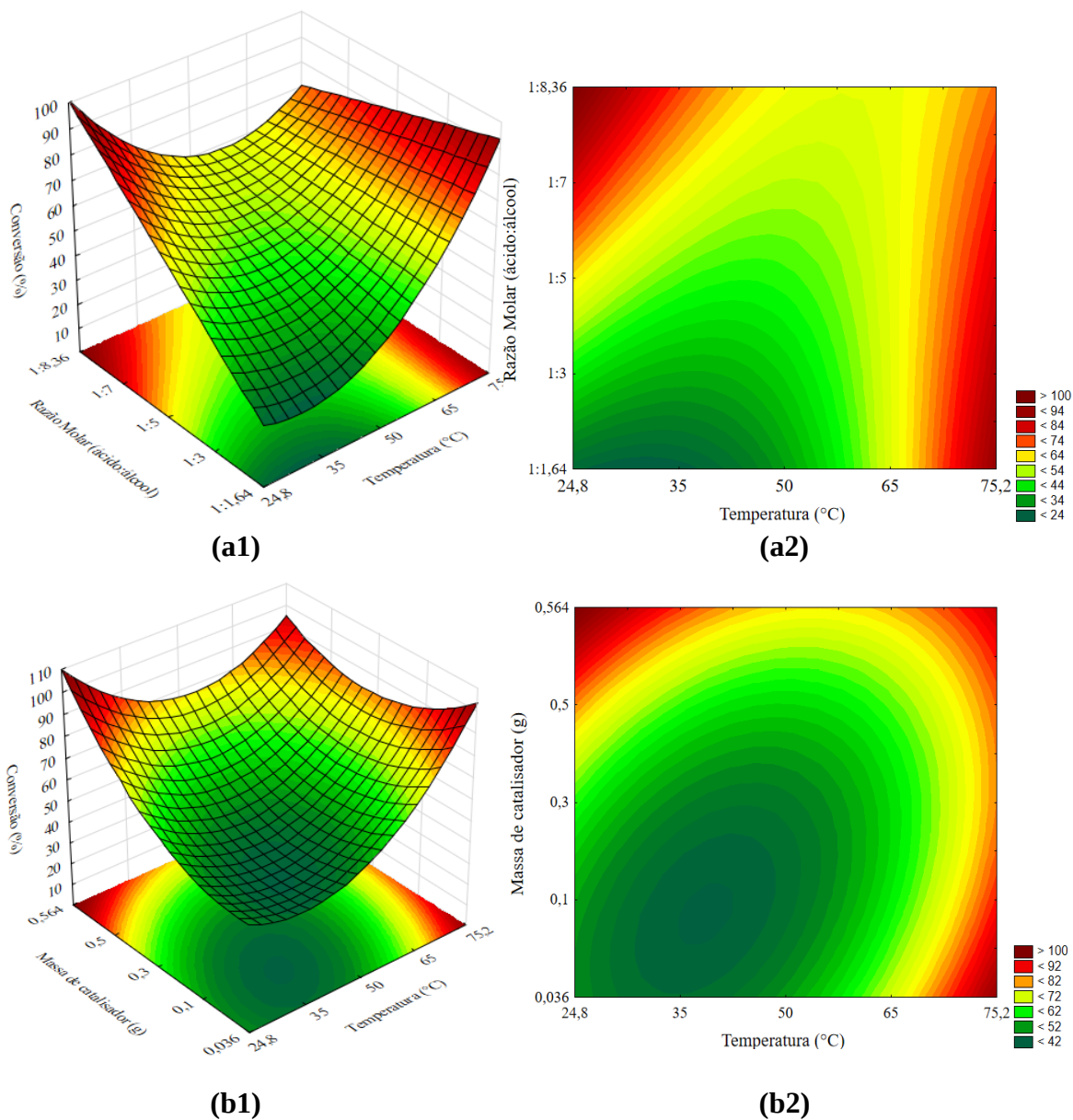
Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O modelo foi validado pela análise de variância ($F_{\text{cal}}(9,18) > F_{\text{tab}}(3,63)$) com um coeficiente de correlação (R^2) = 0,96 (Equação 3.3.4) (Apêndices 3.3.3 e 3.3.4) para o catalisador imobilizado em sistema de agitação ultrassônica.

$$\text{Conversão (\%)} = 94,32 + 18,88T - 7,51T^2 + 4,05R - 20,48R^2 + 14,74M - 12,70M^2 - 3,46T.R + 2,93T.M + 2,58R.M \quad (3.3.4)$$

Onde: T = temperatura (°C), R = razão molar (ácido butirico:álcool etílico) e M = massa de catalisador.

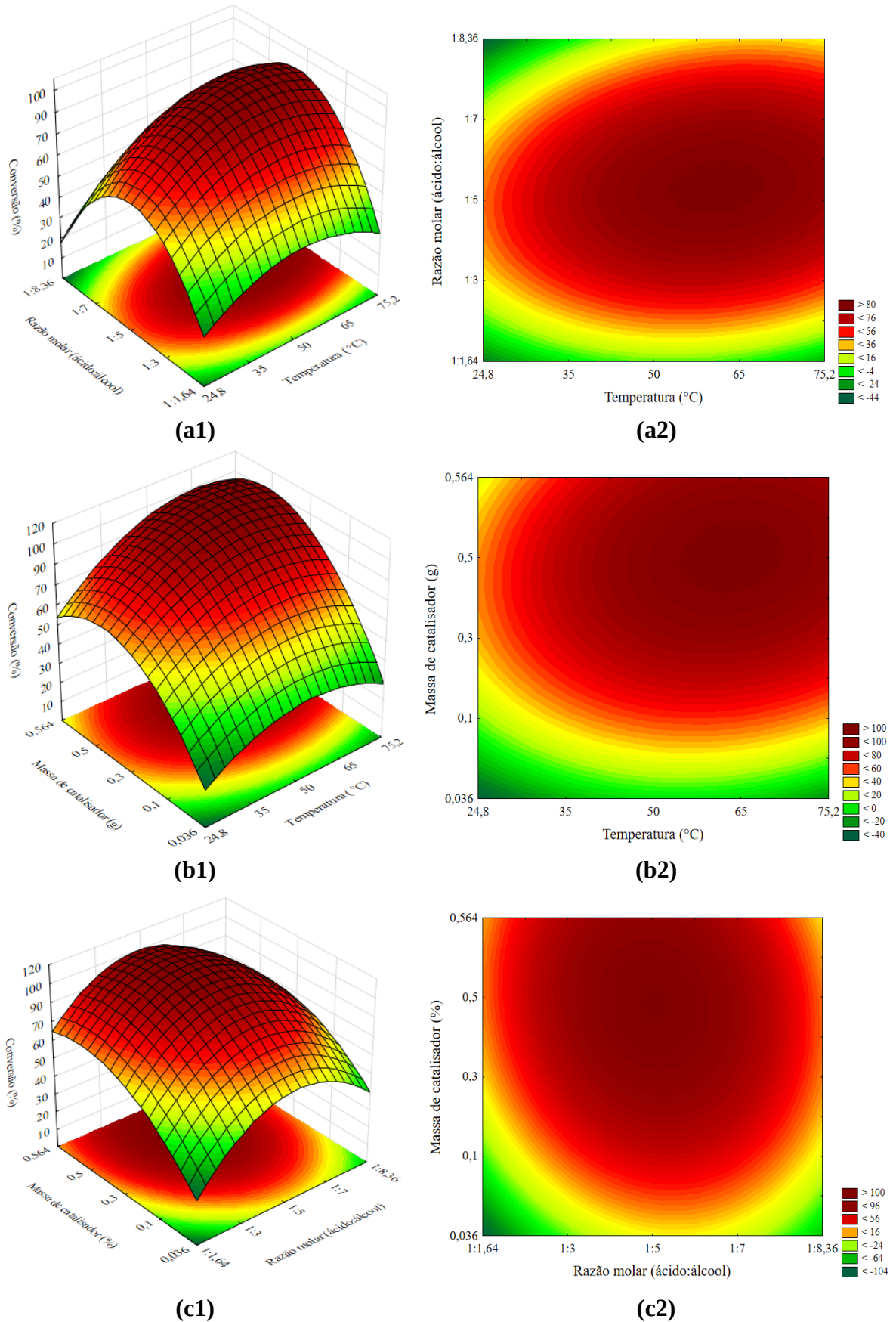
Através da Figura 3.3.4 (1 e 2) é possível observar a superfície de resposta e da curva de contorno empregando o catalisador imobilizado referente às interações entre as variáveis: massa de catalisador, temperatura e razão molar (ácido:álcool) em sistema de agitação ultrassônica.

Figura 3.3.3 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador livre para a síntese de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.



Podemos observar que as maiores conversões empregando o catalisador imobilizado as maiores conversões foram alcançadas na região próxima as condições do ponto ao ponto central (temperatura de 50°C, para a variável razão molar de 1:5 ácido butanoico:álcool etílico entre 1:45 a 1:60, temperatura de 53 a 69°C e massa de catalisador entre a 0,45 a 0,55g) para a síntese de ésteres de butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.

Figura 3.3.4 Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado para a síntese do butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.



Os resultados aqui apresentados, são considerados muito promissores e de importante contribuição para o desenvolvimento deste processo em escala piloto, em comparação com aqueles apresentados na literatura aberta, por se tratar de uma lipase (CALB) com possibilidade de imobilização e utilização em produtos de interesse em um sistema isento de solvente orgânico.

Tais informações são importantes com grande potencial para aplicação em processos industriais, contribuindo de forma ecológica, reduzindo assim os impactos ambientais e respeitando os princípios da química verde.

3.3.3.2 Sistema de agitação ultrassônica

A matriz do DCCR 2³ completo para a síntese de butanoato de etila em sistema de agitação ultrassônica é apresentado na Tabela 3.3.3, em função das variáveis estudadas: massa de catalisador imobilizado (g), temperatura (°C) e potência ultrassônica (%), bem como a resposta de conversão do ácido butanoico (%).

De acordo com os resultados, observa-se a máxima conversão do ácido butanoico (95,6%) nas condições do ponto central, ensaio 15, 16 e 17 (razão molar de 1:7 ácido butanoico:álcool etílico, massa de catalisador de 0,5 g, temperatura de 50°C e potência ultrassônica de 86%) em 180 minutos de reação.

Destaca-se a influência da irradiação ultrassônica observada nos ensaios 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 13 e 14, onde o aumento da energia ultrassônica na reação foi diretamente proporcional ao aumento da conversão. Esta observação pode estar relacionada ao aumento dos efeitos físicos proporcionado pelo ultrassom, levando ao aumento do fenômeno de cavitação e número de bolhas formadas e da quantidade de energia localizada no meio (BANSODE e RATHOD, 2014; SUBHEDAR et al., 2015; MULINARI et al., 2017; SANCHETI e GOGATE, 2017).

Essas bolhas de cavitação dependem da amplitude da onda acústica que conduz o movimento da bolha e das propriedades físicas do substrato (ácido + álcool) do meio reacional, como a viscosidade, densidade e da tensão superficial. Proporcionando um acréscimo significativo na velocidade de reação e taxa de libertação do produto na reação, influenciando diretamente na conversão (COWIE et al., 2014; ZHAO et al., 2016; MULINARI et al., 2017; SANCHETI e GOGATE, 2017).

As variáveis temperatura e razão molar (ácido:álcool), novamente apresentaram efeito positivo, ou seja, ao deslocar os seus níveis para +1, ocorreu o aumento da conversão. Onde, o aumento da temperatura (ensaios 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 8 e 9, 10 e 11) provavelmente

proporcionou a diminuição da viscosidade, levando ao aumento da difusão dos substratos influenciando diretamente na formação dos complexos enzima-substratos e, conseqüentemente no aumento de conversão (SIM et al., 2013; KHAN et al., 2015; WAGHMARE et al., 2015).

Tabela 3.3.3 - Matriz do DCCR 2³ completo empregando o catalisador imobilizado, em função das variáveis estudadas temperatura (°C), razão molar ácido:álcool e potência ultrassônica (%) para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão molar (ácido:álcool)	Potência ultrassônica (%)	Conversão do ácido butanoico (%)
1	-1 (35)	-1(1:3)	-1 (40)	18,4 ± 0,8
2	-1 (35)	-1(1:3)	1 (80)	62,6 ± 2,9
3	-1 (35)	1 (1:7)	-1 (40)	19,0 ± 0,6
4	-1 (35)	1 (1:7)	1 (80)	70,2 ± 1,3
5	1 (65)	-1(1:3)	-1 (40)	67,5 ± 0,3
6	1 (65)	-1(1:3)	1 (80)	83,8 ± 3,0
7	1 (65)	1 (1:7)	-1 (40)	48,1 ± 2,7
8	1 (65)	1 (1:7)	1 (80)	91,4 ± 1,6
9	- 1,68 (24,8)	0 (1:5)	0 (60)	60,5 ± 2,0
10	1,68 (75,2)	0 (1:5)	0 (60)	91,3 ± 0,9
11	0 (50)	-1,68 (1:1,64)	0 (60)	30,0 ± 1,7
12	0 (50)	1,68 (1:8,36)	0 (60)	59,2 ± 2,5
13	0 (50)	0 (1:5)	- 1,68 (26,4)	29,3 ± 1,2
14	0 (50)	0 (1:5)	1,68 (93,6)	93,9 ± 1,4
15	0 (50)	0 (1:5)	0 (60)	94,3 ± 0,8
16	0 (50)	0 (1:5)	0 (60)	95,6 ± 1,2
17	0 (50)	0 (1:5)	0 (60)	94,9 ± 0,7

*Parâmetros fixos: massa de catalisador de 0,5 g, massa de substrato de 5 g, tempo de reação de 180 minutos em agitação ultrassônica.

Já o acréscimo do álcool etílico na reação (ensaio 1 e 3, 2 e 4, 6 e 8, 11 e 12), pode ter contribuído para a intensificação dos efeitos físicos e químicos da reação, alterando a circulação de líquidos (fluxo acústico) do substrato, proporcionando uma emulsão mais fina (menos viscoso) e com uma área de superfície mais aprimorada, ou seja, maior fluxo em torno

da superfície da enzima, aumentando assim a produção do éster (SUBHEDAR e GOGATE, 2016; WAGHMARE e RATHOD, 2016).

Essa influência positiva do ultrassom tem sido relatada por diversos autores (Tabela 3.3.1). Ng e Yang (2016) na síntese de butanoato de butila através da esterificação de ácido butanoico e álcool butílico, em meio aquoso, empregando lipase de *Candida antarctica* B imobilizada *in situ* em esferas de alginato de cálcio e hexadecano, utilizando 0,5 g de catalisador em sistema de agitação ultrassônica, obtiveram 96% de conversão.

Paludo et al. (2015) esterificação de ácido butanoico e álcool butílico na síntese de butanoato de etila catalisada pela lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) (massa de catalisador de 35%, razão molar ácido:álcool 1:1 e 30°C), obtiveram 61% de conversão em 6 horas de reação em sistema de agitação ultrassônica.

Todeschini et al. (2017) para o mesmo sistema aplicando a lipase de *Rhizomucor miehei* (razão molar de ácido:álcool 1:5,47, teor de água de 10%, massa de óleo e 40°C) obtiveram conversão de 80% após 70 horas de reação.

Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O modelo foi validado pela análise de variância ($F_{\text{cal}}(20,92) > F_{\text{tab}}(3,63)$) com um coeficiente de correlação (R^2) = 0,98 (Equação 3.3.5) (Apêndices 3.3.5 e 3.3.6) para o catalisador imobilizado em sistema de agitação mecânica.

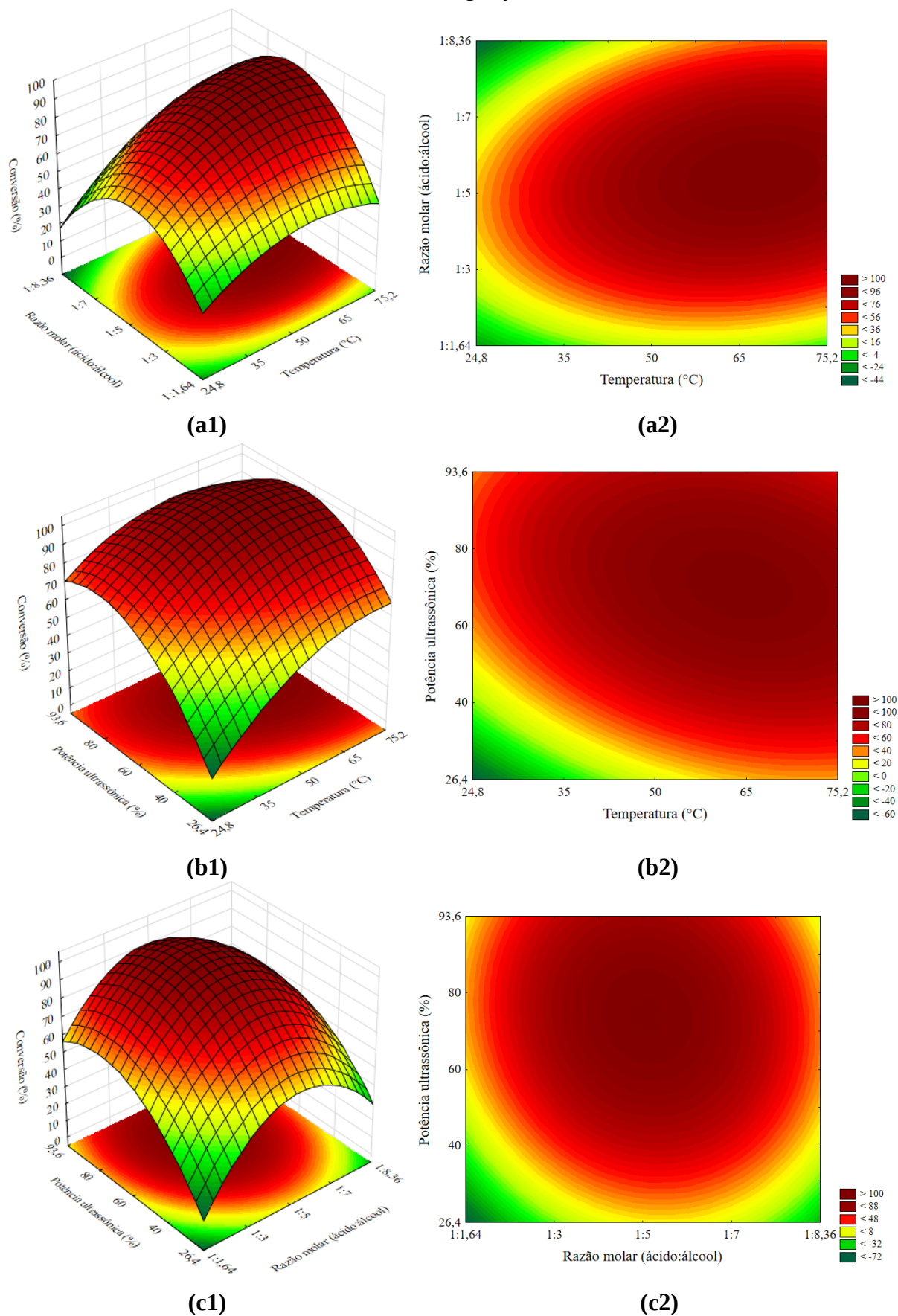
$$\text{Conversão (\%)} = 94,99 + 12,63T - 6,94T^2 + 3,33R - 18,03R^2 + 19,31P - 12,01P^2 + 2,50T.R - 4,47T.P - 2,50R.P \quad (3.3.5)$$

Onde: T = temperatura (°C), R = razão molar (ácido:álcool) e P = potência ultrassônica (%).

Através da Figura 3.3.5 (1 e 2) é possível observar a superfície de resposta e da curva de contorno empregando o catalisador imobilizado referente às interações entre as variáveis: massa de catalisador, temperatura e razão molar (ácido:álcool) em sistema de agitação ultrassônica.

Podemos observar que as maiores conversões empregando o catalisador imobilizado as maiores conversões foram alcançadas próximas a região do ponto central, ensaios 15, 16 e 17 (razão molar de 1:4 a 1:6 ácido butirico:álcool etílico, temperatura de 55 a 75°C e potência ultrassônica de 60 a 80%).

Figura 3.3.5 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) para a síntese do butanoato de etila em sistema de agitação ultrassônica.



Através dos resultados obtidos nesse estudo, o processo de agitação ultrassônica mostra-se como um processo alternativo, simples, viável e eficiente para a produção de ésteres, uma vez que permitiu o uso de condições brandas de temperatura, sem utilização de excesso de substrato e solvente orgânico. Desta forma, o método apresentado neste trabalho, pode contribuir de maneira efetiva na produção de ésteres em geral.

3.1.3.4 Estabilidade operacional

Os resultados da avaliação da estabilidade operacional do sistema de agitação mecânica (razão molar de 1:5 ácido butírico:álcool etílico, temperatura de 64,1°C e 180 minutos) e de agitação ultrassônica (razão molar de 1:7 ácido butírico:álcool etílico, temperatura de 50°C e potência ultrassônica de 86% em 180 minutos) são apresentados na Figura 3.3.6.

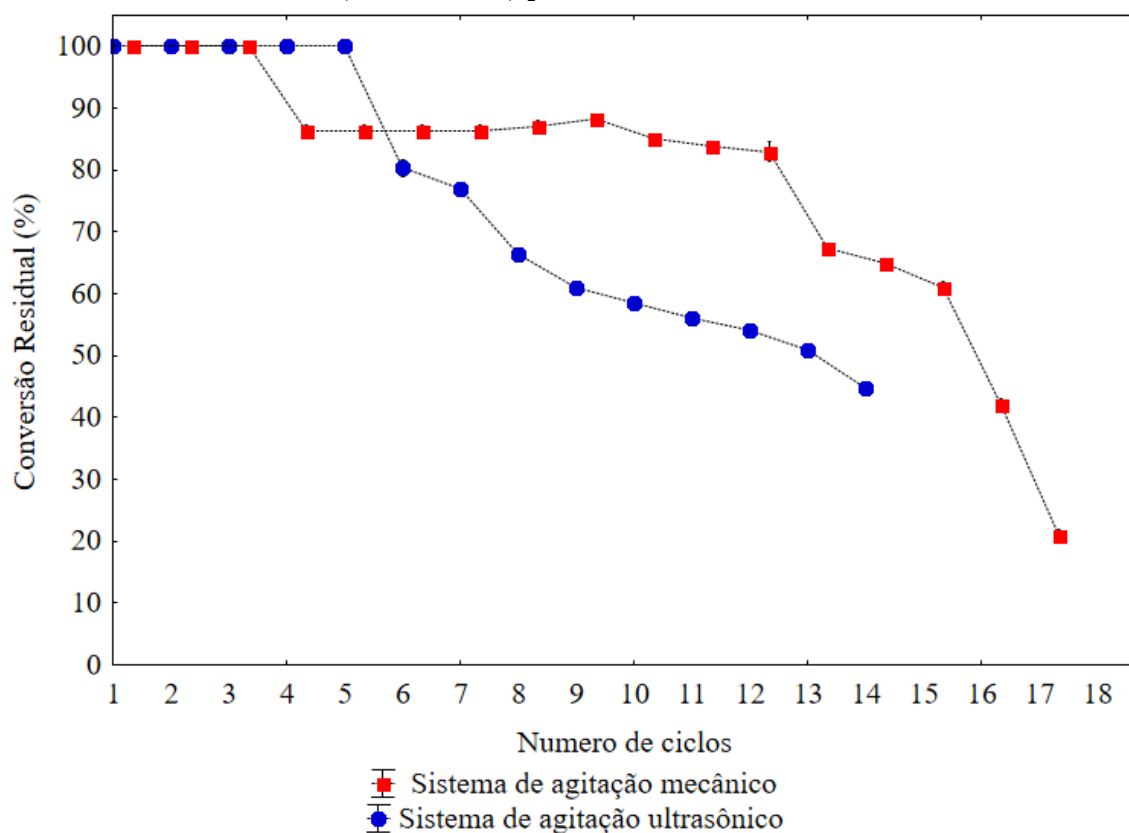
Onde podemos observar com 16 ciclos contínuos de reutilização, com conversão de 41% (conversão final de 37%) em relação a inicial em sistema de agitação mecânica e de 14 ciclos, com 46% de conversão (conversão final de 49%) em relação a inicial para o sistema de agitação ultrassônica.

Além disso, é possível observar ainda, que no decorrer dos 4 primeiros ciclos a conversão se manteve estável e após ocorreu perda contínua e gradativa na conversão, sendo que o sistema ultrassônico apresenta maior queda, este fato pode estar vinculado a diferentes causas, como perda de massa entre os ciclos e até mesmo a desnaturação da enzima (CARVALHO et al., 2015; TODESCHINI et al., 2017).

Esta perda de eficiência apresentada pelo sistema ultrassônica, em relação à mecânica, pode estar vinculada a exposição do biocatalisador à irradiação ultrassônica, a qual além de intensificar o rompimento físico do suporte, facilitando a lixiviação da enzima, pode estar alterando a conformação da enzima, contribuindo para a perda de atividade do imobilizado (BANSODE e RATHOD, 2014; WAGHMARE e VETAL, 2015; MORE et al. 2017).

De acordo com dados reportados na literatura este estudo de reciclo tem sido realizado por diversos autores. Todero et al. (2015) na esterificação do ácido butanoico e do álcool etílico na síntese de butanoato, utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) imobilizada em partículas de poli-metacrilato mesoporoso (PMA) (40°C, razão molar de ácido:álcool 1:3, 40% de catalisador, 2,5% de água) observaram 10 ciclos sucessivos de reutilização com 86% de atividade residual em relação a inicial em 4 horas reacionais em sistema de agitação mecânica.

Figura 3.3.6 - Estabilidade operacional em sistema de agitação mecânica (180 minutos) e ultrassônica (180 minutos) para a síntese de butanoato de etila.



*Onde: Para o sistema de batelada: agitação mecânica (razão molar de 1:5 ácido butírico:álcool etílico, temperatura de 64,1°C em 180 minutos reacionais) e agitação ultrassônica (razão molar de 1:7 ácido butírico:álcool etílico, temperatura de 50°C e potência ultrassônica de 86% em 180 minutos).

Bansode e Rathod (2014) na esterificação do ácido butanoico e do álcool isoamílico na síntese de butanoato de isoamila catalisada por lipase Novozym 435 imobilizada (60°C, razão molar de álcool:ácido 1:2, 2% de catalisador e frequência do ultrassom de 25 kHz com potência de 70 W), observaram 7 ciclos de reutilização em 3 e 10 horas de reação em sistema de agitação ultrassônica e mecânica, respectivamente.

Martins et al. (2013) na esterificação do ácido butanoico e do álcool etílico na síntese do éster de butanoato de butila, catalisada pela lipase imobilizada Lipozyme TL-IM (48°C; razão molar ácido:álcool 3:1 e massa de catalisador de 40%), na presença e ausência de n-hexano observaram 2 e 5 ciclos, respectivamente, com 85% em relação a inicial em 2 horas de reação em sistema de agitação mecânica.

Fallavena et al. (2014) para o mesmo sistema catalisada pela lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM) (razão molar de ácido:álcool de 1:1, 45°C, 14% de

catalisador) obtiveram 5 ciclos sucessivos mantendo 100% em relação a inicial em 2,5 horas de reação em sistema de agitação ultrassônica.

Bansode e Rathod (2014) na esterificação, catalisada por lipase Novozym 435 imobilizada, de butanoato de isoamila em condições reacionais de 60°C, razão molar de 1:2 ácido:álcool, 2% de massa de catalisador e frequência do ultrassom de 25 kHz com potência de 70 W, observaram 7 ciclos de reutilização em 3 e 10 horas de reação em sistema de agitação ultrassônica e mecânica, respectivamente.

Martins et al. (2013) na síntese do éster de butanoato de butila, catalisada pela lipase imobilizada Lipozyme TL-IM, na presença e ausência de n-hexano (48°C; razão molar ácido:álcool 3:1, massa de catalisador de 40% de massa em 2 horas de reação), observaram 2 e 5 ciclos, sem e com lavagem do catalisador com n-hexano, respectivamente, com 85% de sua atividade inicial.

Fallavena et al. (2014) na esterificação de butanoato de etila, catalisada pela lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM), empregando potência ultrassônica (razão molar de 1:1 ácido:álcool, 45°C, 14% de massa do catalisador e 2,5 horas de reação) obtiveram 5 ciclos sucessivos mantendo 100% da sua atividade inicial.

3.3.4 Consideração Parciais

O estudo cinético da síntese do butanoato de etila apresentou o mesmo comportamento do estudo cinético da síntese de acetato de isoamila, sugerindo a manifestação de duas reações durante o processo, uma de esterificação e outra de hidrólise.

A partir dos dados obtidos, é possível observar a viabilidade da utilização de lipase CALB em reação na síntese de éster de butanoato de etila de 75% conversão (65°C, razão molar ácido:álcool 1:7 e 0,5 g de catalisador) em 180 minutos reacionais, empregando o catalisador livre.

Em termos de otimização do processo de síntese do butanoato de etila empregando o catalisador imobilizado, para ambos os sistemas (agitação mecânica e ultrassônica), as variáveis temperatura e a razão molar apresentaram efeitos positivos, apresentando para as condições otimizadas de cada sistema conversões superiores a 94% (razão molar ácido:álcool de 1:7, 65°C e massa de catalisador de 0,5 g) para o sistema de agitação mecânica e (razão molar ácido:álcool de 1:5, 50°C e potência ultrassônica de 60%) para o sistema de agitação ultrassônica em 180 minutos reacionais.

Assim como a variável massa do imobilizado e potência ultrassônica influenciaram de maneira geral positivamente, tanto para o sistema de agitação mecânica e ultrassônica, respectivamente. Ambas as tendências estão coerentes com a literatura, uma vez que as reações de esterificação são de natureza endotérmica e o aumento da razão favorece o aumento da velocidade da reação.

O sistema ultrassônica apresentou apenas 2 ciclos de reutilização (14 ciclos de reutilização com $\approx 43\%$ em relação a inicial) a menos do que o sistema mecânica (16 ciclos de reutilização com $\approx 40\%$ em relação a inicial), porém é possível observar uma queda na conversão mais acentuada, o que está coerente com suas características de poder intensificar o rompimento físico do suporte, facilitando a lixiviação da enzima, pode alterar a conformação da enzima, contribuindo para a perda de atividade do imobilizado.

CAPÍTULO IV

4. ATIVAÇÃO ENZIMÁTICA COM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

A ativação de enzimas à alta pressão empregando fluidos pressurizados ou supercríticos, apesar de apresentar boas perspectivas, ainda não tem sido extensivamente estudada. A concepção de um fluido supercrítico e subcrítico é toda substância que pode ser encontrada em três estados diferentes, dependendo de sua temperatura e pressão: sólido, líquido ou gasoso.

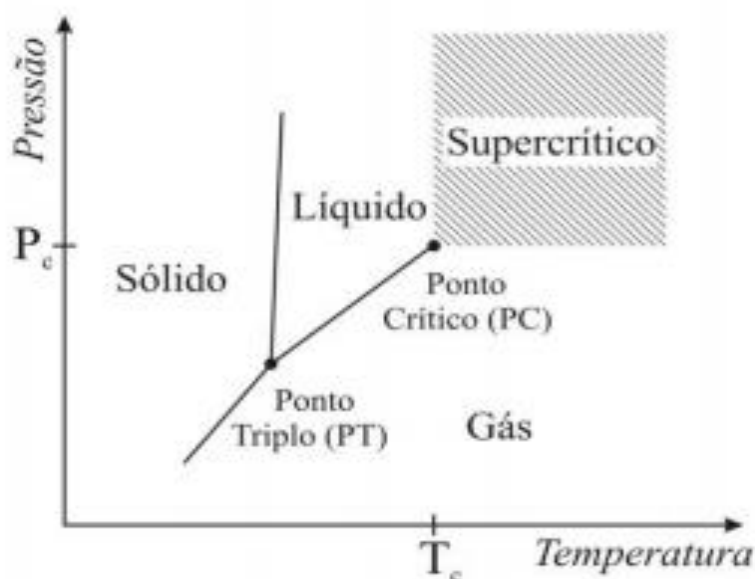
Enquanto o ponto crítico é caracterizado pelo término da coexistência de suas fases no estado líquido e vapor, sendo definido por uma temperatura crítica (T_c) (temperatura acima da qual ele não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se eleve a pressão) e uma pressão crítica (P_c) (pressão acima da qual o gás não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se diminua a temperatura). Quando a pressão e temperatura de uma substância estão acima do seu ponto crítico, atinge-se o estado supercrítico (MCHUGH e KRUKONIS, 1986).

O estado supercrítico é qualquer substância que sofre efusão através de sólidos como um gás e dissolvendo como líquido, com densidade próxima a dos líquidos, o que fortalece as suas propriedades de solvente, viscosidade, difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos aos dos gases, que torna as propriedades de transporte bastante favoráveis ao processo (CLIFFORD e BOSTOCK, 2007; KNEZ et al., 2014).

O diagrama de fases mostrado na Figura 4.1 permite uma melhor visualização do ponto crítico e da região supercrítica de uma substância.

Em condições supercríticas o gás é relativamente denso comparado com um gás convencional e as forças de solubilização são mais intensas, ocorrendo à formação de uma névoa densa, alterando o estado de agregação e alterando as propriedades (difusividade, constante dielétrica, viscosidade, densidade e poder de solvatação), modificando o comportamento químico de gás ou líquido pela elevação da pressão ou da temperatura (MCHUGH e KRUKONIS, 1986; LANCAS et al., 2002). Existe uma série de substâncias que podem ser usadas como fluidos supercríticos em reações.

A Tabela 4.1 apresenta as propriedades críticas de vários solventes que são comumente utilizados em reações.

Figura 4.1 - Diagrama genérico de estados de uma substância pura.

Fonte: RIZVI (1986) adaptado.

Tabela 4.1 - Propriedades críticas dos solventes.

Solvente	Peso molecular (g/mol)	Temperatura crítica (K)	Pressão crítica (Mpa)	Densidade (kg/L)
CO ₂	44,01	304,1	7,38	469
Água	18,02	647,3	22,12	348
Metano	16,04	10,4	4,6	162
Etano	30,07	305,3	4,87	203
Propano	44,09	369,8	4,25	217
Metanol	32,04	512,6	8,09	272
Etanol	46,07	513,9	6,14	276

Fonte: REID et al. (1987) adaptado.

Esses fluidos variam significativamente pela alteração da pressão ou temperatura, o que não ocorre no caso de solventes líquidos, as quais apresentam elevados valores de difusividade, solubilidade e baixa viscosidade, o que facilita uma maior interação com o suporte ou mesmo com radicais da própria enzima, além de afetar diretamente a atividade enzimática (partição do substrato, produto e água entre a enzima e o solvente) e as interações diretas (fluido e a enzima) como a transferência de massa entre a enzima/solvente ou radicais da própria enzima (sítio ativo), as quais podem inibir ou inativar a enzima por quebra das ligações hidrogênio, iônica e hidrofobicidade (mais hidrofóbicos são menos nocivos às enzimas), além de boas propriedades de solvatação, ocasionando num aumento maior na

atividade, estabilidade, rendimento ou conversão do catalisador (FRANKEN et al., 2007; CORREA, 2016; GAIO, 2016).

Fazendo-se uma análise geral na literatura, observam-se que, poucos dados reportam o comportamento da atividade, estabilidade e potencial de aplicação industrial das enzimas principalmente as lipolíticas, especialmente a lipase CALB ativada em fluidos supercríticos. Na prática, um fluido supercrítico é apenas uma das possibilidades situadas entre os dois extremos na ativação ou tratamento de enzimas, pois estes podem apresentar comportamentos distintos dependendo das condições experimentais avaliadas.

Sendo assim, é necessário conhecer o catalisador a ser utilizado, o solvente, coeficiente de difusão no soluto, a viscosidade, densidade, seletividade e solubilidade do soluto e do solvente. Alguns autores têm proposto o mecanismo detalhado do comportamento das enzimas em fluidos pressurizados, mas as conclusões têm sido contraditórias (KUHN et al., 2010).

Na Tabela 4.2 apresenta alguns exemplos de lipases imobilizadas ativadas em fluidos supercríticos.

Segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP), através da Portaria 297/2003-2016, classifica o GLP como o conjunto de hidrocarbonetos com três ou quatro átomos de carbono (propano, propeno, n-butano e buteno) (40 – 60% (v/v), podendo apresentar pequenas frações de outros hidrocarbonetos (11% (v/v) de pentano e 0,5 – 2,0% (v/v) entre outros (ANP, 2003-2016).

Qualquer variação que ocorrer nessas proporções pode interferir nas propriedades finais, pois estes exibem parâmetros críticos de ($T_c = 65^\circ\text{C}$, $P_c = 25\text{ bar}$), podendo alcançar densidade de 9,27 mol/ nesse ponto, ou seja, abaixo dessa faixa chamamos de subcrítico ($>25\text{ bar}$ – líquido) e acima ($< 25\text{ bar}$ – gás) de supercrítico, enquanto o CO_2 só alcança tal densidade em pressão de 124 bar na mesma temperatura (OLIVEIRA et al, 2006c; OLIVEIRA et al., 2009).

Tabela 4.2 - Exemplos de enzimas ativadas em fluidos supercríticos.

GLP					
Enzima	P (bar)	TR (kg/m³.min)	T (min)	ARR (%)	Autor
<i>Yarrowia lipolytica</i> (YLL)	30	2	360	-	Oliveira et al. (2006b)
<i>β-galactosidase</i>	30	50	60	103,2	Braga (2012)
inulinase de <i>K. marxianus</i> / NRRL Y- 757	270	20	360	200,7	Kuhn et al. (2011)
Lipozyme IM	30	2	1	-	Oliveira et al. (2006a)
<i>Amano OS (Burkholderia cepacia)</i>	200	50	30	347	Franken et al. (2010)
	30	2	-	322	
Novozym 435	30	2	1	-	Oliveira et al. (2006a)
<i>Pectina liase (PMGL) Pectinex ULTRA</i>	30	50	1	119,41	
	30	20	60	110,23	
<i>Pectinametilésterase (PME) Pectinex MASH/</i> <i>Alginato-Gelatina</i>	270	100	60	109,53	Gaio (2016)
<i>pectina liase (PMGL) Pectinex MASH</i>	702	20	60	146,32	
<i>pectinametilésterase (PME) Pectinex Ultra SP-L</i>	190	100	60	156,25	
<i>pectina liase (PMGL) Pectinex Ultra SP-L/</i> <i>poliuretano</i>	-	-	-	55,60	
<i>pectinametilésterase (PME) do Pectinex MASH</i>	110	210	210	103,40	
<i>pectina liase (PMGL) Pectinex MASH</i>	-	-	-	85,60	
N BUTANO					
Novozym 435	12	-	360	50	Ceni et al. (2010)
Lipozyme IM	10	50	6	35	Oliveira et al. (2006a)

Novozym 435	250	50	6	75	
DIÓXIDO DE CARBONO – CO₂					
<i>Yarrowia lipolytica</i> (YLL)	30	10	360	-	Oliveira et al. (2006)
<i>β-galactosidase</i>	75	10	60	71,7	Braga (2012)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	7	5	40	125,9	Chen et al. (2013)
Lipozyme RM IM	10	-	180	100	
Palatase 20000 L	15	-	60	135	
Lipozyme CALB L	-	-	180	107,5	Melgosa et al. (2015)
Lipozyme 435	10	-	180	97	
<i>Aspergillus niger</i>	75	100	360	-	
<i>Kluyveromycesmarxianus</i> NRRL Y-7571	275	10	-	39	Silva et al. (2014b)
Lipozyme 435	10	1	60	104	
<i>Burkholderia cepacia</i> / chitosana (CHI)	8,81	3,5	46,02	-	
Lipozyme IM	117,9	105	3,5	-	Jenab et al. (2014)
Novozym 435	71,5	10	1	-	
Lipozyme IM RM e TL IM	17,5	-	120	-	
Novozyme 435	40	-	26 h	-	Knez et al. (2012)
Lipozyme 435	10	-	11 h	-	
Lipozyme 435	10	60	40	0,4	Santos et al. (2015)

* Realizados pelo autor. Parâmetros fixos: *FP* = Fluido Pressurizado (Fluido Supercrítico); *P* = Pressão; *TR* = Taxa de Despressurização ($\text{kgm}^{-3} \text{minuto}^{-1}$); *T* = Tempo (minuto/horas); e *ARR* = Atividade Residual (%).

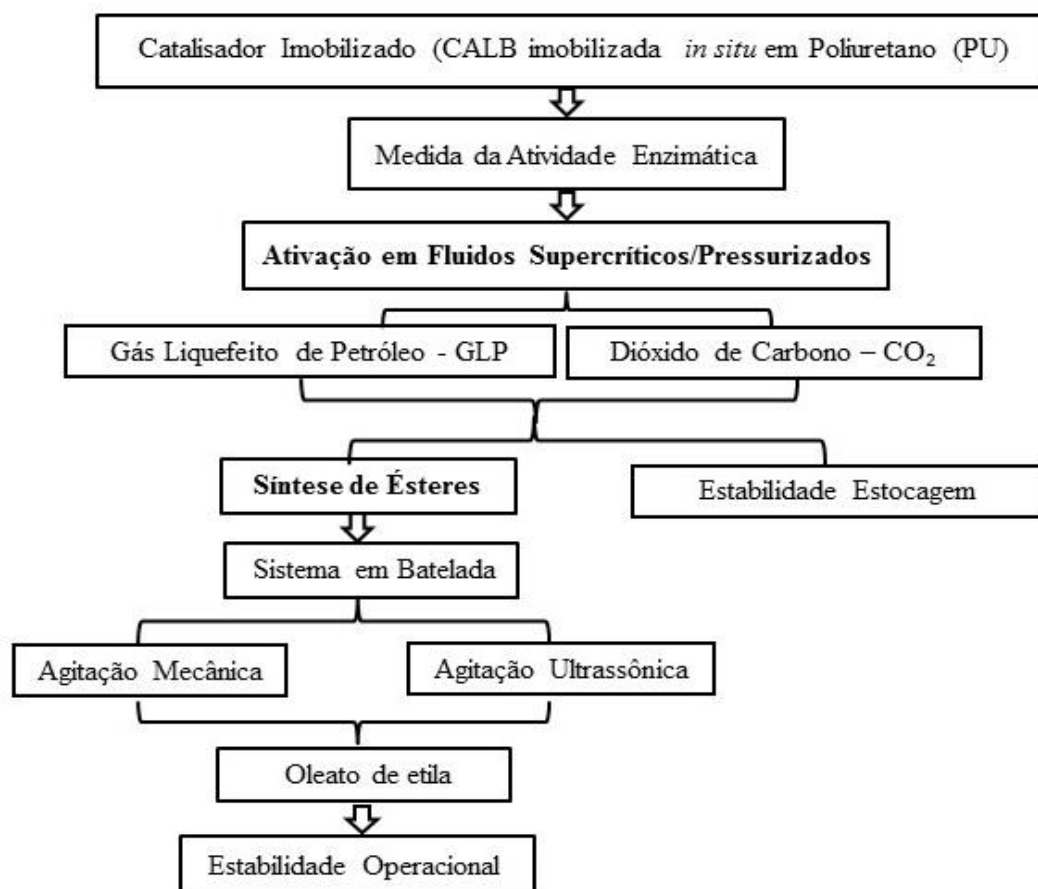
Entre os fluidos supercríticos disponíveis podem citar-se:

- ❖ *Propano* e o *n-butano*: são fluidos pouco empregados, sendo altamente inflamável, o que rege sua principal desvantagem em comparação com CO₂ (KNEZ et al., 2014);
- ❖ *Dióxido de carbono (CO₂)*: é um dos fluidos mais utilizados, por não apresentar inflamabilidade e por ter risco ambiental consideravelmente menor. Está disponível em alta pureza a partir de fontes comerciais e industriais, podendo ser reutilizado com ausência de traços de solvente no produto final.
Apresenta parâmetros críticos de (T_c = 31,4°C, P_c = 73,8 bar e densidade de 9,27 mol/em a pressão de 124 bar) (JÉRÔME e LECOMTE, 2008) abaixo dessa faixa chamamos de subcrítico (>73,8 bar – líquido) e acima chamamos de supercrítico (< 73,8 bar – gás) (BECKMAN, 2004).
- ❖ *Gás liquefeito de petróleo (GLP)*: é obtido do processamento do gás natural e 80% do refino do petróleo (SINDIGÁS, 2016). O Gás natural apresenta baixo teor de contaminantes (nitrogênio, compostos de enxofre, CO₂, água, particulados) e para sua aplicação como gás combustível é odorizado com enxofre (mercaptanas) para conferir o odor característico (PETROBRÁS, 2016).

O uso de fluidos supercríticos como solventes para reações químicas pode ser uma rota promissora no sentido de eliminar traços de solvente dos produtos reacionais. Adicionalmente, processos industriais em condições próximas ao ponto crítico podem ser vantajosos em termos de: consumo de energia, facilidade de recuperação do produto e minimização da formação de produtos secundários (KNEZ e HABULIN, 1998).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da ativação do catalisador imobilizado (CALB imobilizada em PU) em fluidos supercríticos de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) e dióxido de carbono (CO₂) na atividade catalítica do mesmo, seguido da avaliação da estabilidade de estocagem e operacional, além da obtenção de ésteres de oleato de etila em sistema de agitação mecânica e ultrassônica.

A Figura 4.2 apresenta o fluxograma das etapas realizadas neste estudo.

Figura 4.2 - Fluxograma da sequência desta etapa do estudo.

4.1 Materiais e Métodos

Além da enzima lipase B de *Candida antarctica* - CALB (Novozyme NZL-102), imobilizada em poliuretano, os solventes utilizados foram o ácido oleico (Vetec), álcool etílico (Merck), diclorometano (Vetec), fluido supercrítico de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) (Petrobras), constituído de: propano (50,3%), n-butano (28,4%), isobutano (13,7%), etano (4,8%) e outros componentes secundários (metano, pentano, isopentano, etc.), ácido oléico (Vetec), álcool etílico (Merck) e dióxido de carbono (CO₂) e Gás Liquefeito de Petróleo (GLP).

4.2 Ativação do catalisador imobilizado em fluidos supercríticos

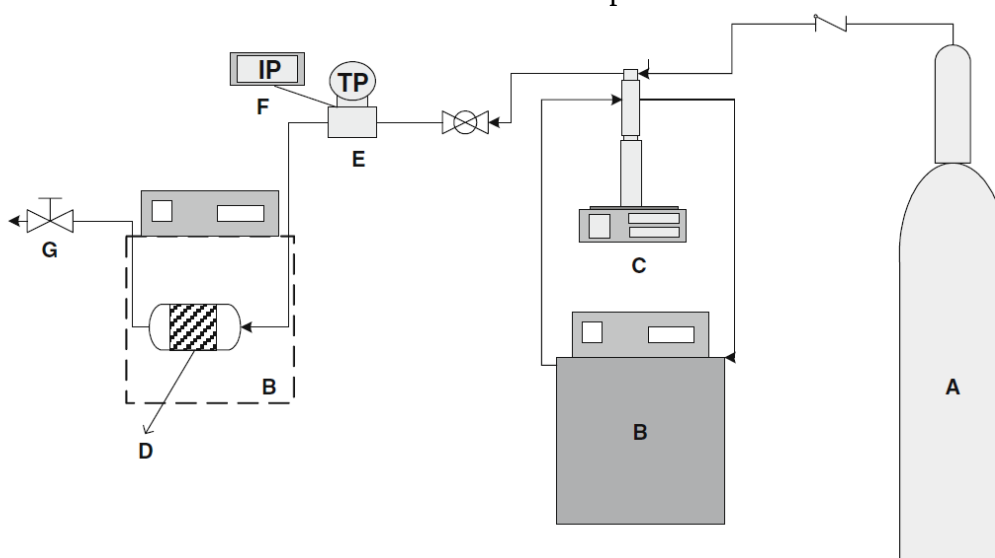
O efeito da ativação em alta pressão empregando fluidos supercríticos na atividade do catalisador imobilizado foi realizado empregando o fluido de GLP e CO₂, de acordo com o um DCCR 2³ completo.

As variáveis estudadas foram pressão, tempo reacional e taxa de despressurização, as quais foram estabelecidas de acordo com o gás empregado. A massa do catalisador

imobilizado foi fixada em 1,5 g (de acordo com capacidade do reator-célula) segundo estudos preliminares realizados por Manera et al. (2010) e a temperatura operacional em 37°C (temperatura limite operacional do equipamento) de acordo por Kuhn et al. (2010).

Os resultados foram expressos em termos de atividade residual (AR %) considerando a atividade enzimática de esterificação inicial (sem ativação como 100%). O diagrama esquemático do equipamento utilizado na ativação do catalisador imobilizado é apresentado na Figura 4.3.

Figura 4.3 - Diagrama esquemático do aparato utilizado na ativação do catalisador imobilizado em fluidos supercríticos.



*Onde: A - reservatório de solvente, B - banho termostático, C - bomba de seringa, D - reator/célula de aço, E - indicador de pressão, F - Transdutor de pressão e G - válvula micrométrica.

4.2.1 Determinação da atividade enzimática de esterificação

A atividade enzimática de esterificação (U.g^{-1}) do catalisador imobilizado foi quantificada empregando como reação modelo, a síntese do éster oleato de etila, a qual foi conduzida empregando 0,1 g de catalisador imobilizado e 5 g de substrato (razão molar ácido oleico:álcool etílico de 1:1). A reação foi conduzida a 40°C, por 40 minutos em agitação mecânica de 160 rpm.

Após este período reacional, alíquotas de 500 μL foram retiradas do meio reacional e adicionadas a 15 mL de uma solução de acetona-etanol (1:1) (v/v) e posteriormente titulada com NaOH 0,05 M até pH 11. As análises foram realizadas em triplicata, onde uma unidade de atividade enzimática de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio, sendo calculada conforme a Equação 1.

$$AE = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 1000 \times V_f}{t \cdot M_{EL} \times V_c} \quad (1)$$

Onde: AE = atividade enzimática de esterificação (U/g), V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos (mL), V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL), M = molaridade da solução de NaOH, V_f = volume final de meio reacional (mL), t = tempo (minuto), M_{EL} = massa do catalisador imobilizado e V_c = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

4.2.2 Determinação da atividade residual (%)

A atividade residual foi expressa em termos de atividade inicial (100%) e após a ativação (atividade final) em alta pressão empregando os fluidos supercríticos de GLP e CO₂, sendo expressa em porcentagem (%) conforme equação Equação 2.

$$AR(\%) = \frac{A_{final}}{A_{inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Onde: AR (%) = Atividade residual relativa, A_{final} = Atividade enzimática de esterificação após a ativação em fluido pressurizado e $A_{inicial}$ = Atividade enzimática de esterificação antes da ativação (referência) (U/g).

4.2.3 Fluido supercrítico de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP)

O efeito da ativação em alta pressão empregando fluido supercrítico de GLP na atividade do catalisador imobilizado foi realizada empregando a variável pressão (6 - 174 bar), tempo de reação (9,6 - 110,4 minutos) e taxa de despressurização (16,4 - 83,6 kg/m³min).

4.2.4 Fluido supercrítico de Dióxido de Carbono (CO₂)

O efeito da ativação em alta pressão empregando fluido supercrítico de CO₂ na atividade do catalisador imobilizado foi realizada empregando a variável pressão (10,8 - 229,2 bar), tempo de reação (9,6 - 110,4 minutos) e taxa de despressurização (2,8 - 137,2 kg/m³min).

4.3 Síntese do éster oleato de etila

A síntese de oleato de etila via ácido oleico e álcool etílico foi realizada, em triplicata, em frascos de 50 mL e livre de solvente orgânico, mantendo-se fixa a massa total de substrato na razão molar ácido oleico:álcool etílico (1:1) (5 g).

Após cada reação, o meio reacional foi submetido a uma etapa de filtração simples para separação do catalisador enzimático do meio reacional, o qual foi armazenado em refrigerador (2 a 8°C) para posterior análise por cromatografia gasosa (CG).

Paralelamente, foi realizado um ensaio em branco, o qual foi conduzido na ausência de enzima, nas mesmas condições reacionais (razão molar, agitação e temperatura), minimizando assim possíveis efeitos do processo.

4.3.1 Reações em sistema de batelada: agitação mecânica e ultrassônica

Avaliação do tempo de reação

Após a ativação em alta pressão empregando fluido supercrítico de GLP e CO₂ na condição otimizada, realizando-se inicialmente um estudo cinético para avaliar o efeito do tempo reacional (0 a 90 minutos) em relação ao rendimento em termos de conversão em oleato de etila. A condição reacional empregada nesta etapa foi a do ponto central do DCCR com a massa de catalisador imobilizado de 0,3 g e temperatura de 50°C, a qual será utilizada posteriormente na etapa de otimização do processo.

Para o sistema de agitação mecânica, a agitação foi fixada em 160 rpm e para o sistema de agitação ultrassônica a potência foi fixada em 60% em relação à potência do banho que é 132 W, ou seja, em 79,2 W e as análises foram realizadas em triplicata.

4.3.2 Otimização do processo de síntese do oleato de etila

Após a ativação em alta pressão empregando fluido supercrítico de GLP e CO₂ na condição otimizada realizou-se o processo de otimização da síntese do oleato de etila, a qual foi conduzida mediante o emprego de um DCCR e as análises foram realizadas em triplicata.

Esse éster foi escolhido por ter apresentado conversões inferiores aos outros ésteres empregando o catalisador imobilizado sem ativação, nesse sentido é possível observar o real efeito do processo de ativação no catalisador imobilizado para a síntese de ésteres.

Reações em batelada

Sistema de agitação mecânica

Para o sistema mecânico as variáveis estudadas foram à massa de catalisador (0,018 - 0,582 g) e a temperatura reacional (35,9 - 64,1°C), mantendo-se fixa a agitação mecânica (Shaker - modelo MA 420 - 600 Watts, Modelo Marconi) em agitação de 160 rpm e o tempo reacional em 40 minutos segundo metodologia descrita por Neta et al. (2012), com modificações.

Sistema de agitação ultrassônica

Para o sistema ultrassônico as variáveis estudadas foram à massa de catalisador (0,068 - 0,532 g), temperatura reacional (24,8 - 75,2°C) e potência ultrassônica (26,4 - 93,6%) (Unique ultraSonic Cleaner, USC-1800A, US 40 KHz, US 132 W), mantendo-se fixo o tempo reacional de 15 minutos de acordo com metodologia empregada no sistema de agitação mecânica.

4.3.2.1 Determinação da conversão (%)

As amostras foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC-Mass Shimadzu 2010) utilizando um banco de dados 5 (Agilent, J & W. Scientific, EUA) em coluna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As amostras foram preparadas por dissolução de 10 µl do produto final em 98 mL de heptano e 10 µl de MSTFA (N-Metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida). 1 µl desta amostra foi então injetada no equipamento.

A temperatura do injetor e do detector era de 250°C, e a temperatura do forno era constante a 60°C durante 1 minuto, e, em seguida aumentada em 10°C/minuto até 250°C, onde foi mantida constante durante 3 minutos segundo metodologia adaptada de Souza et al. (2015).

A conversão da reação foi calculada com base na redução da área de reagente limitante na base de estequiometria da reação (Equação 3).

$$C = \frac{Ab - Aa}{Ab} \times 100 \quad (3)$$

Onde: C (%) = Conversão, Ab = área do sinal referente ao ácido no ensaio em branco (corresponde ao ensaio sem enzima no tempo zero) e Aa = área do sinal referente ao ácido da amostra submetida à condição de reação de síntese.

4.3.7 Avaliação da estabilidade

Após a ativação em alta pressão empregando fluído supercrítico de GLP e CO₂ na condição otimizada realizou-se o processo de avaliação do processo de estabilidade de estocagem e operacional.

Cujos processos foram realizados até obtermos conversões e atividade enzimática de esterificação inferior a 50% em relação a inicial. Os resultados foram expressos em conversão, a qual considera a conversão inicial como 100% (Equação 4).

$$R(\%) = \frac{V_{final}}{V_{inicial}} \times 100 \quad (4)$$

Onde: R (%) = Conversão/Atividade residual, V_{final} = Valor final e $V_{inicial}$ = Valor inicial.

Estocagem

A fim de determinar a temperatura de estabilidade do imobilizado ativado com fluídos supercríticos, este foi armazenamento em temperaturas entre -80 a 80°C, de tempos em tempos (horas ou dias), quantificada a sua atividade enzimática e os resultados foram expressos em termos de atividade residual (%).

Operacional

O número de ciclos operacionais para o catalisador imobilizado na síntese de éster foi avaliado, onde após cada reação o catalisador foi submetido a um processo de filtração simples (papel filtro), retirando-se o excesso de meio reacional e submetida a uma nova etapa reacional, quantificada em função de sucessivos ciclos contínuos de reutilização e os resultados expressos em termos de conversão residual (%).

4.3.8 Análise Estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente segundo metodologia de planejamento de experimentos, com auxílio do software Statistica versão 5.0, com nível de significância de 95% de confiança.

4.4 Resultados e Discussões

O efeito da ativação em fluídos supercríticos de GLP e CO₂ na atividade do catalisador imobilizado considera a atividade inicial (sem ativação) do catalisador imobilizado igual a 789,0 U/g.

4.4.1 Ativação em fluido pressurizado de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP)

A Tabela 4.3 apresenta a matriz do DCCR 2³ completo, para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP, em função das variáveis estudadas: pressão (bar), tempo de reação (minutos) e taxa de despressurização (kg/m³.min).

Tabela 4.3 - Matriz do DCCR 2³ completo em função das variáveis estudadas pressão (bar), tempo de reação (minutos) e taxa de despressurização (kg/m³.min) para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP.

Ensaio	Pressão (bar)	Tempo (minutos)	Taxa Desp. (kg/m ³ .min)	Atv. Enzimática (U/g)	Atv. Residual (%)
1	1 (140)	-1 (30)	-1 (30)	881,1 ± 11,0	111,6 ± 11,0
2	1 (140)	-1 (30)	1 (70)	726,3 ± 17,0	92,1 ± 2,9
3	1 (140)	1 (90)	-1 (30)	1239,2 ± 25,8	157,1 ± 13,5
4	1 (140)	1 (90)	1 (70)	1000,9 ± 15,2	126,8 ± 25,2
5	-1 (40)	-1 (30)	-1 (30)	1413,0 ± 21,8	179,0 ± 24,6
6	-1 (40)	-1 (30)	1 (70)	926,0 ± 17,4	117,3 ± 11,7
7	-1 (40)	1 (90)	-1 (30)	1124,4 ± 12,3	142,5 ± 5,3
8	-1 (40)	1 (90)	1 (70)	803,5 ± 56,6	101,8 ± 21,2
9	-1,68 (6)	0 (60)	0 (50)	1386,2 ± 36,3	175,6 ± 5,2
10	1,68 (174)	0 (60)	0 (50)	867,6 ± 25,5	109,9 ± 1,4
11	0 (90)	-1,68 (9,6)	0 (50)	1069,5 ± 19,4	135,5 ± 15,6
12	0 (90)	1,68 (110,4)	0 (50)	1374,0 ± 14,5	174,1 ± 12,1
13	0 (90)	0 (60)	-1,68 (16,4)	821,7 ± 18,0	104,1 ± 14,8
14	0 (90)	0 (60)	1,68 (83,6)	571,4 ± 32,9	72,4 ± 4,7
15	0 (90)	0 (60)	0 (50)	855,3 ± 33,3	109,2 ± 1,9
16	0 (90)	0 (60)	0 (50)	853,0 ± 16,2	108,3 ± 2,3
17	0 (90)	0 (60)	0 (50)	850,4 ± 26,8	107,7 ± 1,8

*Parâmetros fixos: massa de imobilizado = 1,5 g. Atividade Inicial = 789,0 U/g e temperatura: 37°C.

Através dos resultados apresentados, observa – se que para a maioria dos ensaios, a atividade enzimática do imobilizado ativado foi superior a do imobilizado sem ativação de 789,0 U/g, demonstrando assim a eficiência do processo de ativação de enzimas em sistema de alta pressão, independente das variáveis empregadas pressão, tempo e taxa de despressurização.

Esse aumento na atividade enzimática pode estar vinculado à relação de afinidade por parte do catalisador enzimático (enzima), mais especificamente de seus resíduos e características apolares, com o fluido de GLP, o qual pode estar auxiliando no desdobramento proteico e mudança de conformação, favorecendo assim a abertura do sítio ativo por parte da enzima e consequentemente no aumento de sua atividade enzimática, além de evitar a remoção de água ligada à proteína (enzima) e dificultando a ocorrência de reações químicas indesejáveis (KNEZ e HABULIN, 2009; KUHN et al., 2010; SILVA, 2013b).

Muitas tentativas têm sido improvisadas para correlacionar as propriedades hidrofóbicas dos solventes orgânicos - GLP (propano + butano + hidrocarbonetos) (comportamento como um solvente líquido convencional) e maior poder de solvatação (combinação de moléculas da enzima com as moléculas do solvente) com o desempenho catalítico das enzimas.

Nesse sentido, os valores baixos da constante dielétrica (semelhantes aos do CO₂) podem estar favorecendo na ativação interfacial da enzima (aumento da atividade) e das propriedades mais favoráveis (afinidade com a enzima) de transporte em comparação aos outros solventes tradicionais (KNEZ e HABULIN, 2009)

Analizando independentemente cada variável observa-se um efeito significativo negativo para o aumento de todas as variáveis, as quais podemos observar o efeito da pressão sobre a atividade enzimática de esterificação (ensaios 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8) independentemente das demais variáveis, ou seja com o aumento da pressão ocorreu uma diminuição na atividade enzimática na maioria dos ensaios.

Podemos observar que em quatro ensaios, as atividades enzimáticas foram bem elevadas em relação a demais, com um aumento na atividade residual, superior 130% (ensaios 3, 5, 7 e 9), de três destas (ensaios 3, 5, 9) foram conduzidos empregando as menores pressões (≤ 40 bar), e destes avaliados o que apresentou a atividade enzimática observada foi de 1.413,0 U/g com a atividade residual de 179,0%, (ensaio 5 - 40 bar, 30 minutos e 30 kg/m³.min).

Outra variável de extrema importância numa reação de ativação enzimática é o tempo de exposição que a enzima irá ficar com o solvente. De acordo com os resultados expostos, a variável tempo (ensaios 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, 6 e 8, 11 e 12) teve efeito positivo em taxas de pressões e despressurização baixas e negativo em taxas de pressões e despressurização altas, observados na maioria dos ensaios.

A taxa de despressurização apresentou a mesma tendência observado nas demais variáveis, onde seu aumento proporcionou a diminuição na atividade enzimática, ou seja, teve

efeito significativo negativo (ensaios 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, 13 e 14), o mesmo observado para as variáveis extremas (ensaio 13 e 14).

Nesse sentido, quando a taxa de despressurização ocorre rapidamente, pode ocorrer uma brusca expansão do gás, podendo ocasionar um desdobramento irreversível na estrutura da enzima e rupturas nas ligações, contribuindo para a diminuição da atividade e seletividade, além de proporcionar uma diferença de pressão entre o ambiente onde se encontra a enzima e a sua pressão interna provocando uma fissura celular devida ao *overpressure*, justificando assim o efeito negativo na atividade.

Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O modelo foi validado pela análise de variância ($F_{\text{cal}}(9,28) > F_{\text{tab}}(3,63)$) com coeficiente de correlação (R^2) de 0,96 (Equação 5) empregando para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP.

$$\text{Atividade Residual (\%)} = 853,63 - 94,58P + 94,63P^2 + 53,73T + 128,23T^2 - 118,83D - 57,84D^2 + 130,47 P.T + 51,85P.D + 10,32T.D \quad (5)$$

Onde: P = pressão (bar), T = tempo (minutos) e D = taxa de despressurização ($\text{kg/m}^3.\text{min}$).

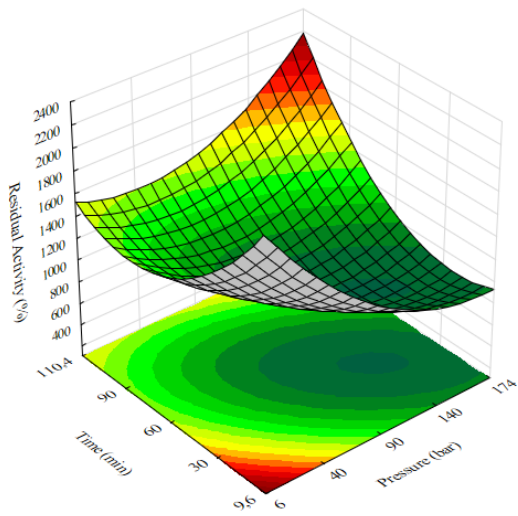
A Figura 4.4 apresenta a superfície de resposta e da curva de contorno, as quais representam os efeitos das interações entre a variável pressão, tempo de reação e taxa de despressurização empregando para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP.

Podemos observar que a para se obter as maiores atividades enzimáticas do imobilizado ativado com GLP as condições de pressão a serem aplicadas devem ser menores que 40 bar, que o tempo de ativação deve ser menor de 30 minutos e que a taxa de despressurização deve ser menor que $50 \text{ kg/m}^3.\text{min}$. Os resultados obtidos neste estudo, com atividade residual entre 72 e 179%, são semelhantes aos reportados pela literatura com utilização de GLP para a ativação de diferentes enzimas imobilizadas.

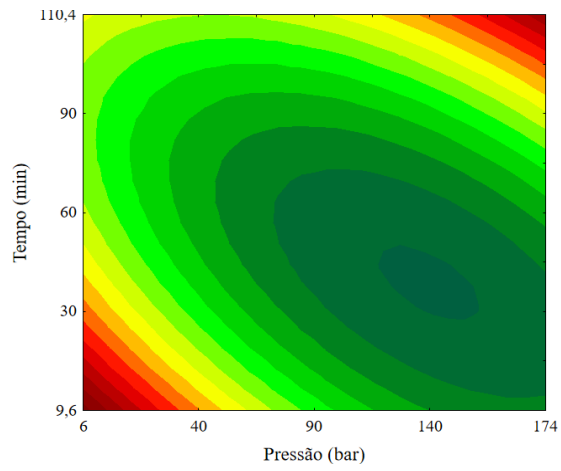
Até o presente momento não foram encontrados relatos na literatura científica do emprego da ativação de lipase CALB imobilizada em poliuretano em fluidos supercríticos.

Oliveira et al. (2006a) submeteram as lipases Lipozyme IM e Novozym 435 em fluido de butano (10 e 250 bar de pressão, $50 \text{ kg/m}^3.\text{min}$ de despressurização em 6 horas), as quais apresentaram aumento de 35 e 75% de atividade residual em todas as condições experimentais investigadas, respectivamente.

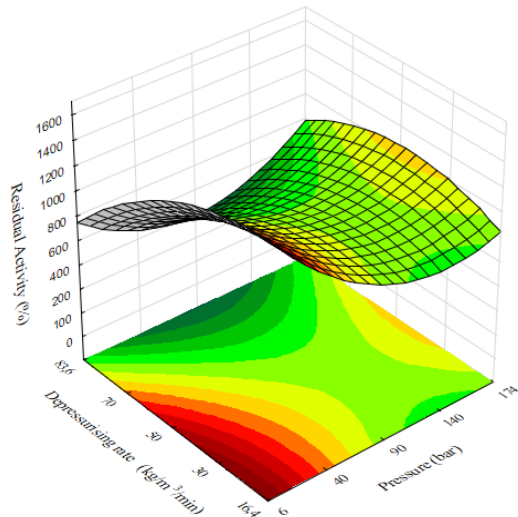
Figura 4.4 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP.



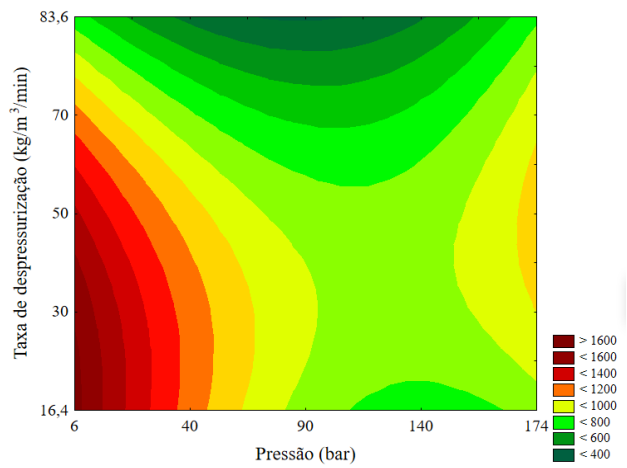
(a1)



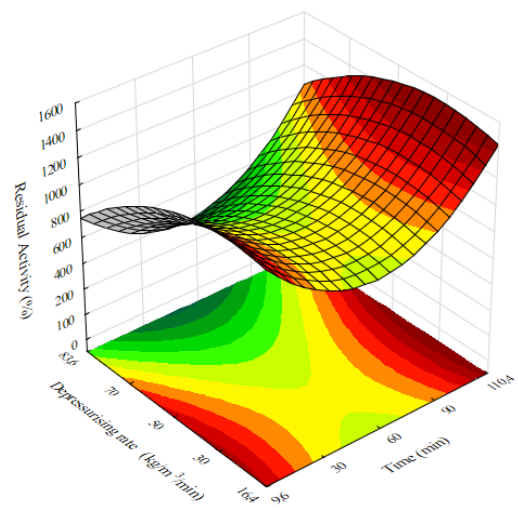
(a2)



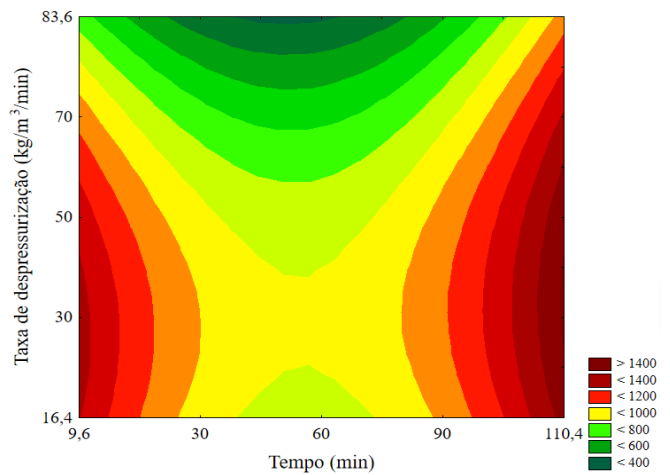
(b1)



(b2)



(c1)



(c2)

Silva (2013a) avaliou o comportamento da atividade da inulinase comercial de *Aspergillus niger* e da não comercial de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, nas suas formas livre e imobilizada em carvão ativo e alginato de sódio ativadas em n-butano, e obteve 210% de atividade residual para a enzima de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 (30 bar, 6 horas e despressurização de 20 kg/m³.min) e de 178% para a enzima de *Aspergillus niger* (270 bar, 6 horas e 100 kg/m³.min).

Marcon (2012) utilizou a Pectinex MASH e Ultra SP-L imobilizadas em carvão ativado e alginato de sódio e ativadas em GLP e observou um aumento de 117 e 63% sobre a atividade inicial (270 bar, 1 hora e taxa de despressurização rápida de 100 kg/m³.min), respectivamente.

Franken (2007) avaliou a atividade hidrolítica de três lipases (Amano PS, Amano AY30 e lipase de *Yarrowia lipolytica*) nas formas livre (liofilizada), ressuspensa e imobilizada em propano pressurizado. Tendo 340% de atividade residual para a lipase Amano PS liofilizada (30 minutos, despressurização de 50 kg/m³.min e 200 bar), de 300% para a lipase Amano PS imobilizada (30 minutos, 2 kg/m³.min e 30 bar) e as lipases Amano PS ressuspensa e Amano AY30 liofilizada e ressuspensa mantiveram praticamente inalterada sua atividade enzimática inicial.

Kuhn (2013) avaliou o efeito do fluido supercrítico de propano e GLP, na atividade de inulinas de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 e *Aspergillus niger* imobilizadas em montmorillonita. A inulinase de *K. marxianus* NRRL Y-7571 (30 bar, 6 h e despressurização de 20 kg/m³.min) apresentou uma atividade residual 218,7% e de 200% (270 bar, 6 horas e despressurização de 20 kg/m³.min) em relação a inicial para o fluido de GLP e propano, respectivamente. Para a inulinase de *A. niger* a atividade enzimática residual encontrada foi de 148,5% (270 bar, 1 hora e despressurização de 100 kg/m³.min) e de 145% (30 bar, 6 horas e despressurização de 20 kg/m³.min) em relação a inicial para o fluido de GLP e propano, respectivamente. Os autores também avaliaram a *Aspergillus. niger* imobilizada em poliuretano (150 bar, 3,5 horas e despressurização de 60 kg/m³.min) e obteve 433,4% de atividade residual.

Gaio (2016) na ativação de enzimas, pectinases liase (PMGL), pectinametilesterase (PME) e pectinases comerciais (Pectinex® Ultra SP-L e Pectinex® Mash) imobilizadas em suporte de gelatina-alginato de sódio e poliuretano (PU), com GLP, obteve aumento de 14% da atividade para a pectina liase (PMGL) e 19% para a pectinametilesterase (PME) quando comparada com a atividade inicial da enzima (110 bar, de 3,5 horas e despressurização de 60 kg/m³.min), já a pectina liase (Pectinex® Mash) (190 bar, 1 hora e 20 kg/m³.min de

despressurizada) apresentou 38% de atividade residual, enquanto que a pectinametilesterase (110 bar, 3,5 horas e despressurizada a uma taxa de 60 kg/m³.min) apresentou 11%. A Pectinex® Ultra SP-L imobilizada em PU apresentou 56% de atividade de pectinametilesterase (PME) quando comparada com a atividade inicial da enzima (190 bar pressão, 6 horas e despressurização de 20 kg/m³.min) e de apenas 3% quando alteradas as condições reacionais (110 bar, 3,5 horas e despressurizada a uma taxa de 60 kg/m³.min).

4.4.2 Ativação em fluido pressurizado de Dióxido de Carbono (CO₂)

A Tabela 4.4 apresenta a matriz do DCCR 2³ completo, para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de CO₂, em função das variáveis estudadas pressão (bar), tempo de reação (minutos) e taxa de despressurização (kg/m³.min).

Podemos observar através dos resultados apresentados que a enzima ativada com CO₂, observa-se que, para a maioria dos ensaios a atividade enzimática do imobilizado ativado foi superior à do imobilizado sem ativação (789,0 U/g), demonstrando a eficiência da ativação de enzimas neste sistema. Sendo que a maior atividade foi observada nos ensaios do ponto central (15, 16 e 17), com 2485,5 U/g e 314 % de atividade residual.

Morild (1981) sugere a esse fato, que a enzima ao ser submetida a altas pressões hidrostáticas, possam ter sua parte monomérica estimulada e sua parte multimérica inibida, fazendo com que ocorra um aumento na atividade enzimática.

Segundo Andrade (2008) o CO₂ usado como solvente supercrítico em catálise enzimática é de grande interesse devido à baixa polaridade do meio, podendo dissolver preferencialmente compostos hidrofóbicos e ser considerado um solvente não polar. Alguns autores acreditam ainda que o CO₂ forme complexos covalentes com os grupos amina livres da superfície da enzima, removendo as cargas dos resíduos de lisina e afetando assim, diretamente a atividade da enzima (KAMAT et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2006b,c; MONHEMI e HOUSAINDOKHT, 2012,a,b,c).

Analisando independente cada variável observamos que a pressão (ensaios 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8, 9 e 10) independentemente da demais variáveis, apresentaram na maioria dos ensaios efeito significativo positivo, comportamento distinto ao observado para o fluido supercrítico de GLP. Extremos de pressão (ensaio 10 - > 180 bar) proporcionou um efeito distinto aos demais, esse fato pode ser devido ao emprego de pressões superiores ao que a enzima pode suportar, ou seja, esse efeito benéfico e até certo ponto onde pode provocar a ruptura do sítio ativo ou até mesmo a desnaturação.

Castilho et al. (2000) destacam o efeito da pressão hidrostática sobre a estabilidade da enzima, apontando que os valores de pressão em torno dos utilizados neste estudo não causam efeito agressivo sobre a atividade da enzima.

Outra variável que apresentou o mesmo comportamento positivo, foi o tempo de exposição, pois de acordo com os resultados apresentados, a variável tempo (ensaios 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, 6 e 8, 11 e 12) em pressões baixas e altas taxas de despressurização tiveram efeito positivo, enquanto em altas pressões e taxas de despressurização, apresentou efeito negativo.

Tabela 4.4 - Matriz do DCCR 2³ completo em função das variáveis estudadas pressão (bar), tempo de reação (minutos) e taxa de despressurização (kg/m³.min) para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de CO₂.

Ensaio	Pressão (bar)	Tempo (minutos)	Taxa Desp. (kg/m ³ .min)	Atv. Enzimática (U/g)	Atv. Residual (%)
1	-1 (55)	-1 (30)	-1 (30)	655,2 ± 10,7	83,0 ± 8,5
2	-1 (55)	-1 (30)	1 (110)	672,3 ± 21,9	85,1 ± 10,4
3	-1 (55)	1 (90)	-1 (30)	982,7 ± 34,5	124,51 ± 20,3
4	-1 (55)	1 (90)	1 (110)	2149,1 ± 25,6	272,3 ± 1,8
5	1 (185)	-1 (30)	-1 (30)	1806,9 ± 21,1	228,9 ± 15,8
6	1 (185)	-1 (30)	1 (110)	1688,4 ± 37,0	213,9 ± 8,4
7	1 (185)	1 (90)	-1 (30)	1513,3 ± 45,1	191,7 ± 9,5
8	1 (185)	1 (90)	1 (110)	959,3 ± 33,2	121,55 ± 12,6
9	-1,68 (10,8)	0 (60)	0 (70)	2182,8 ± 35,7	276,5 ± 7,4
10	1,68 (229,2)	0 (60)	0 (70)	1583,8 ± 75,9	200,3 ± 14,8
11	0 (120)	-1,68 (9,6)	0 (70)	914,7 ± 28,1	115,1 ± 17,9
12	0 (120)	1,68 (110,4)	0 (70)	1944,5 ± 16,2	246,38 ± 9,1
13	0 (120)	0 (60)	-1,68 (2,8)	554,3 ± 20,4	70,5 ± 9,1
14	0 (120)	0 (60)	1,68 (137,2)	2438,1 ± 37,2	308,9 ± 13,0
15	0 (120)	0 (60)	0 (70)	2438,0 ± 49,5	308,9 ± 10,4
16	0 (120)	0 (60)	0 (70)	2461,7 ± 28,7	311,2 ± 14,3
17	0 (120)	0 (60)	0 (70)	2485,5 ± 90,5	314,9 ± 11,1

*Parâmetros fixos: massa de imobilizado = 1,5 g. Atividade Inicial = 789,0 U/g e temperatura: 37°C.

Nas variáveis extremas (ensaio 11 e 12) o acréscimo no tempo de exposição teve um efeito positivo, tendência distinta ao observado empregando o fluido supercrítico de GLP. Esse comportamento pode estar vinculado as condições de pressão e o estado físico do fluido

supercrítico, como a densidade e solubilidade, provocando modificações na vizinhança do ponto crítico (MONHEMI e HOUSAINDOKHT, 2012,a,b).

A taxa de despressurização (ensaios 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, 13 e 14), apresentou a mesma tendência observado nas demais variáveis, onde seu aumento proporcionou um acréscimo na atividade enzimática em pressões baixas e taxas de despressurização altas e uma diminuição em pressões elevadas e taxas de despressurização baixas. Comportamento desigual observado nas variáveis extremas (ensaio 13 e 14) a elevada taxa de despressurização foi benéfica para o aumento na atividade enzimática.

Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O modelo de segunda ordem foi validado pela análise de variância ($F_{cal} (11,54) > F_{tab} (3,63)$ com coeficiente de correlação (R^2) = 0,96 (Equação 6) empregando catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de CO₂.

$$\text{Atividade Residual} = 2458,86 + 419,94P - 305,98P^2 - 150,30T - 419,99T^2 - 224,35D - 419,94D^2 - 72,70P.T - 39,02 P.D + 124,55T.D \quad (6)$$

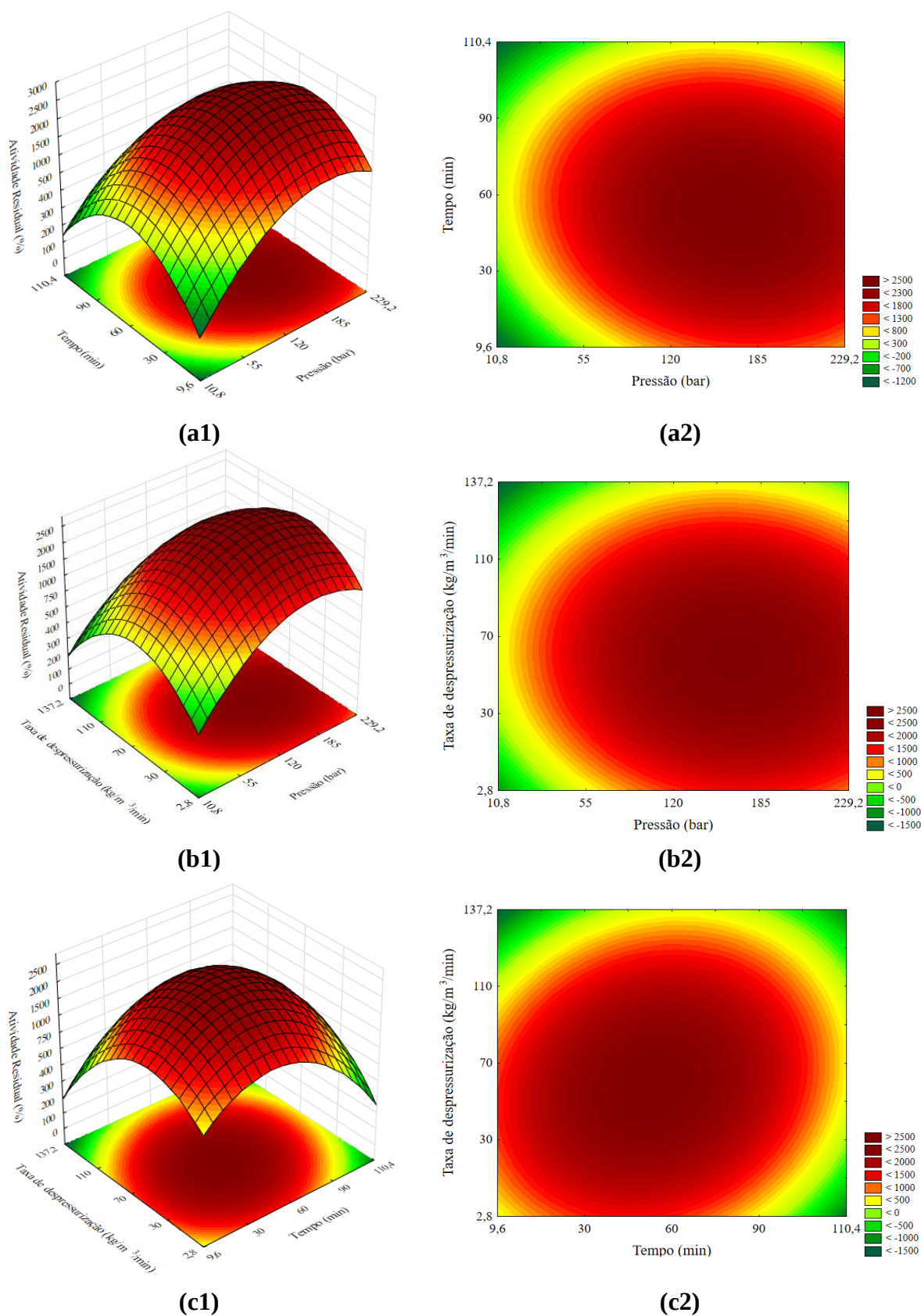
Onde: P = pressão (bar), T = tempo (minutos) e D = taxa de despressurização (kg/m³.min).

A Figura 4.5 apresenta a superfície de resposta e da curva de contorno, as quais representam os efeitos das interações entre a variável pressão, tempo de reação e taxa de despressurização.

Analizando as curvas de contorno observa-se a máxima atividade próxima a região do ponto central, ou seja, temperatura entre 30 a 70 minutos, pressão entre 120 e 190 bar e taxa de despressurização entre 60 e 70 kg/m³.min).

Essa tendência foi similar a observada utilizando o GLP, onde a atividade enzimática depende diretamente do tipo de fluido utilizado, ou seja a partição do substrato entre o sítio ativo e o solvente depende da hidrofobicidade do solvente e da enzima. Ou seja, as diferentes interações proteína- meio supercrítico (solvente), podem afetar a atividade da enzima, alterando a partição do substrato, do produto, da água (enzima e o solvente) e das interações diretas (fluido e a enzima), podendo inibir ou inativar por quebra das ligações, fato que não ocorreu em nosso estudo, pois em os ensaios houve incremento significativo na atividade enzimática em relação a enzima não ativada, indicando um efeito positivo também na ativação com CO₂.

Figura 4.5 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de CO₂.



Na literatura são reportados resultados de perda de atividade enzimática quando ativadas com CO₂ supercrítico.

Uma das hipóteses mais aceitas no que diz respeito à perda de atividade em CO₂, como sugere Kamat et al. (1995), é de que o CO₂, sendo um solvente hidrofílico, possui a capacidade de retirar a água essencial para a manutenção da atividade da enzima causando a desnaturação da mesma, levando conseqüentemente a uma perda de atividade.

Esse fato não foi observado em nosso estudo, isso pode ser explicado devido ao tipo de suporte utilizado no processo de imobilização. Segundo Dalla Vecchia et al. (2004) a imobilização em suportes hidrofóbicos pode aumentar a atividade enzimática, devido a mudanças conformacionais positivas entre enzima e suporte.

Oliveira et al. (2006a,b,c), Andrade (2008) e Wimmer e Zarevúcka (2010) relatam o uso de CO₂ supercrítico na ativação de enzimas, porém estes remetem a perdas na atividade, podendo este comportamento estar relacionado à baixa polaridade do CO₂ supercrítico, o que implica em problemas de dissolução de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos.

Raveendran et al. (2005) e Oliveira et al. (2006a,b) citam a possibilidade do CO₂ poder participar de ligações, por pontes de hidrogênio, com vários sistemas doadores de prótons e conseqüentemente influenciando diretamente no aumento ou diminuição na atividade enzimática.

Feihrmann (2005) empregando o CO₂ na ativação da Lipozyme IM, Novozym 435 e a lipase de *Yarrowia lipolytica*, constataram perdas de atividade para as três enzimas, de 13,7 e 8,9% (6 horas e despressurização de 200 kg/m³.min) para a Lipozyme IM e Novozym 435, respectivamente. E de 28,6% (6 horas e despressurização de 10 kg/m³.min) para a *Yarrowia lipolytica*.

Marcon (2012) avaliou a atividade enzimática das enzimas comerciais Pectinex MASH e Pectinex Ultra SP-L imobilizadas em carvão ativado e alginato de sódio ativadas em CO₂, e observou atividade residual de pectinesterase de 1,28% para a Pectinex Ultra SP-L (275 bar, 1 hora e 200 kg/m³.min de taxa de despressurização) e de 10,68% para a Pectinex MASH (75 bar, 1 hora e 10 kg/m³.min de taxa de despressurização).

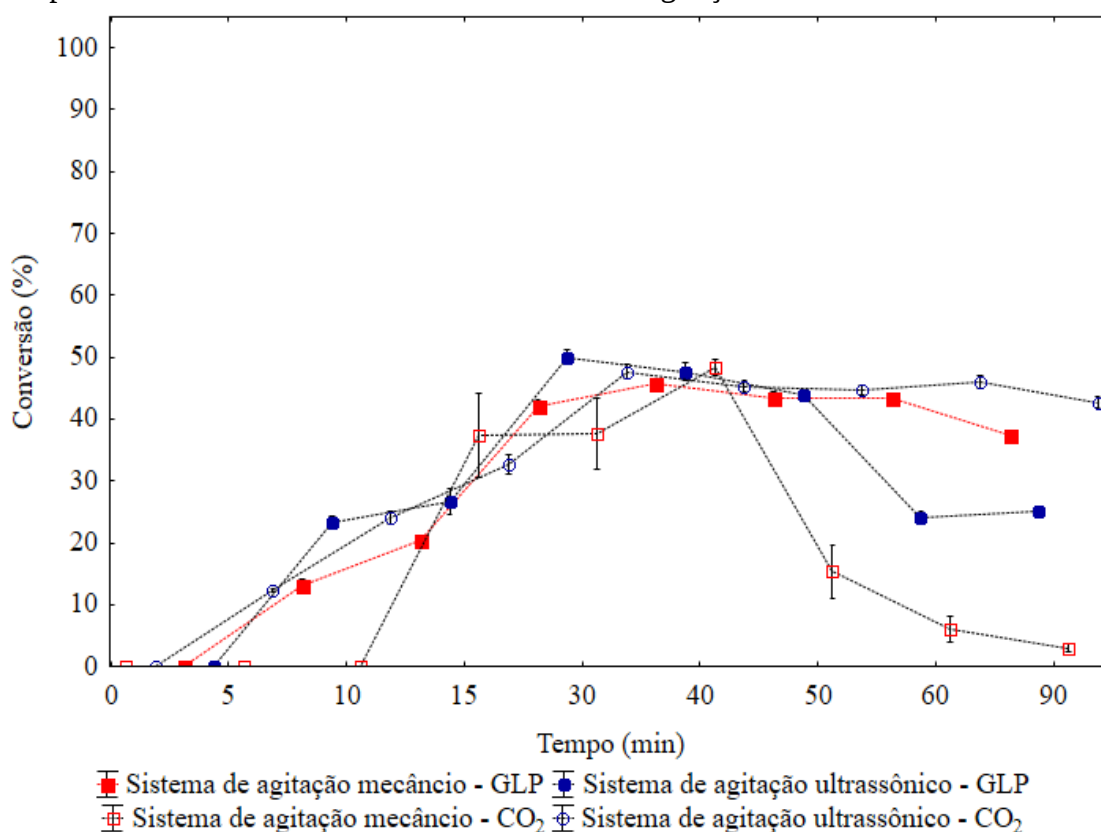
Silva (2013a) empregando as inulinases comerciais, de *Aspergillus niger* e não comercial de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, submetidas ao tratamento (ativação) em CO₂, observou atividade residual de 104,55% (275 bar, 6 horas e taxa de despressurização de 10 Kg/min.m³) e de 61,06% (75 bar, 6 horas e despressurização rápida 200 Kg/min.m³) para a enzima de *K. marxianus* NRRL Y- 7571 e *Aspergillus niger*, respectivamente.

4.4.3 Síntese de éster de oleato de etila

Avaliação do tempo de reação

A aplicação do imobilizado ativado em fluidos supercríticos foi realizada na reação de síntese do éster oleato de etila, na condição maximizada do GLP (40 bar, 30 minutos e 30 kg/m³.min) e do CO₂ (120 bar, 60 minutos e 70 kg/m³.min). A Figura 4.6 apresenta a conversão do éster de oleato de etila em função do tempo de reação para o sistema de agitação mecânica e ultrassônica.

Figura 4.6 - Evolução da conversão do oleato de etila em função do tempo reacional (minutos) empregando catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP e CO₂ para a síntese do oleato de etila em sistema de agitação mecânica e ultrassônica.



Através dos resultados apresentados, podemos observar que o catalisador imobilizado ativado em GLP apresentou conversões de 47 e 50% em 40 e 30 minutos de reação para o sistema de agitação mecânica e ultrassônica, respectivamente. Enquanto que o catalisador imobilizado ativado em CO₂ apresentou conversão de 33 e 50% em 40 minutos reacionais reação para o sistema de agitação ultrassônica.

Como a máxima conversão do éster se deu em 40 e 30 minutos para o sistema de agitação mecânica e ultrassônica, respectivamente, fixou-se este tempo para as próximas etapas do presente estudo.

Liu et al. (2008) chamam a atenção para a redução no tempo reacional quando empregado o sistema de agitação ultrassônica, o qual pode estar vinculado ao aumento na velocidade de reação, ocasionado principalmente pela formação de gotículas microscópicas no sistema, ampliando assim a área interfacial e aumentando a superfície de contato, proporcionando mudanças conformacionais benéficas na estrutura das proteínas sem interromper a sua função e redução nas limitações de transferência entre substrato/catalisador. Silveira (2015) e Zhao et al. (2016) relatam ainda o aumento absorção de energia potencial, o que pode intensificar as taxas de rendimento de conversão.

Sistema de agitação mecânica

A Tabela 4.5 apresenta a matriz do DCCR 2² completo para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica empregando o catalisador imobilização sem ativação e ativado em alta pressão empregando fluido supercríticos de GLP e CO₂, em função das variáveis estudadas massa de catalisador imobilizado (g) e temperatura (°C).

Tabela 4.5 - Matriz do DCCR 2² completo em função das variáveis estudadas temperatura (°C) e massa de catalisador (g) empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP e CO₂ para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.

Ensaio	Massa de catalisador imobilizado (g)	Temperatura (°C)	Conversão do ácido oleico (%)		
			Sem ativação	GLP	CO ₂
1	-1 (0,1)	-1 (40)	14,8 ± 2,0	28,8 ± 2,0	58,5 ± 1,2
2	-1 (0,1)	1 (60)	23,1 ± 1,9	42,3 ± 1,2	66,7 ± 0,6
3	1 (0,5)	-1 (40)	29,6 ± 2,4	67,7 ± 1,7	46,0 ± 0,5
4	1 (0,5)	1 (60)	55,7 ± 0,3	54,8 ± 1,0	55,1 ± 1,5
5	-1.41 (0,018)	0 (50)	15,5 ± 1,3	21,5 ± 0,6	66,9 ± 1,7
6	1.41 (0,582)	0 (50)	58,8 ± 0,5	66,7 ± 1,9	45,6 ± 0,6
7	0 (0,3)	-1.41 (35,9)	23,4 ± 1,9	21,7 ± 1,7	68,0 ± 2,1
8	0 (0,3)	1.41 (64,1)	56,8 ± 0,7	53,0 ± 0,9	41,6 ± 2,3
9	0 (0,3)	0 (50)	54,8 ± 0,6	58,0 ± 2,0	69,5 ± 1,4
10	0 (0,3)	0 (50)	52,0 ± 0,7	56,9 ± 1,2	68,7 ± 1,0
11	0 (0,3)	0 (50)	55,6 ± 0,5	59,2 ± 2,1	67,3 ± 1,3

* Parâmetros fixos: massa de substrato (5 g), razão molar ácido oleico:álcool etílico (1:1) e o tempo de reação de 40 minutos em sistema de agitação mecânica (160 rpm).

Podemos observar empregando o catalisador imobilizado sem ativação, que o aumento da conversão foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura (ensaio 1 e 2, 3 e 4, 7 e 8), independentemente da massa de catalisador imobilizado empregado, indicando um efeito positivo da temperatura sobre a conversão. Com a maximização da conversão do ácido oleico em 58,8% (massa de catalisador de 0,582 g e 50°C de temperatura- ensaio 6) em 40 minutos de reacionais.

Comportamento semelhante foi observado utilizando o catalisador imobilizado ativado em alta pressão empregando fluido supercrítico de GLP, onde é possível observar na maioria dos ensaios o efeito positivo do crescente aumento da temperatura com o aumento da conversão do éster (ensaio 1 e 2, 7 e 8), ressaltado nos ensaios com temperaturas ($> 50^{\circ}\text{C}$) obtiveram conversões superiores a 55% (ensaio 6, 8, 9, 10 e 11).

Enquanto para o catalisador imobilizado ativado em alta pressão empregando fluido supercrítico de CO_2 similar o empregado usando o fluido de GLP, onde o aumento da conversão foi observado com o aumento da temperatura (ensaio 1 e 2, 3 e 4) e as maiores conversões ($> 60\%$) foram observados em temperaturas ($> 50^{\circ}\text{C}$) (ensaio 2,5, 7, 9,10 e 11) e a maximização foi de 69% no ensaio do ponto central (0,3 g de catalisador imobilizado e 50°C).

Através dos resultados obtidos é possível observar a influencia da temperatura empregada, a qual afeta diretamente a taxa e atividade catalítica, rendimento e conversão do éster, através do equilíbrio químico das reações de esterificação. Além do aumento da indução da transferência de massa provocado pela diminuição da densidade e viscosidade do meio reacional.

A viscosidade é uma propriedade que varia proporcionalmente com a força de atração entre as moléculas aumento das distâncias intermoleculares, diminuindo assim as forças atrativas entre as moléculas, tornando o substrato mais difusível, bem como homogêneo, devido ao aumento da solubilidade entre os reagentes (GRANJEIRO et al., 2007).

Outra variável de extrema importância, combinada com temperatura empregada é a massa de catalisador imobilizado utilizado, pois é possível observar um crescente aumento da conversão do ácido oleico com o acréscimo da massa de catalisador empregue (ensaio 1 e 3, 2 e 4, 5 e 6), por exemplo, com 0,1 g de catalisador a conversão foi de $\approx 20\%$, com 0,5 g foi de $\approx 55\%$ e com 0,582 g foi de 58% empregando catalisador sem ativação.

Comportamento similar foi observado empregando catalisador imobilizado ativado em GLP, onde é possível observar na maioria dos ensaios o efeito positivo do crescente aumento da massa de catalisador com o aumento da conversão do éster (ensaio 1 e 3, 2 e 4, 5 e 6). O

aumento da massa de catalisador imobilizado amplia o número de sítios ativos presentes no meio, favorecendo a conversão (COLOMBO, 2011).

Para o catalisador imobilizado ativado em CO₂ obteve efeito distinto (adverso), ou seja, ocorreu uma diminuição na conversão com o aumento da massa de catalisador (ensaios 1 e 3, 2 e 4, 5 e 6), obtendo a maximização da conversão de 67,7% (massa de catalisador imobilizado de 0,5 g e 40°C - ensaio 3).

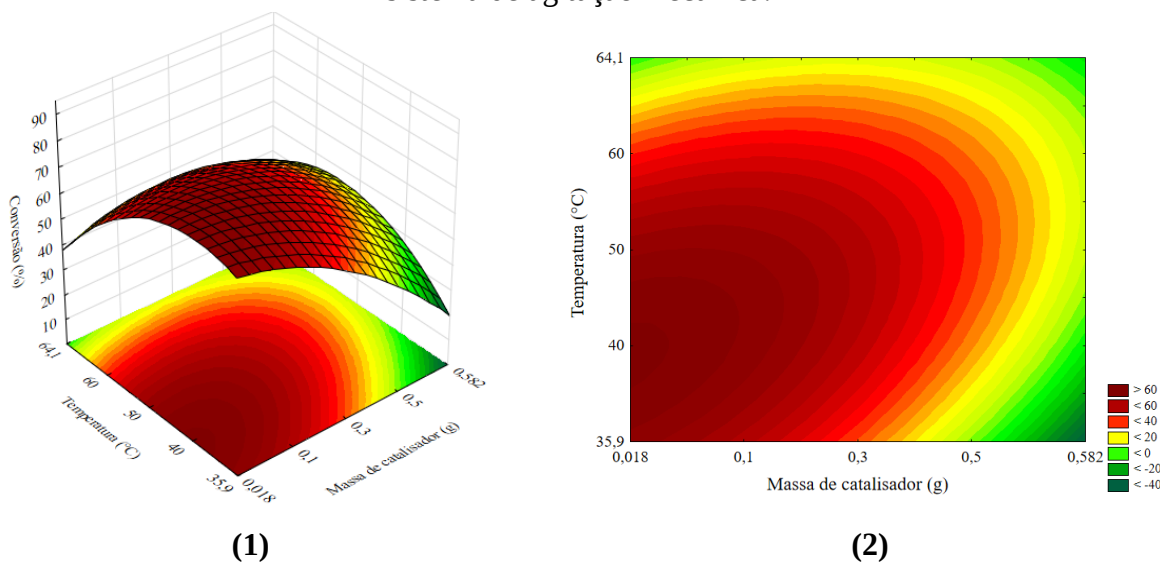
Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). O modelo foi validado pela análise de variância empregando o fluido pressurizado de GLP $F_{cal} (6,36) > F_{tab} (4,01)$ com coeficiente de correlação (R^2) de 0,92 (Equação 7) empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.

$$\text{Conversão} = 58,00 - 14,21M - 5,03M^2 - 5,45T - 8,45T^2 - 6,60M.T \quad (7)$$

Onde: M = massa de catalisador imobilizado (g) e T = temperatura (°C).

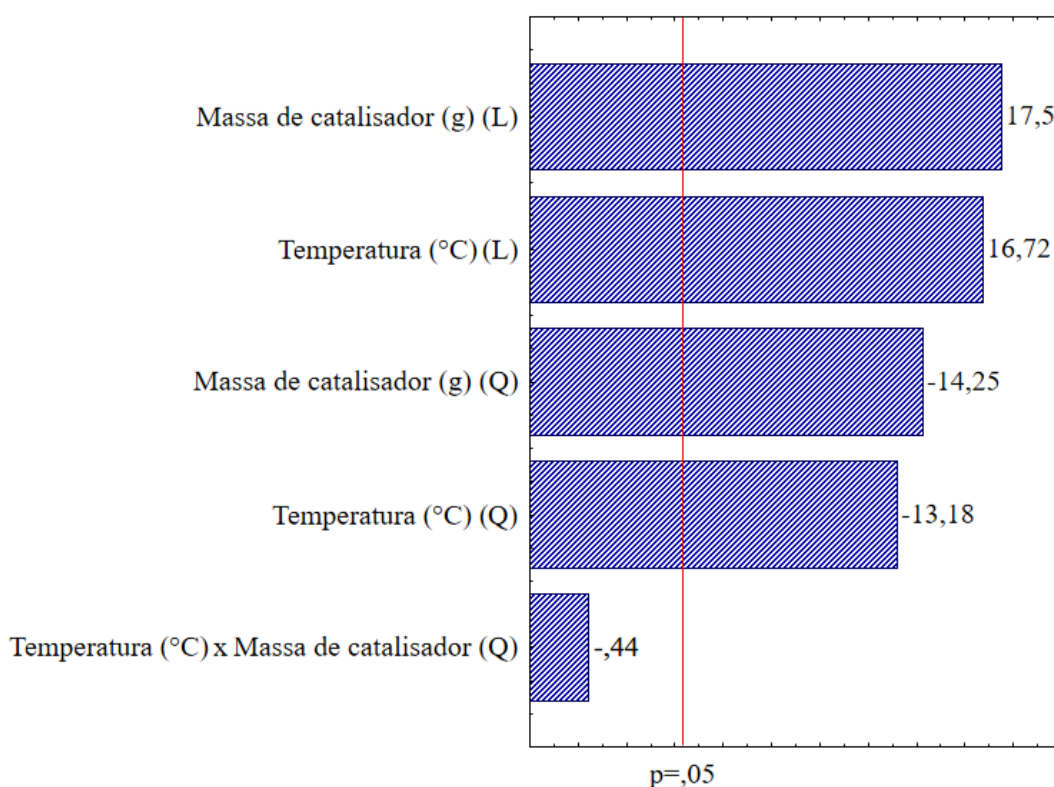
A Figura 4.7 apresenta a superfície de resposta e da curva de contorno, as quais representam os efeitos das interações entre a variável massa de catalisador imobilizado e temperatura empregando para o catalisador ativado com GLP para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica. As maiores conversões foram alcançadas na região correspondente a massa de catalisador entre 0,3 a 0,51 g e temperatura entre 45 a 70°C.

Figura 4.7 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP para a síntese do oleato de etila em sistema de agitação mecânica.



Para o fluido pressurizado de a melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). A Figura 4.8 apresenta o diagrama de Pareto, a qual representa os efeitos das interações entre a variável massa de catalisador imobilizado e temperatura empregando o catalisador imobilizado ativado com CO₂ para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.

Figura 4.8 - Gráfico de Pareto empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de CO₂ para a síntese de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.



Podemos observar através da variável empregada massa de catalisador imobilizado (-14,25) e temperatura (-13,18) apresentaram efeito quadrático negativo e linear positivo, ou seja, quanto maior a massa de enzima (17,50) e temperatura (16,72) no meio reacional, maior será a conversão obtida e a interação entre elas não teve efeito significativo. Além disso é possível identificar um comportamento desigual em relação à utilização do catalisador imobilizado ativado em fluido supercrítico de GLP e sem ativação, para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.

Em termos gerais a ativação empregando fluidos supercríticos foi muito benéfica para o rendimento de conversão do catalisador imobilizado para a síntese de éster de oleato de etila

em sistema mecânico, ou seja, melhorando significativamente na maioria dos ensaios, comparado com o catalisador sem ativação.

Esse aumento na conversão pode estar vinculado à relação de afinidade por parte do catalisador enzimático (enzima), mais especificamente de seus resíduos e características apolares dos fluidos empregados, favorecendo assim a abertura do sítio ativo por parte da enzima e consequentemente no aumento de conversão do éster (KNEZ e HABULIN, 2009).

A aplicação de fluidos supercríticos em processos enzimáticos, seja como meio reacional ou como uma etapa de ativação, tem recebido atenção nos últimos anos, principalmente pela facilidade, rapidez e baixo custo. Manipulando as propriedades do suporte é possível proteger a conformação da enzima e com isso manter ou aumentar seu poder catalítico (TALBERT e GODDARD, 2012; WAGHMARE et al., 2015).

Esta tendência observada está coerente com o tipo de fluido supercrítico utilizando na conversão de diferentes ésteres, a qual foi observada por outros autores (OLIVEIRA et al., 2006b; LU et al., 2008; MARTINS et al., 2014; ZHAO et al., 2016).

Os trabalhos disponíveis na literatura sobre a ativação de enzimas em fluidos supercríticos aplicados na síntese de ésteres ainda é restrita. Kuhn (2013) empregando inulinase comercial de *A. niger* imobilizada em montmorillonita (270 bar, 1 hora e despressurização de 100 kg/m³.min) e em poliuretano (150 bar, 3,5 horas e despressurização de 60 kg/m³.min) ativada em fluido supercrítico de GLP, obteve produção de frutooligossacarídeos de ≈ 18 e 35% utilizando a sacarose e inulina como substratos, respectivamente.

Silva (2013a) na produção de fruto-oligossacarídeos (FOS) empregando a inulinase comercial de *Aspergillus niger* na forma livre e imobilizada, em alginato de sódio e carvão ativo, ativadas em fluido de GLP (30 bar, 1 hora e despressurização de 100 kg/m³.min) apresentou síntese de 26,62% de kestose, 30,62% de nistose e 8,47% frutossilnistose usando sacarose como substrato. O mesmo autor ao utilizar a *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 produziu 11,89% de kestose e 20,83% de frutossilnistose com inulina como substrato.

Sistema de agitação ultrassônica

A Tabela 4.6 apresenta a matriz do DCCR 2³ completo para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica empregando o catalisador imobilização sem ativação e ativado em alta pressão empregando fluido supercríticos de GLP e CO₂, em função das variáveis estudadas massa de catalisador imobilizado (g), temperatura (°C) e potência ultrassônica.

Tabela 4.6 - Matriz do DCCR 2³ completo em função das variáveis estudadas temperatura (°C) e massa de catalisador (g) empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP e CO₂ para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

Ensaio	Temperatura (°C)	Massa de catalisador imobilizado (g)	Potência ultrassônica (%)	Conversão (%)		
				Sem ativação	Com ativação com GLP	Com ativação com CO ₂
1	-1 (35)	-1 (0,1)	-1 (40)	18,4 ± 0,6	45,9 ± 1,7	20,5 ± 0,1
2	-1 (35)	-1 (0,1)	1 (80)	26,6 ± 1,8	54,4 ± 2,5	33,9 ± 1,5
3	-1 (35)	1 (0,5)	-1 (40)	19,0 ± 0,2	30,6 ± 0,9	50,6 ± 2,0
4	-1 (35)	1 (0,5)	1 (80)	59,2 ± 1,4	46,0 ± 2,1	56,9 ± 2,3
5	1 (65)	-1 (0,1)	-1 (40)	31,3 ± 0,5	59,0 ± 1,1	50,6 ± 0,9
6	1 (65)	-1 (0,1)	1 (80)	41,3 ± 4,6	48,3 ± 0,6	40,2 ± 1,5
7	1 (65)	1 (0,5)	-1 (40)	51,2 ± 5,3	66,5 ± 0,5	77,1 ± 2,7
8	1 (65)	1 (0,5)	1 (80)	65,2 ± 0,3	56,4 ± 1,2	50,1 ± 0,3
9	- 1,68 (24,8)	0 (0,3)	0 (60)	39,2 ± 1,7	34,1 ± 2,5	55,7 ± 0,5
10	1,68 (75,2)	0 (0,3)	0 (60)	60,6 ± 1,0	65,2 ± 3,0	55,2 ± 0,6
11	0 (50)	-1,68 (0,068)	0 (60)	18,1 ± 2,1	50,4 ± 0,4	33,0 ± 2,3
12	0 (50)	1,68 (0,532)	0 (60)	56,2 ± 2,9	69,8 ± 1,6	69,2 ± 0,7
13	0 (50)	0 (0,3)	- 1,68 (26,4)	39,6 ± 0,8	34,6 ± 0,5	65,1 ± 2,6
14	0 (50)	0 (0,3)	1,68 (93,6)	66,7 ± 0,6	65,1 ± 2,2	50,6 ± 1,8
15	0 (50)	0 (0,3)	0 (60)	61,8 ± 1,3	73,6 ± 0,9	72,9 ± 1,3
16	0 (50)	0 (0,3)	0 (60)	63,0 ± 2,8	71,5 ± 1,5	75,1 ± 2,4
17	0 (50)	0 (0,3)	0 (60)	64,2 ± 2,5	70,6 ± 1,2	76,0 ± 0,5

*Parâmetros fixos: razão molar em relação ao peso dos substratos (1:1) ácido: álcool e o tempo de reação de 30 minutos.

De uma maneira geral, como no estudo conduzido com agitação mecânica, as variáveis avaliadas, quando analisadas de forma independente, apresentaram efeito positivo empregando catalisador sem ativação. A variável massa de catalisador apresentou um aumento na conversão, independente da temperatura (ensaios 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, 6 e 8, 13 e 14), potência ultrassônica (ensaios 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, 11 e 12) e temperatura (ensaios 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8, 9 e 10), independente das outras variáveis estudadas.

Conversões significativas, sendo superiores a 60% foram observados com o aumento da temperatura ($> 65^{\circ}\text{C}$), massa de catalisador ($> 0,5\text{ g}$) e potência ultrassônica ($> 80\%$) (ensaios 8, 14, 15, 16 e 17) e a maximização foi 66,7% de conversão do ácido oleico (ensaio 14, 50°C , massa de catalisador de 0,3 g e potência ultrassônica de 93,6%) em 30 minutos reacionais.

Comportamento similar foi observado empregando catalisador imobilizado ativado em GLP e CO_2 , onde é possível ressaltar que na maioria dos ensaios o efeito positivo do crescente aumento da temperatura (ensaios 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, 6 e 8, 13 e 14), temperatura (ensaios 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, 4 e 8, 9 e 10) e potência ultrassônica (ensaios 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8, 11 e 12).

Conversões significativas, sendo superiores a 60% foram notados empregando catalisador imobilizado ativado em GLP e CO_2 com o aumento da temperatura, massa de catalisador e potência ultrassônica (ensaios 7, 10, 12, 15, 16 e 17) e (ensaios 7, 12, 13, 15, 16 e 17) respectivamente em 30 minutos reacionais.

A maximização na conversão da conversão do ácido oleico empregando catalisador sem ativação de foi de 69,7% quando ativado em fluidos supercríticos essa conversão aumentou significativamente, passando para 73% para o catalisador ativado com GLP (massa de catalisador imobilizado de 0,5 g, 65°C e 40% de potência ultrassônica) e de 77% para o catalisador ativado em CO_2 (50°C , massa de catalisador de 0,3 g e potência ultrassônica de 93,6% em 30 minutos de reutilização).

Para avaliação do efeito da frequência/potência ou energia ultrassônica sobre a síntese de éster de oleato de etila, foi possível observar através dos resultados obtidos, que o rendimento de conversão foi proporcional ao aumento da energia ou potência ultrassônica empregada.

Choudhury et al. (2013) chamam a atenção para esse fato, pois o efeito das bolhas de cavitação acelera consideravelmente o poder dissipação das moléculas e solubilidade dos reagentes, aumentando a intensidade, energia libertada e, conseqüentemente a velocidade reacional (KHAN et al., 2015), além de proporcionar um baixo consumo energético (KWIATKOWSKA et al., 2011; MARTINS et al., 2013).

Este comportamento pode estar relacionado ao aumento dos efeitos físicos proporcionado pelo ultrassom, levando ao aumento do fenômeno de cavitação (geração de turbulência de microescala pelas bolhas de cavitação e transferência acústica) e consequentemente aumento no número de bolhas formadas e da quantidade de energia localizada no meio (YANG e RUSSELL, 1996; BANSODE e RATHOD, 2014; MULINARI et al., 2017; SANCHETI e GOGATE 2017).

Em termos gerais a ativação empregando fluidos supercríticos foi muito benéfica para o rendimento de conversão do catalisador imobilizado para a síntese de éster de oleato de etila em sistema ultrassônico, além do que na maioria dos ensaios, comparado com o catalisador sem ativação, comportamento similar ao observado no sistema mecânico e já mencionado anteriormente.

Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os modelos de segunda ordem foram validados pela análise de variância empregando o fluido pressurizado de GLP com $F_{cal} (5,97) > F_{tab} (3,63)$ e coeficiente de correlação (R^2) de 0,94 (Equação 8) empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

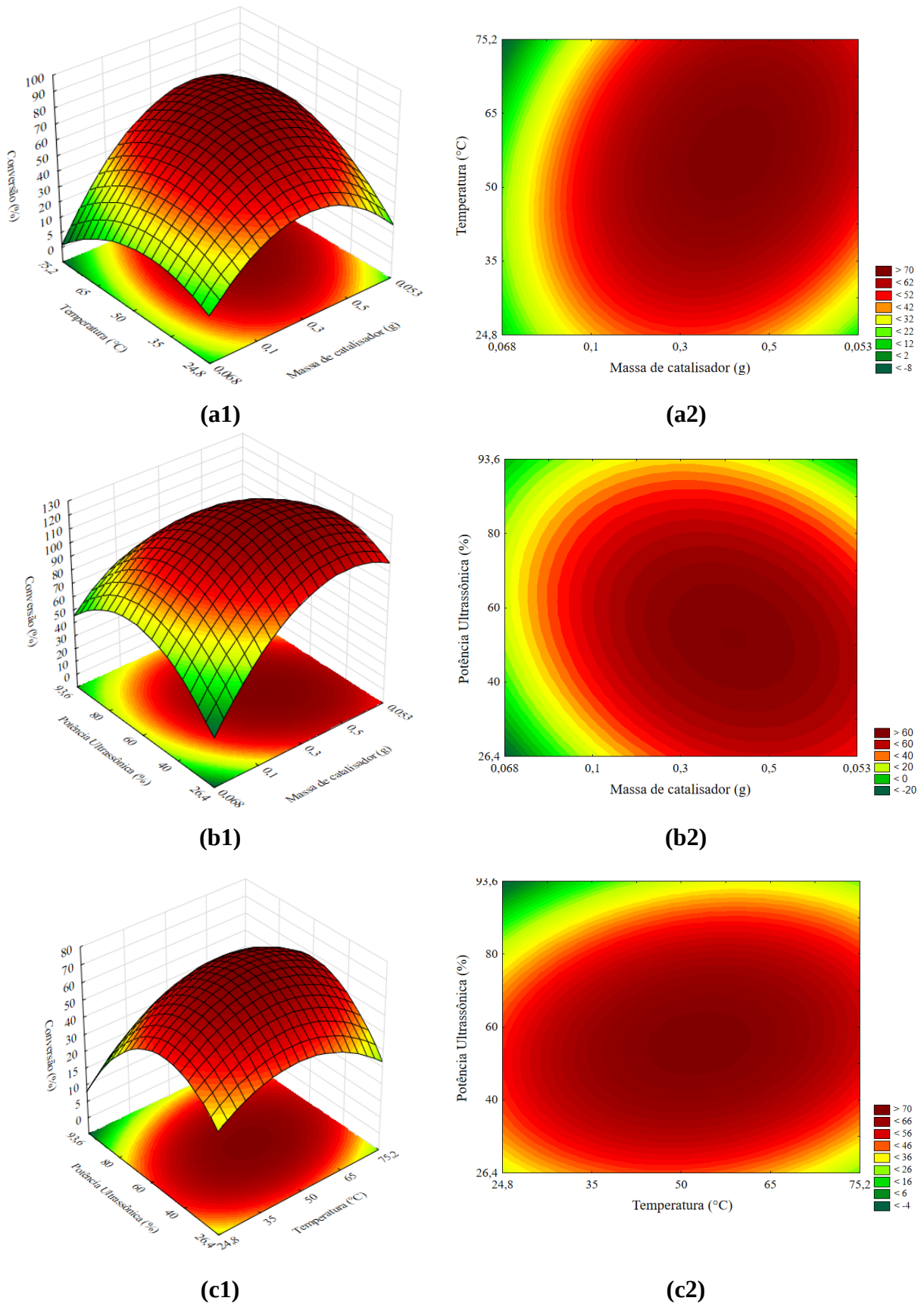
$$\text{Conversão} = 73,02 + 8,461M - 58,74M^2 + 2,52T - 5,04T^2 - 4,26P - 8,67P^2 + 3,66M.T - 4,33M.P + 2,18T.P \quad (8)$$

Onde: M = massa de catalisador imobilizado (g), T = temperatura (°C) e P = potência ultrassônica (%).

A Figura 4.9 apresenta a superfície de resposta e da curva de contorno, as quais representam os efeitos das interações entre a variável massa de catalisador imobilizado e temperatura empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

Para uma melhor interpretação dos resultados, principalmente considerando os efeitos entre as variáveis, os resultados foram tratados estatisticamente com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os modelos de segunda ordem foram validados pela análise de variância empregando o fluido pressurizado de CO₂ com $F_{cal} (11,41) > F_{tab} (3,63)$ e coeficiente de correlação (R^2) de 0,95 (Equação 9) empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de CO₂ para a síntese do oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

Figura 4.9 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP para a síntese do oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

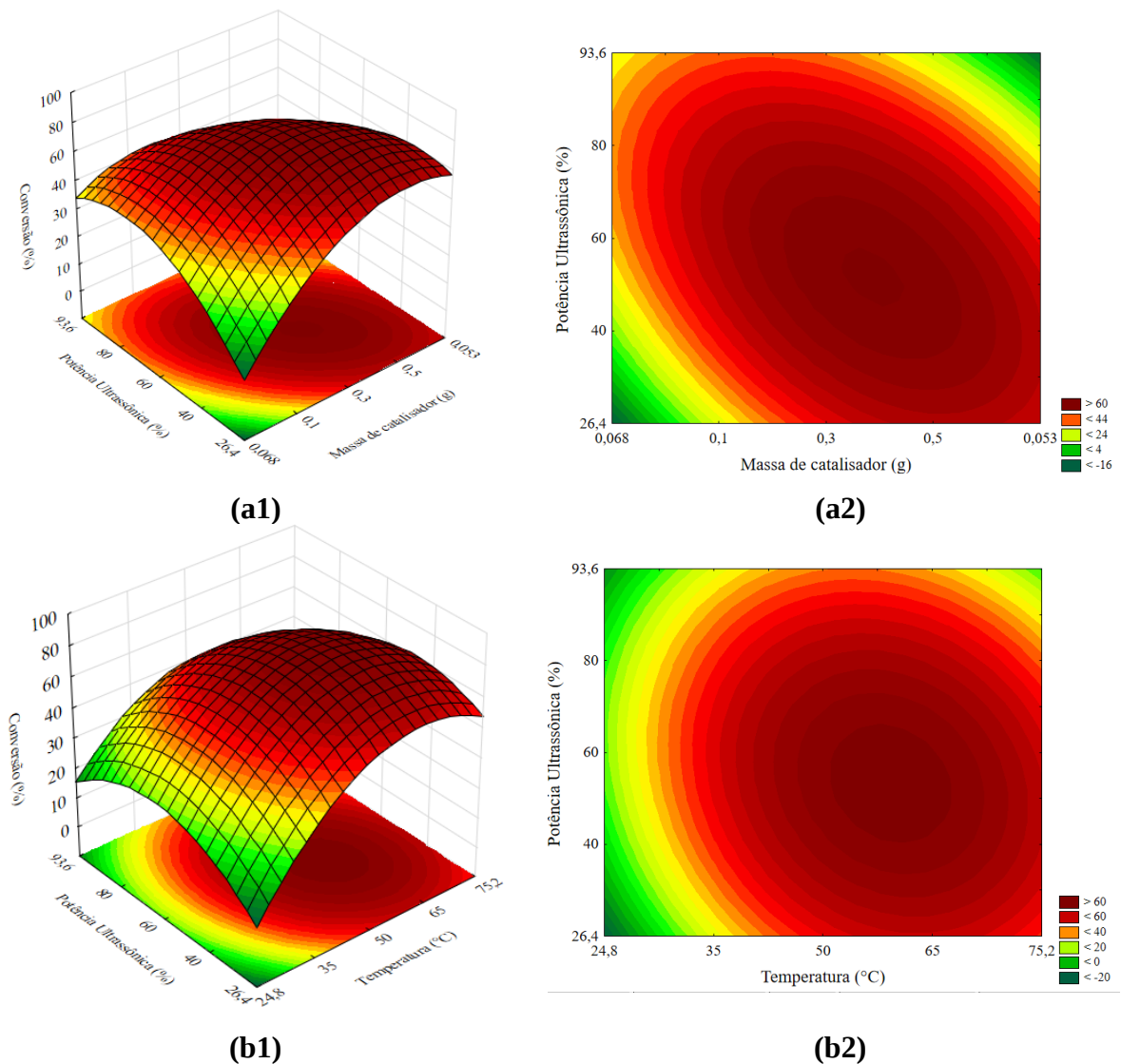


$$\text{Convers\~ao} = 75,07 + 4,04M - 8,16M^2 + 11,01T - 9,70T^2 - 3,08P - 7,31P^2 - 7,13M.P - 2,96T.P \quad (9)$$

Onde: M = massa de catalisador imobilizado (g), T = temperatura (°C) e P = potência ultrassônica (%).

A Figura 4.10 apresenta a superfície de resposta e da curva de contorno, as quais representam os efeitos das interações entre a variável massa de catalisador imobilizado, temperatura e potência ultrassônica, empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de CO₂ para a síntese do oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

Figura 4.10 - Superfície de resposta (1) e curva de contorno (2) empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de CO₂ para a síntese do oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica



Observa-se através da Figura 4.10 dos resultados, uma região ótima de massa de catalisador (0,3 a 0,55g), temperatura (40 a 60°C) e potência ultrassônica (50 a 70%) para obtenção da máxima síntese de oleato de etila, em sistema de agitação ultrassônica, empregando o catalisador imobilizado ativado com GLP.

Observa-se através da Figura 4.11 dos resultados, uma região ótima de massa de catalisador (0,3 a 0,55 g), temperatura (55 a 65°C) e potência ultrassônica (40 a 60%) para obtenção da máxima síntese de oleato de etila, em sistema de agitação ultrassônica, empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de CO₂ para a síntese do oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

4.4.4 Avaliação da estabilidade

A avaliação na estabilidade do catalisador imobilizado ativado em fluidos supercríticos foi realizada na condição maximizada para a ativação em GLP (40 bar, 30 minutos e 30 kg/m³.min) e CO₂ (120 bar, 60 minutos e 70 kg/m³.min).

4.4.4.1 Estabilidade da estocagem

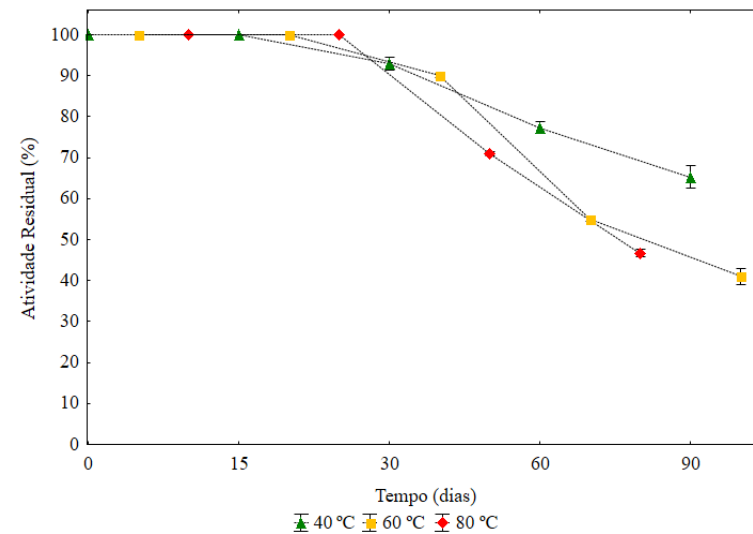
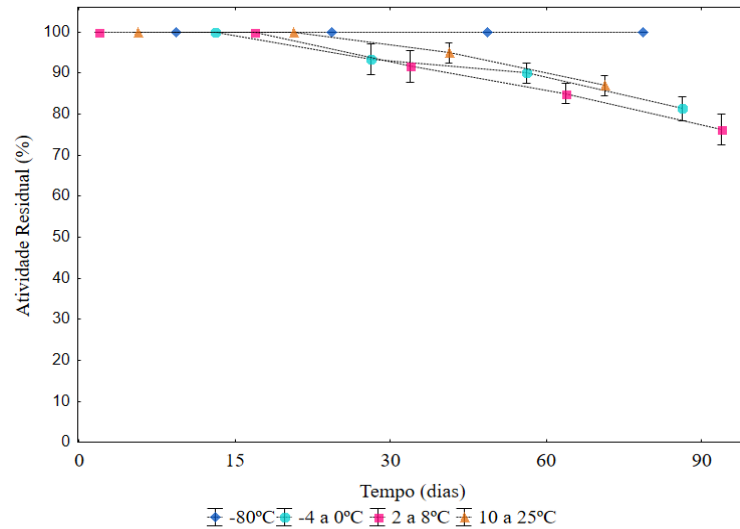
A Figura 4.11 apresenta a avaliação na estabilidade de estocagem a diferentes temperaturas (-80 a 80°C), para o catalisador imobilizado ativado em GLP (1) e CO₂ (2), onde podemos observar no decorrer de 90 dias de armazenamento para as temperaturas de 2 a -80°C atividade residual superior a 90 e 70% em relação inicial, respectivamente.

O aumento da temperatura de estocagem (40, 60 e 80°C), a atividade residual do catalisador imobilizado em 90 dias de estocagem, diminui 80 para 30% em relação a inicial empregando catalisador ativado em fluido pressurizado em CO₂ e GLP.

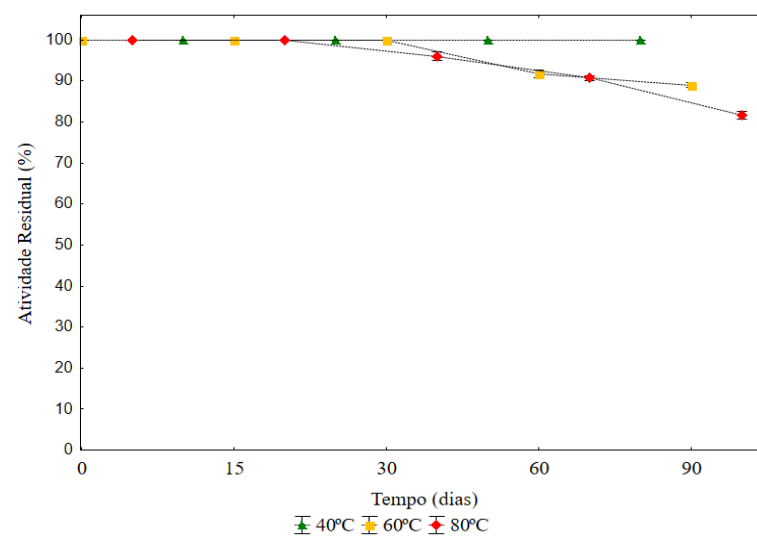
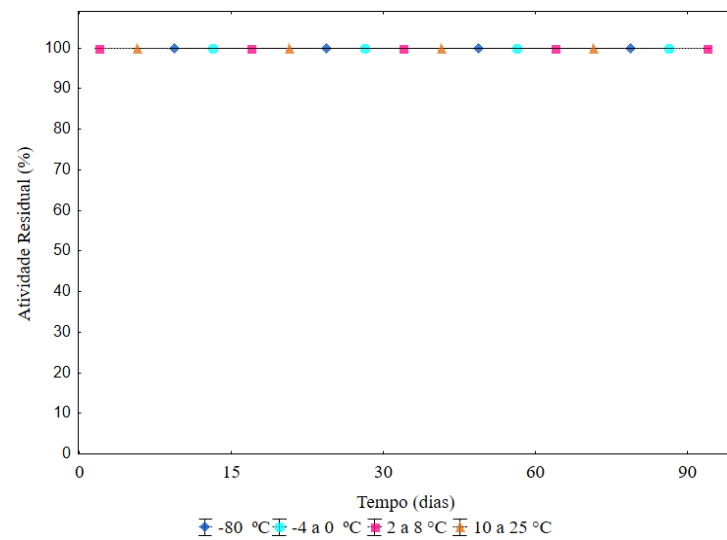
Esta menor atividade residual observada com catalisador ativado com GLP, em temperaturas mais altas, pode ser devido à característica do GLP em ser um gás de maior apolaridade em relação ao CO₂ (OLIVEIRA et al., 2006a,b), ou seja, possui maior afinidade/interação com o poliuretano, que é um composto de características apolares (FEIHRMANN, 2005; KHUN et al., 2010).

A perda de estabilidade de armazenamento em altas temperaturas do imobilizado ativado em fluidos supercríticos, sugere a perda de eficiência do suporte, no que se refere ao efeito protetor térmico que normalmente os suportes exercem em relação à enzima imobilizada (KUHN, 2013; SILVA, 2013a).

Figura 4.11 - Estabilidade de estocagem empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP e CO₂.



(1)



(2)

Cabe destacar que, em geral, a atividade enzimática do imobilizado em fluidos supercríticos se mantiveram com atividade residual de 100% nas 5 primeiras semanas de estocagem. Segundo Oliveira (2008), a variação da estabilidade de estocagem em diferentes temperaturas, pode ser devido ao tipo de catalisador empregado ou até mesmo das modificações ocasionadas na estrutura do suporte.

As diferentes variáveis empregadas nos estudos repostados pela literatura para o processo de avaliação da estabilidade de estocagem, como tipo de suporte, gêneros e espécies de micro-organismos produtores de lipases, temperatura, tipo de incubação e tempos de estocagem, diferem significativamente entre si, dificultando maiores comparações.

Esta tendência está coerente com os resultados observados para os estudos de rendimento de conversão, destacando o efeito promotor do processo de imobilização sobre a estabilidade de estocagem do catalisador imobilizado ativado em alta pressão em fluidos supercríticos de GLP e CO₂.

Pois o processo de imobilização da CALB em poliuretano trata – se de um método de confinamento (inclusão de matriz), onde a enzima é adicionada no momento do preparo do suporte, onde as moléculas de enzimas ficam aprisionadas entre as malhas do polímero, por ligações covalentes entre enzima e suporte, as quais favorecem muito a estabilidade da enzima, evitando assim a possibilidade de sua desnaturação e alterações indesejáveis, permitindo a permeabilidade do substrato entre a matriz do suporte e a saída do produto (GARCÍA-ARRAZOLA et al., 2009).

4.4.4.2 Estabilidade operacional

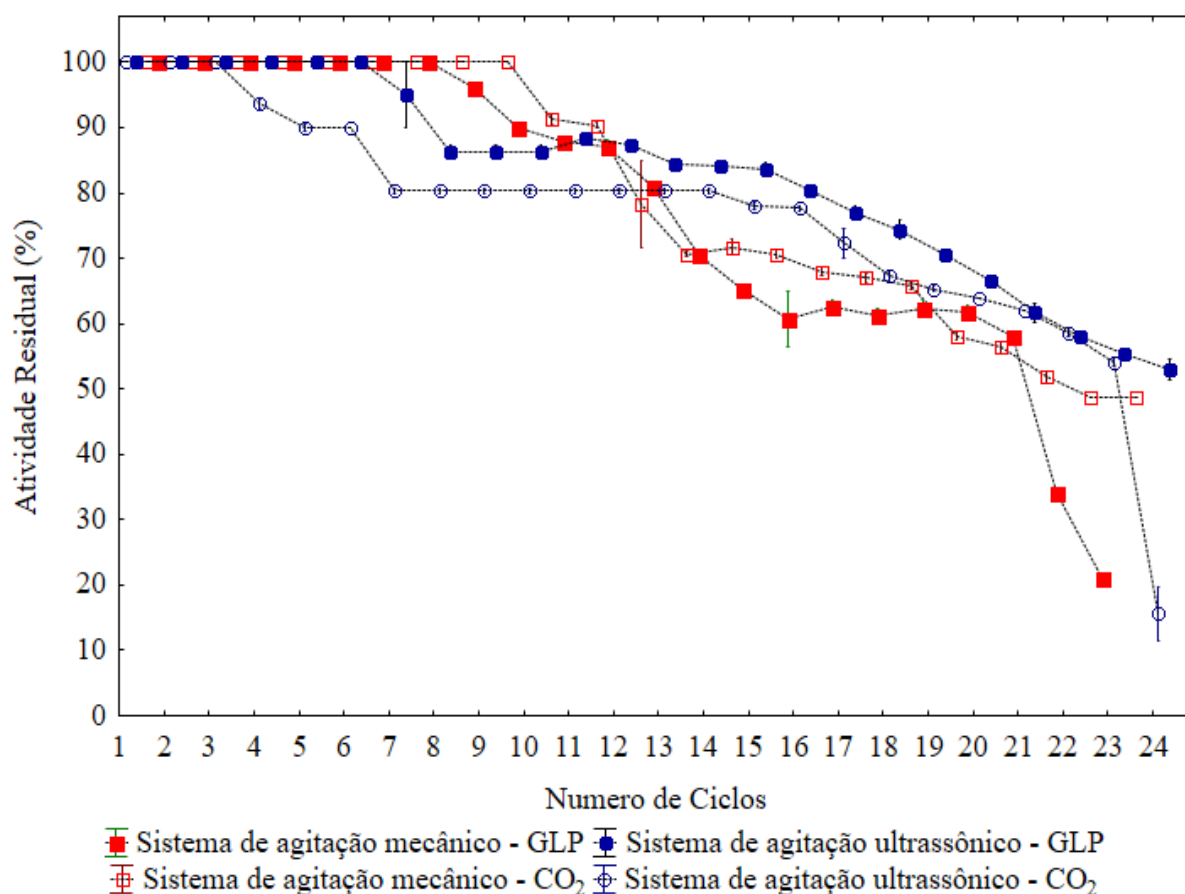
Um dos maiores interesses ao imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador que possa ser reutilizado no processo catalítico. Ao longo dos ciclos, é comum obter diminuição da atividade enzimática. Esta queda deve ser quantificada para determinar o número máximo de vezes que a enzima imobilizada pode ser utilizada, sem afetar significativamente a produtividade do processo (KEMPKA, 2012).

Os resultados obtidos, em termos de conversão residual, para ambos os catalisadores imobilizados ativados com GLP e CO₂ encontram-se apresentados na Figura 4.12. Podemos observar que para o catalisador ativado em GLP (40 bar, 30 minutos e 30 kg/m³.min) para o sistema de batelada de agitação ultrassônica (massa de catalisador imobilizado de 0,3 g, 50°C e 60% de potência ultrassônica) em 30 minutos de reacionais.

Para o catalisador ativado em CO₂ (120 bar, 60 minutos e 70 kg/m³.min) para o sistema de batelada: agitação mecânica (massa de catalisador imobilizado de 0,3 g e 50°C) em

40 minutos reacionais e agitação ultrassônica (massa de catalisador imobilizado de 0,5 g, 56°C e 40% de potência ultrassônica) em 30 minutos de reacionais, apresentaram 24 e 23 ciclos de reutilização com atividade residual superior a 50% em relação a inicial respectivamente.

Figura 4.12 - Estabilidade operacional empregando o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de GLP e CO₂ em sistema de agitação mecânica (40 minutos) e ultrassônica (30 minutos) para a síntese de oleato de etila.



*Onde: Para o catalisador ativado em GLP (40 bar, 30 minutos e 30 kg/m³.min) para o sistema de batelada: agitação mecânica (massa de catalisador imobilizado de 0,5 g e 40°C) em 40 minutos reacionais e agitação ultrassônica (massa de catalisador imobilizado de 0,3 g, 50°C e 60% de potência ultrassônica) em 30 minutos de reacionais e para o catalisador ativado em CO₂ (120 bar, 60 minutos e 70 kg/m³.min) para o sistema de batelada: agitação mecânica (massa de catalisador imobilizado de 0,3 g e 50°C) em 40 minutos reacionais e agitação ultrassônica (massa de catalisador imobilizado de 0,5 g, 56°C e 40% de potência ultrassônica) em 30 minutos de reacionais.

Geralmente a diminuição da atividade catalítica após sucessivos reusos se deve à liberação da enzima do suporte (lixiviação) bem como a inativação por desnaturação proteica (KEMPKA, 2012), como resultado de mudanças estruturais do suporte ou conformacionais da enzima causadas pelo dano mecânico do processo (WON et al., 2005), que no nosso caso é potencializado pela etapa de ativação em alta pressão a que são submetidos os imobilizados.

Cabe salientar, que a diferença observada entre as amostras do imobilizado ativadas em GLP apresentou um melhor estabilidade de reutilização em relação ao CO₂, este fato pode ser devido às interações entre o imobilizado e o fluido supercrítico, características do fluido, do conteúdo de água e das variáveis manipuladas no sistema (OLIVEIRA et al., 2006a).

Além de destacar o efeito promotor do processo de imobilização sobre a estabilidade operacional do catalisador imobilizado ativado em alta pressão em fluidos supercríticos de GLP e CO₂.

4.5 Considerações Parciais

A utilização de alta pressão vem ganhando destaque, principalmente na área biotecnológica com resultados promissores, podendo estes ser empregados no tratamento de enzimas, visando aumentar sua eficiência e atividade catalítica. Cabe ressaltar que nos processos utilizando fluidos supercríticos como antissolvente este fator é minimizado mediante a afinidade do solvente utilizado com o antissolvente, resultando em quantidades mínimas de solvente residual na amostra co-precipitada, além da possibilidade do controle do processo pelas variáveis empregadas.

A utilização de fluidos supercríticos aliada a métodos convencionais de imobilização vem se tornando uma alternativa promissora, nesse sentido, a ativação de enzimas imobilizadas com fluidos supercríticos, visa principalmente a aumentar a sua estabilidade atividade catalítica.

Nesse contexto a unidade experimental empregada em nosso estudo, mostrou-se eficiente e confiável, apresentando – se adequada, com boa reprodutibilidade dos resultados experimentais e facilidade de operação, além de respeitar os procedimentos de segurança e permitir o adequado acesso do efeito das variáveis de experimentais empregadas.

A ativação da CALB imobilizada em PU (catalisador imobilizado), proporcionou um aumento da atividade catalítica da enzima em alta pressão, empregando fluido supercríticos de Gás liquefeito de petróleo (GLP) e Dióxido de carbono (CO₂). A qual empregando catalisador não ativado passou de 789,0 U/g, para 1413 U/g empregando o fluido de GLP e de 2485,5 U/g em CO₂, apresentando um aumento de 100 e 300% na atividade enzimática. Mostrando assim a possibilidade e a viabilidade do processo, como uma alternativa na aplicação como catalisador em reações de esterificação.

Nesse sentido, tais informações permitiram avançar para o emprego desse catalisador ativado na síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânico e ultrassônico.

Para a realização da reação de síntese de éster de oleato de etila empregando o catalisador ativado em alta pressão, foi possível observar um aumento significativo na conversão do éster em dois mecanismos de agitação, em sistema de agitação mecânico e ultrassônico.

Em sistema de agitação mecânico e ultrassônico a conversão inferior < 65% empregando o catalisador não ativado passou para uma conversão superior > 67 e 73 %, com 21 e 24 ciclos contínuos de reutilização, respectivamente empregando o catalisador ativado em GLP. Para o catalisador ativado em CO₂ a conversão foi superior a > 69 e 77% com 24 e 23 ciclos contínuos de reutilização em 30 e 40 minutos reacionais, respectivamente.

O catalisador imobilizado ativado com GLP e CO₂ mantiveram atividade residual superior a 90 e 70% em relação inicial em 90 dias de armazenamento nas temperaturas de -80 a 25°C. Para as temperaturas de 40 a 80°C mantiveram 100% atividade residual em relação a inicial em 30 dias de estocagem.

Nesse sentido é possível observar uma boa perspectiva de utilização de fluidos de GLP e CO₂ supercríticos em reações enzimáticas de interesse e devido a uma carência encontrada na literatura no que se refere a esterificação enzimática em meio pressurizado em sistema de batelada mecânico e ultrassônico, bem como a influência das variáveis e maximização do processo, foram realizados neste estudo.

Como se pode observar a partir dos resultados aqui apresentados, a ativação de enzimas em fluidos supercríticos depende significativamente da enzima utilizada, bem como das condições experimentais aplicadas, ou seja, tempo de exposição, taxa de despressurização e pressão do sistema.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSÕES

Na revisão bibliográfica apresentada neste capítulo, pode-se observar que há um grande interesse na imobilização de lipase de *Candida antarctica* (CALB), devido ao seu amplo potencial de aplicação em reações de interesse industrial (alimentos, fármacos, cosméticos, química, combustível, detergentes, efluentes e de alimentos). Além disso, a procura por compostos com conotação ao “semelhante ao natural”, tem resultado num aumento de pesquisas referentes à bioprodução de ésteres.

O processo de imobilização da *Candida antarctica* B *in situ* em PU é uma metodologia simples e rápida, que proporciona bom rendimento (1400%), além de permitir estabilidade de estocagem frente a uma ampla faixa de temperatura por longos períodos de tempo (120 dias), demonstrando elevado potencial de aplicações industriais.

Neste sentido, os trabalhos que relatam a utilização destes sistemas para a bioprodução de ésteres, desta forma tornando-se uma estratégia de inovação para o presente estudo. Assim, justifica-se a importância da pesquisa sobre a bioprodução de ésteres em sistema de batelada (agitação mecânica e ultrassônica) e em fluxo contínuo com o uso de catalisador imobilizado (CALB em PU).

Em o sistema de batelada de agitação mecânica para a síntese de ésteres de acetato de isoamila, oleato de etila e butano de etila apresentaram conversões 94 % (razão molar ácido acético:álcool isoamílico 1:7, massa de catalisador 0,5 g e 64,1°C) e 28 ciclos ($\approx 60\%$ em relação a inicial) contínuos de reutilização em 360 minutos, 58 % (razão molar ácido oleico:álcool etílico 1:1, massa de catalisador 0,582 g e 50°C) e 28 ciclos ($\approx 50\%$ em relação a inicial) de reutilização em 40 minutos e 96 % (razão molar ácido butírico:álcool etílico 1:5, massa de catalisador 0,5 g e 64,1°C) e 16 ciclos ($\approx 41\%$ em relação a inicial) de reutilização em 180 minutos reacionais, respectivamente.

Para o sistema de batelada de agitação ultrassônica para a síntese de ésteres de acetato de isoamila, oleato de etila e butano de etila apresentaram conversões de 95% (razão molar ácido acético:álcool isoamílico 1:9, massa de catalisador 0,5 g, 65°C e potência ultrassônica 80%) e 13 ciclos ($\approx 50\%$ em relação a inicial) contínuos de reutilização em 60 minutos, 66 % (razão molar ácido oleico:álcool etílico 1:1, massa de catalisador de 0,3 g, 50°C e potência ultrassônica 93,3%) e 22 ciclos ($\approx 50\%$ em relação a inicial) de reutilização em 15 minutos e 95 % (razão molar 1:7 ácido butírico:álcool etílico, massa de catalisador de 0,5 g, 50°C e

potência ultrassônica 86%) 14 ciclos ($\approx 40\%$ em relação a inicial) de reutilização em 180 minutos reacionais, respectivamente.

Para o sistema de agitação em fluxo contínuo para a síntese de ésteres de acetato de isoamila e oleato de etila apresentaram conversões de 95 % (razão molar ácido acético:álcool isoamílico 1:7, massa de catalisador 0,34 g e 64,1°C) e 28 ciclos ($\approx 50\%$ em relação a inicial) contínuos de reutilização em 24,6 minutos e 75 % (razão molar ácido oleico:álcool etílico 1:1, 0,34 g massa de catalisador e 50°C) e 26 ciclos ($\approx 90\%$ em relação a inicial) contínuos de reutilização em 61,5 minutos reacionais.

Mostrando os efeitos positivos para a variável temperatura, razão molar ácido:álcool dos substratos e potência ultrassônica. No sistema de fluxo contínuo a conversão foi de 97% observando o melhor desempenho catalítico em 24,6 minutos reacionais com 28 ciclos contínuos de reutilização ($\approx 90\%$ em relação a inicial).

Para o catalisador ativado em alta pressão empregando os fluidos supercríticos de GLP e CO₂, apresentou um rendimento de atividade, passando de 789,0 U/g (sem ativação) para 1413 U/g (40 bar, 30 minutos e 30 kg/m³.min) e 2485,5 U/g (120 bar, 60 minutos e 70 kg/m³.min) para os fluidos de GLP e o CO₂, respectivamente. Mostrando os efeitos positivos para a variável pressão, tempo e taxa de despressurização na ativação de enzimas em alta pressão.

A avaliação na estabilidade de estocagem a diferentes temperaturas (-80 a 80°C) do catalisador imobilizado ativado em fluidos supercríticos foi realizada na condição maximizada para a ativação em GLP e CO₂, onde podemos observar no decorrer de 90 dias de armazenamento para as temperaturas de 2 a -80°C atividade residual superior a 90 e 70% em relação inicial, respectivamente.

Para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica empregando o catalisador ativado em fluidos supercríticos de GLP e o CO₂ com a maximização da conversão do ácido oleico foi de 58,8% para o catalisador sem ativação, de $\approx 67\%$ para o catalisador ativado com GLP (massa de catalisador imobilizado de 0,1 g e 60°C de temperatura) e 21 ciclos contínuos de reutilização e CO₂ (massa de catalisador imobilizado de 0,3 g e 50°C de temperatura) e 24 ciclos de reutilização em 40 minutos reacionais, respectivamente.

No sistema de agitação ultrassônica empregando o catalisador ativado em fluidos supercríticos de GLP e o CO₂ com a maximização da conversão do ácido oleico foi de

696,7% para o catalisador sem ativação, de $\approx 69\%$ (massa de catalisador imobilizado de 0,5 g, 65°C e 40% de potência ultrassônica) e 24 ciclos contínuos de reutilização e 77% (50°C, massa de catalisador de 0,3 g e potência ultrassônica de 93,6%) e 23 ciclos de reutilização em 30 minutos de reutilização.

Como se pode observar a partir dos resultados aqui apresentados, a ativação de enzimas em fluídos supercríticos depende significativamente da enzima utilizada, bem como das condições experimentais aplicadas, ou seja, tempo de exposição, taxa de despressurização e pressão do sistema.

Mostrando os efeitos positivos para a variável temperatura, massa de catalisador e potência ultrassônica para a síntese de ésteres.

Neste sentido, o presente estudo, visa contribuir de forma inovadora para a síntese de ésteres, justificando assim, a sua importância sobre a bioprodução em sistema de agitação em batelada (mecânica e ultrassônica) e em fluxo contínuo, empregando como catalisador imobilizado (CALB imobilizada em poliuretano PU).

Além de apresentam inúmeras aplicabilidades industriais, como aditivos com o objetivo de fornecer o odor de frutas, realçando o aroma e sabores característicos em diferentes produtos, como o éster de acetato de isoamila e butanoato de etila, como emulsificante, estabilizante, surfactantes, plastificantes, fluidos hidráulicos, emolientes, lubrificantes e biodiesel, empregado na indústria química, farmacêutica, alimentos, cosméticos e de biocombustíveis.

CAPÍTULO VI

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De forma a continuar os estudos empregando o a lipase de *Candida antarctica* B *in situ* em suporte rígido de poliuretano (PU) na síntese de ésteres em sistema livre de solvente, os seguintes temas são sugeridos para estudos futuros:

- Avaliar o processo de síntese de outros ésteres empregando o catalisador imobilizado em sistema livre de solvente;
- Avaliar a influência do sistema microondas na conversão em ésteres (%);
- Avaliar o processo de ativação em alta pressão do catalisador imobilizado, empregando outros fluidos supercríticos;
- Avaliar o processo de síntese de outros ésteres, empregando catalisador imobilizado ativado em alta pressão, empregando fluidos supercríticos de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) e de Dióxido de carbono (CO₂);
- Modelagem matemática dos dados experimentais obtidos.

CAPÍTULO VII

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAHÁZI E., LESTÁL D., BOROS Z. e POPPE L. **Tailoring the Spacer Arm for Covalent Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B - Thermal Stabilization by Bisepoxide-Activated Aminoalkyl Resins in Continuous-Flow Reactors.** *Molecules*, v. 21, n. 6, p. 767, 2016.
- ABBAS H. e COMEAU L. **Aroma Synthesis by Immobilized Lipase from *Mucor sp.*** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, n. 5, p. 589, 2003.
- ABOU-OKEIL A., EL-SHAFIE A. e EL ZAWAHR M. M. **Ecofriendly laccase–hydrogen peroxide/ultrasound-assisted bleaching of linen fabrics and its influence on dyeing efficiency.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 17, n. 2, p. 383, 2010.
- ADEWALE P., DUMONT M. J. e NGADI M. **Enzyme-catalyzed synthesis and kinetics of ultrasonic-assisted biodiesel production from waste tallow.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 27, n. 1, p. 1, 2015.
- ADEWALE P., DUMONT M. J. e NGADI M. **Enzyme-catalyzed synthesis and kinetics of ultrasonic assisted methanolysis of waste lard for biodiesel production.** *Chemical Engineering Journal*, v. 284, n. 1, p. 158, 2016.
- AFSHAR S., SADEHVAND M., AZAD A., DEKAMIN M. G., JALALI-HERAVI M., MOLLAHOSSEINI A. e TADJARODI A. **Optimization of catalytic activity of sulfated titania for efficient synthesis of isoamyl acetate by response surface methodology.** *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, v. 146, n. 12, p. 1949, 2015.
- AGUIEIRAS E. C., CAVALCANTI-OLIVEIRA E. D., DE CASTRO A. M., LANGONE M. A. e FREIRE D. M. **Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts.** *Fuel*, v. 135, n. 1, p. 315, 2014.
- AGUIEIRAS E. C., SOUZA S. L. e LANGONE M. A. **Study of immobilized lipase Lipozyme RM IM in esterification reactions for biodiesel synthesis.** *Química Nova*, v. 36, n. 5, p. 646, 2013.
- AIKATERINI T. A., IOANNIS P. V., MARCELLA F. P., PETRA R., DIMITRIO G. e HARALAMBOS S. **Lipase immobilization on smectite nanoclays. Characterization and application to the epoxidation of α -pinene.** *Bioresour. Technology*, v. 101, n. 1, p. 1587, 2010.
- AKBAY E. e AYTEK I. **Kinetics of esterification of salicylic acid with n-amyl alcohol in the presence of Lewatit MonoPlus S-100.** *Anadolu University Journal Of Science and Technology - A Applied Sciences and Engineering*, v. 17, n. 1, p. 25, 2016.
- ALTIOKKA B., BAYKUL M. C. e ALTIOKKA M. R. **Some physical effects of reaction rate on PbS thin films obtained by chemical bath deposition.** *Journal of Crystal Growth*, v. 384, n. 1, p. 50, 2013.
- ALVES J. S., GARCIA-GALAN C., DANELLI D., PALUDO N., BARBOSA O., RODRIGUES R. C e FERNANDEZ-LAFUENTE R. **Use of lecithase-ultra immobilized on styrenedivinylbenzene beads as catalyst of esterification reactions: effects of ultrasounds.** *Catalysis Today*, v. 255, n. 1, p. 27, 2015.

- ALVES J. S., GARCIA-GALAN C., SCHEIN M. F., SILVA A. M., BARBOSA O., AYUB M. A. e RODRIGUES R. C. **Combined effects of ultrasound and immobilization protocol on butyl acetate synthesis catalyzed by CALB.** *Molecules*, v. 19, n. 7, p. 9562, 2014.
- ANDRADE J. M. **Efeito de dióxido de carbono e propano pressurizados na atividade catalítica de D-Hidantoinase.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, UFRJ, RJ, Brasil, 2008.
- ANDUALEMA A. e GENESSESSE, A. **Microbial Lipases and their Industrial Applications: Review.** *Biotechnology*, v. 11, n. 3, p. 100, 2012.
- ANP - **Agência Nacional do Petróleo - Gás Natural e Biocombustíveis.** Portaria ANP Nº 297, de 18 de novembro de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, Brasil, 20 novembro 2003. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br>. Acesso em fevereiro de 2016.
- ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução RDC nº. 2 de 15 de janeiro de 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em outubro de 2016.
- ARAGÃO V. C., ANSCHAU A., PORCIUNCULA B. D. A., THIESEN C., KALIL S. J., BURKERT C. A. V. e BURKERT J. F. M. **Síntese enzimática de butirato de isoamila empregando lipases microbianas comerciais.** *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 2268, 2009.
- ARAGÃO V. C., PORTO M. R. A., BURKERT C. A. V., KALIL S. J. e BURKERT J. F. D. M. **Response surface methodology approach for the synthesis of ethyl butyrate.** *EQA - Artigos Publicados em Periódicos, FURG*, v. 342, RS, 2011.
- ARAGÃO V. C., PORTO M. R. A., BURKERT C. A. V., KALIL S. J. e BURKERT J. F. M. **Response surface methodology approach for the synthesis of ethyl butyrate.** *Food Technology and Biotechnology*, v. 49, n. 1, p. 103, 2010.
- ARRAY B, C. K. Л. Я. P. E. H. K. O., ARRAY B, M. E. Д. В. E. Д. E. B. A. E ARRAY B, Я. P. O. Ц. K. И. Ё. **Технологические Биокатализаторы На Основе Липазы *Candida antarctica* И Их Применение.** *Биотехнология*, v. 32, n. 3, p. 10, 2016.
- ARUMUGAM A. e PONNUSAMI V. **Biodiesel production from *Calophyllum inophyllum* oil using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within reticulated foams.** *Renewable Energy*, v. 64, n. 1, p. 276, 2014.
- ATHAWALE A. A., BHAGWAT S. V., KATRE P. P., CHANDWADKAR A. J. e KARANDIKAR P. **Aniline as a stabilizer for metal nanoparticles.** *Materials Letters*, v. 57, n. 24, p. 3889, 2003.
- ATKINS P. **Livros Princípios de Química**, Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente, 5ª Edição, Editora Loretta Jones, 2011.
- AWADALLAK J. A. **Uso de ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de palma: síntese de diacilglicerol.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Toledo, PR, Brasil, 2012.
- AZÓCAR L., NAVIA R., BEROIZ L., JEISON D. e CIUDAD G. **Enzymatic biodiesel production kinetics using co-solvent and an anhydrous medium: a strategy to improve lipase performance in a semi-continuous reactor.** *New Biotechnology*, v. 31, n. 5, p. 422, 2014.
- AZUDIN N. Y., DON M. M. e SHUKOR S. R. A. **Production and Kinetics of Isoamyl Acetate from Acetic Anhydride using *Candida antarctica* Lipase B in a Solvent-Free System.** *Journal of Food Quality*, v. 36, n. 6, p. 441, 2013.

- BABICZ I., LEITE S. G., DE SOUZA R. O. e ANTUNES O. A. C. **Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation.** *Ultrasonics sonochemistry*, v. 17, n. 1, p. 4, 2010.
- BADGUJAR K. C. e BHANAGE B. M. **Immobilization of lipase on biocompatible copolymer of polyvinyl alcohol and chitosan for synthesis of laurate compounds in supercritical carbon dioxide using response surface methodology.** *Process Biochemistry*, v. 50, n. 8, p. 1224, 2015.
- BALEN M., SILVEIRA C., KRATZ J. M., SIMÕES C. M., VALÉRIO A., NINOW J. L. e DE OLIVEIRA D. **Novozym® 435-catalyzed production of ascorbyl oleate in organic solvent ultrasound-assisted system.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2015.
- BAMUNUSINGHE D., NAGHASHFAR Z., BUCKLER-WHITE A., PLISHKA R., BALIJI S., LIU Q. e KOZAK C. A. **Sequence diversity, intersubgroup relationships, and origins of the mouse leukemia gammaretroviruses of laboratory and wild mice.** *Journal of Virology*, v. 90, n. 8, p. 4186, 2016.
- BANSODE S. R. e RATHOD V. K. **Ultrasound assisted lipase catalysed synthesis of isoamyl butyrate.** *Process Biochemistry*, v. 49, n. 8, p. 1297, 2014.
- BANSODE S. R., HARDIKAR M. A. e RATHOD V. K. **Evaluation of reaction parameters and kinetic modelling for Novozym 435 catalysed synthesis of isoamyl butyrate.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 1, n. 1, 2016.
- BARBOSA O., ORTIZ C., BERENGUER-MURCIA Á., TORRES R., RODRIGUES R. C. e FERNANDEZ-LAFUENTE R. **Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes a industrial biocatalysts.** *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 5, p. 435, 2015.
- BARZCA G., LEGEZA, Ö., MARTI, K. H. e REIHER, M. **Quantum-information analysis of electronic states of different molecular structures.** *Physical Review A*, v. 83, n. 1, p. 012508, 2011.
- BASSO A., HESSELER M. e SERBAN S. **Hydrophobic microenvironment optimization for efficient immobilization of lipases on octadecyl functionalised resins.** *Tetrahedron*, 2016.
- BATISTELLA L. A., LERIN P., BRUGNEROTTO A. J., DANIELLI C. M., TRENTIN A., POPIOLSKI H., TREICHEL J. V., OLIVEIRA D. e DE OLIVEIRA D. **Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 19, n. 1, p. 452, 2012.
- BATISTELLA L. **Produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em banho de ultrassom.** Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI - Erechim, Erechim, RS, Brasil, 2011.
- BATISTELLA L., USTRA M. K., RICHETTI A., PERGHER S. B., TREICHEL H., OLIVEIRA J. V. e DE OLIVEIRA, D. **Assessment of two immobilized lipases activity and stability to low temperatures in organic solvents under ultrasound-assisted irradiation.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35, n. 3, p. 351, 2012b.
- BECKMAN E. J. **Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing.** *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 28, n. 2, p. 121, 2004.
- BENCZE L. C., BARTHA-VÁRI J. H., KATONA G., TOÇA M. I., PAIZS C. e IRIMIE F. D. **Nanobioconjugates of *Candida antarctica* lipase B and single-walled carbon nanotubes in biodiesel production.** *Bioresource Technology*, v. 200, n. 1, p. 853, 2016.

- BEZBRADICA D., CROVIC M., J TANASKOVIC S., LUKOVIC N., CAREVIC M., MILIVOJEVIC A. e KNEZEVIC-JUGOVIC Z. **Enzymatic Syntheses of Ésters-Green Chemistry for Valuable Food, Fuel and Fine Chemicals**. Current Organic Chemistry, v. 21, n. 2, p. 104, 2017.
- BHANGU S. K., GUPTA S. E ASHOKKUMAR M. **Ultrasonic enhancement of lipase-catalysed transesterification for biodiesel synthesis**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 1, n. 1, 2016.
- BICAS J. L., SILVA J. C., DIONÍSIO A. P. e PASTORE G. M. **Biotechnological production of bioflavors and functional sugars**. Food Science and Technology, Campinas, v. 30, n. 1, p. 07, 2010.
- BÔAS R. D. N. V. **Avaliação da atividade de antioxidantes naturais na síntese de monoglicerídeos via glicerólise do óleo de babaçu durante o curso de reações descontínuas e contínuas**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, USP, SP, Brasil, 2014.
- BOLDY REV V. V. **Mechanochemistry and sonochemistry**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 2, p. 143, 1995.
- BOROS Z., FALUS P., MÁRKUS M., WEISER D., OLÁH M., HORNYÁNSZKY G. e POPPE L. **How the mode of *Candida antarctica* lipase B immobilization affects the continuous-flow kinetic resolution of racemic amines at various temperatures**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 85, n. 1, p. 119, 2013.
- BOUAID A., MARTINEZ M. e ARACIL J. **A comparative study of the production of ethyl ésters from vegetable oils as a biodiesel fuel optimization by factorial design**. Chemical Engineering Journal, v. 134, n. 1, p. 93, 2007.
- BOUAZIZA A., HORCHANI H., SALEM N. B., GARGOURI Y. e SAYARI A. **Expression, purification of a novel alkaline *Staphylococcus xylosus* lipase acting at high temperature**. Biochemical Engineering Journal, v.54, n. 2, p. 93, 2011.
- BRADFORD M. M. **Anal. Biochemistry**. v.72, n. 1, p. 248, 1976.
- BRAGA E. C. **DE Obtenção e Caracterização da Enzima β -Galactosidase Submetida a Diferentes Processos: Purificação, Imobilização e Altas Pressões**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande, UFRG, Rio Grande, RS, Brasil, 2012.
- BRASK J. e NIELSEN P. M. U.S. Patent nº 9,340, 752, 2016.
- BRÍGIDA A. I. S., CALADO V. M. A., GONÇALVES L. R. B. e COELHO M. A. Z. **Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber**. Carbohydrate Polymers, v. 79, n. 4, p. 832, 2010.
- BRÍGIDA A. I. S., PINHEIRO A.D.T., FERREIRA A. L. O. e GONÇALVES L. R. B. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 146, n. 1, p. 173, 2008.
- BRUSAMARELO C. Z., ROSSET E., DE CESARO A., TREICHEL H., DE OLIVEIRA D., MAZUTTI M. A. e OLIVEIRA J. V. **Lipase-catalyzed synthesis of soybean fatty acid ethyl ésters in pressurized propane**. Kinetics of Journal of Biotechnology, v. 147, n. 2, p. 108, 2010.
- BULE M. J. G. M. **Produção de biodiesel por catálise enzimática em sistemas descontínuo e contínuo a partir de óleo de cardo**. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, 2014.

- BUSTAMANTE-VARGAS C. E., DE OLIVEIRA D., NYARI, N. L., VALDUGA E., SOARES M. B. A., BACKES G. T. e DALLAGO R. M. **In situ immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 122, n. 1, p. 35, 2015.
- CADENA P. G., JERONIMO R. A. S., MELO J. M., SILVA R. A., LIMA FILHO J. L. e PIMENTEL M. C. B. **Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron.** Bioresource Technology, v. 101, n. 1, p.1595, 2010.
- CAMBON E., BOURLIEU C., SALUM T., PIOMBO G., DUBREUCQ E., VILLENEUVE **Ability of Vasconcellea x heilbornii lipase to catalyse the synthesis of alkyl esters from vegetable oils.** Process Biochemistry, Elsevier, v. 44, n. 11, p. 1265, 2009.
- CARVALHO N. B., LIMA Á. S. e SOARES C. M. **Use of modified silicas for lipase immobilization.** Química Nova, v. 38, n. 3, p. 399, 2015.
- CASTILHO L. R., POLATO C. M., BARUQUE E. A., SANT'ANNA G. L. e FREIRE D. M. **Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations.** Biochemical Engineering Journal, v. 4, n. 3, p. 239, 2000.
- CASTRO H. F., MENDES A. A., SANTOS J. C. e AGUIAR C. L. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** Química Nova, v. 27, n. 1, p. 146, 2004.
- CAZABAN D., WILSON L. e BETANCOR L. **Lipase Immobilization on Siliceous Supports: Application to Synthetic Reactions.** Current Organic Chemistry, v. 21, n. 2, p. 96, 2017.
- CENI G., DA SILVA P. C., LERIN L., CHARIN R. M., OLIVEIRA J. V., TONIAZZO G., TREICHEL H., OESTREICHER E. G. E. e DE OLIVEIRA D. **Enzyme-catalyzed production of 1-glyceryl benzoate in compressed n-butane.** Enzyme and Microbial Technology, v. 46, n. 6, p. 513, 2010.
- CERVERO J. M., ALVAREZ J. R. e LUQUE S. **Novozym 435-catalyzed synthesis of fatty acid ethyl ésters from soybean oil for biodiesel production.** Biomass and Bioenergy, v. 61, n.1, p. 131, 2014.
- CHAABOUNI F., ABAAB M. e REZIG B. **Characterization of n-ZnO/p-Si films grown by magnetron sputtering.** Superlattices and Microstructures, v. 39, n. 1, p. 171, 2006.
- CHANG S. W., SHAWA J. F., YANG C. K. e SHIEH C. **Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor.** Process Biochemistry, v. 42, n. 1, p. 1362, 2007.
- CHÁVEZ G., HATTI-KAUL R., SHELDON R. A. e MAMO G. **Baeyer-Villiger oxidation with peracid generated in situ by CaLB-CLEA catalyzed perhydrolysis.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 89, n.1, p. 67, 2013.
- CHEN F., ZHANG F., DU F., WANG A., GAO W., WANG Q., YIN X. e XIE T. **A novel and efficient method for the immobilization of thermolysin using sodium chloride salting-in and consecutive microwave irradiation.** Bioresource Technology, v. 115, n. 1, p. 158, 2012.
- CHEN P. C., HUANG X. J. e XU Z. K. **Utilization of a biphasic oil/aqueous cellulose nanofiber membrane bioreactor with immobilized lipase for continuous hydrolysis of olive oil.** Cellulose, v. 21, n. 1, p. 407, 2014.

- CHEN X. Y., CHEN G. J., WANG J. L., WU Q. e LIN X. F. **Lipase/Acetamide-Catalyzed Carbon-Carbon Bond Formations: A Mechanistic View.** *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 355, n. 5, p. 864, 2013.
- CHIARADIA V., PAROUL N., CANSIAN R. L., JÚNIOR C. V., DETOFOL M. R., LERIN L. A., OLIVEIRA J. V. e OLIVEIRA D. **Synthesis of eugenol ésters by lipase-catalyzed reaction in solvent-free system.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 168, n. 4, p. 742, 2012
- CHIARADIA V., VALÉRIO A., DE OLIVEIRA D., ARAÚJO P. H. e SAYER C. **Simultaneous single-step immobilization of *Candida antarctica* lipase b and incorporation of magnetic nanoparticles on Poly (Urea-Urethane) nanoparticles by interfacial miniemulsion polymerization.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 1, n. 1, 2016.
- CHITNIS S. R. e SHARMA M. M. **Industrial applications of acid-treated clays as catalysts.** *Reactive and Functional Polymers*, v. 32, n. 1, p. 93, 1997.
- CHOUDHURY H. A., MALANI R. S. e MOHOLKAR V. S. **Acid catalyzed biodiesel synthesis from *Jatropha* oil: mechanistic aspects of ultrasonic intensification.** *Chemical Engineering Journal*, v. 231, n. 1, p. 262, 2013.
- CIPOLATTI E. P., VALÉRIO A., NICOLETTI G., THEILACKER E., ARAÚJO P. H., SAYER C. e DE OLIVEIRA D. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on PEGylated poly (urea-urethane) nanoparticles by step miniemulsion polymerization.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 109, n. 1, p. 116, 2014.
- CLIFFORD H. T. e BOSTOCK P. D. **Introduction Springer.** Berlin Heidelberg, p. 1, 2007.
- COLOMBO L. T. **Construção de linhagens de *Kluyveromyces lactis* Aku80 hospedeiras para produção de proteínas recombinantes: Análise da expressão da fusão estreptavidina-pectina liase.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, Minas Gerais, MG, Brasil, 2011.
- ĆOROVIĆ M., MIHAILOVIĆ M., BANJANAC K., CAREVIĆ M., MILIVOJEVIĆ A., MILOSAVIĆ N. e BEZBRADICA D. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto Purolite® MN 102 and its application in solvent-free and organic media esterification.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 40, n. 1, p. 23, 2017.
- CORREA M. D. S. **Extração de inflorescência da bananeira (*Musa paradisíaca* L.) utilizando CO₂ supercrítico e propano comprimido.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, UFPR, PR, Brasil, 2016.
- COSTA I. C. R. **Novas estratégias para a síntese enzimática de ésteres do ácido ascórbico.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2014.
- COWIE R., WILLIAMS G., MAAS E., VOYLES K. e RYAN K. **Antarctic sea-ice microbial communities show distinct patterns of zonation in response to algal-derived substrates.** *Aquatic Microbial Ecology*, v. 73, n. 2, p. 123, 2014.
- CUNHA A. G., BESTETI M. D., MANOEL E. A., DA SILVA A. A., ALMEIDA R. V., SIMAS A. B. e FREIRE D. M. **Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica*: effect of the support nature on catalytic properties.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 100, n.1, p. 59, 2014.

- CVJETKO M., VORKAPIĆ-FURAČ J. e ŽNIDARŠIČ-PLAZL P. **Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor.** Process Biochemistry, v. 47, n. 9, p. 1344, 2012.
- DALLA VECCHIA R., NASCIMENTO M. G. e SOLDI V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros.** Química Nova, v. 27, n. 1, p. 623, 2004.
- DALLA ROSA C. **Produção enzimática de biodiesel em modo contínuo em meio pressurizado.** Tese de Doutorado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI - Erechim, Erechim, RS, Brasil, 2009.
- DAMNJANOVIĆ J. J., ŽUŽA M. G., SAVANOVIĆ J. K., BEZBRADICA D. I., MIJIN D. Ž., BOŠKOVIĆ-VRAGOLOVIĆ N. e KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ Z. D. **Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 75, n. 1, p. 50, 2012.
- DANDAVATE V., KEHARIA H. e MADAMWAR D. **Ethyl isovalerate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilized on silica nanoparticles prepared in nonionic reverse micelles.** Process Biochemistry, v. 44, n. 3, p. 349, 2013.
- DE MARÍA P. D., CARBONI-OERLEMANS C., TUIN B., BARGEMAN G. e VAN GEMERT R. **Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: state-of-the-art.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 37, n. 1, p. 36, 2005.
- DE SILVA E. C. L., GUNASEKERA M. Y. e BAMUNUSINGHA B. A. N. N. **Performance of ion exchange resin as solid catalyst for the esterification of acetic acid with ethanol.** Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, v. 44, n. 1, 2016.
- DE SOUSA J. S., CAVALCANTI-OLIVEIRA E. D. A., ARANDA D. A. G. e FREIRE D. M. G. **Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production.** Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, v. 65, n. 1, p. 133, 2010.
- DE SOUZA R. R., FERREIRA R. e AMBIENT L. B. **Imobilização de lipase de *Candida rugosa* em suporte hidrofóbico mesoporoso (MCM 41) para produção de biodiesel.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 2, p. 648, 2015.
- DENG L., TAN T., WANG F. e XU X. **Enzymatic production of fatty acid alkyl ésters with a lipase preparation from *Candida* sp. 99-125.** European Journal of Lipid Science and Technology, v. 105, n. 12, p. 727, 2003.
- DESHMUKH A. W., VARMA M. N., YOO C. K. e WASEWAR K. L. **Effect of Ethyl Oleate Pretreatment on Drying of Ginger: Characteristics and Mathematical Modelling.** Journal of Chemistry, v. 2013, n. 1, p. 1, 2013.
- DHAKE K. P., DESHMUKH K. M., WAGH Y. S., SINGHAL R. S. e BHANAGE B. M. **Investigation of steapsin lipase for kinetic resolution of secondary alcohols and synthesis of valuable acetates in non-aqueous reaction medium.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 77, n. 1, p. 15, 2012.
- DHAKE K. P., THAKARE D. D. e BHANAGE B. M. **Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance éster compounds.** Flavour and Fragrance Journal, v. 28, n. 2, p. 71, 2013.
- DHEEMAN D. S., HENEHAN G. e FRÍAS J. M. **Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour éster synthesis.** Bioresource Technology, v. 102, n. 3, p. 3373, 2011.

- DIA R. M., BELAQZIZ R., ROMANE A., ANTONIOTTI S. e DUÑACH E. **Flavouring and odorant thiols from renewable natural resources by In III-catalysed hydrothioacetylation and lipase-catalysed solvolysis.** Tetrahedron Letters, v. 51, n. 16, p. 2164, 2010.
- DIAS G. S. **Aumento de escala da produção de ésteres etílicos em reatores de leito fixo com sólido fermentado por *Burkholderia* lata CPQBA 515-12 DRM 01.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, PR, Brasil, 2015.
- DOS SANTOS P., REZENDE C. e MARTÍNEZ J. **Activity of immobilized lipase from *Candida antarctica* (Lipozyme 435) and its performance on the esterification of oleic acid in supercritical carbon dioxide.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 107, p. 170, 2016.
- DOS SANTOS V. C., WILSON K., LEE, A. F. e NAKAGAKI S. **Physicochemical properties of WO_x/ZrO₂ catalysts for palmitic acid esterification.** Applied Catalysis B: Environmental, v. 162, n. 1, p. 75, 2015.
- DOYMAZ I. **Convective drying kinetics of strawberry.** Chemical Engineering and Processing, v. 47, n. 5, p. 914, 2008.
- E SILVA W. C., TEIXEIRA L. F., CARVALHO A. K., MENDES A. A. e DE CASTRO H. F. **Influence of feedstock source on the biocatalyst stability and reactor performance in continuous biodiesel production.** Journal of Industrial and Engineering Chemistry, v. 20, n. 3, p. 881, 2014.
- EISENMENGER M. J. e REYES-DE-CORCUERA J. I. **Enhanced synthesis of isoamyl acetate using an ionic liquid–alcohol biphasic system at high hydrostatic pressure.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 67, n. 1, p. 36, 2010.
- ENGEL S., HÖCK H., BOCOLA M., KEUL H., SCHWANEBERG U. e MÖLLER M. **CaLB Catalyzed Conversion of ϵ -Caprolactone in Aqueous Medium.** Part 1: Immobilization of CaLB to Microgels. Polymers, v. 8, n. 10, p. 372, 2016.
- FALLAVENA L. P., ANTUNES F. H., ALVES J. S., PALUDO N., AYUB M. A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. e RODRIGUES R. C. **Ultrasound technology and molecular sieves improve the thermodynamically controlled esterification of butyric acid mediated by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*.** An international journal to further the chemical sciences, v. 4, n. 17, p. 8675, 2014.
- FARIA E. L. P. D. **Síntese enzimática de monoésteres de etila catalisada por células íntegras imobilizadas com elevada atividade lipolítica em reator de leito fixo operando em fluxo contínuo.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, 2014.
- FEHÉR E., ILLEOVÁ V., KELEMEN-HORVÁTH I., BÉLAFI-BAKÓ K., POLAKOVIČ M. e GUBICZA L. **Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid–alcohol biphasic system.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 50, n. 1, p. 28, 2008.
- FEIHRMANN A. C. **Avaliação da atividade enzimática de lipases imobilizados em fluidos pressurizados.** Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI - Erechim, Erechim, RS, Brasil, 2005.
- FEITEN M. C., DALLA ROSA C., TREICHEL H., FURIGO A., ZENEVICZ M. C., DE OLIVEIRA D. e OLIVEIRA J. V. **Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of soybean oil under ultrasound irradiation.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 3, n. 3, p. 83, 2014.

- FERNANDES I. A. **Estudo da imobilização de lipases utilizando Poli-Hidroxibutirato-Co-Hidroxivalerato (PHBV) e Poliuretano (PU) como suportes.** Tese de Doutorado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI – Erechim, Erechim, RS, Brasil, 2013.
- FERNANDES I. A., NYARI N. L., OLIVEIRA J. V. D., RIGO E., SOUZA M. C. M. D., GONÇALVES L. R., OLIVEIRA J. W. e OLIVEIRA, D. D. **Nanoparticles of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) as support for the immobilization of *Candida antarctica* lipase (fraction B).** Química Nova, v. 37, n. 2, p. 331, 2014.
- FERNANDES M. L. M., SAAD, E. B., MEIRA, J. A., RAMOS, L. P., MITCHELL, D. A. e KRIEGER, N. **Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 44, n. 1, p. 8, 2007.
- FERRAZ L. I. R. **Aplicação de lipases na catálise de reações de Interesse.** Tese de Doutorado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI - Erechim, Erechim, RS, Brasil, 2014.
- FERREIRA-DIAS S., CORREIA A. C. e BAPTISTA F. O. **Activity and batch operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in different hydrophilic polyurethane foams during hydrolysis in a biphasic medium.** Bioprocess Engineering, v. 21, n. 6, p. 517, 1999.
- FIDALGO W. R. R., TEIXEIRA L. F., SANTOS J. C. e DE CASTRO H. F. **Estabelecimento das condições operacionais para a síntese de biodiesel catalisada por Novozym® 435 em reator de leito fluidizado.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 2, p. 2173, 2014.
- FILICE M., C ARAGON C., MATEO C. M. e PALOMO J. **Enzymatic Transformations in Food Chemistry.** Current Organic Chemistry, v. 21, n. 2, p. 139, 2017.
- FIORIO R. **Síntese e caracterização de poliuretano termoplástico contendo POSS via extrusão reativa.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2011.
- FORDE J., VAKUROV A., GIBSON T. D., MILLNER P., WHELEHAN M., MARISON I. W. e Ó'FÁGÁIN C. **Chemical modification and immobilisation of lipase B from *Candida antarctica* onto mesoporous silicates.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 66, n. 1, p. 203, 2010.
- FRAMPTON M. B. e ZELISKO P. M. **Chain length selectivity during the polycondensation of siloxane-containing ésters and alcohols by immobilized *Candida antarctica* lipase B.** Enzyme and Microbial Technology, v. 58, n. 1, p. 87, 2014.
- FRANKEN L. P. G. **Avaliação da atividade hidrolítica de lipases em propano pressurizado.** Dissertação de Mestrado da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI - Erechim, Erechim, RS, Brasil, 2007.
- FRANKEN L. P. G., MARCON N. S., TREICHEL H., OLIVEIRA D., FREIRE D. M. G., DARIVA C., DESTAIN J. e OLIVEIRA J. V. **Effect of Treatment with Compressed Propane on Lipases Hydrolytic Activity.** Food and Bioprocess Technology, v. 3, n 1, p. 511, 2010.
- FRIEDRICH J. L., PEÑA F. P., GARCIA-GALAN C., FERNANDEZ-LAFUENTE R., AYUB M. A. e RODRIGUES R. C. **Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 88, n. 6, p. 1089, 2013.

- GAIO I. **Avaliação da atividade e estabilidade de pectinases comerciais imobilizadas e submetidas ao tratamento com gás liquefeito de petróleo.** Tese de Doutorado de Engenharia. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 2016.
- GAMAYUROVA V. S., SHNAIDER K. L., ZARIPOVA S. K. e JAMAI M. J. **Enzymatic Synthesis of Fatty Ésters by Lipase from Porcine Pancreas.** Journal Thermodyn Catalysis, v. 7, n. 161, p. 2, 2016.
- GANJALIKHANY M. R., RANJBAR B. e BAGHERI Z. **Molecular dynamics simulation study of lipase B from *Candida antarctica*.** In First International Conference on Biophysical Chemistry, v. 1, n. 1, 2012.
- GARCÍA-ARRAZOLA R., LÓPEZ-GUERRERO D. A., GIMENO M. e BÁRZANA E. **Lipase-catalyzed synthesis of poly-L-lactide using supercritical carbon dioxide.** Journal of Supercritical Fluids, v. 51, n. 2, p. 197, 2009.
- GARCIA-GALAN C., BERENGUER-MURCIA Á., FERNANDEZ-LAFUENTE R. e RODRIGUES R. C. **Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance.** Advanced Synthesis and Catalysis, v. 353, n. 16, p. 2885, 2011.
- GAVA A. J., SILVA C. A. B. e FRIAS J. R. G. **Tecnologia de Alimentos.** Editora NBL, 2009.
- GHAMGUI H., KARRA-CHAÂBOUNI M., BEZZINE S., MILED N. e GARGOURI Y. **Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system.** Enzyme and Microbial Technology, v. 38, n. 6, p. 788, 2006.
- GHAMGUI H., MILED N., KARRA-CHAÂBOUNI M. e GARGOURI Y. **Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: a comparative study.** Biochemical Engineering Journal, v. 37, n. 1, p. 34, 2007.
- GLASNOV T. N. e KAPPE C. O. **The Microwave-to-Flow Paradigm: Translating High-Temperature Batch Microwave Chemistry to Scalable Continuous-Flow Processes.** Chemistry – A European Journal, v. 17, n. 43, p. 11956, 2011.
- GOMES F. M., PEREIRA E. B. e DE CASTRO H. F. **Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis.** Biomacromolecules, v. 5, n. 1, p. 17, 2004.
- GOMES H. E. **Estudos visando a utilização de condições de fluxo contínuo no rearranjo de Claisen de adutos de Morita-Baylis-Hillman.** Monografia, Universidade de Brasília, UnB, Brasil, 2016.
- GOTOR-FERNÁNDEZ V. e VICENTE G. **Use of lipases in organic synthesis.** In Industrial enzymes Springer Netherlands, p. 301, 2007.
- GRAEBIN N. G., MARTINS A. B., LORENZONI A. S., GARCIA-GALAN C., FERNANDEZ-LAFUENTE R., AYUB M. A. e RODRIGUES R. C. **Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene–divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis.** Biotechnology Progress, v. 28, n. 2, p. 406, 2012.
- GRANJEIRO A. A., QUEIROZ A. J. M., FIGUEIRÊDO R. M. F. e MATA M. E. R. M. C. **Viscosidades de polpas concentradas de figo-da-Índia.** Revista Brasileira de Agrociência, p. 6, Pelotas, 2007.
- GROSSO C., FERREIRA-DIAS S. e PIRES-CABRAL P. **Modelling and optimization of ethyl butyrate production catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase.** Journal Food Engennering, v. 115, n. 1, p. 475, 2013.
- GROVER N., PLAKS J. G., SUMMERS S. R., CHADO G. R., SCHURR M. J. e KAAR J. L. **Acylase-containing polyurethane coatings with anti-biofilm activity.** Biotechnology and Bioengineering, 2016.

- GUAJARDO N., BERNAL C., WILSON L. e CABRERA Z. **Selectivity of R- α -monobenzoate glycerol synthesis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B immobilized on heterofunctional supports.** Process Biochemistry, v. 50, n. 11, p. 1870, 2015.
- GUILLÉN M., BENAIGES M. D. e VALERO F. **Biosynthesis of ethyl butyrate by immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase expressed in *Pichia pastoris*.** Biochemical Engineering Journal, v. 65, n. 1, p. 1, 2012.
- GUMEL A. M. e ANNUAR M. S. M. ***Thermomyces lanuginosus* lipase-catalyzed synthesis of natural flavor ésters in a continuous flow microreactor.** Biotechnology, v. 6, n. 1, p. 1, 2016.
- GUMEL A. M., ANNUAR M. S. M., CHISTI Y. e HEIDELBERG T. **Ultrasound assisted lipase catalyzed synthesis of poly-6-hydroxyhexanoate.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 19, n. 3, p. 659, 2012.
- GUMEL A. M., ANNUAR M. S. M., HEIDELBERG T. e CHISTI Y. **Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid ésters.** Process Biochemistry, v. 46, n. 11, p. 2079, 2011.
- GUNCHEVA M., TASHEV E., ZHIRYAKOVA D., TOSHEVA T. e TZOKOVA N. **Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: Application in wax éster synthesis.** Process Biochemistry, v. 46, n. 4, p. 923, 2011.
- GUO Z. e XU X. **Lipase-catalyzed glycerolysis of fats and oils in ionic liquids: a further study on the reaction system.** Green Chemistry, v. 8, n. 1, p. 54, 2006.
- GÜVENÇ A., KAPUCU N. e MEHMETOĞLU Ü. **The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system.** Process Biochemistry, v. 38, n. 3, p. 379, 2002.
- GÜVENÇ A., KAPUCU N., KAPUCU H., AYDOĞAN Ö. e MEHMETOĞLU Ü. **Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: Optimization by response surface methodology.** Enzyme and Microbial Technology, v. 1, n. 440, p. 778, 2007.
- HALL R. L. e MERWIN E. J. **The role of flavors in food processing.** Food Technology, 1981.
- HARI KRISHNA S. e KARANTH N. G. **Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media.** Catalysis Reviews, v. 44, n. 4, v. 499, 2002.
- HARTMAN R. L., MCMULLEN J. P. e JENSEN, K. F. **Deciding whether to go with the flow: evaluating the merits of flow reactors for synthesis.** Angewandte Chemie International Edition, v. 50, n. 33, p. 7502, 2011.
- HASAN F., SHAH A. e HAMEED A. **Industrial applications of microbial lipase.** Enzyme and Microbial Technology. Elsevier, v. 39, n. 2, p. 235, 2006.
- HAZARIKA S., GOSWAMI P., DUTTA N. N. e HAZARIKA A. K. **Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents.** Chemical Engineering Journal, v. 85, n. 1, p. 61, 2002.
- HE Y., LI J., KODALI S., CHEN B. e GUO Z. **Rationale behind the near-ideal catalysis of *Candida antarctica* lipase A (CAL-A) for highly concentrating ω -3 polyunsaturated fatty acids into monoacylglycerols.** Food Chemistry, v. 219, n. 1, p. 230, 2017.
- HERNANDEZ K. e FERNANDEZ-LAFUENTE R. **Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance.** Enzyme Microbiology Technology, v. 48, n. 1, p. 107, 2011.

- HERNÁNDEZ-MARTÍN E. e OTERO C. **Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM.** *Bioresource Technology*, v. 99, n. 2, p. 277, 2008.
- HIRATA D. B., ALBUQUERQUE T. L., RUEDA N., VIRGEN-ORTÍZ J. J., TACIAS-PASCACIO V. G. e FERNANDEZ-LAFUENTE R. **Evaluation of different immobilized lipases in transesterification reactions using tributyrin: Advantages of the heterofunctional octyl agarose beads.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 133, n. 1, p. 117, 2016.
- HO W. W. S., NG H. K. e GAN S. **Advances in ultrasound-assisted transesterification for biodiesel production.** *Applied Thermal Engineering*, v. 100, n. 1, p. 553, 2016.
- HORCHANI H., SALEM N. B., ZARAI Z., SAYARI A., GARGOURI Y. e CHAÂBOUNI M. **Enzymatic synthesis of eugenol benzoate by immobilized *Staphylococcus aureus* lipase: optimization using response surface methodology and determination of antioxidant activity.** *Bioresource Technology*, v. 101, n. 68, p. 2809, 2010.
- HOSHINO K., SUGIYAMA T., MATSUMOTO M., TANAKA T., SAITO M., HEMMI H. e KAISHO T. **I κ B kinase- α is critical for interferon- α production induced by Toll-like receptors 7 and 9.** *Nature*, v. 440, n. 7086, p. 949, 2006.
- HUANG G., CHEN S., DAI C., SUN L., SUN W., TANG Y. MA H. e XIONG E. **Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 37, n. 1, p. 144, 2017.
- IDRIS A. e BUKHARI A. **Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyéster synthesis.** *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 1, p. 550, 2012.
- INOUE A., ARIMA N., ISHIGURO J., PRESTWICH G. D., ARAI H. e AOKI J. **LPA-producing enzyme PA-PLA1 α regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling.** *The EMBO Journal*, v. 30, n. 20, p. 4248, 2011.
- IOFI - Código de Boas Práticas da International. Organization of the Flavor Industry, Disponível em www.abifra.org.br, 2010. Acesso em dezembro de 2016.
- ITABAIANA JUNIOR I., MIRANDA L. S. D. M. e DE SOUZA R. O. M. A. **Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 85, n. 1, p. 1, 2013.
- ITABAIANA JUNIOR, I., GONÇALVES K. M., ZOUMPANIOTI M., LEAL I. C., MIRANDA L. S. E., XENAKIS A. e DE SOUZA R. O. **Microemulsion-Based Organogels as an Efficient Support for Lipase-Catalyzed Reactions under Continuous-Flow Conditions.** *Organic Process Research and Development*, v. 18, n. 11, p. 1372, 2014.
- ITSEKSON A. M., SEIDMAN D. S., ZOLTI M., ALESKER M. e CARP H. J. **Steroid hormone hypersensitivity: clinical presentation and management.** *Fertility and sterility*, v. 95, n. 8, p. 2571, 2011.
- JAGADEESH D., KUMAR P. R. e MURTHY K. M. **The Effect of Supercharging on Performance and Emission Characteristics of Compression Ignition Engine with Diesel-Ethanol-Ester Blends.** *Thermal science*, v. 15, n. 4, p. 1165, 2011.
- JAGADISH C. e PEARTON S. J. **Zinc oxide bulk, thin films and nanostructures: processing, properties, and applications.** Elsevier, 2011.
- JANG M. G., KIM D. K., PARK S. C., LEE J. S. e KIM S.W. **Biodiesel production from crude canola oil by two-step enzymatic processes.** *Renew Energy*, v. 42, n. 1, p. 99, 2012.

- JENAB E. TEMELLI F., CURTIS J. M. e ZHAO Y. Y. **Performance of two immobilized lipases for interesterification between canola oil and fully-hydrogenated canola oil under supercritical carbon dioxide.** LWT-Food Science and Technology, v. 58, n. 1, p. 263, 2014.
- JÉRÔME C. e LECOMTE P. **Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 60, n. 1, p. 1056, 2008.
- JI J., WANG J., LI Y., YU Y. e XU, Z. **Preparation of biodiesel with the help of ultrasonic and hydrodynamic cavitation.** Ultrasonics, v. 44, p. e411, 2006.
- JIANG Y., LIU X., CHEN Y., ZHOU L., HE Y., MA L. e GAO J. **Pickering emulsion stabilized by lipase-containing periodic mesoporous organosilica particles: A robust biocatalyst system for biodiesel production.** Bioresource Technology, v. 153, n. 1, p. 278, 2014.
- JIN Z., NTWALI J., HAN S., ZHENG S. e LIN, Y. **Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor.** Journal of Biotechnology, Elsevier, v. 159, n. 1, p. 108, 2012.
- JIN Z., NTWALI J., LIN Y., KUI H., ZHENG S. e HAN S. **Geranyl butyrate production by *Candida antarctica* lipase B-displaying *Pichia pastoris*.** In Advances in Applied Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg, p. 361, 2015.
- JUN C., JEON B. W., JOO J. C. LE Q. A. T., GU S. A., BYUN S. e KIM Y. H. **Thermostabilization of *Candida antarctica* lipase B by double immobilization: Adsorption on a macroporous polyacrylate carrier and R1 silaffin-mediated biosilicification.** Process Biochemistry, v. 48, n. 8, p. 1181, 2013.
- KAMAT S. V., BECKMAN E. J. e RUSSELL A. J. **Enzyme activity in Supercritical Fluids.** Critical Reviews in Biotechnology, v. 15, n. 1, p. 41, 1995.
- KANTAK J. B. e PRABHUNE A. A. **Characterization of smallest active monomeric lipase from novel *Rhizopus* strain: Application in transesterification.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 166, n. 7, p. 1769, 2012.
- KANWAR S. S., GEHLOT S., VERMA M. L., GUPTA R., KUMAR Y. e CHAUHAN G. S. **Synthesis of geranyl butyrate with the poly (acrylic acid-co-hydroxy propyl methacrylate-cl-ethylene glycol dimethacrylate) hydrogel immobilized lipase of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-4713.** Journal of Applied Polymer Science, v. 110, n. 5, p. 2681, 2008.
- KAPOOR M. e GUPTA M. N. **Lipase promiscuity and its biochemical applications.** Process Biochemistry, v. 47, n. 4, p. 555, 2012b.
- KAPOOR M. e GUPTA M. N. **Obtaining monoglycerides by esterification of glycerol with palmitic acid using some high activity preparations of *Candida antarctica* lipase B.** Process Biochemistry, v. 47, n. 3, p. 503, 2012a.
- KARAGOZ B., BAYRAMOGLU G., ALTINTAS B., BICAK N. e ARICA M. Y. **Poly (glycidyl methacrylate) polystyrene diblocks copolymer grafted nanocomposite microspheres from surface-initiated atom transfer radical polymerization for lipase immobilization: application in flavor ester synthesis.** Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 49, n. 20, p. 9655, 2010.

- KARRA-CHÂABOUNI M., BOUAZIZ I., BOUFI S., DO REGO A. M. B. e GARGOURI Y. **Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: activity and stability studies.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 66, n. 2, p. 168, 2008.
- KATSOURA M. H., POLYDERA1 A. C., TSIRONIS L. D., PETRAKI M. P., KOSTIC S., TSELEPIS A. D. e STAMATIS H. **Efficient enzymatic preparation of hydroxycinnamates in ionic liquids enhances their antioxidant effect on lipoproteins oxidative modification.** New Biotechnology, v. 26, n. 1, p. 83, 2009.
- KEMPKA A. P. **Desenvolvimento de matriz de imobilização de lipase utilizando gelatina de diferentes blooms adicionada de plastificantes hidrofílicos.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, SC, Florianópolis, Brasil, 2012.
- KHAN N. R. e RATHOD V. K. **Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic ésters and its intensification: A review.** Process Biochemistry, v. 50, n. 11, p. 1793, 2015.
- KHAN N. R., JADHAV S. V. e RATHOD V. K. **Lipase catalysed synthesis of cetyl oleate using ultrasound: Optimisation and kinetic studies.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 27, n. 1, p. 522, 2015.
- KHDER A. S., EL-SHARKAWY E. A., EL-HAKAM S. A. e AHMED A. I. **Surface characterization and catalytic activity of sulfated tin oxide catalyst.** Catalysis Communications, v. 9, n. 5, p. 769, 2008.
- KLÄHN M., LIM G. S., SEDURAMAN A. e WU P. **On the different roles of anions and cations in the solvation of enzymes in ionic liquids.** Physical Chemistry Chemical Physics, v. 13, n. 4, p. 1649, 2011.
- KNEZ Z. e HABULIN, M. **Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review.** Journal of Supercritical Fluids. v. 23, n. 1, p. 29, 2001.
- KNEZ Ž. **Enzymatic reactions in dense gases.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 47, n. 3, p. 357, 2009.
- KNEZ Z., HABULIN M. e KRMELJ V. **Enzyme catalyzed reactions in dense gases.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 14, n. 1, p. 17, 1998.
- KNEZ Ž., KAVČIČ S., GUBICZA L., BÉLAFI-BAKÓ K., NÉMETH G., PRIMOŽIČ M. e HABULIN M. **Lipase-catalyzed esterification of lactic acid in supercritical carbon dioxide.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 66, n. 1, p. 192, 2012.
- KNEZ Ž., MARKOČIČ E., LEITGEB M., PRIMOŽIČ M., HRNČIČ M. K. e ŠKERGET M. **Industrial applications of supercritical fluids: A review.** Energy, v. 77, n. 1, p. 235, 2014.
- KNOTHE G. **Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty éster composition.** Energy and Environmental Science, v. 2, n. 7, p. 759, 2009.
- KRAMER M., CRUZ J. C., PFROMM P. H., REZAC M. E. e CZERMAK P. **Enantioselective transesterification by *Candida antarctica* lipase B immobilized on fumed silica.** Journal of Biotechnology, v. 150, n. 1, p. 80, 2010.
- KUHN G. DE O. **Imobilização e tratamento de inulinases de *Kluyveromyces marxianus* nr1 y-7571 e *Aspergillus niger* em fluidos pressurizados: efeito na atividade enzimática e síntese de frutooligossacarídeos.** Tese de Doutorado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI – Erechim, Erechim, RS, 2013.
- KUHN G. O. DE, COGHETTO C., TREICHEL H., DE OLIVEIRA D. E. e OLIVEIRA J. V. **Effect of compressed fluids treatment on the activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 immobilized in montmorillonite.** Process Biochemistry, v. 46, n. 1, p. 286, 2011.

- KUHN G., MARANGONI M., FREIRE D. M. G., SOARES V. F., GODOY M. G., CASTRO A. M., LUCCIO M. D., TREICHEL H., MAZUTTI M. A., OLIVEIRA D. E. e OLIVEIRA J. V. **Esterification activities of non-commercial lipases after pre-treatment in pressurized propane.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology. v. 85, n. 6, p. 839-844, 2010.
- KUMAR P. P., KUMARAVEL S. e LALITHA C. **Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of Vitex negundo.** African Journal of Biochemistry Research, v. 4, n. 7, p. 191, 2010.
- KUO C. H., LIU Y. C., CHANG C. M. J., CHEN J. H., CHANG C. e SHIEH C. J. **Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles.** Carbohydrate Polymers, v. 87, n. 4, p. 2538, 2012.
- KURATAA A., TAKEMOTOA S., FUJITA T., IWAIB K., FURUSAWAB M., KISHIMOTOA N. e JU H. **Synthesis of 3-cyclohexylpropyl caffeate from 5-caffeoylquinic acid with consecutive enzymatic conversions in ionic liquid.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 69, n. 1, p. 161, 2011.
- KWIATKOWSKA B., BENNETT J., AKUNNA J., WALKER G. M. e BREMNER D. H. **Stimulation of bioprocesses by ultrasound.** Biotechnology Advances, v. 29, n. 1, p. 768, 2011.
- LAEMMLI U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, v. 227, n. 1, p. 680, 1970.
- LAGE F. A., BASSI J. J., CORRADINI M. C., TODERO L. M., LUIZ J. H. e MENDES A. A. **Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system.** Enzyme and Microbial Technology, v. 84, n. 1, p. 56, 2016.
- LAI J., HU Z., WANG P. e YANG Z. **Enzymatic production of microalgal biodiesel in ionic liquid [BMIm][PF6].** Fuel, v. 95, n. 1, p. 329, 2012.
- LANCAS, F. M. **Extração com fluido supercrítico: quo vadis.** Revista Analytica, v. 2, p. 30, 2002.
- LEDRA C. G. A. **Resolution of 3-nitro-and 3, 4-methylenedioxy-1-phenylethanol with the lipase of *Burkholderia cepacia* immobilized in starch films/PEO.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 2009.
- LEE S., H., DOAN T. T. N., WON K., HA S. H. e KOO Y-M. **Immobilization of lipase within carbon nanotube-silica composites for non-aqueous reaction systems.** Journal Molecular Catalysis B: Enzyme, v. 62, n. 1, p. 169, 2010.
- LEONELLI C. e MASON T. J. **Microwave and ultrasonic processing: now a realistic option for industry.** Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, v. 49, n. 9, p. 885, 2010.
- LERIN L. A., FEITEN M. C., RICETTI A., TONIAZZO G., TREICHEL H., MAZUTTI M. A. e DE OLIVEIRA, D. **Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in ultrasound-assisted system: process optimization and kinetic evaluation.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 18, n. 5, p 988, 2011b.
- LERIN L. A., LOSS R. A., REMONATTO D., ZENEVICZ M. C., BALEN M., NETTO V. O. e DE OLIVEIRA D. **A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 37, n. 12, p. 2381, 2014.

- LERIN L., CENI G., RICHETTI A., KUBIAK G., OLIVEIRA J. VLADIMIR, TONIAZZO G., TREICHEL H., OESTREICHER E. G. e OLIVEIRA, D. **Successive cycles of utilization of Novozym 435 in three different reaction systems.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 28, n. 02, p. 181, 2011a.
- LI L., JI F., WANG J., LI Y. e BAO Y. **Esterification degree of fructose laurate exerted by *Candida antarctica* lipase B in organic solvents.** Enzyme and Microbial Technology, v. 69, n. 1, p. 46, 2015.
- LI N. e ZONG M. H. **Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 66, n. 1, p. 43, 2010.
- LI X., XU H. e WU Q. **Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors.** Biotechnology and Bioengineering, v. 98, n. 4, p. 764, 2007.
- LI Y., HU M., DU Y., XIAO H. e MCCLEMENTS D. J. **Control of lipase digestibility of emulsified lipids by encapsulation within calcium alginate beads.** Food Hydrocolloids, v. 25, n. 1, p. 122, 2011.
- LINDEN L. e LORIENT D. **Bioquímica agroindustrial: revalorización alimentaria de la producción agrícola.** Editora Acribia, 1996.
- LINQIU C. e JEOFFREY E. **Cross-linked enzyme aggregates and crosslinker agents therefore.** International Application WO, Prabhavathi Devi, Guo Z, Xu X. Characterization of cross-linked lipase aggregates. Journal Am Oil Chemistry Society, v. 86, n. 1, p. 637, 2009.
- LIU K., SU Z., MIAO S., MA G. e ZHANG S. **Enzymatic waterborne polyurethane towards a robust and environmentally friendly anti-biofouling coating.** Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 38, p. 31698, 2016.
- LIU S. L., DONG X. Y., WEI F., WANG X., LV X., ZHONG e CHEN H. **Ultrasonic pretreatment in lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with high 1, 3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol content.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 23, n. 1, p. 100, 2015.
- LIU Y., JIN Q., SHAN L., LIU Y., SHEN W. e WANG X. **The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 15, p. 402, 2008.
- LIU Y., Zhang X., Tan H., Yan Y. e Hameed B. H. **Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase.** Process Biochemistry, v. 45, n. 7, p. 1176, 2010.
- LIU Z., ZENG X., YANG D., CHU G., YUAN Z. e CHEN S. **Applying DNA barcodes for identification of plant species in the family Araliaceae.** Gene, v. 499, n. 1, p. 76, 2012.
- LONGO M. A. e SANROMÁN M. A. **Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies.** Food Technology and Biotechnology, v. 44, n. 3, p. 335, 2006.
- LOPES H. J. S. **Valoração de resíduos e subprodutos agroindustriais utilizando reatores anaeróbios em fermentação escura para produção de hidrogênio, etanol e ácidos orgânicos.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, São Paulo, SP, 2015.
- LÓPEZ-LÓPEZ O., E CERDAN M. e I GONZALEZ SISO M. **New extremophilic lipases and ésterases from metagenomics.** Current Protein and Peptide Science, v.15, n. 5, p. 445, 2014.

- LOTTI M., PLEISS J., VALERO F. e FERRER P. **Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel.** Biotechnology Journal, v. 10, n. 1, p. 22, 2015.
- LOZANO P., DE DIEGO T., SAUER T., VAULTIER M., GMOUH S. e IBORRA, J. L. **On the importance of the supporting material for activity of immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid/hexane and ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic media.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 40, n. 1, p. 93, 2007.
- LOZANO P., VILLORA G., GOMEZ D., GAYO A. B., SÁNCHEZ-CONESA J. A., RUBIO M. e IBORRA J. L. **Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for éster synthesis in supercritical carbon dioxide.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 29, n. 1, p. 121, 2004.
- LV Y., LIN Z., TAN T. e SVEC F. **Preparation of reusable bioreactors using reversible immobilization of enzyme on monolithic porous polymer support with attached gold nanoparticles.** Biotechnology and Bioengineering, v. 111, n. 1, p. 50, 2014.
- MA H. Z., YU X. W., SONG C., XUE Q. L. e JIANG B. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on epoxy modified silica by sol-gel process.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 127, n. 1, p. 76, 2016.
- MACEDO A. G. A. e PASTORE G. M. **Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma.** Food Science and Technology, Campinas, 1997.
- MACEDO G. A., PASTORE G. M. e RODRIGUES M. I. **Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus sp.* lipase with a central composite rotatable design.** Process Biochemistry, v. 39, n. 6, p. 687, 2004.
- MACHADO A. H. L., PANDOLI O., DE MARIZ, MIRANDA L. S. e DE SOUZA R. O. **Micro Reatores: Novas Oportunidades em Síntese Química.** Revista Virtual de Química, v. 6, n. 4, p. 1076, 2014.
- MADALOZZO A. D. **Síntese de Ésteres Etílicos utilizando uma Lipase Recombinante de *Rhizopus Oryzae*.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná. Paraná, PR, Brasil, 2011.
- MADALOZZO A. D., MUNIZ L. S., BARON A. M., PIOVAN L., MITCHELL D. A. e KRIEGER N. **Characterization of an immobilized recombinant lipase from *Rhizopus oryzae*: Synthesis of ethyl-oleate.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 3, n. 3, p. 13, 2014.
- MADARÁSZ J., NÉMETH D., BAKOS J., GUBICZA L. e BAKONYI P. **Solvent-free enzymatic process for biolubricant production in continuous microfluidic reactor.** Journal of Cleaner Production, v. 93, n. 1, p. 140, 2015.
- MAGNAN E., CATARINO I., PAOLUCCI-JEANJEAN D., PREZIOSI-BELLOU L. e BELLEVILLE M. P. **Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability.** Journal of Membrane Science, v. 241, n. 1, p. 161, 2004.
- MAHAPATRA P., KUMARI A., KUMAR V., GARLAPATI R., BANERJEE A. e NAG A. **Enzymatic synthesis of fruit flavor ésters by immobilized lipase from *Rhizopus oligosporus* optimized with response surface methodology.** Journal Molecular Catalysis B: Enzyme, v. 60, n.1, p. 57, 2009.
- MAHAPATRA P., KUMARI A., KUMAR GARLAPATI V., BANERJEE R. E NAG A. **Enzymatic synthesis of fruit flavor esters by immobilized lipase from *Rhizopus***

- oligosporus optimized with response surface methodology.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Elsevier, v. 60, n. 1, p. 57, 2009.
- MANERA A. P., COSTA F. A. D. A., RODRIGUES M. I., KALIL S. J. e MAUGERI FILHO F. **Galacto-oligosaccharides production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*.** International Journal of Food Engineering, v. 6, n. 6, 2010.
- MANOEL E. A., ROBERT J. M., PINTO M. C., MACHADO A. C., BESTETI M. D., COELHO M. A. Z. e FREIRE D. M. **Evaluation of the performance of differently immobilized recombinant lipase B from *Candida antarctica* preparations for the synthesis of pharmacological derivatives in organic media.** An International Journal to Further the Chemical Sciences, v. 6, n. 5, p. 4043, 2016.
- MARCON N. S. **Avaliação da atividade enzimática de pectinases em fluidos pressurizados.** Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI - Erechim, Erechim, RS, Brasil, 2012.
- MARTÍNEZ-RUIZ A., GARCÍA H. S., SAUCEDO-CASTAÑEDA G. e FAVELA-TORRES E. **Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 151, n. 3, p. 393, 2008.
- MARTINS A. B. **Comparação entre agitação mecânica e ultrassônica na Síntese de ésteres de aromas catalisada por lipase.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2012.
- MARTINS A. B., DA SILVA A. M., SCHEIN M. F., GARCIA-GALAN C., AYUB M. A. Z., FERNANDEZ-LAFUENTE R. e RODRIGUES R. C. **Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor ésters.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 105, n. 1, p. 18, 2014.
- MARTINS A. B., FRIEDRICH J. L., CAVALHEIRO J. C., GARCIA-GALAN C., BARBOSA O., AYUB M. A., FERNANDEZ-LAFUENTEC R. e RODRIGUES R. C. **Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene-divinylbenzene beads.** Bioresource Technology, v. 134, n. 1, p. 417, 2013.
- MARTINS A. B., GRAEBIN N. G., LORENZONI A. S. G., FERNANDEZ-LAFUENTE R., AYUB M. A. Z. e RODRIGUES R. C. **Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: reaction optimization by response surface methodology.** Process Biochemistry, v. 46 n. 1, p. 2311, 2011c.
- MARTINS C. M., OLIVEIRA A. V., FIÚZA L. M. C. G. e SANTAELLA S. T. **Effect of phenol on free and immobilized cells of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 in polyurethane foam.** Bioscience Journal, v. 29, n. 5, 2011a.
- MARTINS S., MUSSATTO S. I., MARTÍNEZ-AVILA G., MONTAÑEZ-SAENZ J., AGUILAR C. N. e TEIXEIRA J. A. **Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation.** A review. Biotechnology Advances, v. 29, n. 3, p. 365, 2011b.
- MAT RADZI S. M., BASRI M., SALLEH A. B., ARIFF A., MOHAMMAD R., RAHMAN M. B. A. e RAHMAN R. N. Z. R. A. **Large scale production of liquid wax éster by immobilized lipase.** Journal of Oleo Science, v. 54, n. 4, p. 203, 2005b.
- MAT RADZI S., BASRI M., BAKAR SALLEH A., ARIFF A., MOHAMMAD R., RAHMAN A. e RAJA R. N. Z. **High performance enzymatic synthesis of oleyl oleate using immobilised lipase from *Candida antartica*.** Electronic Journal of Biotechnology, v. 8, n. 3, p. 291, 2005a.

- MATEO C. **Editorial Thematic Issue: Biocatalytic Selective Synthesis.** Current Organic Chemistry, v. 21, n. 2, p. 95, 2017.
- MATHPATI A. C., BADGUJAR K. C. e BHANAGE B. M. **Kinetic modeling and docking study of immobilized lipase catalyzed synthesis of furfuryl acetate.** Enzyme and Microbial Technology, v. 84, n. 1, p. 10, 2016.
- MATOS L. J. B. DE L. **Imobilização da lipase tipo B de *Candida antarctica* em sílica macroporosa e polimetilmetacrilato visando a síntese do oleato de etila.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, UFC, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2014.
- MATSUDA T., HARADA T. e NAKAMURA K. **Biocatalysis in supercritical CO₂.** Current Organic Chemistry, v. 9, n. 3, p. 299, 2005.
- MATTE C. R., BORDINHÃO C., POPPE J. K., RODRIGUES R. C., HERTZ P. F. e AYUB M. A. **Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 127, p. 67, 2016.
- MCHUGH M. A e KRUKONIS V. J. **Supercritical fluids extraction: principles and practice.** Boston: Butterworth, Capítulo I, p. 41, 1986.
- MCHUGH M. e KRUKONIS V. **Supercritical Fluid Extraction.** Stonenham, Butterworth-Heinenamm, 1994.
- MCMURRY J. **Organic Chemistry.** 7ª. Edição. Editora Belmont: Cengage Brooks, 2010.
- MCMURRY J. **Química Orgânica.** LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora SA, 4º Edição, v. 1 e 2. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1997.
- MEHRASBI M. R., MOHAMMADI J., PEYDA M. e MOHAMMADI M. **Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil.** Renewable Energy, v. 101, n. 1, p. 593, 2017.
- MELGOSA R., SANZ M. T., SOLAESA Á. G., BUCIO S. L. e BELTRÁN S. **Enzymatic activity and conformational and morphological studies of four commercial lipases treated with supercritical carbon dioxide.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 97, n.1, p. 51, 2015.
- MENDES A. A., CASTRO H. F. E GIORDANO R. L. C. **Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*.** Quimica Nova, v. 36, n. 2, p. 245, 2013.
- MENDES A. A., GIORDANO R. C., DE L. C., GIORDANO R. e CASTRO H. F. D. **Immobilization and stabilization of microbial lipase by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: application of the biocatalysts in biodiesel synthesis.** Journal Molecular Catalysis B: Enzyme, v. 68, n. 1, p. 109, 2011a.
- MENDES A. A., OLIVEIRA P. C. D., CASTRO H. F. D. e GIORDANO R. D. L. **Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest.** Química Nova, v. 34, n. 5, p. 831, 2011b.
- MENG Y., WANG G., YANG N., ZHOU Z., LI, Y., LIANG X., CHEN J., LI Y. e LI J., **Twostep synthesis of fatty acid ethyl éster from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase.** Biotechnoly Biofuels, v. 4, n. 1, p. 1, 2011.
- MIAO S. e SHANKS B. H. **Mechanism of acetic acid esterification over sulfonic acid-functionalized mesoporous silica.** Journal of Catalysis, v. 279, n. 1, p. 136, 2011.

- MICHELIN S., PENHA F. M., SYCHOSKI M. M., SCHERER R. P., TREICHEL H., VALÉRIO A. e OLIVEIRA J. V. **Kinetics of ultrasound-assisted enzymatic biodiesel production from Macauba coconut oil.** Renewable Energy, v. 76, n. 1, p. 388, 2015.
- MIHAILOVIĆ M., STOJANOVIĆ M., BANJANAC K., CAREVIĆ M., PRLAINOVIĆ N., MILOSAVIĆ N. e BEZBRADICA D. **Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite® A109 and its post-immobilization stabilization.** Process Biochemistry, v. 49, n. 4, p. 637, 2014.
- MOHD SAUPIA H. S., TEJOA B. A., BASRIA M., SALLEHB A. B., ABD RAHMAN R. N., ABDUL RAHMAN M. N. e ABDULMALEKA E. **Improved enzymatic galactose oleate synthesis in ionic liquids.** Journal Molecular Catalysis B: Enzyme, v. 76, n. 1, p. 37, 2012.
- MOLINA-GUTIÉRREZ M., HAKALIN N. L., RODRÍGUEZ-SANCHEZ L., PRIETO A. e MARTÍNEZ M. J. **Green synthesis of β -sitostanol ésters catalyzed by the versatile lipase/sterol ésterase from *Ophiostoma piceae*.** Food Chemistry, v. 221, n. 1, p. 1458, 2017.
- MONHEMI H. e HOUSAINDOKHT M. R. **How enzymes can remain active and stable in a compressed gas. New insights into the conformational stability of *Candida antarctica* lipase B in near-critical propane.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 72, n. 1, p. 161, 2012.
- MORE S. B., WAGHMARE J. T. e GOGATE P. R. **Ultrasound pretreatment as a novel approach for intensification of lipase catalyzed esterification of tricaprylin.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 36, n. 1, p. 253, 2017.
- MORILD E. **The theory of pressure effects on enzymes.** Advances in protein chemistry, v. 34, n. 1, p. 93, 1981.
- MUHAMMAD N., ELSHEIKH Y. A., MUTALIB M. I. A., BAZMI A. A., KHAN R. A., KHAN H. e MAN Z. **An overview of the role of ionic liquids in biodiesel reactions.** Journal of Industrial and Engineering Chemistry, v. 21, n. 1, p. 1, 2015.
- MULINARI J., VENTURIN B., SBARDELOTTO M., AGNOL A. D., SCAPINI T., CAMARGO A. F. e REICHERT F. W. **Ultrasound-assisted hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by homemade lipases.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 35, n. 1, p. 313, 2017.
- MÜLLER S. S. e FREY H. **Synthesis of Oxetane-Functional Aliphatic Polyésters via Enzymatic Polycondensation.** Macromolecular Chemistry and Physics, v. 213, n. 17, p. 1783, 2012.
- MUTHUKUMOROPAN K., TIWARI B. K., O'DONNELL C. P. e CULLEN P. J. **9 Ozone and CO₂ Processing: Rheological and Functional Properties of Food.** Novel Food Processing: Effects on Rheological and Functional Properties, v. 127, n. 1, p.127, 2016.
- NADOR S. S. e RATHOD V. K. **Sonochemical Effect on Activity and Conformation of Commercial Lipases.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 1, n. 1, 2016.
- NARWAL S. K., SAUN N. K., DOGRA P. e GUPTA R. **Green synthesis of isoamyl acetate via silica immobilized novel thermophilic lipase from *Bacillus aerius*.** Russian Journal of Bioorganic Chemistry, v. 42, n. 1, p. 69, 2016.
- NASRATUN M., SAID H. A., NORAZIAH A. e ABD ALLAH A. N., **Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on chitosan beads for transesterification reaction.** American Journal Applied Science, v. 6, n. 1, p. 1653, 2009.

- NATALINO R., VAREJAO E. V. V., DA SILVA M. J., CARDOSO A. L. e FERNANDES S. **A. p-Sulfonic acid calix[n]arenes: the most active and water tolerant organocatalysts in esterification reactions.** *Catalysis Science and Technology*, v. 4, n. 1, p. 1369, 2014.
- NETA N. A. S. **Estudo da reação de produção de ésteres de ácidos graxos por via enzimática objetivando aplicações alimentícias.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ceará, UFC, Fortaleza, Brasil, 2007.
- NETA N. S., CUNHA J. A. C., SANCHO S. O., ABREU R. F. A., PONTES D. F., CARIOCA J. O. B. e TEIXEIRA J. A. **Produção enzimática do éster oleato de etila utilizando lipase a partir de *Candida antarctica* B.** *Revista Holos*, v. 2, n. 1, p.1807, 2012.
- NETA N. S., TEIXEIRA J. A. e RODRIGUES L. R. **Sugar Éster Surfactants: Enzymatic Synthesis and Applications in Food Industry.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 55, n. 5, p. 595, 2015.
- NETTO C. G., ANDRADE L. H. e TOMA H. E. **Enantioselective transesterification catalysis by *Candida antarctica* lipase immobilized on superparamagnetic nanoparticles.** *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 20, n. 19, p. 2299, 2009.
- NG C. H. e YANG K. L. **Lipase in biphasic alginate beads as a biocatalyst for esterification of butyric acid and butanol in aqueous media.** *Enzyme and microbial technology*, v. 82, n. 1, p. 173, 2016.
- NICOLÁS P., LASSALLE V. L. e FERREIRA M. L. **Quantification of immobilized *Candida antarctica* lipase B (CALB) using ICP-AES combined with Bradford method.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 97, n. 1, p. 97, 2017.
- NIOLETTI G. **Imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em espuma de poliuretano e aplicação na síntese do éster geranyl propionato.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 2014.
- NOVAK U. e ŽNIDARŠIČ-PLAZL P. **Integrated lipase-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a miniaturized system with enzyme and ionic liquid recycle.** *Green Processing and Synthesis*, v. 2, n. 6, p. 561, 2013.
- NOVAK U., LAVRIC D. e ŽNIDARŠIČ-PLAZL P. **Continuous lipase B-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a two-liquid phase system using corning® AFR™ module coupled with a membrane separator enabling biocatalyst recycle.** *Journal of Flow Chemistry*, v. 6, n. 1, p. 33, 2016.
- NYARI N. L. D. **Estudo da imobilização de lipase de *Candida Antarctica* B em poliuretano.** Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI – Erechim, Erechim, RS, Brasil, 2013.
- NYARI N. L. D., FERNANDES I. A., BUSTAMANTE-VARGA C. E., STEFFENS, C., D., ZENI J. e DALLAGO R. M. **In situ immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 124, n. 1, p. 52, 2016.
- NYARI N. L. D., PAULAZZI A. R., STEFFENS C., PAROUL N., MIGNONI M., ZENI J., DALLAGO R. M. **Optimization of the olive oil hydrolysis process using immobilized lipase from *Burkholderia cepacia* sp in polyurethane.** *Acta Scientiarum Technology*, 2017.
- NYARI N. L. D., STEFFENS C., ZENI J. e DALLAGO R. M. **Easy and Fast Method of *Candida antarctica* B Lipase Immobilization in Polyurethane Foam.** *Indian Journal Advanced Chemical Science*, 2015.

- OHE T. H. K. **Produção de biodiesel etílico com uso de lipases extracelulares de fungos termofílicos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/97757>, 2011.
- OLIVEIRA C. A., SOUZA A. C., SANTOS A. P. B., SILVA B. V., LACHTER E. R. e PINTO A. C. **Síntese de ésteres de aromas de frutas: um experimento para cursos de graduação dentro de um dos princípios da química verde**. Revista 45. Virtual de Química, v. 6, n. 1, 2014.
- OLIVEIRA D., FEIHRMANN A. C., DARIVA C., CUNHA A. G., BEVILAQUA J. V., DESTAIN J., OLIVEIRA J. V. e FREIRE D. M. G. **Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 39, n. 1, p. 117, 2006b.
- OLIVEIRA D., FEIHRMANN A. C., RUBIRA A. F., KUNITA M. H., DARIVA C. e OLIVEIRA J. V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids**. Journal of Supercritical Fluids, v. 38, n. 1, p. 373, 2006a.
- OLIVEIRA D., FEIHRMANN A. C., RUBIRA A. F., KUNITA M. H., DARIVA C. e OLIVEIRA J. V. **Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 1, n. 39, p. 117, 2006c.
- OLIVEIRA DE E. B., HUMEAU C., CHEBIL L., MAIA E. R., DEHEZ F., MAIGRET B. e ENGASSER J. M. **A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 59, n. 1, p. 96, 2009.
- OLIVEIRA DE P. A. **Formação de derivados do glicerol em regime contínuo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2015.
- OLIVEIRA U. M. F. D. **Desenvolvimento de biocatalisadores utilizando lipases de *Rhizomucor mihei* (RML) imobilizada em suporte de quitosana e sua aplicação na síntese de ésteres butirato de metila e butirato de etila**. Tese de Doutorado, Rede Nordeste de Biotecnologia, UFC, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil, 2012.
- OLIVEIRA V. M. S. D. **Síntese e caracterização de dispersões aquosas de poliuretano**. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2008.
- OMAR K. A., GOUNGA M. E., LIU R., ABOSHORA W., AL-HAJJ N. Q. M., JIN Q. e WANG X. **Influence of lipase under ultrasonic microwave assisted extraction on changes of triacylglycerol distribution and melting profiles during lipolysis of milk fat**. Royal Society of Chemistry Advances, v. 6, n. 103, p. 100857, 2016.
- ORELLANA-COCA C., TÖRNVALL U., ADLERCREUTZ D., MATTIASSON B. e HATTI-KAUL R. **Chemo-enzymatic epoxidation of oleic acid and methyl oleate in solvent-free medium**. Biocatalysis and Biotransformation, v. 23, n. 6, p. 431, 2005.
- ORITA T., TOMITA M., SAITO T., NISHIDA N. e KATO K. **Immobilization of cholesterol ésterase in mesoporous silica materials and its hydrolytic activity toward diethyl phthalate**. Materials Science and Engineering C - Biomimetic and Supramolecular Systems, v. 32, n. 4, p. 718, 2012.
- OSORIO-VIANA W., DUQUE-BERNAL M., FONTALVO J., DOBROSZ-GÓMEZ I. e GÓMEZ-GARCÍA M. Á. **Kinetic study on the catalytic esterification of acetic acid with isoamyl alcohol over Amberlite IR-120**. Chemical Engineering Science, v. 101, n. 1, p. 755, 2013b.

- OSORIO-VIANA W., DUQUE-BERNAL M., QUINTERO-ARIAS J. D., DOBROSZ-GÓMEZ I., FONTALVO J. e GÓMEZ-GARCÍA M. Á. **Activity model and consistent thermodynamic features for acetic acid–isoamyl alcohol–isoamyl acetate–water reactive system.** Fluid Phase Equilibria, v. 345, n. 1, p. 68, 2013c.
- OSORIO-VIANA W., IBARRA-TAQUEZ H. N., DOBROSZ-GÓMEZ I. e GÓMEZ-GARCÍA M. Á. **Hybrid membrane and conventional processes comparison for isoamyl acetate production.** Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, v. 76, n. 1, p. 70, 2014.
- OSORIO-VIANA W., QUINTERO-ARIAS J. D., DOBROSZ-GOMEZ I., FONTALVO J. e GÓMEZ-GARCÍA M. Á. **Intensification of isoamyl acetate production: transport properties of silica membranes.** Desalination and Water Treatment, v. 51, n. 10-12, p. 2377, 2013a.
- ÖZTÜRK H., POLLET E., PHALIP V., GÜVENILIR Y. e AVÉROUS L. **Nanoclays for Lipase Immobilization: Biocatalyst Characterization and Activity in Polyéster Synthesis.** Polymers, v. 8, n. 12, p. 416, 2016.
- OZYILMAZ G. e GEZER E. **Production of aroma ésters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 64, n. 3, p. 140, p. 2010.
- PÄIVIÖ M., PERKIÖ P. e KANERVA L. T., **Solvent-free kinetic resolution of primary amines catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: effect of immobilization and recycling stability.** Tetrahedron: Asymmetry v. 2, n. 3, p. 230, 2012.
- PALUDO N. **Uso da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada na síntese de ésteres de aroma: comparação entre agitação mecânica e ultrassom.** Salão de Iniciação Científica Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, v. 26, p. 20, Porto Alegre, RS, 2014.
- PALUDO N., ALVES J. S., ALTMANN C., AYUB M. A., FERNANDEZ-LAFUENTE R. e RODRIGUES R. C. **The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 22, n. 1, p. 89, 2015.
- PAROUL N. **Síntese enzimática de ésteres aromatizantes a partir de diferentes substratos em sistema livre de solvente orgânico.** Tese de Doutorado, Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias do Sul, RS, Brasil, 2011.
- PEIRCE S., TACIAS-PASCACIO V. G., RUSSO M. E., MARZOCHELLA A., VIRGEN-ORTÍZ J. J. e FERNANDEZ-LAFUENTE R. **Stabilization of *Candida antarctica* Lipase B (CALB) Immobilized on Octyl Agarose by Treatment with Polyethyleneimine (PEI).** Molecules, v. 21, n. 6, p. 751, 2016.
- PEREIRA P. S., HEIZIR F. DE C., ZANIN G. M. e DE MORAES F. F. De. **Imobilização de Enzimas e sua Estabilização, Enzimas.** Cap 06 - Sa pt.scribd.co, publicado em 24 de setembro de 2010.
- PEREIRAA P. I., GOMESA T. P., DA SILVA M. A. e LANGONEA M. A. **Produção de biodiesel a partir de óleos ácidos empregando reatores de leito fixo em série contendo lipases.** XXV Congresso Iberoamericano de Catálisis, Montivideo, Uruguai, 2016.
- PETER T. R e ROBERT B. **Beeswax through the ages.** Personal care, October vol. 10, p. 27, 2001.
- PETROBRÁS. Disponível em: <http://www.petrobras.com.br>. Acesso em fevereiro de 2016.

- PIAZZA S. P., DALLAGO R. M., CANSIAN R. L. e PAROUL N. **Otimização da Produção de Butanoato de Etila Catalizada por Lipozyme 435 em Sistema Livre de Solventes**. XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, ENZITEC, Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias do Sul, RS, Brasil. 2016
- POHAR A. e PLAZL I. **Process intensification through microreactor application**. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, v. 23, n. 4, p. 537, 2009.
- POLONA Z., PLAZL N. e PLAZL I. **Modelling and experimental studies on lipase-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a microreactor**. Process Biochemistry, v. 44, n. 1, p. 1115, 2009.
- POOJARI Y. e CLARSON S. J. **Thermal stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized on macroporous acrylic resin particles inorganic media**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 2, n. 1, p. 7, 2013.
- POPIOLSKI A. S. **Otimização do processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom**. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões, URI - Erechim, Erechim, RS, Brasil, 2011.
- POPPE J. K. **Síntese de ésteres metílicos catalisada por lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em suportes hidrofóbicos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil, 2012.
- POPPE J. K., COSTA A. P. O., BRASIL M. C., RODRIGUES R. C. e AYUB, M. A. Z. **Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 94, n. 1, p. 57, 2013b.
- POPPE J. K., GARCIA-GALAN C., MATTE C. R., FERNANDEZ-LAFUENTE R., RODRIGUES R. C. e AYUB M. A. Z. **Optimization of synthesis of fatty acid methyl ésters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 94, n. 1, p. 51, 2013.
- POPPE J. K., MATTE C. R., PERALBA M. D. C. R. FERNANDEZ-LAFUENTE R., RODRIGUES, R. C. e AYUB M. A. Z. **Optimization of ethyl éster production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases**. Applied Catalysis A: General, v. 490, n. 1, p. 50, 2015.
- PRIYA K. e CHADHA A. **Enzyme Synthesis of hydrocinnamic ésters by *Pseudomonas cepacia* lipase**. Synthesis of hydrocinnamic ésters by *Pseudomonas cepacia* lipase. Microbiology Technology, v. 32, n. 1, p. 485, 2003.
- PRLAINOVIĆ N. KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ Z. MIJIN D. e BEZBRADICA D. **Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Sepabeads: the effect of lipase oxidation by periodates**. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 34, n. 7, p. 803, 2011.
- PUSKAS J. E., KANTOR J. e SHRIKHANDE G. **Reaction engineering with enzymes: A relatively uncharted territory**. Chemical Engineers Journal, v. 63, n. 1, p. 266, 2017.
- QUEIROZ M. L., ONOREVOLI B., FONTES G., KRAUSE L., ALVAREZ H., DARIVA C. e FRICKS A. **Biotechnological route for obtaining methyl esters from crambe oil (*Crambe abyssinica*)**. International Conference for Healthcare and Medical Students (ICHAMS), BioMed Central, v. 8, n. 14, p. 215, 2014.
- RADZI S. M., MUSTAFA W. A. F., OTHMAN S. S. e NOOR H. M. **Green synthesis of butyl acetate, a pineapple flavour via lipase-catalyzed reaction**. World Academy of Science, Engineering and Technology. v. 59, n. 1, p. 677, 2011.

- RAGHAVENDRA T., BASAK A., MANOCHA L. M., SHAH A. R. e MADAMWAR D. **Robust nanobioconjugates of *Candida antarctica* lipase B–Multiwalled carbon nanotubes: Characterization and application for multiple usages in non-aqueous biocatalysis.** Bioresource Technology, v. 140, n. 1, p. 103, 2013.
- RAGHAVENDRA T., PANCHAL N., DIVECHA J., SHAH A. e MADAMWAR D. **Biocatalytic Synthesis of Flavor Éster “Pentyl Valerate” Using *Candida rugosa* Lipase Immobilized in Microemulsion Based Organogels: Effect of Parameters and Reusability.** BioMed Research International, v. 2014, n. 1, p. 14, 2014.
- RAGHAVENDRA T., SAYANIA D. e MADAMWAR D. **Synthesis of the ‘green apple éster’ ethyl valerate in organic solvents by *Candida rugosa* lipase immobilized in MBGs in organic solvents: Effects of immobilization and reaction parameters.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 63, n. 1, p. 31, 2010.
- RAHMAN ET N. F. A., BASRI M., RAHMAN M. B. A., RAHMAN R. N. Z. R. A. e SALLEH A. B. **High yield lipase-catalyzed synthesis of Engkabang fat esters for the cosmetic industry.** Bioresource Technology, v. 102, n. 3, p. 2168, 2011.
- RAMIREZ A. M., YANG T., BOUWMEÉSTER H. J. e JONGSMA M. A. **A trichome-specific linoleate lipoxygenase expressed during pyrethrin biosynthesis in *Pyrethrum*.** Lipids, v. 48, n. 10, p. 1005, 2013.
- RAMÍREZ I. M. **Isolation of genomic DNAs from the tropical fruit trees avocado, coconut, guava and mango for PCR-based DNA marker application.** Cultivos Tropicales, v. 25, n. 1, p. 38, 2013.
- RANGEL H., CARRILLO-MORALES M., GALINDO J. M., CASTILLO E., OBREGÓN-ZÚÑIGA A., JUARISTI E. e ESCALANTE J. **Structural features of N-benzylated- β -amino acid methyl ésters essential for enantiodifferentiation by lipase B from *Candida antarctica* in hydrolytic reactions.** Tetrahedron: Asymmetry, v. 26, n. 7, p. 325, 2015.
- RASO J., MANAS P., PAGÁN R. e SALA F. J. **Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 5, p. 157, 1999.
- RAVEENDRAN P., IKUSHIMA Y. e WALLEN S. L. **Polar attributes of supercritical carbon dioxide.** Accounts of Chemical Research, v. 38, n. 6, p. 478, 2005.
- RAVELO M., FUENTE E., BLANCO Á., LADERO M. e GARCÍA-OCHOA F. **Esterification of glycerol and ibuprofen in solventless media catalyzed by free CALB: Kinetic modelling.** Biochemical Engineering Journal, v. 101, n. 1, p. 228, 2015.
- RAZAK N. N. A. e ANNUAR M. S. M. **Enzymatic synthesis of flavonoid éster: Elucidation of its kinetic mechanism and equilibrium thermodynamic behavior.** Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 54, n. 21, p. 5604, 2015.
- REID R. C., PRAUSNITZ J. M. e POLING B. E. **The properties of gases and liquids,** 1987.
- REN K. e LAMSAL B. P. **Synthesis of some glucose-fatty acid ésters by lipase from *Candida antarctica* and their emulsion functions.** Food chemistry, v. 214, n. 1, p. 556, 2017.
- RICO A. L. D. L. **Produção enzimática de biodiesel etílico em reator de leito fixo e regime de fluxo contínuo utilizando células íntegras de *Mucor Circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. SP, Brasil, 2015.

- RIZVI S. S. H. **Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods**. Food Technology, v. 40, n. 6, p. 55, 1986.
- RODRIGUES J., PERRIER V., LECOMTE J., DUBREUCQ E. e FERREIRA-DIAS S. **Biodiesel production from crude jatropha oil catalyzed by immobilized lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* in aqueous medium**. Bioresource Technology, v. 218, n. 1, p. 1224, 2016.
- RODRIGUES R. C. e FERNANDEZ-LAFUENTE R. **Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 64, n. 1, p. 1, 2010.
- ROJAS M. L., HELLMEISTER TREVILIN J., AUGUSTO D. e ESTEVES P. **The ultrasound technology for modifying enzyme activity**. Scientia Agropecuaria, v. 7, n. 2, p. 145, 2016a.
- ROJAS O., SALAZAR A., GIL, I. e RODRÍGUEZ G. **Effect of Pressure on the Azeotrope of the Mixture Isoamyl Acetate–Isoamyl Alcohol at 50.00, 101.32, 250.00, and 350.00 kPa**. Journal of Chemical and Engineering Data, v. 61, n. 9, p. 3109, 2016b.
- ROMERO F. A., DU W., HWANG I., RAYL T. J., KIMBALL F. S., LEUNG D. e BOGER D. L. **Potent and selective α -ketoheterocycle-based inhibitors of the anandamide and oleamide catabolizing enzyme, fatty acid amide hydrolase**. Journal of Medicinal Chemistry, v. 50, n. 5, p. 1058. 2007b.
- ROMERO M. D., CALVO L., ALBA C. e DANESHFAR A. **A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane**. Journal of Biotechnology, v. 127, n. 2, p. 269, 2007.
- ROMERO M. D., CALVO L., ALBA C., HABULIN M., PRIMOŽIČ M. e KNEZ Ž. **Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide**. The Journal of Supercritical Fluids, v. 33, n. 1, p. 77, 2005a.
- ROMERO M. D., SOTELO J. L. e DÍAZ-SUELTO B. **Effect of acid and alcohol chain length on the enzymatic synthesis of short-chain ésters in supercritical carbon dioxide**. Journal of Biotechnology, 2005b.
- ROSSET I. G., CAVALHEIRO M. C. H., ASSAF E. M. e PORTO A. L. **Enzymatic esterification of oleic acid with aliphatic alcohols for the biodiesel production by *Candida antarctica* lipase**. Catalysis Letters, v. 143, n. 9, p. 863, 2013.
- RUEDA N., DOS SANTOS C. S., RODRIGUEZ M. D., ALBUQUERQUE T. L., BARBOSA O., TORRES R. e FERNANDEZ-LAFUENTE R. **Reversible immobilization of lipases on octyl-glutamic agarose beads: A mixed adsorption that reinforces enzyme immobilization**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 128, n. 1, p. 10, 2016.
- RUIZ M., GALVIS M., BARBOSA O., ORTIZ C., TORRES R. e FERNANDEZ-LAFUENTE R. **Solid-phase modification with succinic polyethyleneglycol of aminated lipase B from *Candida antarctica*: Effect of the immobilization protocol on enzyme catalytic properties**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 87, n. 1, p. 75, 2013.
- SALIHU A., ALAM M. Z., ABDULKARIM M. I. e SALLEH H. M. **Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues**. Resources, Conservation and Recycling, v. 58, n. 1, p. 36, 2012.
- SALLEH Z., STEWART J. e MANSON S. **In The Impact Of Board Composition and Ethnicity On Audit Quality: Evidence From Malaysian Companies**. Malaysian Accounting Review, v. 5, n. 2, 2016.

- SALUM T. F. C., BARON A. M., ZAGO E., TURRA V., BARATTI J., MITCHELL D. A. e KRIEGER N. **An efficient system for catalyzing éster synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain.** Biocatalysis and Biotransformation, v. 26, n. 3, p. 197, 2008.
- SANCHETI S. V. e GOGATE P. R. **A review of engineering aspects of intensification of chemical synthesis using ultrasound.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 36, n. 1, p. 527, 2017.
- SANTIN C., DE OLIVEIRA D., DE OLIVEIRA J. V. e DALLA ROSA C. **Estudo das Lipases Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozym 435 para a produção de biodiesel.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 2, p. 10392, 2015.
- SANTOS F. A., DE QUEIRÓZ J. H., COLODETTE J. L., FERNANDES S. A., GUIMARÃES V. M. e REZENDE S. T. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol.** Química Nova, v. 35, n. 5, p. 1004, 2012.
- SANTOS J. C., BUENO T., ROS P. C. M., CASTRO H. F. **Lipase-catalyzed synthesis of butyl esters by direct esterification in solvent-free system.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, n.1, v. 82, p. 956-, 2007.
- SANTOS T., BONOMO R., FRANCO M., FINOTELLI P. e AMARAL P. **Purificação de lipase produzida a partir *yarrowia lipolytica* por meio sistema aquoso bifásico e ultrafiltração.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 2, p. 1018, 2015.
- SBARDELOTTO R. C. **Síntese de Butanoato de Geranila (Aroma de Cereja) via Esterificação Enzimática em Sistema Livre de Solvente Orgânico.** Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI - Erechim, Erechim, RS, Brasil, 2015.
- SCHREIBER S., THIEFES A., SCHULDT U., DÄHNE L., SCHEPER T. e BEUTEL S. **New application of depth filters for the immobilization of *Candida antarctica* lipase B.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 101, n. 2, p. 599, 2017.
- SCHWAB W., DAVIDOVICH-RIKANATI R. e LEWINSOHN E. **Biosynthesis of plant-derived flavor compounds.** The Plant Journal, v. 54, n. 4, p. 712, 2008.
- SERRA S. **Recent advances in the synthesis of carotenoid-derived flavours and fragrances.** Molecules, v. 20, n. 7, p. 12817, 2015.
- SERRANO-ARNALDOS M., MÁXIMO-MARTÍN M. F., MONTIEL-MORTE M. C., ORTEGA-REQUENA S., GÓMEZ-GÓMEZ, E. e BASTIDA-RODRÍGUEZ J. **Solvent-free enzymatic production of high quality cetyl ésters.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 39, n. 4, p. 641, 2016.
- SHARMA R., CHISTI Y. e BANERJEE U. C. **Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases.** Biotechnology Advances, v. 19, n. 8, p. 627, 2011.
- SHARMA S. e KANWAR S. S. **Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications.** The Scientific World Journal. 2014.
- SHELDON R. A. **Enzyme immobilization: the quest for optimum performance.** Advanced Synthesis and Catalysis, v. 349, n. 8, p. 1289, 2007.
- SHELKE N. B., JAMES R., LAURENCIN C. T. e KUMBAR S. G. **Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering.** Polymers for Advanced Technologies, v. 25, n. 5, p. 448, 2014.
- SHIH, I. L. Hung S. H. CHEN F. Y., JU H. Y. e SHIEH C. J. **Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-menthyl butyrate by *Candida rugosa* lipase.** Food Chemistry, v. 100, p. 1223, 2007.

- SHU C., CAI J., HUANG L., ZHU X. e XU Z. **Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 72, n. 3, p. 139, 2011.
- SILVA C. S. P., SILVA-STENICO M. E., FIORE M. F., DE CASTRO H. F. e DA RÓS P. C. M. **Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942 (*cyanobacterium*) to be used as feedstock for biodiesel production.** Algal Research, v. 3, p. 1, 2014a.
- SILVA M. A., TAVARES M. I. B., NASCIMENTO S. A. M. e RODRIGUES E. J. R. **Caracterização de nanocompósitos de poliuretano/montmorilonita organofílica por RMN de baixo campo.** Polímeros, v. 22, p. 481, 2012b.
- SILVA M. F., GOLUNSKI S. M., RIGO D., MOSSI V., DI LUCCIO M., MAZUTTI M. A., OLIVEIRA D., OLIVEIRA J. V. e TREICHEL H. **Fructooligosacharides production in aqueous medium with inulinase from *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 immobilized and treated in pressurized CO₂.** Food and Bioproducts Processing, v. 91, n. 4, p. 647, 2012a.
- SILVA M. F., RIGO D., MOSSIA V., DALLAGO R. M., HENRICKA P., KUHNA G. O. DE, ROSA D. C., OLIVEIRA D., OLIVEIRA J. V. e TREICHEL, H. **Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam.** Food and Bioproducts Processing, v. 91, n. 1, p. 54, 2013a.
- SILVA M. V., BASSUT J. F., JUNIOR I. I., DE SOUZA S. P., ESTRADA M. L., MIRANDA L. S. e DE SOUZA, R. O. **Lipase immobilization towards improved productivity on kinetic resolutions by a continuous-flow process.** Royal Society of Chemistry, v. 5, n. 124, p. 102409, 2015.
- SILVA N. C., MIRANDA J. S., BOLINA I. C., SILVA W. C., HIRATA D. B., DE CASTRO H. F. e MENDES A. A. **Immobilization of porcine pancreatic lipase on polyhydroxybutyrate particles for the production of ethyl ésters from macaw palm oils and pineapple flavor.** Biochemical Engineering Journal, v. 82, n.1, p. 139, 2014b.
- SILVA P. P. **Estudo termodinâmico e experimental da produção de hidrogênio a partir das reações de reforma a vapor e oxidativa do gás liquefeito de petróleo usando precursores do tipo Perovskita.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2014.
- SILVA W. C. **Produção enzimática de biodiesel a partir de óleos láuricos em reatores de leito fixo duplo estágio incorporando coluna extratora do glicerol formado como subproduto.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brasil, 2013b.
- SILVEIRA C. **Síntese enzimática de ascorbil oleato em sistema assistido por ultrassom.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 2015.
- SIM J. E., ASADUZZAMAN A. K. M., KIM R. H. e CHUN B. S. **Effect of reaction rate on converted products from wheat germ oil by immobilized lipase ethanolysis.** Food Science and Biotechnology, v. 22, n. 2, p. 295, 2013.
- SINDIGAS - Estatísticas. Disponível em: www.sindigas.com.br. Acesso em 25 de abril de 2016.
- SINGH M. K., SINGH J., KUMAR, M. e THAKUR I. S. **Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 110, n. 1, p. 92, 2014.

- SINGH P., SAXENA D. K. e NAIK S. N. **Synthesis of food flavors by enzymatic esterification process.** International Journal of Science and Research, v. 3, n. 9, p. 2113, 2014.
- SOUZA R. L., VENTURA S. P., SOARES C. M., COUTINHO J. A. e LIMA Á. S. **Lipase purification using ionic liquids as adjuvants in aqueous two-phase systems.** Green Chemistry, v. 17, n. 5, p. 3026, 2015.
- SOUZA R. O. e MIRANDA L. S. **Reações Sob Fluxo Contínuo: da Química Verde a um Processo Verde.** Revista Virtual de Química, v. 6, n. 1, p. 34, 2013.
- SRIVASTAVA S., MADRAS G. e MODAK J. **Esterification of myristic acid in supercritical carbon dioxide.** Journal Supercritics Fluids, v. 77, n. 1, p. 55, 2002.
- STROHALM H., DOLD S., PENDZIALEK K., WEIHER M. e ENGEL K. H. **Preparation of passion fruit-typical 2-alkyl éster enantiomers via lipase-catalyzed kinetic resolution.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 58, n. 10, p. 6328, 2010.
- SU E. e WEI D. **Improvement in biodiesel production from soapstock oil by one-stage lipase catalyzed methanolysis.** Energy Conversion and Management, v. 88, n. 1, p. 60, 2014.
- SUBHEDAR P. B. e GOGATE P. R. **Ultrasound assisted intensification of biodiesel production using enzymatic interesterification.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 29, n. 1, p. 67, 2016.
- SUBHEDAR P. B., BOTELHO C., RIBEIRO A., CASTRO R., PEREIRA M. A., GOGATE P. R. e CAVACO-PAULO A. **Ultrasound intensification suppresses the need of methanol excess during the biodiesel production with Lipozyme TL-IM.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 27, n. 1, p. 530, 2015.
- SUN J., JIANG Y., ZHOU L. e GAO J. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption in organic medium.** New Biotechnology, v. 27, n. 1, p. 53, 2010.
- SUN Y. S. e XU Y. **Membrane-bound “synthetic lipase” specially cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation.** Bioresouce Technology, v. 100, p. 1336, 2009.
- SUSLA M., NOVOTNY C. e SVOBODOVÁ K. **The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures.** Bioresource Technology, v. 98, n. 11, p. 2109, 2007.
- SYAMSUL K. M. W., ALINA M. R. S., SITI S. O., HANINA M. N., BASYARUDDIN M. A. R. e JUSOFF K. **Green synthesis of lauryl palmitate via lipase-catalyzed reaction.** Journal World Applied Science, v. 11, n. 4, p. 401, 2010.
- TACIAS-PASCACIO V. G., PEIRCE S., TORRESTIANA-SANCHEZ B., YATES M., ROSALES-QUINTERO A., VIRGEN-ORTÍZ J. J. e FERNANDEZ-LAFUENTE R. **Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity.** Royal Society of Chemistry, v. 6, n. 102, p. 100281, 2016.
- TALBERT J. N. e GODDARD J. M. **Enzymes on material surfaces.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. v. 8, n. 1, p. 93. 2012.
- TAN T., LU J., NIE K., DENG L. e WANG F. **Biodiesel production with immobilized lipase: a review.** Biotechnology Advances, v. 28, n. 5, p. 628, 2010.
- TAN T., NIE K. e WANG F. **Production of biodiesel by immobilized *Candida* sp. lipase at high water content.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 128, n. 2, p. 109, 2006.

- TANASKOVIĆ S. J., JOKIĆ B., GRBAVČIĆ S., DRVENICA I., PRLAINOVIĆ N., LUKOVIĆ N. e KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ Z. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on kaolin and its application in synthesis of lipophilic antioxidants.** v. 135, n. 1, Applied Clay Science, 2016.
- TAVARES G. R., GONÇALVES J. E., DOS SANTOS W. D. e DA SILVA C. **Enzymatic interesterification of crambe oil assisted by ultrasound.** Industrial Crops and Products, v. 97, p. 218, 2017.
- TEPE O. e DURSUN A. Y. **Combined effects of external mass transfer and biodegradation rates on removal of phenol by immobilized *Ralstonia eutropha* in a packed bed reactor.** Journal of Hazardous Materials, v. 151, n. 1, p. 9, 2008.
- TODERO L. M., BASSI J. J., LAGE F. A., CORRADINI M. C. C., BARBOZA J. C., HIRATA, D. B. e MENDES A. A. **Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 38, n. 8, p. 1601, 2015.
- TOMIN A., HORNYÁNSZKY G., KUPAI K., DORKÓ Z., ÜRGE L., DARVAS F. e POPPE L. **Lipase-catalyzed kinetic resolution of 2-methylene-substituted cycloalkanols in batch and continuous-flow modes.** Process Biochemistry, v. 45, n. 6, p. 859, 2010.
- TOMKE P. D. e RATHOD V. K. **Ultrasound assisted lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification reaction in a solvent free medium.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 27, n. 1, p. 241, 2015.
- TORRES M. G., FORESTI M. L. e FERREIRA M. L. **CLEAs of *Candida antarctica* lipase B (CALB) with a bovine serum albumin (BSA) cofeeder core: study of their catalytic activity.** Biochemical Engineering Journal, v. 90, n. 1, p. 36, 2014.
- TRAN D. T. e CHANG J. S. **Kinetics of enzymatic transesterification and thermal deactivation using immobilized *Burkholderia* lipase as catalyst.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 37, n. 3, p. 481, 2014.
- TRBOJEVIĆ IVIĆ J., VELIČKOVIĆ D., DIMITRIJEVIĆ A., BEZBRADICA D., DRAGAČEVIĆ V., GAVROVIĆ JANKULOVIĆ M. e MILOSAVIĆ N. **Design of biocompatible immobilized *Candida rugosa* lipase with potential application in food industry.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 1, n. 1, 2016.
- TRENTIN C. M., SCHERER R. P., DALLA ROSA C., TREICHEL H., OLIVEIRA D. e OLIVEIRA J. V. **Continuous lipase-catalyzed esterification of soybean fatty acids under ultrasound irradiation.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 37, n. 5, p. 841, 2014.
- ULKER C., GOKALP N. e GUVENILIR Y. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CALB) on surface-modified rice husk ashes (RHA) via physical adsorption and cross-linking methods.** Biocatalysis and Biotransformation, v. 1, n. 1, p. 2016.
- UPPENBERG J., OEHRNER N., NORIN M., HULT K., KLEYWEGT G. J., PATKAR S. e JONES T. A. **Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols.** Biochemistry, v. 34, n. 51, p. 16838, 1995.
- UPPENBERG J., PATKAR S., BERGFORS T. e JONES T. **Alwyn. Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*.** Journal of Molecular Biology, v. 235, n. 2, p. 790, 1994.
- VALDEZ-PEÑA A. U., ESPINOZA-PEREZ J. D., SANDOVAL-FABIAN G. C., BALAGURUSAMY N., HERNANDEZ-RIVERA A., DE-LA-GARZA-RODRIGUEZ I. M.

- e CONTRERAS-ESQUIVEL J. C. **Screening of industrial enzymes for deproteinization of shrimp head for chitin recovery.** Food Science and Biotechnology, v. 19, n. 2, p. 553, 2010.
- VALÉRIO A., NICOLETTI G., CIPOLATTI E. P., NINOW J. L., ARAÚJO P. H., SAYER C. e DE OLIVEIRA D. **Kinetic study of *Candida antarctica* lipase B immobilization using poly (methyl methacrylate) nanoparticles obtained by miniemulsion polymerization as support.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 175, n. 6, p. 2961, 2015.
- VARMA M. N. e MADRAS G. **Effect of chain length of alcohol on the lipase-catalyzed esterification of propionic acid in supercritical carbon dioxide.** Applied biochemistry and biotechnology, v. 160, n. 8, p. 2342, 2010.
- VARMA M. N., DESHPANDE P. A. e MADRAS G. **Synthesis of biodiesel in supercritical alcohols and supercritical carbon dioxide.** Fuel, v. 89, n. 7, p. 1641, 2010.
- VED J. J. e PAI J. S. **Preparation of short chain ésters by the lipase from *Mucor miehei* using heptane and silica gel.** Biotechnology Techniques, v. 10, n. 11, p. 855, 1996.
- VELASCO-LOZANO S., LÓPEZ-GALLEGO F., VÁZQUEZ-DUHALT R., MATEOS-DÍAZ J. C., GUISÁN J. M. e FAVELA-TORRES E. **Carrier-free immobilization of lipase from *Candida rugosa* with polyethyleneimines by carboxyl-activated cross-linking.** Biomacromolecules, v. 15, n. 5, p. 1896, 2014.
- VELJKOVIĆ V. B., AVRAMOVIĆ J. M. e STAMENKOVIĆ O. S. **Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: State of the art and the perspectives.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 16, n. 2, p. 1193, 2012.
- VENTURA S. P., SOUSA S. G., FREIRE M. G., SERAFIM L. S., LIMA Á. S. e COUTINHO J. A. **Design of ionic liquids for lipase purification.** Journal of Chromatography B, v. 879, n. 26, p. 2679, 2011.
- VESCOVI V., KOPP W., GUISÁN J. M., GIORDANO R. L., MENDES A. A. e TARDIOLI P. W. **Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino-glutaraldehyde spacer arms.** Process Biochemistry, v. 51, n. 12, p. 2055, 2016.
- VILAR W. D. **Química e tecnologia dos poliuretanos.** Rio de Janeiro, disponível em <http://www.poliuretanos.com.br>, acesso em 28 de fevereiro de 2016.
- VILLENEUVE P. **Lipases in lipophilization reactions.** Biotechnology Advances. v. 25, n. 6, p. 515, 2000.
- WAGHMARE A. G., SALVE M. K., LEBLANC J. G. e ARYA S. S. **Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*.** Bioresources and Bioprocessing, v. 3, n. 1, p. 16, 2016.
- WAGHMARE G. V. e RATHOD V. K. **Ultrasound assisted enzyme catalyzed hydrolysis of waste cooking oil under solvent free condition.** Ultrasonics sonochemistry, v. 32, n. 1, p. 60, 2016.
- WAGHMARE G. V., VETAL M. D. e RATHOD V. K. **Ultrasound assisted enzyme catalyzed synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 22, n. 1, p. 311, 2015.
- WANG C. F., ZHOU G. W., LI Y. J., LU N., SONG H. B. e ZHANG L. **Biocatalytic esterification of caprylic acid with caprylic alcohol by immobilized lipase on amino-functionalized mesoporous silica.** Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 406, n. 1, p. 75, 2012.

- WANG J., GU S. S., CUI H. S., WU X. Y. e WU F. A. **A novel continuous flow biosynthesis of caffeic acid phenethyl éster from alkyl caffeate and phenethanol in a packed bed microreactor.** Bioresource Technology, v. 158, n. 1, p. 39, 2014.
- WANG S. S., LI Z. J., SHENG S., WU F. A. e WANG J. **Microfluidic biocatalysis enhances the esterification of caffeic acid and methanol under continuous-flow conditions.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 91, n. 2, p. 555, 2016.
- WEGNER J., CEYLAN S. e KIRSCHNING A. **Ten key issues in modern flow chemistry.** Chemical Communications, v. 47, n. 16, p. 4583, 2011.
- WIMMER Z. e ZAREVÚCKA M. **A review on the effects of supercritical carbon dioxide on enzyme activity.** International Journal of Molecular Sciences, v. 11, n. 1, p. 233, 2010.
- WOLFSON A., ATYYA A., DŁUGY C. e TAVOR D. **Glycerol triacetate as solvent and acyl donor in the production of isoamyl acetate with *Candida antarctica* lipase B.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 33, n. 3, p. 363, 2010.
- WON J. H., KIM J. W., KOH G. W. e LEE J. Y. **Evaluation of hydrogeological characteristics in Jeju Island.** Korea. Geosciences Journal. v. 9, n. 1, p. 33, 2005.
- WORLD FLAVOURS e FRAGRANCES MARKET. IAL Consultants CP House, Uxbridge Road Ealing, London W5 5TL UK, p. 97, 2013. Disponível em: <http://www.reportlinker.com>. Acesso em: janeiro de 2017.
- XIAO Z., HOU X., LYU X., ZHAO J. Y., XI L., LI J. e LU J. R. **Enzymatic synthesis of aroma acetoin fatty acid ésters by immobilized *Candida antarctica* lipase B.** Biotechnology Letters, v. 37, n. 8, p. 1671, 2015.
- XU WANG D., MU X. Q., ZHAO G. A. e ZHANG K. C. **Biosynthesis of ethyl ésters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase.** Journal Molecular Catalysis B: Enzyme, v. 18, n. 1, p. 29, 2002.
- XU Z. P. e CHUANG K. T. **Effect of internal diffusion on heterogeneous catalytic esterification of acetic acid.** Chemical Engineering Science, v. 52, n. 17, p. 3011, 1997.
- YADAV G. D. e BORKAR I. V. **Kinetic and mechanistic investigation of microwave-assisted lipase catalyzed synthesis of citronellyl acetate.** Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 48, n. 17, p. 7915, 2009.
- YADAV G. D. e DEVENDRAN S. **Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous medium.** Process Biochemistry, v. 47, n. 3, p. 496, 2012.
- YADAV G. D. e DHOOT S. B. **Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 57, n. 1, p. 34, 2009.
- YADAV G. D. e LATHI P. S. **Microwave assisted enzyme catalysis for synthesis of n-butyl dipheyl methyl mercapto acetate in non-aqueous media.** Clean Technologies and Environmental Policy, v. 9, n. 4, p. 281, 2007.
- YADAV G. D. e THORAT P. A. **Microwave assisted lipase catalyzed synthesis of isoamyl myristate in solvent-free system.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 83, n. 1, p. 16, 2012.
- YAN J., ZHENG X. e LI S. **A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase:**

- preparation, characterization and application in biodiesel production.** Bioresource Technology, v. 151, n. 1, p. 43, 2014.
- YANG F. e RUSSELL A. J. **The role of hydration in enzyme activity and stability: 2. Alcohol dehydrogenase activity and stability in a continuous gas phase reactor.** Biotechnology and Bioengineering, v. 49, n. 6, p. 709, 1996b.
- YANG W. S., NOH J. H., JEON N. J., KIM Y. C., RYU S., SEO J. e Seok S. I. **High-performance photovoltaic perovskite layers fabricated through intramolecular exchange.** Science, v. 348, n. 6240, p. 1234, 2015.
- YANG Z. e RUSSELL A. J. **Fundamentals of non-aqueous enzymology.** In Enzymatic Reactions in Organic Media, Springer Netherlands, v. 1, n. 1, p. 43, 1996.
- YOSHIDA A., HAMA S., TAMADANI N., NODA H., FUKUDA H. e KONDO A. **Continuous production of biodiesel using whole-cell biocatalysts: sequential conversion of an aqueous oil emulsion into anhydrous product.** Biochemical engineering journal, v. 68, n. 1, p. 7, 2012.
- YU D., TIAN L., WU H., WANG S., WANG Y., MA D. e FANG X. **Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435.** Process Biochemistry, v. 45, n. 1, p. 519, 2010.
- YU J., MOHAWED S. M., BHATNAGAR D. e CLEVELAND T. E. **Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*.** Journal of applied microbiology, v. 95, n. 6, p. 1334, 2003.
- ZAGO E. C. **Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, SC, 2010.
- ZAWADZKI R. A. F. D. O. **Desenvolvimento de processo contínuo de pré-hidrólise enzimática de efluente com elevado teor lipídico.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, UFPR, PR, Brasil, 2011.
- ZENEVICZ M. C. P. **Uso de Ultrassom para a Produção de Biodiesel em Modo Contínuo Utilizando Lipases.** Blucher Chemical Engineering Proceedings. v. 1, n. 2, p. 8010, 2015.
- ZHANG T. C. e NAKAJINA M. **Advances in applied biotechnology.** Springer, v. 1, n. 1, 2015.
- ZHANG Y., GE J. e LIU Z. **Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes.** American Chemical Society Catalysis, v. 5, n. 8, p. 4503, 2015.
- ZHAO T., KIM B. H., HONG S. I., YOON S. W., KIM C. T., KIM Y. e KIM I. H. **Lipase-Catalyzed Production of Pinolenic Acid Concentrate from Pine Nut Oil Using a Recirculating Packed Bed Reactor.** Journal of food Science, v. 77, n. 2, p. C267, 2012.
- ZHAO X., BANSODE S. R., RIBEIRO A., ABREU A. S., OLIVEIRA C., PARPOT P. e CAVACO-PAULO A. **Ultrasound enhances lipase-catalyzed synthesis of poly (ethylene glutarate).** Ultrasonics Sonochemistry, v. 31, v. 1, p. 506, 2016.
- ZHAO X., QI F., YUAN C., DU W. e LIU D. **Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 44, n. 1, p. 182, 2015.
- ZHENG M. M., LU Y., DONG L., GUO P. M., DENG Q. C., LI W. L. e HUANG F. H. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol ésters.** Bioresource Technology, v. 115, n. 1, p. 141, 2012.

CAPÍTULO VIII

8. APÊNDICES

Capítulo I

Apêndice 1.1 - Suportes utilizados para imobilização de lipase CALB.

Tipo de Suporte	Autores
Nanotubos de Carbono (MWCNTS) e Filme de Amido de Batata; Fibra de Coco Verde e Agregados Reticulados (CLEAS); Immobead e Celite, Resina Macroporosa Poliestirênica (Purolite® A109), Octil-glioxil agarose e Membrana Tubular α Alumina.	Lozano et al. (2004), Brígida et al. (2010), Chávez et al. (2013), Raghavendra et al. (2013), Mihailović et al. (2014) e Rueda et al. (2016).
Filmes de Caseinato de Sódio com Glicerol Plastificante, Polietileniminas (PEIs), Nanopartículas (metacrilato de metila) (PMMA) e de poli (ureia-uretano), Titanossilicato Lamelar (AM-1) em Celulose, Nka-9, metacaulina e Accurel 1000 (núcleo-casca (poli (metacrilato de metila) casca (PMMA/PMMA), poli (metacrilato de metila-co-divinilbenzeno) casca (PMMA -co-DVB/PMMA-co-DVB) e poli (estireno-co-divinilbenzeno) concha (PS-co-DVB/PS-co-DVB).	Silva (2012), Cipolatti et al. (2014), Velasco-Lozano et al. (2014), Valério et al. (2015), Manoel et al. (2016) e Tanasković et al. (2016).
Esferas Porosas de Estireno-Divinilbenzeno, Géis de Agarose com Polietilenimina e Nanopolisterase Hidrofóbica, Tio ₂ (Dióxido De Titânio), Polímero em Gel , Membrana, Resina (LEWATIT OC 1600), grupos Octilas (suportes monofuncionais) e grupos Undecanol-glioxilas Octil-Epóxido (suportes heterofuncionais), Glicoxil-Octil Agarose (OCGLX) e Gel de Sílica Mesoporosa.	Linqiu et al. (2009), Foresti et al. (2010), Hernandez e Fernandes Laflaute (2011), Boros et al. (2013), Guajardo et al. (2015), Hirata et al. (2016) e Rueda et al. (2016)
Silicato Mesoporosa (MPS), Santa Barbara amorporos (SBA), Nitrila com sílica (CNS), Mobil com Matter (MCM), Grânulos Manae-Agarose (Gluta), Nanoargilas Esmectítica, Polipropileno Poroso, Tresylated Sepharose (4B), Epoxi com Sepharose e Sílica.	Netto et al. (2009), Aikaterini et al. (2010) e Forde et al. (2010)
Poliacrilato Macroporoso e R1, Eupergit C e Resina Macroporosa, Polipropileno, Poliamida, Celulose, Nanotubos de Carbono Carboxilados (SWCNTCOOH), Itrocelulose e Alumina	Lozano et al. (2004), Sun et al. (2010), Jun et al. (2013), Poojari e Clarson (2013), Frampton e Zelisko

Membrana Cerâmica.	(2014), Ruiz et al. (2013) e Bencze et al. (2016)
Resina de Poli Hidrófila Macroporosa, Argilas Nano-Argilas de Esmeclite, Carvão Ativado, Resina Acrílica Macroporosa, Lewatit (OC 1600), Organo com sepiolita e montmorilonita, e VP Resina Divinil Benzeno (N435).	Kramer et al. (2010), Kappor e Gupta (2012), Chávez et al. (2013), Cunha et al. (2014), Array et al. (2016) e Öztürk et al. (2016).
Lewatit OC 1600 (N435), Lewatit, Epoxyactivated Sepharose, Tresylated Sepharose, Silica (TCT), Alumina (TCT), Metil-Si, Etil-Si, Butil-Si, Octil-Si, Octadecil-Si, Cianopropil-Si, Carboxilic-Si, Agarose Heterofuncional Octil-Glutâmico (OCGLU) e octil-agarose (OC).	Lozano et al. (2007), Peirce et al. (2016) e Rueda et al. (2016).
Resina Acrílica de Lewatit, Sílica (MS 3030) e Polipropileno (Accurel EP100), Polímero Lactido e Monômeros Glicólido (PURASORB), Poli-Hidroxibutirato-Co-Hidroxivalerato (PHBV), Sol Gel, Membrana Cerâmica Composta de Polímero (Imina Gelatina / Polietileno), Resina Aniônica Hidrofóbica Purolite® (MN102), Nanopartículas de magnetita com quitosana (CHIT) e, glutaraldeído (GLUT).	Magnan et al. (2004), Päiviö et al. (2012), Fernandes et al. (2014), Čorović et al. (2017) e Nicolás et al. (2017).
Nanopartículas magnéticas (MNPs) (Fe ₃ O ₄ - casca de sílica (Fe ₃ O ₄ @ SiO ₂ e 3-glicidoxipropil) Trimetoxilsilano (GPTMS), Silsesquioxanos Oligoméricos de Quitina-Poliédrico (POSS), silanização de sílica com Trietoxi (Octil) Silano E Trietoxi (3-Aminopropil) com Glutaraldeído, aminopropiltriatoxissilano (APTS), Nanofibras de Poli (Álcool Vinílico) (PVA) e Microgéis.	Engel et al. (2016), Ulker et al. (2016), Vescovi et al. (2016) e Mehrasbi et al. (2017)
Lifetech™ (ECR1061M) (Polímero de Estireno / Metacrílico), Lifetech™ (ECR8804M) (Metacrilato de Octadecilo), Lifetech™ (ECR8806M) (Metacrilato de Octadecilo), Lifetech™ (ECR1090M) (Estireno), Lifetech™ (ECR1030M0) (Polímero DVB / Metacrílico), Polímeros de Aminoalquilo Mesoporoso Poliacrilato - Aminoalquilo (Etilamina: EA e Hexilamina: HA) e Poliuretano.	Abaházi et al. (2016). Basso et al. (2016), Nyari et al. (2016) e Tacias-Pascacio et al. (2016)

*Realizados pelo autor.

Apêndice 1.2 - Síntese de ésteres submetidos ao sistema de agitação ultrassônica.

Enzima	Temp. (°C)	ME (mg/mL)	T. (h/min)	Produto (%)	Autor
<i>Staphylococcus simulans</i>	-	-	-	50% acetato de hexila e valerato de etila	Lerin et al. (2011a,b)
<i>Crambe abyssinica</i> H.	-	20	6 h	10% ésteres metílicos de ácidos graxos	Tavares et al. (2017)
<i>Candida</i> sp. 99-125	60	20	1 h	85,7% ésteres de fitoésterol	Zheng et al. (2012)
			-	93,5% fitoésterol com óleo de cozinha	
			-	91,7% fitoésterol com óleo de linhaça	
			10 h	92,5% fitoésterol com óleo de girassol	
			-	90,3% fitoésterol com óleo de girassol	
CALB™ 10000 (<i>Candida antarctica</i> lipase B)	60	5	30 min	95,96% oleato de cetila	Khan et al. (2015)
	60	5	30 min	95% oleato de cetila	Khan et al. (2015)
CALB	-	-	1 h	94% de hidrólise de óleo de soja	Liu et al. (2008)
	-	6	20 min	85,6% de oleato de cetila para biodiesel	Adewale et al. (2015)
	-	6	20 min	96,8% biodiesel	Adewale et al. (2016)
<i>Candida antarctica</i>	40	-	1	96,77% de poli (etileno glutarato)	Zhao et al. (2016)
<i>Candida rugosa</i> / microemulsão	-	-	-	90% éster de valerato pentila	Raghavendra et al. (2014)
<i>Candida rugosa</i>	-	0,23	1,5 h	biodiesel com óleo de canola e metanol	Bhangu et al. (2016)
<i>Rhizopus oryzae</i> / octadecil sepabeads	-	-	24 h	99,1% de butanoato de etila	Guillén et al. (2012)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL-IM)	30	-	6 h	90% de butanoato de etila	Paludo et al. (2015)
	40	6	24 h	90,1% de biodiesel	Subhedar e Gogate (2016)
		3	3 h	96,1% acetato de metila	
Lipozyme RM e Novozym 435	50	3	7 h	94% tricaprilina a base de glicerol	More et al. (2017)
Lipozyme (TL - IM)	30	35	6 h	61% de síntese de butanoato de etila	Paludo et al. (2015)

Lipozyme-435, Novozyme-435 e <i>Thermomyces lanuginosus</i>	50	-	45 min	90% de hidrólise de triacilgliceróis (TAGs)	Omar et al. (2016)
<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme RM IM)	50	12	4 h	73% de 1,3-dioleoil-2-palmitoilglicerol (OPO)	Liu et al. (2015)
Novozym 435 e Lipozyme IM RM	60	-	4 h	90% de óleo de soja com o etanol	Batistella et al. (2012a)
	60		4 h	90% de óleo de soja com o etanol	Batistella et al. (2012b)
	70	5	3 h	27% de palmitato de ascorbila	Martins et al. (2011b)
Novozym - 435	-	-	-	90% de acetato de butila	
	60	1	6 h	99% de acetato de eugenila	Chiaradia et al. (2012)
	46	7	2,5 h	94% de acetato de butila	Martins et al. (2013)
	-	-	10 h	95,2% de fenetila	Chen et al. (2012)
	60	13	4 h	99,75% de carbonato de glicerol	Waghmare et al. (2015)
	60	2	10 h	83% e 96% de butanoato de isoamila	Bansode et al. (2016)
	40	0,4	10 min	90% de ácido palmítico e álcool lauril	Syamsul et al. (2010)
	60	2	10 h	83% de butanoato de isoamila	Bansode e Rathod (2014)
	40	6	2 h	90% de álcool terc-amílico, óleo de soja e metanol	Yu et al. (2010)
	40	5	60 min	27% palmitato de ascorbilo	Lerin et al. (2011b)
	65	15	4 h	16% de benzoato de 1-glicerol	
	50	15	12 h	40% de benzoato de 1-glicerol	
	30	-	2 h	53% e 100% de citronelol laurato	Yadav e Lathi (2007)
	60	1	6 h	99% de acetato de eugenila	
	70	20	12 h	87% de ascorbil oleato	Balen et al. (2015)
	50	0,4	5-10 min	95% de oleato de etila	Mat Radzi et al. (2005a,b)
	40	6	2 h	90% de álcool terc-amílico, óleo de soja e metanol	Yu et al. (2010)

Novozym - 435	40	7,5	2,5 h	90% de acetato de butila	Martins et al. (2011b)
	50	0,4	5-10 min	95% de oleato de etila	Mat Radzi et al. (2005a)
	70	20	12 h	87% de ascorbil oleato	Balén et al. (2015a)
	70	5	12 h	87% de oleato de ascorbila	
	65	-	30 min	70% de ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE)	Michelin et al. (2015)
	50	1,25	2 h	75,19% de hidrólise de óleo de cozinha usado (WCO)	Waghmare et al. (2016)
	40	-	20 min	99% acetato de isoamila	Tomke e Rathod (2015)

*Realizados pelo autor. Parâmetros fixos: Temp. (°C) = Temperatura (°C); ME = Massa de Enzima (g/% ou mg/mL ou g/L) e T = Tempo (horas/minutos).

Onde: Lipozyme RM IM (imobilizado em resina de permuta aniônica) de *Rhizomucor miehei*, Lipozyme TL IM (imobilizado em gel de sílica) de *Thermomyces lanuginosus*, Novozym 435 (imobilizado em resina poliacrílica) de *Candida antarctica* (Novozymes), CALB (*Candida antarctica B*) e *Candida antarctica* imobilizada em dimetacrilato de metacrilato de glicidilo-ter-divinilbenzeno-ter-etileno glicol.

Apêndice 1.3 - Síntese de ésteres submetidos ao sistema de fluxo contínuo.

Enzima	Produto (%)	Autores
Novozym 435	93,21% de cafeato de metila (CAPE - ácido cafeico (CA) e 2-feniletanol (PE))	Wang et al. (2014)
	98% de oleato de isoamila (ácido oleico e álcool isoamílico)	Madarasz et al. (2015)
	80% de biodiesel	Azócar et al. (2014)
	98,45% de cafeato de metila (ácido cafeico e metanol)	Wang et al. (2016)
	98,1% de biodiesel	Fidalgo et al. (2014)
	97% de biodiesel	Santin et al. (2015)
Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozym 435	90% de biodiesel a partir de óleo ácido oleico	Pereira et al. (2016)
<i>Mucor circinelloides</i> URM 4182	96% de biodiesel da transesterificação do óleo de coco	Faria (2014)
<i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM	90 e 96% de pré-hidrólise de óleos e graxas (O&G)	Zawadzki (2011)
<i>Candida parapsilosis</i> imobilizada em resinas sintéticas (Accurel MP1000 e Lewatit VP OC 1600)	97% de biodiesel a partir de óleo de semente de cardo (<i>Cynara cardunculus</i> , L.)	Bule (2014)
<i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA	52,2% de síntese de monogliceróis (MAGs) de óleo e glicerol	Bôas (2014)
linhagens fúngicas <i>Myceliophthora sp</i> e <i>Thermomyces lanuginosus</i> TO-05	90 e 99% de biodiesel (transesterificação de óleos vegetais com etanol anidro)	Ohe (2011)
<i>Candida antarctica</i> B (CALB)	99% organogéis - MBGs	Itabaiana Junior et al. (2014)
<i>Burkholderia cepacia sp.</i>	67% de biodiesel	Tran et al. (2014)
	86,7% de hidrólise do tributirato de glicerila (tributirina)	Lv et al. (2014)
	87% de biodiesel	E Silva et al. (2014)

*Realizados pelo autor.

Tabela 1.4 - Síntese de ésteres por via enzimática.

Enzima	Ésteres	Autores
Novozym 435 (poliacrílico pérolas de resina macro-poroso), Lipase DSM 43304, Lipozyme RM-I, Lipozyme CALBL, Lipase HPL, Lipolase 100T, Lipozyme RM-IM (formaldeído), Lipozyme TL-IM (sílica) e <i>Candida rugosa</i> (nanopartículas de sílica)	acetato de isoamila, acetato de pentila, acetato de butila, butirato de pentila, propionato de isobutila e butanoato de etila e metila, iso-valerato de etila, octanoato de isoamila e acetato de geranila	Romero et al. (2005 b), Ozyilmaz e Gezer (2010); Valdez-Peña et al. (2010), Dheeman et al. (2011), Jin et al. (2012), Yadav e Thorat (2012), Azudin et al. (2013); Dandavate et al. (2013) e Martins et al. (2013)
Novozym 435, Lipases pancreática, <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Rhizopus oligosporus</i> NRRL 5905 e <i>Rhizopus oryzae</i>	acetato de butila, butanoato de isoamila, acetato de vinila, butanoato de geranila, octanoato de heptila, acetato de butila e acetato de propila	Mahapatra et al. (2009), Eisenmenger e Reyes-De Corcuera (2010), Martins et al. (2011a), Gumel et al. (2012), Kuo et al. (2012) e Friedrich et al. (2013)
Lipozyme Novozym 435, <i>Rhizomucor miehei</i> Lipozyme RMIM (<i>Rhizomucor miehei</i>) e CALB	acetato e valerato de hexila, acetato de geranila, isovalerato de isoamila, galactato (dimetilsulfóxi), eugenol benzoato, n-butil tigolato e geranil tigolato, oleato de galactose, etila, lactose, sucrose e frutose, miristil frutose, maltose e finila	Chaabouni et al. (2006), Dia et al. (2010), Horchani et al. (2010), Gumel et al. (2011), Chen et al. (2012), Neta et al. (2012) e Mohd Saupia et al. (2012)
<i>Mucor sp</i> , Novozym 435, CALB	caproato de etila, butil, butanoato, caproato, laurato de cinamila, decil butanoato, hexanoato e octanoato acetato	Abbas e Comeau (2003), Oliveira et al. (2009), Yadav e Dhoot (2009) e Strohalm et al. (2010)
Lipase <i>Mucor miehei</i> (imobilizada em pérolas de resina), Novozym 435, Lipozyme TL IM Lipase PPL (poli-hidroxibutirato – PHB), <i>Candida rugosa</i> (quitosana), Lipozyme IM 20, Lipozyme TL IM e Novozym SP 435	butanoato de butila	Yadav e Dhoot (2009), Aragão et al. (2010), Shu et al. (2011), Paludo (2014) e Xiao et al. (2015)

CALB, <i>Rhizomucor miehe</i> , <i>Candida sp.</i> , Lipozyme, <i>Candida sp.</i> e <i>Rhizopus oryzae</i>	oleato de etila, cetila, palmitato de etila, oleato de octil, éster de vitamina A	Li et al (2011), Kuo et al (2012) e Martins et al (2013)
Lipases M (LM), AK Amano 20 (LAK20), OS Amano SD, <i>Rhizopus sp.</i> ; Lipozyme IM; lipase pancreatica, lipase HPL Novozym 435, PS Amano IM, LCR e lipase LPS	acetato de cinamoila, benzoato de metila, isovalerato, propionato, isobutanoato e butanoato de isoamila e hexonoato de etila	Yadav e Lathi (2007) e Ledra et al. (2009), Aragao et al. (2011)
Novozym 435, Lipozyme TL-IM (TLL), CALB e Lipozyme RM-IM (RML)	transesterificação de óleo de oliva e óleo de palma, etanoato de vinila, propanoato de etila, butanoato de etila, decanoato, dodecanoato e propenoato de etila	Cvjetko et al. (2012), Poppe et al. (2015) e Lotti et al. (2015)
CALB, <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , CALB, <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Candida rugosa</i> e Novozyme 435	ésteres cinamicos, cumários e ferúlico, laurato de vinila,-butil hidrocínato, citronela laurato e acetato de cinamila e acetato de geranila	Priya e Chadha (2003), Yadav e Borkar (2009), Yadav et al. (2009), Martins et al. (2013) e Grosso et al. (2013)
Lipozyme TL IM, CALB, Novozyme 435 e <i>Rhizopus arrhizus</i>	hexil laurato, palmito de glicerol, palmitato de glicerol, oleato de frutose, férrico, cafeico, acético, lacilato propila, metil cafeato, cinâmico octanol e laurato de citronela	Chang et al. (2007), Katsoura et al. (2009), Bouaziza et al. (2011) e Kurataa et al. (2011)
Novozyme 435, lipase pancreática II e Lipase SP – 435, <i>Rhizopus chinesis</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Candida rugosa</i> e <i>Rhizopus oligosporus</i> , Lipozyme TL IM e <i>Candida sp.</i> 99	metacrilato de celulose e glicose, laurato e palmitato de frutose, acetil frutose e glicose, acetato de vinila, acetil frutose e butanoato de etila, fenila, butil hidrocínato, hexanoato de etila, valerato de etila, biodiesel, fenitila e cafeato de metila	Xu et al. (2002), Priya et al. (2003), Raghavendra et al. (2010), Bouaziza et al. (2011), Kurataa et al. (2011), Jang et al. (2012) e Zhao et al. (2012)

*Realizados pelo autor.

Tabela 1.5 - Exemplos de lipases aplicadas na síntese de ésteres de acetato e butanoato.

Enzima	Temp. (°C)	ME (mg/mL)	T. (h/min)	Produto (%)	Autor
Ésteres de acetato					
Novozym 435	30	12	8 h	75	Guvenç et al. (2007)
	40	5,04	3 h - hexano	100	Romero et al. (2007a)
	-	-	2 h	100	Romero et al. (2007a)
	43,2	8,15	5,27 h	25	Güvenç et al. (2007)
	40	11,4	2 h - hexano	100	Romero et al. (2007b)
	40	5,04	24 h - hexano	10	Romero et al. (2005a)
	40	5,04	24 h - hexano	25	
	40	5,04	24 h - hexano	50	
	40	5	3 h	10	Romero et al. (2005b)
	40	5	3 h	95	
	40	5	4 h	30	
	60	10	24 h	24	Macedo et al. (2004)
	40	7,5	2,5 h	9	Martins (2012)
	46	7	2,5 h	94	
	46	0,25	2,5 h	96	Martins et al. (2013)
	40	0,2	20 min	99	Tomke e Rathod (2015)
	130	-	300 min	94	Afshar et al. (2015)
	60	2	3 h	96	Bansode e Rathod (2014)
	60	2	10 h	83	
	40	7,5	2,5 h	91,5	Martins et al. (2011)
<i>Crude HPL - hog</i>	35	20	12 h	40	Karagoz et al. (2010)
<i>pancreas</i>	30	125	5 h	77,1	Silva et al. (2013)
<i>Burkholderia cepacia</i> (BCL)	50	30	3 h	99,98	Mathpati et al. (2016)

<i>Rhizomucor miehe</i> <i>Mucor miehe</i> (RML)	55	-	24 h	40	Srivastava et al. (2002)
	60	-	48 h - heptano	53	Ved e Pai (1996)
	-	-	72 h - hexano	95	Hari Krishna et al. (2002)
	60	-	48 h	53	Rodrigues et al. (2010)
	40	-	72 h - heptano	95	Fehèr et al. (2008)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	-	-	50 min	96,1	Todero et al. (2015)
	-	-	90 min	73,6	
	-	-	36,5 s - hexano	35	Polona et al. (2009)
	80	10	5 h - triacetin	73	Wolfson et al. (2010)
	-	-	4 - 8 h	75	Güvenç et al. (2007)
Ésteres de butanoato					
Enzima	Temp. (°C)	ME (mg/mL)	T. (h/min)	Produto (%)	Autor
Novozym – 435	60	20	10 h	96	Bansode e Rathod (2014)
	30	-	6 h	56	Yadav e Lathi (2009)
CALB/ (Fe ₃ O ₄) (NPM) CALB	50	40	2 h	80	Brígida et al. (2008)
	50	40	2 h	50	Souza e Miranda (2013)
	60	10	1 h	96	
	-	-	3 h	96	Bansode et al (2016)
	-	-	3 h	96	
<i>Candida rugosa</i>	37	31,7	8,7 h	72,6	Shih et al. (2007)
<i>B. cepacia</i>	50	-	8,7 h	72,6	
(PPL)\(PHB)	-	-	2 h	93	Silva et al. (2014b)
<i>Rhizopus oryzae</i>	30	7,5	24 h	99,1	Guillén et al. (2012)
<i>Rhizopus sp</i>	-	-	48 h	47	Grosso et al. (2013)
	-	-	48 h	75	Macedo et al. (2004)

* Realizados pelo autor. Parâmetros fixos: Temp. (°C) = Temperatura (°C); ME = Massa de Enzima (g/% ou mg/mL ou g/L) e T = Tempo (horas/minutos).

Apêndice 1.6 - Exemplos de lipases aplicadas na síntese de ésteres de oleato.

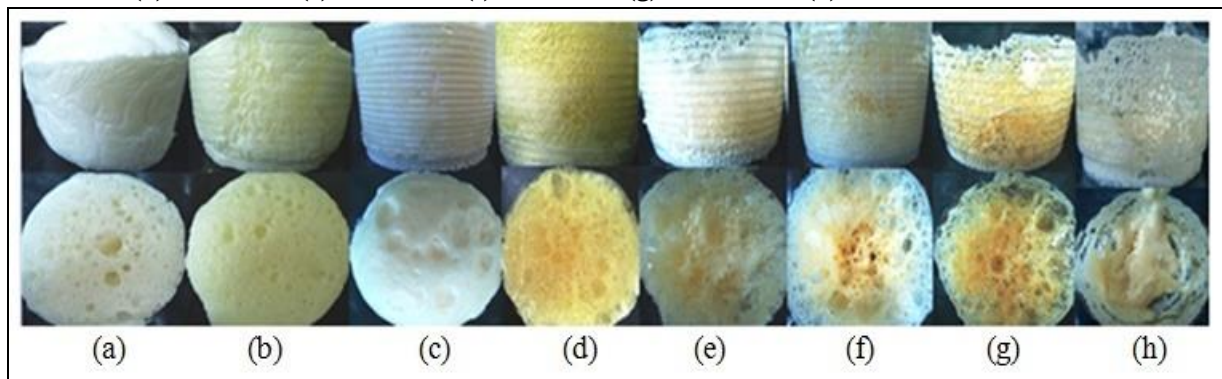
Enzima	Temp. (°C)	ME (mg/mL)	T. (h/min)	Produto (%)	Autor
CALB	-	25	72 h	93 e 99% de ésteres metílicos	Poppe et al. (2013a)
	-	-	4 h	72 e 29% de biodiesel	Poppe et al. (2013b)
Novozym – 435	-	-	1 h	94% de hidrólise de óleo de soja	Liu et al. (2008)
	-	-	2 h	64% de hidrólise de óleo de soja	
	55	10	96 h	7,8% de oleato de etila	Neta et al. (2012)
	-		5 min	90% oleao de etila com hexano	Mat Radzi et al. (2005a,b)
	-	25	72 h	93 e 99% de ésteres metílicos	Poppe et al. (2013)
	50	0,4	5 min	95% de oleato de oleíla	Mat Radzi et al. (2005)
	40	6	2 h	90% álcool terc-amílico óleo de soja	Yu et al. (2010)
	30	90	-	90% de oleato de etila	Mat Radzi et al. (2005)b
	40	-	12 h	88% biodiesel com óleo de palma	Halim et al. (2008)
	50	11	8 h	98,1% de biodiesel	Fidalgo et al. (2014)
	50	-	48 h	67,4% biodiesel com óleo soja	Lai et al. (2012)
	37	5		90% de biodiesel	Cervero et al. (2014)
	30	0,5	2 h	90% de biodiesel	Luna et al. (2014)
	-	-	-	95,2% de biodiesel	Su e Wei. (2014)
<i>Rhizomucor miehei</i> (RML)/accurel EP 700	-	-	24 h	57% oleato de etila	Oliveira et al. (2000)
<i>Rhizomucor miehei</i> (RML)/Immobead 150	-	-	4 h	72% e 29% de biodiesel	Poppe et al. (2013b)
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	24 h	66% de oleato de etila	Kantak e Prabhune (2012)
	35	20	-	92% de biodiesel com óleo de <i>Calophyllum inophyllum</i> linn	Arumugam e Ponnusami (2014)

<i>Rhizopus oryzae</i> /Accurel MP 1000	40	-	30 min	34% oleato de etila em n-heptano	Madalozzo et al. (2014)
<i>R. oryzae</i> / CaCO ₃	-	-	50 h	83% de oleato de butila	Ghamgui et al. (2007)
<i>R. oryzae</i> / strain JK-1	-	900	24 h	66% oleato de etila	Kantak e Prabhune (2012)
<i>R. oryzae</i> /fibras de celulose	-	15	4 h	80% de oleato de butila	Karra-Chaâbouni et al. (2008)
lipase (denominado LP@PE)	30	150		87,1% de biodiesel óleo de <i>Jatropha</i>	Jiang et al. (2014)
<i>Rhizomucor miehei</i>	40	-	8 h	99,6% de biodiesel óleo ácido de macauba (<i>Acrocomia aculeata</i>)	Aguieiras et al. (2014)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	-	6	84 h	78% de biodiesel	Yan et al. (2014)
Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozym 435	-	0,3	24h	>60% de biodiesel	Pereiraa et al. (2016)
<i>Candida</i> sp. 99	-	-	-	83% biodiesel/oleo de cozinha	Deng et al. (2003)
	-	-	-	88,5% biodiesel/óleo de palma	Tan et al. (2006)
<i>Candida</i> sp.	-	75	12 h	87,4% biodiesel com óleo de arroz	Li e Zong (2010)
	-	-	12 h	98% biodiesel apartir de <i>Chlorella protothecoides</i>	Li et al. (2007)
	-	-	-	97% biodiesel	
	-	-	-	72,25% biodiesel	
<i>Candida rugosa</i> (formerly <i>Candida cylindracea</i>)	-	18	25 h	70% e 85% biodiesel/oleo palma/etanol e metanol	Nasratun et al. (2009)
<i>Candida rugosa</i> em suporte mesoporoso (mcm 41)	-	0,30	-	52% de biodiesel	De Souza et al. (2015)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	18	3 h	80% hidrolisado com oleo de soja	Meng et al. (2011)
	-			85% esterificação oleo de soja	

* Realizados pelo autor. Parâmetros fixos: Temp. (°C) = Temperatura (°C); ME = Massa de Enzima (g/% ou mg/mL ou g/L) e T = Tempo (horas/minutos).

Capítulo II

Apêndice 2.1 - Aspecto conformacional das espumas de poliuretano formadas empregando diferentes proporções dos monômeros poliál e isocianato, respectivamente, sendo (a) 95 e 5%, (b) 90 e 10%, (c) 75 e 25%, (d) 65 e 35%, (e) 60 e 40%, (f) 50 e 50%, (g) 25 e 75% e (h) 10 e 90%.



Capítulo III

Apêndice 3.1.1 Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador livre para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação mecânica.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t	p
Média	52,9046	0,983745	53,7788	0,000346
T (L)	9,5861	0,603324	15,8889	0,003938
T (Q)	-5,5535	0,719922	-7,7140	0,016393
R (L)	14,4199	0,603324	23,9008	0,001746
R (Q)	-12,2684	0,719922	-17,0413	0,003426
T.R	5,6750	0,851959	6,6611	0,021803

*Parâmetros fixos: massa de substrato (5 g), massa de catalisador livre (0,5 g), tempo de reação (360 min) e 160 rpm de agitação mecânica.

Tabela 3.1.2 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta análise de variância empregando o catalisador livre para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação mecânica.

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F_{calc}
Regressão	3393,23	5	678,65	13,04
Resíduo	260,21	5	52,04	
Erro Puro	5,807	2	2,903	
Total	3647,636	10		

$F_{tab} = 4,01$; $R^2 = 0,96$

Tabela 3.1.3 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo empregando o catalisador imobilizado apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação mecânica.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t	p
Média	87,4462	0,484189	180,6035	0,000031
T (L)	22,3578	0,296949	75,2915	0,000176
T (Q)	-15,6765	0,354338	-44,2416	0,000511
R (L)	13,8184	0,296949	46,5344	0,000461
R (Q)	-12,7591	0,354338	-36,0083	0,000770
T.R	4,2500	0,419325	10,1353	0,009595

*Parâmetros fixos: T = temperatura (°C) e R = razão molar (ácido:álcool). *Nível de significância de 95%.

Apêndice 3.1.4 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação mecânica.

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F_{calc}
Regressão	7371,15	5	1474,23	30,97
Resíduo	238,00	5	47,60	
Erro Puro	1,407	2	0,703	
Total	7607,742	10		

F_{tab} = 4,01; R² = 0,98 *Nível de significância de 95%.

Apêndice 3.1.5 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação ultrassônica.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t	p
Média	93,61011	0,601506	155,6263	0,000041
T (L)	11,68035	0,282637	41,3263	0,000585
T (Q)	-9,73806	0,311375	-31,2743	0,001021
R (L)	7,47303	0,282637	26,4403	0,001427
R (Q)	-4,47658	0,311375	-14,3768	0,004803
P (L)	10,67484	0,282637	37,7687	0,000700
P (Q)	-7,29333	0,311375	-23,4230	0,001818
T.P	-3,67500	0,369121	-9,9561	0,009938
T.R	-3,40000	0,369121	-9,2111	0,011582

*Parâmetros fixos: T = temperatura (°C), R = razão molar (ácido:álcool) e Potência ultrassônica (%). *Nível de significância de 95%.

Apêndice 3.1.6 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de acetato de isoamila em sistema de agitação ultrassônica.

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F_{calc}
Regressão	5693,20	8	711,65	35,27
Resíduo	161,42	8	20,18	
Erro Puro	2,180	2	1,090	
Total	5852,442	16		

F_{tab} = 3,63; R² = 0,98 *Nível de significância de 95%.

Apêndice 3.2.1 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t	p
Média	54,1640	1,091367	49,6295	0,000406
M (L)	13,5971	0,669328	20,3145	0,002414
M (Q)	-10,5025	0,798682	-13,1497	0,005733
T (L)	10,2171	0,669328	15,2648	0,004264
T (Q)	-9,0186	0,798682	-11,2919	0,007752
M.T	4,4500	0,945163	4,7082	0,042272

*Parâmetros fixos: M = Massa de catalisador e T = temperatura (°C). *Nível de significância de 95%.

Apêndice 3.2.2 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F_{calc}
Regressão	3228,86	5	645,77	18,83
Resíduo	171,48	5	34,30	
Erro Puro	7,147	2	3,573	
Total	3393,189	10		

F_{tab} = 4,01; R² = 0,97 *Nível de significância de 95%.

Apêndice 3.2.3 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t	p
Média	63,4457	0,691366	91,7686	0,000119
T (L)	7,4509	0,324861	24,4440	0,001669
T (Q)	-6,1330	0,357892	-17,1363	0,003388
M (L)	10,3342	0,324861	31,8111	0,000987
M (Q)	-10,6504	0,357892	-29,7586	0,001127
P (L)	8,1590	0,324861	25,1154	0,001582
P (Q)	-4,9814	0,357892	-13,9189	0,005122
T.P	4,5000	0,424264	10,6066	0,008772
M.P	-3,0500	0,424264	-7,1889	0,018806

*Parâmetros fixos: M = Massa de catalisador, T = temperatura (°C) e Potência ultrassônica (%). *Nível de significância de 95%.

Apêndice 3.2.4 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F_{calc}
Regressão	4877,98	8	609,75	17,34
Resíduo	281,29	8	35,16	
Erro Puro	2,880	2	1,440	
Total	5156,391	16		

F_{tab} = 3,63; R² = 0,97 *Nível de significância de 95%.

Apêndice 3.3.1 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador livre para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t	p
Média	47,31104	0,982818	48,1382	0,000431
T (L)	6,10020	0,461810	13,2093	0,005682
T (Q)	4,20471	0,508765	8,2645	0,014327
R (L)	6,72754	0,461810	14,5678	0,004679
M (L)	5,38901	0,461810	11,6693	0,007264
M (Q)	7,37577	0,508765	14,4974	0,004724
T.R	-6,13750	0,603117	-10,1763	0,009519
T.M	4,21250	0,603117	6,9845	0,019889

*Parâmetros fixos: T = temperatura (°C), R = razão molar (ácido:álcool) e M = massa de catalisador (g). *Nível de significância de 95%.

Tabela 3.3.2 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta análise de variância empregando o catalisador livre para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F_{calc}
Regressão	2552,99	2751	0,93	1,03
Resíduo	613,03	678	0,90	
Erro Puro	5,820	5,820	2	
Total	3160,198	3429,061	16	

F_{tab} = 3,63; R² = 0,90 *Nível de significância de 95%.

Tabela 3.3.3 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t	p
Média	94,3214	1,034378	91,1867	0,000120
T (L)	18,8846	0,486037	38,8542	0,000662
T (Q)	-7,5169	0,535456	-14,0382	0,005036
R (L)	4,0569	0,486037	8,3470	0,014051
R (Q)	-20,4845	0,535456	-38,2563	0,000683
M (L)	14,7435	0,486037	30,3341	0,001085
M (Q)	-12,7075	0,535456	-23,7321	0,001771
T.R	-3,4625	0,634757	-5,4548	0,032003
T.M	2,9375	0,634757	4,6278	0,043659
R.M	3,5875	0,634757	5,6518	0,029909

*Parâmetros fixos: T = temperatura (°C), M = Massa de catalisador e R = razão molar (ácido:álcool). *Nível de significância de 95%.

Tabela 3.3.4 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação mecânica.

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F _{calc}
Regressão	13597,41	9	1510,82	9,18
Resíduo	1151,70	7	164,53	
Erro Puro	6,45	2	3,223	
Total	14742,66	16		

F_{tab} = 3,63; R² = 0,96 *Nível de significância de 95%.

Apêndice 3.3.5 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de *p* e *t* empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	<i>t</i>	<i>p</i>
Média	94,9947	0,374859	253,4147	0,000016
T (L)	12,6307	0,176140	71,7086	0,000194
T (Q)	-6,9491	0,194049	-35,8112	0,000779
R (L)	3,3314	0,176140	18,9133	0,002784
R (Q)	-18,0390	0,194049	-92,9608	0,000116
P (L)	19,3134	0,176140	109,6483	0,000083
P (Q)	-12,0157	0,194049	-61,9211	0,000261
T.R	-2,5000	0,230036	-10,8679	0,008361
T.P	-4,4750	0,230036	-19,4535	0,002632
R.P	4,2500	0,230036	18,4754	0,002917

*Parâmetros fixos: T = temperatura (°C), R = razão molar (ácido:álcool) e Potência ultrassônica (%). *Nível de significância de 95%.

Apêndice 3.3.6 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta análise de variância empregando o catalisador imobilizado para a síntese de éster de butanoato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F _{calc}
Regressão	11985,48	9	1331,72	20,92
Resíduo	445,66	7	63,67	
Erro Puro	0,85	2	0,423	
Total	12430,29	16		

F_{tab} = 3,63; R² = 0,98 *Nível de significância de 95%.

Capítulo IV

Apêndice 4.2 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t para a catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP).

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t	p
Média	853,631	1,412420	604,375	0,000003
P (L)	-94,589	0,663672	-142,524	0,000049
P (Q)	94,633	0,731153	129,429	0,000060
T (L)	53,732	0,663672	80,961	0,000153
T (Q)	128,239	0,731153	175,393	0,000033
D (L)	-118,837	0,663672	-179,059	0,000031
D (Q)	-57,844	0,731153	-79,113	0,000160
P.T	130,475	0,866747	150,534	0,000044
P.D	51,850	0,866747	59,821	0,000279
T.D	10,325	0,866747	11,912	0,006973

*Parâmetros fixos: P = pressão (bar), T = tempo (minutos) e D = depressurização (kg/m³.min). *Nível de significância de 95%.

Apêndice 4.3 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta análise de variância para a para a catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP).

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F_{calc}
Regressão	890327,08	9	98925,23	9,28
Resíduo	74596,31	7	10656,62	
Erro Puro	12,0	2	6,0	
Total	964911,4	16		

F_{tab} = 3,63; R² = 0,96 *Nível de significância de 95%.

Apêndice 4.3 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de p e t para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de dióxido de carbono (CO₂).

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t	p
P (L)	2458,867	13,68329	179,6985	0,000031
P (Q)	419,975	6,42955	65,3196	0,000234
T (L)	-305,982	7,08329	-43,1978	0,000535
T (Q)	-150,305	6,42955	-23,3773	0,001825
D (L)	-419,999	7,08329	-59,2943	0,000284
D (Q)	-224,359	6,42955	-34,8950	0,000820
P.T	-419,945	7,08329	-59,2868	0,000284
P.D	-72,700	8,39690	-8,6580	0,013079
T.D	-39,025	8,39690	-4,6475	0,043311
R.M	124,550	8,39690	14,8329	0,004514

*Parâmetros fixos: P = pressão (bar), T = tempo (minutos) e D = depressurização (kg/m³.min). *Nível de significância de 95%.

Apêndice 4.4 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2³ completo apresenta análise de variância para a para a catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de dióxido de carbono (CO₂).

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F _{calc}
Regressão	6816952,90	9	757439,21	11,54
Resíduo	459571,21	7	65653,03	
Erro Puro	1128	2	564	
Total	7275396	16		

F_{tab} = 3,63; R² = 0,96 *Nível de significância de 95%.

Apêndice 4.5 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de *p* e *t* para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) para a síntese de ésteres de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	<i>t</i>	<i>p</i>
Média	58,0025	0,664154	87,3329	0,000131
M (L)	-14,4344	0,407321	-35,4375	0,000795
M (Q)	-5,0366	0,486040	-10,3626	0,009184
T (L)	-5,4579	0,407321	-13,3994	0,005524
T (Q)	-8,4318	0,486040	-17,3480	0,003306
M.T	6,6000	0,575181	11,4746	0,007509

*Parâmetros fixos: M = Massa de catalisador e T = temperatura (°C). *Nível de significância de 95%.

Apêndice 4.6 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta análise de variância para a para a catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) para a síntese de ésteres de oleato de etila em sistema de agitação mecânica.

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F _{calc}
Regressão	2515,36	5	503,07	6,36
Resíduo	395,42	5	79,08	
Erro Puro	2,647	2	1,323	
Total	2908,125	10		

F_{tab} = 4,01; R² = 0,92 *Nível de significância de 95%.

Apêndice 4.7 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de *p* e *t* para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) para a síntese de ésteres de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	<i>t</i>	<i>p</i>
Média	73,02167	0,682507	106,9904	0,000087
M (L)	8,46828	0,320698	26,4057	0,001431
M (Q)	-8,74461	0,353306	-24,7508	0,001628
T (L)	2,52785	0,320698	7,8823	0,015717
T (Q)	-5,04209	0,353306	-14,2712	0,004874
P (L)	-4,26096	0,320698	-13,2865	0,005617
P (Q)	-8,67375	0,353306	-24,5502	0,001655
M.T	3,66250	0,418828	8,7446	0,012826
M.P	-4,33750	0,418828	-10,3563	0,009195
T.P	2,18750	0,418828	5,2229	0,034758

*Parâmetros fixos: M = Massa de catalisador, T = temperatura (°C) e P = potência ultrassônica (%). *Nível de significância de 95%.

Tabela 4.8 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta análise de variância para a para a catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) para a síntese de ésteres de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F _{calc}
Regressão	2945,16	9	327,24	5,97
Resíduo	383,96	7	54,85	
Erro Puro	2,807	2	1,4033	
Total	3326,309	16		

F_{tab} = 3,63; R² = 0,94 *Nível de significância de 95%.

Tabela 4.9 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, valores de *p* e *t* para o catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de dióxido de carbono (CO₂) para a síntese de ésteres de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	<i>t</i>	<i>p</i>
Média	75,07083	0,918815	81,7040	0,000150
M (L)	4,04989	0,431736	9,3805	0,011174
M (Q)	-8,16128	0,475634	-17,1587	0,003379
T (L)	11,01636	0,431736	25,5164	0,001532
T (Q)	-9,70252	0,475634	-20,3991	0,002394
P (L)	-3,08249	0,431736	-7,1398	0,019058
P (Q)	-7,31094	0,475634	-15,3709	0,004206
M.T	-7,13750	0,563841	-12,6587	0,006183
M.P	-2,96250	0,563841	-5,2541	0,034368

*Parâmetros fixos: M = Massa de catalisador, T = temperatura (°C) e P = potência ultrassônica (%). *Nível de significância de 95%.

Tabela 4.10 - Tratamento Estatístico segundo o DCCR 2² completo apresenta análise de variância para a para a catalisador imobilizado ativado em fluido pressurizado de dióxido de carbono (CO₂) para a síntese de ésteres de oleato de etila em sistema de agitação ultrassônica.

	Soma Quadrados	Graus Liberdade	Quadrado Médio	Valor F _{calc}
Regressão	4034,01	8	504,25	11,43
Resíduo	352,98	8	44,12	
Erro Puro	5,087	2	2,543	
Total	4381,899	16		

F_{tab} = 3,63; R² = 0,95 *Nível de significância de 95%.