



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-  
BRASILEIRA  
INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL - IEDS**

**BRUNO ALVES SOUSA DA SILVA**

**ÓLEO DE FRITURA: OBTENÇÃO DE BIODIESEL POR BIOCATÁLISE  
(NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS/ENZIMAS)**

**ACARAPE-CE**

**Junho de 2017**

BRUNO ALVES SOUSA DA SILVA

**ÓLEO DE FRITURA: OBTENÇÃO DE BIODIESEL POR BIOCATÁLISE  
(NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS/ENZIMAS)**

Trabalho de conclusão do curso desenvolvido na Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito parcial para obtenção do Título de Engenheiro de Energias. Área de concentração: Engenharia de Energias.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristiane Martins de Souza

ACARAPE

Junho de 2017

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira  
Sistema Integrado de Bibliotecas da Unilab(SIBIUNI)  
Catalogação de Publicação na Fonte.

---

Silva, Bruno Alves Sousa da.

S578o

Óleo de fritura: obtenção de biodiesel por biocatálise nanopartículas magnéticas/enzimas / Bruno Alves Sousa da Silva.  
- Acarape, 2017.  
36f: il.

Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Engenharia de Energias, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2017.

Orientadora: Maria Cristiane Martins de Souza.

1. Biodiesel. 2. Nanopartículas. 3. Lipase. I. . II.  
Título.

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai, que sempre me orientou, incentivou e me proporcionou chegar até aqui. A toda minha família e minha companheira Letícia (e família), por estarem ao meu lado em todos os momentos.

À minha orientadora, professora Maria Cristiane, por todo leque de oportunidades que me foi concebido, e pelo exemplo de profissionalismo e humanidade.

Aos amigos que formei durante essa árdua caminhada, que me ajudaram direta e indiretamente.

À UNILAB, sua equipe docente e funcionários, por todo conhecimento a mim repassado.

Aos departamentos da química e da engenharia química da UFC, por permitirem a realização deste trabalho.

Aos professores da banca examinadora, pela contribuição acadêmica.

À FUNCAP por todo apoio financeiro.

E em especial à minha mãe que deixou uma imensa saudade.

“O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem; mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir.”

(ALBERT EINSTEIN)

## RESUMO

O uso da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em reações de interesse industrial deve-se a sua capacidade de atuar em diversas reações com condições mais brandas, conferindo um caráter de alta seletividade, permitindo a obtenção de biobrodutos com maior pureza. Todavia, a imobilização em suportes sólidos, faz-se necessário. O suporte sólido nanopartículas magnéticas - NPM possibilita a fácil separação da mistura reacional através do uso de magnetismo, tendo alta resistência química e mecânica, favorecendo assim o reuso do biocatalisador nos processos industriais. Neste trabalho, Nanopartículas magnéticas de ferro (NPM) foram modificadas e utilizadas como suporte para a imobilização da CALB e o biocatalisador (CALB-NPM) aplicado para a produção de biodiesel a partir de óleo residual de fritura. A produção de ésteres etílicos foi realizada por transesterificação utilizando óleo residual de fritura (ORF) e analisada por cromatografia gasosa (CG). A máxima conversão em oleato de etila obtida foi de 37,14%. Planejamento experimental foi realizado para investigar a influência das variáveis: razão molar óleo/álcool, temperatura e massa de catalisador na conversão de triglicérides e ácidos graxos livres (AGLs) em ésteres etílicos. A análise do valor de probabilidade (p) mostrou que a única variável que não é significativa é temperatura e que maiores conversões são obtidas para maiores concentrações de CALB e maiores razões molares óleo/álcool.

**Palavras-chave:** Lipase. Nanopartículas. Biodiesel.

## ABSTRACT

The use lipase B of *Candida antarctica* (CALB) in reactions of industrial interest is due to its ability to act in several reactions with milder conditions, conferring a character of high selectivity, allowing the production of bio-products with higher purity. However, immobilization on solid supports is necessary. The continuous support of magnetic nanoparticles - NPM allows easy separation of the reaction mixture through the use of magnetism, having high chemical and mechanical resistance, thus favoring the reuse of the biocatalyst in industrial processes. In this work, iron magnetic nanoparticles (NPM) were modified and used as support for an immobilization of CALB and the biocatalyst (CALB-NPM), applied for the production of biodiesel from frying residual oil. The production of essential and electric was performed by transesterification, residual frying oil (ORF) and analysis by gas chromatography (GC). The maximum conversion to ethyl oleate obtained was 37.14%. Experimental design was carried out to investigate an influence of the variables: oil / alcohol molar ratio, temperature and mass of the catalyst in the conversion of triglycerides and free fatty acids (FFAs) to ethyl esters. The analysis of the probability value (p) showed that it is a single variable that is not a distance and a higher temperature and larger conversions are higher for higher concentrations of CALB and higher molar ratios oil / alcohol.

**Keywords:** Lipase. Nanoparticles. Biodiesel.

## LISTA DE FIGURA

Figura 1 – Representação esquemática da discriminação enzimática dos enantiômeros .....	15
Figura 2 – Modificação da superfície de nanopartículas magnéticas, reticulação por glutaraldeído e imobilização da enzima calb.....	19
Figura 3 – Etapas da transesterificação enzimática de um triglicerídeo.....	21
Figura 4 – Superfície de resposta para a conversão de orf em ésteres etílicos.....	29

## LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Concentração de proteínas.....	25
Tabela 2 - Parâmetros de imobilização.....	25
Tabela 3 – Condições de reação e taxa de conversão em ésteres .....	27
Tabela 4 – Análise dos fatores de perturbação das variáveis independentes: massa de catalisador (C), razão molar (RM) e temperatura (T) sobre a conversão .....	27
Tabela 5 – Análise da variância (ANOVA).....	28

## LISTA DE SIGLAS

ANP	Agência nacional do petróleo, gás natural e biocombustíveis
APTS	Aminopropiltriétoxisilano
NPM	Nanopartículas magnéticas de ferro
CALB	Lipase de <i>Candida antarctica</i> do tipo B
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
EC	Comissão para Enzimas
UIB	União Internacional de Bioquímica
OGR	Óleo e gordura residual
ORF	Óleo residual de frituras
RMN	Ressonância magnética nuclear
ρNPB	ρ-Nitrofenil butirato

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1	<b>Contextualização</b> .....	11
1.2	<b>Justificativa</b> .....	11
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	13
2.2	<b>Objetivo específico</b> .....	13
3.	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
3.1	<b>Enzima</b> .....	14
3.2	<b>Nanopartículas magnéticas</b> .....	16
3.3	<b>Imobilização da enzima em suporte</b> .....	18
3.4	<b>Ésteres etílicos: Biodiesel</b> .....	20
4.	<b>METODOLOGIA</b> .....	22
4.1	<b>Materiais</b> .....	22
4.2	<b>Tratamento do suporte com aminopropiltriétoxissilano (APTS)</b> .....	22
4.3	<b>Reticulação com solução de glutaraldeído</b> .....	22
4.4	<b>Imobilização da enzima em nanopartículas magnéticas</b> .....	22
4.5	<b>Quantificação de proteína e medida de atividade</b> .....	23
4.6	<b>Produção de biodiesel</b> .....	24
4.7	<b>Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)</b> .....	24
4.8	<b>Análise estatística</b> .....	24
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	25
5.1	<b>Quantificação de proteína e medida de atividade</b> .....	25
5.2	<b>Aplicação do derivado para obtenção do biodiesel</b> .....	26
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	30
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
	<b>ANEXO A – Cromatógrafo do ensaio 4 da Tabela 3</b> .....	36

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Contextualização

Dentro dos princípios da necessidade de um desenvolvimento sustentável, diversas medidas devem ser tomadas pelo homem de forma a tornar mais harmônico o seu convívio com o meio ambiente. O grande desafio é a continuidade do desenvolvimento, diminuindo os danos causados. Tal fato requer uma nova conduta para o aprimoramento dos processos, com o objetivo fundamental da geração cada vez menor de resíduos e efluentes tóxicos, bem como menor produção de gases indesejáveis ao ambiente.

Na problemática dos processos industriais, um dos principais é o considerável volume de resíduos tóxicos produzidos. Entretanto, isso pode ser minimizado através do emprego de reagentes alternativos apropriados (CLARK; MACQUARRIE, 1998), o aumento da seletividade para maximizar o uso dos materiais de partida (CLARK; MACQUARRIE, 1996), a utilização de catalisadores heterogêneos para facilitar a separação do produto final da mistura, bem como a reciclagem dos reagentes e catalisadores empregados no processo (ANASTAS; KIRCHHOFF, 2002).

Dentre as áreas de pesquisa focadas para estas finalidades, têm-se destacado muito nos últimos anos o uso da biocatálise, com uso de enzimas, que para ter seu uso eficiente, faz-se necessário o uso de suportes para imobilização das mesmas, já que a catálise heterogênea apresenta a vantagem de reuso (CORDEIRO et al., 2011).

### 1.2 Justificativa

Nanopartículas magnéticas de ferro (NPM) podem ser utilizadas como suporte para a imobilização de lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB). O biocatalisador (CALB-NPM), por sua vez, pode ser utilizado na catálise do biodiesel a partir do óleo e gordura residual. Nanopartículas magnéticas são particularmente interessantes para imobilização enzimática devido as suas propriedades magnéticas facilmente permitirem a separação do meio reacional, através do uso de magnetismo, e o tamanho de partícula permitir o melhoramento da resistência química e mecânica, favorecendo assim o reuso do biocatalisador nos processos industriais (SOUZA, 2013).

A enzima é um catalisador biológico homogêneo e ao ser imobilizada em Nanopartículas magnéticas se torna um catalisador heterogêneo, facilitando sua recuperação e

reutilização, atendendo aos princípios da química verde e conferindo maior estabilidade térmica ao derivado (BRUNO et al., 2005).

A CALB é uma enzima capaz de atuar em diversas reações, como, hidrólises e transesterificações, sendo altamente seletivas, reduzindo a produção de reações indesejáveis. A enantio e a quimio seletividade das bioconversões podem simplificar os processos industriais, aumentando o rendimento e diminuindo a geração de subprodutos. Contudo, um dos problemas do uso de enzimas como catalisadores homogêneos é a sua recuperação. Assim, é necessário o uso de suportes que retenham a enzima, mantendo suas características catalíticas (CLARK; RHODES, 2000).

Nesse contexto, as nanopartículas magnéticas que possuem superparamagnetismo permitem a facilidade de separação de meios multifásicos, como na reação de transesterificação, pelo simples uso de um campo magnético (ímã), e sua fácil re-dispersão depois de cessada a aplicação do campo (NANGOI, 2009).

A transesterificação é uma das técnicas utilizadas para produzir biodiesel. Catalisadores ácido, básico ou biológico podem ser utilizados para acelerar a reação. O uso de catalisadores biológico demonstra um potencial crescente devido ao fato de poder serem reutilizados, mais seletivos (favorecendo a formação do produto), não contaminarem o sistema reacional e atuarem em condições mais brandas.

O reaproveitamento de óleo residual para ser utilizado como fonte de combustível evita o seu descarte inadequado, que muitas vezes contamina os solos e os recursos hídricos, que combinado com uso de biocatalisadores atendem aos princípios da química “verde”.

A contribuição deste trabalho é o estudo detalhado dos parâmetros que influem na biocatálise heterogênea, introduzindo um eficiente processo de reuso dos biocatalisadores em reações para produção de biodiesel.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi o estudo de diferentes protocolos de reação de transesterificação do óleo residual de frituras de pasteis, utilizando CALB imobilizada em Nanopartículas Magnéticas de ferro (NPM) com a finalidade de se aplicar em reações de interesse industrial.

### 2.2 Objetivo específico

- ✓ Recobrir a superfície das Nanopartículas magnéticas de ferro com aminopropiltrióxido (APTS) e glutaraldeído para posterior imobilização enzimática.
- ✓ Imobilizar a enzima lipase em nanoestruturas magnéticas.
- ✓ Caracterizar a lipase CALB (Lipase B de *Candida antarctica*) solúvel e imobilizada em relação, atividade enzimática utilizando como substrato para-nitrofenolbutirato *p*NPB e quantidade de proteína por volume de solução e massa de suporte;
- ✓ Reaproveitar o óleo residual de fritura;
- ✓ Aplicar a enzima imobilizada em Nanopartículas magnéticas na síntese enzimática dos ésteres: biodiesel a partir de óleo residual;
- ✓ Analisar a influência das variáveis que influenciam na produção de ésteres etílicos através do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> com dois níveis e três fatores.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Enzima

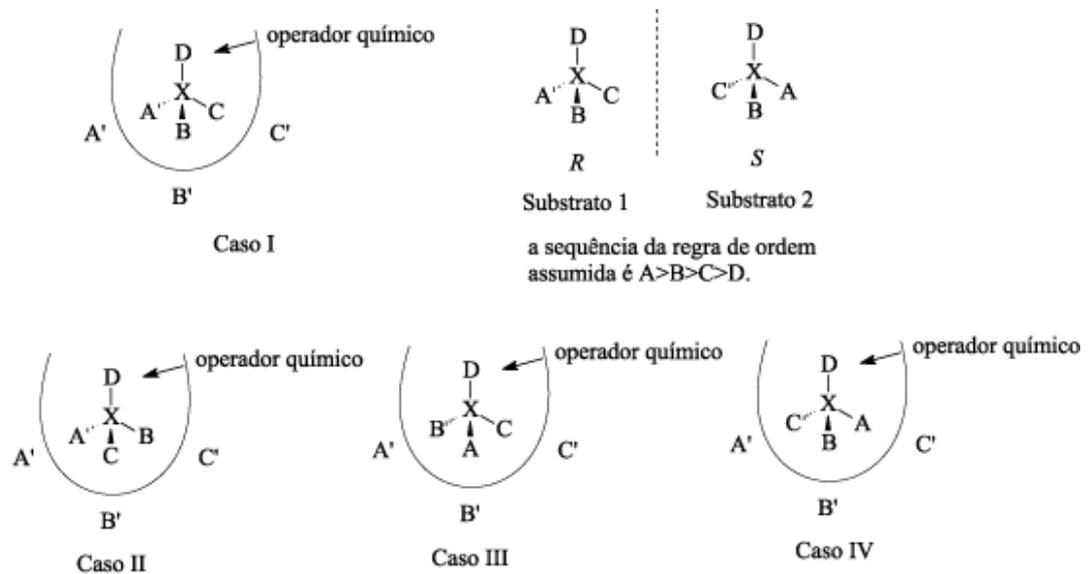
As enzimas são proteínas (catalisadores naturais) formadas por subunidades de aminoácidos (entre 62 a 2500 resíduos de aminoácidos) combinadas por ligações peptídicas, que aceleram a velocidade das reações, sendo altamente versáteis na catálise de vários tipos de reações devido à alta especificidade e estabilidade, temperatura e pH de atuação, ou habilidade para catalisar reações de síntese na presença de solventes orgânicos (VOET; VOET, 1995).

A função catalítica das enzimas está relacionada à capacidade de interação enzima-substrato. Em relação aos catalisadores químicos convencionais, as enzimas se sobressaem por terem seu uso viável em aplicações industriais, como a formação de bioprodutos devido a alta especificidade das enzimas, evitando a formação de produtos prejudiciais ao meio ambiente. As condições brandas de reação aplicadas aos processos enzimáticos também favorecem sua demanda industrial como catalisador (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

O mecanismo de atuação da enzima se inicia com a relação do substrato com o sítio ativo da enzima, na qual várias teorias têm sido desenvolvidas para tentar compreender o processo da catálise enzimática. Entre estas pode-se citar o mecanismo chave e fechadura, do estado induzido e dos três pontos.

A teoria dos três pontos, sugerida por Ogston em 1948, é amplamente usada para explicar a enantiosseletividade das enzimas. Para obter um alto grau de enantiosseletividade, um substrato deveria ser firmemente preso no espaço em 3 dimensões. Entretanto, eles deveriam ter pelo menos 3 pontos diferentes de ataque do substrato no sítio ativo. Isto exemplifica a discriminação dos enantiômeros do substrato racêmico 1 e 2, ilustrado na Figura 1. No caso I, o enantiômero A é um bom substrato permitindo uma ótima interação. Nos casos II a IV, o enantiômero B é um substrato pobre porque a ligação ótima e orientação do grupo D não são possíveis (BARALDI; CORRÊA, 2004).

Figura 1 – Representação esquemática da discriminação enzimática dos enantiômeros



Fonte: (BARALDI; CORRÊA, 2004)

Contudo, para que a reação ocorra é preciso fornecer uma certa quantidade de energia, geralmente, na forma de calor, que favoreça o encontro e a colisão entre enzima e substrato. A energia também é necessária para romper ligações químicas existentes entre os átomos de cada substância, permitindo a ocorrência de outras ligações e por fim a síntese de uma nova substância (ENZIMAS, 2017).

As enzimas podem ser divididas em seis classes, de acordo com a Comissão para Enzimas (*Enzyme Commission* – EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB): Hidrolases – Associam a moléculas de água para promoverem a quebra das ligações covalentes, como a Peptidases por exemplo; Ligases – Responsáveis por formar novas moléculas através da união de duas já pré-existentes, como a Sintetases; Oxido-redutases – Efetuam a transferência de elétrons, o que podemos definir como oxi-redução. Exemplo: Desidrogenases; Transferases – São aquelas enzimas que tem como finalidade realizar a translocação de grupos funcionais como grupamento amina, carbonila, carboxila, fosfato, de uma molécula para outra. Podemos citar como exemplo a Quinase; Liasas – Atuam na remoção de molécula de água, gás carbônico e amônia, a partir da ruptura de ligações covalentes; Isomerasas – Responsáveis por mediar a conversão de substâncias isoméricas, sejam eles geométricos ou ópticos (CABRAL; AIRES-BARROS; GAMA, 2003).

As lipases, pertencentes às hidrolases, destacam-se devido a capacidade de catalisar reações em meios orgânicos com baixo teor de água, mantendo-se estável e à possibilidade de

utilização em condições mais brandas. Essa flexibilidade aliada às diferentes lipases confere a essas enzimas um potencial enorme de aplicações (KIM; YOUN; SHIN, 2006; YIN; LIU; TAN, 2006).

Existe diversos fatores que modificam o comportamento da enzima, dentre os quais destacam-se: a água, o meio orgânico reacional, temperatura, PH e pressão.

O papel da água na atividade catalítica e de estabilidade enzimática é essencial em síntese de ésteres (HALLING, 1984). A quantidade de água necessária para manter a enzima ativa em solvente orgânico deve ser mínima, o que faz com que a água influencie e desloque o equilíbrio nas reações de esterificação como na transesterificação (KAIEDA et al., 1999). As lipases atuam na interface entre a fase orgânica e a fase aquosa. Assim, a água atua como facilitadora da expansão da área de contato, mantendo a atividade da lipase. Entretanto, reações indesejadas, como a hidrólise de produtos, podem ser consequências do excesso de água (MADALOZZO, 2011).

Os meios orgânicos permitem a ocorrência de reações de sínteses que raramente ocorreriam em sistemas aquosos (LAANE et al., 1987).

A temperatura pode influenciar na velocidade da reação catalisada quando o aumento da temperatura e o conseqüente aumento da energia cinética dos reagentes resultam na aceleração do processo, e quando a desnaturação da enzima ocorre pelo aumento da excessivo da temperatura (AL-ZUHAIR; LING; JUN, 2007; NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005; FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; MACRAE, 1983). A temperatura ótima, é quando for alta o suficiente para não desnaturar uma quantidade significativa de enzimas, ao mesmo tempo em que é baixa o suficiente para acelerar o processo reacional.

De acordo com Kim e Shin (2006), a estabilidade térmica da lipase imobilizada é maior do que da enzima livre, pois o suporte evita a transição da conformação da enzima em altas temperaturas.

### **3.2 Nanopartículas magnéticas**

Nanopartículas magnéticas (NPM) são grãos formados na ordem de nanômetros que, por encontrarem-se entre o estado molecular e atômico, possuem propriedades físicas e químicas diferentes das observadas em materiais volumosos, dependendo do tamanho, morfologia e estrutura cristalina, resultando em formação de monodomínios magnéticos; existência de grande área superficial em relação ao volume; e a possibilidade de recobri-las com

diversos tipos de ligantes específicos (FRANCISQUINE; SCHOENMAKER, 2014; SOUZA, 2013).

O campo magnético característico dessas nanopartículas torna possível uma eficiente recuperação do meio reacional, quando utilizado como suporte, com uma simples aplicação de um campo magnético, impedindo assim a contaminação do produto. Diversas metodologias podem ser usadas para a imobilização de diferentes tipos de lipases em nanopartículas magnéticas. Em geral, a modificação de superfície das nanopartículas magnéticas é necessária para o processo de imobilização (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013).

As NPM podem ser aplicadas em diferentes áreas como biotecnologia, ciências biomédicas, catálise, análises de imagem por ressonância magnética nuclear (RNM) e armazenamento de dados (ALVES, 2007).

Diversos métodos têm sido utilizados para a produção de nanopartículas magnéticas, como o método de sonicação, pirólise e sol-gel, técnica hidrotermal, decomposição térmica redutiva e liga mecânica. A decomposição térmica parece o melhor método para controle de tamanho e morfologia. A microemulsão, por sua vez, também pode ser usada para sintetizar nanopartículas monodispersas com morfologias diferentes, contudo, utilizando uma grande quantidade de solvente. A síntese hidrotermal é um método relativamente pouco explorado para a síntese de NPM, embora permita a síntese de nanopartículas de alta qualidade (FRANCISQUINE; SCHOENMAKER; SOUZA, 2014).

A técnica de coprecipitação é provavelmente a via química mais simples e eficiente para a obtenção de partículas magnéticas, devido sua simplicidade e baixo custo. Óxidos de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) são geralmente preparados por uma mistura estequiométrica de sais ferrosos e férricos em meio aquoso com a adição de uma base em atmosfera inerte à temperatura ambiente ou temperatura elevada. O tamanho, a forma e a composição das NPM dependem do tipo de sais utilizados (por exemplo, cloretos, sulfatos, nitratos), da razão entre os sais, da temperatura, do valor do pH e da força iônica dos meios (SHI et al., 1999; KAVAS et al., 2009; BARRETO et al., 2012).

A presença de grupos hidroxila, tais como Fe-OH, sobre a superfícies de nanopartículas magnéticas pode permitir a ligação a compostos funcionais. A modificação da superfície das nanopartículas proporciona pontos de ligação (grupos amina) para diferentes moléculas. O aminopropiltriétoxisilano - APTS, por exemplo, conduz a um revestimento de silicato que ajuda a estabilizar as nanopartículas magnéticas contra a oxidação pelo ar. Evitando, ainda, a agregação das nanopartículas devido aos grupos amina (XU; LIU; FINCH, 1997). COSTA et al. (2016) estudou condições de modificação da superfície das

nanopartículas para imobilização da CALB e encontrou maior atividade hidrolítica quando se utiliza a relação NPM/APTS (1:3).

Os maiores obstáculos para a implantação das NPM, estão geralmente relacionados com a relação superfície/volume desses sistemas. Ou seja, as mesmas características (tamanho e propriedade magnética) que proporcionam às NPM propriedades especiais também as tornam instável ao longo do tempo. As NPM tendem a formar aglomerados e, se não recobertas com uma camada protetora, apresentam tendência à oxidação (FRANCISQUINE; SCHOENMAKER; SOUZA, 2014).

BEZERRA et al. (2016) testou a modificação da superfície das nanopartículas para empregar adsorção ou ligação covalente na imobilização da CALB observando uma eficiente imobilização da lipase de TLL em nanopartículas tratadas por APTS, gerando um biocatalisador mais estável e com elevada atividade catalítica.

### **3.3 Imobilização da enzima em suporte**

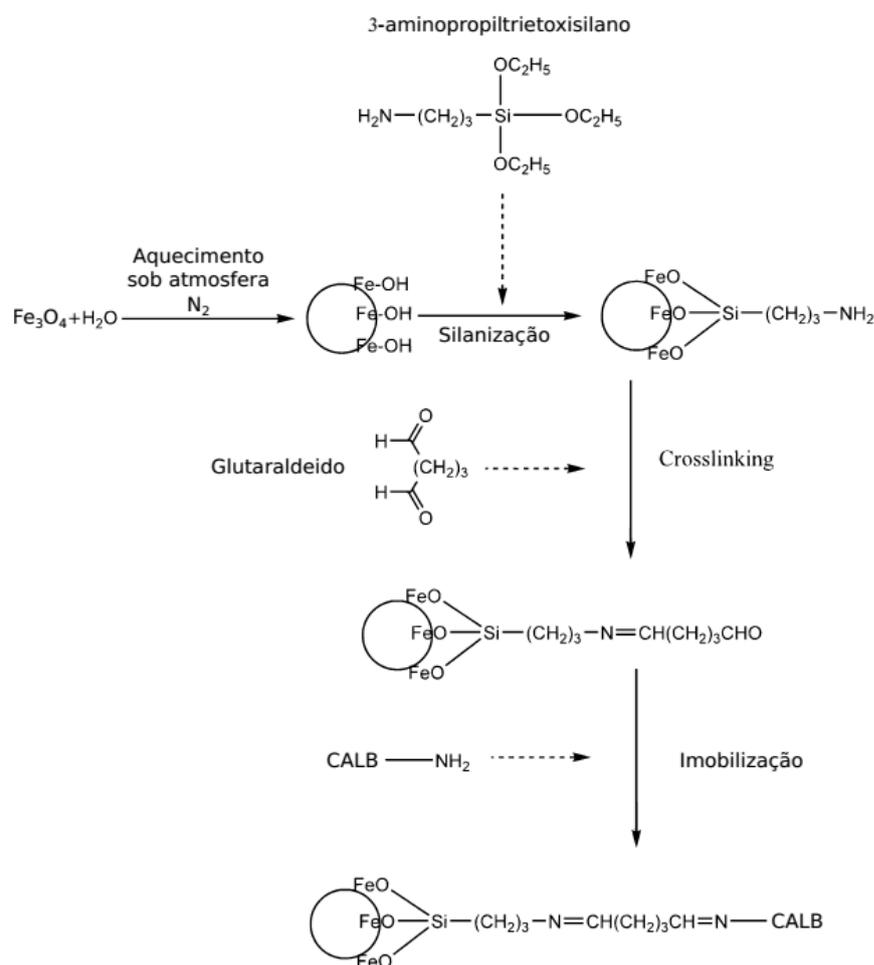
A imobilização é realizada com a função de fixar a enzima em um suporte para que sua atividade catalítica não seja afetada, sendo assim uma forma de proteção contra condições adversas do meio (CANILHA; CARVAOLHO; SILVA, 2006). Esse recurso permite o uso da enzima em diversos processos, pois diminui os riscos de contaminação em operações com altas taxas de diluição e a formação de subprodutos devido à alta especificidade, aumenta a estabilidade e permite a reutilização do derivado. Além disso, permite a utilização em diferentes solventes, pHs e temperaturas e podem ser expostas a agentes desnaturantes.

Vários materiais podem ser utilizados como suporte, podendo ser alginato, álcool polivinílico, quitosana ou superfícies sólidas como vidro poroso, alumina, etc. Esses materiais precisam ser facilmente encontrados, apresentar baixo custo, ser de fácil manuseio, não ser tóxico para a enzima e ter alta resistência mecânica, observando a sua área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e natureza hidrofílica, resistência ao ataque microbiano (MENDES, 2009).

O processo de imobilização ocorre basicamente por dois meios: O processo de adsorção física e ligação covalente. O primeiro caso é o método mais utilizado por ser simples, barato, não ser necessário a ativação do suporte e possibilitar a regeneração da matriz utilizada. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia tais como as ligações iônicas. Esse método depende de fatores como tamanho da enzima a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e porosidade (permitem a ligação da enzima com a superfície

interna do suporte, fortalecendo a adsorção). Todavia, apresentam a desvantagem por sofrer dessorção devido às variações de temperatura, pH e força da ligação iônica. No caso da ligação covalente, é necessária ativação de grupos químico, do suporte para que interajam com os nucleófilos das proteínas, como ilustra a Figura 2. Esse processo requer mais energias, porém, confere maior estabilidade na ligação, mantendo 88% da sua atividade inicial após 10 ciclos sucessivos (REBELO et al., 2010).

Figura 2 – Modificação da superfície de nanopartículas magnéticas, reticulação por glutaraldeído e imobilização da enzima CALB



Fonte: (TANG et al., 2011)

Amorim et al. (2003) testaram a imobilização da lipase de *Candida cylindraceae* em um filme de quitosana ativado com glutaraldeído. A estabilidade do sistema imobilizado foi testada reutilizando o sistema 4 vezes e verificando sua atividade. Pode-se verificar que a lipase

caiu drasticamente em 45% da atividade inicial depois de usada pela segunda vez e manteve-se estável até a quarta.

### **3.4 Ésteres etílicos: Biodiesel**

Os ésteres, função orgânica derivado dos ácidos carboxílicos que sofreram a substituição do H da carboxila por um grupo orgânico, são utilizados em diversos setores da indústria para obtenção de medicamentos, cosméticos, alimentos, aromas, sabões, perfumes e na produção de biocombustíveis (MACEDO; PASTORE, 1997).

A síntese de ésteres pode ser obtida utilizando óleos vegetais com álcoois de cadeia curta, como o metanol, na presença de catalisadores. Convencionalmente, baseia-se na esterificação de ácidos graxos com álcool na presença de catalisadores inorgânicos a elevadas temperaturas (+100°C). Estes processos demandam grande quantidade de energia, além de não serem seletivas, ou seja, resultam em reações laterais indesejáveis e alto custo de refino, associados a dificuldade encontrada para a remoção do catalisador e recuperação do glicerol, tornando o método de obtenção do biodiesel por rota química dispendioso (OGNJANOVIC et al., 2009).

Neste contexto, o emprego de enzimas como biocatalisadores permitem uso de temperaturas relativamente baixas e com obtenção de produtos de melhor qualidade, como na síntese do biodiesel (KISS et al., 2004; WELSH; WILLIAMS; DAWSON, 1990).

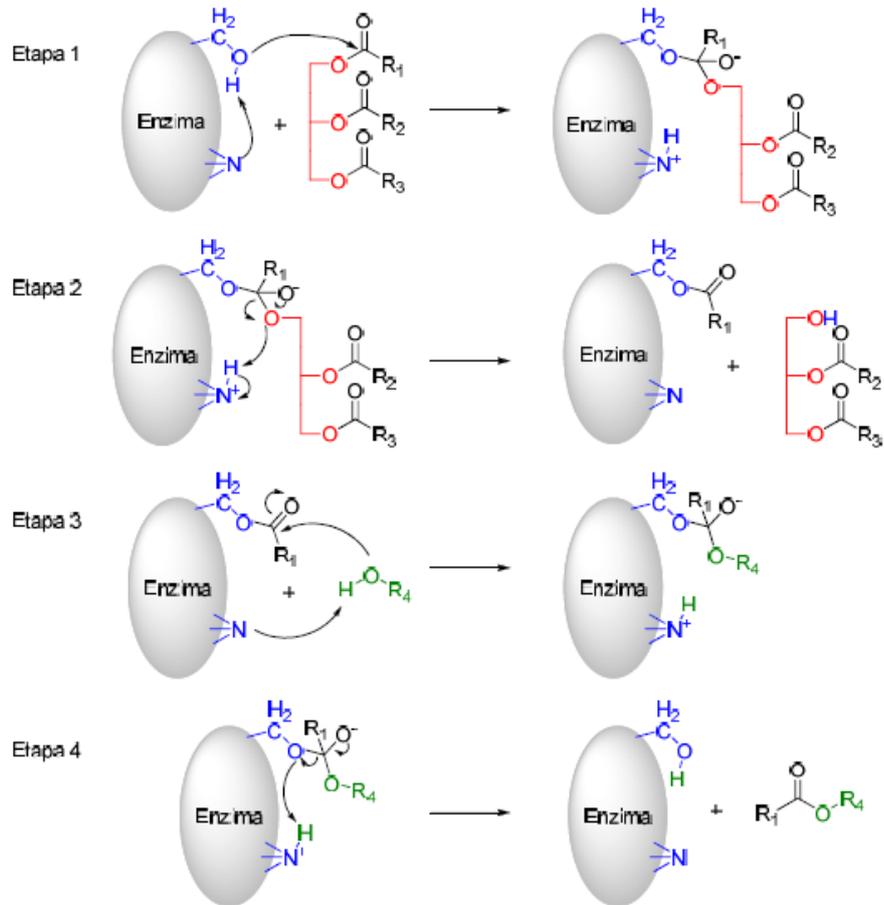
O biodiesel, constituído basicamente de ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos de cadeia longa como oleato, é um combustível renovável produzido a partir oleaginosas (soja, mamona, dendê, girassol, entre outros), ou de óleo residual. Trata-se de uma fonte de energia renovável, livre de enxofre, com menor emissão de poluentes e alternativo aos derivados do petróleo (BIODIESEL, 2017).

O óleo residual que, muitas vezes é descartado em solos, corpos d'água e pia pode ser reutilizado para produção de biodiesel, evitando a contaminação dos corpos hídricos, solos, e entupimentos dos encanamentos. Em estabelecimentos comerciais usam-se fritadeiras elétricas com volumes de 15 a 300 litros, podendo ultrapassar os 1.000 litros nos processos industriais (HOCEVAR, 2005). No entanto, como não há uma legislação sobre o tema, torna-se difícil estimar o volume de OGR descartado.

Com o emprego de lipases como biocatalisadores na transesterificação associado ao reaproveitamento de OGR, pode-se ter um processo que ocorre em temperaturas mais brandas, mais seletivo, com fácil recuperação do catalisador, visando otimizar os processos

tradicionais que utilizam catalizadores básicos ao mesmo tempo em que se reduz o descarte inadequado do óleo residual. A figura 3 ilustra a transesterificação do óleo de fritura para obtenção do biodiesel por biocatálise.

Figura 3 – Etapas da transesterificação enzimática de um triglicerídeo



Fonte: (ROSSET, 2011)

A etapa 1 consiste de uma adição nucleofílica para formar o complexo enzima-substrato ( $OH$ ). Na etapa 2 ocorre uma transferência de próton do ácido conjugado da amina para o átomo de oxigênio do substrato, assim com a quebra da ligação  $C-O$ , ocorre a formação de uma molécula de diglicerídeo (que sofrerá novamente ação do grupo  $OH$ , continuando o ciclo para formar o monoglicerídeo, que por sua vez será transformado no glicerol). Na etapa 3, uma molécula de álcool ( $R_4-OH$ ) reage com o grupo carbonila do acil-enzima para formar o complexo acilado álcool-enzima. Na etapa 4, a ligação  $C-O$  do complexo rompe-se, resultando no éster (Biodiesel) e regenerando a enzima (AL-ZUHAIR; LING; JUN, 2007).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Materiais

Nanopartículas magnéticas de ferro (NPM) foram obtidas junto ao departamento de química da Universidade Federal do Ceará, UFC. Lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) foi adquirida da Codexis (Redwood, USA), g -aminopropiltriétoxissilano (APTS), solução de glutaraldeído grau II 25% (m/v), butirato de *p*-nitrofenila (*p*NPB) e *p*-nitrofenila (*p*NP) da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e os demais reagentes de grau analítico obtidos da Synth (São Paulo, Brasil) e Vetec (São Paulo, Brasil) foram gentilmente cedidos pelo departamento de engenharia química da UFC. O óleo residual de fritura utilizado para a produção de biodiesel foi obtido de um restaurante situado em Fortaleza-Ce.

### 4.2 Tratamento do suporte com aminopropiltriétoxissilano (APTS)

A reação foi iniciada com a adição de solução de APTS (2,0% v/v) ao suporte NPM na proporção de 0,2 (ml/mg de suporte) e colocados sobre agitação mecânica. As nanopartículas foram lavadas com 100 ml de metanol e 100 ml de etanol, separadas por magnetismo, em seguida o material foi seco a 30°C por 24 horas (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013).

### 4.3 Reticulação com solução de glutaraldeído

NPM (0,01g) foram suspensas em solução 25% (m/v) de glutaraldeído na proporção de 2,5 (solução (ml)/suporte (g)). A mistura foi mantida sob agitação rotativa (45 rpm) por 2 horas à 25 °C. Finalmente, o suporte foi lavado com tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 10,0 (razão m/v de 1/10) a 25°C para remover o excesso de glutaraldeído (ANDRADE et al., 2010).

### 4.4 Imobilização da enzima em nanopartículas magnéticas

A CALB solúvel foi imobilizada em Nanopartículas magnéticas tratadas por APTS e reticuladas com glutaraldeído 25% na presença de tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 10,0 (razão m/v de 1/10) a 25°C. O sistema foi mantido sob agitação rotacional controlada: 45

rpm. O tempo de contato enzima-suporte foi de 1,0 h (SILVA et al., 2012). A enzima imobilizada foi removida da solução por magnetismo.

#### 4.5 Quantificação de proteína e medida de atividade

A atividade hidrolítica da CALB solúvel e imobilizada foi determinada usando p-nitrofenol butirato (pNPB) como substrato, a pH 7,0 e 25°C (KORDEL; SCHMID, 1991). Uma unidade de atividade (1 U) enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1  $\mu\text{mol}$  de pNPB/min.

Parâmetros como atividades inicial ( $At_i$ ) e final da enzima ( $At_f$ ) solúvel, rendimento de imobilização (R), atividade teórica (AtT) e atividade recuperada (AtR) foram determinados a fim de avaliar a eficiência do catalisador (SILVA et al., 2012).

A concentração de proteínas foi determinada pelo método (BRADFORDM, 1976). Atividade enzimática foi determinada através da equação 4.1.

$$Ativ_{enzimatica} = (C \times D \times f \times v_r) / V_{enz} \quad (4.1)$$

Onde  $Ativ_{enzimatica}$  é a atividade enzimática (U/mL), C é a taxa de consumo do pNPB (Abs/min), D representa a diluição da solução enzimática (mL/mL), f é o fator ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{Abs}$ ),  $v_r$  é o volume do reator (mL) e  $V_{enz}$  é o volume de solução enzimática (mL).

O rendimento da imobilização foi determinado através da equação 4.2.

$$R (\%) = \frac{At_i - At_f}{At_i} \times 100 \quad (4.2)$$

Onde R (%) é o rendimento da imobilização em porcentagem,  $At_i$  é atividade inicial da enzima solúvel; e  $At_f$  é atividade final da enzima no remanescente.

A atividade teórica (AtT), que é a atividade da enzima teoricamente imobilizada no suporte, é calculada utilizando-se a quantidade de enzima oferecida por grama de suporte (Atof) e o rendimento de imobilização (R), equação 4.3:

$$AtT (\text{U/g}) = R \times Atof \quad (4.3)$$

A atividade recuperada (AtR) é definida pela razão entre a atividade da enzima imobilizada (AtD) e a atividade teórica (AtT), equação 4.4:

$$AtR (\%) = \frac{AtD}{AtT} \times 100 \quad (4.4)$$

#### **4.6 Produção de biodiesel**

A transesterificação foi realizada com 0,6g do óleo residual pré-aquecido à 40 °C, variando-se a razão molar óleo/álcool (etanol), massa do catalisador (CALB-NPM) e temperatura. A reação ocorreu em tubos plásticos (2ml) em um agitador orbital à 150 rpm durante 24 horas. A análise do meio reacional foi realizada através de Cromatografia Gasosa (CG/MS) (RODRIGUES, 2011; SOUZA, 2013).

#### **4.7 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)**

A determinação da composição do biodiesel obtido foi realizada por CG-EM em um cromatógrafo gasoso GC-17A (Shimadzu) acoplado ao espectrômetro de massa EM-QP5050 (Shimadzu). Método: Coluna (DB-1ms 30 m, I. D. 0,25 mm e filme 0,25µm). Gás de arraste N<sub>2</sub>. Temperatura do injetor de 25 °C. E temperatura de interface de 230 °C. O oleato de etila foi utilizado como referência interna.

#### **4. 8 Análise estatística**

A influência das variáveis que influenciam na produção de ésteres etílicos foi analisada através do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> com dois níveis e três fatores. O planejamento do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) foi realizado utilizando o software STATISTICA (versão 10.0). As variáveis: razão molar óleo/álcool; massa de catalisador e temperatura foram avaliadas no planejamento experimental. A variável de resposta ou dependente foi a conversão de ORF em ésteres etílicos após a transesterificação com (CALB-NPM).

Os efeitos das variáveis e os respectivos erros foram calculados a um limite de confiança de 95%. Realizou-se o teste de Significância do ajuste do modelo, baseados na Análise de Variância (ANOVA), para verificar a qualidade desse ajuste, em seguida obteve-se o Coeficiente de Determinação (R<sup>2</sup>), que fornece a variação dos resultados previstos e obtidos, calculou-se ainda os valores de F do Teste de Fisher para avaliar a significância do modelo. As Curvas de Contorno e as Superfícies de Respostas foram obtidas para definir as faixas ótimas operacionais das variáveis.

## 5. RESULTADOS

Nanopartículas magnéticas com superfície modificada foram utilizadas para imobilizar a enzima CALB. Para avaliar o rendimento de da imobilização, quantificação de proteínas, medida de atividade enzimática e parâmetros de imobilização foram calculados. O biocatalisador produzido foi utilizado na produção de biodiesel, com a técnica de CG/EM utilizada para analisar a taxa de conversão do éster produzido. A análise estatística também foi empregada, avaliando qual(ais) a(s) variável(eis) que mais influenciaram na reação.

### 5.1 Quantificação de proteína e medida de atividade

A Tabela 1 retorna o resultado da quantificação de proteínas. Analisando as concentrações de enzima inicial (branco) e do remanescente (amostras 1 e 2), nota-se que houve imobilização da enzima no suporte

Tabela 1 - Concentração de Proteínas

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (mg/ml)</b>
Branco	<b>1,05 ± 0,01</b>
Amostra 1	<b>0,5 ± 0,01</b>
Amostra 2	<b>0,5 ± 0,01</b>

Fonte: elaborada pelo autor

A Tabela 2, traz a eficiência da produção do catalisador biológico CALB-NPM.

Tabela 2 - Parâmetros de imobilização

<b>Parâmetros</b>	<b>Suporte magnético (NPM)</b>
Carga oferecida (U/g)	<b>200 ± 1,50</b>
Atividade remanescente (U/ml)	<b>118 ± 0,9</b>
Rendimento de imobilização (%)	<b>41 ± 0,7</b>
Atividade teórica (U/g)	<b>82 ± 0,06</b>
Atividade recuperada (%)	<b>35 ± 0,13</b>

Fonte: elaborada pelo autor

*Atividade<sub>derivado</sub>* foi estimada em 29 U<sub>pnpb/g</sub> a uma taxa de rendimento de imobilização de 41%, sendo considerado satisfatório quando comparado à literatura. Souza (SOUZA, 2013) obteve atividade de 29,1 U<sub>pnpb/g</sub> com rendimento de aproximadamente 41,8%. Esse bom comportamento pode ser explicado pelo tratamento com APTS, proporcionando um

revestimento de silicato estável, levando grupos disponíveis a reagir com glutaraldeído, que tem, por sua vez, a função de reagir com o grupo amina do APTS deixando um terminal aldeído para reagir com as enzimas (ANDRADE et al., 2010).

## **5.2 Aplicação do derivado para obtenção do biodiesel**

A Tabela 3 mostra a conversão obtidas para os ensaios do planejamento experimental 2<sup>3</sup> com triplicata no ponto central para a produção de biodiesel com ORF utilizando (CALB-NPM) como catalisador, através da análise CG/MS. O ensaio 4 apresentou maior taxa de conversão 37,14% ) e em anexo pode-se encontrar a cromatografia. As condições empregadas nessa ensaio foi razão molar óleo/álcool de 1/15, massa de catalisador 0,06 g e temperatura de 27 °C. Barros, Wust e Meier (2008) utilizando catálise alcalina com temperatura de 45 °C, óleo residual e etanol (razão molar 1:1) durante 1 hora, obteve taxa de conversão 80%. Morandim et al. (2008) utilizando catálise básica com temperatura de 50 °C, óleo residual e metanol (razão molar 1:7) durante 25 min, também obteve taxa de conversão 80%. Essa diferença pode ser explicada devido a catálise química já possuir as melhores condições definidas, enquanto a catalise biológica ainda encontra-se em estudo (estado da arte). Quando a análise é realizada com reações padrões, como a esterificação de oleato de etila (matéria-prima) e produção de biodiesel por rota enzimática, o rendimento para ésteres foi de aproximadamente 90% (SOUZA, 2013). Esse resultado mostra que o material de partida mais complexo, como o óleo residual leva a maiores dificuldades, devido a separações de impurezas iniciais e a complexidade de triacilglicérides presentes, diferente do uso com ácidos graxos livres comerciais como o ácido oleico.

Tabela 3 – Condições de reação e taxa de conversão em ésteres

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Razão molar</b>	<b>Massa<sub>cat</sub> (g)</b>	<b>Taxa de Conversão (%)</b>
1	27,0	9	0,02	<b>7,42</b>
2	47,0	9	0,06	<b>8,48</b>
3	47,0	15	0,02	<b>3,74</b>
4	27,0	15	0,06	<b>37,14</b>
5	37,0	12	0,04	<b>10,77</b>
6	47,0	9	0,02	<b>3,94</b>
7	27,0	9	0,06	<b>7,25</b>
8	27,0	15	0,02	<b>12,79</b>
9	47,0	15	0,06	<b>2,96</b>
10	37,0	12	0,04	<b>9,92</b>
11	37,0	7	0,04	<b>1,85</b>
12	37,0	17	0,04	<b>10,82</b>
13	37,0	12	0,01	<b>6,51</b>
14	37,0	12	0,07	<b>4,96</b>
15	20,2	12	0,04	<b>4,80</b>
16	53,8	12	0,04	<b>33,46</b>
17	37,0	12	0,04	<b>9,96</b>

Fonte: elaborada pelo autor

Os coeficientes dos efeitos de cada variável independente e das suas interações na conversão são apresentados na Tabela 4. Os valores estimados se referem à influência que essas variáveis exercem sobre a conversão a um nível de significância de 95%. A análise do valor de probabilidade (p) mostrou que a única variável que não é significativa é temperatura (linear).

Tabela 4 – Análise dos fatores de perturbação das variáveis independentes: massa de catalisador (C), razão molar (RM) e temperatura (T) sobre a conversão

<b>Variáveis</b>	<b>Efeitos</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>p</b>
C*	3,71	0,26	0,001
C <sup>2</sup> *	-3,14	0,28	0,008
RM*	6,53	0,26	0,001
RM <sup>2</sup> *	-2,72	0,28	0,010
T*	0,39	0,26	0,264
T <sup>2</sup> *	6,32	0,28	0,002
C×RM*	4,80	0,33	0,004
C×T*	-5,10	0,33	0,004
RM×T*	-10,24	0,33	0,001

\*Significância 95%

Fonte: elaborada pelo autor

O efeito positivo nos termos lineares da massa de catalisador e da razão molar mostrou que maiores conversões são obtidas para maiores concentrações de CALB (0,06g) e maiores razões molares (1/15). O efeito negativo no termo quadrático da massa de catalisador e da razão molar indicou que a variável apresenta um ponto máximo. Silva Filho (2010) testou planejamento fatorial completo  $2^3$  utilizando temperatura, massa de catalisador KOH e tempo como variáveis independentes, e rendimento de biodiesel como variável dependente, observando que a massa de catalisador foi a única variável negativa e que para maiores valores menor será na taxa de conversão. Isto pode estar relacionado com a formação de sabão que acaba sendo favorecida pelo consumo do catalisador, e conseqüentemente, desfavorecendo a reação de transesterificação. Na melhor condição, obteve 31% de conversão em éster.

A adequação do modelo matemático pode ser constatada pelo cálculo do fator F obtido com a análise de variância (ANOVA) mostrado na Tabela 3. O modelo é estatisticamente significativo quando o valor de  $F_{\text{calculado}}$  é maior do que o valor de  $F_{\text{tabelado}}$ . Para o modelo obtido, o valor de  $F_{\text{calculado}}$  foi maior do que o  $F_{\text{tabelado}}$ , indicando uma boa representação dos dados experimentais pelo modelo.

Tabela 5 – Análise da variância (ANOVA)

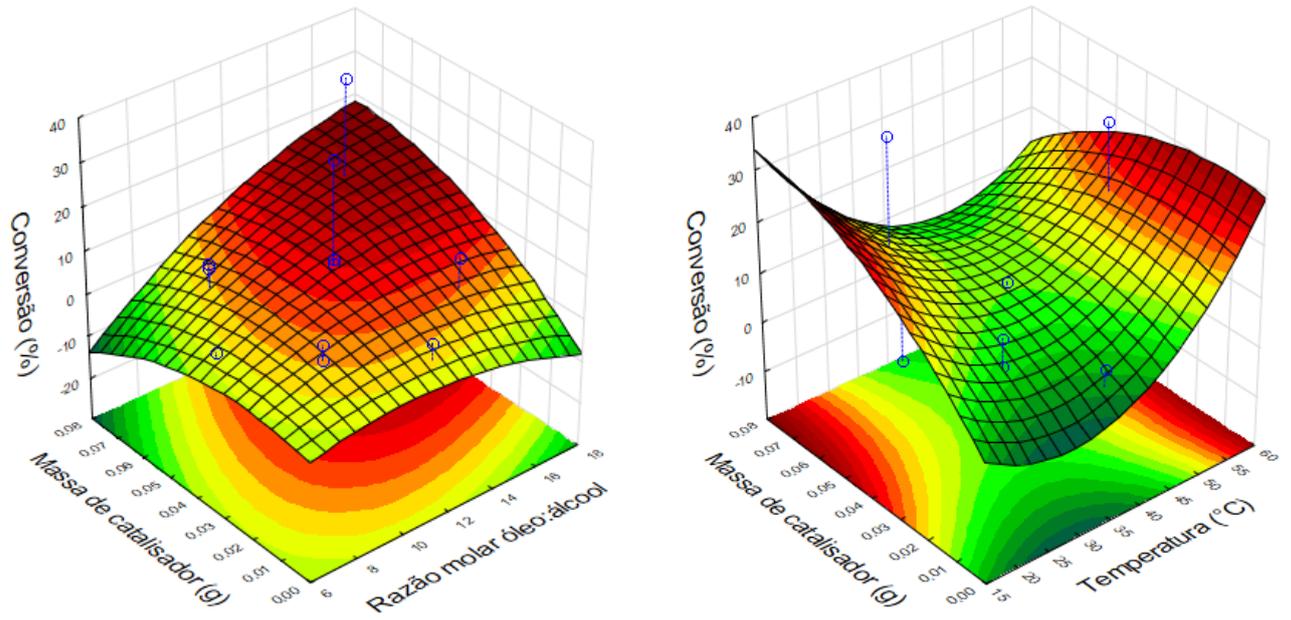
Fonte de variação	Somas dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal.
Regressão	1566,2	14	111,87	484,3
Erro	0,462	2	0,231	
Total SS	1565,8	16		

\* $F_{\text{tabelado}} = 3,68$

Fonte: elaborada pelo autor

A Figura 4 apresenta a superfície de resposta para a variável dependente conversão de ORF em ésteres etílicos utilizando a lipase CALB imobilizada em  $(\text{Fe}_3\text{O}_4)$  (NPM) como catalisador em função da razão molar óleo/etanol, da quantidade de catalisador e da temperatura. Observa-se que para baixas temperaturas maiores conversões são obtidas utilizando maiores massas de catalisador e o inverso é verificado para maiores temperaturas. Adotando  $27^\circ\text{C}$  como temperatura de reação, a conversão é maior para maiores massas de catalisador e razões molares.

Figura 4 – Superfície de resposta para a conversão de ORF em ésteres etílicos



Fonte: (Autor, 2017)

## 6. CONCLUSÃO

O suporte magnético mostrou-se eficaz, após sofrer modificações em sua superfície com aminopropiltriétoxisilano (APTS) e solução de glutaraldeído grau II 25% (m/v), para imobilização da CALB, tendo um rendimento de imobilização 41%, com 35% de atividade recuperada e com o derivado apresentando  $29 U_{\text{pnpb/g}}$ .

O suporte CALB-NPM, utilizado para produção de ésteres etílicos permitiu a fácil recuperação do catalisador, após cessada a transesterificação do óleo de fritura com o etanol, com uma simples aplicação de um campo magnético, possibilitando seu reuso.

O aproveitamento do óleo de fritura evitou seu descarte inadequado e a obtenção de um biocombustível renovável e menos poluente.

O ensaio 4 apresentou maior taxa de conversão (37,14%) nas seguintes condições: razão molar óleo/álcool de 1/15, massa de catalisador 0,06 g e temperatura de 27 °C. A análise de variância mostrou que maiores conversões são obtidas para maiores concentrações de CALB-NPM e maiores razões molares.

A biotransformação demonstra um alto potencial por resultar em bioprodutos mais puros e fácil separação do produto formado e o catalisador, podendo ainda reaproveita-lo. Além disso, a possibilidade de ocorrer reações em condições mais brandas, torna-a rota enzimática um ótimo atrativo para aplicação industrial.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, T. M. M. T. **Síntese e caracterização de nanopartículas de óxidos de ferro para aplicações biomédicas**. f.99. Tese (doutorado). Instituto de Física Gleb Wataghin. Universidade Estadual de Campinas. Campina Grande, 2007.
- AL-ZUHAIR, S.; LING, F.; JUN, L. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, Elsevier, v. 42, n. 6, p. 951–960, 2007.
- AMORIM, R. V. S.; MELO, E. S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; LEDINGHAM, W. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 89, p.35-39, jan. 2003.
- ANASTAS, P. T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. **Accounts of chemical research**, v. 35, n. 9, p. 686-694, 2002.
- ANDRADE, L.; REBELO, L.; NETTO, C.; TOMA, H. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Elsevier, v. 66, n. 1, p. 55-62, 2010.
- BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G. O emprego de fermento de pão, *Saccharomyces cerevisiae*, na síntese de feromônios. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 421-431, 2004.
- BARRETO, A.; MAIA, F. J. N.; SANTIAGO, V. R.; RIBEIRO, V. G. P.; DENARDIN, J. C., MELE, G.; FECHINE, P. B. A. Novel ferrofluids coated with a renewable material obtained from cashew nut shell liquid. **Microfluidics and nanofluidics**, Springer, p. 1–10, 2012.
- BARROS, A. A. C.; WUST, E.; MEIER, H. F. Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 255-262, 2008.
- BEZERRA, R. M.; GONÇALVES, L.R.B.; DOS SANTOS, JOSÉ CLEITON SOUSA; ANDRADE NETO, D. M.; GALVAO, W. S.; FECHINE, P. B. A. Imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) em nanopartículas superparamagnéticas: efeito da modificação da superfície do suporte. In: COBEQ 2016 - XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2016, Fortaleza/ CE. v. 1. p. 1-1.
- BIODIESEL. **Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?id=472>>. Acesso em: 30/04/2017.
- BRADFORDMM, A. rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n. 7, p. 248–254, 1976.
- BRUNO, L. M.; COELHO, J. S.; MELO, E. H. M.; LIMA-FILHO, J. L. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer, v. 21, n. 2, p. 189–192, 2005.
- CABRAL J.M.S., AIRES-BARROS M.R., GAMA M.; **Engenharia Enzimática**. Lidel –

edições técnicas, Ltda. Lisboa, 2003.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores Imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 9, n. 36, p.48-57, 2006.

CATERINA, G.C.M.N; ANDRADE, L.H.; TOMA, H.E. Enantioselective transesterification catalysis by *Candida antarctica* lipase immobilized on superparamagnetic nanoparticles. *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 20, p. 2299-2304, 2009.

CLARK, J. H; MACQUARRIE, D. J. Catalysis of liquid phase organic reactions using chemically modified mesoporous inorganic solids. **Chemical Communications**, n. 8, p. 853-860, 1998.

CLARK, J. H.; MACQUARRIE, D. J. Environmentally friendly catalytic methods. **Chemical Society Reviews**, v. 25, n. 5, p. 303-310, 1996.

CLARK, J. H.; RHODES, C. N. Clean synthesis using porous inorganic solid catalysts and supported reagents. **Royal Society of Chemistry**, n. 113, 2000.

CORDEIRO, C.S.; SILVA, R.S.; WYPYCH F.; RAMOS, L. P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, vol.34 no.3, 2011.

COSTA, V. M.; SOUZA, M.C.M; FECHINE, P. B. A.; MACEDO, A. C.; GONÇALVES, L. R. B. Nanobiocatalytic systems based on lipase- $Fe_3O_4$  and conventional systems for isoniazid synthesis: a comparative study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** (Online), v. 33, p. 661-673, 2016.

ENZIMAS. **SOBIOLOGIA**. Disponível em:  
<[http://www.sobiologia.com.br/conteudos/quimica\\_vida/quimica11.php](http://www.sobiologia.com.br/conteudos/quimica_vida/quimica11.php)>. Acesso em: 25/03/2017.

FRANCISQUINE, E.; SCHOENMAKER, J.; SOUZA, J. A. Nanopartículas Magnéticas e suas Aplicações. **Química Supramolecular e Nanotecnologia**, p. 269, 2014.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of bioscience and bioengineering**, Elsevier, v. 92, n. 5, p. 405–416, 2001.

HALLING, P. Effects of water on equilibria catalysed by hydrolytic enzymes in biphasic reaction systems. **Enzyme and Microbial Technology**, Elsevier, v. 6, n. 11, p. 513–516, 1984.

HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, Elsevier, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HOCEVAR, L. Biocombustível de óleos e gorduras residuais—a realidade do sonho. In: **Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel (2.: 2005: Varginha, MG)**. Combustível ecológico/editores Pedro Castro Neto, Antônio Carlos Fraga.-Lavras: UFLA. 2005.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S., & RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase-a critical review. **Critical reviews in biotechnology**, Informa UK Ltd London, UK, v. 28, n. 4, p. 253–264, 2008.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; MATSUMOTO, T.; BAN, K.; KONDO, A.; SHIMADA, Y.; FUKUDA, H. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 88, n. 6, p. 627-631, 1999.

KAVAS, H.; KASAPOLU, N.; BAYKAL, A.; KÖSEOLU, Y. Characterization of  $\text{NiFe}_3\text{O}_4$  nanoparticles synthesized by various methods. **Chemical Papers**, Springer, v. 63, n. 4, p. 450–455, 2009.

KIM, H.; YOUN, S.; SHIN, C. Lipase-catalyzed synthesis of sorbitol–fatty acid esters at extremely high substrate concentrations. **Journal of biotechnology**, Elsevier, v. 123, n. 2, p. 174–184, 2006.

KISS, M. A.; SEFANOVITS-BÁNYAI, É.; TOTH, A., BOROSS, L. Extractive synthesis of ethyl-oleate using alginate gel co-entrapped yeast cells and lipase enzyme. *Engineering in life sciences*, **Wiley Online Library**, v. 4, n. 5, p. 460–464, 2004.

KORDEL, M.; SCHMID, R. D. Inhibition of the lipase from *Pseudomonas* sp. ATCC 21 808 by diethyl p-nitrophenyl phosphate; hints for one buried active site for lipolytic and esterolytic activity. In **Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering** (GBF monographs no. 16). pp. 385-388. Edited by L. Alberghina, R. Verger & R. D. Schmid. Weinheim: VCH, 1991.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, Wiley Online Library, v. 30, n. 1, p. 81–87, 1987.

LEI, L.; BAI, Y.; LI, Y.; YI, L.; YANG, Y.; XIA, C. Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, Elsevier, v. 321, n. 4, p. 252–258, 2009.

LU, J.; NIE, K.; WANG, F.; TAN, T. Immobilized lipase *Candida* sp. 99-125 catalyzed methanolysis of glycerol trioleate: Solvent effect. **Bioresource technology**, Elsevier, v. 99, n. 14, p. 6070–6074, 2008.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. "Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma." **Food Science and Technology**, Campinas, v. 17, n.5, pag.115-119, 1997.

MACRAE, A. R. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Springer, v. 60, n. 2, p. 291–294, 1983.

MADALOZZO, A. D. **Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae***. 2011. 149 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Elsevier, v. 11, n. 6, p. 1300–1311, 2007.

MENDES, A. A. **Seleção de Suportes e Protocolos de Imobilização de Lipases para a Síntese Enzimática de Biodiesel**. 2009. 194 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MORANDIM, A. A.; RIBEIRO, R. L.; SANTOS, R. O.; COMPRI, I. G.; TORRES, R. B. Estudo comparativo da produção de biodiesel proveniente do óleo de fritura e do óleo de soja. In: Congresso Brasileiro De Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras E Biodiesel, 5, 2008, **Anais**. Varginha: [S.n.], 2008. p. 164-178.

NANGOI, I. M. **Desenvolvimento de catalisadores de paládio nanoparticulado para a reação de hidrodescloração**. 2009. 67 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Elsevier, v. 85, p. 71-92, 2013.

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

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5146-5154, 2009.

REBELO, L. P.; NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Enzymatic kinetic resolution of (rs)-1-(phenyl) ethanols by burkholderia cepacia lipase immobilized on magnetic nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 8, p. 1537-1542, 2010

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, L. R. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Elsevier, v. 51, n. 3, p. 100–109, 2008.

ROSSET, I. G. **Produção de biodiesel empregando biocatálise via reações de esterificação e transesterificação**. 2011. 152f. Tese (Doutorado). Instituto de química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

SALIS, A.; SOLINAS, V.; MONDUZZI, M. Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilised lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, n. 4, p. 167-174, 2003.

SALTARIN, M. J.; FREIRES, F. G. M.; TORRES, E. A.; SANTOS, T. B.; SILVA, M. S. A logística inversa dos óleos de gorduras residuais na produção de um biodiesel sustentável: uma revisão. In: **XXXIII ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUCAO**, 2013. Salvador. **Anais...** Salvador.

SANTOS, R. B. dos; LACERDA JUNIOR, V.; SOUZA, T. S.; CASTRO, E. V. R. Estudo das propriedades físico-químicas do biodiesel obtido a partir do óleo da cutieira (*Joannesia princeps* Vell.). In: **CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL**. 2007. p. 44-47.

SHI, Y.; DING, J.; LIU, X.; WANG, J. NiFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ultrafine particles prepared by co-precipitation/ mechanical alloying. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, Elsevier, v. 205, n. 2, p.249–254, 1999.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Elsevier, v. 17, n. 3, p. 133–142, 2002.

SILVA FILHO, J. B. **Produção de biodiesel etílico de óleos e gorduras residuais (OGR) em reator químico de baixo custo**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Engenharia Mecânica e de Materiais, UTFPR, Manaus, 2010.

SILVA, J. A.; MACEDO; G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, Elsevier, v. 60, p. 16-24, 2012.

SOUZA, M. C. M. de. **Imobilização de lipase de *Candida Antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. 2013. 88 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

TANG, T.; FAN, H.; AI, S.; HAN, R.; QIU, Y. Hemoglobin (hb) immobilized on amino-modified magnetic nanoparticles for the catalytic removal of bisphenol a. **Chemosphere**, Elsevier, v. 83, n. 3, p. 255–264, 2011.

VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**. 2. ed. New Youk: John Wiley e Sons, p.1361, 1995.

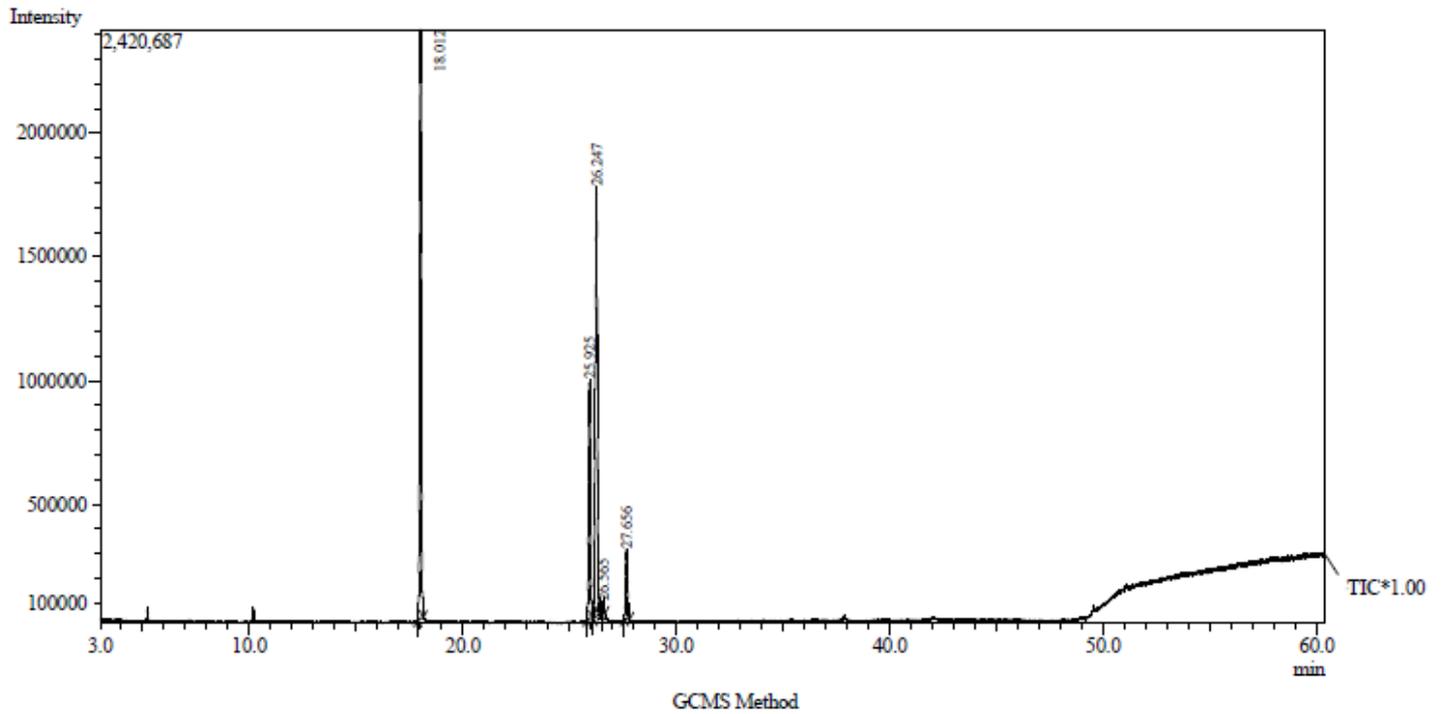
WELSH, F. W.; WILLIAMS, R. E.; DAWSON, K. H. Lipase mediated synthesis of low molecular weight flavor esters. **Journal of food science**, Wiley Online Library, v. 55, n. 6, p. 1679–1682, 1990.

XIE, W.; MA, N. Immobilized lipase on fe<sub>3</sub>o<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. **Energy & Fuels**, ACS Publications, v. 23, n. 3, p. 1347–1353, 2009.

XU, Z.; LIU, Q.; FINCH, J. A. Silanation and stability of 3-aminopropyl triethoxy silane on nanosized superparamagnetic particles: I. direct silanation. **Applied surface science**, Elsevier, v. 120, n. 3, p. 269–278, 1997.

YIN, C.; LIU, T.; TAN, T. Synthesis of vitamin a esters by immobilized *Candida* sp. lipase in organic media. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, Elsevier, v. 14, n. 1, p. 81–86, 2006.

## ANEXO A – Cromatógrafo do ensaio 4 da Tabela 3



Column Information: DB-1 (30 m x 0,25 mm id x 0,25 um film)

Inj. Initial Temp.: 25.00 °C    Interface Temp.: 230.00 °C    Control Mode : Split    Column Inlet Pressure : 100.0 kPa  
 Column Flow : 1.7 mL/min    Linear Velocity : 47.4 cm/sec    Split Ratio : 27    Total Flow : 50.0 mL/min    Equilibrium Time : 1.00 min  
 Oven Temp. Program : Rate    Temperature(°C)    Keep Time(min)  
 -    50.0    0.00

## GCMS Peak Report TIC

Peak#	R. Time	I. Time	Area	Height	A/H	Mark	Name	Base m/z	Area%	Int%
1	18.012	17.885	12241854	2384386	5.13		Hexadecanoic acid, ethyl ester	88.05	40.05	4.00
2	25.925	25.805	5647487	964970	5.85		Linoleic acid ethyl ester	67.05	18.48	7.81
3	26.247	26.090	10747628	1736912	6.19		Ethyl Oleate	55.05	35.16	2.05
4	26.565	26.475	240581	50208	4.79	MI	Ethyl Oleate	55.10	0.79	0.93
5	27.656	27.555	1689881	282151	5.99		Octadecanoic acid, ethyl ester	88.05	5.53	5.21
			30567431	5418627					100.00	0.00