



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS ERECHIM
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA**

MARCELA LEONARDT LAGO

**AVALIAÇÃO DE LIPASES FRENTE A IMOBILIZAÇÃO EM POLIURETANO (PU)
VISANDO A PRODUÇÃO DE ESTERES ETÍLICOS**

ERECHIM

2017

MARCELA LEONARDT LAGO

**AVALIAÇÃO DE LIPASES FRENTE A IMOBILIZAÇÃO EM POLIURETANO (PU)
VISANDO A PRODUÇÃO DE ESTERES ETÍLICOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao curso de Engenharia Ambiental e
Sanitária a Universidade Federal da Fronteira Sul,
como requisito para obtenção do título de
Bacharela em Engenharia Ambiental e Sanitária

Orientadora: Prof.^a Dra. Clarissa Dalla Rosa

ERECHIM

2017

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

Lago, Marcela Leohnardt

Avaliação de lipases frente a imobilização em poliuretano (PU) visando a produção de ésteres etílicos/ Marcela Leohnardt Lago. -- 2017.

27 f.:il.

Orientadora: Clarissa Dalla Rosa.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária , Erechim, RS , 2017.

1. NS-40116. 2. biodiesel. 3. transesterificação. I. Rosa, Clarissa Dalla, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MARCELA LEOHNARDT LAGO

**AVALIAÇÃO DE LIPASES FRENTE A IMOBILIZAÇÃO EM POLIURETANO (PU)
VISANDO A PRODUÇÃO DE ESTERES ETÍLICOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao curso de Engenharia Ambiental E
Sanitária da Universidade Federal da Fronteira
Sul, como requisito para obtenção do título de
Bacharela em Engenharia Ambiental e Sanitária

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a. Clarissa Dalla Rosa
UFFS – Erechim

Prof.^a Gean Delise Leal Pasquali Vargas
UFFS – Erechim

Prof.^a Dr.^a. Marilia Hartmann
UFFS - Erechim

AGRADECIMENTOS

A Deus, simplesmente por tudo!

Aos meus pais Rogerio e Leonice que sempre fizeram tudo por mim e para mim!

Aos meus padrinhos, tios e primos que acompanham minha trajetória e torcem por mim.

A minha amiga mais antiga Pati, que passe o tempo que passar, esteja onde estiver eu sempre vou poder contar!

Ao meu namorado Felipe, que com carinho e atenção me incentivou e ajudou muito nessa fase final da graduação.

A minha orientadora Prof. Clarissa, que desde 2013 me aceitou no grupo de pesquisa, e me auxilia desde então. Pelos ensinamentos ao longo do desenvolvimento desse estudo que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

A Prof. Gean que sempre me ajudou e incentivou durante a trajetória da graduação.

Ao grupo de pesquisa mais legal que existe, obrigada!!! Sem vocês, Luis Felipe, Liane, Wesler, Michele e Marluci, as noites, feriados e domingos no laboratório não teriam sido tão legais e produtivas! Vocês são demais!!

Aos "nossos" da turma 2011 que me acolheram com carinho.

As "possíveis formandas", minhas parceiras que sempre me escutaram e me ajudaram nessa caminhada.

À Ana, Marcela S., Jé e Dani, que foram pessoas muito importantes em diversos momentos desta trajetória.

Àos colegas e técnicos do laboratório de efluentes.

À todos que, de alguma forma, estiveram ao meu lado durante esta caminhada.

RESUMO

A procura por fontes de energias renováveis tem aumentado, isto decorre da diminuição das reservas petrolíferas e do alto índice de poluição pelo uso destes derivados para a obtenção de energia. As matérias-primas mais utilizadas na produção de biodiesel no Brasil são o óleo de soja, devido a tradição no cultivo da soja, além de capacidade de esmagamento e cadeia produtiva bem estabelecida, e o metanol, em virtude do baixo custo, entretanto a utilização do etanol torna a produção de biodiesel no país autossuficiente, por consequência da produção nacional ser muito eficiente. O emprego de enzimas como catalisadores nas reações de produção destes ésteres (biodiesel) apresenta muitas vantagens em relação aos catalisadores químicos homogêneos. É crescente o estudo e pesquisa referente à utilização de enzimas imobilizadas, pois podem potencializar a utilização desses catalisadores, permitindo superar as desvantagens da solubilidade no meio reacional e da instabilidade operacional. Neste contexto, o presente trabalho buscou avaliar as enzimas Eversa e NS-40116 imobilizadas em suporte de poliuretano (PU) e verificar a aplicação da enzima NS-40116 em reações de síntese de produção de ésteres por transesterificação a partir de óleo de soja e etanol. Nos ensaios para avaliação das lipases, a NS-40116 apresentou maior atividade. Nas reações de transesterificação foram avaliados os parâmetros razão molar óleo:etanol e teor de água, onde obteve-se os maior valor de conversão em ésteres para a enzima imobilizada, de 42,6% e 89,5% para enzima livre.

Palavras-chave: NS-40116, biodiesel, transesterificação.

ABSTRACT

The demand for renewable energy sources has been increasing, it is decorated with the decrease of oil reserves and the high pollution rate due to the use of these derivatives to obtain energy. The most unsustainable raw materials for biodiesel production in Brazil are soybean oil, due to a tradition without soybean cultivation, as well as crushing capacity and well defined production chain, methanol, due to the low cost, however, ethanol becomes a production of biodiesel not a self-sufficient country, as a consequence of the national production being very efficient. The use of enzymes as catalysts in the reactions of biodiesel production presents many advantages over homogeneous chemical catalysts. The study and research concerning the use of immobilized enzymes is increasing, since it can potentiate a use of catalysts, allowing to overcome as disadvantages of solubility in the reaction medium and operational instability. In this context, the present work aimed to evaluate the immobilized Eversa and NS-40116 enzymes in polyurethane (PU) support and verification of the application of the NS-40116 enzyme in reactions of synthesis of esterification production by transesterification from soybean oil and ethanol . Initially in assays for the evaluation of lipases, an activity of NS-40116. In the reactions of transesterification as control of emission of molar ratio: ethanol and water content added to the reaction; and as dependent variables the conversion of esters (biodiesel) and residual enzymatic activity was determined. In the two forms the enzyme was employed, the activity was shown after a transesterification reaction. The highest conversion value in esters obtained for immobilized enzyme was 42.6% and 89.5% for free enzyme.

Keywords: Enzymatic biodiesel. Lipase NS-40116. Transesterification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Reação geral de transesterificação.....	7
Figura 2- Reação de esterificação do ácido graxo livre.	8
Figura 3- A) Enzima Eversa concentração 3,5 %, immobilizada em PU flexível após trituração; B) Enzima NS-40116 concentração 3,5%, immobilizada em PU rígido após trituração.	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental	15
Tabela 2 - Ensaio preliminares de atividade das enzimas NS-40116 em suporte de PU rígido e Eversa em suporte de PU flexível.....	17
Tabela 3 - Atividade inicial da enzima NS-40116.....	18
Tabela 4 - atividade enzimática residual da enzima NS 40116 imobilizada em PU rígido e livre, obtidos para as diferentes condições experimentas.....	19
Tabela 5 - Conversão de ésteres etílicos para diferentes condições experimentais.....	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GERAL.....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1. CENÁRIO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	5
3.2. ROTAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL	7
3.3. LIPASES	8
3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1. CATALIZADOR ENZIMÁTICO.....	12
4.1.1. IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES	12
4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	12
4.2.1. ENSAIOS PRELIMINARES DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS Eversa e NS-40116.....	13
4.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	14
4.3.1. REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO	15
4.3.1.1. DETERMINAÇÃO DOS ÉSTERES ETÍLICOS	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PRELIMINAR	17
5.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA RESIDUAL DA ENZIMA NS 40116 IMOBILIZADA EM PU RÍGIDO E LIVRE APÓS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO.....	19
5.3. DETERMINAÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS	20
6. CONCLUSÃO E APONTAMENTOS PARA TRABALHOS FUTUROS	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

A produção e uso do biodiesel representam o desenvolvimento de uma fonte energética sustentável sob os aspectos ambiental, econômico e social. A dimensão do mercado no Brasil e no mundo assegura uma grande oportunidade para o setor agrícola, assim como contribuirá para o desenvolvimento e a ampliação do parque industrial em consonância com o meio ambiente. O biodiesel apresenta ótimo potencial de ganhos ambientais. Em média, a emissão de poluentes no uso em motores é reduzida em comparação ao diesel. Destaca-se a redução de SO₂, particulados e hidrocarbonetos. Além disso, por ser renovável, contribui positivamente para reduzir o efeito estufa. O CO₂ emitido na queima do biodiesel é absorvido na etapa agrícola de seu ciclo produtivo (CRISTO E FERREIRA, 2006).

Um dos grandes responsáveis pelo crescente interesse do emprego dos biocombustíveis reside no aspecto ambiental. Os ésteres produzidos a partir de gorduras animais e de óleos vegetais, mistura denominada biodiesel, podem fornecer reduções significativas no teor de monóxido de carbono e nas emissões de particulados e de hidrocarbonetos (SZYBIT *et al.*, 2005). Por exemplo, tomando-se por base o biodiesel puro (B100) produzido com óleo de soja, seu uso reduz as emissões do monóxido de carbono (CO) em 48%, de material particulado (MP) em 47%, de óxido de enxofre (SO_x) em praticamente 100% e dos hidrocarbonetos totais (HC) em 67%. Por outro lado, em relação ao diesel de origem fóssil, o uso do biodiesel aumenta em aproximadamente 10% as emissões de óxido de nitrogênio (NO_x), o que não deve constituir obstáculo para seu uso devido às grandes vantagens em relação aos outros poluentes. Ademais, há muitos estudos que visam a redução de NO_x mediante o emprego de catalisadores adequados (KNOTHE *et al.*, 2006).

Analisando-se apenas as emissões de gases que contribuem para o efeito estufa gerado pelo ciclo de vida do insumo álcool (desconsiderando as emissões de gases de efeito estufa do ciclo de vida da matéria graxa), o uso de biodiesel metílico reduz a emissão de gases causadores do citado efeito em 95% comparado ao diesel. Quanto ao biodiesel etílico, a redução é de 96,2%, em relação ao diesel, havendo, portanto, diferença não significativa (1,2%) entre os dois ésteres (KNOTHE *et al.*, 2006).

De acordo com Knothe et al (2006), o biodiesel (alquil éster de ácidos graxos), que pode ser obtido através da reação de transesterificação entre um triglicerídeo e um

álcool, atraiu atenção considerável durante a década passada como um combustível renovável, biodegradável e não tóxico. Diversos processos para a produção deste combustível foram desenvolvidos, entre eles a transesterificação que usa catalisadores alcalinos e promove níveis elevados de conversão dos triglicerídeos em seus correspondentes alquil ésteres em curtos tempos de reação. Este processo foi utilizado intensamente para a produção de biodiesel em vários países. No entanto, os processos de produção de biodiesel com catalisadores químicos homogêneos, além de requerer o emprego de catalisador, envolvem necessariamente a separação do produto e do catalisador, que resulta em altos custos de processamento e elevado consumo de energia.

Recentemente, a transesterificação enzimática, utilizando lipases como catalisador, tornou-se uma alternativa atrativa para a produção de biodiesel, uma vez que temperaturas amenas são empregadas, aliadas ao fato de que o glicerol produzido como um subproduto pode facilmente ser recuperado e a purificação dos ésteres é relativamente simples de ser realizada (FUKUDA *et al.*, 2001). Por outro lado, de acordo com Colombo (2011), a transesterificação enzimática exige elevadas proporções de solvente orgânico/substratos para que a reação ocorra a contento e ainda encontra limitações de aplicação com relação ao custo relativo a produção e comercialização destas lipases

O biodiesel pode ser produzido de diferentes formas, quando diz respeito em relação ao catalisador a ser empregado na reação, como os catalisadores homogêneos (ácidos ou alcalinos), catalisadores heterogêneos (zeólitas ou argilas), catalisadores enzimáticos (lipases) ou ainda em condições supercríticas a reação acontece sem a presença de catalisador. Devido ao baixo custo e rápida conversão os catalisadores alcalinos são os mais utilizados nas indústrias, entretanto apresentam limitações como, por exemplo, quando se utiliza matérias-primas com elevada acidez ou presença de água (LEUNG *et al.*, 2010; SAJID *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2016).

A possibilidade de utilização de catalisadores enzimáticos é uma alternativa à catálise química. As enzimas toleram a presença de ácidos graxos livres e de água na matéria-prima e possibilitam operar em condições mais brandas de temperatura, pH e pressão e tornam mais fáceis os processos de recuperação e purificação dos produtos gerados, por serem de origem biológica (HAMA; KONDO, 2013; AARTHY *et al.*, 2014; CHRISTOPHER *et al.*, 2014; ZENEVICZ *et al.*, 2016).

De acordo com Nyari (2013), comercialmente, a imobilização de enzimas apresenta algumas vantagens sobre a utilização de enzimas na forma livre, como por exemplo, facilidade de separação dos produtos, facilidade de recuperação do biocatalisador, processo operado continuamente, custos com manejo de materiais são minimizados, entre outras.

De acordo com Santos (2016), no cenário atual, não basta apenas migrar nossa matriz energética para as fontes renováveis, mas é preciso revolucionar o próprio segmento, desenvolvendo processos alternativos de produção capazes de, além de aumentar a competitividade destes produtos frente aos de origem fóssil, viabilizar a inclusão de novas fontes de matéria-prima, visando uma autossuficiência energética baseada nas fontes renováveis, a inclusão de mais pessoas no processo produtivo e a diminuição no uso de matérias-primas alimentícias

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho buscou avaliar as enzimas Eversa e NS-40116 imobilizadas em suporte de poliuretano (PU) e verificar sua aplicação em reações de síntese de produção de ésteres por transesterificação de ácidos graxos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade das enzimas Eversa e NS – 40116 frente a imobilização em PU .

- Determinar a atividade da enzima NS – 40116 imobilizada em PU rígido submetida a reação de transesterificação.

- Quantificar a atividade da enzima NS – 40116 na forma livre frente a reação de transesterificação.

- Avaliar a influencia das variáveis razão molar óleo:etanol e adição de água nas reações de transesterificação utilizando óleo de soja e etanol como substratos, através da quantificação de ésteres etílicos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo se buscará trazer referências sobre a conjuntura da produção de biodiesel no Brasil, bem como as reações que ocorrem neste processo, lipases e imobilização das enzimas.

3.1. CENÁRIO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

De acordo com Nogueira (2010), o Brasil é um país em potencial no que diz respeito à produção e utilização de fontes renováveis de energia. Isso se explica por possuir extensa área geográfica, climas tropicais e subtropicais que favorecem uma ampla diversidade de matérias-primas.

Conforme Ministério do Meio Ambiente (2014), o Brasil possui a matriz energética com maior porcentagem de energia renovável do mundo industrializado, com 45,3% de sua produção proveniente de fontes como recursos hídricos, biomassa e etanol. Desde 2004 o Brasil conta com o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, que regulamenta a produção e a distribuição do biodiesel brasileiro, produzido com oleaginosas. Segundo com o Ministério de Minas e Energia (2017), atualmente, o País está entre os dois maiores produtores desse tipo de combustível, junto aos Estados Unidos, ultrapassando os tradicionais produtores europeus.

A Lei 13.263/2016 (BRASIL) estabeleceu que a partir 23 de março de 2017 a mistura de biodiesel ao diesel vendido ao consumidor é de 8% (B8). O novo percentual incentiva a produção de biodiesel, reduz as importações de óleo diesel e favorece a agricultura familiar e o agronegócio brasileiro. Ainda de acordo com a medida, as composições deverão ser elevadas para 9% e 10%, respectivamente, a partir de 1º de março de 2018 e 1º de março de 2019. Os novos percentuais de adição do biodiesel colocam o Brasil em destaque no mercado internacional do produto.

De acordo com Encarnação (2008), a maior quantidade de energia utilizada no mundo é proveniente de fontes não renováveis, como o petróleo, carvão e gás natural, estas equivalem por aproximadamente 80% da matriz energética mundial. A queima destes combustíveis fósseis e a estimativa de esgotamento destas fontes no futuro, quando relacionadas com as questões ambientais tornam indispensável a procura por energias alternativas. Desta forma, o biodiesel se torna uma importante opção para modificação da matriz energética, podendo contribuir para o desenvolvimento sustentável nas áreas ambiental, social e econômica.

O biodiesel é um biocombustível utilizado em motores semelhantes aos motores de combustão de diesel mineral, pois seus potenciais caloríficos são bastante similares. A utilização de óleos vegetais como combustível, está relacionada com a invenção do motor a diesel pelo engenheiro francês de origem alemã Rudolph Christian Carl Diesel (1858-1913), no final do século XIX. As primeiras experiências com óleos vegetais como matéria-prima para a combustão com motores de compressão foram conduzidas com óleo de amendoim (KNOTHE et al, 2006).

O biodiesel é visto com uma promissora fonte renovável de combustíveis devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e menor dependência de produtos petrolíferos (ENCINAR, 1999). O biodiesel é totalmente miscível ao óleo diesel mineral, além de ter características físico-químicas semelhantes a este, tendo inclusive melhor lubricidade. Dados dos fabricantes de autopeças mostram que 2% de biodiesel adicionados ao diesel aumentam em cerca de 50% a lubricidade do combustível, aumentando, conseqüentemente, a vida útil das peças desses motores (ENCARNAÇÃO, 2008).

Segundo Vianna (2006), a mistura de biodiesel com diesel confere a este combustível propriedades lubrificantes, permitindo a completa dessulfurização do diesel mineral no processo de refino.

Economicamente, o benefício do biodiesel, está relacionado à substituição das importações. As vantagens ambientais mais pertinentes são a redução de emissão de materiais particulados, de dióxido de carbono (CO₂), e de dióxido de enxofre (SO₂), os quais são gases responsáveis pelo efeito estufa e chuva ácida, reduz significativamente as emissões de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's) e de aldeídos, cujas emissões são compensadas pelo aumento da emissão de acroleína, evitando custos com saúde pública, e podendo gerar recursos internacionais no mercado de carbono (HOLANDA, 2004).

As matérias-primas mais utilizadas na produção de biodiesel no Brasil são o óleo de soja e o etanol, dado a auto-suficiência na produção de etanol e a tradição no cultivo da soja, além de capacidade de esmagamento e cadeia produtiva bem estabelecida, uma vez que o óleo de soja representa cerca de 90% da produção brasileira de óleos vegetais, porém é crescente o estudo e pesquisa referente à utilização de novos substratos como gordura animal e efluentes industriais na obtenção deste biocombustível (SANTIN, 2013).

3.2. ROTAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

A produção deste bicomcombustível é realizada a partir de óleos vegetais, gordura animal e óleos de microalgas por transesterificação, craqueamento ou esterificação com alcoóis de cadeia curta (SANTIN, 2013).

A transesterificação é o método mais utilizado para conversão de ácido graxo em biodiesel. Segundo Encarnação (2008), nesta reação o triglicerídeo reage com um álcool simples (metanol ou etanol), formando ésteres (metílico ou etílico), que constituem o biodiesel e glicerol. A Figura 1 representa como ocorre a reação.

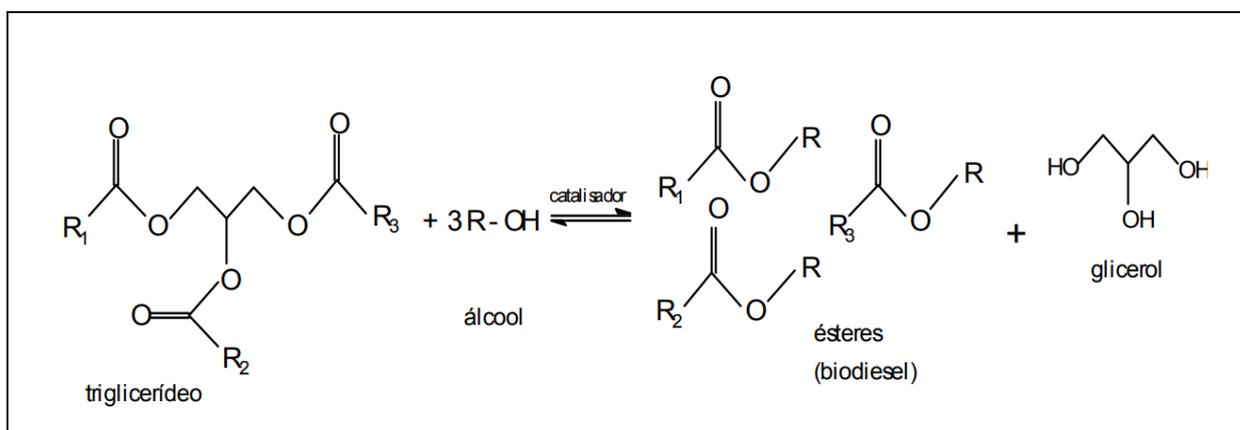


Figura 1- Reação geral de transesterificação

Fonte: BERNARDES, 2008.

O álcool é adicionado em excesso para possibilitar a formação de uma fase separada de glicerol e deslocar o equilíbrio para um máximo rendimento de biodiesel, devido ao caráter reversível da reação. A reação pode ser catalisada por bases, ácidos ou enzimas (lipases) (MEHER et al., 2006).

O produto da reação possui duas fases na qual a mais pesada é composta pela glicerina e a fase mais leve é o biodiesel. Ambos estão contaminados com excessos de álcool, água e catalisador. A glicerina e o biodiesel são separados por decantação e/ou por centrifugação (DABDOUB et al., 2009)

Junto com as reações de transesterificação descritas, nas reações com catálise enzimática onde o óleo utilizado como matéria-prima e contém altos teores de ácidos graxos livres (AGL), ocorrem as reações de esterificação, onde os AGL são convertidos diretamente aos ésteres. Um esquema da reação de esterificação está representado na Figura 2(GOG et al., 2012)

A reação pode ocorrer em duas etapas, primeiramente se realiza a hidrólise enzimática, em presença de água, da estrutura do triacilglicerol em diacilglicerol, o diacilglicerol resultante em monoacilglicerol e este em glicerol, produzindo uma molécula de ácido graxo livre em cada uma das três reações intermediárias de hidrólise, a segunda etapa é a esterificação destes ácidos graxos livres (SANTOS, 2016):

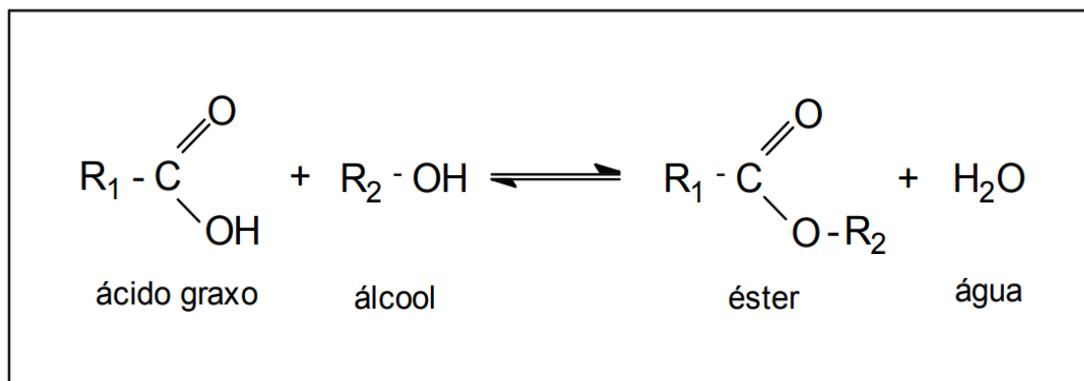


Figura 2- Reação de esterificação do ácido graxo livre.

Fonte: BERNARDES, 2008.

3.3. LIPASES

Sabe-se que as reações químicas podem ser conduzidas diretamente usando lipases em meio orgânico, estas são utilizadas por serem biocatalisadores eficazes devido à elevada atividade específica pelo substrato, baixo impacto ao ambiente, grupo funcional e estereoseletividade. (OLIVEIRA et al, 2006).

De acordo com Neto (2002), quimicamente, as enzimas são macromoléculas de alta massa molecular formadas por subunidades conhecidas por aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. As enzimas, são altamente versáteis na catálise de vários tipos de reações, que ocorrem sob condições amenas, normalmente à temperatura ambiente e em pH próximo à neutralidade. Outras características das enzimas são a sua capacidade de operação em condições suaves de temperatura e pressão, além de serem seletivas para substratos, aprimorando assim a especificidade da operação.

As lipases catalisam a hidrólise de triglicerídeos, e da mesma maneira os di- e monoglicérides, os ácidos graxos formados reagem com o álcool gerando ésteres monoalquílicos. O uso destes biocatalisadores tem sido favorecido, devido à elevada eficiência catalítica, em geral muito maior que a dos catalisadores sintéticos, pois têm alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas, apresentam poucos problemas na separação de subprodutos além de serem altamente versáteis. (CONTESINI et al, 2009).

As lipases são originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência (SAXENA et al, 1999). Segundo Rigo (2004), as lipases são encontradas na natureza em ampla escala filogenética, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e também a partir de microrganismos naturais ou geneticamente modificados que as produzem de forma endógena ou exógena.

De acordo com Souza (2010), as lipases microbianas apresentam uma série de vantagens quando comparadas às de origem animal e vegetal, pois, geralmente são enzimas extracelulares, podendo ser separadas das células microbianas por centrifugação ou filtração; possuem alta velocidade de síntese e alto rendimento de conversão de substratos em produtos; apresentam versatilidade sintética; elevada estabilidade a altas temperaturas e em substratos orgânicos; são seletivas e específicas.

Os catalisadores enzimáticos como as lipases, podem catalisar eficazmente o processo de transesterificação dos triglicerídeos nos sistemas aquosos ou não aquosos, superando os problemas relacionados ao conteúdo de água presente. Em particular, o subproduto glicerol, pode facilmente ser removido sem nenhum processo complexo, e também os ácidos graxos livres contidos nos óleos e nas gorduras podem completamente ser convertidos a ésteres (MEHER et al., 2006).

Um dos grandes obstáculos que historicamente dificultaram a expansão dos processos enzimáticos é o alto custo de muitas enzimas que, mesmo com seus aspectos tecnológicos conhecidos e aprovados, não são viáveis economicamente ou não tem condições de competir com os produtos sintéticos. Porém, graças aos esforços que pesquisadores de muitas empresas de biotecnologia, centros de pesquisa e universidades vêm realizando, significativos avanços neste sentido foram conquistados nos últimos anos ou estão sendo previstos para os próximos. Essa redução de custo está relacionada a inúmeros fatores, como por exemplo, desenvolvimento de novas formulações mais baratas ou com maior rendimento, possibilidade de desenvolver processos que utilizam matérias-primas mais acessíveis, desenvolvimento de alternativas que permitam a reutilização das enzimas, dentre outros. Dessa forma, a utilização de biocatalisadores enzimáticos tem perspectivas de crescimento bastante otimistas para os próximos anos (GOG et al., 2012; CHRISTOPHER et al., 2014).

Neste sentido, empresas produtoras destes biocatalisadores, vem apresentando solução enzimática comercialmente disponível para produzir biodiesel a partir uma ampla gama de materiais graxos como matéria-prima.

3.4 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Conforme Cardoso et al (2009), A imobilização é um termo genérico utilizado para descrever a retenção de uma biomolécula em um suporte. Especificamente, a imobilização enzimática mantém o biocatalisador fisicamente confinado ou localizado em uma região do suporte, mantendo sua atividade catalítica e possibilitando sua utilização repetida e continuamente (CHIBATA et al, 1978).

De acordo com Castro et al (2008), as pesquisas sobre enzimas imobilizadas tiveram início no século XX, quando foi observado que após uma enzima ser adicionada em solução com atividade invertásica no carvão ativo, mesmo após lavagens sucessivas o carvão mantinha a capacidade de hidrolisar sacarose. Segundo Nyari (2017), foi a partir de então, que passou-se a investigar condições de imobilização, a fim de poder aprimorar e utilizar esta técnica em diferentes aplicações.

Do ponto de vista comercial, as principais vantagens e desvantagens na utilização de enzimas imobilizadas são a facilidade do desenvolvimento de processos em escala comercial ou de causar alguns efeitos sobre a estabilidade, as propriedades cinéticas, a especificidade e o deslocamento dos valores de pH e temperatura (NYARI, 2017).

Inúmeros métodos de imobilização têm sido descritos na literatura e investigados para contornar os possíveis problemas de instabilidade das enzimas e otimizar suas aplicações, bem como facilitar a sua recuperação e reutilização (MENDES et al, 2013).

A imobilização deve ser selecionada levando em consideração parâmetros como atividade global do imobilizado, características de regeneração e desativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada (DALLA-VECCHIA et al, 2004).

Um poliuretano (PU) pode ser definido como um polímero resultante da reação de um isocianato e um composto hidroxilado, em que ambos podem ser di ou polifuncionais (COUTINHO, 1999).

O Poliuretano (PU) é um polímero que compreende uma cadeia de unidades orgânicas unidas por ligações uretânicas. São amplamente usados em espumas rígidas, flexíveis, elastômeros duráveis, adesivos de alto desempenho, selantes, fibras, vedações, gaxetas, preservativos, carpetes, peças de plástico rígido e tintas (CATAL, 2010).

A classificação das espumas como flexível ou rígida, depende principalmente da escolha do poliol. As flexíveis são preparadas a partir de poliois de massa molecular

moderadamente elevada, variando de 100 a 6000 e baixo grau de funcionalidade, variando de 1,8 a 3, ao contrário das espumas rígidas, cujos pólios apresentam massas moleculares entre 250 a 1000 e alta funcionalidade de 3 a 12 (VILAR 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada na cidade de Erechim, localizada no Estado do Rio Grande do Sul, nos laboratórios do campus da Universidade Federal da Fronteira Sul.

4.1. CATALISADOR ENZIMÁTICO

Os catalisadores enzimáticos utilizados foram as enzimas lipases. NS-40116 e Eversa, produzidas pela indústria Novozymes. Estas enzimas foram gentilmente cedidas pelo professor José Vladimir de Oliveira, colaborador de pesquisas da empresa TransferTech.

A enzima Eversa foi a primeira a ser desenvolvida diretamente para produção de biodiesel, desta forma facilitando o uso de óleos e gorduras reaproveitados.

A enzima NS 40116, é uma formulação líquida de enzima livre (não imobilizada) termoestável desenvolvida e modificada recentemente a partir do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*.

4.1.1. IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES

As enzimas Eversa e NS-40116 foram imobilizadas em PU flexível e rígido respectivamente, nas concentrações de 1,5%; 3,5% e 6,0% no Campus de Erechim da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI.

A imobilização da enzima NS- 40116 em suporte de PU rígido, foi realizada conforme metodologia descrita por Nyari (2017).

A imobilização da enzima Eversa em suporte de PU flexível foi executada de acordo com a metodologia relatada por Antunes et al (2015).

4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi determinada segundo metodologia adaptada dos procedimentos descritos por Nyari (2017).

Inicialmente foi realizado o ensaio do branco, ou seja, o meio reacional foi preparado contendo 0,1 g da enzima imobilizada em PU (concentrações de 1,5%; 3,5% e 6%), 0,7 g de álcool e 4,3g de ácido oleico:álcool. Alíquotas de 500 µL foram retiradas do meio, onde eram adicionados 15 mL de solução acetona:etanol (relação volumétrica de 1:1) e iniciava-se a titulação com hidróxido de Sódio (NaOH) 0,05 M sem que o meio tenha sido conduzido para o agitador orbital.

Após foram preparados os outros meios reacionais que continham as mesmas quantidades do ensaio branco, entretanto os meios foram conduzidos para o agitador orbital por um período total de 40 min a temperatura de 45°C e agitação de 160 rpm.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome 1µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi calculada utilizando a Equação 1.

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

Onde:

AE = atividade de esterificação (U/g);

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 min (mL);

V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo 0 (mL);

M = molaridade da solução de NaOH;

V_f = volume final de meio reacional (mL);

t = tempo (min);

M_{EL} = peso da enzima livre (solução enzimática)/imobilizada;

V_c = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL).

4.2.1. ENSAIOS PRELIMINARES DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS EVERSA E NS-40116

Inicialmente as enzimas imobilizadas em suporte de PU foram trituradas em liquidificador, para homogeneizar o máximo possível as amostras e facilitar o contato entre enzima e substrato durante a reação. A Figura 3 apresenta como ficaram as amostras.

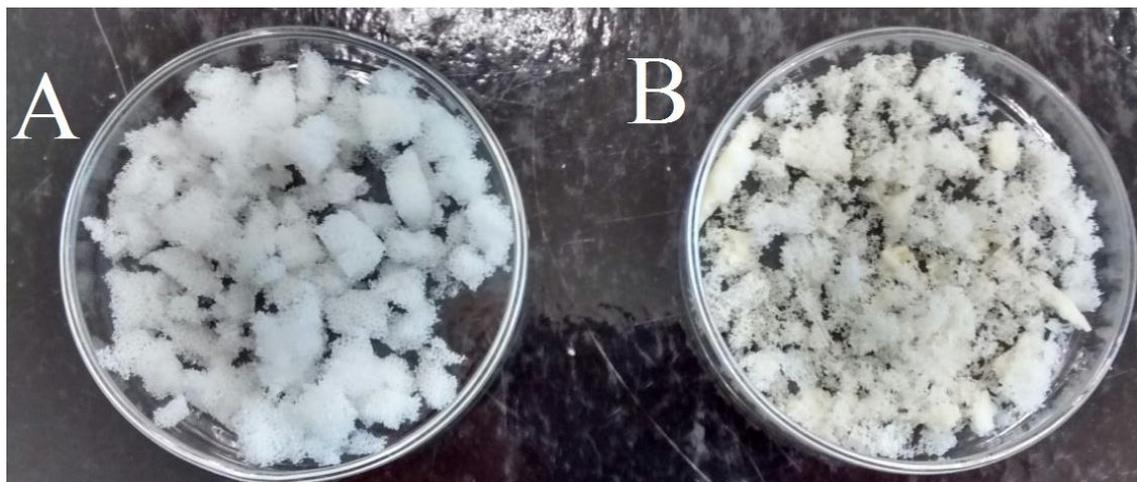


Figura 3- A) Enzima Eversa concentração 3,5 %, immobilizada em PU flexível após trituração; B) Enzima NS-40116 concentração 3,5%, immobilizada em PU rígido após trituração.

Fonte. A autora

Os ensaios preliminares para determinação da atividade das enzimas immobilizadas em suporte de PU foram realizadas afim de avaliar a melhor condição de atividade para que posteriormente fossem aplicadas nos ensaios das reações de transesterificação.

As determinações de atividade enzimática também foram realizadas com a NS – 40116 livre e immobilizada como forma de avaliar o potencial da immobilização. Em função da indisponibilidade da enzima Eversa livre, estes testes não foram realizados com esta lipase.

Ainda, foram realizadas determinações de atividade enzimática contendo apenas o poliuretano como forma de avaliar a influência deste suporte sobre uma possível reação com os substratos propostos neste estudo.

4.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Com base no trabalho de Santos (2016) foram definidas as condições de razão molar óleo:etanol e teor de água. Utilizou-se a metodologia de Planejamento Experimental. O Planejamento Experimental fatorial 2^2 foi executado de acordo com a Tabela 1, sendo que o ponto central foi realizado em triplicata.

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental

Ensaio	Razão molar Óleo:Etanol	Teor de água (m/m)
1	-1 (1:3)	-1 (0%)
2	+1 (1:9)	-1 (0%)
3	-1 (1:3)	+1 (4%)
4	+1 (1:9)	+1 (4%)
5	0 (1:6)	0 (2%)
6	0 (1:6)	0 (2%)
7	0 (1:6)	0 (2%)

4.3.1. REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

Para as reações de transesterificação o planejamento experimental citado anteriormente. O tempo de reação avaliado para cada experimento foi de 8 horas, definido segundo estudo de Santos (2016). Avaliou-se a atividade enzimática residual e a quantidade de ésteres formados em cada um dos ensaios.

Neste sentido, a cada ensaio realizado preparou-se um meio reacional contendo uma quantidade fixa de 5 g de óleo de soja, 0,4g de enzima e teor de água e etanol de acordo com o planejamento descrito anteriormente. Os erlenmeyers contendo a mistura reacional foram vedados, afim de manter as condições internas no momento da agitação durante o tempo reacional.

Os meios reacionais permaneceram em agitador orbital a temperatura de 45°C e agitação de 250 rpm, após eram retirados para análise; e submetidos a centrifugação à 12000 rpm e 10°C por 20 minutos para separação das fases líquida e sólida resultantes da reação.

4.3.1.1. DETERMINAÇÃO DOS ÉSTERES ETÍLICOS

A determinação dos ésteres produzidos foi realizada através de metodologia descrita pela Norma Européia (NE) 14103. Para a quantificação de ésteres de ácidos graxos as amostras foram previamente preparadas, transferindo-se 250 mg das mesmas para um balão volumétrico de 5 mL completando o volume até o menisco do mesmo com a solução de padrão interno heptadecanoato de metila (C17:0) na concentração de 5000 mg/L. As amostras de cada experimento foram preparadas em duplicata. A solução foi então injetada (1 µL) em cromatógrafo gasoso (GC) (Shimadzu 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna

capilar Rtx-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) nas condições cromatográficas descritas pela Norma EN 14103 (2003), do Comitê Europeu para Padronizações. A temperatura inicial da coluna foi 120°C permanecendo por 1 minuto, seguido pelo aquecimento de 15°C/min até 180°C permanecendo por 2 minutos, e novamente aquecendo 5°C/min até 250°C permanecendo assim por mais 2 minutos. Ar sintético e nitrogênio eram utilizados como gás de arraste e a temperatura do injetor e detector eram 250°C e a taxa de split de 1:50, possibilitando a determinação da conversão em ésteres etílicos da reação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos a partir da metodologia descrita anteriormente e discutidos com trabalhos de referência da área.

5.1. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS EVERSA E NS-40116 APÓS IMOBILIZAÇÃO

Os ensaios para determinação de atividade preliminar das lipases foram realizados afim de indicar a viabilidade do PU flexível ou rígido, frente as diferentes concentrações de enzima.

Tabela 2- Ensaios preliminares de atividade das enzimas NS-40116 em suporte de PU rígido e Eversa em suporte de PU flexível

Concentração de Enzima	Ensaio	AE NS-40116 (U/g)	AE Eversa (U/g)
1,5	(1)	354,31	378,48
1,5	(2)	273,10	421,51
1,5	(3)	358,62	752,30
3,5	(1)	2794,85	106,16
3,5	(2)	2527,15	84,84
3,5	(3)	2588,96	151,94
6,0	(1)	2201,02	-64,02
6,0	(2)	1755,21	118,33
6,0	(3)	1524,72	327,49

Verifica-se na Tabela 2, que os melhores resultados para atividade, são encontrados nos ensaios com a enzima NS-40116 com concentração 3,5% no processo de imobilização. Sendo assim optou-se por utilizar a combinação entre enzima NS-40116, concentração 3,5% e imobilização rígida nos experimentos posteriores.

Ao retirar as amostras com PU+enzima, dos recipientes onde ocorreu a imobilização, percebeu-se que a imobilização em suporte rígido de concentração 6,0% apresentou um grande acúmulo de enzima no fundo do recipiente. Facin (2017) observou que quando utilizado uma concentração de enzima maior que o ponto de saturação do suporte, a formação do polímero de PU rígido fica comprometida.

Os resultados com valores menores de atividade apresentados pela enzima Eversa imobilizada em PU flexível, podem ser explicados porque grande parte destas pode estar inativa ou perdeu atividade. Esta inativação ou perda de atividade pode estar

relacionada a diversos fatores como a elevada quantidade de ligações covalentes/cruzadas presentes, que podem dificultar a ação da enzima (efeitos difusionais e transferência de massa) ou ainda promover a ligação da enzima ao suporte por meio de ligações que afetem a sua atividade catalítica (FACIN, 2017). Além disso, o tempo e a temperatura que a enzima permaneceu após a imobilização pode ter contribuído para os resultados insatisfatórios. Facin (2017), observou que houve uma redução de apenas 20% na atividade catalítica da enzima NS-40116 imobilizada em suporte polimérico de PU flexível após 30 dias de armazenamento tanto a temperatura ambiente quanto sob refrigeração. Nyari et al (2016), estudou a estabilidade ao armazenamento de *Candida antarctica B (CalB)* lipase livre e imobilizada em suporte polimérico de PU rígido a temperatura ambiente e geladeira. O estudo revelou que após 360 dias a atividade enzimática relativa era 87% quando armazenada a temperatura ambiente e 51% quando armazenada sob refrigeração.

De acordo com Vilar (2014), para as espumas serem definidas como rígidas ou flexíveis é analisado a massa molecular e grau de funcionalidade. Observando-se os resultados de atividade enzimática frente as duas lipases, percebe-se que a enzima imobilizada em PU rígido (NS-40116), a qual obteve-se um tamanho de imobilizado menor após a trituração, apresentou atividades superiores a enzima imobilizada em PU flexível (Eversa). Nesse contexto, como pode-se perceber na Figura 3, a espuma flexível é mais difícil de triturar, devido sua baixa funcionalidade, ao contrário da espuma rígida que apresenta alta funcionalidade. Desta forma, se o tamanho do material adquirido após a trituração é grande, dificulta o contato entre enzima e substrato.

Foi realizado um acompanhamento da atividade inicial da enzima NS-40116 livre e imobilizada, com o intuito de avaliar o potencial de imobilização. A Tabela 3 com estes resultados é apresentada a seguir:

Tabela 3- Atividade inicial da enzima NS-40116

Ensaio	AE (U/g)	Acréscimo de AE (%)
NS 40116 LIVRE	182,35	-
NS 40116 IMOBILIZADA	278,66	52

De acordo com a Tabela 3, verifica-se que ocorreu um acréscimo de 52 % da atividade da enzima NS-40116 imobilizada em relação à livre. Nyari (2017) observou um aumento de 250% da atividade inicial da CAL B imobilizada em PU rígido em relação a livre. De acordo com a autora, estes resultados apresentam um efeito benéfico da imobilização sobre a atividade da enzima. Esta tendência pode estar relacionada com vários fatores como, a disponibilização e facilidade do acesso de novos sítios ativos.

Após constatar esse acréscimo de atividade, foram realizados experimentos em triplicata para averiguar a possibilidade do PU estar agindo isoladamente como catalisador.

Os resultados obtidos não apresentaram valores de atividade, confirmando que o PU não age como catalisador e apresenta comportamento inerte frente aos substratos avaliados.

5.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA RESIDUAL DA ENZIMA NS 40116 IMOBILIZADA EM PU RÍGIDO E LIVRE APÓS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO.

Os resultados de atividade enzimática residual da enzima NS-40116 imobilizada em PU rígido e livre, obtidos para as diferentes condições experimentais estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- atividade enzimática residual da enzima NS 40116 imobilizada em PU rígido e livre, obtidos para as diferentes condições experimentais.

Ensaio	Razão molar Óleo:Etanol	Teor de água (m/m)	AE NS 40116 imobilizada (U/g)	AE NS 40116 livre (U/g)
1	-1 (1:3)	-1 (0%)	672,15	618,02
2	+1 (1:9)	-1 (0%)	523,50	1087,82
3	-1 (1:3)	+1 (4%)	541,69	560,55
4	+1 (1:9)	+1 (4%)	973,78	933,54
5	0 (1:6)	0 (2%)	969,39	1039,83
6	0 (1:6)	0 (2%)	512,36	817,39
7	0 (1:6)	0 (2%)	821,47	956,51

É importante notar que a enzima apresentou manutenção de atividade, após todas as reações de transesterificação, com diferentes razões molares óleo:etanol e

porcentagens de água. Isso sugere possibilidade de reutilização da enzima, diminuindo os custos do processo que for empregada.

Nas condições sob a enzima imobilizada a atividade apresentou variação na triplicata do ponto central. Isso pode ocorrer em função da enzima não ter apresentado uma distribuição uniforme no PU durante o processo de expansão da espuma. Desta forma a fração de PU+enzima que compunha os meios reacionais não se apresentam de forma uniforme.

Os resultados de atividade enzimática das reações que fizeram uso da enzima livre, também apresentaram grande variação. Isso pode ter ocorrido em função da separação ineficaz da enzima na etapa de centrifugação, permitindo que não só a enzima fosse coletada para determinação de atividade, mas também, parte do meio reacional.

Decorrente da variação observada nos resultados da triplicata do ponto central, maiores discussões e análises acerca das variáveis teor de água e razão molar óleo:etanol não serão apresentadas.

5.3. DETERMINAÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS

Os resultados de conversão em ésteres etílicos para as diferentes condições experimentais após 8 horas de reação estão apresentados na Tabela 5 a seguir:

Tabela 5- Conversão de ésteres etílicos para diferentes condições experimentais.

Ensaio	Razão molar Óleo:Etanol	Teor de água (m/m)	Teor de Éster (%)	
			NS-40116 imobilizada	NS-40116 livre
1	-1 (1:3)	-1 (0%)	4,4	61,2
2	+1 (1:9)	-1 (0%)	11,4	71,4
3	-1 (1:3)	+1 (4%)	11,3	66,5
4	+1 (1:9)	+1 (4%)	42,6	87
5	0 (1:6)	0 (2%)	26,7	87,6
6	0 (1:6)	0 (2%)	29,8	87,6
7	0 (1:6)	0 (2%)	27,2	89,5

Existe uma grande diferença nos valores de conversão em ésteres encontrados quando utilizada a enzima na forma livre e imobilizada. Segundo Yadav e Trivedi (2003), o processo de síntese enzimática, especialmente em sistemas livres de solventes,

a transferência de massa entre a fase aquosa e não aquosa é muito importante, já que a lipase atua justamente na interface das duas fases. Para Nyari (2013), nos sistemas com enzima imobilizada existem limitações de transferência de massa que reduzem a velocidade das reações, pelas limitações de difusão e transferência de substratos e produtos através dos poros e membranas do suporte. Portanto, quando a enzima está na forma livre o contato entre enzima e substrato é mais fácil, garantindo que a reação de transesterificação ocorra. Além disso, a quantidade de enzima que compõe o meio reacional na forma livre é maior, pois no imobilizado, o peso determinado para enzima é formado por enzima e PU, enquanto na livre é apenas enzima.

O maior valor de conversão de ésteres encontrado com a enzima livre foi de 89,5%, no ensaio 7 (ponto central). Santos (2016), observou no trabalho ‘Produção de ésteres metílicos a partir de óleo de macaúba bruto (*acrocomia aculeata*) empregando enzima livre’, que também fez uso da enzima NS 40116, que os valores referentes ao teor de ésteres produzidos variaram de uma condição para outra, sendo o maior valor obtido de 84,78% m/m, na condição de 40 °C, razão óleo:etanol de 1:4,5 (1,5 eqv.), 0,65% m/m do composto enzimático e 1,0% m/m de água adicionada.

Percebe-se que os resultados do ensaio 4 (87% de éster), onde encontram-se os níveis superior de teor de água (4%) e razão molar óleo:etanol (1:9) são muito próximos ao ponto central, sugerindo que o incremento dado por esta condição comparada ao ponto central não apresenta vantagem na produção de ésteres.

Verifica-se, que independente da razão molar óleo:etanol investigada, quando adicionado água ao sistema, a conversão em ésteres é maior. Isto representa a importância da presença de água no meio reacional. Desta forma corrobora-se a afirmação de Santos (2016), que obteve o valor de menor conversão, de apenas 10,04% m/m de ésteres no produto final, na condição em que trabalhou com ausência de água. Este fato pode ser justificado porque a água auxilia na atividade catalítica, estabilidade da lipase e na ativação da enzima, que passa a trabalhar na interface água/óleo. A água aumenta essa região interfacial provendo a transferência de massa, portanto, a área de ação da enzima, melhorando sua atividade (GOG et al. 2012). Ainda assim, de acordo com Christopher et al (2014), deve-se ter precaução com o excesso de água, pois a reação de hidrólise concorrente pode ser facilitada, diminuindo os rendimentos de transesterificação.

Avaliando os resultados obtidos frente as variações de razão molar óleo:etanol, pode-se observar que tanto para a enzima livre, quanto para a imobilizada, o teor de

ésteres sofre aumento quanto maior a razão molar óleo:etanol adicionada. Isso sugere que valores acima da razão estequiométrica para conversão dos triacilgliceróis em estes, são benéficas.

Dalla Rosa, et. al (2008), investigou o efeito da razão molar óleo etanol de 1:3 à 1:15 em sistemas pressurizados, e os resultados obtidos sugerem que a razão molar óleo:etanol de 1:3 à 1:9 afeta positivamente o processo.

Os valores de conversão em éster apresentados pelas triplicatas do ponto central da enzima livre e imobilizada apresentam similaridade, ou seja, valores baixos de desvio padrão e erro padrão. O valor de desvio padrão encontrados para os ensaios com a enzima imobilizada foram de 1,35 e erro padrão de 0,96. Já para a enzima livre, foram encontrados valores de 0,89 de desvio padrão e 0,63 de erro padrão. Estes valores indicam uma boa reprodutibilidade e confiabilidade nos valores obtidos. Nos ensaios realizados com a enzima na forma livre, os valores de teor de ésteres não variam muito, estando de acordo com os resultados encontrados por Santos (2016), onde variam entre a faixa de 70 a 80%. Esta uniformidade nos resultados pode ser devido ao catalisador utilizado ser bastante robusto e capaz de tolerar grandes variações nas condições operacionais.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho estudou-se a atividade das lipases Eversa e NS-40116 imobilizadas em PU flexível e rígido respectivamente, e a síntese de ésteres de biodiesel a partir da reação de transesterificação de triglicerídeos e álcool catalisada pela enzima NS-40116 imobilizada em PU rígido e livre.

Os ensaios para avaliar a atividade das enzimas Eversa e NS-40116, demonstraram que a melhor atividade obtida foi da lipase NS-4016, com concentração de 3,5% e imobilização de PU rígido.

Os ensaios para determinação de atividade de enzima realizados após as reações de transesterificação apontaram que a enzima empregada na forma livre e imobilizada, apresentam manutenção das atividades, mesmo após exposição ao meio reacional referente as reações de transesterificação, sugerindo que possa ser reutilizada.

Quanto ao processo de transesterificação com catalisador enzimático, nas condições deste estudo, podemos observar a potencialidade da produção de ésteres. O valor de 89,5% de conversão em éster foi obtido com a condição de enzima livre e 42,6% com a enzima imobilizada em PU rígido.

Desta forma verifica-se que não é viável a imobilização da lipase NS-40116 em PU rígido, quando comparada a utilização na forma livre, para produção de ésteres etílicos. São necessários mais estudos para potencializar o emprego desta lipase imobilizada, de forma a ampliar as faixas e os parâmetros investigados, com vistas as melhores condições de produção de ésteres.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTHY, M. et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1591–1601, 2014.
- ANTUNES, A. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* b (calb) in situ em espuma flexível de poliuretano de diferentes densidades**. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em engenharia de alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2015.
- BRASIL. **Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016**. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Brasília, DF, 2016.
- BERNARDES, L. O. **Produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleo de soja**. 2008. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.
- CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; CASS, Q. B., **Química Nova**, v. 32, no1, p.175-187, 2009
- CASTRO, M. Óleo da palmeira nativa de Minas, ganha status de produto de qualidade para vários setores. **Caderno Agropecuário**. Jaboticatubas/MG: Portal Estado de minas, 2008.
- CATAL. B., Enzyme, **Polyurethane Technology**, John Wiley & Sons, New York, 2010
- CHIBATA, I., **Immobilized Enzymes – Research and Development**, New York: John Wiley & Sons, p. 71, 1978.
- COLOMBO, T. S. **Produção enzimática de ésteres etílicos a partir de óleo de soja em reator de leito expandido em modo contínuo**. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em engenharia de alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2011.
- CONTESINI, F. J., et al. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **The Journal Of Microbiology**, v. 47, n. 5, p.563-571, out. 2009.
- CRISTO, C. M. P. N.; FERREIRA, J. R. (Orgs.) **O futuro da indústria: biodiesel**. Brasília. MDIC-STI-IEL. 2006.
- CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497–520, 2014.
- DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L., RAMPIN, M. A.. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**. v.32, n.3, pp.776-792, 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DALLA ROSA, et al. Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.47, n.49-53, 2008.

COUTINHO, F. M. B.; DELPECH, M.C.. Poliuretanos como materiais de revestimento de superfície. **Polímeros**, v. 9, n. 1, p.41-48, 1999.

EN 14103:2003; **Fat and oil derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl esters content**, Bruxelas, 2011.

ENCARNAÇÃO, A. P. G. **Geração de biodiesel pelos processos de transesterificação e hidroesterificação, uma avaliação econômica**. 2008. 164 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

ENCINAR, J. M. et al. Preparation and Properties of Biodiesel from *Cynara cardunculus* L. Oil. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, n. 8, p.2927-2931, ago. 1999.

FACIN, B. R. **Imobilização de lipase em suporte polimérico e aplicação na hidrólise de óleos vegetais**. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, pp. 405-416, 2001.

GOG, A. et al. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, n. 1, p.10-16, mar. 2012.

HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386–395, 2013.

HOLANDA, A. **Biodiesel e inclusão social**. Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, 200 p. Série cadernos de altos estudos n.1. Brasília, 2004.

KLOSS, J. R., **Síntese e Caracterização de Poliuretanos Biodegradáveis à base de póli(εCaprolactona)Diol**. 2007. 231 f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

KNOTHE, G.; VON GERPEN, J.; KRAHH, J.; RAMOS, L. P. Ramos (Eds.) **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2006.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083–1095, 2010

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. **Renew Sustain Energy Rev**, v.10, p. 248–268, 2006.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C.. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**. vol.36, n.2, p.245-251, 2013.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Matriz Energética**. 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2010/11/matriz-energetica>>. Acesso em: 14 nov. 2017

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Percentual obrigatório de biodiesel no óleo diesel passa para 8%**. 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/03/percentual-obrigatorio-de-biodiesel-no-oleo-diesel-passa-para-8>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

NETO, P. R.. **Obtenção de Ésteres Alquílicos (Biodiesel) por Via Enzimática a Partir do Óleo de Soja**. 2002. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

NYARI, N. L. D.. **Estudo da imobilização de lipase de candida antarctica b em poliuretano**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2013.

NYARI, N. L. D. et al. In situ immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p.52-61, fev. 2016.

NYARI, N. L. D. **Aplicação da lipase de *Candida antarctica in situ* em poliuretano em reações de síntese de ésteres em sistema livre de solvente**. 2013. 237 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2017.

NOGUEIRA, N.S. **Análise Delphi e SWOT das Matérias-primas de Produção de Biodiesel: Soja, Mamona e Microalgas**. 2010. 177 f. Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

OLIVEIRA, L.B et al. Analysis of the sustainability of using wastes in the Brazilian power industry. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**.v.12, p. 883–890, 2006.

RIGO, E. **Aplicação de lipases como auxiliar no pré-tratamento de efluentes de frigoríficos de suínos e bovinos**. 2004. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2004.

SAJID, Z.; KHAN, F.; ZHANG, Y. Process simulation and life cycle analysis of biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 85, p. 945–952, 2016.

SANTIN, C. M. T. **Síntese de biodiesel pela transesterificação e esterificação enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.** 2013. 213 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2013.

SANTOS, J. M. B. **Produção de ésteres metílicos a partir de óleo de macaúba bruto (*Acrocomia aculeata*) empregando enzima livre.** 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

SAXENA, R. K., et al. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, vol. 77, no. 1, p. 101-115, 1999.

SOUZA, L T. A.. **Síntese enzimática do biodiesel de *Jatropha curcas* pela rota etílica.** 2010. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Processos Catalíticos e Biocatalíticos, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

SZYBIST, J. P.; et al. Evaluation of formulation strategies to eliminate the biodiesel NO_x effect. **Fuel Processing Technology**, v.86, p. 1109-1126, 2005.

VIANNA, F.C. **Análise de ecoeficiência: avaliação do desempenho econômicoambiental do biodiesel e petrodiesel** - Dissertação (Mestrado) Pós graduação em Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

VILAR, Walter. **Química e Tecnologia dos Poliuretanos.** 3. ed. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <<http://www.poliuretanos.com.br/Capa/inicial.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

XU, Q.-Q. et al. Continuous production of biodiesel from soybean flakes by extraction coupling with transesterification under supercritical conditions. **Fuel Processing Technology**, v. 144, p. 37–41, 2016.

YADAV, G. D.; TRIVEDI, A. H. Kinetic modeling of immobilizedlipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media, **Enzyme Microb. Technol**, v. 32, p. 783-789, 2003.

ZENEVICZ, M. C. P. et al. Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 235–241, 2016.