



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA
AFRO-BRASILEIRA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO ACADÊMICO EM SOCIOBIODIVERSIDADE E TECNOLOGIAS SUSTENTÁVEIS -
MASTS**

MAURO MACEDO DE OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO DA BROMELINA A PARTIR DA CASCA DO
ABACAXI (*Ananas comosus*) E SUA IMOBILIZAÇÃO EM
ESFERAS DE HIDROGEL PARA SÍNTESE DE ÉSTERES DE
INTERESSE ENERGÉTICO**

**REDENÇÃO-CE
JUNHO-2016**



UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA
AFRO-BRASILEIRA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO ACADÊMICO EM SOCIOBIODIVERSIDADE E TECNOLOGIAS SUSTENTÁVEIS -
MASTS

MAURO MACEDO DE OLIVEIRA

**EXTRAÇÃO DA BROMELINA A PARTIR DA CASCA DO
ABACAXI (*Ananas comosus*) E SUA IMOBILIZAÇÃO EM
ESFERAS DE HIDROGEL PARA SÍNTESE DE ÉSTERES DE
INTERESSE ENERGÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis (MASTS) da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

**REDENÇÃO-CE
JUNHO-2016**

**Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro- Brasileira
Direção de Sistema Integrado de Bibliotecas da UNILAB (DSIBIUNI)
Biblioteca Setorial Campus Liberdade
Catalogação na fonte**

Bibliotecário: Gleydson Rodrigues Santos – CRB-3 / 1219

O48e Oliveira, Mauro Macedo de.

Extração da bromelina a partir da casca do abacaxi (ananas comosus) e sua imobilização em esferas de hidrogel para síntese de ésteres de interesse energético. / Mauro Macedo de Oliveira. – Redenção, 2016.

100 f.; 30 cm.

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis - MASTS da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira – UNILAB.

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

Inclui figuras, referências e tabelas.

1. Bromelina – Extração. 2. I. Título

CDD

Dedico:

Primeiramente à Deus, por todas as graças que me tem dado e pela força que me dá nos momentos difíceis.

A minha esposa, Erine, companheira de todas as horas, que não me deixa desistir nunca.

Aos meus filhos, Nicolas e Mateus, pois eles são a razão da minha vida

Aos meus pais, pelo esforço de terem me proporcionado a educação para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa a conclusão de uma etapa, gratificante e exaustiva, porém denota o recebimento de um dom: a autodisciplina. Foi com muito esforço e dedicação que consegui a realização desse objetivo, contudo sem a presença e o auxílio de alguns, este êxito não teria sido alcançado. À esses quero expressar reconhecidamente minha gratidão e amizade.

À Deus, inicialmente, por ser o meu guia maior, pela minha existência, alegria, saúde, paz, força e oportunidade que me proporcionou. Por ser onipotente, onisciente e onipresente e assim nunca me desampara.

À minha esposa, Erine Dantas Bezerra, que sempre me incentivou e me ajudou nos momentos de desânimo. Pelos seus conselhos e ajuda na elaboração deste trabalho, pela sua disponibilidade incondicional, pelo seu carinho, apoio e cooperação. Minha eterna gratidão. Amo-te.

À minha irmã Gabriela, meu cunhado Daniel e minha sobrinha Isabel, pela companhia, ajuda e alojamento durante meus experimentos. Meu muito obrigado a vocês.

À todos os professores do mestrado em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira, pela troca de experiência e aprendizado mútuo.

Ao Prof. Rinaldo dos Santos do IFCE, à Prof.(a) Telma da UFC, ao Prof. Marcos Carlos de Mattos da UFC, ao Prof. Diego Lomônaco da UFC, e ao Prof. José Cleiton do DEQ-UFC, por terem cedido espaço para as caracterizações das amostras.

À todos os meus colegas de turma do mestrado, em especial aos que dividiram alojamento, pela amizade, troca de experiências profissionais e pelos papos descontraídos que me revigoravam depois de um dia cansativo de trabalho.

Enfim, para meus pais, pelo esforço e dedicação que me criaram e fizeram de mim um ser humano de bem, e por terem me deixado a herança mais valiosa do mundo: a educação.

“O conhecimento é algo que você compra com dinheiro. A sabedoria é algo que você ganha fazendo.”

Taiichi Ohno.

RESUMO

As lipases podem catalisar além de reações de hidrólise outras reações como a transesterificação. As lipases vegetais desempenham papel importante nesse contexto, uma vez que, apresentam resultados semelhantes aos das lipases microbianas e possuem vantagens na sua obtenção. Portanto, este estudo teve por finalidade a preparação de extratos enzimáticos da casca do abacaxi contendo bromelina, com e sem trituração mecânica, por período de até 9 dias de extração, imobilização destes em esferas de hidrogel e aplicação como biocatalisador na produção de ésteres de interesse energético. Os extratos obtidos foram caracterizados em seu teor de proteína, atividade de hidrólise e atividade de esterificação. O melhor teor de proteínas obtido foi de 1,95 mg/mL de extrato para 6 dias com trituração mecânica, já para a hidrólise do *p*-NPP, 0,0125 U/mL para 1 dia de extração com trituração. O melhor índice de atividade de esterificação alcançado para o ácido láurico como substrato foi de 1,82 U/mL de extrato com 1 dia de extração sem trituração. Realizou-se ainda a imobilização em esferas de hidrogel, obtendo-se rendimento máximo de imobilização em termos de proteína de 28,8% com o extrato de 1 dia e trituração mecânica, e em termos de atividade do *p*-NPP de 40,6% para o imobilizado com extrato de 9 dias sem trituração mecânica. As esferas imobilizadas e desidratadas com extrato de 1 dia sem trituração levou a melhor atividade de esterificação, 7,14 U/g de biocatalisador. O melhor desempenho na biocatálise de ésteres graxos por esterificação foi do dodecanoato de o n-propila, com conversão de 95,1% para um período de 48 horas de reação. Para a reação de transesterificação, o oleato de metila atingiu rendimento de 47,3% para 120 horas de reação.

Palavras chave: Lipase, bromelina, abacaxi, ácidos graxos, transesterificação.

ABSTRACT

The lipases can catalyze hydrolysis reactions as well as other reactions such as transesterification. The plant lipases play an important role in this context, since show similar results to those of microbial lipases and have advantages in its obtention. Therefore, this work aimed to prepare pineapple peel enzyme extract containing bromelain, with and without mechanical grinding for a period of up to 9 days of extraction, immobilization of these extracts in hydrogel beads and application as a biocatalyst in the production of energy interest ester. The extracts were characterized for its protein content, hydrolysis and esterification activity. The best obtained protein content was 1.95 mg/mL for 6 days with mechanical grinding, as for the hydrolysis of *p*-NPP, 0.0125 U/mL for 1 day extraction with trituration. The best index esterification activity achieved for the lauric acid as a substrate was 1.82 U/mL at 1 day extraction without crushing. Still held immobilizing hydrogel beads, obtaining maximum performance in terms of immobilized protein of 28.8% with 1 day extract and mechanical grinding, and in terms of activity of *p*-NPP, the best value was 40.6% with 9 days extract without mechanical grinding. The immobilized and dehydrated balls with 1 day extract without grinding took the best esterification activity, 7.14 U/g of biocatalyst. The better conversion performance in the biocatalysis of fatty esters is by esterification of the dodecanoate *n*-propyl, with 95.1% for a period of 48 hours of reaction. For the transesterification reaction, the methyl oleate yield reached 47.3% for 120 hours of reaction.

Keywords: Lipase, bromelain, pineapple, fatty acids, transesterification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reações catalisadas por lipases do tipo não específicas e 1,3 específicas	20
Figura 2	Estrutura da lipase de <i>pseudomonas aeruginosa</i>	21
Figura 3	Mecanismo de hidrólise da lipase	23
Figura 4	Estrutura terciária da bromelina do talo	31
Figura 5	Estrutura do poliacrilato de sódio e da poliacrilamida	38
Figura 6	Reação geral de transesterificação do triacilglicerol com o metanol	42
Figura 7	Etapas da transesterificação do triacilglicerol	43
Figura 8	Mecanismo de transesterificação alcalina	45
Figura 9	Mecanismo de transesterificação ácida	46
Figura 10	Espectro de absorção na região do infravermelho do poliacrilato de sódio	60
Figura 11	Espectro de absorção na região do infravermelho do hidrogel	60
Figura 12	Esferas de hidrogel hidratadas até seu ponto de equilíbrio	61
Figura 13	Gráfico de crescimento das esferas de hidrogel	61
Figura 14	Extratos enzimáticos da casca do abacaxi – EXT1 (A), EXT2 (B)	62
Figura 15	Padrões de massa molecular das proteínas dos extratos enzimáticos (EXT1 e EXT2)	63
Figura 16	Esferas de hidrogel imobilizadas – IMOB1 (A), IMOB2 (B)	64
Figura 17	Esferas de hidrogel <i>in natura</i> (A), derivado catalítico CAT1 ou CAT2 (B)	64
Figura 18	Rendimento de esterificação do dodecanoato de n-propila, etila e metila	71
Figura 19	Rendimento de transesterificação do oleato de n-propila, etila e metila	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividades de hidrólise catalisadas por lipases vegetais registradas na literatura	26
Tabela 2	Sínteses de ésteres utilizando lipases vegetais como biocatalisador registradas na literatura	28
Tabela 3	Concentração de proteínas dos extratos enzimáticos e das esferas imobilizadas correspondentes	65
Tabela 4	Atividade de hidrólise <i>p</i> -NPP e parâmetros de imobilização para extratos com 1 dia de extração	67
Tabela 5	Atividade de hidrólise <i>p</i> -NPP e parâmetros de imobilização para extratos com 6 dias de extração	67
Tabela 6	Atividade de hidrólise <i>p</i> -NPP e parâmetros de imobilização para extratos com 9 dias de extração	68
Tabela 7	Produtividade de lipase e atividade de esterificação do extrato enzimático, esferas imobilizadas e derivado catalítico	69

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1	Cálculo de c_1 e c_2 do modelo matemático que descreve a hidratação da esferas de hidrogel	86
Apêndice 2	Curva de calibração do método de Bradford	87
Apêndice 3	Curvas de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (Absorbância x tempo)	88
Apêndice 4	Curva para obtenção do coeficiente de extinção molar	94
Apêndice 5	Cromatogramas das reações de esterificação para tempos de 24, 48 e 120 horas	95
Apêndice 6	Cromatogramas das reações de transesterificação para tempos de 24, 48 e 120 horas	98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Objetivos	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Enzimas	18
2.1.1	Lipases	19
2.1.1.1	Mecanismo de hidrólise das lipases	20
2.1.1.2	Aplicações das lipases	23
2.2	Lipases vegetais	24
2.2.1	A bromelina	30
2.3	Imobilização de enzimas	32
2.3.1	Adsorção	34
2.3.2	Ligação covalente	35
2.3.3	Encapsulamento	36
2.4	Polímeros superabsorventes	36
2.5	Ésteres de interesse energético	38
2.5.1	O biodiesel	38
2.5.2	Histórico	39
2.5.3	Matéria-prima	41
2.5.4	Processos de produção do biodiesel	42
2.5.4.1	Catálise alcalina	43
2.5.4.2	Catálise ácida	45
2.5.4.3	Catálise enzimática	46
2.5.5	Substratos alcóolicos	48
3	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1	Material	50
3.1.1	Casca, substratos e esferas de hidrogel	50
3.1.2	Reagentes	50
3.2	Métodos	50
3.2.1	Caracterização das esferas de hidrogel	50

3.2.2	Estudo da hidratação das esferas de hidrogel	51
3.2.3	Assepsia das cascas	51
3.2.4	Preparação dos extratos enzimáticos	52
3.2.5	Caracterização dos extratos enzimáticos	52
3.2.6	Imobilização do extrato enzimático nas esferas de hidrogel	52
3.2.7	Desidratação das esferas imobilizadas	53
3.2.8	Determinação da concentração de proteínas	53
3.2.9	Hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> -NPP)	54
3.2.10	Parâmetros de imobilização	55
3.2.10.1	Rendimento de imobilização em termos de proteína	55
3.2.10.2	Rendimento de imobilização em termos de atividade	55
3.2.11	Determinação da atividade de esterificação	56
3.2.11.1	Produtividade (P)	57
3.2.12	Aplicação das lipases da casca do abacaxi imobilizadas para produção de ésteres	57
3.2.12.1	Reação de esterificação para os dodecanoato e $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}_3\text{H}_7$	57
3.2.12.2	Reação de transesterificação para os oleatos e $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{C}_3\text{H}_7$	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Caracterização das esferas de hidrogel	59
4.2	Hidratação das esferas de hidrogel	60
4.3	Preparação, caracterização e imobilização do extrato enzimático	62
4.4	Concentração de proteína	64
4.5	Atividade de hidrólise: palmitato de <i>p</i> -nitrofenila (<i>p</i> -NPP)	66
4.6	Atividade de esterificação	68
4.7	Produção de ésteres (esterificação e transesterificação)	69
5	CONCLUSÃO	73
6	REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

A partir da Revolução Industrial cresceu a competitividade econômica entre os países bem como a qualidade de vida dos seus cidadãos. Tais fatores são fortemente influenciados pela energia, o que levou a uma demanda cada vez maior desse recurso nos últimos séculos. O Brasil vivenciou tal fenômeno no início do século XX, porém seu apogeu ocorreu nos anos 1970 com a explosão demográfica acompanhada de uma maior taxa de urbanização e aumento da atividade industrial (TOLMASQUIM; GUERRERO; GORINI, 2007).

Grande parte da energia que a humanidade necessita, com exceção da energia hidroelétrica e nuclear, está baseada no petróleo, carvão e gás, que são notadamente fontes não renováveis (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998).

O Diesel de petróleo, por exemplo, ocupa uma posição muito importante na economia industrial de um país. Os transportes de mercadorias ou pessoas, as unidades de geração de energias termelétricas, equipamentos agrários, equipamentos de mineração são movidos por este combustível. Logo, existe uma relação direta entre o consumo de diesel de uma nação e o seu desenvolvimento econômico (SRIVASTANA; PRASAD, 2000).

Nações que se posicionem em relação a fontes energéticas de baixo custo, renováveis e de baixo impacto ambiental obterão diversas vantagens competitivas (TOLMASQUIM; GUERRERO; GORINI, 2007). Assim, é de vital importância a busca de substitutos aos derivados de petróleo (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998; SRIVASTANA; PRASAD, 2000).

O biodiesel, derivado de fonte renovável, é um possível substituto natural do Diesel de petróleo e pode ser obtido a partir da transesterificação de óleos vegetais e/ou gorduras animais (SRIVASTANA; PRASAD, 2000), nesse processo são empregados álcoois mono-hidroxilados de cadeia curta na presença de um catalisador que pode ser homogêneo, heterogêneo ou enzimático (RAMOS et al., 2011).

A rota de produção do biodiesel por via enzimática utiliza as lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) cuja função biológica é hidrolisar óleos e gorduras liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol livre (RAMOS et al., 2011).

Paques e Macedo (2006) esclarecem que, além da hidrólise, as lipases também podem catalisar outros tipos de reações químicas como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), aminólise (síntese de amidas) e lactonização. Estes

mesmos autores caracterizam as lipases como sendo de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (bactérias e fungos) e vegetal (caule, folha, látex e frutos), com variação em suas propriedades catalíticas.

A produção de lipases via micro-organismos exibe elevados rendimentos (MATEOS DIAZ et al., 2006). Desta forma, resultados animadores têm sido obtidos em sistemas biocatalíticos para produção de biodiesel, sobretudo aqueles com lipases microbianas imobilizadas (MARDER et al., 2008). Por exemplo, utilizando estes parâmetros, Dosanjh e Kaur (2002) obtiveram conversões de 98% em 8 horas de reação.

A técnica de imobilização de enzimas desperta muito interesse, principalmente pela necessidade de evitar problemas que os ambientes adversos causam às enzimas na forma livre (MARDER et al., 2008). A imobilização normalmente aprimora a estabilidade térmica e química das lipases. Em parte, isto impede o efeito desnaturante da temperatura, pH e solventes (KNIGHT et al., 2000). A possibilidade de reciclagem do biocatalisador também torna atrativa a forma imobilizada, visto que, vários métodos de imobilização são viáveis no caso das lipases (MARDER et al., 2008).

As lipases microbianas possuem uma vasta aplicação industrial, no entanto, o alto custo de produção aparece como inconveniente. Isto posto, o interesse pelo uso de lipases vegetais em processos industriais têm crescido nos últimos anos. As lipases das plantas apresentam a vantagem de possuir alta disponibilidade e fácil extração a partir da biomassa dos vegetais, e sem a necessidade de tecnologias complicadas para produzi-las (MOUNGUENGUI et al., 2013).

Ocorre que muitas dessas biomassas vegetais são resíduos de processamento, cuja gestão, vem desafiando e mobilizando diversos segmentos de mercado. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias têm se preparado para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

Várias substâncias de alto valor agregado podem ser extraídas de resíduos, caso seja empregado uma tecnologia apropriada. Esse material pode ser convertido diretamente no produto de interesse ou em matéria-prima para processos secundários (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003). No caso das lipases vegetais, são geralmente obtidas na forma de extrato bruto, parcialmente purificado, ou purificadas a partir de diferentes métodos de extração e separação (MOUNGUENGUI et al., 2013).

O Abacaxi (*Ananas comosus*) está entre as frutas mais produzidas no Brasil. A

área exata de cultivo e os volumes de produção são difíceis de se determinar, pois grande parcela da produção ocorre em pequenas propriedades para o autoconsumo, ou venda nos mercados locais. Em termos de volumes totais é a fruta mais importante. Na última década, a produção variou entre 2,2 e 2,7 Mt, com uma produção média nos últimos anos chegando a 2,5 Mt. A perspectiva é que este número aumente para 2,9 Mt até 2024 acompanhando o aumento da demanda interna, pois as exportações encolheram para virtualmente zero (OCDE-FAO, 2015). Rogério et al. (2007) estimam que no processamento do abacaxi, do total de frutos após prensagem, 75 – 85% resulta em suco e 15 – 25% são resíduos do processo. Ademais, Ketnawa; Chaiwut e Rawdkuen (2012) concluíram em seu estudo que a casca do abacaxi é o resíduo de maior potencial para a extração da bromelina, uma vez que a casca, constitui a maior proporção dos resíduos de processamento do abacaxi.

Dentro dessa perspectiva, a casca do abacaxi possui potencial para uma bioutilização, em especial como fonte de lipases, visto que é uma fruta abundante e deveras consumida, e que, a bromelina possui a capacidade de catalisar reações de transesterificação. Assim, o presente trabalho busca subsídios que possam apoiar o desenvolvimento de um biocatalisador heterogêneo, formado pela bromelina da casca do abacaxi, imobilizada em esferas de hidrogel, para síntese de ésteres de interesse energético.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

- Sintetizar ésteres por esterificação e transesterificação utilizando o derivado catalítico formado pelo extrato da casca do abacaxi imobilizado em esferas de hidrogel.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obter extratos enzimáticos a partir da casca do abacaxi;
- Caracterizar os extratos da casca do abacaxi obtidos;
- Imobilizar os extratos enzimáticos em esferas de hidrogel para formar um derivado catalítico;
- Avaliar os parâmetros de imobilização no sistema extrato enzimático – hidrogel.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

O termo enzima tem origem do grego e significa “em levedura”, sua descoberta remonta ao século XVIII quando se iniciaram os estudos sobre a digestão dos alimentos. No século XIX, houve uma controvérsia entre Pasteur e Liebig, o primeiro afirmava que a fermentação estaria obrigatoriamente associada às células vivas, nesse sentido ele estabeleceu o conceito de que as enzimas seriam células vivas. Já Liebig acreditava que a fermentação fosse provocada por substâncias químicas. Buchner acabou com essa questão ao demonstrar a possibilidade de fermentação com ausência de célula viva (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002).

As enzimas possuem função de catalisar reações biológica através da ligação ou quebra de moléculas para criar novos compostos. Estas se combinam temporariamente com os reagentes para produzir um estado de transição com energia de ativação suficiente para romper ou constituir uma ligação química. Este estado ativado possui energia menor do que aquele sem a presença das enzimas obteria (LEHNINGER, 1976). Desta forma a enzima busca um caminho alternativo para a reação na qual a energia de ativação é menor. A principal vantagem no uso de enzimas é o aumento da velocidade das reações, a qual pode ser 10^6 a 10^{12} vezes superior que as reações não catalisadas (TORRES, 2001).

A estrutura das enzimas apresenta forma complexa e são constituídas em grande parte por proteínas, porém, algumas outras substâncias podem estar associadas, tais como carboidratos e lipídios (NELSON; COX, 2011). Algumas enzimas, denominadas apoenzimas, dependem apenas da sua própria estrutura proteica para apresentar atividade catalítica, outras, chamadas de coenzimas, necessitam que substâncias menores estejam presentes no meio para participar das reações. Estas substâncias são chamadas de cofatores, que por sua vez podem ser íons inorgânicos ou moléculas orgânicas (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002; NELSON; COX, 2011; VESCOVI, 2012).

Segundo relatórios publicados, periodicamente, pela Business Communications Company Inc. (BCC Research), o mercado mundial de enzimas está em grande ascensão. Este movimentou cerca de US\$ 3,1 bilhões em 2009, US\$ 3,6 bilhões em 2010, US\$ 3,9 bilhões em 2011, US\$ 4,5 bilhões em 2012 e quase US\$ 4,8 bilhões em 2013. Os relatórios preveem

alcançar valores da ordem de US\$ 6,0 bilhões em 2016 e US\$ 7,1 bilhões em 2018. A taxa de crescimento é estimada em 8,2% ao ano entre 2013 e 2018. As enzimas para alimentos e bebidas compreendem a maior parte desse segmento, seguido por indústria têxtil e produtos de limpeza.

O emprego dessas substâncias em química analítica, medicina, agricultura, tecnologia de alimentos e estudos ambientais tem tido grande relevância em virtude de sua alta seletividade e poder catalítico (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002).

2.1.1 Lipases

O nome recomendado pela *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) é triacilglicerol lipase. O nome da classificação é EC 3.1.1.3, onde: O primeiro dígito: 3, classe hidrolase; o segundo dígito: 1, subclasse esterase; o terceiro dígito: 1, sub-subclasse éster carboxílico hidrolase; o quarto dígito: 3, triacilglicerol lipase.

As lipases podem ser de origem animal, vegetal e microbiana (PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003; PAQUES; MACEDO, 2006; MARDER et al., 2008; ANTCZAK et al., 2009; PATIL, CHOPDA; MAHAJAN, 2011). No passado eram preferencialmente obtidas do pâncreas de animais e utilizadas para ajudar na digestão dos humanos (FROST; MOSS, 1987).

Nos últimos anos, Carvalho et al. (2003) perceberam uma maior predominância dos microrganismos como sendo a principal fonte das preparações enzimáticas comerciais, isto em função de possuírem maior facilidade no controle dos processos fermentativos, no isolamento e na purificação. Dentro dessa mesma linha, Pastore, Costa e Koblitz (2003), também consideram as lipases microbianas como sendo as de maior importância, devido ao seu maior potencial de produção em larga escala em comparação com as outras fontes de lipases.

Mesmo com uma vasta variedade de lipases de origem microbiana, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é escasso, devido aos elevados custos de produção (CARVALHO et al., 2003; PAQUES; MACEDO, 2006). Mais recentemente estudos de fontes vegetais como sementes, látex, folhas e caule, têm crescido. Dentre as lipases vegetais, as mais estudadas são as extraídas de cereais e óleos de sementes, localizadas em diferentes

tecidos e normalmente ativadas durante a germinação (PAQUES; MACEDO, 2006).

Segundo Macrae e Hammond (1985); Carvalho et al. (2003); Castro et al. (2004); Paques e Macedo (2006), as lipases possuem especificidade em relação à molécula do substrato, podendo ser classificadas em três grupos:

- Regiosseletivas

Lipases não específicas - hidrolisam moléculas de triacilglicerol, produzindo monoacilglicerol, diacilglicerol, glicerol e ácido graxo.

Lipases 1,3 específicas - hidrolisam apenas os ácidos graxos das posições 1 e 3 dos triacilgliceróis.

- Seletivas

A lipase é específica ao comprimento da cadeia ou à presença da dupla ligação na cadeia do resíduo de ácido graxo.

- Enantioseletivas

Lipases com habilidades de discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica. Esta propriedade está relacionada com a natureza quiral das enzimas, ou seja, da sua simetria estrutural, que limita a ação em substratos que não satisfaçam determinadas relações espaciais. Desta forma a enantioseletividade das lipases pode variar com o substrato.

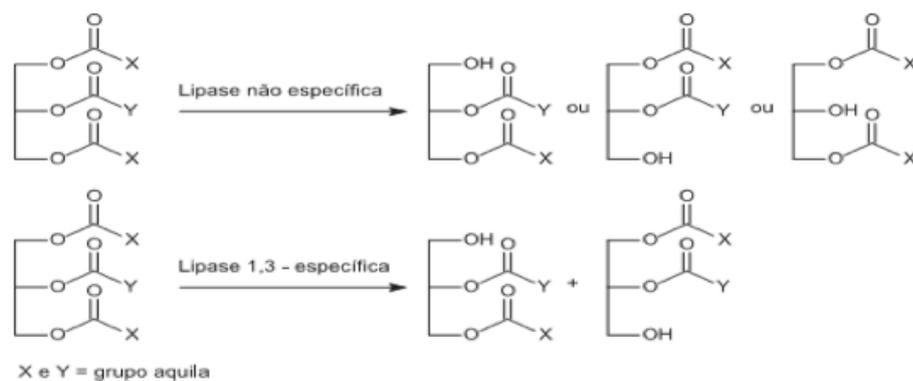


Figura 1. Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica (PAQUES; MACEDO, 2006).

2.1.1.1 Mecanismos de hidrólise das lipases

As lipases são enzimas com atuação particular, o sítio ativo é normalmente formado por uma tríade, composta por aminoácidos serina (Ser), histidina (His) e ácido aspárgico (Asp) ou glutâmico (Glu). Os complexos acil-enzima são intermediários cruciais

em todas as reações catalisadas por lipases. As estruturas tridimensionais (3D) das lipases passaram a ser elucidadas a partir de 1990, com exceção da lipase pancreática, todas as outras estudadas foram de origem microbiana. Estas enzimas, com variação de peso molecular entre 19 a 60 kDa, exibem um padrão de dobragem característico conhecido como a dobra α/β – hidrolase. O núcleo da lipase é formado por uma folha β central consistida de até oito cadeias β diferentes ($\beta 1 - \beta 8$) ligadas por até seis hélices α (A-F). A estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* é mostrada na Figura 2, num modelo construído usando coordenadas de raio-X. Cadeias β são representadas como setas (vermelho escuro) e hélices α como bobinas (azul ou amarelo); a hélice amarela poderia formar uma 'tampa' sobre o local ativo (JAEGER; REETZ, 1998; JAERGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; CASTRO et al.; 2004). É mostrado na Figura 2 a tríade do sitio ativo Ser82, His251 e Asp229 rotuladas. A posição de um íon Ca^{2+} é indicado por uma bola verde.

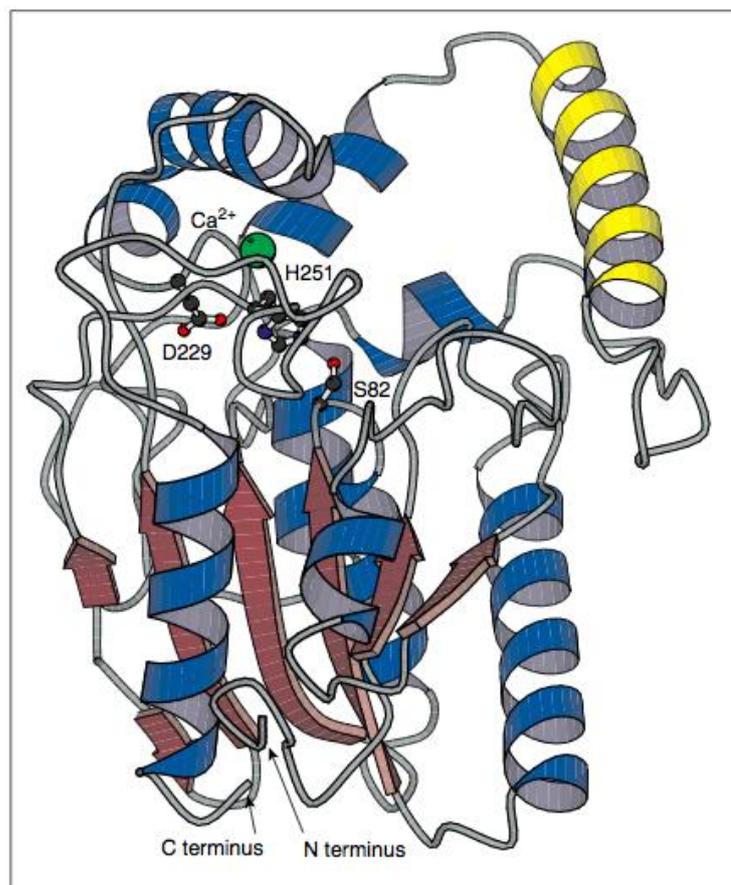


Figura 2. Estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* (JAEGUER; REETZ, 1998).

Devido à semelhança estrutural dos seus sítios ativos, Jaerger, Dijkstra e Reetz (1999) e Reis et al. (2009), relatam que as lipases seguem o mesmo mecanismo catalítico das

proteases. O mecanismo se mostra análogo àquele que foi proposto para a quimotripsina, uma serina protease. O mecanismo é mostrado na Figura 3.

O processo começa com o ataque do átomo de oxigênio da hidroxila do resíduo nucleofílico da serina ao átomo de carbono da carbonila do éster. Um intermediário tetraédrico transiente é formado. Este é caracterizado pela carga negativa no átomo de oxigênio da carbonila da ligação éster cindível. Quatro átomos ligam-se ao carbono da carbonila e rearranjam-se como um tetraédro.

O intermediário é estabilizado por grupos peptídicos NH, onde ligações de hidrogênio entre o oxigênio carregado negativamente e pelo menos duas cadeias principais de grupos NH são formadas. Um dos grupos NH é proveniente do resíduo da serina nucleofílica, e o outro, proveniente do final da cadeia β 3.

A nucleofilicidade do ataque da serina é aprimorada pela histidina, para a qual um próton do grupo hidroxila da serina é transferido. Este próton é transferido facilmente pela presença de um catalisador ácido, que orienta precisamente o anel imidazol da histidina e neutraliza parcialmente a carga que este desenvolve. Subsequentemente, o próton é doado para o oxigênio da ligação susceptível do éster, que em seguida, é clivada. Nesse estágio, o componente ácido do substrato é esterificado pela serina nucleofílica, enquanto o álcool se difunde.

O passo seguinte é a desacilação, na qual a molécula de água hidrolisa o intermediário covalente. O sítio ativo da histidina ativa a molécula de água pela extração de seu próton. Ocorre a formação do íon OH^- , que ataca o átomo de carbono da carbonila do grupo acila que foi atacado pela serina. Novamente um intermediário tetraédrico é formado, e este é estabilizado pela interação com o oxianion. A histidina doa um próton para o átomo de oxigênio do sítio ativo da serina, que por sua vez libera o componente acila. Após a difusão do produto acila, a enzima está pronta para um novo ciclo.

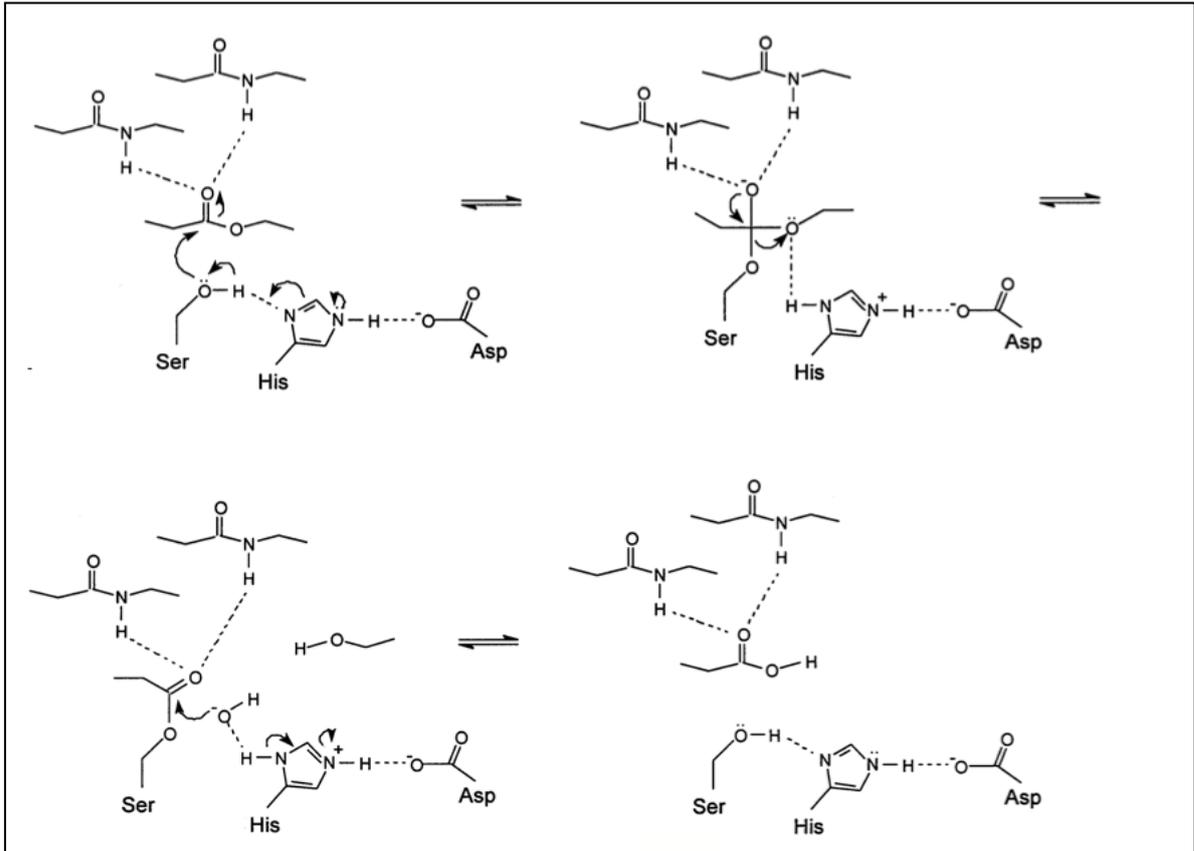


Figura 3. Mecanismo de hidrólise da lipase (JAERGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

2.1.1.2 Aplicação das lipases

A alta versatilidade das lipases, reconhecida como o mais importante grupo de biocatalisadores, permite diversas aplicações em diferentes setores, como: alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos, couro, têxtil, cosmético e papel (REIS et al.; 2009).

Jaeger, Dijkstra e Reetz (1999) afirmam que as lipases movimentam um negócio de bilhões de dólares onde engloba uma grande variedade de aplicações. Delgado (2014) expressa a importância das lipases com base na sua capacidade de transformação dos triglicerídeos contidos nos óleos e gorduras possibilitando um número indeterminado de aplicações em diversas áreas com modificações de óleos, na indústria de detergentes, na indústria de química fina, aromas, panificação, agroquímicos, biorremediação e outros.

Embora atualmente as aplicações das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes e de alimentos e ainda sejam, em sua maioria, baseadas nas reações de hidrólise, novas aplicações decorrentes também das reações de síntese e transesterificação têm

crecido bastante. As características enântio e régiosseletivas das lipases vêm se estabelecendo nos mais diversos campos para produção de compostos que tem características pró-quirais (COSTA, 2009).

Na reação de hidrólise, devido a sua alta especificidade em relação ao tipo e a posição estereoespecífica, o resíduo de ácido graxo proporciona um grande número de aplicações dentro da área de alimentos. Sabores e aromas para alimentação humana e/ou animal têm sido alterados ou melhorados pela hidrólise parcial dos triglicerídeos (MALCATA et al., 1990).

Outro exemplo é o caso da reação de transesterificação que troca, especificamente, o ácido palmítico pelo ácido esteárico, para formar um triglicerídeo (esteárico-oleico-esteárico) com o propósito de se ajustar o ponto de fusão desse lipídio para uso em preparações de chocolates (JAERGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

2.2 Lipases vegetais

Pesquisas recentes mostram o aumento do interesse pelas lipases provenientes dos vegetais. O uso de lipases de origem vegetal em processos industriais possui algumas vantagens: baixo custo, alta disponibilidade, elevada seletividade e especificidade, podem ser obtidas com grande facilidade no mercado na forma de extratos brutos, não exigem um alto grau de purificação (CARO et al., 2000; CARO et al., 2001; PAQUES; MACEDO, 2006; PAQUES et al., 2008; MOUNGUENGUI et al., 2013).

Além das lipases ditas “verdadeiras” (E.C. 3.1.1.3), Mukherjee e Hills (1994), relatam que se pode encontrar nos tecidos vegetais outros tipos de lipases, tais como:

- Acil-hidrolases não específicas - que apresentam uma combinação de fosfolipases A1 (EC 3.1.1.32), A2 (EC 3.1.1. 4), B (EC 3.1.1.5), glicolipases, sulfolipases e que hidrolisam ácidos graxos esterificados em fosfoglicerídios e galactoglicerídios. Neste grupo estão também as monoacilglicerol lipases, que hidrolisam ácidos graxos esterificados em monoacilgliceróis.
- Fosfolipase C (EC 3.1.4.3) e D (EC 3.1.4.4) - que hidrolisam ligações fosfodiéster entre glicerol e grupamento fosfato, em diferentes posições.

Dentre as lipases vegetais, as mais estudadas são as extraídas de cereais e de sementes oleaginosas, localizadas em diferentes tecidos e normalmente ativadas durante a

germinação. Estas lipases, de uma forma geral são bastante atrativas, no entanto, apresentam também algumas desvantagens tais como: complexidade no processo de extração e baixo rendimento, produção limitada ao período de germinação e baixa estabilidade da lipase recuperada. Por estas razões, outras fontes de lipases vegetais podem ser exploradas para fins de aplicação industrial, ainda mais se estas forem provenientes de biomassa (PAQUES; MACEDO, 2006).

Vários estudos têm mostrado que as lipases vegetais também podem ser usadas como biocatalisadores na hidrólise de triacilgliceróis bem como na síntese de alquil ésteres via esterificação ou transesterificação (alcoólise, acidólise, interesterificação). As diferentes etapas para obtenção de extratos lipásicos a partir de biomassa vegetal são as seguintes: (i) Preparação do extrato vegetal bruto - moagem, secagem, delipidação), (ii) Extrato purificado - precipitação, cromatografia, fracionamento (MOUNGUENGUI et al., 2013).

Lipases vegetais, devido à sua facilidade de preparação e uso, são potenciais candidatos para produção catalítica do biodiesel . Até agora não se tem notícia do uso de lipases vegetais na produção industrial desse biocombustível. Entretanto, elas já são normalmente aceitas e utilizadas na indústria de alimentos como biocatalisador, onde costumam pelo menos vinte vezes menos que as lipases microbianas por uma atividade semelhante (MOUNGUENGUI et al., 2013).

Alguns trabalhos que mostram reações de hidrólise bem como a síntese de ésteres catalisada por extratos enzimáticos provenientes de tecidos vegetais estão resumidos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Atividades de hidrólise catalisadas por lipases vegetais registradas na literatura.

Vegetal	Fonte de lipases	Substrato	Atividade hidrolítica (UI/g)	Referência
Mamão (<i>Carica Papaya</i>)	Látex (Extrato bruto comercial)	tributirina	1570	Dhuique-Mayer et al.(2001)
		tributirina	900*	
		tributirina	1590	CARO et al. (2000)
		tricaproína	1350	
		tricaprilina	1080	
		tricaprina	1050	
		copra	590	
		trioleína	55	
		azeite oliva	68	
		óleo girassol	56	
óleo de linhaça	52			
	Casca/semente (Extrato bruto)	azeite oliva	125,28	Paques et al. (2008)
Manga (<i>Mangifera Indica L.</i>)	Casca	azeite oliva	12,20	Delgado (2014)
		P-NPP	0,00	
		P-NPB	4,31	
	Polpa	P-NPL	1,01	Delgado (2014)
		azeite oliva	28,20	
		P-NPP	0,00	
		P-NPB	12,73	
	Sementes	P-NPL	0,00	Delgado (2014)
		azeite oliva	40,30	
		P-NPP	0,00	
P-NPB		5,76		
		P-NPL	0,98	
Eufórbio (<i>Euphorbia Characias</i>)	Látex	tributirina	3500***	CARO et al. (2000)
		tricaproína	950***	
		tricaprilina	835***	
		tricaprina	470***	
		copra	220***	
		trioleína	44***	
		azeite oliva	34***	Palocci et al. (2003)
		óleo girassol	48***	
		óleo de linhaça	27***	
		triacetina	426***	
		tributirina	1084***	
		tricaprilina	2746***	
		óleo girassol	785***	
		óleo de linhaça	1183***	
Babaco (<i>Carica Pentagona</i>)	Látex	tributirina	1010	Dhuique-Mayer et al.(2001)
Eufórbio (<i>Euphorbia Wulfenii</i>)	Látex	triacetina	516***	Palocci et al. (2003)
		tributirina	806***	
		tricaprilina	2413***	
		óleo girassol	833***	
		óleo de linhaça	1173***	
Maracujá (<i>Passiflora Ebulis Sims</i>)	Casca	azeite oliva	1,7a	Feitosa et al. (2013)
		azeite oliva	< 4	Delgado (2014)
	Polpa	azeite oliva	28,9	Delgado (2014)
	Sementes	azeite oliva	< 4	

Continuação

Vegetal	Fonte de lipases	Substrato	Atividade hidrolítica (UI/g)	Referência
Abacaxi (<i>Ananas Comosus</i>)	Caule (Extrato bruto comercial)	tributirina	64**	CARO et al. (2001)
		tributirina	67	
		tributirina	64	CARO et al. (2000)
		tricaproína	45	
		tricaprilina	51	
		tricaprina	41	
		copra	42	
		trioleína	42	
		azeite oliva	42	
		óleo girassol	56	
		óleo de linhaça	52	
Laranja (<i>Citrus sinensis L. Osbeck</i>)	Polpa	azeite oliva	14,20	Delgado (2014)
	Bagaço	azeite oliva	36,55	Delgado (2014)
		P-NPP	0,00	
		P-NPB	5,27	
	Casca	P-NPL	1,59	Delgado (2014)
		azeite oliva	57,55	
		P-NPP	1,02	
		P-NPB	7,84	
	Frit	P-NPL	0,79	Delgado (2014)
		azeite oliva	22,95	
P-NPP		3,12		
P-NPB		15,46		
		P-NPL	0,00	
Uva (<i>Vitis vinífera L.</i>)	Casca	azeite oliva	< 4	Delgado (2014)
Amendoim (<i>Arachis hypogaea L.</i>)	Semente	azeite oliva	24,10	Delgado (2014)
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Semente	azeite oliva	5,86	Pierozan (2014)
Soja (<i>Glycine max</i>)	Semente	azeite oliva	100,00	Vescovi (2012)
Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	Semente	azeite oliva	81,10	Vescovi (2012)
Mamona (<i>Ricinus communis L.</i>)	Semente	azeite oliva	236,90	Vescovi (2012)

UI/g unidade internacional de atividade lipolítica por grama de extrato enzimático.

P-NPP – Palmitato de p-nitrofenila

P-NPB – Butirato de p-nitrofenila

P-NPL – Laureato de p-nitrofenila

* Lote diferente de extrato enzimático

** Lote diferente de extrato enzimático

*** Valores em UI/ml

Tabela 2. Sínteses de ésteres utilizando lipases vegetais como biocatalisador registradas na literatura.

Espécie	Fonte de lipases	Reação Envolvida	Substrato 1	Substrato 2	Condições de processo		Rendimento (%)	Referência
Mamão (<i>Carica Papaya</i>)	Látex (Extrato bruto comercial)	esterificação	1-hexanol	Mistura equimolar ácidos alifáticos C4:0 – C12:0	63°C	24h	92,0	Gandhi e Mukherjee (2000)
			1-hexanol	Mistura equimolar ácidos alifáticos C8:0, C14:0 – C12:0			54,0	
			Mistura equimolar álcoois primários C4 – C10	ácido octanóico			75,0	
			Mistura equimolar álcoois ramificados C4 – C6, C12-C16	ácido octanóico			22,0	
	Alcoois C18:0, C18:1, C18:2, C18:3	ácido caprílico	63°C	24h	0,0	Gandhi e Mukherjee (2001)		
	Interesterificação	tributirina	tricaproína	70,4	50°C	24h	26,6	Caro et al. (2000)
			tricaprilina	65,9				
			tricaprína	65,7				
			trila urína	54,6				
			trimiristina	50,5				
tripalmitina			20,9					
trimargarina			49,1					
triestearina			20,9					
trioleína	34,5							
trilinoleína	20,1							
Tri- α -linolenina	23,1							
Casca/semente (Extrato purificado 50% acetona -18°C)	esterificação	1-butanol	ácido butírico	0,0	55°C	48h	< 5,0	Paques et al. (2008)
			ácido caprílico	6,0				
			ácido láurico	18,0				
			ácido esteárico	7,0				
ácido oléico	7,0							
Abacaxi (<i>Ananas Comosus</i>)	Caule (Extrato bruto comercial)	esterificação	1-butanol	ácido mirístico	30°C	250h	≈ 60,0	Mukherjee e Kiewitt (1998)

Continuação

Espécie	Fonte de lipases	Reação Envolvida	Substrato 1	Substrato 2	Condições de processo		Rendimento (%)	Referência
<i>Trigo (Triticum aestivum)</i>	Sementes (extrato bruto)	esterificação	n-propanol	ácido láurico	40°C	40min	57,88 *	Pierozan (2014)
	Sementes (extrato purificado com sulfato de amônio)	esterificação	n-propanol	ácido láurico	40°C	40min	208,2 *	Pierozan (2014)
<i>Laranja (Citrus sinensis L. Osbeck)</i>	Casca	esterificação	etanol	ácido oléico	40°C	144h	< 5,0	Delgado (2014)
		transesterificação	etanol	óleo soja	40°C	72h	-	
	Bagaço	esterificação	etanol	ácido oléico	40°C	144h	41,0	
		transesterificação	etanol	óleo soja	40°C	72h	-	
	Frit	esterificação	etanol	ácido oléico	40°C	144h	40,2	Delgado (2014)
		transesterificação	etanol	óleo soja	40°C	72h	+	
	Polpa	esterificação	etanol	ácido oléico	40°C	144h	58,5	
		transesterificação	etanol	óleo milho	40°C	72h	+	
<i>Manga (Mangifera Indica L.)</i>	Casca	esterificação	etanol	ácido oléico	40°C	144h	32,8	Delgado (2014)
		transesterificação	etanol	óleo soja	40°C	72h	-	
	Semente	esterificação	etanol	ácido oléico	40°C	144h	< 5,0	
		transesterificação	etanol	óleo milho	40°C	72h	+	
							-	
							-	

* Valores em UI/g

+ Teste qualitativo que indica formação de ésteres.

- Teste qualitativo que não indica formação de ésteres

2.2.1 Bromelina

A bromelina é uma enzima muito utilizada industrialmente como fonte de protease sulfidrílica em indústrias farmacêuticas, amaciamento de carne, clarificação de cerveja, preparação de alimentos infantis e dietéticos, além de indústrias têxteis e no tratamento de distúrbios digestivos (PAQUES; MACEDO, 2006; BRESOLIN, 2013). A bromelina é encontrada em tecidos vegetais como casca, talo, fruto e folhas das espécies da família das *Bromeliaceae* onde se encontra o abacaxi (BRESOLIN, 2013).

O abacaxi apresenta elevado teor de bromelina no seu conteúdo, que ajuda no processo de digestão. A bromelina é tida como uma mistura de isoenzimas proteolíticas que em meio ácido, alcalino ou neutro, transforma as matérias albuminóides em proteoses ou peptona. A bromelina pode ser isolada do suco da fruta ou do talo da planta, ocorrendo em maior concentração no cilindro central do abacaxi (MEDINA, 1987; GRANADA; ZAMBIAZI; MENDONÇA, 2004).

O abacaxi, uma vez industrializado, ocorre a geração de resíduos como casca, talos e sólidos centrifugados (produção de sucos). Rogério et al. (2007) afirmam que nesse processo de fabricação de sucos, produz-se cerca de 15 a 25% em massa do abacaxi de resíduos. Bresolin (2013) comenta que esses subprodutos possuem baixo apelo comercial, entretanto, é importante ressaltar que estes resíduos são muito ricos na enzima bromelina, que pode ser recuperada e purificada visando à geração de produtos com um maior valor agregado.

Ketnawa; Chaiwut e Rawdkuen (2012), também seguem nessa mesma linha de raciocínio, pois, afirmam que os resíduos do abacaxi possuem grande potencial quando utilizados como matérias-primas na obtenção de produtos com maior valor agregado. Na agricultura, estes resíduos são ocasionalmente utilizados como fertilizantes ou para a alimentação animal. A casca também é rica em celulose, hemiceluloses e outros hidratos de carbono, e tem sido usada para produção de papel, cédulas de dinheiro e tecidos. Estes mesmos autores colocam a utilização dos resíduos do abacaxi como fonte de compostos bioativos, especialmente de enzimas proteolíticas, como sendo uma alternativa viável.

A atividade da bromelina depende da presença de um sitio catalítico formado por resíduos de cisteína e histidina. O imidazol de um resíduo de histidina usualmente funciona como um catalisador ácido-base, e aumenta o caráter nucleofílico dos grupos tiólico e

hidroxila (COSTA, 2014). A Figura 4 mostra a estrutura da bromelina do talo do abacaxi.

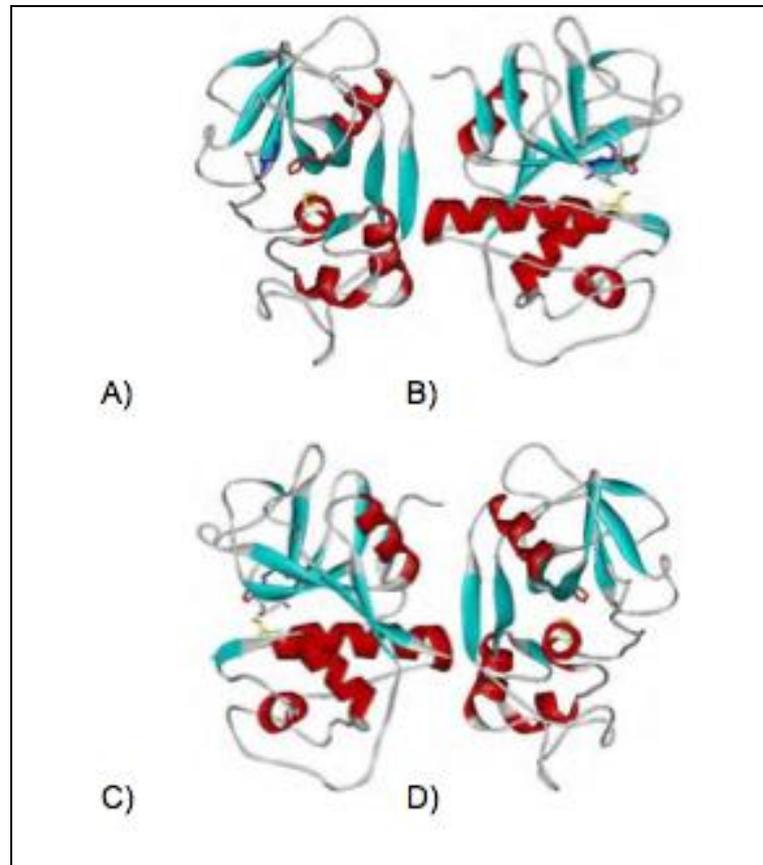


Figura 4. Estrutura terciária da bromelina do talo. Os resíduos em destaque são referentes a tríade catalítica. Estes resíduos são cisteína (amarelo), histidina (vermelho), lisina (azul). (A – Frente, B – Lado 1, C – Lado 2, D – Fundo) (COSTA, 2014).

O extrato de bromelina não é obtido através do látex, como no caso da *Carica papaya* (mamão). Comercialmente, a bromelina é extraída do caule e das folhas da espécie *Ananas comosus* (PAQUES; MACEDO, 2006).

Caro et al. (2000) constataram que a bromelina, proveniente do extrato bruto do vegetal *Ananas comosus*, apresenta potencial de hidrolisar reações de triacilgliceróis de cadeia curta menor quando comparada com a enzima do látex do vegetal *Carica papaya*. Para triacilgliceróis de cadeia longa e insaturados, tanto a papaína (mistura de enzimas extraída do mamão) quanto a bromelina, possuem atividades de hidrólise parecidas. Esses valores podem ser observados na Tabela 1.

Mukherjee e Kiewitt (1998) fizeram estudos que permitiram identificar especificidades do extrato de bromelina bruta frente aos ácidos graxos insaturados (C18-1,

C18-3). Eles constataram que esta enzima possui uma especificidade similar à papaína, ou seja, elas têm baixa preferência por ácidos graxos de qualquer natureza que possuam a ligação dupla com geometria *cis*-4, *cis*-6 ou *cis*-8 e alta preferência por *cis*-5 e *cis*-9. Os mesmos autores utilizaram meio reacional contendo ácidos graxos com grupos hidróxi, epóxi e ciclopentil em sua estrutura com o 1-butanol. A lipase do abacaxi apresentou maior índice de esterificação com estes ácidos pouco comuns na natureza quando comparados com os de cadeia linear, como o ácido mirístico (C14:0).

No trabalho de Ketnawa; Chaiwut e Rawdkuen (2012), extratos aquosos dos resíduos do abacaxi (casca, talo, coroa e caule) de dois cultivares diferentes (*Nang Lae* e *Phu Lae*) foram preparados com misturador mecânico e, em seguida, caracterizados em termos de proteínas totais, atividade proteolítica entre outros. O resultado desse estudo evidenciou que a casca representou a maior parcela dos resíduos do abacaxi (30 – 42%, m/m), seguido pelo talo (9 – 11%, m/m), caule (2 – 5%, m/m) e coroa (2 – 4%, m/m), cultivares *Nang Lae* e *Phu Lae*, respectivamente. A coroa obteve maior concentração de proteínas totais para os dois cultivares (220,5 – 141,0 mg/g), seguido pela casca (132,4 – 70,7mg/g), talo (45,4 – 27,1 mg/g) e caule (29,8 – 28,1 mg/g). Quanto a atividade proteolítica, a coroa também logrou o maior valor (172,964 – 322,734 U/g), seguido pela casca (90,653 – 118,920 U/g), talo (36,111 – 42,428 U/g) e caule (14,435 – 17,068 U/g), valores referentes aos cultivares *Nang Lae* e *Phu Lae* respectivamente.

Diante do exposto, percebeu-se que a casca do abacaxi é uma potencial fonte de bromelina, uma vez que esta representa maior percentual em termos de geração de resíduos no processamento do abacaxi, e possui, segundo Ketnawa; Chaiwut e Rawdkuen (2012), a segunda maior concentração de proteínas e atividade proteolítica em relação aos outros resíduos.

2.3 Imobilização de enzimas

O termo “enzimas imobilizadas” foi empregado, por Ephraim Katchalski–Katzir em 1971, para designar enzimas fisicamente confinadas numa certa região do espaço com a manutenção da sua atividade catalítica, podendo ser repetidamente utilizada. Nesta técnica a enzima fica retida no interior ou na superfície de um material que é utilizado como suporte. O complexo “enzima-suporte” mantém as mesmas características físicas do suporte, bem como

a atividade biológica que a enzima teria na forma solúvel. No entanto, o termo “enzimas imobilizadas” também pode designar a utilização de enzimas em reatores equipados com membranas de ultra filtração, que mantém as enzimas dentro do reator enquanto são retirados o produtos, bem como quando se restringe a mobilidade das enzimas pela ligação destas com outras moléculas, tornando-as insolúveis no meio reacional (ARIELA et al., 2008).

Por razões práticas e econômicas é mais proveitoso o uso de lipases na forma imobilizada (MENDES et al., 2011). Vários autores discorrem sobre as vantagens do uso de enzimas imobilizadas. Dentre elas destacam-se: maior facilidade no desenvolvimento de processos contínuos de larga escala; facilidade de recuperação da enzima ao final do processo, por exemplo, fazendo uso de filtração simples; subsequente possibilidade de reutilização; maior estabilidade térmica e química, que impacta na resistência ao efeito desnaturante de solventes orgânicos; e melhoria nas taxas de reação (KNIGHT et al., 2000; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008; ARIELA et al., 2008; FJERBAECK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009; MICHELIN, 2013; BONINE; POLIZELLI; BONILLA-RODRIGUEZ, 2014).

Malcata et al. (1990); Arroyo (1998); Villeneuve et al. (2000); Dalla-Vecchia, Nascimento e Soldi (2004); Volpato (2009) e Mendes et al. (2011) citam algumas das estratégias pelos quais as enzimas podem ser imobilizadas:

- Adsorção;
- Ligação cruzada;
- Adsorção seguida de ligação cruzada;
- Ligação covalente;
- Encapsulamento físico.

Contudo, a seleção de uma estratégia de imobilização e escolha de um suporte deve ser baseada em especificações de processos catalíticos, tais como atividade de enzima, características de ativação e formas de regeneração, o custo do processo de imobilização, toxicidade dos reagentes, e propriedades finais desejadas para o imobilizado (MALCATA et al., 1990; MENDES et al., 2011).

Uma vez que a enzima esteja imobilizada no suporte, ela passa de catalisador solúvel para um catalisador heterogêneo. Volpato (2009) relaciona algumas características desse novo catalisador heterogêneo: reutilização ou uso contínuo, fácil separação da mistura de reação, possibilidade de modular as propriedades catalíticas, prevenção de uma

contaminação microbiana, possível estabilização da estrutura tridimensional da enzima. Esta autora define que a junção da enzima com o suporte resulta no “derivado enzimático”, e este por sua vez, irá possuir características em função da soma das propriedades da enzima mais do suporte. A seguir serão descritos os três principais tipos de imobilização de enzimas.

2.3.1 Adsorção

O procedimento de adsorção de enzimas é bem direto, é um dos métodos mais utilizados, possui preparação fácil e está associado à baixo custo. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio, iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser aplicados com essa finalidade. A escolha do suporte dependerá de suas propriedades, tais como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo (VILLENEUVE et al., 2000; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). A recuperação do catalisador é normalmente possível após tratamento com detergentes, agentes desnaturantes fortes ou agentes molhantes (MALCATA et al., 1990), ou pela modificação do pH, que ocasionará a desorção das enzimas, seguido de nova imobilização (VILLENEUVE et al., 2000).

As lipases possuem uma tendência de adsorver-se em superfícies hidrofóbicas, dado ao fato de possuírem afinidade com substratos oleosos. Assim, essa característica pode ser utilizada para o desenvolvimento de protocolos específicos para estas enzimas. Neste caso as lipases “confundem” a superfície do suporte com a superfície hidrofóbica do óleo (VOLPATO, 2009).

O sucesso e a eficiência da adsorção depende de diversos parâmetros. O tamanho da proteína adsorvida, a área específica e a natureza física da superfície do suporte (porosidade e tamanho dos poros) são fundamentais para esse tipo de modificação enzimática. A concentração de enzimas, bem como o pH são variáveis importante na imobilização. Em geral, a maior taxa de adsorção é observada em pH próximo ao ponto isoelétrico da enzima. Inicialmente, suportes minerais tais como: esferas de vidro porosas, terra diatomácea, sílica e alumina, foram usados. Mais recentemente, os suportes mais utilizados são resinas de troca iônica, celite e biopolímeros (VILLENEUVE et al., 2000).

2.3.2 Ligação covalente

Arroyo (1998) define a estratégia de imobilização como sendo baseada na ativação de grupos químicos do suporte que possam reagir com os nucleófilos das enzimas. Dentre os aminoácidos existentes nas estruturas das enzimas os mais empregados para formação de ligação covalente com o suporte são: lisina, cisteína, tirosina e histidina, e em menor medida metionina, triptofano, arginina, ácido aspártico e glutâmico. Os demais aminoácidos, por possuírem caráter hidrofóbico, não se expõe a parte externa da estrutura proteica, assim não conseguem fazer ligações covalentes. Este é o método de imobilização mais interessante do ponto de vista industrial.

Muitos suportes orgânicos ou minerais podem ser utilizados, mas antes de se fazer a ligação covalente esse suporte deve ser "ativado". Esta ativação corresponde, na verdade, na incorporação de um grupo químico que seja capaz de reagir com os grupos laterais da proteína. Diferentes métodos de ativação estão disponíveis: o mais comum é a utilização de glutaraldeído. Este composto polimeriza-se facilmente, resultando em polímeros contendo aldeídos insaturados do tipo ω que podem reagir com os grupos amino do suporte. O excesso de glutaraldeído é eliminado lavando-se com tampão e o suporte ativado é suspenso em solução enzimática (VILLENEUVE et al., 2000).

Volpato (2009) cita as principais vantagens de um derivado enzimático produzido por ligações covalentes baseado nos trabalhos de Klibanov (1983); Leckband e Langer (1990) e Alonso (1996):

- Caráter covalente, portanto a estabilidade da ligação
- Estabilização adicional que se pode obter quando a interação for multipontual, levando a uma maior resistência à desativação por efeito de temperatura, solventes orgânicos ou pH.
- Fácil manipulação do derivado, e com isso a possível modificação das propriedades químicas ou catalíticas.
- A carga de enzima permanece constante após a imobilização
- Os derivados podem ser utilizados em reatores contínuos, empacotados, de leito fluidizado ou tanque agitado.

O principal inconveniente, neste caso, se dá na realização da ligação covalente de aminoácidos que não se encontram no aparato catalítica. Isto pode ser difícil de conseguir e,

geralmente, enzimas imobilizadas com esta técnica perdem parte da sua atividade inicial (VILLENEUVE et al., 2000).

2.3.3 Encapsulamento

Consiste em confinar a enzima em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A encapsulação é muito similar ao processo de adsorção com a diferença que neste caso a enzima fica completamente envolvida pelo sistema. Neste sistema, cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. As enzimas, que são moléculas grandes não podem sair, porém moléculas menores como os substratos e produtos possuem trânsito livre sobre membrana da cápsula (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A enzima é posta em solução de fase monomérica, a qual, após a polimerização, leva a sua retenção. Géis de poliacrilamida são as matrizes mais comumente utilizadas. Outros tipos de suportes são: colágeno, alginato, carraginato e resinas de poliuretano. A vantagem dessa técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero, evitando assim que ela se desnature. Contudo, a passagem de substratos e produtos pela membrana podem ocasionar problemas no tocante à velocidade de difusão limitando o rendimento da reação. Para isso ser minimizado são necessárias altas concentrações de substratos. As enzimas encapsuladas apresentam maior eficiência com substratos de menor massa molar, pois estes têm a tendência de se aproximarem mais do sítio ativo das enzimas (ARROYO, 1998; VILLENEUVE et al., 2000).

2.4 Polímeros superabsorventes

Nasser et al. (2007) definem como polímero superabsorvente aqueles materiais hidrofílicos que são capazes absorver grandes quantidades de água ou soluções aquosas devido a capacidade que o polímero superabsorvente tem de se expandir. Como exemplo de polímero superabsorvente comercial tem-se o poliacrilato de sódio (PAS), normalmente utilizado na hidratação de plantas. Os polímeros superabsorventes são também conhecidos como: hidrogel ou hidropolímeros.

O Poliacrilato de sódio (PAS), devido à pressão osmótica, absorve água para equilibrar a concentração de íons sódio dentro e fora do polímero, já a poliacrilamida (PA),

que é outro tipo de polímero superabsorvente normalmente usado no dia a dia, absorve água por meio da formação de ligações de hidrogênio (MARCONATO; FRANCHETTI, 2002).

Quando imersos em um ambiente com água, os polímeros superabsorventes expandem até o seu volume de equilíbrio, e não se dissolvem devido as suas propriedades. Em geral, apresentam estabilidade mecânica, podendo resistir a repetidos ciclos de absorção – dessorção. Quando as primeiras moléculas de água começam a entrar na matriz do hidrogel, elas vão hidratar primeiro os grupos hidrofílicos e polares. A consequência dessa primeira etapa é que o hidrogel começa a se expandir. Desta forma, os grupos apolares ficam expostos, interagindo também com as moléculas de água. Após essas duas ligações, uma outra parcela de água (chamada de água livre, pois não participa de nenhuma ligação) irá entrar na estrutura do gel levado pelo efeito da força osmótica. Este último efeito, por sua vez, é contraposto pela força das ligações cruzadas do material que tem um comportamento elástico. Desta maneira, o hidrogel encontra o seu ponto de equilíbrio na expansão. A chamada água livre preenche o espaço entre as cadeias poliméricas e os poros do hidrogel que ainda estavam vazios (SILVA, 2007).

O poliacrilato de sódio (PAS) é comercialmente encontrado na forma de pequenas esferas. Marder et al. (2008) utilizaram lipases do tipo PS pura, doadas pela Amano Corporation, imobilizadas em esferas de hidrogel para produção de biodiesel de óleo de girassol por processo enzimático. Esse estudo resultou em conversões de até 70% para tempos de reação de 24 horas, temperatura de 55°C, proporção óleo/álcool de 1:6 e agitação de 100rpm.

DEMIRBAS, 2003; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; RAMOS et al., 2011).

Na composição do biodiesel, as moléculas dos ésteres podem variar tanto no tamanho da cadeia carbônica quanto na quantidade e na posição das instaurações ou até mesmo na presença de grupamentos nas cadeias (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

A Lei nº 11.097 de 13 de Janeiro de 2005 conceitua o biodiesel como sendo um “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”.

Neste momento é oportuno fazer a diferenciação entre BIODIESEL e ECODIESEL. Parente (2003) afirma:

o que tem sido denominado de BIODIESEL, é um combustível renovável, biodegradável e ambientalmente correto, sucedâneo ao óleo Diesel mineral, constituído de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos da reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo com um álcool de cadeia curta, metanol ou etanol, respectivamente.

Existem diversas vantagens ecológicas que advém da mistura do biodiesel ao Diesel mineral. Este induz a uma melhoria nas características do Diesel no tocante às emissões gasosas para a atmosfera (PARENTE, 2003). Assim, Parente (2003) define ECODIESEL como:

um combustível obtido da mistura de biodiesel e óleo diesel mineral, em proporções ajustadas de forma que a mistura resultante, quando empregada na combustão de motores diesel, minimize os efeitos nocivos ambientais. As misturas Biodiesel/Diesel mineral costumam receber um atributo em sua designação. O ECODIESEL B-20, por exemplo, corresponde a uma mistura contendo 20% em volume de biodiesel. O biodiesel puro, frequentemente tem sido denominado de B-100.

2.5.2 Histórico

Os relatos mostram que o uso de biocombustíveis não é recente. Rudolph Diesel, na Exposição Universal de Paris, demonstrou pela primeira vez seu motor de ignição por compressão, tendo como combustível o óleo de amendoim, o qual teria sido o primeiro “biodiesel” da história. Este experimento se mostrou de tal maneira bem-sucedido, que o uso de óleos vegetais foi introduzido em algumas colônias tropicais europeias com o intuito de torná-las autossuficientes em produção de energia (KNOTHE, 2005; RAMOS et al., 2011; MICHELIN, 2013).

O uso de óleos vegetais como combustível intensificou-se durante a Segunda Guerra Mundial, quando estes foram utilizados de forma emergencial, para abastecimento de

frotas móveis por diversos países. No Brasil, houve a proibição da exportação do óleo de algodão, para que este pudesse substituir o diesel consumido. Redução nas importações de combustíveis líquidos foi relatada na Argentina nesse mesmo período, o que também resultou na exploração dos óleos vegetais para fins energéticos (KNOTHE, 2005).

O uso de óleos vegetais *in natura* traz uma série de inconvenientes aos motores do ciclo diesel devido à sua alta viscosidade. Sendo assim, a reação de transesterificação proporciona a solução para esse problema. Os monoalquil ésteres formados (biodiesel) produzem uma redução da viscosidade cinemática em relação aos óleos vegetais (SRIVASTANA; PRASAD, 2000; SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998; RAMOS et al., 2011).

No Brasil o uso de óleos vegetais iniciou-se em 1975, originando o “Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos” (Pró-Óleo). Seu objetivo era gerar excedentes de óleo vegetal que tornassem seus custos de produção competitivos face ao petróleo. Previa-se uma mistura de 30% de óleo vegetal ao óleo diesel, com perspectivas de sua substituição integral em longo prazo (MICHELIN, 2013).

O primeiro relato do que se denomina hoje como biodiesel é de uma patente Belga de 1937 (patente número 422.877), concedida ao pesquisador Charles Chavanne da Universidade de Bruxelas. Nesta, foi relatada a utilização de ésteres etílicos obtidos do óleo de palma por transesterificação em meio ácido (embora outros óleos vegetais e ésteres metílicos também tenham sido mencionados), ali descritos como um combustível análogo ao diesel de petróleo (RODRIGUES, 2007; RAMOS et al., 2011).

No final de 1977, o engenheiro químico Expedito José de Sá Parente, então professor da Universidade Federal do Ceará, teve a ideia de extrair óleo de sementes, misturá-lo com álcool, e após algumas reações químicas, obter um combustível que, no futuro, viria a ser chamado de biodiesel (BRITO, 2007).

O lançamento desta descoberta deu-se em 30 de outubro de 1980 no Centro de Convenções de Fortaleza. O novo combustível era até então chamado de PRODIESEL. Foram depositadas, junto ao INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial, duas patentes de invenção, das quais uma veio a ser homologada. A patente PI 8007957, de 1980, foi a primeira, a nível mundial, do biodiesel e querosene vegetal de aviação (PARENTE, 2003).

O termo biodiesel só veio aparecer mais tarde, em um trabalho científico do chinês Wang de 1988 (RODRIGUES, 2007; RAMOS et al., 2011), sendo posteriormente

utilizado em um artigo de 1991 de autoria de Bailer e Hueber, momento a partir do qual se tornou de uso comum (RAMOS et al., 2011).

Em 2004 o governo federal lançou o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel com o objetivo de implementar de forma sustentável sua produção e uso, promovendo a inclusão social, o desenvolvimento regional e contribuindo para a economia e a melhoria das condições do meio ambiente (MME, 2004). A partir de 1 de novembro de 2014, a Lei nº 13.033 de 24 de setembro de 2014 estipulou que o percentual obrigatório de biodiesel adicionado ao óleo diesel comercializado ao consumidor final ficaria estabelecido como sendo de 7% (sete por cento) medidos em volume. Proporção válida para todo território brasileiro.

2.5.3 Matéria-prima

Como principais fontes de triglicerídeos para a produção de biodiesel destacam-se: os óleos vegetais, as gorduras de origem animal e os resíduos oleosos principalmente provenientes de frituras ou subprodutos industriais (PARENTE, 2003; KNOTHE, 2005; RAMOS et al., 2011). Os principais componentes dessas matérias-primas são: majoritariamente os triglicerídeos, e em menor quantidade os diglicerídeos e monoglicerídeos (RAMOS et al., 2011). Eventualmente, estas fontes contêm ácidos graxos livres, água, esteróis, fosfolípidios, odores e outras impurezas (MA; HANNA, 1999).

Os óleos vegetais têm-se apresentado como principal matéria-prima do processo de produção do biodiesel muito em função de ser uma fonte renovável e isso pode trazer benefícios ambientais (MICHELIN, 2013). Todavia, nem todo óleo vegetal pode ou deve servir como matéria-prima para produção do biodiesel. Isto porque alguns podem apresentar propriedades indesejáveis, que são transferidas para o biocombustível, tornando-o inadequado para o uso. Sendo assim, o estudo da viabilidade de cada matéria-prima dependerá de aspectos técnicos, agronômicos, econômicos, sociais e ambientais (RAMOS et al., 2003).

Óleos vegetais utilizados como meio de transferência de calor para fritura de alimentos também podem ser empregados para a síntese do biodiesel. Deste modo, é sugerido que os óleos de descarte sejam diretamente incorporados ao óleo bruto, anteriormente ao processo de transesterificação (COSTA NETO et al., 2000).

Ramos et al. (2011) indica ainda que, materiais graxos provenientes do tratamento de efluentes podem ser aproveitados como fonte de triacilgliceróis para produção do

biodiesel. Nesse estudo, a matéria-prima utilizada na síntese de ésteres pela reação de esterificação foi o ácido láurico, bem como o azeite de oliva para produção de ésteres pela a reação de transesterificação.

2.5.4 Processos de produção do biodiesel

A transesterificação ou alcoólise é o principal método utilizado para a produção do biodiesel (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998; MA; HANNA, 1999; SRIVASTANA; PRASAD, 2000; FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; DEMIRBAS, 2002; RAMOS et al., 2011). Consiste no deslocamento do álcool de um éster através de um outro álcool, em um processo similar ao da hidrólise, exceto pelo fato de se usar álcool ao invés de água (SRIVASTANA; PRASAD, 2000; FUKUDA; KONDO; NODA, 2001). Neste caso, a relação estequiométrica é um mol de triacilglicerol reagindo com três mols de álcool, usualmente metanol ou etanol, na presença de um catalisador que pode ser homogêneo, heterogêneo ou enzimático (RAMOS et al., 2011). Na prática, a razão molar necessita de excesso de álcool para deslocar o equilíbrio da reação no sentido de maximizar o rendimento dos ésteres (MA; HANNA, 1999; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006).

A Figura 6 mostra a reação completa de transesterificação do óleo para produção biodiesel:

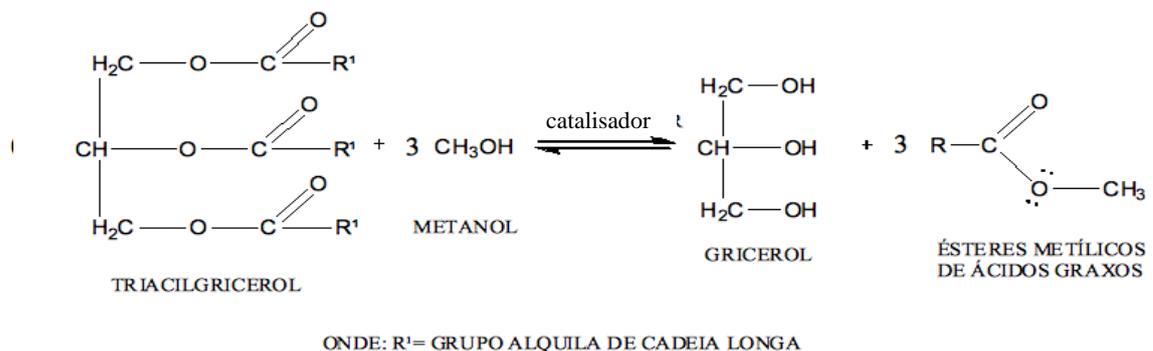


Figura 6. Reação geral de transesterificação do triacilglicerol com o metanol (SRIVASTANA; PRASAD, 2000).

Contudo acredita-se que três reações reversíveis e consecutivas venham a ocorrer (SRIVASTANA; PRASAD, 2000; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; MARDER et al., 2008).

Como mostra a Figura 7:

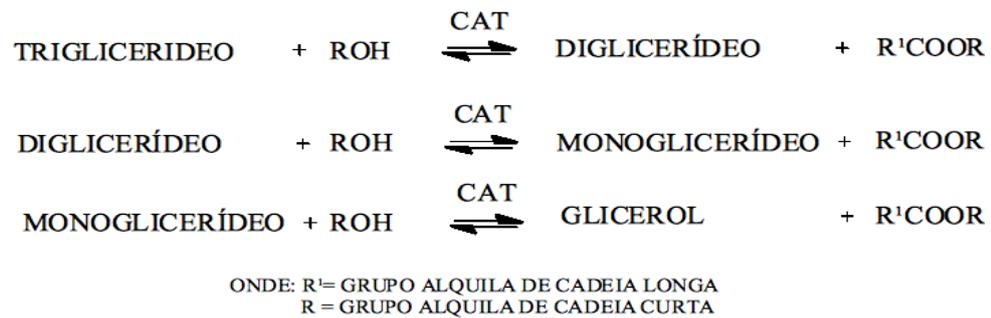


Figura 7. Etapas da transesterificação do triacilglicerol (SRIVASTANA; PRASAD, 2000).

O primeiro passo é a conversão do triglicerídeo em diglicerídeo, seguido pela conversão do diglicerídeo em monoglicerídeo e finalmente de monoglicerídeo em glicerol. Produzindo uma molécula de éster de cada glicerídeo em cada passo.

Vários aspectos incluindo o tipo de catalisador, a razão molar álcool/óleo, temperatura e tempo de reação, pureza dos reagentes, umidade e a acidez graxa livre podem influenciar no curso da transesterificação (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006).

2.5.4.1 Catálise alcalina

Dentre os catalisadores utilizados nesse tipo de processo destacam-se: hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, carbonatos e alcóxidos metálicos (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; ANTCZAK et al., 2009). A transesterificação de óleos vegetais catalisada em meio alcalino possui cinética muito mais acelerada do que as que utilizam catalisador ácido. Estima-se em 4000 vezes mais rápido, mantendo-se a mesma quantidade de ácido (SRIVASTANA; PRASAD, 2000; FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

Os alcóxidos metálicos são os catalisadores mais ativos, produzem conversões acima de 98% para tempos inferiores a 30 min e concentração molar da ordem de 0,5% (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998). Estes podem ser adicionados diretamente nos meios de produção ou produzidos *in situ*. A produção *in situ* consiste na dissolução de hidróxido de sódio ou de potássio no álcool utilizado como agente de transesterificação (RAMOS et al., 2011).

O processo de transesterificação por catalise alcalina é considerado o método mais amplamente utilizado devido à sua excelente produtividade (ANTCZAK et al., 2009).

Toda a produção do biodiesel, neste caso, acontece em condições de baixas pressões e temperaturas, proporcionando assim redução nos custos de operação (LEUNG; WU e LEUNG, 2010).

Apesar das vantagens do sistema reacional alcalino, este apresenta algumas limitações no tocante à necessidade de várias etapas de separação e purificação (ANTCZAK et al., 2009). Entre os problemas gerados na catalise alcalina, podemos citar: formação de sabão, principalmente, quando a matéria-prima tem elevado índice de ácidos graxos livres, exigindo um pré-tratamento da matéria-prima. Outro inconveniente é a necessidade de excesso de álcool no meio reacional. Muitos catalisadores alcalinos são altamente higroscópios, e essa absorção de água, leva a redução de rendimento (MICHELIN, 2013).

O mecanismo de reação para a transesterificação alcalina ocorre em três etapas: Na primeira etapa verifica-se o ataque nucleofílico do íon alcóxido ao carbono da carbonila do triacilglicerol. Acontece a formação de um intermediário tetraédrico. Na segunda etapa, o intermediário tetraédrico reage com o álcool para regenerar o íon alcóxido. Finalmente, com o rearranjo do intermediário tetraédrico, ocorre a eliminação de uma molécula de éster e a formação de uma molécula de diacilglicerol (ECKEY, 1956; MA; HANNA, 1999).

Com a repetição desse ciclo, ocorre a formação de mais duas moléculas de ésteres e uma de glicerol. A Figura 8 ilustra esse mecanismo.

Quando não se adiciona diretamente alcóxidos metálicos, existe o inconveniente da formação de água no meio. Isto possibilita a hidrólise dos ésteres graxos e a formação de sabão, tendo por consequência a diminuição do rendimento da reação (MA; HANNA, 1999; RAMOS et al., 2011).

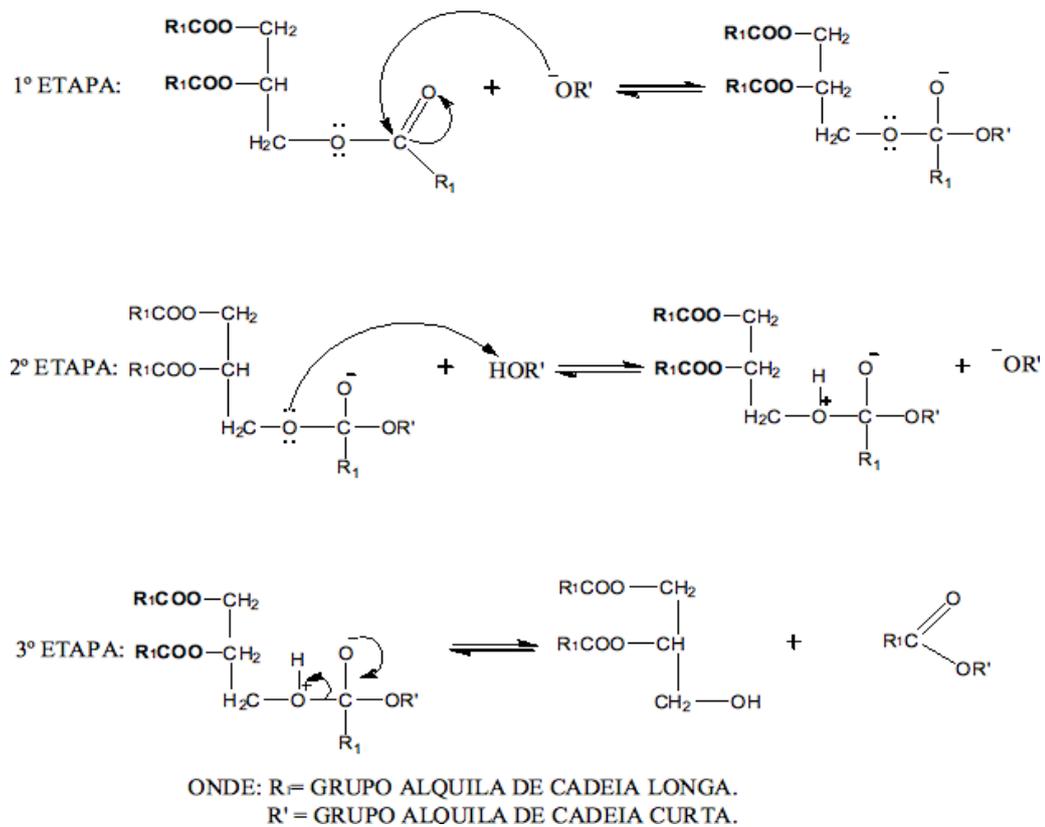


Figura 8. Mecanismo de transesterificação alcalina (MA; HANNA, 1999).

2.5.4.2 Catálise ácida

A reação de transesterificação também pode ser catalisada por um ácido de Brönsted-Lowry, principalmente ácido sulfúrico e sulfônico. Este processo resulta em elevados valores de rendimentos, mas as reações são lentas e requerem temperaturas em torno de 100°C. Demandam mais de três horas para completar a conversão (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998). A catálise ácida é mais adequada para os óleos que possuem maior quantidade de água e acidez graxa livre na sua composição (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

O mecanismo da catálise ácida é descrito a seguir e mostrado na Figura 9:

Na primeira etapa, ocorre a protonação do grupo carbonila do éster, formando um carbocátion. Na segunda etapa, o carbocátion sofre um ataque nucleofílico do álcool, produzindo um intermédio tetraédrico. Este por sua vez, na terceira etapa, elimina o glicerol para formar um novo éster e regenera o catalisador H⁺ (STOFFEL; CHU; AHRENS JR,

1959; SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998).

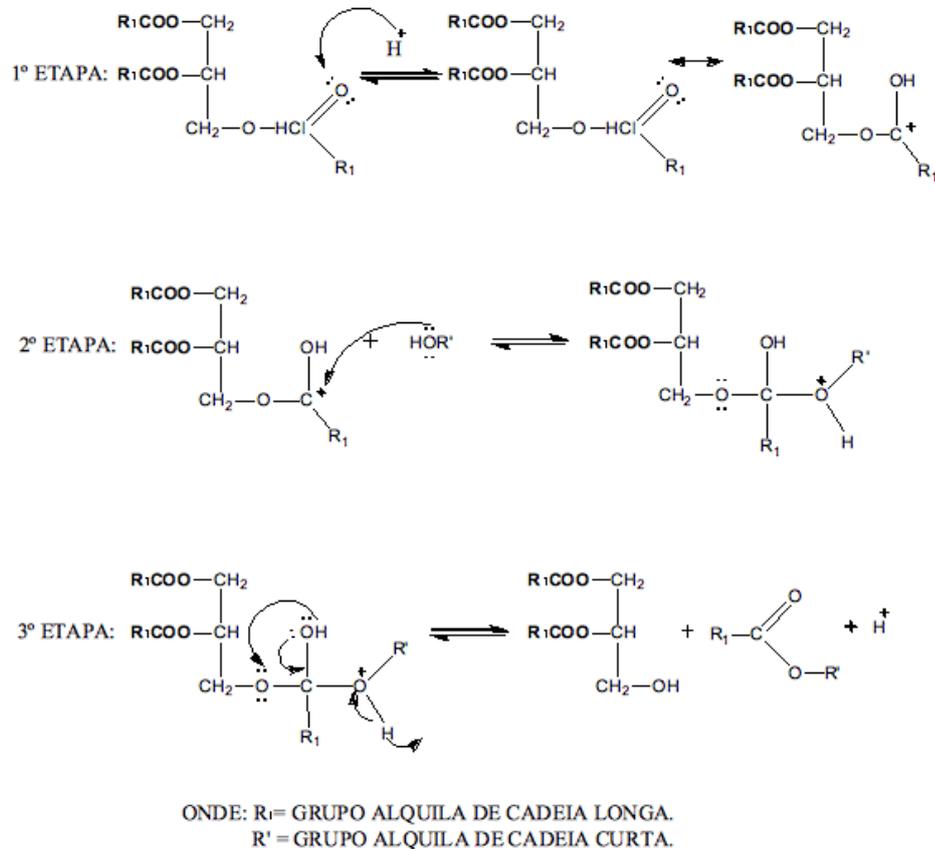


Figura 9. Mecanismo de transesterificação ácida (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998).

Mesmo quando se utiliza o catalisador ácido, também é necessário deslocar o equilíbrio da reação pelo excesso de álcool no meio. Contudo, se esta quantidade for muito além do necessário, torna-se mais difícil a recuperação do glicerol. Então, a razão molar (óleo/álcool) ideal é determinada de forma empírica considerando cada condição particular (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998).

2.5.4.3 Catálise enzimática

A transesterificação pode ser feita a partir de catalisadores biológicos. Nesse caso, o biocatalisador utilizado são as enzimas lipases. O uso desse tipo de substância na química orgânica é uma alternativa frente aos processos químicos ditos tradicionais (PAQUES; MACEDO, 2006).

Embora sua principal função seja na hidrólise de ligações ésteres, elas também

podem catalisar a reação reversa sob condições de restrição de água (GOMES; SILVA; CASTRO, 2004), bem como outros tipos de reações, entre as quais destaca-se a transesterificação (PAQUES; MACEDO, 2006).

Quando se empregam catalisados químicos na produção do biodiesel, os álcalis ou ácidos utilizados, devem ser removidos dos produtos. Isto causa maior consumo de energia, uma vez que induz o aumento de etapas de purificação bem como maior consumo de água no processo, provocando a formação de efluentes industriais que necessitam de tratamento. O mesmo não ocorrendo na transesterificação enzimática (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; MARDER et al., 2008; FJERBAECK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

Essas reações podem ocorrer sobre diversos materiais lipídicos como: óleos vegetais refinados e brutos, gorduras residuais de fritura, sebo animal, entre outras. A concentração de ácidos graxos livres na matéria-prima, neste caso, pode ser bem maior do que aquela recomendada para a catálise alcalina, pois estes ácidos orgânicos são convertidos normalmente em ésteres, isto em função da capacidade das lipases de catalisarem tanto reações transesterificação quanto de esterificação (ANTCZAK et al., 2009). Esses insumos com maior teor de acidez graxa livre, em geral, são mais baratos do que os óleos refinados, ficando evidente neste caso, a redução dos custos de produção quando se opta pelo uso desse tipo de material em processos enzimático (FJERBAECK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009).

Devido à disponibilidade e facilidade com que podem ser manuseadas, as enzimas hidrolíticas têm sido largamente aplicadas em síntese orgânica. Schuchardt; Sercheli e Vargas (1998) ressaltam que as lipases não necessitam de cofator, possuem relativa estabilidade e apresentam tolerância à solventes orgânicos.

Um aspecto em comum que os estudos de catálise enzimática possuem, consiste em buscar otimizar as condições de reação (Solvente, temperatura, pH e tipo de fonte de lipase), afim de estabelecer as características adequadas para a aplicação industrial. Contudo, essa modalidade de reação, conduz a rendimentos e tempos lamentavelmente desfavoráveis em comparação com as rotas tradicionais (SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998).

A transesterificação enzimática pode ser conduzida em sistemas livres de solvente ou na presença de solventes orgânicos (ANTCZAK et al., 2009). Os solventes orgânicos são utilizados na síntese enzimática do biodiesel com a finalidade de aumentar a taxa de transesterificação através da melhora na solubilidade entre triacilgliceróis (hidrofóbicos) e

álcoois (hidrofílicos). Além disso, os solventes orgânicos podem proteger as enzimas da desnaturação devido aos teores elevados de álcoois (MICHELIN, 2013).

O desenvolvimento de processos para produção de biodiesel por via enzimática tem tido maior destaque com enzimas imobilizadas como uma forma de reduzir custos. Este método tem a propriedade de aumentar o tempo de vida da proteína, devido à redução dos danos físicos e químicos à sua estrutura, mantendo sua conformação ótima e atividade catalítica, fato este, que possibilita o reciclo da mesma (LEUNG; WU; LEUNG, 2010).

2.5.5 Substratos alcóolicos

Conforme Antczak et al. (2009), o metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2- propanol, n-butanol, e isobutanol podem ser usados como substratos nos processos de transesterificação e esterificação enzimática. Desta forma, o presente trabalho empregou o metanol, o etanol e o n-propanol como substratos alcóolicos nas reações catalisadas pela bromelina.

O tamanho da cadeia carbônica dos substratos alcóolicos influencia no processo, pois quanto maior a cadeia, mais miscível será o álcool no óleo, melhorando assim o rendimento da reação. No entanto, com o aumento da miscibilidade, surge a dificuldade da separação da mistura álcool/éster no final do processo. Assim o uso de álcoois de cadeia longa acarretará o acréscimo nas etapas de separação que agregariam custos adicionais ao processo podendo torná-lo inviável (STARAVACHE et al., 2005).

Antczak et al. (2009) e Michelin (2013) destacam que o metanol e o etanol são usualmente empregados na produção industrial, sendo o metanol preferido pelo seu baixo custo e por suas vantagens físico-químicas. As vantagens do uso do metanol são relatada por Ma e Hanna (1999) como sendo: capacidade de reagir rapidamente com os triglicerídeos e possuir caráter polar. Porém, Leung; Wu e Leung (2010) discorrem sobre o perigo de explosões associados aos vapores de metanol que são incolores e inodoros, devendo ser assegurada a não exposição a esses produtos químicos durante a produção de biodiesel.

Existem relatos na literatura da inibição de alguns tipos de enzimas (Novozym 435) com o uso de metanol, havendo a perda total da sua atividade catalítica (SHIMADA et al., 1999). Antczak et al. (2009) comentam que tanto o metanol quanto o etanol contam com um alto poder de inativação de lipases. Em geral, a taxa de reação aumenta com o tamanho da cadeia carbônica do álcool.

Outro aspecto importante em relação aos substratos alcólicos diz respeito à sua origem, pois um dos principais pontos na utilização do biodiesel é a redução na quantidade de poluentes, assim como o uso sustentável dos recursos, de tal forma que se possibilite o desenvolvimento sustentável das sociedades. O etanol proveniente da fermentação de biomassa, no caso do Brasil, a cana-de-açúcar, parece ser um substrato ambientalmente mais correto do que o metanol que, embora com menor custo, é derivado de combustível fóssil (FJERBAECK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009; MICHELIN, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Cascas, substratos e esferas de hidrogel

Neste trabalho, os abacaxis (*Ananas comosus*) foram adquiridos em supermercado localizado no município de Redenção-CE e em seguida retiradas as cascas em laboratório.

As esferas de hidrogel utilizadas como suporte na imobilização do extrato enzimático foram as da marca *XYXIANGXUN* com 2-3mm de diâmetro e adquiridas pelo comercio eletrônico.

O azeite de oliva do tipo extra virgem, utilizado na síntese de ésteres por transesterificação, foi adquirido no mercado local. O palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP), utilizado no ensaio de atividade hidrolítica, foi adquirido junto a Sigma-Aldrich Co., e, o ácido láurico, substrato usado na atividade de esterificação bem como na síntese dos ésteres, foi adquirido junto à Merck Millipore.

3.1.2 Reagentes

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), hidróxido de sódio (NaOH), etanol, n-propanol, metanol, acetona, hexano, fenolftaleína, azul brilhante Coomassie G-250, ácido fosfórico, dodecil sulfato de sódio, mercaptoetanol e poliacrilato de sódio foram adquiridos na sua forma de grau analítico PA. A albumina bovina (BSA), Triton X100, papel de filtro para filtração rápida (qualitativo 80g) e célula MiniProtein (Biorad) foram usados na sua forma comercial. O hipoclorito de sódio (NaClO) empregado, foi o produto comercial a 3% e o brometo de potássio (KBr) foi o de grau espectroscópico.

3.2 Métodos

3.2.1 Caracterização das esferas de hidrogel

As esferas de hidrogel foram caracterizadas pela técnica da espectroscopia na região do infravermelho onde as amostras foram homogeneizadas em almofariz com KBr (brometo de potássio) com grau espectroscópico em uma proporção de aproximadamente 10% de amostra. Em seguida a mistura foi prensada numa matriz de aço com 4,5 toneladas aplicadas por uma prensa hidráulica. Foram obtidas pastilhas que depois foram analisadas em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT, no modo transmitância e na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . Neste caso foram obtidos dois espectros, um das esferas de hidrogel e outro de uma amostra padrão de poliacrilato de sódio.

3.2.2 Estudo da hidratação das esferas de hidrogel

A taxa de hidratação das esferas foi determinada colocando-se uma esfera de hidrogel em recipiente tipo *Becker* contendo 100 mL de água destilada, de forma que essa pudesse aumentar de tamanho na medida em que a água fosse sendo incorporada no seu interior. Aferiu-se o diâmetro com paquímetro a cada hora, até 9 horas de imersão. Esse processo foi repetido por 6 (seis) vezes e o diâmetro médio foi calculado. Por fim, as medidas foram confirmadas após 48 horas de imersão para se determinar o tamanho de equilíbrio das esferas. Metodologia adaptada de Marder et al. (2008).

O fenômeno de hidratação das esferas foi modelado matematicamente segundo a equação (1):

$$d(t) = \frac{(c_1 \cdot t)}{(c_2 + t)} \quad (1)$$

Onde: $d(t)$ é o diâmetro médio das esferas, t é o tempo de hidratação, c_1 e c_2 são constantes.

Realizou-se a linearização do modelo e aplicou-se o método de regressão linear para se calcular os parâmetros c_1 e c_2 (Apêndice 1).

3.2.3 Assepsia das cascas

Conforme Feitosa et al. (2013), os abacaxis foram lavados em água corrente com detergente e posteriormente lavados com água destilada. Em seguida retirou-se a casca do fruto e a mesma foi cortada em cubos de $\pm 1,5\text{cm}$ de aresta. As cascas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO 3%) por um período de 15 min. Após nova lavagem

com água destilada, as cascas foram secas à temperatura ambiente ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) por 4 horas.

3.2.4 Preparação dos extratos enzimáticos

Esta etapa foi adaptada dos trabalhos de Ketnawa; Chaiwut e Rawdkuen (2012) e Feitosa et al. (2013). A preparação dos extratos enzimáticos foi feita por dois métodos. No primeiro, 60 g de cascas secas foram imersas em 300 mL de água destilada e deixadas em repouso a 5°C . No outro processo, 60g de cascas secas, foram trituradas com 300 mL de água destilada em liquidificador doméstico e também armazenadas a 5°C . O tempo de armazenamento foi variável. Após este período foi realizada uma filtração simples com peneira, sendo obtidos os extratos aquosos, denominados de: extrato enzimático n°1 (EXT1) para a 1° metodologia e extrato enzimático n°2 (EXT2) para a 2° metodologia. Os resíduos (cascas) foram descartados.

3.2.5 Caracterização dos extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos foram caracterizados em termos das massas moleculares das proteínas por eletroforese (SDS-PAGE) em condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970). Usou-se uma célula MiniProtein (Bio-rad), gel de corrida de 12% em uma zona de separação de 9 cm x 6 cm, e uma zona de concentração de 5% de poliacrilamida. As amostras de EXT1 e EXT2 foram filtradas em papel de filtro para filtração rápida e ressuspensos em 1 mL de tampão de ruptura (2% de SDS e 10% de mercaptoetanol), fervidas durante 5 min e 20 μL de alíquota do sobrenadante foi utilizada nas experiências. Os géis foram corados com azul brilhante Coomassie G-250. Marcadores de baixo peso molecular foram usados (10-200 kDa).

3.2.6 Imobilização do extrato enzimático nas esferas de hidrogel

A estratégia de imobilização empregada nesse estudo foi notadamente a de encapsulamento físico. Para este experimento utilizou-se a metodologia de imobilização de Marder et al. (2008) com modificações, onde 60 esferas de hidrogel (1,05408 g) foram imersas em 150 mL de extrato enzimático por 4 horas, à temperatura ambiente, agitado em

“*shaker*” com 100 rpm. Após decorrido o tempo determinado, as esferas foram separadas do meio por filtração simples. As esferas foram denominadas de: imobilizado n° 1 (IMOB1), aquelas imersas no EXT1, e imobilizado n° 2 (IMOB2), aquelas onde se utilizou o EXT2. O volume dos extratos enzimáticos restantes obtidos no processos de filtração foram denominados de sobrenadante n° 1 (SOBN1) e sobrenadante n° 2 (SOBN2), respectivamente. O volume dos sobrenadantes foram medidos para os dois casos, e em seguida, calculado o volume (mL) de extrato que foi incorporado em cada esfera do suporte conforme a equação (2).

$$V_{\text{imob}} \left(\frac{\text{mL}}{\text{esfera}} \right) = \frac{(V_i - V_f)}{n} \quad (2)$$

Em que: V_{imob} é o volume de extrato enzimático imobilizado para cada esfera (mL por esfera), V_i é o volume inicial de extrato enzimático utilizado, V_f é o volume final medido após imobilização (sobrenadante) e n é o numero de esferas usadas na imobilização.

3.2.7 Desidratação das esferas imobilizadas

Parte das esferas imobilizadas foram levadas para estufa à 37°C por 48 horas para retirada da água do seu interior. As esferas IMOB1, após desidratação, foram chamadas de material catalítico n°1 (CAT1) e as esferas IMOB2 deram origem ao material catalítico n°2 (CAT2). Adaptado de Marder et al. (2008).

3.2.8 Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína das preparações enzimáticas foi determinado pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976). Inicialmente, preparou-se uma solução de albumina de soro bovino (BSA) com concentração de 1 mg/mL. A partir dessa solução, foram feitas diluições de 0,00 a 0,10mg/mL com volume de 200µL em tubos Eppendorf, adicionou-se 2000µL do reagente de Bradford e agitou-se cada tubo Eppendorf por 5 segundos. Esperou-se 10 minutos para a reação acontecer. Em seguida fez-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm e construiu-se a curva de calibração (Apêndice 2).

A determinação da concentração de proteína foi efetuada nos extratos EXT1 e EXT2 com 1, 6 e 9 dias de armazenamento a 5°C, bem como nos seus respectivos sobrenadantes de imobilização (SOBN1 e SOBN2) para que se pudesse calcular a quantidade aproximada de proteína imobilizada em cada esfera de hidrogel. Para isto, pipetou-se 200µL da amostra em tubo eppendorf (em triplicata) e adicionou-se 2000µL de reagente de Bradford, repetindo-se o mesmo procedimento. A curva de calibração permite converter a absorvância da amostra em concentração de proteína. O cálculo da concentração de proteína imobilizada nas esferas de hidrogel foi descrito na Equação (3).

$$\text{Conc. proteína} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{(C_i \cdot V_i - C_f \cdot V_f)}{m} \quad (3)$$

Em que: C_i é a concentração de proteínas do extrato enzimático (mg/mL), C_f é a concentração de proteínas do sobrenadante após imobilização (mg/mL), V_i é o volume inicial do extrato enzimático utilizado (mL), V_f é o volume final do sobrenadante após imobilização (mL) e m é a massa das esferas usadas na imobilização.

3.2.9 Hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP)

Este método se baseia na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) pela enzima, em meio aquoso. Esta metodologia foi baseada no trabalho de Pencreac'h e Baratti (1996) com modificações. Para este procedimento foram elaboradas 50 mL de uma solução A contendo: 4,61mM de *p*-NPP em *n*-propanol, e 250mL de uma solução B com 0,4% de Triton X100 e 0,1% de goma arábica em tampão fosfato de sódio 100mM pH 7,0. Assim são transferidos para uma cubeta 0,18 mL da solução A e 1,62 mL da solução B. Após estabilizada a temperatura a 37°C adicionou-se 0,2 mL da enzima solúvel. A liberação do *p*-nitrofenol (*p*-NP), de cor amarela, foi acompanhada a 410 nm contra um branco sem enzima. A variação da absorvância foi medida a cada minuto até 5 (cinco) minutos. No caso de enzima imobilizada, reagiu-se 30 mL da solução (1 vol. de A + 9 vol. de B) com 5 (cinco) esferas de hidrogel contendo enzimas imobilizadas (IMOB1 e IMOB2). Coletou-se 2 mL de amostra a cada minuto até 5 (cinco) minutos e mediu a absorvância nas mesmas condições. Para os dois casos, obteve-se o coeficiente angular de curva “absorvância vs tempo” (Apêndice 3).

A velocidade de reação foi determinada a partir do coeficiente de extinção molar nas condições descritas. Este valor foi determinado pela absorbância de soluções padrões de *p*-nitrofenol (*p*-NP) na mistura reacional (Apêndice 4). Uma unidade de atividade (U_{PNPP}) foi a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-NP por minuto nas condições descritas.

$$\text{Atividade}_{PNPP} \left(\frac{U}{\text{mL ou g}} \right) = \frac{\frac{\Delta \text{abs}}{\Delta t} \cdot V_r}{\varepsilon \cdot E \cdot L} \quad (4)$$

Onde: $(\Delta \text{abs}/\Delta t)$ é o coeficiente angular da curva “absorbância vs tempo”, V_r é o volume reacional (L), ε o coeficiente de extinção molar do *p*-NP ($0,00536 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), L é o caminho ótico (1cm) e E é a quantidade de enzima utilizada no ensaio (ml para enzima solúvel e g para a enzima imobilizada).

3.2.10 Parâmetros da imobilização

3.2.10.1 Rendimento da imobilização em termos de proteína

O percentual de proteína imobilizada R_{imob} é calculado pela equação (5). Esse parâmetro foi adaptado do trabalho de Vescovi (2012), uma vez que o volume do sobrenadante no final do processo de imobilização é diferente do volume inicial do extrato enzimático. C_i é a concentração de proteínas totais do extrato enzimático (mg/mL), V_i é o volume inicial do extrato enzimático (mL), C_f é a concentração de proteínas totais do extrato após a imobilização (sobrenadante) em (mg/mL) e V_f é o volume do sobrenadante (mL).

$$R_{imob} (\%) = \frac{C_i \cdot V_i - C_f \cdot V_f}{C_i \cdot V_i} \cdot 100 \quad (5)$$

3.2.10.2 Rendimento da imobilização em termos de atividade

O rendimento de imobilização em termos de atividade foi adaptado de Vescovi (2012) e é calculado pela equação (6).

$$At_{imob}(\%) = \frac{U_i.V_i - U_f.V_f}{U_i.V_i} \cdot 100 \quad (6)$$

Em que: U_i é a atividade inicial do extrato enzimático ($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$), V_i é o volume inicial do extrato enzimático (mL), U_f é a atividade enzimática medida no sobrenadante no final da imobilização ($\mu\text{mol}/\text{min}$), V_f é o volume do sobrenadante (mL).

3.2.11 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação foi calculada a partir da reação do ácido láurico e do n-propanol. Assim, fez-se reagir 1 g de ácido láurico com 15 mL de n-propanol catalisado por 10 mL de extrato enzimático ou 12 esferas de hidrogel no caso da enzima imobilizada. O meio reacional foi mantido a 40°C por 40 minutos. Alíquotas de $200\mu\text{L}$ foram retiradas do meio reacional no tempo zero e no tempo de 40 minutos, sendo diluídas em 20 mL de acetona/etanol (1:1 v/v) com a finalidade de parar a reação. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinado pela titulação com NaOH 0,025M utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima capaz de consumir $1\mu\text{mol}$ de ácido láurico por minuto nas condições descritas. Esta metodologia foi baseada no estudo de Pierozan (2014) com modificações. A atividade de esterificação é calculada pela equação (7).

$$Atividade\left(\frac{U}{\text{mL ou g}}\right) = \frac{(V_0 - V_{40}) \cdot M \cdot 1000 \cdot Vf}{t \cdot E \cdot Va} \quad (7)$$

Onde:

M = Concentração molar da solução de NaOH;

V_0 = Volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (mL);

V_{40} = Volume gasto de NaOH na titulação da amostra retirada no tempo 40 minutos (mL);

t = Tempo de reação em minutos;

E = Volume de extrato enzimático (mL) ou massa de catalisador heterogêneo (g) usado na

reação;

V_a = Volume da alíquota (mL);

V_f = Volume final (mL).

3.2.11.1 Produtividade (P)

Este parâmetro foi utilizado para avaliar o potencial de extração de lipases das cascas de abacaxi. Foi expresso em unidade lipolítica por grama de casca seca.

$$Produtividade = \frac{Atividade \cdot V}{M} \quad (8)$$

Onde:

Atividade = atividade de esterificação (U/mL)

V = Volume total do extrato (mL)

M = Massa total de cascas secas utilizadas na preparação (g)

3.2.12 Aplicação das lipases da casca do abacaxi imobilizada na produção de ésteres

3.2.12.1 Reação de esterificação para os dodecanoatos de -CH₃, -C₂H₅ e -C₃H₇

Este experimento, adaptado de Marder et al. (2008), foi realizado em frascos erlenmeyer com tampa. A formação do dodecanoato de n-propila, etila e metila, se desenvolveu pela mistura de ácido dodecanóico com álcool n-propílico, etílico e metílico, respectivamente, na razão molar de (1:5). A reação foi catalisada pelos derivados catalíticos (CAT1 e CAT2) na proporção de 6% (m/v) e agitada em “*Shaker*” a 150 rpm por 5 dias a temperatura ambiente. Um branco sem catalisador foi acompanhado para efeito de comparação.

Alíquotas de 200µL foram retiradas do meio reacional com 24 horas, 48 horas e 120 horas e acondicionadas em tubos eppendorf contendo 200µL de hexano a temperatura ambiente.

Os espectros de massas dos produtos da esterificação foram obtidos no

espectrômetro de massa Hewlett-Packard, modelo HP-5971 A, acoplado a cromatógrafo gás-líquido, modelo HP-5890 A, série II (CGL/EM), provido de coluna capilar de metil-fenil silicone (25,0 m x 0,20 mm x 0,25 μ m) utilizando hélio a 1,0 mL/min como gás carreador no modo split, operando com gradientes de temperatura que variavam dependendo da natureza química dos compostos analisados. Para os compostos de baixa Massa Molecular utilizou-se um gradiente de 10°C/min (40-180°C) e de 40°C/min (180°-300°C) e para os de Massa Molecular mais elevada um gradiente de 10°C/min (100-180°C) e de 40°C/min (180-300°C), com a temperatura de injetor de 250°C e detector de 280°C.

3.2.12.2 Reação de transesterificação para os oleatos de -CH₃, -C₂H₅ e -C₃H₇

A reação de produção de ésteres foi realizada em recipientes fechados e mantidos sob agitação de 150 rpm. A matéria prima oleosa utilizada foi o azeite de oliva extra virgem. Mediu-se 10 mL do óleo, adicionou-se 6,5 mL de n-propanol (0,0865 mols) e catalisou-se esse meio reacional tanto com 25 esferas de CAT1 quanto com 25 esferas de CAT2. Também foi feito esse mesmo procedimento para etanol de metanol, onde se utilizou a mesma quantidades em mols, 5 mL e 3,5 mL respectivamente. Um branco sem catalisador foi acompanhado para efeito de comparação. Alíquotas de 200 μ L foram retiradas do meio reacional com 24 horas, 48horas e 120 horas, e acondicionadas em tubos eppendorf contendo 200 μ L de hexano a temperatura ambiente. Adaptado de Marder et al. (2008).

Os espectros de massas dos produtos da transesterificação foram obtidos no espectrômetro de massa Hewlett-Packard, modelo HP-5971 A, acoplado a cromatógrafo gás-líquido, modelo HP-5890 A, série II (CGL/EM), provido de coluna capilar de metil-fenil silicone (25,0 m x 0,20 mm x 0,25 μ m) utilizando hélio a 1,0 mL/min como gás carreador no modo split, operando com gradientes de temperatura que variavam dependendo da natureza química dos compostos analisados. Para os compostos de baixa Massa Molecular utilizou-se um gradiente de 10°C/min (40-180°C) e de 40°C/min (180°-300°C) e para os de Massa Molecular mais elevada um gradiente de 10°C/min (100-180°C) e de 40°C/min (180-300°C), com a temperatura de injetor de 250°C e detector de 280°C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados experimentais obtidos são apresentados e discutidos neste capítulo. O ponto de partida foi entender a dinâmica de hidratação das esferas de hidrogel, em seguida, foram preparados os extrato enzimático com e sem trituração. Buscou-se avaliar como o tempo de imobilização influenciava nas características do extrato enzimático bruto. Fez-se a imobilização desses estratos em esferas de hidrogel e posterior remoção da umidade por meio de secagem em estufa.

Numa etapa subsequente, caracterizou-se o teor de proteína e a atividade de hidrólise (*p*-NPP), tanto dos extratos brutos quanto dos derivados obtidos na imobilização. Foram calculados alguns parâmetros de imobilização para comparar as formas e o tempos de extração.

De posse desses resultados, utilizou-se os derivados catalíticos obtidos para produção do dodecanoato de *n*-propila, etila e metila por esterificação, e do oleato de *n*-propila, etila e metila por transesterificação.

4.1 Caracterização das esferas de hidrogel

Na análise comparativa entre os espectros de absorção na região do infravermelho obtidos, as esferas de hidrogel e o poliacrilato de sódio mostraram enormes semelhanças entre si. Os picos que identificam os grupamentos das moléculas evidenciaram que as esferas de hidrogel utilizadas são efetivamente de poliacrilato de sódio. Alguma distorção entre eles deve-se provavelmente ao grau de pureza das esferas, contudo, não se pode auferir qualquer análise quantitativa de pureza. Os valores de comprimento de onda que caracterizaram o poliacrilato de sódio onde ocorrem deformações e estiramentos no espectro são: 3.400cm^{-1} (OH^-), 2.950cm^{-1} (alcanos: CH_2), 1.655cm^{-1} (carbonila), 1450 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} e 1.320 cm^{-1} (alcanos: CH , CH_2 , CH_3) (SILVERSTEIN at al., 2005). Esses grupamentos podem ser identificados na estrutura molecular do poliacrilato de sódio (Figura 5). Os espectros do poliacrilato de sódio e do hidrogel podem ser visto nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

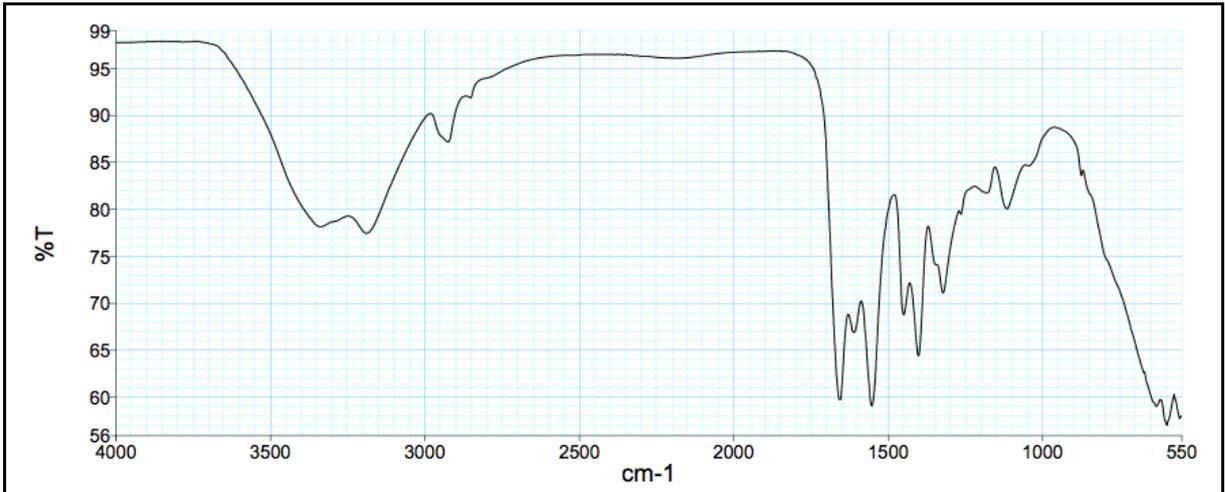


Figura 10. Espectro de absorção na região do infravermelho do poliacrilato de sódio.

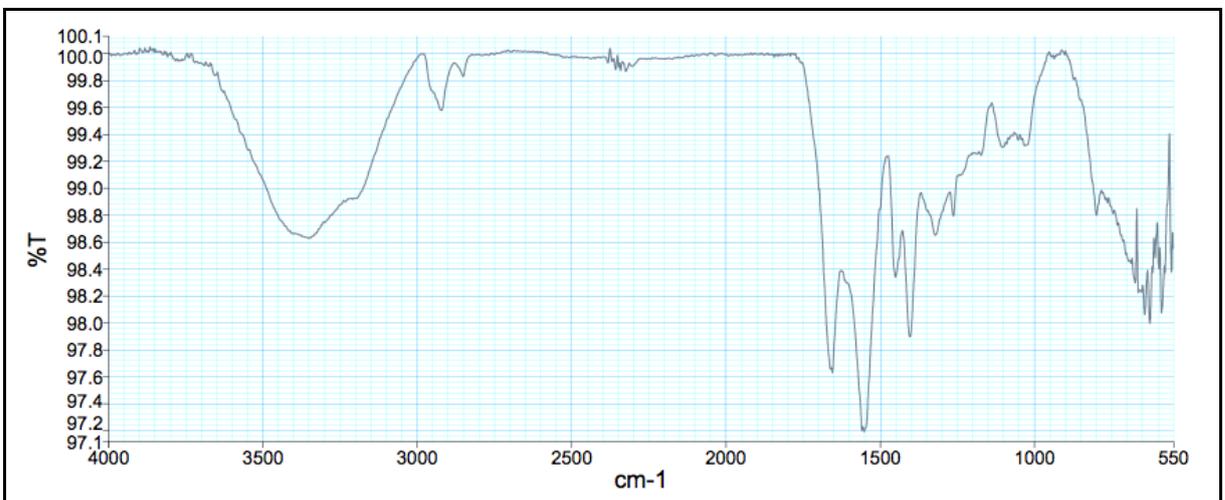


Figura 11. Espectro de absorção na região do infravermelho do hidrogel.

4.2 Hidratação das esferas de hidrogel

O diâmetro inicial das esferas apresentou média de 2,28 mm e massa média de 0,01757 g/esfera. No equilíbrio estes valores atingiram 16,44 mm e 0,735 g/esfera. Observou-se uma taxa de crescimento mais intensa nas primeiras 4 (quatro) horas de imersão, correspondendo a região de máxima inclinação no gráfico.

No final desse período, as esferas apresentaram diâmetro médio 14,98 mm, isto representa 91,11% do diâmetro de equilíbrio. O gráfico de crescimento das esferas está mostrados na Figura 13.

Com base nesses resultados, admitiu-se 4 horas como sendo o tempo ótimo de imersão das esferas no extrato enzimático (imobilização), uma vez que, após esse tempo, não

se tem considerável aumento de volume das esferas, e conseqüentemente, pouco ingresso do extrato enzimático no interior do suporte.



Figura 12. Esferas de hidrogel hidratadas até seu ponto de equilíbrio.

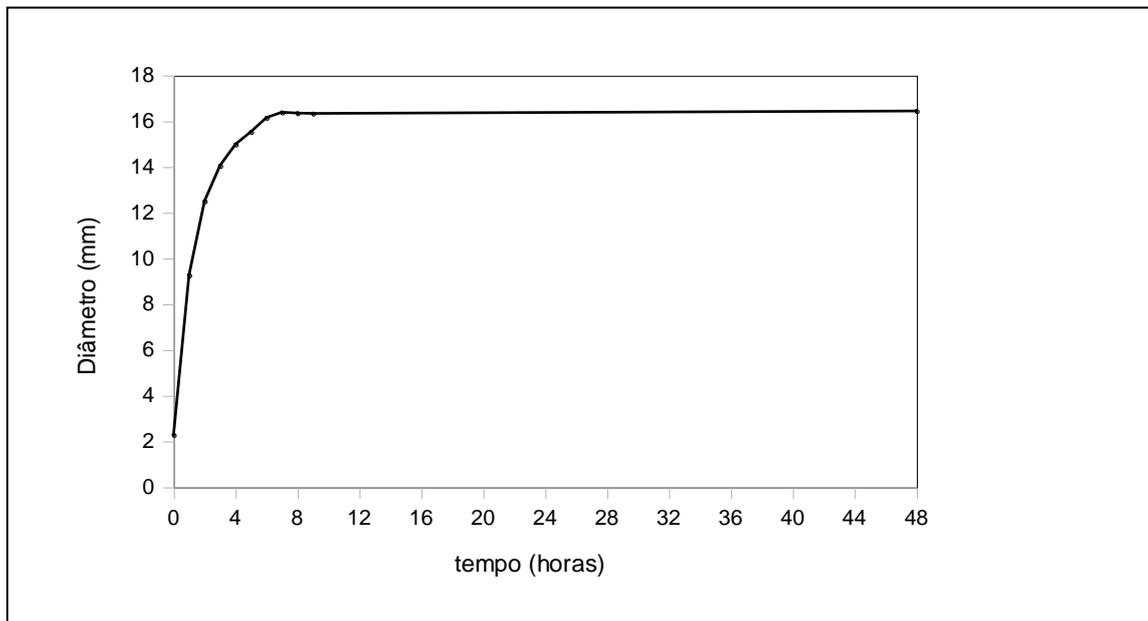


Figura 13. Gráfico de crescimento das esferas de hidrogel.

O modelo matemático que melhor representa o fenômeno de hidratação das esferas de hidrogel, com nível de confiança $R^2 = 0,9832$, está descrito na equação (9):

$$d(t) = \frac{(18,2 \cdot t)}{(0,94 + t)} \quad (9)$$

Os valores das constantes c_1 e c_2 obtidas foram de 18,2 e 0,94, respectivamente.

4.3 Preparação, caracterização e imobilização do extrato enzimático

Os extratos enzimáticos obtidos apresentaram aspectos bem distintos, enquanto o primeiro (EXT1), preparado pela simples imersão das cascas assépticas em água destilada, mostrou um aspecto límpido e de coloração menos intensa, o segundo (EXT2), que passou por trituração mecânica, evidenciou uma cor mais forte e turbidez mais elevada. Tecidos vegetais não retidos na filtração também foram percebidos neste caso, o que justifica a priori, o aumento da turbidez (Figura 14).

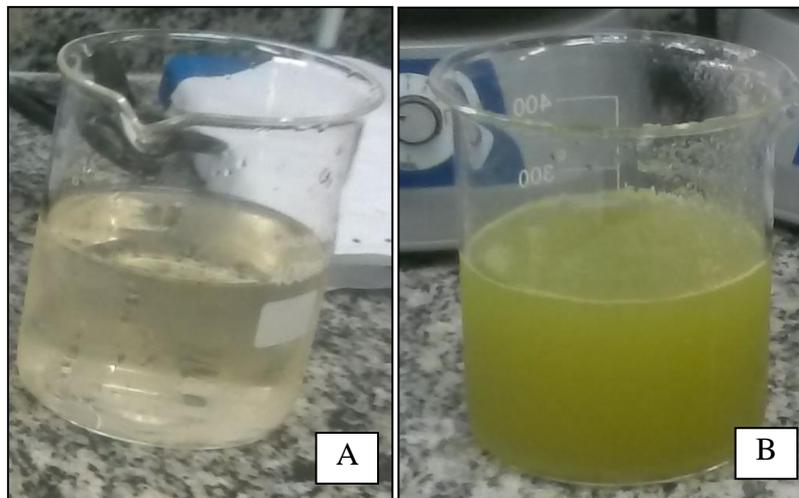


Figura 14. Extratos enzimáticos da casca do abacaxi - EXT1 (A), EXT2 (B).

Os padrões de proteínas dos extratos enzimáticos (EXT1, EXT2) são colocados na Figura 15. Esses resultados mostraram que os componentes proteicos de ambos os extratos foram praticamente os mesmos, a não ser na intensidade, o que leva a crer que o EXT2 possui maior quantidade de proteínas. Os principais componentes proteicos identificáveis em ambos

os extratos mostraram massa molecular entre 28 e 30 kDa. Isto deixa claro que ambos contêm bromelina na sua composição, uma vez que, Ketnawa; Chaiwut e Rawdkuen (2012), obtiveram em seus experimentos valores de aproximadamente 28kDa, para o extrato comercial de bromelina. Esse resultado é particularmente relevante porque expõe que os dois processos de extração foram capazes de retirar bromelina da casca do abacaxi.

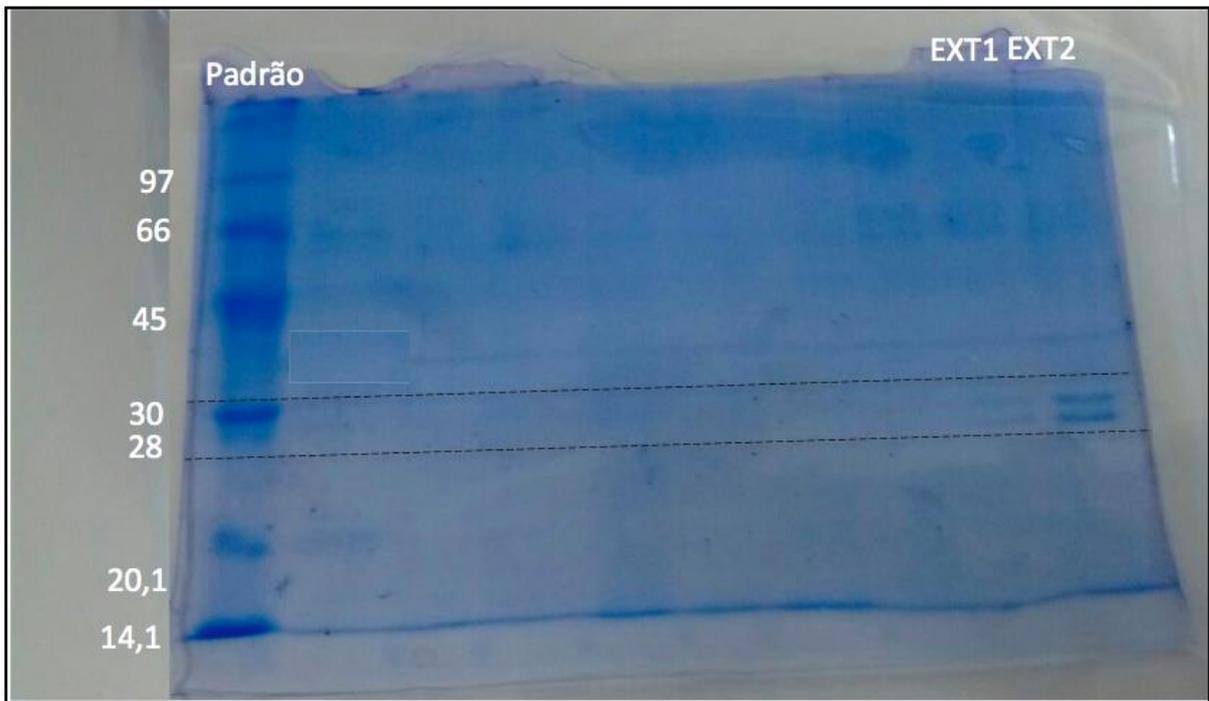


Figura 15. Padrões de massa molecular das proteínas dos extratos enzimáticos (EXT1 e EXT2).

O IMOB1 produzido na imobilização, reteve no seu interior $0,82 \pm 0,08^*$ mL de extrato enzimático bruto para cada esfera de hidrogel, já para o IMOB2 este valor foi de $0,76 \pm 0,14^*$ mL/esfera. Contudo, a julgar pelos desvios padrões obtidos, não se pôde inferir a existência de alguma relação entre os dois tipos de extração e o volume de extrato encapsulado pelas esferas de hidrogel. * Desvios padrões ($n = 3$).

No tocante ao aspecto físico, as esferas imobilizadas com o extrato enzimático n°2 (IMOB2), apresentaram, assim como o extrato (EXT2), coloração mais forte tendendo para a cor “amarelo-esverdeado” e menor transparência. Também foi notado o aumento da massa das esferas, para o IMOB1 esse aumento foi em média de 45,53 vezes, e de 38,13 vezes para o IMOB2. Isto pode ser percebido na Figura 16.

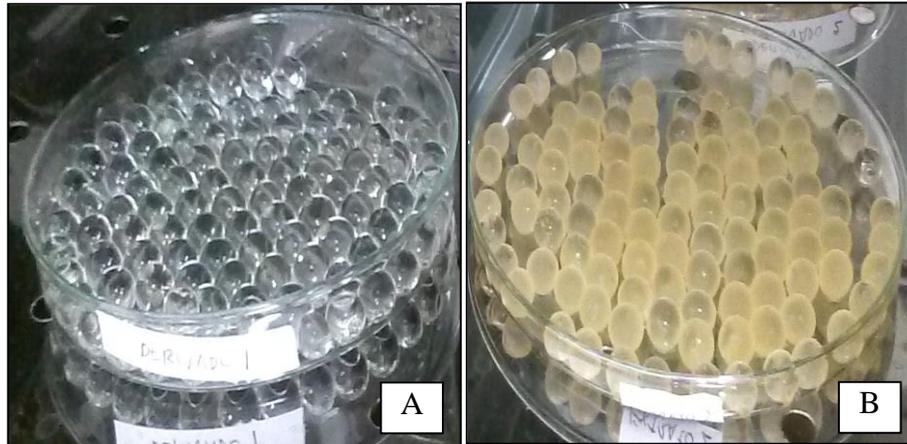


Figura 16. Esferas de hidrogel imobilizadas - IMOB1 (A), IMOB2 (B).

Após retirada da água na estufa, as esferas praticamente retornaram ao seu tamanho inicial, porém houve um aumento médio da massa das esferas de 24,6% para o CAT1 e 25,8% para o CAT2, indicando que, as substâncias contidas nos extratos, entre elas a bromelina, permaneceram fixadas no suporte e apenas a água foi removida. Os derivados catalíticos (CAT1 e CAT2) também exibiram colorações diferentes aos das esferas de hidrogel *in natura*.

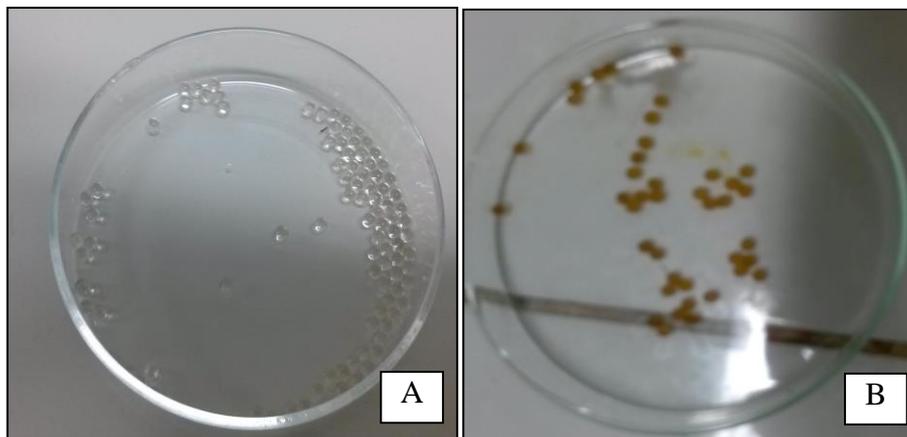


Figura 17. Esferas de hidrogel *in natura* (A), Derivado catalítico CAT1 ou CAT2 (B).

4.4 Concentração de proteínas

A concentração de proteínas para o extrato bruto obtido sem trituração (EXT1) foi de 0,13 mg/mL para 1 dia de imersão, após 5 dias, este valor aumentou para 0,96 mg/mL.

Quando o tempo de imersão atingiu 9 dias, o teor de proteína no extrato caiu para 0,90 mg/mL. Quando utilizou-se o extrato enzimático nº 2 (EXT2), percebeu-se a mesma tendência, porém todos os teores de proteínas foram muito superiores aos valores do primeiro extrato, sugerindo que a trituração em liquidificador favorece a extração de proteínas da casca do abacaxi. O teor de proteína do EXT2 para 1 dia de imersão foi de 1,26 mg/mL, para 5 dias 1,95 mg/mL e 1,93 mg/mL em 9 dias. Esses resultados corroboram com o trabalho de Ketnawa, Chaiwhit e Rawdkuen (2012), que mostrou um total de proteínas extraídas correspondente a 132,4 mg/100g de casca do abacaxi, equivalendo a 0,26 mg/mL de extrato aquoso. Vale ressaltar que nesse caso, o extrato enzimático foi obtido imediatamente após trituração mecânica, não houve tempo de imersão. O fato das concentrações de proteínas obtidas para o EXT2 serem superiores, pode justificar uma influência direta do tempo de extração com a concentração de proteína obtida nos extratos aquosos.

No que diz respeito à massa de proteínas imobilizadas no suporte, os resultados mostraram para ambos os extratos que, o tempo de extração influenciou de forma inversa, ou seja, quanto maior esse tempo menor o teor imobilizado. Para extratos enzimáticos com 1 dia de imersão, produziu-se esferas com 6,26 mg/g do suporte para o IMOB1 e 68,87 mg/g do suporte para IMOB2. Decorridos 5 dias de extração, esse valores foram de 24,48 mg/g para e 53,73 mg/g do suporte; e com 9 dias 18,21 mg/g e 40,00 mg/g para IMOB1 e IMOB2 respectivamente. A concentração de proteína no suporte foi calculado pela equação 2.

Tabela 3. Concentração de proteína dos extratos enzimáticos e das esferas imobilizadas correspondentes

Concentração de Proteína	Tempo de extração (dias)		
	1	6	9
EXT1 (mg/mL)	0,13 ± 0,01*	0,96 ± 0,03*	0,90 ± 0,02*
IMOB1 (mg/g)	6,26 ± 1,70*	24,48 ± 10,24*	18,21 ± 3,98*
EXT2 (mg/mL)	1,26 ± 0,05*	1,95 ± 0,06*	1,93 ± 0,05*
IMOB2 (mg/g)	68,87 ± 16,40*	53,73 ± 8,48*	40,00 ± 13,09*

* Desvio padrão (n = 3)

De acordo com os valores mostrados, embora tempos mais longos de extração tenham produzido maior teor de proteína no extrato enzimático bruto, isto não implicou num suporte com mais proteínas imobilizadas, ou por outra, a manutenção das cascas de abacaxi imersas em água à 5°C por um tempo maior que 1 dia, implicou, apenas, em desperdício de

recursos. Não estão claros os motivos que ocasionaram esse fenômeno, contudo, devem estar ligados à capacidade de absorção de soluções aquosas pelo suporte. Azevedo (2008) mostrou essa influência quando estudou o processo de hidratação da poliacrilamida por diferentes soluções, e concluiu que, a depender do soluto e sua concentração, alterava-se a capacidade de hidratação do hidrogel.

Assim, o imobilizado com melhor teor de proteína, foi o IMOB2, ou seja, aquele obtido a partir do extrato triturado (EXT2), com tempo de extração de 1 dia.

4.5 Atividade de hidrólise: palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-npp)

Os resultados relativos à atividade de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) foram satisfatórios. Para 1 dia de extração os extratos 1 e 2 exibiram valores de $0,0087 \pm 0,0017$ U/mL e $0,0125 \pm 0,0012$ U/mL para a atividade de hidrólise. Esses valores mostram que a trituração em mecânica favoreceu a extração de lipases que hidrolisam esse tipo de substrato. Também foram medidas as atividades das esferas IMOB1 e IMOB2, os valores obtidos foram de $0,0107 \pm 0,0007$ U/g e $0,0225 \pm 0,0051$ U/g respectivamente.

No que diz respeito aos rendimentos de imobilização, obteve-se 24,0% e 28,8% em termos de proteínas e 5,1% e 7,8% em termos de atividade para a produção do IMOB1 e IMOB2 respectivamente. Esses resultados evidenciam que extratos preparados a partir de trituração mecânica resultam em melhor rendimento de imobilização tanto em termos de proteínas quanto em atividade.

Os extratos enzimáticos com 6 dias, apresentaram valores de atividade lipolítica de $0,0109 \pm 0,0070$ U/mL para o EXT1 e $0,0120 \pm 0,0040$ U/mL para o EXT2. Os valores de atividade para os imobilizados foram de $0,0147 \pm 0,0019$ e $0,0140 \pm 0,0005$ U/g para IMOB1 e IMOB2 respectivamente. O rendimento de imobilização foi de 12,9% em termos de proteína e 9,1% em termos de atividade para o imobilizado feito a partir do extrato que não passou por trituração mecânica. Para o outro tipo de preparação, esses valores foram de 14,4% e 32,4% para rendimento em termos de proteína e atividade respectivamente.

Os extratos enzimáticos com 9 dias de extração lograram valores de $0,0119 \pm 0,0051$ U/mL e $0,0117 \pm 0,0007$ U/mL, assim como seus respectivos imobilizados que apresentaram atividade de hidrólise do *p*-NPP de $0,0147 \pm 0,0019$ U/g e $0,0200 \pm 0,0101$ U/g. Com 9 dias, o rendimento em termos de proteína e foi de 9,9% para a primeira imobilização e

e 10,1% para a segunda, os rendimentos em termos de atividades alcançaram 40,6% e 18,7% respectivamente.

Em relação aos resultados expostos, embora os valores de atividade de hidrólise do *p*-NPP colhidos possam ser considerados baixos comparados, por exemplo, com a casca (1,02 U/g) e o *frit* de laranja (*Citrus sinensis L. Osbeck*) (3,12 U/g) mostrados no trabalho de Delgado (2014), ainda sim é bastante expressivo, uma vez que não se usou nenhuma técnica de purificação do extrato lipásico. Nesse mesmo trabalho, Delgado (2014) não identificou atividade de hidrólise do *p*-NPP para a casca, poupa e sementes de manga (*Mangífera indica L.*) e bagaço de laranja (*Citrus sinensis L. Osbeck*).

Tabela 4. Atividade de hidrólise *p*-NPP e parâmetros de imobilização para extratos com 1 dia de extração.

Cascas de Abacaxi	Atividade do extrato enzimático ¹ (U/mL)	Atividade das esferas imobilizadas ² (U/g)	Rendimento em termos de proteína (%)	Rendimento em termos de atividade (%)
Extração 1	0,0087 ± 0,0017*	0,0107 ± 0,0007*	24,0	5,1
Extração 2	0,0125 ± 0,0012*	0,0225 ± 0,0051*	28,8	7,8

¹ Refere-se ao que foi denominado de extrato enzimático (EXT1 e EXT2) com 1 dia de extração,² Imobilizado (IMOB1 e IMOB2) respectivamente. * Desvio padrão (n=3).

Tabela 5. Atividade de hidrólise *p*-NPP e parâmetros de imobilização para extratos com 6 dias de extração.

Cascas de Abacaxi	Atividade do extrato enzimático ¹ (U/mL)	Atividade das esferas imobilizadas ² (U/g)	Rendimento em termos de proteína (%)	Rendimento em termos de atividade (%)
Extração 1	0,0109 ± 0,0070*	0,0147 ± 0,0019*	12,9	9,1
Extração 2	0,0120 ± 0,0040*	0,0140 ± 0,0005*	14,4	32,4

¹ Refere-se ao que foi denominado de extrato enzimático (EXT1 e EXT2) com 6 dia de extração,² imobilizado (IMOB1 e IMOB2) respectivamente. * Desvio padrão (n=3).

Notou-se também que a trituração mecânica, favoreceu o aumento da atividade lipolítica tanto nos extratos brutos quanto nos seus respectivos imobilizados, e que, o tempo de extração influenciou de forma oposta nos rendimentos. Enquanto o rendimento em termos

de proteína decresceu com o aumento do tempo, o rendimento em termos de atividade aumentou em função do aumento do tempo de extração. Entretanto, a despeito dos desvios padrões, considerou-se como a melhor situação aquele onde houve trituração mecânica das cascas no liquidificador e tempo de extração de 1 dia.

Tabela 6. Atividade de hidrólise *p*-NPP e parâmetros de imobilização para extratos com 9 dia de extração.

Cascas de Abacaxi	Atividade do extrato enzimático ¹ (U/mL)	Atividade das esferas imobilizadas ² (U/g)	Rendimento em termos de proteína (%)	Rendimento em termos de atividade (%)
Extração 1	$0,0119 \pm 0,0051^*$	$0,0152 \pm 0,0010^*$	9,9	40,6
Extração 2	$0,0117 \pm 0,0007^*$	$0,0200 \pm 0,0101^*$	10,1	18,7

¹ Refere-se ao que foi denominado de extrato enzimático (EXT1 e EXT2) com 9 dia de extração,² imobilizado (IMOB1 e IMOB2) respectivamente. * Desvio padrão (n=3).

4.6 Atividade de esterificação

Os extratos de casca do abacaxi apresentaram atividade de esterificação entre o ácido láurico e o n-propanol. Diferentemente do que aconteceu com a hidrólise, os catalisadores provenientes do processo de extração sem trituração (EXT1, IMOB1 e CAT1) apresentaram atividades de esterificação superiores aos seus correlatos com trituração mecânica (EXT2, IMOB2 e CAT2), embora esse valores estejam bem próximos. Nota-se que, aparentemente, as esferas desidratadas obtiveram incremento de atividade em relação às hidratadas, no entanto, vale ressaltar que as esferas IMOB1 e IMOB2 possuem massa muito superior aos catalisadores CAT1 e CAT2.

Os extratos enzimáticos n° 1 e n° 2 obtiveram atividade de $1,82 \pm 0,36$ U/mL e $1,72 \pm 0,35$ U/mL respectivamente. Para os imobilizados n°1 e n° 2 o valores foram de $4,72 \pm 0,23$ U/g* e $4,10 \pm 0,48$ U/g* e para os derivados catalíticos obteve-se $7,14 \pm 0,50$ U/g** e $7,01 \pm 0,49$ U/g**. Os valores encontrados são apresentados na Tabela 7.

Pierozan (2014) obteve atividade de esterificação do ácido láurico com n-propanol entre 7,06 e 57,88 U/g de extrato de sementes de trigo (*Triticum aestivum*). Esses resultados evidenciam que as cascas do abacaxi produziram valores satisfatórios, uma vez que estas renderam atividade máxima de 9,10 U/g de cascas secas do abacaxi. Essa relevância é

ainda maior se for considerado que os cereais e as sementes de oleaginosas são as principais fontes de lipases vegetais (PAQUES; MACEDO, 2006).

Tabela 7. Produtividade de lipase e atividade de esterificação do extrato enzimático, esferas imobilizadas e derivado catalítico.

Cascas de Abacaxi	Produtividade (U/g casca seca)	Atividade do extrato enzimático ¹ (U/mL)	Atividade das esferas imobilizadas ² (U/g)*	Atividade das esferas imobilizadas desidratadas ³ (U/g)**
Extração 1	$9,10 \pm 1,80$	$1,82 \pm 0,36$	$4,72 \pm 0,23$	$7,14 \pm 0,50$
Extração 2	$8,59 \pm 1,75$	$1,72 \pm 0,35$	$4,10 \pm 0,48$	$7,01 \pm 0,49$

¹ Refere-se ao que foi denominado de extrato enzimático (EXT1 e EXT2) com 1 dia de extração, ² imobilizado (IMOB1 e IMOB2) respectivamente e ³ derivado catalítico (CAT1 e CAT2) respectivamente. * Utilizou-se a massa de catalisador referente às esferas hidratadas.** Utilizou-se a massa de catalisador referente às esferas desidratadas. Desvio padrão (n=3).

4.7 Produção de ésteres (esterificação e transesterificação)

A produção de dodecanoato de n-propila evidenciou que CAT1 não obteve rendimento superior ao da reação não catalisada, no entanto, o catalisador CAT2 mostrou resultado promissor, uma vez que, atingiu rendimento máximo de 95,1% para 48 horas de reação, e, nos três momentos investigados, sempre manteve-se com rendimento melhor que o CAT1 e a reação não catalisada. Notou-se também que, após as 48 horas de reação, houve um deslocamento do equilíbrio reacional em direção aos reagentes nas três reações.

Já na produção do dodecanoato de etila, tanto o CAT1 quanto o CAT2, lograram rendimentos superiores aos obtidos sem o uso catalisador. Isso mostra que, efetivamente, os catalisadores deslocaram a reação no sentido dos produtos. Contudo, ao contrário do que aconteceu com n-propanol, o CAT1 obteve melhor desempenho do que o CAT2. Com 120 horas de reação, o CAT1 alcançou 90,7% de rendimento e o CAT2 79,0% de rendimento. Nessa experimento, as reações atingiram extensão máxima com 120 horas para as três formas.

Quando se utilizou o metanol na reação, para produzir o dodecanoato de metila, observou-se melhores rendimentos com 24 horas, e a partir daí, houve um deslocamento gradual em direção aos reagentes nas três configurações. Esse experimento indicou que o uso de metanol, possivelmente, inativou o efeito dos derivados catalíticos CAT1 e CAT2, pois estes obtiveram resultados inferiores aos da reação sem catalisador. Esse fenômeno pode ser

explicado por analogia ao trabalho de Shimada et al. (1999), onde estes afirmam, que o uso de metanol aumenta a perda de atividade das lipases (Novozym 435). O que também pode estar ocorrendo para as lipases vegetais da casca do abacaxi. Estes resultados são resumidos na Figura 18.

Na Figura 19 são apresentados os percentuais de rendimento da transesterificação do azeite de oliva com os álcoois n-propanol, etanol e metanol em termos de ésteres do ácido oleico. Este experimento mostrou que o não houve formação de oleato de n-propila em nenhum dos três casos (sem catalisador, CAT1, CAT2) mesmo com 120 horas de reação.

Para a reação conduzida com etanol, detectou-se a formação do éster oleato de etila para o três casos, contudo os valores mais expressivos foram com 120 horas de reação, onde o CAT2 obteve o melhor rendimento de 18,1%, seguido pelo CAT1 com 12,8%. Nesse ponto, notou-se uma influência positiva no deslocamento da reação no sentido dos produtos, indicando que as lipases imobilizadas obtiveram efeito.

A formação do oleato de metila foi melhor favorecida pelo uso do CAT2, com 120 horas, e logrou rendimento de 47,3%, enquanto que nas outras duas configurações os resultados foram de 7,8 e 9,5% para reação sem catalisador e com CAT1 respectivamente. Embora estes resultados não estejam bem uniformes, pode-se entender que os derivados catalíticos, em comparação a amostra sem catalisador, influenciaram o deslocamento no sentido dos produtos da reação.

O uso do metanol para a transesterificação mostrou que os derivados catalíticos CAT1 e CAT2 influenciaram positivamente o equilíbrio da reação no sentido dos produtos, reforçando a ideia que o derivados catalíticos feitos a partir da casca do abacaxi possuem atividade lipolítica no tocante a transesterificação.

Os cromatogramas das reações de esterificação e transesterificação são mostrados nos apêndices 5 e 6 respectivamente.

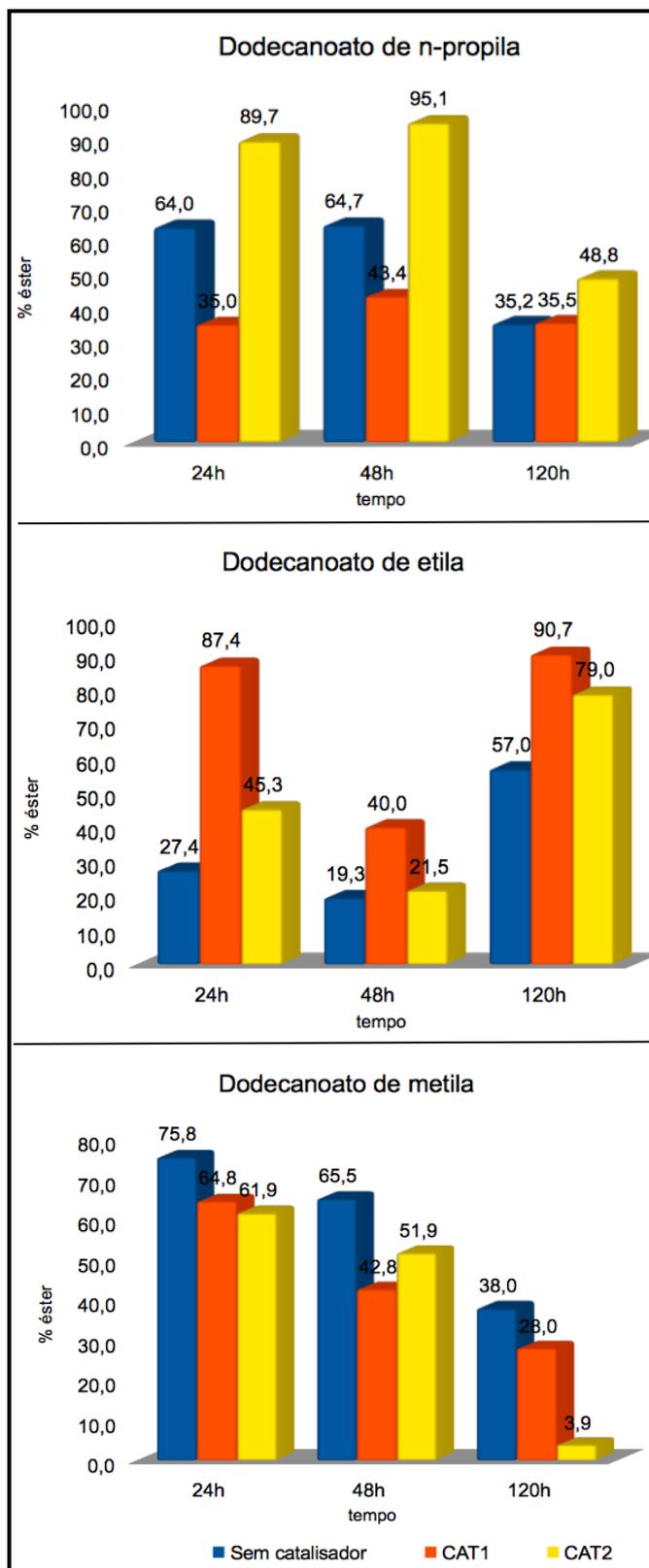


Figura 18. Rendimento da esterificação do dodecanoato de n-propila, etila e metila.

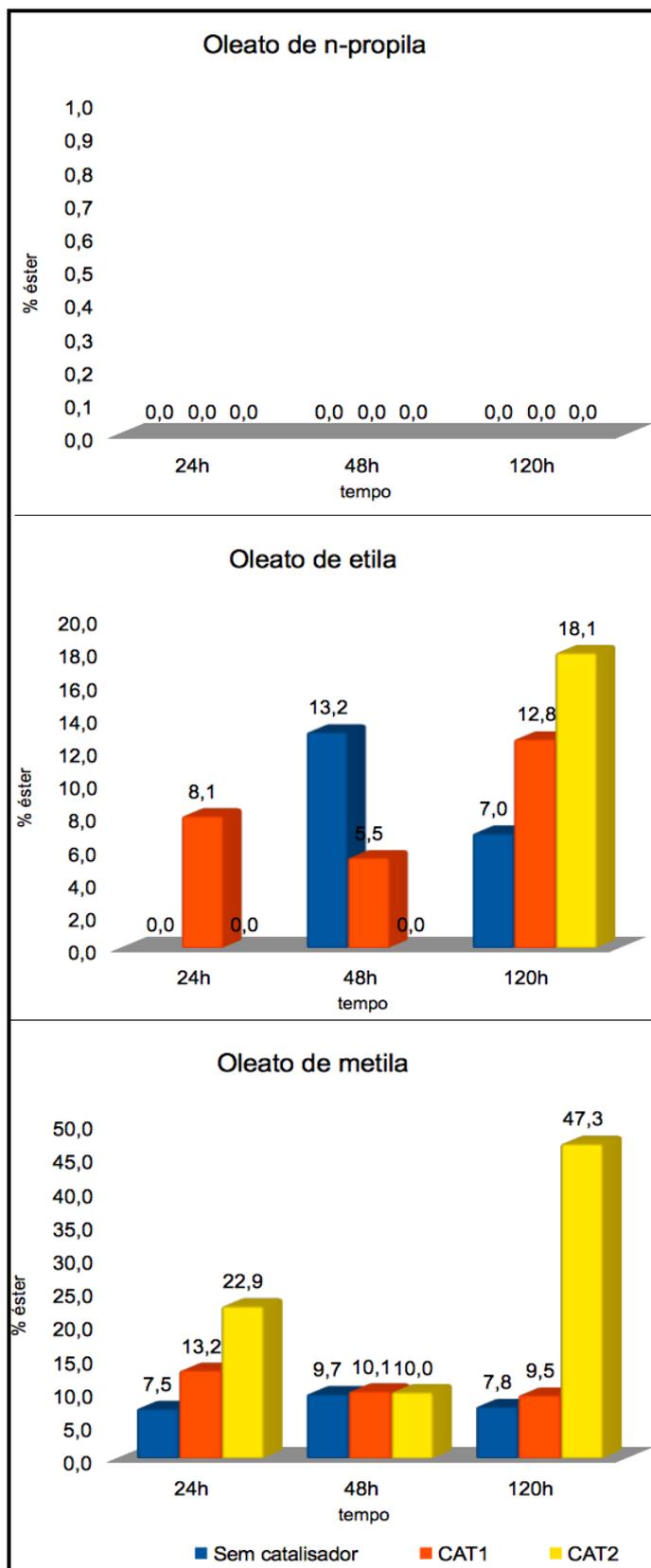


Figura 19. Rendimento da transesterificação do oleato de n-propila, etila e metila.

5. CONCLUSÃO

Ao final deste trabalho, fica claro que as cascas do abacaxi são fontes de bromelina e que, a simples imersão destas em água é suficiente para haver a migração dessas moléculas para a fase líquida. A introdução da trituração mecânica com água, fez melhorar o potencial lipolítico do extrato produzido. No tocante ao tempo de extração, mesmo favorecendo a extração das enzimas, o tempo de 1 dia mostrou-se eficaz para os objetivos deste estudo.

Quando fez-se a imobilização dos extratos nas esferas de hidrogel, houve, claramente, êxito na fixação dessa atividade lipolítica no suporte, uma vez que se conseguiu um pico de 40,6% de rendimento de fixação em termos de atividade para o imobilizado nº1 com 9 dias de extração e detectou-se atividade de hidrólise do *p*-NPP para as esferas imobilizadas tanto com o EXT1 quanto para o EXT2.

Nas reações de transesterificação e esterificação, os derivados catalíticos CAT1 e CAT2, mostraram de uma forma geral que favorecem do deslocamento da reação no sentido dos produtos. Na formação dos ésteres do ácido dodecanóico, os derivados catalíticos obtiveram bons resultados para o *n*-propanol e para o etanol, CAT2 e CAT1, respectivamente. A formação do dodecanoato de *n*-propila atingiu valor máximo de 95,1% de conversão para 48 horas de reação, enquanto que o CAT1 logrou 90,7% para o dodecanoato de etila em 120 horas de reação.

Na transesterificação, os derivados catalíticos não mostraram influencia para o *n*-propanol, ou seja, não houve formação do oleato de *n*-propila para nenhum dos casos. Diferentemente do primeiro caso, detectou-se a formação dos ésteres etílicos e metílicos com alguma influência dos derivados catalíticos no aumento do deslocamento da reação. A conversão máxima obtida foi de 47,3% para o oleato de metila e 18,1% para o oleato de etila para 120 horas de reação.

Em síntese, foi possível perceber que o catalisador heterogêneo formado pelo extrato da casca do abacaxi com trituração mecânica e esferas de hidrogel se mostrou promissor como biocatalisador na produção de ésteres de interesse comercial.

6. REFERÊNCIAS

ABÍLIO, G. M.; HOLSCHUH, H. J.; BORA, P. S.; OLIVEIRA, E. F. D.; Extração, Atividade da Bromelina e Análise de Alguns Parâmetros Químicos em Cultivares de Abacaxi. Rev. Bras. Frutic., v. 31, n. 4, p. 1117-1121, 2009.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured publishing corporation, 2007.

ALONSO, G. P. Diseño de herramientas bioquímicas para la ingeniería molecular de derivados inmovilizados de renina y β -Galactosidasa. Tese de doutorado. Universidad Complutense de Madrid, Espanha, 1996.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – key factors affecting efficiency of processes. Renewable energy, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

ARIELA, V. P.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; BRUNO, L. M.; CASTRO, H. F.; Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. Química Nova, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2008.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas: Fundamentos, métodos y aplicaciones. Ars Pharmaceutica, v. 39, p. 23-39, 1998.

AZEVEDO, Tedson Luis de Freitas. Condicionamento de substrato com hidrogel superabsorvente para produção de mudas em ambiente protegido. 2008. 66f. Tese (Programa de Pós Graduação em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR. 2008.

BCC RESEARCH. Global markets for enzymes in industrial applications, 2014. Disponível em <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>. Acesso em 14/08/2015.

BONINE, B. M.; POLIZELLI, P. P.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Immobilization of a plant lipase from *pachira aquatica* in alginate and alginate/PVA beads. *Enzyme research*, v. 2014, 2014.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for a quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Lei nº 11.097, 13 de Janeiro de 2005. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, e 8.723, de 28 de outubro de 1993; revoga dispositivos da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005; e dá outras providências. *Diário oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 24 set. 2014. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm> Acesso em: 25 jun. 2015.

BRASIL. Lei nº 13.033, 24 de Setembro de 2014. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nº 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. *Diário oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 13 jan. 2005. Disponível em: <<http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll?f=templates&fn=default.htm&vid=anp:10.1048/enu>> Acesso em: 25 jun. 2015.

BRESOLIN, I. R. A. P. Purificação da enzima bromelina de resíduos de abacaxi para estudo de estabilidade em bases dermatológicas. 2013. 95f. Tese (Programa de Pós Graduação em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. 2013.

BRITO, R. “EU VI A MOLÉCULA”. *Revista Veja*, Fortaleza, v. 1998, p. 69. mar. 2007.

CARO, Y.; VILLENEUVE, P.; PINA, M.; REYNES, M.; GRAILLE, J. Lipase activity and fatty acid extracts typoselectivities hydrolysis and interesterification. *Journal of the American*

Oil Chemist's Society, v.77, n.4, p. 349-354, 2000.

CARO, Y.; DHUIQUE-MAYER, C.; TURON, F.; PINA, M.; REYNES, M.; GRAILLE, J. The biocatalytic activity of bromelain in ester synthesis reaction: difference between the intrinsic lipase activity and thermal catalysis. *Biotechnology letters*, v. 23, n. 24, p. 2035-2039, 2001.

CEARÁ (estado). Agência de desenvolvimento de Ceará. Perfil da produção de frutas Brasil Ceará 2013. Ceará, 2013. 31 p.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química nova*, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados, *Química Nova*, v. 26, p. 75-80; 2003.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v.27, n.1, p. 146-156, 2004.

COSTA, R. J. Avaliação Do Processo De Extração De Lipases De Semente de Trigo. 2009. 61 f. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI campus de erchim, Erechin-RS. 2009.

COSTA, H. B. Desenvolvimento de processo para a purificação de bromelina a partir de resíduos de abacaxizeiro (*Ananas comosus var. comosus*) cv. Vitória. 2014. 150 f. Tese (Programa de Pós Graduação em Biotecnologia RENORBIO) – Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Vitória-ES. 2014.

DALLA-VECCHIA, R.; DA GRAÇA NASCIMENTO, M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas

de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DELGADO, C. H. O. Obtenção, caracterização e aplicação de lipases vegetais: Utilizando subprodutos do processamento de laranja e manga para suco. 2014. 88 f. Dissertação (Instituto de Biociências) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP. 2014.

DEMIRBAS, A. Diesel fuel from vegetable oil via transesterification and soap pyrolysis. *Energy Sources*, v. 24, n. 9, p. 835-841, 2002.

DEMIRBAS, A. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. *Energy Conversion and Management*, v. 44, p. 2093-2109, 2003.

DOSANJH, N. S.; KAUR, J. Immobilization, stability and esterification studies of a lipase from a *Bacillus* sp. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 36, n. 1, p. 7-12, 2002.

DHUIQUE-MAYER, C.; CARO, Y., PINA, M., RUALES, J., DORNIER, M.; GRAILLE, J. Biocatalytic properties of lipase in crude latex from babaco fruit (*Carica pentagona*). *Biotechnology Letters*, v. 23, n. 13, p. 1021-1024, 2001.

ECKEY, E. W. Esterification and interesterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 33, n. 11, p. 575-579, 1956.

FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.

FEITOSA, R. K.; LIMA, D. R.; MOURA, L. F. W. G.; MAGALHÃES, E. A.; MOTA, J. G. S. M.; MAGALHÃES, F. E. A. Bioprospecção de atividade de lipases de *passiflora edulis* Sims comercializados no município de Tauá-ce. *Revista Biofar*, v.9, n.2, p. 1-7, 2013.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. *Biotechnology and*

Bioengineering, v. 102, n. 5, p. 1298-1302, 2009.

FROST, G. M.; MOSS, D. A. Production of enzymes by fermentation. *Biotechnology Enzyme Technology*, v. 7, p. 65-2011, 1987.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

GANDHI, N. N.; MUKHERJEE, K. D. Specificity of papaya lipase in esterification of aliphatic alcohols a comparison with microbial lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 78, n. 2, p. 161-165, 2001.

GANDHI, N. N.; MUKHERJEE, K. D. Reactivity of medium-chain substrates in the interesterification of tripalmitin catalyzed by papaya lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 78, n. 9, p. 965-968, 2001b.

GRANADA, G. G.; ZAMBIAZI R. C.; MENDONÇA, C. R. B. ABACAXI: Produção, Mercado e Subprodutos. *Revista B. CEPPA*, v.22, n.2, p. 405-422, 2004.

GOMES, F. M.; SILVA, M. B.; CASTRO, H. F. Avaliação das condições reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila empregando lipase de *Candida rugosa*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, n.2, p. 189-195, 2004.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalyst: Molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, v. 53, n. 1, p. 315-351, 1999.

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

KETNAWA, S.; CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S. Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and Bioproducts Processing*, v. 90, n. 3, p. 385-391, 2012.

KLIBANOV, A.M. Enzymes - nature's chemical machines. *Technology Review*, v. 86, n. 8, p. 40-48, 1983.

KNOTHE, G. The History of Vegetable Oil-Based Diesel Fuels. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J. *The Biodiesel Handbook*. Champaign, Illinois: AOCS Press, 2005.

KNIGHT, K.; PIMENTEL, M. D. C. B.; MORAIS, M. M. C. D.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. D.; MAIA, M. D. M. D. Immobilization of lipase from *Fusarium solani* FS1. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, n. 3, p. 219-221, 2000.

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

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products:(A) the upgrading concept;(B) practical implementations. *Bioresource Technology*, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003

LECKBAND, D.; LANGER, R. An approach for the stable immobilization of proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 37, p. 227-237, 1990.

LEHNINGER, A. *Componentes moleculares das células*. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1976. 262p.

LEUNG, D.Y.C.; WU, X.; LEUNG, M.K.H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, v. 87, p. 1083–1095, 2010.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

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

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 3, n. 1, p. 193-218, 1985.

MATEOS DIAZ, J. C.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 1042–1050, 2006.

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

MARCONATO, J. C.; FRANCHETTI, S. M. M. Polímeros superabsorventes e as fraldas descartáveis. Um material alternativo para o ensino de polímeros. *Química Nova na Escola*, n. 15, 2002.

MARDER, F.; CELIN, M. M.; MAZUIM, M. S.; SCHNEIDER, R. C. S.; MACAGNAN, M. T.; CORBELLINI, V. A. Produção de biodiesel por biocatálise utilizando método alternativo de imobilização da lipase em hidrogel. *Revista TECNO-LÓGICA*, v.12, n.2, p. 56-64, 2008.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HIL, C. G.; AMUNDSON, C. H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A review: *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 67; p. 890-910; 1990.

MEDINA, J. C. Abacaxi: Cultura, matéria prima e aspectos econômicos. *Séries frutas tropicais*, v. 2, 1987.

MENDES, A. A.; GIORDANO, R.C.; GIORDADO, R. L. C.; CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, p.109–115, 2011.

MICHELIN, S. Produção de biodiesel enzimático livre de solvente do óleo do fruto da macaúba (*acrocomia aculeata* (jacq.) lodd. ex mart) em sistema de ultrassom. 2013. 138 f. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI campus de erechim, Erechin-RS. 2013.

MOUNGUENGUI, R. W. M., BRUNSCHWIG, C., BARÉA, B., VILLENEUVE, P.; BLIN, J. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production?. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 39, n. 5, p. 441-456, 2013.

MME - Ministério de Minas e Energia. Cartilha sobre biodiesel. Biodiesel: o novo combustível do Brasil. (2004). Disponível em: <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/galerias/arquivos/biodiesel/Apres_MinistraME_06-12-04.pdf>. Acesso em 25 jun. 2015.

MUKHERJEE, K. D.; HILLS, M. J. Lipases – their structure, biochemistry and application. In: Wooley, P.; Petersen, S. B. Ed(s). Cambridge University Press, 1994, cap. 3.

MUKHERJEE, K. D.; KIEWITT, I. Substrate specificity of lipases in protease preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.46, n.6, p. 2427-2432, 1998.

NASSER, R.O.; LOPES, G. K.; ANDRADE, C. T.; TEIXEIRA, S. C. Correlação entre a capacidade de inchamento e as características estruturais de Polímeros Superabsorventes. In: 9º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLIMEROS. Anais. 2007.

NC-IUBMB – Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme Nomenclature Recommendations. Disponível em <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/1/1/>. Acesso em 19/08/2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIELSEN, M. P.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 110, p.692-700, 2008.

OCDE-FAO – Perspectivas Agrícolas (2015 – 2024) – Capítulo Brasil. Relatório de 2015. Disponível em: <https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>. Acessado em 30 de Setembro de 2015.

PALOCCHI, C.; SORO, S.; CERNIA, E.; FIORILLO, F.; BELSITO, C. M.; MONACELLI, B.; PASQUA, G. Lipolytic isoenzymes from *Euphorbia latex*. *Plant Science*, v. 165, n. 3, p. 577-582, 2003.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais. *Revista Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PAQUES, F. W.; PIO, T.F.; CARVALHO, P.O.; MACEDO, G.A. Characterization of the lipase from *Carica papaya* residues. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11, n.1, p. 20-27, 2008.

PARENTE, E. D. S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. Fortaleza: Tecbio, 2003.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *rhizopus sp.* *Revista Ciência Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.

PATIL, K. J.; CHOPDA, M. Z.; MAHAJAN, R.T. Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science and Technology*, v.4, n.8, p. 971-982, 2011.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em Processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of*

Technology Management & Innovation, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PENCREACH, G.; BARATTI, J. C. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, n. 6, p. 417-422, 1996.

PIEROZAN, M. K. Extração e Avaliação da Atividade de Hidrólise e Esterificação de Extrato Enzimático Lipásico de Semente de Trigo (*triticum aestivum*) Após Concentração Com Sulfato de Amônio. *Revista de Agronomia e Medicina Veterinária IDEAU*, v. 01, n. 01, 2014.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 31, p. 28-37, 2003.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. *Revista Virtual de Química*, v.3, n. 5, p. 385-405, 2011.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 147, p. 237-250, 2009.

RODRIGUES, H. S. Obtenção de ésteres etílicos e metílicos, por reações de transesterificação, a partir do óleo da palmeira Latino Americana macaúba-*Acrocomia aculeata*. 2007. 236 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2007.

ROGÉRIO, M. C. P.; BORGES, I.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUEZ, N. M.; PIMENTEL, J. C. M.; MARTINS, G. A.; RIBEIRO, T. P.; COSTA, J. B.; SANTOS, S. F.; CARVALHO, F. C. Valor nutritivo do resíduo da indústria processadora de abacaxi (*Ananas comosus L.*) em dietas para ovinos. 1. Consumo, digestibilidade aparente e balanços energético e nitrogenado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 3, p. 773-781, 2007.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 76, n. 7, p. 789–793, 1999.

SILVA, L. B. J. Novo Hidrogel eletro, pH e termoresponsivo para aplicações em músculos artificiais e atuadores. 2007. 148 p. Tese (Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG. 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. 7^a edition. John Wiley & Sons, Inc., 2005. 502p.

SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R.; Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and sustainable energy reviews*, v. 4, n. 2, p. 111-133, 2000.

STAVARACHE, C.; VINATORU, M.; NISHIMURA, R.; MAEDA, Y. Fatty acids methyl esters from vegetable oil by means of ultrasonic energy. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 12, n. 5, p. 367-372, 2005.

STENHAGEN, E.; ABRAHAMSON, S.; MCLAFFERTY, F. W. Registry of Mass Spectra Data. John. Willey & Sons, New York, NY, 1974.

STOFFEL, W.; CHU, F.; AHRENS JR, E. H. Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 307-308, 1959.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 9, n. 3, p. 199-210, 1998.

TOLMASQUIM, M. T.; GUERREIRO, A.; GORINI, R. Matriz Energética Brasileira: Uma Prospectiva. *Revista Novos Estudos*, v. 79, p. 47-69, 2007.

TORRES, B. B. Elementos de enzimologia. In: BORZANI, W. et al. *Biotecnologia industrial:*

fundamentos. São Paulo: Edgard Blücher, v. 1, p. 151-176, 2001.

VESCOVI, V. Extração, purificação e imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres. 2012. 79 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP. 2012.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. Química Nova, v. 35, n. 2, p. 274-279, 2012.

VOLPATO, G. Produção, purificação e imobilização de lipases de *Staphylococcus Warneri* ex17 produzidas em glicerol. 2009. 147 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS. 2009.

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

APÊNDICE 1

Cálculo de c_1 e c_2 do modelo matemático que descreve a hidratação da esferas de hidrogel

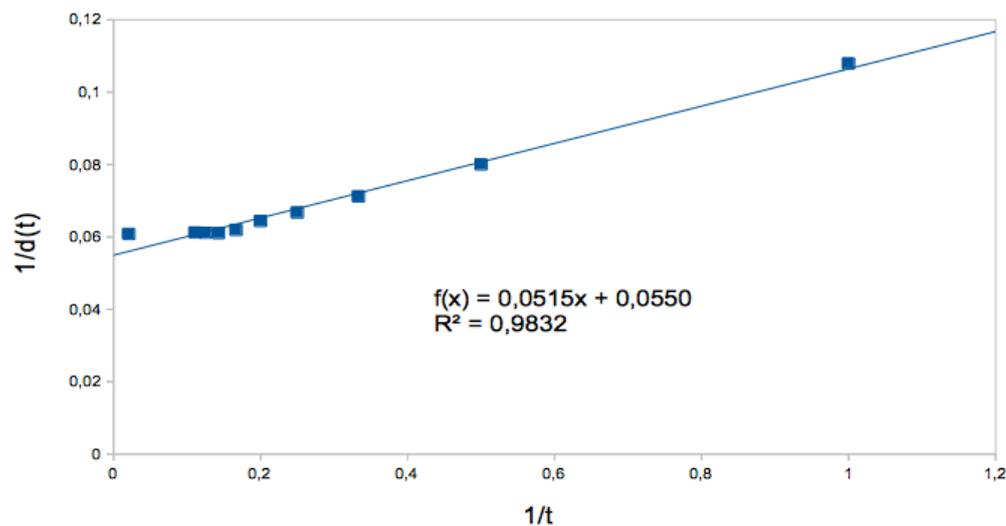
- **Modelo proposto**

$$d(t) = \frac{(c_1 \cdot t)}{(c_2 + t)}$$

- **Linearização do modelo**

$$\frac{1}{d(t)} = \frac{c_2 + t}{c_1 \cdot t} \longrightarrow \frac{1}{d(t)} = \frac{c_2}{c_1} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{c_1}$$

- **Gráfico de $1/d(t)$ vs $1/t$**



logo:

$$\frac{1}{c_1} = 0,0550 \longrightarrow \boxed{c_1 = 18,2}$$

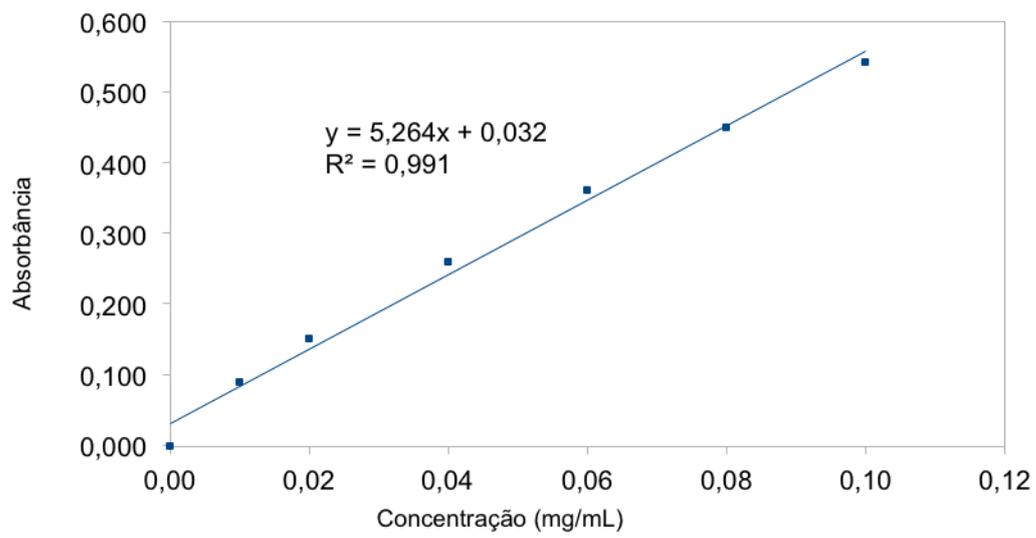
$$\frac{c_2}{c_1} = 0,0515 \longrightarrow \boxed{c_2 = 0,94}$$

- **Modelo :**

$$\boxed{d(t) = \frac{(18,2 \cdot t)}{(0,94 + t)}}$$

APÊNDICE 2

Curva de calibração do método de Bradford

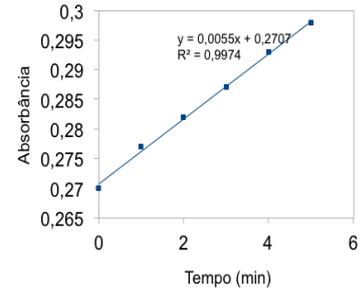
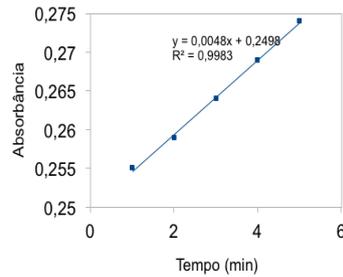
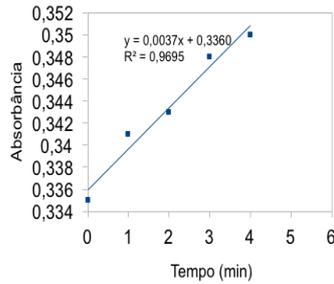


APÊNDICE 3

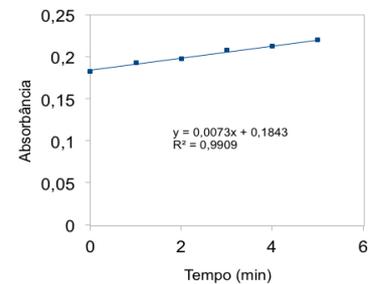
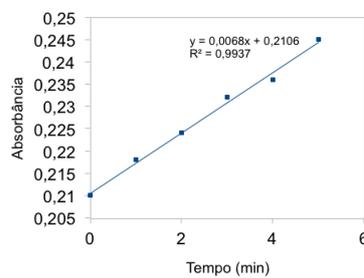
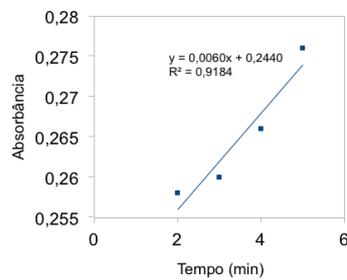
Curvas de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (Absorbância x tempo)

TEMPO DE EXTRAÇÃO: 1 DIA (triplicata)

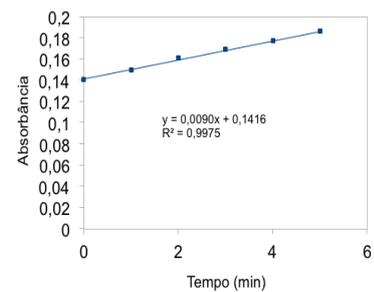
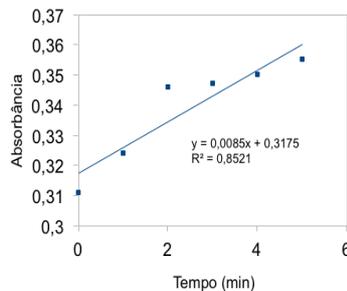
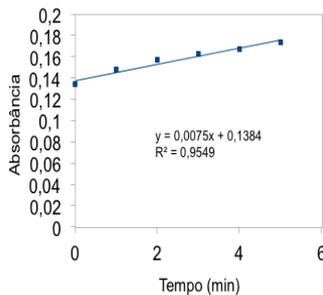
Extrato enzimático n°1 (EXT1):

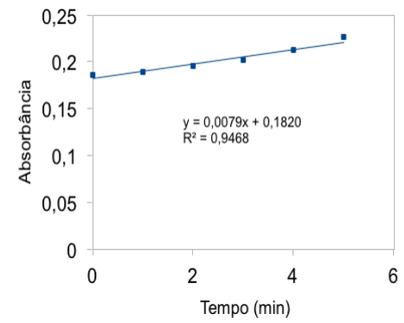
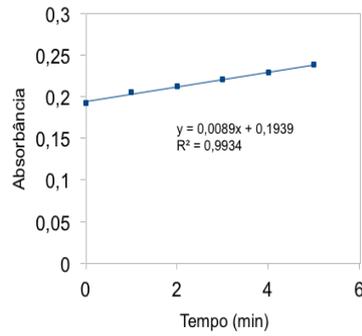
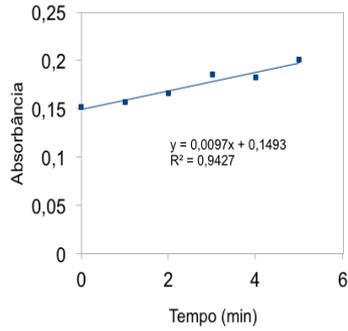
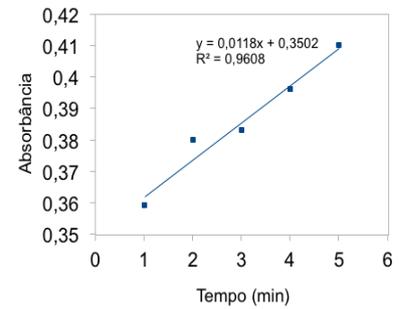
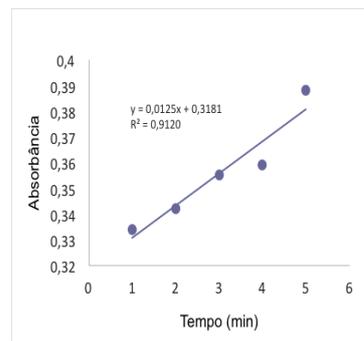
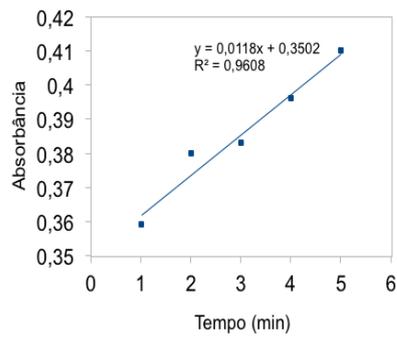
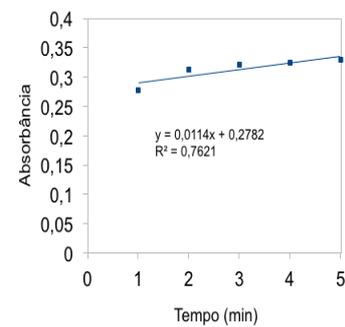
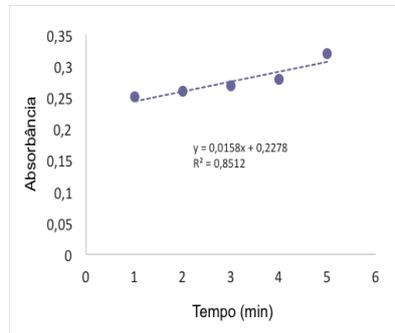
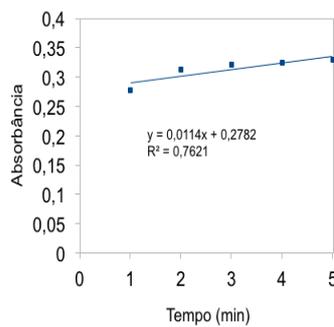


Extrato enzimático n°2 (EXT2):



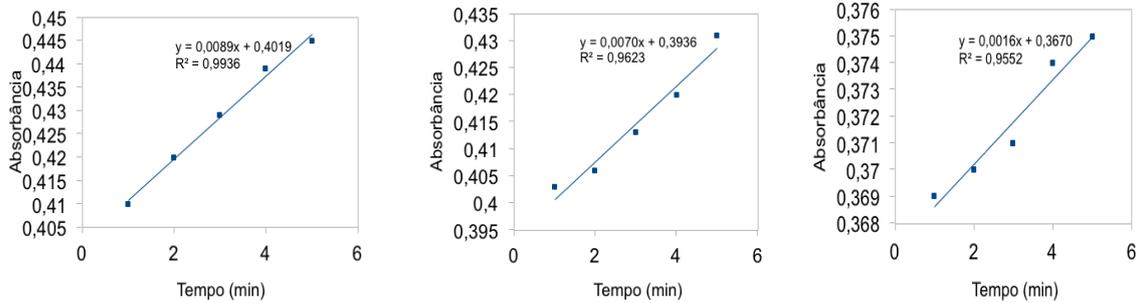
Sobrenadante n°1 (SOBN1):



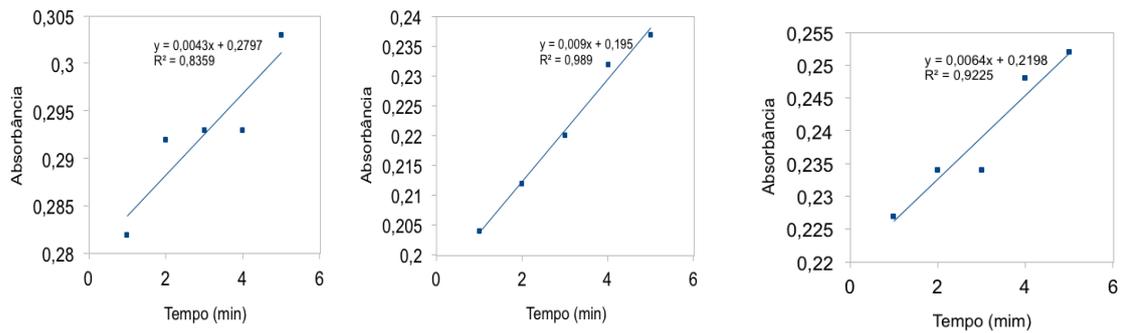
Sobrenadante n°2 (SOBN2):**Imobilizado n°1 (IMOB1):****Imobilizado n°2 (IMOB2):**

TEMPO DE EXTRAÇÃO: 6 DIAS (triplicata)

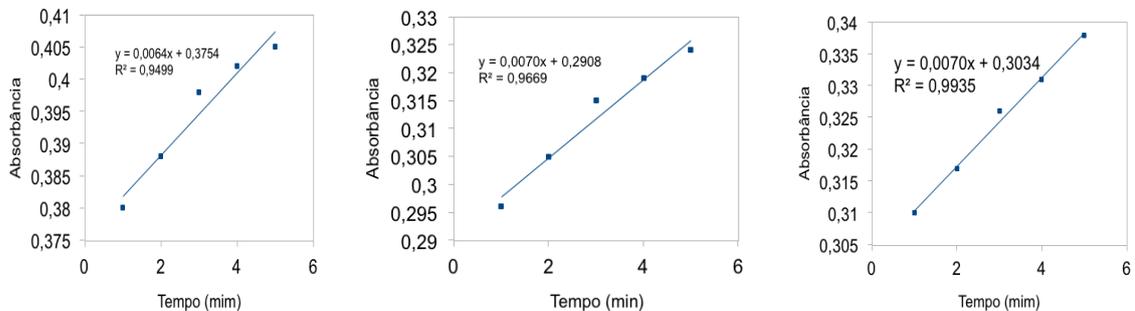
Extrato enzimático n°1 (EXT1):

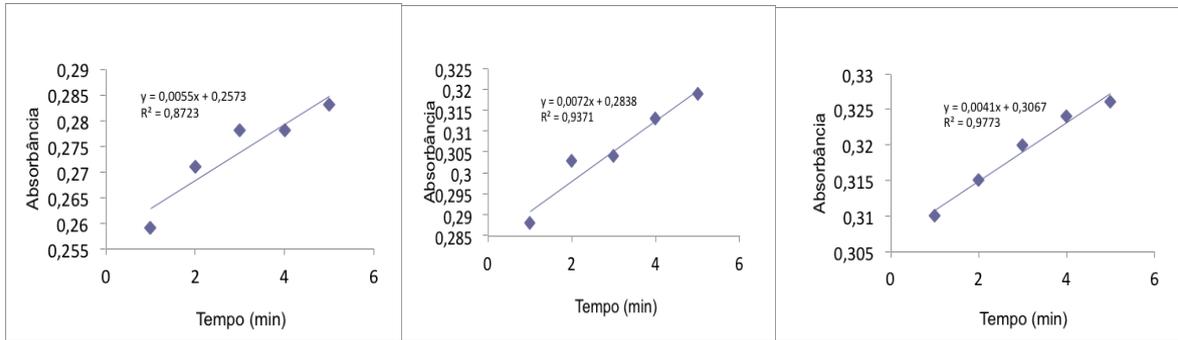
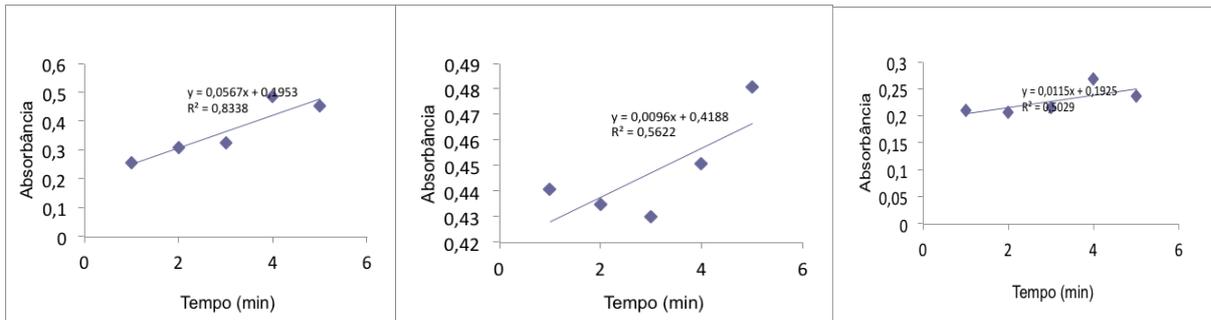
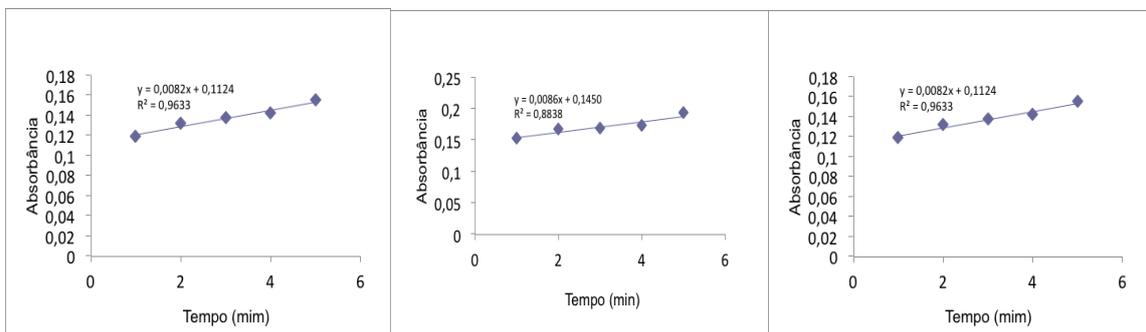


Extrato enzimático n°2 (EXT2):



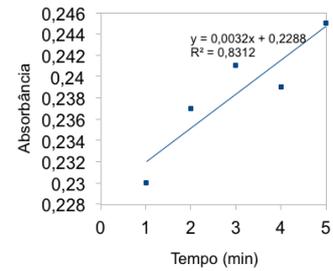
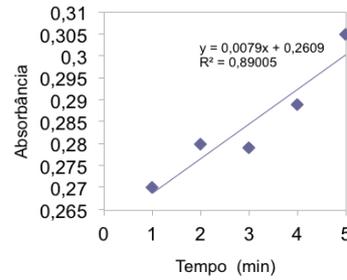
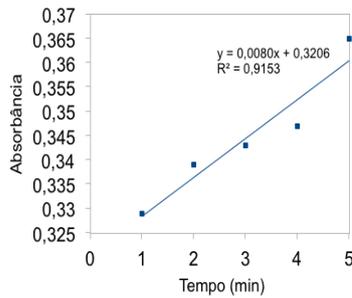
Sobrenadante n°1 (SOBN1):



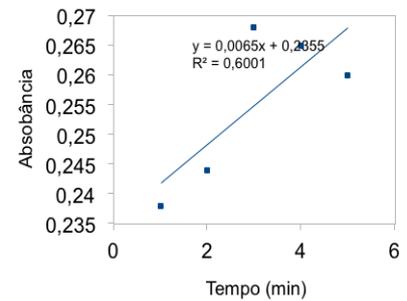
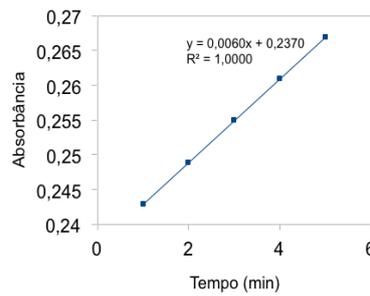
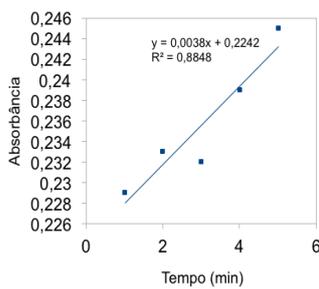
Sobrenadante n°2 (SOBN2):**Imobilizado n°1 (IMOB1):****Imobilizado n°2 (IMOB2):**

TEMPO DE EXTRAÇÃO: 9 DIAS (triplicata)

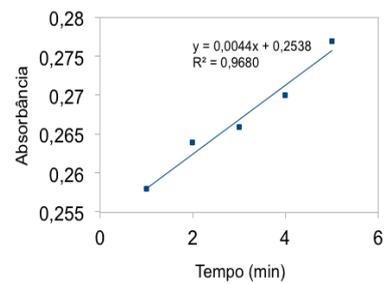
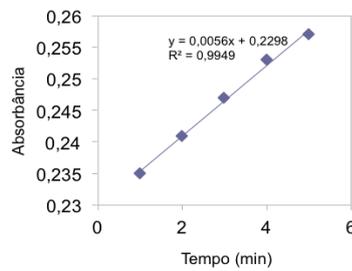
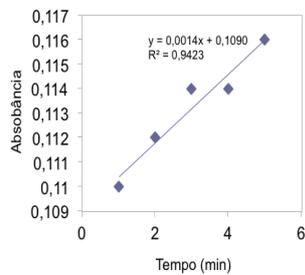
Extrato enzimático n°1 (EXT1):

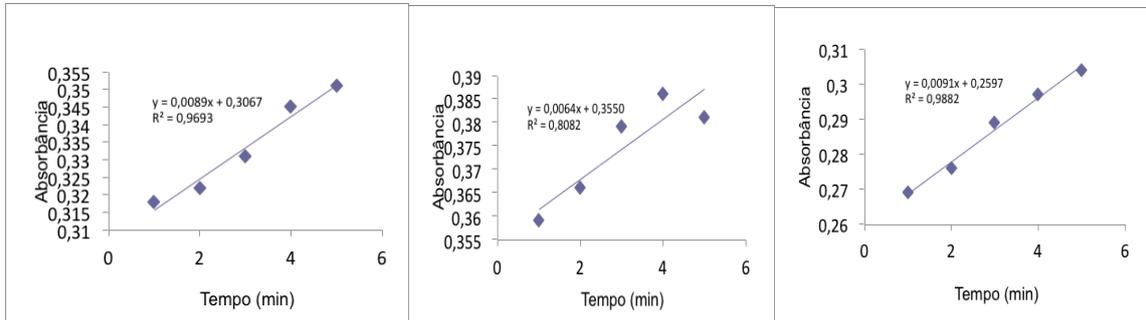
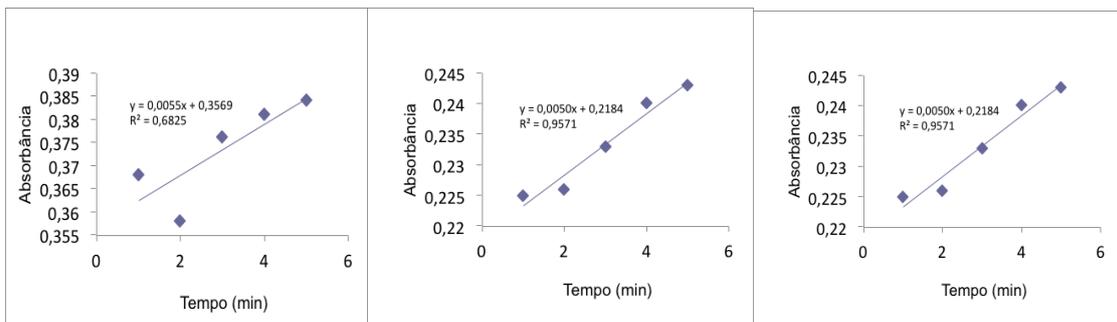
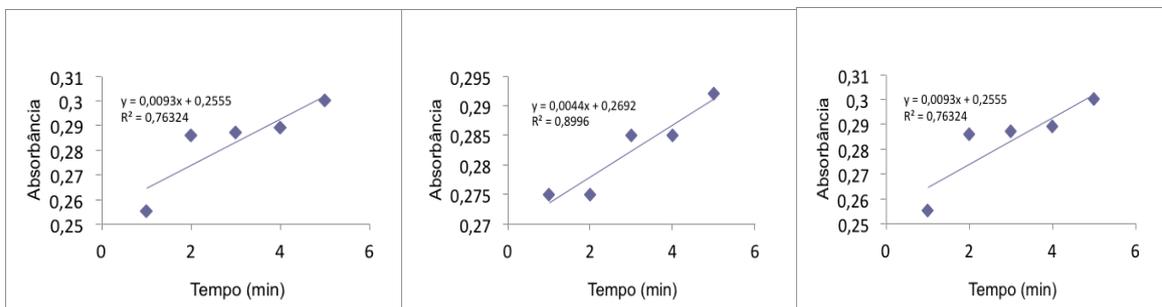


Extrato enzimático n°2 (EXT2):



Sobrenadante n°1 (SOBN1):

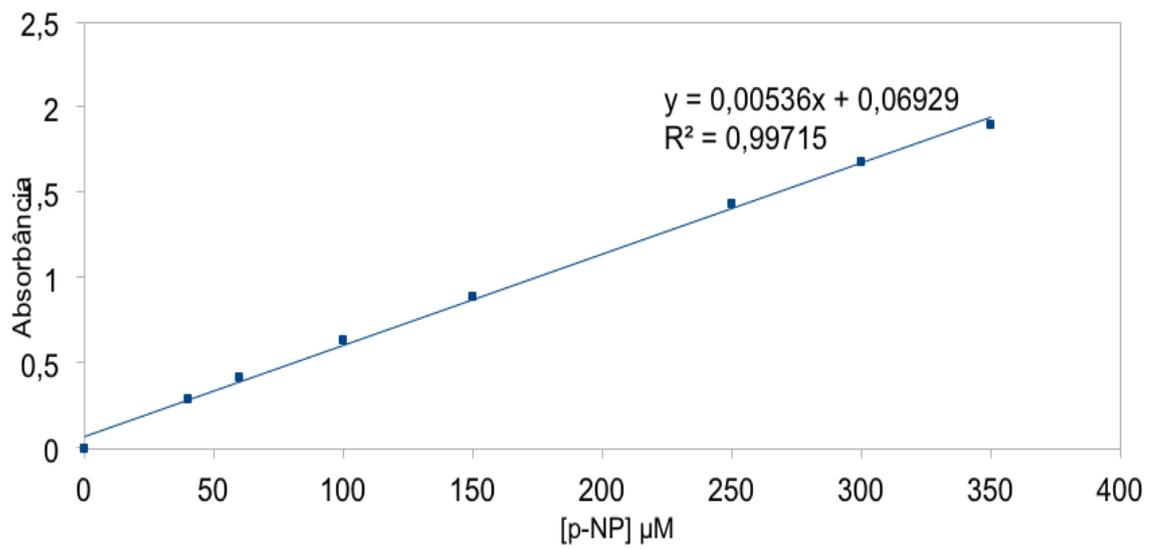


Sobrenadante n°2 (SOBN2):**Imobilizado n°1 (IMOB1):****Imobilizado n°2 (IMOB2):**

APÊNDICE 4

Curva para obtenção do coeficiente de extinção molar

Curva padrão p-NP: Coeficiente de extinção molar (ϵ)



$$\epsilon = 0,00536 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

APÊNDICE 5

Cromatogramas das reações de esterificação para tempos de 24, 48 e 120 horas

* Dodecanoato de n-propila catalisada pelo CAT1

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
EPROP124	Ácido dodecanóico	17,13	65,0	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de n-propila	18,16	35,0	RT, EM, Literatura*
EPROP148	Ácido dodecanóico	17,16	56,6	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de n-propila	18,18	43,4	RT, EM, Literatura*
EPROP1120	Ácido dodecanóico	17,29	64,5	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de n-propila	18,23	35,5	RT, EM, Literatura*

* Dodecanoato de n-propila catalisada pelo CAT2

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
EPROP224	Ácido dodecanóico	17,22	10,3	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de n-propila	18,18	89,7	RT, EM, Literatura*
EPROP248	Ácido dodecanóico	17,04	4,9	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de n-propila	18,17	95,1	RT, EM, Literatura*
EPROP2120	Ácido dodecanóico	16,96	51,2	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de n-propila	18,18	48,8	RT, EM, Literatura*

* Dodecanoato de n-propila sem a presença de catalisador

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
EPROP24	Ácido dodecanóico	16,67	36,0	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de n-propila	18,12	64,0	RT, EM, Literatura*
EPROP48	Ácido dodecanóico	17,28	35,3	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de n-propila	18,19	64,7	RT, EM, Literatura*
EPROP120	Ácido dodecanóico	17,36	64,8	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de n-propila	18,23	35,2	RT, EM, Literatura*

* Dodecanoato de etila catalisada pelo CAT1

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
EET124	Ácido dodecanóico	16,79	12,6	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de etila	15,89	87,4	RT, EM, Literatura*
EET148	Ácido dodecanóico	16,85	60,0	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de etila	15,91	40,0	RT, EM, Literatura*
EET1120	Ácido dodecanóico	16,75	9,3	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de etila	15,90	90,7	RT, EM, Literatura*

* Dodecanoato de etila catalisada pelo CAT2

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
EET224	Ácido dodecanóico	16,77	54,7	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de etila	15,94	45,3	RT, EM, Literatura*
EET248	Ácido dodecanóico	16,72	78,5	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de etila	15,94	21,5	RT, EM, Literatura*
EET2120	Ácido dodecanóico	16,85	21,0	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de etila	15,93	79,0	RT, EM, Literatura*

* Dodecanoato de etila sem a presença de catalisador

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
EETB24	Ácido dodecanóico	16,72	72,6	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de etila	15,90	27,4	RT, EM, Literatura*
EETB48	Ácido dodecanóico	16,29	80,7	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de etila	15,92	19,3	RT, EM, Literatura*
EETB120	Ácido dodecanóico	17,59	43,0	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de etila	16,01	57,0	RT, EM, Literatura*

* Dodecanoato de metila catalisada pelo CAT1

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
EMET124	Ácido dodecanóico	16,74	35,2	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de metila	14,24	64,8	RT, EM, Literatura*
EMET148	Ácido dodecanóico	16,97	57,2	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de metila	14,26	42,8	RT, EM, Literatura*
EMET1120	Ácido dodecanóico	16,95	72,0	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de metila	14,29	28,0	RT, EM, Literatura*

* Dodecanoato de metila catalisada pelo CAT2

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
EMET224	Ácido dodecanóico	16,56	38,1	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de metila	14,24	61,9	RT, EM, Literatura*
EMET248	Ácido dodecanóico	16,64	48,1	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de metila	14,27	51,9	RT, EM, Literatura*
EMET2120	Ácido dodecanóico	16,88	96,1	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de metila	14,29	3,9	RT, EM, Literatura*

* Dodecanoato de metila sem a presença de catalisador

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
EMETB24	Ácido dodecanóico	16,92	24,2	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de metila	14,25	75,8	RT, EM, Literatura*
EMETB48	Ácido dodecanóico	16,65	34,5	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de metila	14,24	65,5	RT, EM, Literatura*
EMETB120	Ácido dodecanóico	16,70	62,0	RT, EM, Literatura*
	Dodecanoato de metila	14,28	38,0	RT, EM, Literatura*

*Os componentes individuais foram identificados por duas bibliotecas digitais de Fonte de Espectro de massas (EM) usando o Tempo de Retenção (RT) como uma rotina de pré-seleção (STENHAGEN, ABRAHAMSON e MCLAFFERTY, 1974) e para confirmação uma inspeção visual de espectro de massas da literatura (ADAMS, 2007).

APÊNDICE 6

Cromatogramas das reações de transesterificação para tempos de 24, 48 e 120 horas

* Oleato de n-propila catalisada pelo CAT1

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
TPROP124	Ácido oleico	33,21	100,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de n-propila	-	0,0	RT, EM, Literatura*
TPROP148	Ácido oleico	33,21	100,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de n-propila	-	0,0	RT, EM, Literatura*
TPROP1120	Ácido oleico	33,21	100,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de n-propila	-	0,0	RT, EM, Literatura*

* Oleato de n-propila catalisada pelo CAT2

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
TPROP224	Ácido oleico	33,21	100,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de n-propila	-	0,0	RT, EM, Literatura*
TPROP248	Ácido oleico	33,21	100,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de n-propila	-	0,0	RT, EM, Literatura*
TPROP2120	Ácido oleico	33,21	100,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de n-propila	-	0,0	RT, EM, Literatura*

* Oleato de n-propila sem a presença de catalisador

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
TPROPB24	Ácido oleico	33,21	100,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de n-propila	-	0,0	RT, EM, Literatura*
TPROPB48	Ácido oleico	33,21	100,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de n-propila	-	0,0	RT, EM, Literatura*
TPROPB120	Ácido oleico	33,21	100,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de n-propila	-	0,0	RT, EM, Literatura*

* Oleato de etila catalisada pelo CAT1

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
TET124	Ácido oleico	33,21	91,9	RT, EM, Literatura*
	Oleato de etila	28,73	8,1	RT, EM, Literatura*
TET148	Ácido oleico	33,21	94,5	RT, EM, Literatura*
	Oleato de etila	27,73	5,5	RT, EM, Literatura*
TET1120	Ácido oleico	33,21	87,2	RT, EM, Literatura*
	Oleato de etila	27,74	12,8	RT, EM, Literatura*

* Oleato de etila catalisada pelo CAT2

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
TET224	Ácido oleico	33,21	100,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de etila	-	0,0	RT, EM, Literatura*
TET248	Ácido oleico	33,21	100,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de etila	-	0,0	RT, EM, Literatura*
TET2120	Ácido oleico	33,21	81,9	RT, EM, Literatura*
	Oleato de etila	27,72	18,1	RT, EM, Literatura*

* Oleato de etila sem a presença de catalisador

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
TETB24	Ácido oleico	33,21	100,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de etila	-	0,0	RT, EM, Literatura*
TETB48	Ácido oleico	33,21	86,8	RT, EM, Literatura*
	Oleato de etila	27,72	13,2	RT, EM, Literatura*
TETB120	Ácido oleico	27,28	93,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de etila	27,72	7,0	RT, EM, Literatura*

* Oleato de metila catalisada pelo CAT1

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
TMET124	Ácido oleico	27,28	86,8	RT, EM, Literatura*
	Oleato de metila	26,50	13,2	RT, EM, Literatura*
TMET148	Ácido oleico	33,21	89,9	RT, EM, Literatura*
	Oleato de metila	26,50	10,1	RT, EM, Literatura*
TMET1120	Ácido oleico	33,21	90,5	RT, EM, Literatura*
	Oleato de metila	26,50	9,5	RT, EM, Literatura*

* Oleato de metila catalisada pelo CAT2

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
TMET224	Ácido oleico	33,21	77,1	RT, EM, Literatura*
	Oleato de metila	26,50	22,9	RT, EM, Literatura*
TMET248	Ácido oleico	33,21	90,0	RT, EM, Literatura*
	Oleato de metila	26,50	10,0	RT, EM, Literatura*
TMET2120	Ácido oleico	33,21	52,7	RT, EM, Literatura*
	Oleato de metila	26,50	47,3	RT, EM, Literatura*

* Oleato de metila sem a presença de catalisador

Reação	Compostos	RT	Porcentagem (%)	Identificação
TMETB24	Ácido oleico	33,21	92,5	RT, EM, Literatura*
	Oleato de metila	26,50	7,5	RT, EM, Literatura*
TMETB48	Ácido oleico	33,21	90,3	RT, EM, Literatura*
	Oleato de metila	26,50	9,7	RT, EM, Literatura*
TMETB120	Ácido oleico	27,27	92,2	RT, EM, Literatura*
	Oleato de metila	26,50	7,8	RT, EM, Literatura*

*Os componentes individuais foram identificados por duas bibliotecas digitais de Fonte de Espectro de massas (EM) usando o Tempo de Retenção (RT) como uma rotina de pré-seleção (STENHAGEN, ABRAHAMSON e MCLAFFERTY, 1974) e para confirmação uma inspeção visual de espectro de massas da literatura (ADAMS, 2007).