UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

ERIKA CRISTINA GONÇALVES AGUIEIRAS

SÍNTESE DE ESTOLIDES EMPREGANDO CATÁLISE ENZIMÁTICA

Orientadoras: Mônica Antunes Pereira da Silva, D. Sc.
Marta Antunes Pereira Langone, D. Sc.

RIO DE JANEIRO
2011

Erika Cristina Gonçalves Aguieiras

SÍNTESE DE ESTOLIDES EMPREGANDO CATÁLISE ENZIMÁTICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Mônica Antunes Pereira da Silva, D. Sc.
Marta Antunes Pereira Langone, D. Sc.

Rio de Janeiro
2011

A263s Aguieiras, Erika Cristina Gonçalves

Síntese de estolides empregando catálise enzimática / Erika Cristina Gonçalves Aguieiras – 2011.

106 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2011.

Orientador: Mônica Antunes Pereira, Marta Antunes Pereira Langone.

1. Estolide. 2. Lipase. 3. Biolubrificante. – Teses. I. Silva, Mônica Antunes Pereira da (Orient.). II. Langone, Marta Antunes Pereira (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química. IV. Título.

CDD: 660.634

ERIKA CRISTINA GONÇALVES AGUIEIRAS

SÍNTESE DE ESTOLIDES EMPREGANDO CATÁLISE ENZIMÁTICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO REQUISITO PARCIAL À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS.

Aprovada por:

_____
Mônica Antunes Pereira da Silva, D. Sc., UFRJ

_____
Marta Antunes Pereira Langone, D. Sc., UERJ

_____
Antônio Carlos Augusto da Costa, D. Sc., UERJ

_____
Denise Maria Guimarães Freire, D. Sc., UFRJ

_____
Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc., UFRJ

Rio de Janeiro

Fevereiro 2011

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe Angela Cristina, exemplo de determinação, superação e a quem eu devo tudo que conquistei em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus pos estar sempre presente na minha vida nos momentos de oportunidade e de dificuldade.

À minha orientadora Mônica Antunes Pereira da Silva pelo apoio, incentivo, dedicação e credibilidade no meu trabalho.

À minha orientadora Marta Antunes Pereira Langone pela dedicação, compreensão, profissionalismo, amizade e pelos ensinamentos para minha vida profissional e pessoal desde os tempos de Escola Técnica Federal de Química.

Às funcionárias do CENPES, Danielle de Oliveira Rosas e Juliana Vaz Bevilaqua, e à professora Cláudia Veloso pela confiança, credibilidade e colaboração no trabalho.

A minha mãe pelo apoio nas minhas escolhas e por seu amor incondicional.

Ao meu namorado Vitor por estar sempre ao meu lado. Sua paciência, ajuda, compreensão nos momentos difíceis, carinho, amor e confiança em meu trabalho foram muitos importantes nessa conquista.

Aos meus familiares pela presença em minha vida, pelo apoio, carinho e bons momentos vividos.

Aos meus amigos pelos bons momentos indispensáveis vividos com vocês, em especial a minha amiga Isabel Bretas pela sua amizade com a qual eu sei que sempre poderei contar.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos durante as disciplinas ministradas.

Aos amigos Marly Catran e Igor Nascentes pela amizade, colaboração durante a execução do trabalho e pelos valiosos conselhos nos momentos difíceis.

Aos alunos e funcionários do DQA – UERJ em especial Otávio, Susana, Nattascha e Natália pela ajuda, agradável convivência e pelos momentos de descontração vividos no laboratório e a aluna de mestrado Sabrina pela colaboração nas análises do produto.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro pela oportunidade.

Ao CNPq e à FAPERJ pelas bolsas concedidas.

À PETROBRAS pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

"O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos".

Eleanor Roosevelt

RESUMO

AGUIEIRAS, Erika Cristina Gonçalves. **Síntese de estolides empregando catálise enzimática.** Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011

Estolides são lubrificantes derivados de óleos vegetais obtidos a partir de ácido oléico ou fontes de ácidos graxos hidroxilados. Esses lubrificantes freqüentemente superam a performance de produtos comercialmente disponíveis como fluidos hidráulicos derivados de petróleo e de óleo de soja. O objetivo deste trabalho foi estudar a síntese de estolides de ácido oléico ou ácido esteárico com ricinoleato de metila (biodiesel de mamona), utilizando lipases imobilizadas comerciais (Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM) em meio sem solvente. A influência de parâmetros de reação como temperatura, concentração de enzima, razão molar dos reagentes, tempo de reação, tipo de lipase, velocidade de agitação, pressão e remoção da água do meio na conversão do ácido graxo foi estudada. O índice de acidez foi utilizado no acompanhamento do progresso das reações. Novozym 435 apresentou a melhor performance e manteve atividade, mesmo a 100℃. Relação linear foi obtida entre a co ncentração de catalisador e a conversão até 14% (m/m) de lipase (conversão de 53%). Após 100 horas de reação a 80℃ e 6% (m/m) de Novozym 435, foram obtidos 49 e 50% de conversão para os ácidos oléico e esteárico, respectivamente. O emprego de peneiras moleculares e vácuo promoveu aumento na conversão superior a 10% após 48 h. A lipase Novozym 435 foi mais ativa a pressão atmosférica e pôde ser reutilizada em 4 reações consecutivas em batelada entre ácido oléico e biodiesel de mamona a 80℃. A reação entre duas moléculas de ácido ricinoléico também foi catalisada pela lipase. A conversão obtida nessa reação foi de 32,4% após 48 h. Cromatografia em fase gasosa foi utilizada para avaliar os possíveis produtos formados nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila. Foram detectados picos provavelmente referentes aos dímeros de estolides. O produto obtido apresentou boas propriedades de viscosidade, baixo ponto de fluidez e ausência de corrosividade.

Palavras-chave: Estolide. Lipase. Biolubrificante.

ABSTRACT

AGUIEIRAS, Erika Cristina Gonçalves. **Estolides synthesis using enzymatic catalysis**. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011

Estolides are lubricants based on vegetable oils obtained from oleic acid or any source of hydroxy fatty acids. These lubricants currently out-perform the commercially available products such as petroleum-based hydraulic fluids and soy-based fluids. The aim of this work was to study the synthesis of estolides from oleic acid or stearic acid and methyl ricinoleate (castor oil biodiesel), using commercial immobilized lipases (Novozym 435, Lipozyme RM IM and Lipozyme TL IM) in a solvent free medium. The influence of reaction parameters such as temperature, enzyme concentration, molar ratio of reagents, reaction time, type of lipase, speed of agitation, pressure and water removal on the acid conversion was examined. The acid value was used as an index to show the degree of reaction. Novozym 435 showed the best performance and kept activity even at 100℃. A linear relation between catalyst amount and conversion was found until 14 wt. % of lipase (conversion of 53%). After 100 hours of reaction at 80℃ and 6 wt.% of Novozym 435, were obtained 49 and 50% of conversion to oleic and stearic acids, respectively. The use of molecular sieves and vacuum increased the conversion after 48 h in more than 10%. The lipase Novozym 435 was most active at atmospheric pressure and could be reused for four batch reactions with oleic acid and castor biodiesel at 80℃. The reaction between two molecules of ricinoleic acid was also catalyzed by lipase. The conversion attained in this reaction was 32.4% after 48 h. Gas chromatography was used to evaluate the possible products formed in reactions between oleic acid and methyl ricinoleate. Peaks were detected probably related to estolides dimers. The obtained biolubricant showed good properties of viscosity, low pour point and lack of corrosiveness.

Keywords: Estolide. Lipase. Biolubricant.

SUMÁRIO

Capítulo 1 1
INTRODUÇÃO 1

Capítulo 2 4
REVISÃO BIBLIOGRAFICA 4

2.1 Óleos lubrificantes 4
2.1.1 Propriedades dos lubrificantes 6
2.2 Biolubrificantes 9
2.3 Estolides 12
2.4 Biodiesel de mamona 15
2.5 Síntese de estolides 17
2.5.1 Via química 17
2.5.2 Via enzimática 19
2.5.2.1 Lipases 20
2.5.2.2 Síntese de estolides empregando lipases 27
2.6 Fatores que influenciam na síntese de estolides catalisada por lipase 28
2.6.1 Temperatura 28
2.6.2 Concentração de lipase 28
2.6.3 Tipo de lipase 29
2.6.4 Concentração de substrato 30
2.6.5 Posição da hidroxila do ácido graxo hidroxilado (HFA) 30
2.6.6 Tempo de reação 32
2.6.7 Água 33
2.6.8 Pressão 35

Capítulo 3 37
OBJETIVOS 37

3.1 Objetivos específicos 38

Capítulo 4 39
MATERIAIS E MÉTODOS 39

4.1 Materiais 39

4.2 Metodologia 40
4.2.1 Dosagem da água nos reagentes 40
4.2.2 Atividade Enzimática 40
4.2.3 Reações de síntese de estolides 41
4.2.4 Parâmetros estudados 42
4.2.4.1 Efeitos do tipo de lipase 42
4.2.4.2 Efeitos da razão molar dos reagentes 42
4.2.4.3 Efeitos do tipo de ácido graxo 43
4.2.4.4 Influência do tempo de reação 43
4.2.4.5 Efeitos da presença de água no meio reacional 43
4.2.4.6 Velocidade de agitação 45
4.2.4.7 Reação sob pressão 45
4.2.4.8 Efeitos da temperatura 46
4.2.4.9 Efeitos da concentração de biocatalisador 46
4.2.5 Reações empregando apenas um reagente 46
4.2.6 Análise dos resultados 46
4.2.7 Avaliação dos produtos por cromatografia em fase gasosa (CG) 47
4.2.7.1 Curva padrão do ácido oléico 48
4.2.8 Comparação dos resultados obtidos via índice de acidez e cromatografia em fase gasosa 48
4.2.9 Caracterização físico-química do produto 49
4.2.10 Reutilização da lipase comercial 51
Capítulo 5 52
RESULTADOS E DISCUSSÃO 52
5.1 Dosagem da água nos reagentes 52
5.2 Atividade enzimática 53
5.3 Efeitos do tipo de lipase 53
5.4 Efeitos da razão molar dos reagentes 54
5.5 Efeitos do tipo de ácido graxo 56
5.6 Influência do tempo de reação 57
5.7 Efeitos da concentração de água presente no meio 58
5.7.1 Efeitos da adição de água no meio reacional 58

5.7.2 Remoção da água do meio 59
5.7.2.1 Emprego de sistema reacional aberto 59
5.7.2.2 Emprego de peneira molecular 60
5.7.2.3 Emprego de vácuo 62
5.8 Velocidade de agitação 65
5.9 Reação sob pressão 66
5.10 Efeitos da temperatura 68
5.11 Efeitos da concentração de biocatalisador 70
5.12 Avaliação dos produtos obtidos por cromatografia em fase gasosa 72
5.12.1 Reações empregando apenas um reagente 72
5.12.1.1 Ácido oléico 72
5.12.1.2 Ricinoleato de metila 74
5.12.1.3 Ácido ricinoléico 76
5.12.2 Reações entre ácido oléico e ácido ricinoléico 77
5.12.3 Reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila 79
5.13 Caracterização físico-química do produto 84
5.14 Reutilização da lipase comercial 88
Capítulo 6 90
CONCLUSÕES 90
Capítulo 7 92
SUGESTÕES 92
Capítulo 8 93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 93

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Esquema de estolide derivado do ácido ricinoléico..... 12
Figura 2.2 Esquema de estolide derivado do ácido oléico..... 14
Figura 2.3 Mamoneira, seu fruto e sua semente..... 15
Figura 2.4 Estrutura química do ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi 9-octadecenóico)..... 16
Figura 2.5 Tríade catalítica de lipase..... 22
Figura 2.6 Estrutura da lipase de *Candida rugosa* obtida a partir de difração de raios-X..... 23
Figura 2.7 Mecanismo Ping-Pong Bi-Bi..... 24
Figura 2.8 Esquema de reação entre ácido octanóico e HAE..... 32
Figura 4.1 Sistema reacional..... 42
Figura 5.1 Efeitos do tipo de lipase na conversão dos ácidos oléico ou esteárico com ricinoleato de metila, após 48 horas, empregando razão molar dos reagentes (R=1), 6% (m/m) de enzima a 80℃ em reator batelada fechado.. 54
Figura 5.2 Efeitos da razão molar dos reagentes na reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila, empregando 6% (m/m) de lipase comercial a 80℃..... 55
Figura 5.3 Índice de acidez em função do tempo nas reações de condensação entre ácido oléico e ácido esteárico com ricinoleato de metila, empregando razão estequiométrica dos reagentes (R=1) e 6% (m/m) de lipase a 80℃..... 56
Figura 5.4 Influência do tempo de reação na conversão da reação dos ácidos oléico ou esteárico com ricinoleato de metila a 80℃, emprega ndo razão estequiométrica dos reagentes (R=1), 6% (m/m) de Novozym 435, em reator batelada fechado..... 57
Figura 5.5 Efeitos da adição de água na conversão dos ácidos oléico ou esteárico com ricinoleato de metila, após 48 horas, empregando razão molar dos reagentes (R=1), 6% (m/m) de enzima a 80℃ em reator batelada fechado.. 58
Figura 5.6 Efeito do emprego de reator aberto na conversão após 24 horas de reação entre ácido oléico ou ácido esteárico e ricinoleato de metila. Temperatura de 80℃, 6% (m/m) de Novozym 435 e razão estequiométrica dos reagentes (R=1)..... 60
Figura 5.7 Efeito do tempo de adição de peneira molecular na conversão após 48 horas de reação entre ácido oléico ou ácido esteárico e ricinoleato de metila, empregando reator fechado, 6% (m/m) de Novozym 435 e razão estequiométrica dos reagentes (R=1) a 80℃..... 61

Figura 5.8 Efeitos da quantidade de peneira molecular de 3Å adicionada após 6 horas na conversão após 48 horas de reação entre ácido oléico ou ácido esteárico e ricinoleato de metila empregando razão estequiométrica dos reagentes e 6% (m/m) de Novozym 435 a 80℃..... 62

Figura 5.9 Influência do emprego de vácuo na conversão após 48 horas de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila a 80℃, teor de lipase Novozym 435 de 6% (m/m) e razão estequiométrica dos reagentes, sob pressão de 0,45 mmHg a partir de t=0h ou t=6h..... 63

Figura 5.10 Conversões após 48 h na reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila com 500 mg de peneira molecular adicionada após 6 h ou vácuo de 0,45 mmHg ligado após 6 h de reação. Reações conduzidas a 80℃, com 6% (m/m) de Novozym 435 e razão estequiométrica dos reagentes..... 64

Figura 5.11 Influência da velocidade de agitação na conversão após 48 horas de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila, empregando teor de Novozym 435 de 6% (m/m), razão estequiométrica dos reagentes a 80℃ em micro reator de bancada com agitador do tipo hélice de impulsão..... 66

Figura 5.12 Influência do emprego de pressão na conversão após 48 horas de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila a 80℃, empregando 6% (m/m) de Novozym 435 e razão estequiométrica dos reagentes..... 67

Figura 5.13 Efeitos da temperatura na conversão após 24 horas de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila com razão estequiométrica dos reagentes e 6% (m/m) de Novozym 435..... 68

Figura 5.14. Efeito da presença de biocatalisador na redução do índice de acidez determinado nas reações conduzidas a 100℃, na razão estequiométrica dos reagentes, na ausência e na presença de 6% (m/m) de Novozym 435..... 70

Figura 5.15. Efeitos da concentração de Novozym 435 na reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 90ºC..... 71

Figura 5.16. Reação empregando ácido oléico como reagente..... 73

Figura 5.17 Perfis cromatográficos obtidos no início (0h) e após 48 horas na reação empregando ácido oléico a 80℃, teor de enzima de 6 % (m/m) e reator batelada fechado. 73

Figura 5.18. Perfis cromatográficos obtidos no início (0h) e após 48 horas na reação empregando ricinoleato de metila a 80℃, teor de enzima de 6% (m/m) e reator batelada fechado..... 75

Figura 5.19. Reação empregando ricinoleato de metila como reagente..... 76
Figura 5.20 Perfis cromatográficos obtidos no início (0h) e após 48 horas na reação empregando ácido ricinoléico a 80℃, teor de enzima de 6% (m/m) e reator batelada fechado..... 77
Figura 5.21. Perfis cromatográficos obtidos no início (0h) e após 48 horas na reação entre ácido ricinoléico e ácido oléico a 80℃, teor de enzima de 6% (m/m) razão molar igual a 1 e reator batelada fechado..... 78
Figura 5.22. Reação empregando ácido oléico e ácido ricinoléico..... 79
Figura 5.23. Perfis cromatográficos obtidos no início (0h), em 24, 48 e 72 horas na reação entre ricinoleato de metila e ácido oléico a 80℃, teor de enzima de 6% (m/m) razão molar igual a 1 e reator batelada fechado..... 80
Figura 5.24. Reação empregando ácido oléico e ricinoleato de metila..... 82
Figura 5.25. Comparação entre a redução no percentual de ácido oléico e o índice de acidez em 72 horas de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila, empregando 6% (m/m) de enzima e reator batelada fechado a 80℃... 83
Figura 5.26. Espectros de infravermelho do óleo básico neutro leve (azul) e do biolubrificante obtido na reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila (preto)..... 84
Figura 5.27 Reutilização da lipase comercial Novozym 435 nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila a 80℃, razão estequiométrica dos reagentes e teor de enzima de 6% (m/m)..... 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Efeitos do tamanho da cadeia e da posição hidroxila de uma cadeia de HFA na formação de produtos catalisada por lipase..... 31

Tabela 5.1 Propriedades físico-químicas do biolubrificante obtido na reação entre ricinoleato de metila e ácido oléico e de três lubrificantes derivados de petróleo..... 84

Tabela 5.2 Comparação dos resultados obtidos com dados da literatura..... 87

Tabela 5.3 Comparação entre as características do produto obtido com as de produtos comerciais..... 87

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AOCS – American Oil Chemists' Society

ASTM - American Society for Testing and Materials

AV - Acid value

CG – Cromatografia em fase gasosa

CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa

EN – Estolide number

HAE – Ésteres de ácidos graxos

HFA – Hydroxy fatty acid

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography

IA - Índice de acidez

NHA – Ácidos não hidroxilados

RPVOT – Rotating pressurized vessel oxidation test

TMP – Trimetilolpropano

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO

A substituição de triglicerídeos naturais para fins lubrificantes por derivados de petróleo teve início no século XIX devido ao maior custo dos óleos vegetais, a maior oferta de derivados de petróleo e às limitações de aplicação dos óleos vegetais devido a algumas de suas propriedades físicas. Os produtos petrolíferos que se tornaram mais baratos para produção e venda e que se oxidam menos têm dominado o mercado desde então. Essas fontes petrolíferas, no entanto, são limitadas e com previsão de esgotamento, além de muitas vezes não serem compatíveis com os padrões de qualidade definidos por considerações ambientais. O mercado mundial de lubrificantes é da ordem de 13 bilhões de galões por ano, dos quais se estima que cerca de 50% são descartados no meio ambiente. A iminência do esgotamento das reservas mundiais de petróleo e a crescente consciência do impacto ambiental do uso desta matéria-prima fóssil têm direcionado a pesquisa do

setor oleoquímico em diversas áreas, dentre as quais destaca-se a produção de óleos lubrificantes biodegradáveis.

Óleos vegetais e seus derivados têm recebido crescente interesse para serem utilizados como matérias-primas para a produção de lubrificantes biodegradáveis. No entanto, estes óleos são sensíveis ao estresse térmico-oxidativo e não apresentam boa performance em baixas temperaturas. Dessa forma, os biolubrificantes obtidos a partir de óleos vegetais devem superar sua instabilidade inerente devido à presença de resíduos de ácidos graxos insaturados no óleo natural para serem competitivos com produtos à base de óleos minerais. Uma melhoria destas propriedades pode ser atingida por modificações na cadeia carbônica dos ácidos graxos que compõem os óleos vegetais. Dentre as propriedades lubrificantes dos óleos avaliadas destacam-se: a viscosidade, o índice de viscosidade, o ponto de fluidez, o índice de acidez dentre outras. Para biolubrificantes, as estabilidades oxidativa, térmica e hidrolítica são essenciais devido à sua origem vegetal. Óleos que possam resistir à oxidação são menos prováveis de formarem depósitos, material escuro e sub-produtos corrosivos, e são menos susceptíveis a variações de viscosidade. Portanto, a maior parte das pesquisas de desenvolvimento de novos biolubrificantes está focada na obtenção de um biolubrificante resistente a oxidação e ao mesmo tempo biodegradável.

Estolides constituem uma nova classe de lubrificantes derivados de óleos vegetais com excelentes propriedades a baixas temperaturas, sendo o ponto de fluidez um dos melhores indicadores de tais propriedades. Estolide é o nome genérico de poliésteres lineares de ácidos graxos em que a carbonila funcional de um ácido graxo se liga ao sítio de insaturação de outro ácido graxo ou em que a hidroxila de um ácido graxo hidroxilado é esterificada pela carboxila de outra molécula de ácido graxo.

O processo convencional de produção de estolides por meio de reações de polimerização dos ácidos oléico ou ricinoléico a temperaturas de 205 a 210℃ sob vácuo de 700 mmHg em atmosfera de dióxido de carbono ou empregando ácidos fortes ($HClO_4$ or H_2SO_4) como catalisadores. Os produtos resultantes dessas reações, geralmente, precisam ser redestilados para remoção de impurezas geradas

via degradação térmica. Além disso, os processos homogêneos clássicos, por utilizarem catalisadores ácidos, acarretam em problemas de corrosão nos equipamentos e geram efluentes ácidos, que podem causar danos ambientais.

Como alternativa ao processo convencional, alguns pesquisadores têm estudado a síntese de estolides a partir de reações de esterificação catalisadas por lipases. A síntese de estolide empregando lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) previne a degradação dos reagentes e produtos e reduz o número de reações secundárias uma vez que essas enzimas atuam em condições reacionais brandas e possuem alta especificidade.

Este trabalho se insere na área de processos enzimáticos de síntese de estolides para uso como lubrificantes e visa contribuir para o desenvolvimento de novos processos para a produção de lubrificantes biodegradáveis. Desse modo, o objetivo desta dissertação foi investigar a síntese enzimática de estolides a partir de reações entre ricinoleato de metila (biodiesel de mamona) e os ácidos oléico e esteárico utilizando lipases imobilizadas comerciais em meio sem solvente. A escolha do ricinoleato de metila como reagente para a obtenção de estolides deve-se ao existente e desenvolvido programa de produção de biodiesel a partir do óleo de mamona no país visando o incentivo para obtenção de biodiesel a partir de oleaginosas de agricultura familiar. Entretanto, algumas propriedades desse combustível, como sua alta viscosidade e higroscopicidade têm acarretado em dificuldades de implementação desse biodiesel na matriz energética brasileira. Desta forma, o aproveitamento desse éster em reações de condensação catalisadas por lipases representa uma rota alternativa de utilização desse produto para obtenção de um lubrificante biodegradável (estolide) a partir de uma tecnologia ambientalmente compatível.

Capítulo 2

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Óleos lubrificantes

Óleos lubrificantes são líquidos que ficam interpostos entre duas partes formando uma película que evita o contato direto entre as superfícies metálicas evitando o atrito e, conseqüentemente, o desgaste e a geração de calor (http://www.ibp.org.br; http://www.renewablelubricants.com). Os lubrificantes líquidos podem ser de origem mineral, vegetal, animal ou sintética. Atualmente, os óleos básicos, obtidos pelo processamento do petróleo, são os principais constituintes de óleos lubrificantes e podem ser classificados em minerais e sintéticos.

O processo de produção de óleos básicos minerais para aplicação como lubrificantes inclui a separação das diferentes frações do óleo por destilação e refino do petróleo. No processo de extração dos óleos básicos, as frações destiladas passam por unidades de processamento para remoção de compostos indesejáveis como aromáticos e compostos contendo heteroátomos como nitrogênio e enxofre,

onde são obtidos lubrificantes com determinadas faixas de viscosidade. Os resíduos provenientes da destilação são tratados para a obtenção de lubrificantes de maior viscosidade. Dessa forma, os óleos lubrificantes básicos minerais podem ser classificados em destilados e residuais. A combinação desta classificação com a estrutura molecular do óleo permite agrupar os óleos básicos minerais em parafínicos, naftênicos e aromáticos (http://www.ibp.org.br).

Os óleos básicos sintéticos são produzidos a partir de reações químicas com o objetivo de se obter propriedades adequadas às funções lubrificantes. Dentre estes lubrificantes destacam-se as polialfaolefinas, os ésteres sintéticos e os poliglicóis. Óleos básicos sintéticos possuem como principais vantagens maiores estabilidades térmica e oxidativa (SILVA, 2006). No entanto, esses lubrificantes são mais caros em relação aos óleos minerais.

A especificação do óleo básico é obtida por meio de um conjunto de análises laboratoriais denominado análise típica, que determina as características do óleo. A partir da especificação é possível padronizar os óleos a fim de que os lubrificantes produzidos a partir dos mesmos apresentem uniformidade em termos de aparência e tenham suas características variando dentro de limites definidos. Além da especificação, os óleos também são analisados para a determinação de seu desempenho, que se refere ao comportamento do lubrificante em uma dada aplicação, ou seja, sua capacidade de reduzir atrito, resistir à oxidação, minimizar a formação de depósitos e espuma e de impedir a corrosão e o desgaste (SILVA, 2006).

Na maior parte das vezes o melhor desempenho dos óleos é obtido com o emprego de aditivos que têm como objetivo reforçar ou conferir ao óleo básico as características necessárias à lubrificação. Os principais aditivos são: antioxidantes, anti-corrosivos, anti-desgastes, anti-ferruginosos, anti-espumantes, depressores de ponto de fluidez e melhoradores do índice de viscosidade.

2.1.1 Propriedades dos lubrificantes

As principais propriedades dos óleos lubrificantes, e que constituem requisitos para seu bom desempenho são:

Viscosidade: É a resistência do fluido ao escoamento, que é função da força necessária para haver deslizamento entre as camadas individuais do fluido. Lubrificantes são produzidos para atender a uma larga gama de viscosidades podendo ser classificados em leves, médios e pesados (http://www.renewablelubricants.com). A viscosidade diminui com o aumento da temperatura e, portanto, para manter uma película lubrificante, quanto maior a temperatura, maior deverá ser a viscosidade. O método mais utilizado para a medição da viscosidade é o método cinemático. O viscosímetro cinemático é constituído de um tubo capilar onde ocorre o escoamento do óleo (http://www.oilbrasil.com.br). A viscosidade cinemática é expressa em centistokes (cSt) e é convencionalmente obtida em duas temperaturas padrão: 40ºC e 100ºC (http://www.renewablelubricants.com; http://www.laboroil.com.br/internet_afq.php).

Índice de Viscosidade: É uma escala arbitrária de numeração que indica as mudanças na viscosidade do óleo em função da variação da temperatura (http://www.renewablelubricants.com). É determinado a partir da medição da viscosidade cinemática a duas temperaturas diferentes. Um alto índice de viscosidade denota que o fluido possui pouca mudança de viscosidade em uma grande variação de temperatura (ISBELL *et al*., 2001). Essa propriedade é determinada em geral pelo método ASTM D2270 (http://www.ibp.org.br).

Ponto de Fulgor: É a menor temperatura na qual os vapores do produto inflamam-se na presença de uma chama. A determinação dessa propriedade tem importância sob o ponto de vista da segurança, uma vez que temperaturas acima do ponto de fulgor podem representar condição favorável à ocorrência de incêndios e explosões. É também um teste indicativo de contaminação por combustível em óleos de motores de combustão interna (http://www.ibp.org.br; http://www. laboroil. com. br /internet _afq.php).

Ponto de Fuidez: É a menor temperatura na qual o óleo flui livremente sob condições pré-estabelecidas em laboratório. Vários fatores, como a origem do óleo cru e o processo de fabricação, interferem no valor do ponto de fluidez. Essa propriedade possui grande importância principalmente quando há a possibilidade do lubrificante ser usado em climas frios e em óleos para máquinas de sistemas de refrigeração. Nesse caso, lubrificantes com baixo ponto de fluidez são desejáveis para garantir o escoamento do produto, impedindo danos ao equipamento (http://www.ibp.org.br; http://www.laboroil.com.br/internet_afq.php).

Ponto de névoa: É a temperatura em que os sólidos dissolvidos no óleo, como a parafina, começam a se formar e se separar do fluido. Alguns óleos devem ser mantidos a temperaturas acima do ponto névoa para evitar o entupimento de filtros (http://www.renewablelubricants.com).

Cinzas: O teor de cinzas está relacionado à quantidade de materiais não combustíveis que podem estar presentes no lubrificante. Esses materiais são provenientes geralmente de soluções de aditivos metálicos que não são completamente queimados. O percentual de cinzas de um óleo queimado fornece uma indicação da quantidade de aditivo metálico e contaminação por sólidos não combustíveis (http://www.ibp.org.br).

Acidez: A acidez de um óleo geralmente é expressa em termos de índice de acidez (quantidade de hidróxido de potássio (mg) necessária para neutralizar os componentes ácidos presentes em 1g de óleo). O ponto de neutralização da amostra é detectado pela mudança de sua coloração (método colorimétrico ASTM D974) ou pela leitura do pH (método eletrométrico ASTM D664). Em óleos novos, o índice de acidez é utilizado no controle da qualidade de fabricação. Em óleos usados, o aumento da acidez ocorre devido contaminação externa ou processo de oxidação acelerado (http://www.oilbrasil.com.br). Assim, o índice de acidez (IA) de uma amostra de óleo é indicativo da idade do fluido e pode ser usado para determinar quando o óleo deve ser trocado (http://www.renewablelubricants.com). São desejáveis valores inferiores a 0,5 mg KOH/g, uma vez que valores elevados de IA contribuem para aumentar efeitos de corrosão (SILVA, 2006).

Corrosivisidade: Os lubrificantes não devem ser corrosivos. Alguns lubrificantes contêm aditivos à base de cloro, enxofre e sais orgânicos que podem atacar os metais, principalmente as ligas de cobre. Por isso, o teste mais utilizado para a determinação da corrosividade é o ASTM 130 (Corrosão em Lâmina de Cobre). Neste teste, uma lâmina de cobre é colocada em banho no óleo a ser testado por 3 horas à temperatura de 100ºC. Esta lâmina é então removida, lavada e comparada com os padrões ASTM (de 1a - ausência de manchamento até a 4c - corrosão) (http://www.oilbrasil.com.br).

Demulsibilidade: É o tempo necessário para que ocorra completa separação de óleo/água (http://www.laboroil.com.br/internet_afq.php). Esta propriedade é muito importante em óleos de turbina e em sistemas nos quais o óleo terá contato com a água, pois esse contato pode acarretar em perda da capacidade de lubrificação devido à formação de emulsão e coleta de poeira, areia e sujeira que podem prejudicar a operação de válvulas e bombas, aumentar o desgaste e promover a oxidação do líquido (http://www.renewablelubricants.com).

Estabilidade à oxidação: Lubrificantes devem possuir estabilidade e resistência à oxidação. As reações químicas do óleo com o oxigênio resultam na formação de ácidos orgânicos que aumentam a viscosidade do fluido e podem causar corrosão. A estabilidade a oxidação é o principal fator determinante do período de vida útil de um lubrificante (http://www.oilbrasil.com.br). Os contribuintes mais significativos para a oxidação incluem temperatura, pressão, contaminantes, água e agitação (http://www.renewablelubricants.com). Em geral, pequenas quantidades de antioxidantes são utilizadas em formulações de óleos minerais. No entanto, óleos vegetais, por serem insaturados, tendem a ser mais susceptíveis à oxidação, sendo necessárias maiores quantidades desses aditivos (1 a 5%) (SILVA, 2006). Os ensaios para a determinação da tendência do óleo de se oxidar submetem o lubrificante a altas temperaturas na presença de oxigênio puro sob pressão.

2.2 Biolubrificantes

Em 2008, o mercado mundial de lubrificantes foi da ordem de 13 bilhões de galões, dos quais cerca de 50% foram perdidos para o meio ambiente por meio de evaporação, vazamentos e eliminação inadequada, contaminando solos e águas subterrâneas (BREMMER e PLONSKER, 2008).

Além de motosserras e máquinas agrícolas, outros equipamentos que utilizam lubrificantes podem causar degradação do meio ambiente através da liberação de óleo não queimado e gás de exaustão. Quando motores náuticos são utilizados em rios, lagos e oceanos, o óleo não queimado quando liberado pode acarretar em poluição das águas. Esses lubrificantes derivados de petróleo, por não serem facilmente degradados, representam perigo para o ambiente quando são liberados.

O aumento das restrições ambientais aliado a fatores como, a disponibilidade limitada dos recursos fósseis, o desenvolvimento de políticas de mitigação das alterações climáticas e a mudança no perfil do consumidor devido à consciência da necessidade de sustentabilidade, acarretam na urgência de substituição de derivados de petróleo por produtos atóxicos derivados de fontes vegetais (BREMMER e PLONSKER, 2008; REPORT OF THE TASKFORCE ON BIO-BASED PRODUCTS, 2007). Nesse cenário, a preocupação mundial com a produção de fluidos capazes de se degradarem em curtos períodos de tempo vem se tornando uma das principais prioridades do setor oleoquímico.

O termo biolubrificante refere-se ao lubrificante que é biodegradável, ou seja, que possui capacidade comprovada de ser decomposto, em um intervalo de até 1 ano, por processos biológicos naturais em solos carbonosos atóxicos, água, dióxido de carbono ou metano (SILVA, 2006; http://www.renewablelubricants.com). A biodegradação ocorre por meio de reações físicas e químicas com a biota, onde compostos orgânicos mais reduzidos que CO_2 são atacados por enzimas microbianas, desde que possuam semelhança estrutural com os substratos naturais. De maneira geral os lubrificantes podem classificados em facilmente biodegradáveis, inerentemente biodegradáveis (20 a 70% degradados em 28 dias) e não-biodegradáveis (http://www.renewablelubricants.com).

Alguns lubrificantes biodegradáveis são baseados em óleos vegetais puros não modificados, como triglicerídeos naturais. No entanto, a aplicação direta dos óleos vegetais como lubrificantes é limitada por algumas de suas propriedades físicas, principalmente, sua elevada viscosidade e baixa estabilidade térmica, hidrolítica e oxidativa (CERMAK *et al*., 2006). A baixa estabilidade térmica e oxidativa dos óleos vegetais se deve à presença de insaturações na parte do ácido graxo e ao grupo β-CH no componente alcoólico (ISBELL *et al*., 2006; SILVA, 2006). As duplas ligações são propícias a sofrerem oxidação pelo oxigênio presente no ar. Quanto maior a temperatura, mais reativas são as moléculas, propiciando oxidação e, consequentemente, a deterioração do lubrificante (PALULIAN, 2003). Já o átomo de hidrogênio β é facilmente eliminado da estrutura da molécula levando a quebra do éster em olefinas e ácidos (SILVA, 2006). Além disso, em baixas temperaturas, as moléculas formam grumos e se cristalizam, levando a um aumento da viscosidade.

Estas desvantagens podem ser superadas com o uso de aditivos. Entretanto, a utilização de aditivos acarreta na redução da biodegradabilidade e no aumento da toxicidade e do preço do produto final (CERMAK *et al*., 2008). Os problemas relacionados à presença de poli-insaturações nos óleos vegetais podem ser reduzidos por modificações nas moléculas do óleo, como a alquilação, acilação, hidrogenação, oligomerização (polimerização), epoxidação, microemulsão, pirólise e reação de transesterificação com álcoois de cadeia curta (BREMMER e PLONSKER, 2008; FAGUNDES *et al*., 2004). Como exemplo tem-se os ésteres sintéticos derivados de matéria-prima de origem vegetal, como trimetilolpropano (TMP) e trioleato, que são similares em termos de estrutura química aos triglicerídeos naturais e melhoram significativamente as propriedades físico-químicas em baixas temperaturas das matérias-primas biodegradáveis. Assim, os óleos vegetais naturais podem ser tratados para produzir produtos modificados, que ainda são biodegradáveis e renováveis. Entretanto, os derivados de ésteres sintéticos são de duas a seis vezes mais caros que os óleos vegetais, o que limita sua aplicação (ISBELL *et al*., 2001).

Apesar da melhoria no desempenho dos biolubrificantes, o mercado para esses produtos tem se desenvolvido lentamente devido à falta de pressões

regulatórias e ao preço, uma vez que biolubrificantes podem custar até oito vezes mais do que os óleos convencionais (http://www.funcap.ce.gov.br/ceara-sedia-unidade-de-pesquisa-em-biolubrificantes-da-petrobras). Atualmente, o uso de biolubrificantes representa apenas uma pequena parte da quantidade total dos lubrificantes utilizados no mundo (BREMMER e PLONSKER, 2008). Em 2007, a produção de biolubrificantes correspondeu a 2% do total (100.000 toneladas de 5 milhões de toneladas), principalmente no setor hidráulico (REPORT OF THE TASKFORCE ON BIO-BASED PRODUCTS, 2007). Nos Estados Unidos até pouco tempo atrás se observava pouco ou nenhum incentivo para substituição de lubrificantes à base de óleo mineral por lubrificantes derivados de óleos vegetais. Entretanto, conforme exigido pelo artigo “Farm Bill” de maio de 2002 e legislações posteriores, o país adotou incentivos com o objetivo de priorizar a escolha e utilização de produtos renováveis no lugar de produtos à base de petróleo, quando razoavelmente competitivos e adequados para a aplicação. Atualmente, biolubrificantes são empregados em diversos setores, desde os elevadores da Estátua da Liberdade até hidrelétricas canadenses. Acredita-se que a área de biolubrificantes irá crescer mais rapidamente nos próximos anos à frente do que foi observado anteriormente (BREMMER e PLONSKER, 2008).

Já na Europa, as pressões ambientais e o volume de informações disponíveis para a substituição de derivados de petróleo por óleos renováveis e biodegradáveis são maiores. O uso estimado de biolubrificantes em 2006 na União Européia foi de 127 mil toneladas, ou cerca de 40 milhões de galões (BREMMER e PLONSKER, 2008). O crescimento foi estimado em 3,7% ao ano entre 2000 e 2006. Esse fato se deve ao maior nível de conscientização ambiental existente no continente, onde a utilização de biolubrificantes pode ser observada há mais de 20 anos. Na Alemanha estima-se que o mercado de biolubrificantes ocupe cerca de 15% do total. Os escandinavos respondem por cerca de 11% e outros países, como França, Espanha e Reino Unido possuem mercados inferiores a 1% (BREMMER e PLONSKER, 2008). Em alguns locais da Europa, embarcações de água doce não podem usar lubrificantes que não sejam biodegradáveis porque a água potável, hoje é uma commodity (mercadoria) cada vez mais valorizada.

2.3 Estolides

Estolide é o nome genérico para oligômeros lineares (poliésteres) de ácidos graxos onde a carbonila funcional de um ácido graxo se liga ao sítio de insaturação de outro ácido graxo ou em que a hidroxila de um ácido graxo hidroxilado (HFA) é esterificada pela carboxila de outra molécula de ácido graxo (CERMAK e ISBELL, 2002; BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2005). O número de estolide (EN) é definido como o número de moléculas de ácidos graxos adicionadas ao ácido graxo base (EN = n+1) e representa a extensão da oligomerização. Estolides também podem ser convertidos em ésteres de estolides pela reação da carboxila terminal com um álcool (CERMAK *et al*., 2008).

A Figura 2.1 representa um esquema de uma molécula de estolide derivada do ácido ricinoléico (C18:1, OH).

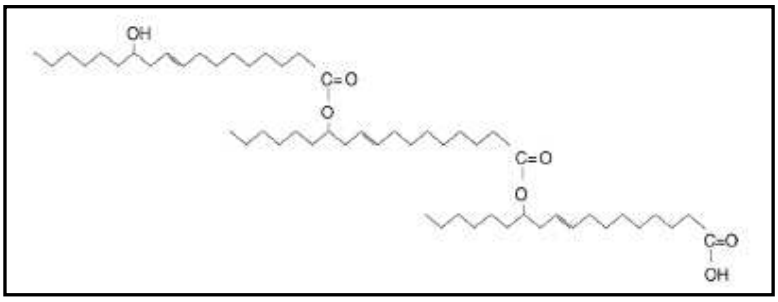


Figura 2.1 Esquema de estolide derivado do ácido ricinoléico.
Fonte: BÓDALO-SANTOYO *et al*. (2005)

Estudos têm observado grande potencial dos estolides derivados de ácidos graxos (ex. ácido ricinoléico) em aplicações específicas devido aos seus altos índices de viscosidade e biodegradabilidade, podendo ser empregados como plasticidas, aditivos em cosméticos, componentes de tintas, controladores de viscosidade em chocolates e emulsificantes em margarinas e como resinas de revestimento no processamento de metais (BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2005; HAYES e KLEIMAN, 1995; YOSHIDA *et al*., 1997; PELÁEZ *et al.,* 2003).

Estolides e ésteres de estolides também representam uma alternativa como biolubrificantes obtidos a partir de óleos vegetais, podendo ser empregados para ajudar na redução e eliminação dos problemas comuns associados à utilização de óleos vegetais não modificados como lubrificantes (CERMAK e ISBELL, 2002). Eles

podem ser produzidos a partir de uma série de óleos vegetais como: “meadowfoam” (planta dos prados), mamona e “cuphea” (sete-sangrias) e de ácidos graxos como ácido oléico (ZERKOWSKI *et al*., 2008). Estolides apresentam excelente lubricidade e biodegradabilidade, baixos pontos de fluidez, boa estabilidade oxidativa e, freqüentemente, superam a performance de produtos comercialmente disponíveis como fluidos hidráulicos derivados de petróleo e fluidos derivados de óleo de soja (CERMAK e ISBELL, 2003; CERMAK e ISBELL, 2004; CERMAK e ISBELL, 2009). Além disso, as ligações ésteres secundárias dos estolides são mais resistentes à hidrólise do que as ligações presentes nos triglicerídeos de óleos vegetais. Esse aspecto estrutural da molécula de estolide resulta em propriedades superiores a baixas temperaturas, além das propriedades já inerentes da molécula de ácido graxo (ISBELL *et al*., 2001).

A patente US 6,316,649 descreve um processo para a síntese de ésteres de estolides a partir da reação entre ácido oléico e ácidos graxos saturados com 6 a 18 átomos de carbono e posterior reação com 2-etil-hexanol, empregando como catalisador o ácido perclórico. Os ésteres de estolides obtidos apresentaram boa estabilidade oxidativa, boas propriedades viscosimétricas (viscosidade e índice de viscosidade), baixo ponto de fluidez e boa degradabilidade (CERMAK e ISBELL, 2001).

Com relação à biodegradabilidade, foi observado que estolides derivados de ácido oléico foram degradados em quantidades superiores a 90%, enquanto estolides de meadowfoam (planta dos prados) e ácido erúcico foram degradados mais lentamente, em quantidades superiores a 75 e 80%, após 30 dias, respectivamante (ERHAN e KLEIMAN, 1997).

Na natureza, estolides podem ser encontrados em pequenas quantidades, na forma de tetraglicerídeos, em diversas sementes de plantas da família Cruciferae ou Brassicaceae (famílias do repolho, couve-flor, nabo, agrião e da mostarda) nos gêneros *Heliophila* e *Lesquerella*. O óleo de Cruciferae possui elevada quantidade de ácido lesquerólico (ácido 14-hidroxi-cis-11-eicosanóico), enquanto o óleo de Brassicaceae apresenta elevada quantidade dos ácidos: densipólico (ácido 15-hidroxi-9,15-octadecadienóico), auricólico (ácido 14-hidroxi-11,17-eicosadienóico) e lesquerólico. Os principais monômeros descritos na literatura como componentes de

estolides são os ácidos graxos hidroxilados ricinoléico (12-hidroxi-9-cis-octadecenóico, 18:19-OH12) e 12-hidroxi esteárico (PELÁEZ *et al*., 2003).

Em laboratório, estolides foram primeiramente sintetizados pela condensação do ácido oléico (processo de homopolimerização), empregando-se altas pressões e temperaturas (200ºC) ou catalisadores ácidos (PELÁEZ *et al*., 2003). A Figura 2.2 apresenta um esquema desses estolides derivados de ácido oléico.

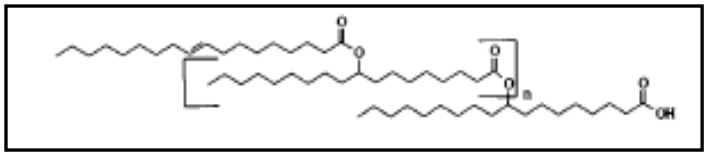


Figura 2.2 Esquema de estolide derivado do ácido oléico.
Fonte: ISBELL *et al*. (1997)

Além do processo de homopolimerização, uma outra classe de estolides pode ser sintetizada a partir de um processo denominado de capeamento. No capeamento o processo de oligomerização é finalizado pela adição de um ácido graxo saturado ao meio reacional. O ácido graxo saturado, ao reagir com a dupla ligação de um ácido insaturado como o ácido oléico faz com que não haja mais sítios adicionais para que a oligomerização prossiga. Desse modo, a síntese é finalizada nesse ponto, não havendo mais introdução de novas moléculas de ácidos graxos e o estolide é denominado como capeado (CERMAK *et al*., 2008).

A adição de um ácido graxo saturado que age como agente de capeamento, diminui o número de insaturações na molécula melhorando sua estabilidade oxidativa. No entanto, os pontos de fluidez e de névoa são negativamente afetados o que diminui a performance do lubrificante em baixas temperaturas (CERMAK e ISBELL, 2002). A performance em baixas temperaturas é uma característica que deve ser levada em consideração para determinadas aplicações do estolide. Logo, a escolha do material de capeamento é importante para se obter estolides com as características desejadas (CERMAK e ISBELL, 2001).

A maior parte dos trabalhos reportados na literatura relacionados à síntese de estolides utiliza como substrato o ácido oléico que é polimerizado via emprego de catalisadores químicos convencionais. A utilização de lipases visando à obtenção desses produtos possui ainda poucos trabalhos relatados, nos quais o ácido

ricinoléico (presente no óleo de mamona) é na maior parte das vezes o reagente de partida empregado.

No Brasil, o programa de incentivo para obtenção de biodiesel a partir de oleaginosas de agricultura familiar, tem proporcionado um aumento na produção do óleo de mamona, bem como do biodiesel obtido a partir do mesmo (pricipalmente o ricinoleato de metila). Entretanto, algumas propriedades desse combustível, como sua alta viscosidade e higroscopicidade acarretam em dificuldades de implementação desse biodiesel na matriz energética brasileira. Desta forma, o aproveitamento desse éster em reações de condensação catalisadas por lipases representa uma rota alternativa de utilização desse produto para obtenção de um lubrificante biodegradável (estolide) a partir de uma tecnologia ambientalmente compatível.

2.4 Biodiesel de mamona

A mamona (*Ricinus communis* L.) é um arbusto de origem afro-asiática com elevada capacidade de resistência à seca, pertencente à família Euphorbiaceae e encontrada em todo o território nacional (SCHOLZ e SILVA, 2008).

Figura 2.3 Mamoneira, seu fruto e sua semente.

A importância da cultura da mamoneira deve-se à grande aplicabilidade de seu óleo (45 a 50% da baga), constituído por cerca de 90% de ácido ricinoléico (MAPA 2009; SCHNEIDER *et al*., 2004). Esse ácido graxo possui três grupamentos químicos sujeitos a modificações: a hidroxila (C12), a dupla ligação (C=C) no carbono 9 e a carboxila ácida, fornecendo uma grande variedade de derivados (SCHNEIDER *et al*., 2004). A Figura 2.4 ilustra a estrutura química do ácido ricinoléico.

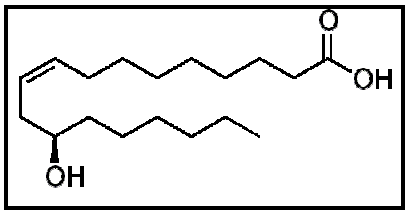


Figura 2.4. Estrutura química do ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxi 9-octadecenóico).

Hoje o Brasil ocupa a terceira posição como maior produtor mundial de mamona, permanecendo atrás apenas da Índia e da China que ocupam o primeiro e segundo lugar na produção mundial, respectivamente. O Brasil conta com capacidade instalada de esmagamento de cerca de 160 mil toneladas/ano, de bagas nas principais empresas, considerando 200 dias úteis de processamento. A produção da safra 2008/2009 foi de 765 kg/ha o que equivale a 133 mil toneladas (MAPA, 2009; MACEDO, 2006). Na Bahia essa lavoura possui maior representação econômica com cerca de 72% do total produzido no país (MACEDO, 2006).

A cultura de mamona, que passou por um período de decadência na década de 90, vem apresentando sinais de recuperação devido ao lançamento de programas visando incentivar e aperfeiçoar a produção de biodiesel, priorizando oleaginosas que propiciem maior emprego de mão-de-obra e insira regiões que estejam à margem do processo de desenvolvimento econômico do país. O cultivo da mamona no semi-árido é uma tentativa de sustentabilidade e de inclusão social através da agricultura familiar, criando melhores condições de vida em regiões carentes.

Nesse contexto, a mamona está incluída no Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) elaborado pelo Governo Federal que, por meio da lei federal 11.097/2005, autorizou a adição de 2% de combustíveis derivados de óleos vegetais ao diesel obtido a partir do petróleo em 2008, e a elevação desse porcentual para 5% até 2012 (LÉLES, 2008). A principal rota de síntese do biodiesel de mamona é a transesterificação do óleo com alcoóis de cadeia curta (metanol e etanol) sendo obtidos ésteres metílicos ou etílicos (principalmente ésteres de ácido ricinoléico).

2.5 Síntese de estolides

2.5.1 Via química

A rota mais empregada para a síntese de estolides é a partir de reações de homopolimerização do ácido oléico, ácido ricinoléico e ácido 12-hidroxiesteárico sob altas temperaturas ou utilizando catálise ácida mineral (BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2008; CERMAK e ISBELL, 2004; ISBELL *et al*., 2006; CERMAK *et al*., 2006).

A síntese de estolides de ácido oléico empregando catalisadores ácidos minerais acarreta em maiores rendimentos e em produtos com boas propriedades físicas (CERMAK e ISBELL, 2002). A catálise com ácido sulfúrico promove rendimento de 60% após 6 horas de reação. A utilização de ácido perclórico como catalisador promove elevados rendimentos em estolides (75%), mesmo em tempos curtos de reação (2 horas) (ISBELL *et al*., 1997). No entanto, o ácido perclórico é mais corrosivo e mais caro que o ácido sulfúrico (YOSHIDA *et al*., 1997). Argilas também podem ser empregadas na síntese de estolides, porém promovem baixos rendimentos (HARRY-O KURU *et al*., 2001).

Isbell e colaboradores (1997) estudaram a síntese de estolides a partir de ácido oléico comercial (70,5%) empregando ácido sulfúrico como catalisador. Os autores obtiveram melhores rendimentos (75%) com 5% (v/v) de catalisador a 55ºC após 1500 minutos. Temperaturas acima de 55℃ resultaram em baixos rendimentos em estolides devido à formação de lactonas. As lactonas são formadas a partir de uma ciclização intramolecular do grupo carboxila de um ácido graxo com um carbocátion localizado nas posições 4 ou 5 da cadeia de ácido graxo em meio ácido (CERMAK e ISBELL, 2001).

Cermak e Isbell (2001) estudaram a síntese de estolides derivados do ácido oléico utilizando ácido perclórico como catalisador. Os autores avaliaram os efeitos do capeamento do estolide com diferentes ácidos graxos saturados, desde ácido butírico (C4) até esteárico (C18). Os rendimentos variaram de 45% (empregando ácido esteárico a 55℃) a 65% (empregando ácido decanóico a 45℃). Entretanto, a 55℃, lactonas foram os principais produtos secundários.

Em trabalho posterior, Cermak e Isbell (2004) sintetizaram estolides e ésteres de estolides derivados de ácido oléico e óleo de cuphea (sete-sangrias), composto principalmente por ácido decanóico, com ácido perclórico como catalisador a 60ºC,

em meio sem solvente e sob vácuo. O ácido decanóico presente no óleo de cuphea agiu como reagente de capeamento dos estolides derivados do ácido oléico. Os autores observaram que o aumento na quantidade de catalisador acarretou no aumento do número de estolide (EN) e no rendimento após 24 horas de reação. No entanto, o aumento de EN acarretou em aumento dos pontos de fluidez e de névoa, bem como aumento da viscosidade a 40 e 100℃.

Harry O-Kuru e colaboradores (2001) estudaram a síntese de estolides a partir de ácido oléico, a 45℃ utilizando ácido per clórico como catalisador. Os estolides foram esterificados com diferentes álcoois para gerar ésteres de estolides. Os ésteres de estolides apresentaram cor clara com os pontos de fluidez de -32,8 a -12,8℃ e valores de viscosidade de 89,2 a 119,2 cS t, apropriados para diversas aplicações.

Com o objetivo de sintetizarem um lubrificante de origem vegetal com melhores propriedades de ponto de fluidez, ponto de fusão e viscosidade, Isbell e colaboradores (2001) realizaram sínteses de estolides e ésteres de estolides derivados dos ácidos graxos presentes nos óleos de meadowfoam (planta dos prados), crambe (couve-marinha) e do ácido oléico. Os estolides foram sintetizados empregando ácido perclórico como catalisador. A esterificação dos estolides promoveu redução da viscosidade. Estolides de ácido oléico esterificados com os álcoois 2-etilhexanol e isopropanol apresentaram baixos pontos de fusão (-34 e -32ºC, respectivamente). Os pontos de fluidez diminuíram drasticamente com a redução dos valores de EN, tanto para os estolides quanto para os ésteres de estolides e a viscosidade aumentou com o aumento da oligomerização.

Cermak e Isbell (2002) sintetizaram estolides a partir do ácido oléico e de ácidos graxos saturados, desde butírico até esteárico, com ácido perclórico como catalisador. Foram sintetizados dímeros e tetrâmeros de ácidos graxos e os rendimentos variaram de 45 a 65%. As menores cadeias de ácidos graxos (butírico e hexanóico) forneceram estolides com maior grau de oligomerização. Quando o tamanho da cadeia do ácido graxo saturado aumentou de C4 a C10, o ponto de fluidez dos ésteres de estolides diminuiu para -39ºC, enquanto que quando o tamanho da cadeia aumentou para C18 o ponto de fluidez aumentou para -15ºC. O índice de viscosidade variou de 122 a 155 para os estolides e de 172 a 196 para estolides esterificados com 2-etil hexanol. Os ésteres de estolides apresentaram

propriedades em baixas temperaturas superiores aos derivados de óleo de soja e aos fluidos derivados de petróleo, sendo os pontos de fluidez e névoa de -36 e -41℃, respectivamente.

2.5.2 Via enzimática

A maior parte dos trabalhos relacionados à síntese de estolides utiliza catalisadores ácidos minerais como ácido sulfúrico e ácido perclórico, ou altas temperaturas (200ºC) e pressões elevadas.

Entretanto, além dos problemas de corrosão e geração de efluentes ácidos, o processo químico convencional de síntese de estolides apresenta problemas de coloração e odor do produto final, devido às altas temperaturas empregadas (BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2005; BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2009). A utilização de condições ácidas severas também pode levar a clivagem de muitos grupos funcionais presentes na molécula de estolide (HAYES e KLEIMAN, 1995; ZERKOWSKI *et al*., 2008). O uso de ácido sulfúrico como catalisador pode levar à formação de subprodutos sulfonados que se decompõem ao longo do tempo, liberando grupamentos sulfonados ácidos que diminuem o pH da solução de estolide, prejudicando o funcionamento do fluido (CERMAK e ISBELL, 2001).

A utilização de biocatalisadores como as lipases para a obtenção de estolides representa uma alternativa em relação aos métodos químicos convencionais. Devido à alta especificidade das lipases, quase não são formados produtos secundários, o que reduz consideravelmente a quantidade de efluentes industriais gerados. Além disso, o emprego de biocatalisadores reduz o consumo de energia do processo pelo fato das lipases atuarem em condições reacionais brandas (de temperatura, pH e pressão) (KOSKINEN e KLIBANOV, 1996). O emprego de lipases imobilizadas também permite a recuperação e posterior reutilização do catalisador.

2.5.2.1 Lipases

Lipases (triacilglicerol éster hidrolases - EC 3.1.1.3) são enzimas que possuem como função natural a hidrólise de ésteres, especialmente triglicerídeos de cadeia longa, produzindo ácidos graxos livres, di- e monoglicerídeos e glicerol. No

entanto, em condições micro-aquosas, também podem atuar como catalisadores da reação reversa (reação de esterificação). A combinação da ampla variedade de substratos e alta seletividade faz das lipases catalisadores ideais para sínteses orgânicas (BORNSCHEUER e KASLAUSKAS, 1999).

Lipases encontram-se no grupo de enzimas mais amplamente empregado no setor de tecnologia enzimática, pois reconhecem uma ampla variedade de substratos e podem catalisar diferentes reações como hidrólise, síntese de ésteres, alcoólise, aminólise, peroxidações, epoxidações e interesterificações (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Essas enzimas constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para a síntese de biopolímeros, biodiesel, resolução de misturas racêmicas, transesterificações, síntese de peptídeos, produção de fármacos enantiomericamente puros, agroquímicos e aromatizantes (FORESTI *et al*., 2008; HASAN *et al*., 2006).

- **Fontes**

As lipases são amplamente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de animais, vegetais e microrganismos (CASTRO *et al*., 2004). As enzimas de origem microbiana são mais estáveis em relação às enzimas de origem animal e vegetal. Além disso, a versatilidade de suas propriedades, no que se refere à capacidade catalítica, especificidade e facilidade de produção, faz com que lipases microbianas constituam um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica (HASAN *et al*., 2006). Atualmente, lipases microbianas são produzidas por processos fermentativos por diversas indústrias, como Novozymes, Amano, Gist Brocades, entre outras (CASTRO *et al*., 2004).

- **Propriedades físico-químicas**

A massa molecular das lipases pode variar de 20 a 75 kDa, dependendo da fonte. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40℃. A estabilidade térmica de uma lipase varia

consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (CASTRO *et al*., 2004). Quando imobilizadas, podem ser submetidas a condições industriais típicas, em reatores com temperaturas superiores a 70℃ por longos períodos de tempo (HASAN *et al*., 2006).

Com relação ao potencial iônico do meio, essas enzimas atuam em uma ampla faixa de pH, entre 5 e 9, o que proporciona maior estabilidade em diferentes meios reacionais. Valores de pH muito extremos podem fazer com que substratos não consigam se ligar a lipase, ou podem inibir as reações químicas necessárias para a transformação dos substratos em produtos (PAIVA *et al*., 2000).

Cabe ressaltar que as diferenças nas propriedades físico-químicas (massa molecular, pH ótimo e estabilidade térmica) de lipases produzidas por um mesmo microrganismo podem ser atribuídas às diferentes condições de cultivo, como, por exemplo, tipo e concentração de determinado nutriente. Desse modo, diferentes linhagens microbianas produzem enzimas com características variadas como atividade hidrolítica e sintética, estabilidade, etc. (SHARMA *et al*., 2001).

- **Especificidade**

A especificidade das lipases desempenha um papel muito importante em aplicações industriais (CASTRO *et al*., 2004). A enzima pode ser específica em relação à classe de lipídeos, à posição da ligação éster de uma molécula (regioespecificidade), ao resíduo de ácido graxo (comprimento da cadeia ou presença de dupla ligação) ou à discriminação de enantiômeros (estereoespecifidade). As lipases microbianas podem ser divididas em três categorias baseadas em sua especificidade. Lipases não específicas (ex: produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas* sp.), que quebram as moléculas de acilglicerol em posições randômicas, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, mono- e diacilgliceróis como intermediários. As lipases 1,3 específicas (ex: de *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillum roquefortii*) catalisam seletivamente a hidrólise nas posições 1 e 3 da molécula de triglicerídeo, liberando produtos com composições diferentes daqueles obtidos por lipases não-específicas. As lipases 1,3

específicas resultam da inabilidade estérica de ésteres de 2-glicerol se ajustarem ao sítio ativo da enzima. Lipases ácido graxo específicas são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada, com a dupla ligação em *cis* no carbono 9. O exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum* (CASTRO *et al*., 2004; KOSKINEN e KLIBANOV, 1996).

- **Estrutura tridimensional e mecanismo de lipólise**

Os estudos de determinação da estrutura tridimensional das lipases revelam que essas enzimas possuem pouca homologia na seqüência de aminoácidos (estrutura primária), mas grande similaridade em sua estrutura tridimensional (PAIVA *et al*., 2000). As lipases são α/β-proteínas, formadas por um domínio de folhas β-pregueadas (β1- β8), dispostas paralelamente, interligadas e circundadas por seis α-hélices (A-F) (JAEGER e REETZ, 1998).

O sítio ativo é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico e histidina. O aminoácido serina é o resíduo nucleofílico essencial para a catálise (JAEGER e REETZ, 1998).

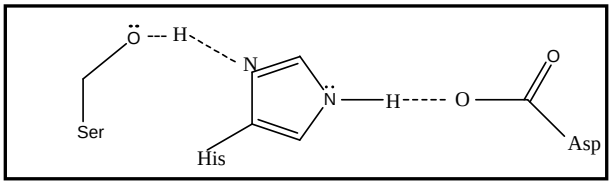


Figura 2.5 Tríade catalítica da lipase

O mecanismo de hidrólise catalisado pelas lipases ocorre pela formação de complexos intermediários covalentes (GAMA *et al*., 2003). A hidrólise do substrato se inicia com o ataque nucleofílico pelo oxigênio do sítio catalítico da serina sobre o átomo de carbono da carbonila da ligação éster, levando à formação de um intermediário tetraédrico estabilizado por pontes de hidrogênio entre os átomos de nitrogênio dos resíduos da cadeia principal que pertencem a chamada “cavidade oxiônica”. Um álcool é liberado, restando um complexo acil-lipase, o qual é

finalmente hidrolisado com a liberação do ácido graxo e regeneração da enzima (JAEGER e REETZ, 1998).

- **Ativação interfacial**

O sítio ativo da maioria das lipases é recoberto por uma estrutura helicoidal, denominada “tampa” polipeptídica, constituída por resíduos hidrofóbicos, que a torna inacessível ao substrato em meio aquoso (PAIVA *et al*., 2000; RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A localização desta tampa varia entre as diversas lipases, assim como seu tamanho e complexidade que aumentam com o aumento do tamanho da molécula protéica (JAEGER e REETZ, 1998).

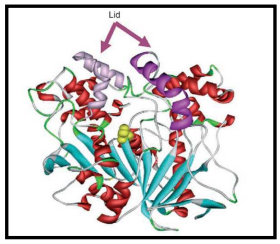


Figura 2.6 Estrutura da lipase de *Candida rugosa* obtida a partir de difração de raios-X (Kasrayan *et al*., 2007).

O fenômeno de ativação interfacial se baseia na mudança conformacional da estrutura da lipase para uma forma ativa quando em contato com uma interface óleo/água (PAIVA *et al*., 2000). Na presença de um substrato lipídico, as lipases são adsorvidas na interface hidrofóbica e as caudas hidrofóbicas alifáticas do óleo exercem um efeito de atração sobre tampa da lipase, girando-a para trás do sítio ativo, alterando a conformação da enzima para a forma “aberta” e fazendo com que o sítio ativo torne-se acessível ao substrato (PETKAR *et al*., 2006; RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). O lado hidrofílico do sítio ativo, que encontrava-se exposto ao solvente na estrutura nativa da lipase, se torna parcialmente escondido na cavidade polar, preenchida previamente por moléculas de água e, simultaneamente, o lado hidrofóbico da tampa se torna completamente exposto, expandindo então a superfície apolar ao redor do sítio ativo e aumentando a afinidade da enzima pelo substrato lipídico (PAIVA *et al*., 2000). Cabe ressaltar que

nem todas as lipases sofrem o fenômeno de ativação interfacial, dentre elas a lipase utilizada nesse estudo (Novozym 435 de *Candida antarctica*).

- **Mecanismo das reações**

O modelo cinético de reações catalisadas por lipases (hidrólise, esterificação ou interesterificação), que envolve a participação de dois substratos originando dois produtos, é denominado Ping-Pong Bi-Bi (GAMA *et al*., 2003). Nesse modelo de reação, um grupo funcional X do primeiro substrato A é removido do substrato pela enzima E para produzir o primeiro produto P e uma forma estável da enzima F (E-X), na qual X está ligado covalentemente à enzima (Ping). No segundo estágio da reação, X é removido da enzima por um segundo substrato B para produzir o segundo produto Q (B-X), regenerando a forma original da enzima, E (Pong). As equações que descrevem os mecanismos de bi-substratos são consideravelmente mais complexas do que a equação de Michaelis-Menten para um único substrato, contendo até quatro constantes cinéticas (VOET *et al*., 2000). A Figura 2.7 representa esquematicamente o mecanismo de Ping-Pong Bi-Bi, sem representação de inibição pelos substratos:

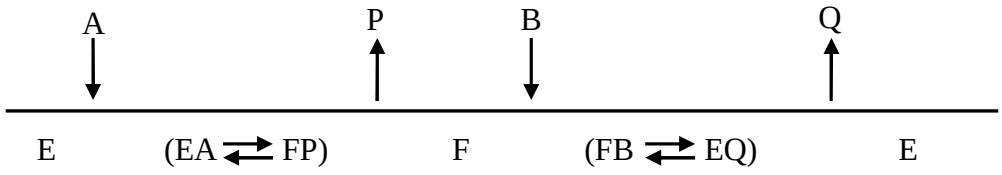


Figura 2.7 Mecanismo Ping-Pong Bi-Bi.
Fonte: CABRAL *et al.* (2003)

Onde A e B representam os substratos na ordem em que se ligam à enzima, P e Q representam os produtos na ordem em que dessorvem da enzima, E representa a forma menos complexa da enzima e EA, FP, FB e EQ formas da enzima capazes de sofrerem reações unimoleculares com liberação de um substrato ou de um produto (GAMA *et al*., 2003).

- **Bioatálise em meios não-aquosos**

O uso exclusivo de água como solvente restringe a gama de aplicações da biocatálise, bem como limita a produtividade de diversos processos. A constatação de que muitas enzimas operam *in vivo* em ambientes ricos em lipídeos (hidrofóbicos) sugere que estes meios predominantemente não aquosos podem ser igualmente adequados à atividade enzimática. A convergência desses dois aspectos conduziu à incorporação no meio reacional de solventes orgânicos, fluidos supercríticos, fases gasosas ou sólidas e líquidos iônicos, aos quais se atribuiu a designação de meios não-convencionais. Em comum, esses meios possuem uma quantidade de água disponível reduzida (GAMA *et al*., 2003).

Uma das principais vantagens da catálise enzimática em meio orgânico é a possibilidade de efetuar reações que utilizam substratos pouco solúveis em água. Além disso, é possível deslocar o equilíbrio termodinâmico da reação, através da extração de substratos e/ou produtos para a fase aquosa e/ou orgânica ou pela diminuição da quantidade de água no meio reacional (KOSKINEN e KLIBANOV, 1996).

Entretanto, a presença de um solvente orgânico constitui um risco de inativação da enzima, pois o solvente pode ocasionar mudanças na conformação da proteína, e interagir direta ou indiretamente com substratos e produtos alterando suas concentrações na camada aquosa ao redor da proteína (KOSKINEN e KLIBANOV, 1996). Além disso, devem-se considerar os custos adicionais com a segurança e o processamento de efluentes do processo, incluindo a possibilidade de reutilização do solvente orgânico (GAMA *et al*., 2003).

O emprego de sistemas sem solvente (Solvente Free System - SFS) foi reconhecido a princípio pelas empresas Unilever, Kao Corporation e Fuji Oil na síntese enzimática de triglicerídeos de alto valor agregado, empregando lipases 1,3 específicas. No início dos anos 80, essas empresas obtiveram suas primeiras patentes relacionadas à síntese de equivalentes da manteiga de cacau, o que permitiu a redução dos custos de produção com os produtos obtidos enzimaticamente tornando-os então competitivos com a manteiga de cacau natural (KOSKINEN e KLIBANOV, 1996).

Em SFS, apenas os substratos e a enzima encontram-se no meio reacional. O emprego de sistemas livres de solvente (SFS) combina a especificidade da catálise biológica com os altos níveis de produtividade alcançados com os métodos convencionais, além de reduzir os custos operacionais com o solvente e a geração de efluentes tóxicos e evitar a possibilidade de desativação do biocatalisador pelo solvente (KOSKINEN e KLIBANOV, 1996; TRUBIANO *et al*., 2007; HOU, 2005). Nesse sistema, o equilíbrio químico da reação pode ser deslocado no sentido da síntese pela remoção da água formada na reação por emprego de vácuo e uso de adsorventes seletivos como sílica gel ou peneiras moleculares (KOSKINEN e KLIBANOV, 1996).

- **Reações de condensação catalisadas por lipases**

Lipases vêm sendo estudadas como catalisadores promissores para a síntese de polímeros ambientalmente compatíveis (MAHAPATRO *et al*., 2004). Os três principais tipos de polimerização são: condensação entre diácidos e dióis ou hidroxi-ácidos com eles mesmos, transesterificação de hidroxi ésteres ou diésteres com dióis e polimerização de lactonas com abertura do anel (BORNSCHEUER e KASLAUSKAS, 1999). Polímeros biodegradáveis como poliésteres, policarbonatos e polifosfatos produzidos por catálise enzimática podem ser utilizados em aplicações biomédicas (peças ortopédicas, engenharia de tecidos e controladores de liberação de drogas) (VARMA *et al*.,2005).

Em geral, os polímeros produzidos enzimaticamente apresentam baixo peso molecular. O peso molecular é limitado devido a reações secundárias como hidrólise, especificidade da enzima em relação ao tamanho da cadeia e desativação do biocatalisador (VARMA *et al*., 2005).

As lipases reportadas para a síntese de poliésteres são: oriundas de mamíferos (lipase pancreática, (PPL)), fungos (*Candida antartica* lipase B (CA), *Candida rugosa* (CR), *Candida cylindracea* (CC), *Aspergillus niger* (AN), *Penicillium rorueforti* (PR), *Rhizopus delemar* (RD), *Rhizomucor miehei* (RM)) ou bactérias (*Pseudomonas cepacia* (PC), *Pseudomonas flourescens* (PF), *Pseudomonas* sp. (PS)) (VARMA *et al*., 2005).

Mahapatro e colaboradores (2004) estudaram reações de poliesterificação de diferentes ω- hidroxiácidos catalisadas pela lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435). Os ácidos graxos estudados foram: 6-hidroxihexanóico, 10-hidroxidecanóico, 12-hidroxidodecanóico e 16-hidroxihexadecanóico. Após 48 horas de reação, o crescimento do polímero foi similar para os ácidos de cadeia C10, C12 e C16 e menor para o hidroxiácido de menor cadeia C6, o que foi atribuído ao fato da lipase exibir preferência pelos substratos com cadeias similares às encontradas em triglicerídeos. Os autores observaram que a reação de polimerização do ácido 12-hidroxidodecanóico catalisada pela lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435) ocorreu rapidamente, com o percentual de oligômeros com alto peso molecular de 91% após 24 horas de reação.

Linko e colaboradores (1995) investigaram a influência de diversos parâmetros na síntese de poliésteres derivados de bis (2,2,2-trifluoroetil) sebacato com 1,4-butanediol, com lipase de *M. miehei.* Os autores observaram que o emprego de 0,15 $mol.L^{-1}$ dos reagentes acarretou em formação de maiores quantidades de oligômeros de baixo peso molecular, quando comparado ao emprego de maiores quantidades de reagentes. Em maiores concentrações de substrato (0,83 $mol.L^{-1}$ de cada um dos substratos) foram obtidos produtos de maior peso molecular. Quando a concentração de ambos os substratos foi maior que 1,2 $mol.L^{-1}$, o meio reacional se tornou muito viscoso, resultando em uma redução do peso molecular dos produtos.

2.5.2.2 Síntese de estolides empregando lipases

O ácido graxo mais utilizado na síntese enzimática de estolides é o ácido ricinoléico, com o estolide sendo formado pela esterificação entre a hidroxila presente no ácido com a carboxila de outra molécula de ácido graxo.

Foi reportado que o índice de acidez obtido na síntese de estolides derivados do ácido ricinoléico por métodos químicos é de 40, o que equivale a cinco resíduos de ácidos graxos incorporados por molécula de ácido poliricinoléico (oligômero). Esse valor ácido pode ser obtido empregando-se lipase imobilizada, mas nunca foi obtido com lipase livre (ADACHI e KOBAYASHI, 2005).

2.6 Fatores que influenciam na síntese de estolides catalisada por lipase

2.6.1 Temperatura

Um dos parâmetros mais importantes que afetam as reações enzimáticas é a temperatura (PAIVA *et al*., 2000). Um aumento da temperatura produz dois efeitos nas reações catalisadas por enzimas. Inicialmente, a taxa inicial de reação aumenta proporcionalmente com o aumento da temperatura, devido ao aumento de colisões entre as moléculas de substrato e enzima. No entanto, elevadas temperaturas podem levar a perda da atividade catalítica da lipase devido à desnaturação da estrutura protéica resultante da quebra de ligações fracas que estabilizam a estrutura tridimensional da enzima (FORESTI e FERREIRA, 2007; YU *et al*., 2010). Em meio sem solvente a temperatura também influencia na viscosidade e na transferência de massa. Enquanto elevadas temperaturas favorecem a fluidez do meio, reduzindo assim as limitações de transferência de massa e favorecendo a interação entre as partículas de enzima e substratos, a enzima deve ser prevenida da desativação térmica (BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2009). O aumento da temperatura também pode favorecer o processo de lactonização, com aumento da síntese de lactonas em relação à de estolides no meio reacional (HAYES, 1996).

A reação de síntese de estolides utilizando ácido ricinoléico como reagente é usualmente realizada a 40℃ (BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2005, 2008, 2009; YOSHIDA *et al*., 1997).

Bódalo-Santoyo e colaboradores (2005) realizaram a síntese de estolides de ácido ricinoléico empregando lipase de *Candida rugosa* em meio sem solvente a 40℃ e, após 30 horas de reação, observaram que o m onômero havia desaparecido quase completamente do meio reacional, indicando que a redução no índice de acidez ocorreu devido à formação de oligômeros.

2.6.2 Concentração de lipase

Em geral, o aumento na concentração de biocatalisador promove aumento nas taxas iniciais e nos rendimentos de reação. No entanto, altas concentrações

enzimáticas podem promover saturação da área interfacial e limitar a disponibilidade de substrato para a reação (RAMACHANDRAN *et al*., 2006).

Bódalo-Santoyo e colaboradores (2005) estudaram a síntese de estolides derivados do ácido ricinoléico (AV inicial de 180) empregando lipase de *Candida rugosa* como catalisador em meio sem solvente a 40℃. Os autores observaram aumento de taxa de reação quando dobraram a concentração de enzima (de 0,66 para 1,33% (m/m)), mas não verificaram diferenças significativas quando triplicaram a concentração de lipase. Os autores obtiveram AV de 65 após 48 horas de reação (64% de conversão) com 1,33% (m/m) de lipase, 144.000 ppm de água e agitação com hélice de três pás.

A patente JP 1016591 descreve a síntese enzimática de estolides a partir dos ácidos graxos hidroxilados presentes no óleo de mamona (ácido ricinoléico). A reação de hidrólise e formação de estolide do óleo de mamona foi realizada utilizando 2 a 15 % (m/m) de lipase em 30 a 65% (m/m) de óleo de mamona disperso em solução aquosa onde foi obtido um rendimento em estolide superior a 90% (CHOZO *et al*., 1989).

2.6.3 Tipo de lipase

A especificidade da lipase também influencia na síntese de estolides. Hayes e Kleiman (1995) estudaram a síntese de estolides utilizando lipases em meio contendo ácido lesquerólico (ácido 14-hidroxi-11-eicosanóico) e ácido octadecenóico. As lipases 1,3 específicas (de *Rhizopus arrhizus* e *Rhizomucor miehei*) foram ineficazes na síntese de estolides. As lipases não específicas (*C. rugosa*, *G. candidum* e *Pseudomonas* sp.) produziram rendimentos em estolides de 41,3%, 45,2% e 62,8%, respectivamente. A lipase de *C. rugosa* produziu pricipalmente monoestolides derivados de um grupamento acil de ácido lesquerólico e um grupamento acil de ácido octadecenóico (84%). A lipase de *Pseudomonas sp.* também produziu como maior produto o estolide 20-OH,18 (51,1%), mas também sintetizou estolide 20-OH,20-OH e diestolides em grandes quantidades (29,0 e 12,5%, respectivamente). Os autores agruparam as lipases estudadas em três categorias: lipases que sintetizam estolides a partir de reações entre ácidos graxos hidroxilados (HFA) e não

hidroxilados (NHA) (*C. rugosa*), lipases que são aptas para a formação de diversas categorias de estolides tanto de HFA quanto de NHA (*Pseudomonas* sp.) e lipases inaptas para a síntese de estolides (lipases 1,3 específicas).

2.6.4 Concentração de substrato

A concentração inicial de substrato é um importante fator na distribuição dos produtos, uma vez que a própria hidroxila da molécula de HFA compete com as hidroxilas de outras moléculas de HFA para esterificação de seu grupo carboxila. De maneira geral, a formação de lactona é favorecida por menores concentrações de substrato. Lactonas (e poliolides) são os principais produtos formados quando ω-HFA estão presentes em concentrações menores ou iguais a 1 $mmol.L^{-1}$. Trabalhos demonstram que a formação de lactona diminui com o aumento da concentração de ω-HFA. Quando a concentração de ácido 5-hidroxi pentanóico foi de 165 $mmol.L^{-1}$ ocorreu preferencialmente a formação de estolide, no entanto na concentração de 31,3 $mmol.L^{-1}$ a síntese de lactonas foi favorecida (HAYES, 1996). Estolides são produzidos quase exclusivamente a partir de ω-HFA quando o substrato está presente em uma concentração de 22,5 $mmol.L^{-1}$ em solvente orgânico ou na ausência de solvente. Foi reportado que lactonas são produzidas em reações empregando baixas concentrações (menor ou igual a 5 $mmol.L^{-1}$) dos ácidos graxos ricinoléico, ricineláidico e 12-hidroxi esteárico (HAYES, 1996).

2.6.5 Posição da hidroxila do ácido graxo hidroxilado (HFA)

A síntese de estolide catalisada por lipase depende fortemente da posição do grupamento hidroxila (BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2005). A posição do grupamento hidroxila na cadeia de ácido graxo apresenta uma pronunciada influência na formação de estolides ou lactonas quando ácidos graxos hidroxilados (HFA) ou ésteres derivados de ácidos graxos hidroxilados (HAE) são expostos à ação biocatalítica das lipases. Quando o grupamento hidroxila está localizado no carbono 3 (isto é na posição β) apenas estolides são formados. Quando a hidroxila encontra-se no C4 (γ) ou C5 (δ), lactonas são preferencialmente sintetizadas (HAYES, 1996).

Na Tabela 2.1 estão listados os efeitos do tamanho da cadeia carbônica e da posição da hidroxila na formação de estolide derivado de ácidos graxos hidroxilados (HFA).

Tabela 2.1 Efeitos do tamanho da cadeia e da posição hidroxila de uma cadeia de HFA na formação de produtos catalisada por lipase.

Cadeia carbônica	***Posição da hidroxila***	***Produto***
3	3 (β)	estolide
4-8	4 (γ)	γ -lactona
5	5 (γ,δ)	estolide
6-16	5 (δ)	δ -lactona
6	6 (ε,ω)	estolide
8-11	ω 1	ω –lactonas/poliolides
10-20	ω	ω –lactonas/poliolides [a] estolide [b]
13-15	ω 6	lactonas e estolides
18	12	estolide
20	14	estolide

[a] Baixas concentrações de substrato hidroxilado (menor que 10 $mmol.L^{-1}$)
[b] Altas concentrações de substrato hidroxilado
Fonte: HAYES (1996)

Engel e colaboradores (1991) estudaram a reação entre ésteres de ácidos graxos hidroxilados (HAE) com seis átomos de carbono e ácido octanóico empregando lipase de *C. rugosa* como catalisador e observaram que quando o grupamento OH estava na posição α (C2) apenas pequenas quantidades de estolides foram sintetizadas (reação i da Figura 2.8), com grande quantidade de HFA livre sendo formada (reação ii). A reação entre duas cadeias hidroxiladas não foi observada (reação iii). Quando o grupamento OH encontrava-se nos carbonos β (C3) ou δ (C5) a formação de estolide ocorreu muito mais rapidamente que a hidrólise (HAYES, 1996).

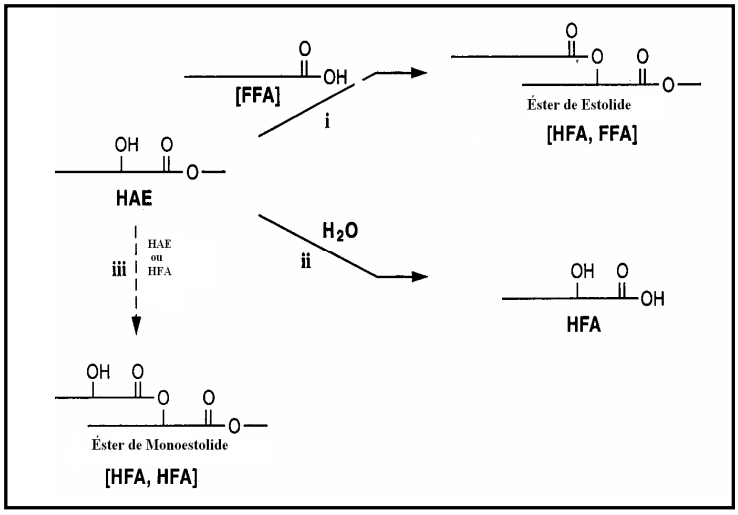


Figura 2.8 Esquema de reação entre ácido octanóico e HAE.
Fonte: HAYES (1996)

2.6.6 Tempo de reação

O tempo de reação representa uma variável muito importante em reações de condensação catalisadas por lipases (BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2005). Em geral, as reações de polimerização catalisadas por enzimas requerem longos tempos de reação para a completa conversão do monômero e a formação dos poliésteres (VARMA *et al*., 2005).

Linko e colaboradores (1995) avaliaram o efeito do tempo de reação na síntese de poliésteres derivados de bis (2,2,2-trifluoroetil) sebacato com 1,4-butanediol, utilizando lipase de *M. miehei*. Os autores observaram que o maior grau de polimerização foi obtido após sete dias de reação (168 horas). Tempos maiores de reação acarretaram na redução da polimerização devido à diminuição da solubilidade dos poliésteres formados e ao movimento limitado das macromoléculas, resultando em diminuição da probabilidade de colisão com monômeros e oligômeros de baixo peso molecular.

Peláez e colaboradores (2003) investigaram a produção de estolides pela fermentação de *Pseudomonas* sp. em meio contendo ácido oléico como fonte de carbono. A autooxidação do ácido oléico em um sistema aquoso e aerado resultou nos derivados ácido 10-hidroxi-8-octadecenóico (MHOD) e ácido 7,10-hidroxi-8-octadecenóico (DHOD), que foram utilizados pelas lipases na síntese de estolides.

Estolides foram detectados após 5 horas de incubação e, após 50 horas, nenhum dos ácidos graxos foi detectado no sobrenadante da cultura a 30℃. A quantidade de polímero aumentou com a quantidade de lipase na cultura, alcançando concentração 3,8g/L no final do experimento (72 horas). Os autores obtiveram dímeros (27,5%), trímeros (19,4%), tetrâmeros (15,0%), pentâmeros (9,7%) e hexâmeros (11,0%).

2.6.7 Água

A água desempenha importante papel nas reações de síntese de estolides catalisadas por lipases. É amplamente reconhecido que enzimas necessitam de algum grau de hidratação para manutenção de sua atividade catalítica (FORESTI *et al*., 2008; BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2009). A água é essencial na manutenção da função catalítica da enzima, pois participa, direta ou indiretamente, de todas as interações não-covalentes que mantêm a conformação do sítio catalítico e garante a flexibilidade da enzima. Baixas quantidades de água (0,1%), geralmente, reduzem a atividade da enzima. Nesse caso, a quantidade de água no meio reacional não é suficiente para o bom funcionamento da enzima.

Além disso, a água influencia no equilíbrio da reação de síntese e de hidrólise e na distribuição dos produtos do meio (FORESTI *et al*., 2007; VARMA *et al*., 2005). Como a reação de formação de estolide é uma reação de desidratação-condensação, a reação atinge o equilíbrio e é interrompida quando a concentração de água no meio aumenta (BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2005). No início da reação existem muitas moléculas de água ligadas aos grupos polares do ácido ricinoléico, deixando poucas moléculas disponíveis para manutenção da estrutura catalítica da enzima. Com o progresso da reação, ocorre a redução da polaridade do meio devido à condensação das moléculas de ácido e, então, mais moléculas de água ficam disponíveis para se ligarem à enzima, o que reduz a quantidade de água ótima necessária no meio reacional (YOSHIDA *et al*., 1997). Logo a quantidade de água ótima no meio reacional varia em cada estágio da reação.

A remoção da água, principal produto secundário da reação, tem como objetivo deslocar o equilíbrio no sentido da reação de síntese. O controle da atividade de água tem sido utilizado para otimizar diferentes reações catalisadas por lipases. No entanto, os níveis de água ideais para a catálise diferem de acordo com

os diferentes sistemas reacionais (MAHAPATRO *et al*., 2004). Dentre as técnicas utilizadas para a remoção da água formada na reação destacam-se: o emprego de agentes adsorventes como alumina, zeólitas e sílica, destilação azeotrópica, pervaporação, adição de peneiras moleculares e solução de sais saturada. Peneiras moleculares possuem a vantagem de não co-adsorverem hidrocarbonetos como fazem os adsorventes comuns de sílica e alumina (GIACOMETTI *et al*., 2001; HOU, 2005). A remoção de água por vácuo e elevadas temperaturas, permite produzir estolides com altos rendimentos (>90%) (CERMAK *et al*., 2006).

Bódalo-Santoyo e colaboradores (2005) compararam a influência de três métodos de remoção da água do meio reacional (evaporação espontânea, vácuo e circulação de ar quente) em reações de síntese de estolides derivados do ácido ricinoléico, empregando lipase de *Candida rugosa* em meio sem solvente. Os autores obtiveram melhores resultados com circulação de ar quente. Para o estudo da influência da circulação de ar quente no meio reacional os autores realizaram experimentos com diferentes quantidades iniciais de água (entre 10.000 e 510.000 ppm). A maior parte da água foi eliminada entre as 2 e 10 primeiras horas de reação, e após 24 horas, a água presente no meio foi estabilizada em 2.500 ppm em todos os experimentos.

Por outro lado, como a reação enzimática requer uma quantidade de água mínima necessária para manutenção da atividade da lipase, alguns autores reportam que adição de quantidades apropriadas de água no meio reacional favorece a reação de síntese. Além disso, alguns autores relatam que a formação de duas fases (uma orgânica e outra aquosa) devido à adição de água no meio reacional, favorece a migração da água produzida na reação da fase reacional (orgânica) para uma fase aquosa não reacional, aumentando as conversões (BUCALÁ *et al*., 200; FORESTI *et al.,* 2008). Esses resultados podem ser encontrados em trabalhos de esterificação (FORESTI *et al*., 2008), bem como em trabalhos relacionados à síntese de estolides (YOSHIDA *et al*.1997, BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2009).

Yang e colaboradores (2006) observaram que a adição de 15% (m/m) de água no meio reacional melhorou a conversão de metanólise de óleo de soja empregando lipase imobillizada de *Candida* sp. 99-125. No entanto, maiores concentrações de água favoreceram a reação reversa de hidrólise.

Foresti e colaboradores (2008) observaram que as conversões obtidas na síntese de oleato de etila catalisada pela lipase imobilizada de *Candida antarctica* B foram muito baixas quando não foi adicionada água no meio reacional. A adição de 10% ou 20% (m/m) acarretou em maiores conversões uma vez que a água encontrava-se fora da fase reacional aumentando a taxa da reação de esterificação.

Yoshida e colaboradores (1997) estudaram a síntese de estolides de ácido ricinoléico e observaram que quando ácido ricinoléico previamente seco (1852 mg de água/kg de ácido) foi circulado na coluna contendo lipase imobilizada de *Candida rugosa*, não ocorreu decréscimo no valor de AV após 16 horas de reação. A quantidade mínima de água requerida no meio reacional no início da reação a fim de manter a estrutura catalítica da lipase foi de 1800 a 4200 mg/kg de ácido ricinoléico. No entanto, com o progresso da reação, e consequente redução da polaridade do meio (devido à condensação do ácido ricinoléico), a concentração de água deveria ser ajustada para um valor menor ou igual a 1000 mg/kg a fim de se evitar a reação reversa (hidrólise).

Bódalo-Santoyo e colaboradores (2009) estudaram os efeitos da quantidade de água no meio em reações de síntese de estolides de ácido ricinoléico utilizando lipase imobilizada de *Candida rugosa* em reator aberto. A adição de uma pequena quantidade de água (0,5 mL) favoreceu a redução do AV. No entanto, a adição de 5 mL de água no meio diminuiu a produção de estolides.

2.6.8 Pressão

A pressão hidrostática tem sido utilizada para aumentar a atividade e/ou estabilidade de diversas enzimas em diferentes solventes (BOONYARATANAK-ORNKIT *et al*., 2002). Embora os mecanismos de estabilização induzidos por altas pressões ainda não tenham sido completamente elucidados, de maneira geral, as alterações nas taxas de reações catalisadas por enzimas sob altas pressões estão relacionadas com diferentes fatores como: mudanças na conformação e na solvatação da enzima, no equilíbrio químico, nas propriedades físicas do substrato ou do solvente e alterações no suporte de imobilização (EISENMENGER e REYES-DE-CORCUERA, 2009). Do ponto de vista intramolecular, a pressão exerce influência sobre as interações que mantêm as estruturas secundária, terciária e quaternária das

proteínas: interações iônicas, hidratação, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Ligações covalentes, que definem a estrutura primária da proteína, não são afetadas pelo aumento de pressão, pois essas ligações são altamente incompressíveis (BOONYARATANAKORNKIT *et al*., 2002).

A pressão hidrostática tem sido reportada como protetora dos efeitos desnaturantes da temperatura sobre as enzimas. De acordo com Mozhaev e colaboradores (1996) a estabilização de enzimas contra inativação térmica induzida pela pressão reside na oposição dos efeitos da pressão e da temperatura na habilidade dos grupos funcionais da proteína de interagirem com a água (EISENMENGER e REYES-DE-CORCUERA, 2009). Em uma etapa inicial de inativação térmica, a proteína perde moléculas de água essenciais, o que resulta em rearranjos estruturais da enzima. Altas pressões podem dificultar esse processo, favorecendo a hidratação da enzima. Desse modo, a aplicação de alta pressão hidrostática fortalece a camada de hidratação da proteína impedindo sua inativação térmica.

A estabilidade e atividade de lipases sob altas pressões têm sido investigadas em fluidos e gases comprimidos ou supercríticos incluindo dióxido de carbono, propano, butano e misturas de butano e propano. A lipase de *Candida antarctica* B (CALB) foi eficaz na síntese de acetato de isoamila em dióxido de carbono supercrítico com altas taxas de reação inicial quando comparado com n-hexano, mantendo a atividade de 8 a 30 MPa, o que foi atribuído ao aumento da difusividade dos reagentes no meio (ROMERO *et al*., 2005).

O emprego de alta pressão em meio aquoso também resultou em aumento da atividade da lipase de *R. miehei*. Em temperaturas de 50, 55 e 60℃, a aplicação de 50 a 350 MPa produziu um efeito protetor sobre a enzima (MARIE-OLIVE *et al*., 2000).

A atividade das lipases pancreática, de *C. antarctica*, *Aspergillus oryzae*, *Candida cylindracea*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizums*, *Mucor miehei* e *Pseudomonas cep*acia foi aumentada na presença de CO_2 supercrítico a 15MPa (HLAVSOVA *et al*., 2008).

Capítulo 3

3 OBJETIVOS

Esse trabalho visa contribuir para o desenvolvimento de novos processos para a produção de lubrificantes biodegradáveis a partir do emprego de enzimas como catalisadores da reação de síntese de estolides.

Considerando a disponibilidade de matéria-prima nacional rica em ácido ricinoléico (óleo de mamona) e a crescente demanda por métodos alternativos para a produção de biolubrificantes, o objetivo desse trabalho foi estudar a produção de estolides a partir de ricinoleato de metila (biodiesel de óleo de mamona) e os ácidos oléico (ácido cis-9-octadecenóico) e esteárico (ácido octadecanóico) utilizando lipases imobilizadas comerciais como catalisadores em meio sem solvente.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliação dos efeitos dos seguintes parâmetros na síntese de estolides: temperatura, pressão, concentração de biocatalisador, tipo de lipase, razão molar dos reagentes, tempo de reação, tipo de ácido graxo, concentração inicial de água e velocidade de agitação;
- Investigação de diferentes formas de remoção da água do meio reacional:
    - evaporação livre,
    - peneira molecular,
    - vácuo;
- Investigação dos produtos obtidos nas reações de síntese de estolides empregando cromatografia em fase gasosa;
- Avaliação das possíveis rotas reacionais envolvidas na síntese de estolides;
- Caracterização físico-química do biolubrificante obtido;
- Verificação da viabilidade de recuperação e posterior reutilização da enzima imobilizada.

Capítulo 4

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

As lipases comerciais utilizadas nesse trabalho foram Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM, produzidas e gentilmente doadas pela Novozymes Latin American Ltda (Paraná, Brasil).

Novozym 435 é uma lipase de *Candida antarctica* B produzida por fermentação do microrganismo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado e adsorvida em resina acrílica macroporosa. As partículas da enzima imobilizada possuem de 0,3 a 0,9 mm de diâmetro e 1 a 2 % (m/m) de água (Oils e Fats / 2001-06950-03, Product Sheet, Novozymes).

Lipozyme RM IM é uma lipase de *Rhizomucor miehei* produzida por fermentação submersa do microrganismo *Aspergillus oryzae* e imobilizada em resina macroporosa de troca iônica. As partículas da enzima imobilizada possuem de 0,2 a 0,6 mm de diâmetro e 2 a 3 % (m/m) de água. Com relação à

especificidade da lipase imobilizada, Lipozyme RM IM apresenta especifidade para as posições 1 e 3 (Oils e Fats / 2000-10503-04, Product Sheet, Novozymes).

Lipozyme TL IM é uma lipase de *Thermomyces lanuginosus* produzida por fermentação submersa do microrganismo *Aspergillus oryzae*. As partículas da enzima imobilizada possuem de 0,3 a 1,0 mm de diâmetro (Oils e Fats / 2001-06952-04, Product Sheet, Novozymes).

Ácido oléico extra puro, etanol P.A. e n-hexano foram obtidos da Merck (São Paulo, Brasil). Ácido esteárico puro (95%), hidróxido de sódio P.A. e acetona P.A. foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido ricinoléico (80% de pureza) e a peneira molecular com diâmetro do poro de 3Á foram obtidos da SIGMA (St. Louis, EUA). O biodiesel de mamona foi doado pelo CENPES (Petrobras).

4.2 Metodologia

4.2.1 Dosagem da água nos reagentes

A dosagem da água presente no ácido oléico extra puro (Merck) e no ricinoleato de metila (biodiesel de mamona cedido pelo CENPES/Petrobras) utilizados foi realizada em titulador Karl Fischer Mettler modelo DL18 empregando solução Karl Fischer isenta de piridina (Merck). As análises foram feitas com seis réplicas e os resultados foram expressos em percentual (m/m) de água presente em cada um dos reagentes.

4.2.2 Atividade enzimática

A atividade de esterificação das lipases comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM foi determinada pela velocidade inicial da reação de esterificação do ácido oléico com butanol, empregando razão estequiométrica dos reagentes (0,03 mmols de ácido oléico e 0,03 mmols de butanol) e 3% (m/m) de lipase comercial a 45℃.

A reação foi conduzida em reator aberto com capacidade de 20 mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático (HAAKE D10). O

progresso da reação foi acompanhado retirando-se alíquotas do meio reacional (100 µL, em duplicata) nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos de reação, que foram analisadas por titulometria de neutralização. As amostras foram dissolvidas em 30 mL de acetona/etanol 1:2 e tituladas contra uma solução de NaOH a 0,02 mol.L^{-1}, empregando titulador automático Mettler modelo DL25. Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 µmol de ácido oléico por minuto nas condições experimentais descritas. A equação 4.1 descreve o cálculo empregado para determinação da atividade enzimática de esterificação.

$$A\ (\mu mols/min.g) = \frac{(V_1 - V_2)xC}{txm} x1000x\frac{V_m}{V_a} \qquad (4.1)$$

onde: A = atividade de esterificação (µmols/min.g);

V_1 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo zero de reação (mL);

V_2 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo *t* minutos de reação (mL);

C = concentração da solução de NaOH (mol.L^{-1});

t = tempo de reação (min);

m = massa de preparação enzimática utilizada na reação (g);

V_a = volume de amostra (mL);

V_m = volume de meio reacional (mL).

4.2.3 Reações de síntese de estolides

As reações de síntese de estolides foram conduzidas em reator batelada fechado, com capacidade de 15 mL, provido de condensador e agitação magnética. O sistema reacional consistiu na mistura dos reagentes e da enzima imobilizada. A temperatura do meio reacional foi mantida constante pela circulação de etileno glicol pela camisa do reator (Haake DC10). O sistema reacional utilizado está apresentado na Figura 4.1.

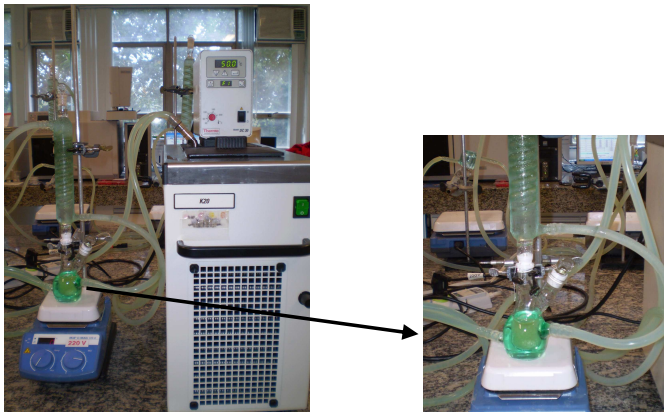


Figura 4.1 Sistema reacional.

O progresso da reação foi acompanhado pela retirada de alíquotas do meio reacional (100 µL, em duplicata), que foram analisadas por titulometria de neutralização. As amostras foram dissolvidas em 40 mL de acetona/etanol 1:1 e tituladas contra uma solução de NaOH 0,02 mol.L^{-1}, empregando titulador automático Mettler modelo DL25.

4.2.4 Parâmetros estudados

4.2.4.1 Efeitos do tipo de lipase

Os efeitos do tipo de lipase nas reações de síntese de estolides foram avaliados empregando-se as lipases comerciais imobilizadas: Novozym 435 (lipase de *Candida antarctica* B), Lipozyme RM IM (lipase de *Rhizomucor miehei*) e Lipozyme TL IM (lipase de *Thermomyces lanuginosus*). As reações foram conduzidas durante 48 horas entre ácido oléico ou ácido esteárico e ricinoleato de metila com razão estequiométrica dos reagentes, teor de lipase comercial de 6% (m/m) e temperatura de 80℃.

4.2.4.2 Efeitos da razão molar dos reagentes

Os efeitos da razão molar dos reagentes foram estudados nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila a 80℃ e com 6 % (m/m) de lipase comercial

Novozym 435. As razões molares ácido oléico/ricinoleato de metila empregadas foram: 0,5, 0,66, 0,86, 0,93, 0,96, 1,0 (razão estequiométrica dos reagentes), 1,04, 1,08, 1,16, 1,5 e 2,0.

4.2.4.3 Efeitos do tipo de ácido graxo

A especificidade da lipase com relação ao tipo de ácido graxo empregado foi investigada utilizando os ácidos graxos esteárico (C18:0) e oléico (C18:1). As reações foram conduzidas em reator fechado, com razão estequiométrica dos reagentes (0,015 mol de ácido e 0,015 mol de ricinoleato de metila), temperatura de 80℃ e teor de Novozym 435 de 6% (m/m).

4.2.4.4 Influência do tempo de reação

A influência do tempo de reação foi investigada nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila e ácido esteárico e ricinoleato de metila. As sínteses foram realizadas com teor de enzima comercial de 6% (m/m) e razão estequiométrica dos reagentes (0,015 mol de ácido e 0,015 mol de éster) a 80℃. As reações foram conduzidas durante 24, 48, 72 e 100 horas.

4.2.4.5 Efeitos da presença da água no meio reacional

- **Adição de água no meio reacional**

Como é reconhecido que a lipase necessita de uma camada essencial de água para manutenção de sua estrutura nativa, foi investigada a adição de água no meio reacional nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila e ácido esteárico e ricinoleato de metila. As sínteses empregaram razão estequiométrica dos reagentes (R=1), temperatura de 80℃ e 6% (m/m) de lipase comercial. A quantidade de água estudada foi de 20% (m/m), o que corresponde a 1,8 g (1,8 mL). A água foi adicionada no meio reacional no início da reação (t= 0h).

- **Remoção da água do meio reacional**

Com o objetivo de estudar os efeitos da remoção da água produzida durante a reação foram investigados três métodos para eliminação da água do meio reacional: evaporação simples (sistema reacional aberto), adição de peneira molecular de 3Å e emprego de vácuo.

a) Evaporação simples

O sistema reacional aberto foi utilizado nas reações entre ricinoleato de metila e ácido oléico e ricinoleato de metila e ácido esteárico. As condições estudadas foram: 80℃, 6% (m/m) de lipase comercial Novozym 4 35 e razão estequiométrica dos reagentes (R=1), durante 24 horas de reação.

b) Emprego de peneira molecular

Foram realizadas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila e ácido esteárico e ricinoleato de metila na presença de peneira molecular SIGMA com poro de 3Å. As sínteses foram conduzidas com 6% (m/m) de enzima, temperatura de 80℃ e razão estequiométrica dos reagentes (R=1), durante 48 horas. As massas de peneira empregadas foram 100, 250, 500 e 650 mg. Os resultados foram comparados àqueles obtidos nas reações sem utilização do agente secante. A peneira molecular foi previamente seca em mufla (FDG Modelo 3P-S) a 300℃ por 3 horas e adicionada ao meio reacional no início da reação (t=0h), após 6 horas ou após 24 horas de reação, para avaliação da influência do tempo de adição do agente secante na conversão.

c) Emprego de vácuo

As reações realizadas sob vácuo foram conduzidas a 80℃, teor de Novozym 435 de 6% (m/m) e razão estequiométrica dos reagentes (ácido oléico e ricinoleato de metila). O sistema era constituído do reator batelada fechado, provido de agitação magnética e acoplado a um condensador. A bomba de vácuo (Edwards Modelo RV3) foi conectada na parte superior do condensador por meio de uma mangueira de

silicone e era provida de um manômetro que indicava a pressão no meio reacional durante os experimentos que foi constante e igual a 0,6 mbar, equivalente a aproximadamente $6x10^{-4}$ atm (0,45 mmHg). A bomba foi ligada no início (t=0h) ou após 6 horas de reação.

4.2.4.6 Velocidade de agitação

Para avaliar a influência da velocidade de agitação nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila, foi utilizado um micro reator de bancada de aço inox com capacidade de 50 mL (Reator Parr Modelo 4843). O reator era provido de agitador do tipo hélice de impulsão, de controlador de temperatura, de pressão e de velocidade de agitação. As velocidades de agitação usadas no reator foram: 250, 400, 550 e 650 rpm. A maior velocidade de agitação empregada nesse trabalho (650 rpm) foi limitada pela velocidade de rotação máxima do agitador (666 rpm). As sínteses foram conduzidas a 80℃, com teor de enzim a comercial Novozym 435 de 6% (m/m) e razão estequiométrica dos reagentes, durante 48 horas. Nesses experimentos foram empregadas quantidades maiores de reagente em relação às utilizadas no sistema convencional, pois o meio reacional deveria representar 75% do volume do reator. Desse modo, foram utilizados 0,0550 mols de cada um dos reagentes (15,5g de ácido oléico e 17,2g de ricinoleato de metila).

4.2.4.7 Reação sob pressão

Os efeitos da pressão foram investigados nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila empregando-se o reator Parr Modelo 4843. As pressões estudadas foram 100 e 250 psi. Nitrogênio foi utilizado para pressurizar o reator. As sínteses foram conduzidas a 80ºC, com teor de enzima comercial Novozym 435 de 6% (m/m), razão estequiométrica dos reagentes e 550 rpm, durante 48 horas. Foram utilizados 0,0550 mols de cada um dos reagentes (15,5g de ácido oléico e 17,2g de ricinoleato de metila).

4.2.4.8 Efeitos da temperatura

Para avaliar os efeitos da temperatura durante o tempo de reação, as sínteses foram conduzidas na razão estequiométrica dos reagentes (0,015 mol de ácido oléico (4,23 g) e 0,015 mol de ricinoleato de metila (4,68 g)) e 6% (m/m) de lipase comercial Novozym 435. As temperaturas estudadas foram 50, 60, 70, 80, 90 e 100℃.

4.2.4.9 Efeitos da concentração de biocatalisador

Os efeitos da concentração de biocatalisador foram investigados empregando-se razão estequiométrica dos reagentes (0,015 mol de ácido oléico (4,23 g) e 0,015 mol de ricinoleato de metila (4,68 g)) e teores de Novozym 435 que variavam entre 4 e 18% (m/m). As reações foram realizadas a 90ºC.

4.2.5 Reações empregando apenas um reagente

Com objetivo de verificar a especificidade da lipase comercial Novozym 435, foram realizadas sínteses empregando-se apenas um dos reagentes: ácido oléico ou ricinoleato de metila. Além disso, para se avaliar melhor o comportamento da reação, também foram conduzidas reações com apenas ácido ricinoléico como reagente. Dessa forma, foi possível estabelecer uma comparação mais clara entre os resultados obtidos nesse trabalho com os dados da literatura que utilizam, em grande parte, ácido ricinoléico como reagente. As reações foram conduzidas nas seguintes condições: teor de Novozym 435 de 6% (m/m), temperatura de 80℃ e reator fechado. Foram utilizados 0,030 mol de reagente em cada reação.

4.2.6 Análise dos resultados

O progresso das reações foi acompanhado pela determinação do índice de acidez ou valor ácido (acid value-AV), de acordo com a norma oficial AOCS Te 1a-64 (1997), na qual AV é a massa de hidróxido de potássio (mg) necessária para neutralizar os ácidos graxos presentes em 1 g de amostra. Esse índice corresponde à concentração de grupos carboxila presente no meio reacional, que decresce devido à

formação de estolide e é aplicável para todos os ácidos graxos comerciais e ácidos graxos polimerizados.

A equação 4.2 foi empregada para a determinação do índice de acidez:

$$AV = \frac{vol.deNaOH(mL)xMx56{,}10}{m(g)} \qquad (4.2)$$

onde: M = molaridade da solução de NaOH

56,10 = meg do KOH

m = massa de amostra

O resultado é expresso em mg de KOH/g de amostra.

A conversão foi calculada em função do índice de acidez.

$$Conversão(\%) = \left(\frac{AVinicial - AVfinal}{AVinicial}\right)x100 \qquad (4.3)$$

4.2.7 Avaliação dos produtos por cromatografia em fase gasosa (CG)

O progresso das reações foi acompanhado pela retirada de alíquotas de 20 µL, em duplicata, do meio reacional que foram diluídas em 980 µL de n-hexano e injetadas em cromatógrafo a gás Varian modelo CP 3380 com detector de ionização de chama e coluna capilar Factor Four VF-1 de 15 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme. As condições das análises foram: temperatura inicial de 100℃ por 1 minuto e, então, programada a uma taxa de 20℃/min até 200℃, seguida de uma rampa de aquecim ento a 5℃/min até 230℃ e novamente a 20℃/min até 300℃, permanecendo a 300° C por 10 min. As temperaturas do detector e do injetor foram de 280 e 250℃, respectivamente. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste, a uma vazão de 2,0 mL/min. Foi utilizada injeção do tipo split de 1:50 e pressão de 10 psi.

4.2.7.1 Curva padrão do ácido oléico

Para a construção da curva padrão do ácido oléico, foram preparados 10 mL de uma solução padrão 0,00155 mol/g de ácido oléico em n-hexano. Essa solução foi diluída de 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:80 e 1:100 e as soluções foram analisadas por cromatografia em fase gasosa de acordo com o método descrito no item 4.2.6. A curva de calibração foi determinada empregando as áreas obtidas *versus* as concentrações de ácido oléico (mol/g).

4.2.8 Comparação dos resultados obtidos via índice de acidez e cromatografia em fase gasosa

O progresso das reações foi acompanhado pela redução do índice de acidez e do percentual de ácidos graxos livres no meio reacional. O percentual de ácido oléico presente no meio foi obtido a partir das equações 4.4 e 4.5.

$$C(mol/g) = \left(\frac{Área(t) x 10^{-3}}{39{,}857} \right) x 10^{-4} x 50 \qquad (4.4)$$

onde: 39,857 = coeficiente angular da curva padrão do ácido oléico

Área (t) = área referente ao pico do ácido no tempo t

50 = fator de diluição da amostra

$$\%ácido(t) = \frac{Conc(t) x 100}{Conc(i)} \qquad (4.5)$$

onde: % ácido (t) = percentual de ácido oléico no tempo t (24, 48, 72 horas)

Conc (i) = concentração inicial de ácido obtida a partir da equação 4.3

Conc (t) = concentração de ácido obtida nos tempos 24, 48 e 72 horas.

4.2.9 Caracterização físico-química do produto

Para a caracterização do produto obtido, foram conduzidas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila a 80℃, com 12% (m/m) de Novozym 435, razão molar dos reagentes igual a 1 em reator batelada fechado, em um volume reacional de 100 mL (0,150 mol de cada reagente), durante 72 horas. O progresso das reações foi monitorado pela redução do índice de acidez, bem como por cromatografia em fase gasosa. Após 72 horas de reação, a enzima foi separada do meio reacional por decantação e o produto foi filtrado a vácuo. O produto foi então armazenado a 5℃ para sua posterior análise. A enzima utilizada também foi recuperada por lavagem com n-hexano e filtração a vácuo.

As propriedades do produto final avaliadas foram: viscosidade, índice de viscosidade, ponto de fluidez, índice de neutralização e corrosividade. Também foi obtido o espectro de infravermelho do produto.

a) Viscosidade

A viscosidade cinemática foi obtida a 40 e 100℃ pela metodologia ASTM D445-09. O viscosímetro previamente calibrado foi carregado com a amostra e mantido em um banho com as temperaturas desejadas. A viscosidade foi obtida a partir do tempo (em segundos) registrado para que a amostra escorresse da primeira para a segunda marcação no instrumento.

b) Índice de viscosidade

O índice de viscosidade foi obtido pela metodologia ASTM D2270-04. Após a obtenção das viscosidades do produto a 40 e 100℃, os valores foram utilizados em equações para a determinação do índice de viscosidade (4.6 e 4.7).

$$IV = \frac{(anti\log N) - 1}{0{,}00715} + 100 \qquad (4.6)$$

$$N = \frac{(\log H - \log U)}{\log Y} \qquad (4.7)$$

onde: H = valor obtido na tabela presente na norma

U = viscosidade cinemática obtida a 40℃ ($mm^2.s^{-1}$ (cSt))

Y = viscosidade cinemática obtida a 100℃ ($mm^2.s^{-1}$ (cSt))

c) Ponto de fluidez

O ponto de fluidez foi obtido pela metodologia ASTM D97-07. Cerca de 30 mL de amostra foram colocados em um tubo de vidro e o ensaio foi realizado em um sistema fechado, no qual o tubo de vidro contendo a amostra foi colocado. O sistema era constituído por um termômetro que entrava em contato com a amostra. Inicialmente, o equipamento elevou levemente a temperatura para quebrar qualquer possível estrutura cristalina formada na amostra. Em seguida, a temperatura foi resfriada a uma taxa constante de 3 em 3ºC. A amostra foi então analisada nesses intervalos de 3℃, a fim de se detectar se era capaz de fluir. O ponto de fluidez caracterizou-se pela menor temperatura na qual a amostra não escoou mais.

d) Índice de neutralização

A metodologia ASTM D974-08 foi utilizada para obtenção do índice de neutralização do produto. Uma amostra de 0,2 g foi dissolvida em 100 mL uma mistura de tolueno e isopropanol contendo uma pequena quantidade de água. Como indicador foi utilizado *p*-naftolbenzeína. A amostra foi titulada contra uma solução de KOH 0,1 $mol.L^{-1}$ alcoólica até a persistência da coloração verde. O branco foi feito pela titulação do solvente (tolueno com isopropanol) e o índice de neutralização foi obtido (mg KOH/g amostra) a partir da equação 4.8.

$$AV = \frac{(A-B)xMx56{,}10}{m(g)} \qquad (4.8)$$

onde: A = volume de KOH utilizado na titulação da amostra

B = volume de KOH utilizado na titulação do branco

M = molaridade da solução de KOH

m = massa de amostra

e) Corrosividade

Para análise da corrosividade do produto foi empregada a metodologia ASTM D130-04 (corrosão em lâmina de cobre). Cerca de 30 mL amostra foram colocados em um tubo de análise. Uma lâmina de cobre polida e limpa foi imersa na amostra e o sistema foi aquecido a 100℃ durante 3 horas. Após o ensaio, a lâmina foi lavada com solvente de lavagem (isooctano), seca e comparada com padrões ASTM para análise da existência de perda de brilho e corrosão.

f) Espectroscopia de infravermelho

A análise de infravermelho do produto foi realizada em um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrophotometer) da Perkin Elmer utilizando célula de KBr de 0,1 mm de espessura.

4.2.10 Reutilização da lipase comercial

A possibilidade de reutilização da lipase comercial Novozym 435 nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila e ácido esteárico e ricinoleato de metila foi avaliada empregando-se razão molar dos reagentes igual a 1, temperatura de 80℃ e 6% (m/m) de Novozym 435. Após 48 horas de reação, a lipase foi inicialmente separada do meio reacional por decantação, seguida de lavagem com n-hexano e filtração a vácuo. Em seguida a enzima foi reutilizada em uma nova reação.

O resumo dos experimentos com as etapas de otimização e caracterização encontra-se no Anexo 2.

Capítulo 5

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dosagem da água nos reagentes

Os percentuais de água do ácido oléico extra puro e do ricinoleato de metila (biodiesel de mamona) obtidos empregando Karl Fischer foram de 0,29 e 0,96% (m/m), respectivamente. É possível observar por esses resultados que a quantidade de água presente no biodiesel de mamona foi bem superior à encontrada no ácido oléico, o que pode ser atribuído a alta higroscopicidade do ricinoleato devido à presença da hidroxila na cadeia do éster. O alto teor de água presente no biodiesel da mamona sugere que o reagente possui uma quantidade de água satisfatória para a expressão da atividade catalítica da lipase. Yoshida e colaboradores (1997) reportaram que a concentração inicial de água ótima no meio reacional deveria estar entre 0,18 a 0,42% (m/m) na síntese de estolides de ácido ricinoléico. Por outro lado, Bódalo-Santoyo e colaboradores (2005) reportaram que esse valor deveria ser maior

(entre 0,4 e 7,5% (m/m)). As diferenças nos valores observadas nos trabalhos podem ser devido às diferenças no ácido ricinoléico e no suporte das lipases. O suporte exerce forte influência sobre a partição dos substratos, produtos e da água do meio, e, portanto, influencia na atividade catalítica da enzima (Bódalo *et al*., 2007). Diferentes microambientes requerem diferentes quantidades de água para que a enzima expresse atividade catalítica.

5.2 Atividade enzimática

A atividade de esterificação das lipases comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM foi determinada pelo consumo de ácido oléico na reação de esterificação com butanol, empregando razão molar ácido oléico/butanol igual a 1 e 3% m/m de enzima, a 45ºC. Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que consome 1μmol de ácido oléico por minuto. Nessas condições, as atividades das lipases Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM foram de 3824, 1909 e 699 μmols de ácido/min.g de enzima, respectivamente. A partir desses resultados, observa-se que atividade de esterificação da lipase Novozym 435 foi cerca de duas vezes maior em relação à atividade da enzima Lipozyme RM IM, cuja atividade foi cerca de três vezes maior em relação a atividade da Lipozyme TL IM.

5.3 Efeitos do tipo de lipase

Os efeitos do tipo de lipase na conversão de reação foram avaliados em experimentos de 48 horas, com as lipases comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM. As reações foram realizadas a 80°C, na razão estequiométrica dos reagentes (R=1) e com teor de 6% (m/m) de enzima. Os resultados encontram-se na Figura 5.1, onde é possível observar que após 48 horas de reação as maiores conversões foram obtidas com a lipase comercial Novozym 435 (33% para ambos os ácidos graxos). As conversões obtidas com as lipases Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM foram inferiores a 15%. Desse modo, a lipase comercial Novozym 435 foi a mais ativa na síntese de estolides a partir de reações entre os ácidos oléico ou esteárico com ricinoleato de metila.

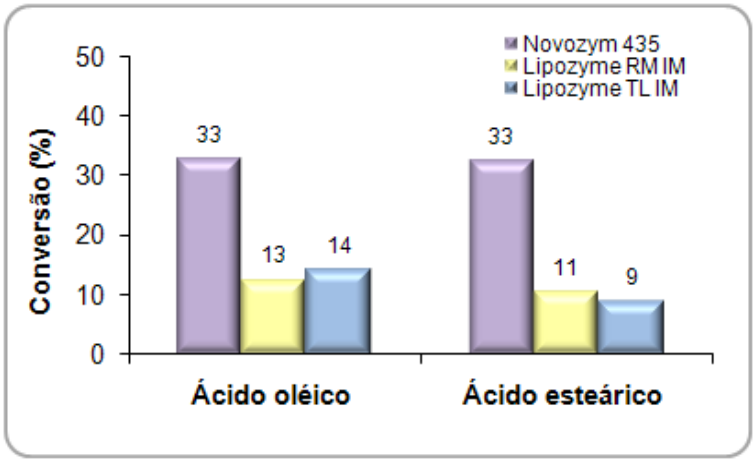


Figura 5.1 Efeitos do tipo de lipase na conversão dos ácidos oléico ou esteárico com ricinoleato de metila, após 48 horas, empregando razão molar dos reagentes (R=1), 6% (m/m) de enzima a 80℃ em reator batelada fechado.

Reações envolvendo a formação de estolide a partir de ácido ricinoléico ou hidrólise de estolides têm sido catalisadas com sucesso por lipases não específicas para as posições 1,3 (*Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, P*seudomonas* sp. e *Geotrichum candidum*), mas não são bem catalisadas por lipases 1,3 específicas (*Rhizopus* p., *Rhizomucor miehei*, lipase pancreática, etc.) (BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2005). Lipases 1,3 específicas não podem atuar sobre o grupamento hidroxila de um HFA, e desse modo, não catalisam a reação intermolecular entre hidroxilas secundárias e grupamentos carboxílicos de duas moléculas de ácido ricinoléico (KARUNA *et al*., 2005). Lipases randômicas como, por exemplo, de *C. rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *G. candidum* e *Pseudomonas sp.* são mais ativas para catalisar a síntese de estolides.

Peláez e colaboradores (2005) observaram que a lipase de *Rhizopus delemar* não catalisou a formação de estolide durante a hidrólise de óleo de mamona e a lipase de *R. miehei* também não foi capaz de atacar o grupamento hidroxila do ácido 12-hidroxiesteárico durante a esterificação.

5.4 Efeitos da razão molar dos reagentes

A estequiometria dos reagentes é uma variável muito importante nas polimerizações por condensação (ALLINGER *et al*., 1978).

Os efeitos da razão molar dos reagentes na reação entre ricinoleato de metila e ácido oléico foram avaliados a 80℃, por 24 horas, empregando 6% (m/m) de Novozym 435 em reator fechado. O efeito da razão molar foi estudado com base em dados de comunicação pessoal fornecidos pelo CENPES como sugestão de avaliação do efeito do aumento da concentração de ácido no meio na conversão final da reação. A Figura 5.2 apresenta as conversões (%) das reações obtidas após 24 horas de reação. Nas reações onde o ricinoleato de metila era o reagente limitante a conversão foi calculada através da equação:

$$X_B = \frac{X_A}{M} x \frac{b}{a} \qquad (5.1)$$

Onde: X_B = conversão de ricinoleato

X_A = conversão de ácido oléico

M = concentração inicial de ricinoleato (mol/g)/ concentração inicial de ácido oléico (mol/g)

b/a = 1 (estequiometria da reação)

A maior conversão (22%) de ácido oléico foi obtida com razão estequiométrica dos reagentes (R=1). No entanto, pode ser observado que o excesso de ambos os reagentes não apresentou influência significativa na conversão.

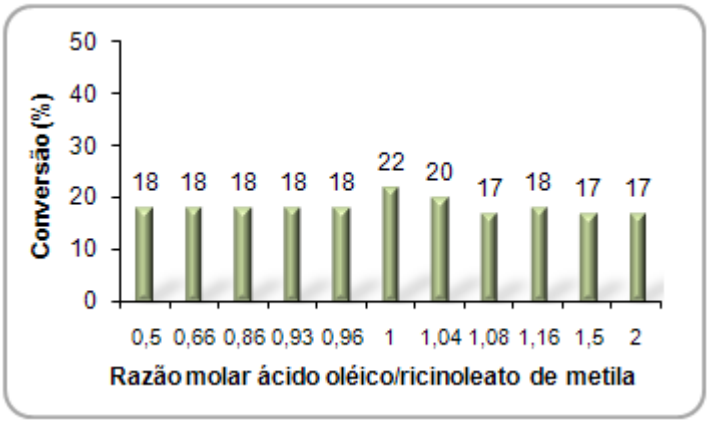


Figura 5.2 Efeitos da razão molar dos reagentes na reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila, empregando 6% (m/m) de lipase comercial a 80℃.

5.5 Efeitos do tipo de ácido graxo

A especificidade da lipase comercial foi investigada empregando-se os ácidos oléico (C18:1) e esteárico (C18:0) nas reações com ricinoleato de metila. Esse parâmetro foi estudado tendo em vista que os trabalhos da literatura reportam que a adição de um ácido graxo saturado que atua como agente de capeamento diminui o número de insaturações na molécula aumentando sua estabilidade oxidativa. Entretanto, os pontos de fluidez e névoa são negativamente afetados, o que diminui o desempenho do lubrificante em baixas temperaturas (CERMAK e ISBELL, 2001). Dessa forma, a partir da comparação dos resultados obtidos com os ácidos oléico e esteárico foi possível avaliar se a lipase Novozym 435 exibiria seletividade em relação à presença de insaturação na cadeia do ácido graxo,

As reações foram conduzidas em reator fechado a 80°C, com 6% (m/m) de enzima e razão estequiométrica dos reagentes (R=1). De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.3, pode ser observado o mesmo perfil de decaimento do índice de acidez com o tempo para os dois ácidos graxos estudados, indicando que a lipase não exibiu preferência em relação à presença de insaturação do ácido graxo. Após 100 horas de reação, foi obtida uma redução de 101 para 52 na reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila, e de 106 para 53,4 na reação entre ácido esteárico e ricinoleato de metila.

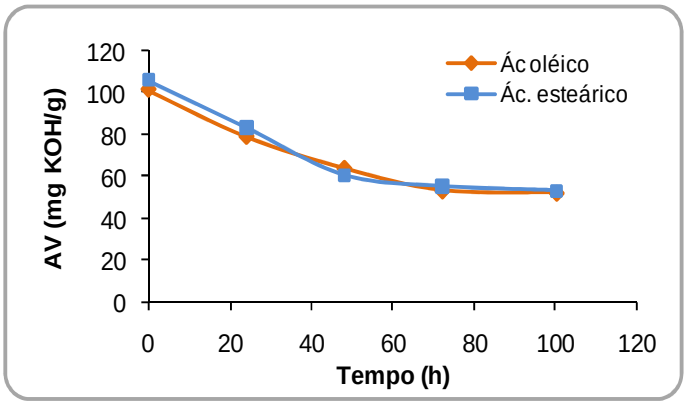


Figura 5.3 Índice de acidez em função do tempo nas reações de condensação entre ácido oléico e ácido esteárico com ricinoleato de metila, empregando razão estequiométrica dos reagentes (R=1) e 6% (m/m) de lipase a 80℃.

Bódalo-Santoyo e colaboradores (2008) obtiveram redução no AV de 180 para 50 após 150 horas de reação (conversão de 72%), com 30 g de ácido ricinoléico e 5 g de lipase de *C. rugosa* imobilizada (atividade hidrolítica de 819U/mg de sólido) em resina de troca iônica (16,6% (m/m)).

5.6 Influência do tempo de reação

Para avaliar a influência do tempo de reação na síntese de estolides, foram realizadas reações de 24, 48, 72 e 100 horas a 80℃ em reator batelada fechado. As reações foram conduzidas entre ácido oléico e ricinoleato de metila e ácido esteárico e ricinoleato de metila usando 6% (m/m) de Novozym 435 e razão molar dos reagentes (R = 1).

As conversões em função do tempo de reação encontram-se na Figura 5.4 onde pode ser observado que o aumento do tempo de reação acarretou no aumento da conversão. No entanto, não foi observada uma variação significativa na conversão com aumento do tempo de reação de 72 para 100 horas, sendo obtidos 46 e 49% de conversão do ácido oléico e 46 e 50% de conversão do ácido esteárico.

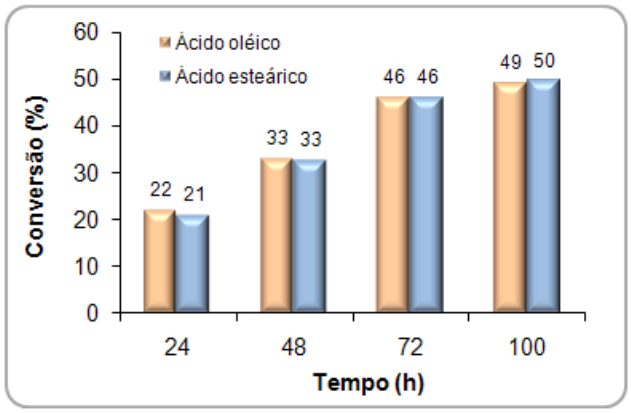


Figura 5.4 Influência do tempo de reação na conversão dos ácidos oléico ou esteárico com ricinoleato de metila a 80℃, empregando razão estequiométrica dos reagentes (R=1), 6% (m/m) de Novozym 435, em reator batelada fechado.

Bódalo-Santoyo e colaboradores (2005a) estudaram a síntese de estolides derivados do ácido ricinoléico a 40ºC catalisada pela lipase de *Candida rugosa* imobilizada em resina de troca iônica (atividade hidrolítica de 819U/mg de sólido). A quantidade de monômero diminuiu com o tempo de reação, diestolides e triestolides alcançaram um máximo com 9 e 56 horas de reação, respectivamente, e a fração

mais pesada de estolide (tetraestolide e estolides maiores) continuou a crescer. Após 330 horas, quando o AV de 40 foi alcançado, 55% dos estolides possuíam quatro ou mais unidades de ácido ricinoléico.

5.7 Efeitos da concentração de água presente no meio

5.7.1 Efeitos da adição de água no meio reacional

Os efeitos da adição de água na conversão foram avaliados nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila e ácido esteárico e ricinoleato de metila em reator batelada fechado. As seguintes condições foram empregadas: 6% (m/m) de enzima, razão estequiométrica dos reagentes, tempo de reação de 48 h e 80℃. Baseado em dados da literatura para reações de esterificação (FORESTI e FERREIRA, 2008), de transesterificação (YANG *et al*., 2006) e de síntese de estolides (BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2005), a concentração de água escolhida para se investigar a influência de adição de água no meio reacional foi de 20% (m/m).

A Figura 5.5 apresenta as conversões após 48 h. A adição de água no meio reacional diminuiu a conversão, não sendo observadas conversões significativas após 48 horas de reação para ambos os ácidos graxos. A elevada concentração de água no meio pode ter promovido à formação de grumos de enzima, bem como ter favorecido a reação de hidrólise devido à competição da água pelo sítio ativo da lipase.

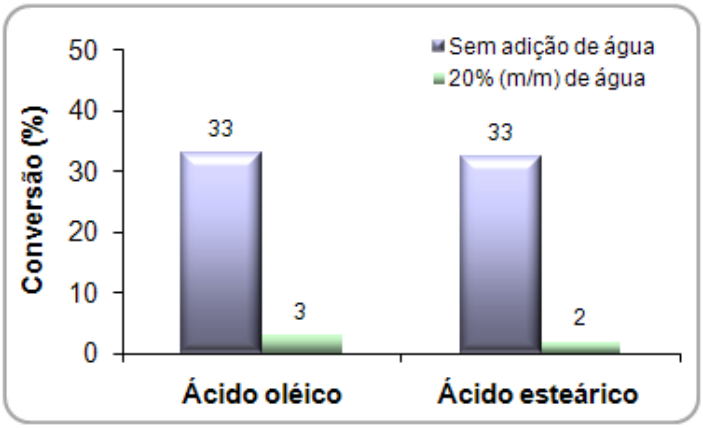


Figura 5.5. Efeitos da adição de água na conversão dos ácidos oléico ou esteárico com ricinoleato de metila, após 48 horas, empregando razão molar dos reagentes (R=1), 6% (m/m) de enzima a 80℃ em reator batelada fechado.

Bódalo-Santoyo e colaboradores (2005) observaram que a concentração inicial de água de 4.000 ppm não foi suficiente para manter a estrutura catalítica da lipase de *Candida rugosa* em reações de síntese de estolides derivados do ácido ricinoléico. Quando a concentração de água aumentou de 4.000 para 77.000 ppm (0,4 a 7,5%), foi obtido um decréscimo no valor do AV mais pronunciado. Entretanto, na concentração de 510.000 ppm (50% (m/m de água)) a taxa de reação diminuiu devido ao favorecimento da reação reversa (hidrólise). A concentração de água considerada ótima foi de 77.000 ppm (7,5% (m/m)). Nessas condições os autores obtiveram AV de 65 após 48 horas de reação (conversão de 64%).

Yoshida e colaboradores (1997) também obtiveram melhores resultados com adição de água no meio (1.800 a 4.200 ppm) na síntese de estolides de ácido ricinoléico catalisada pela lipase de *C. rugosa*.

Entretanto, os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que a adição de água no meio diminuiu a conversão da reação. Nesse caso, o elevado teor de água presente no reagente ricinoleato de metila (0,96% (m/m)) foi suficiente para manter o meio com as quantidades traços de água necessárias para a manutenção da atividade catalítica da lipase.

Trubiano e colaboradores (2007) observaram que a presença de 20% (m/m) de água na síntese de oleato de etila com lipase Novozym 435 em meio sem solvente acarretou na redução da conversão de reação. Os resultados obtidos foram justificados pelo fato da lipase de *Candida antarctica* B (CALB) não requerer a presença de uma interface óleo/água para exibir maior atividade, ou seja, não exibir ativação interfacial.

5.7.2 Remoção da água do meio

Com o objetivo de investigar a influência da remoção da água produzida na reação de condensação, foram investigados três métodos de eliminação da água do meio reacional: evaporação simples, peneira molecular e vácuo.

5.7.2.1 Emprego de sistema reacional aberto

As reações em reator aberto foram conduzidas por 24 horas a 80℃, com 6% (m/m) de lipase comercial e razão molar dos reagentes (R=1). Os resultados

encontram-se na Figura 5.6. Pode ser observado que menores conversões foram obtidas nas reações conduzidas em reator aberto em relação às reações realizadas em reator fechado, para os dois ácidos graxos estudados. Esse resultado foi mais pronunciado nas sínteses com ácido esteárico, onde a conversão obtida em reator fechado após 24 horas de reação foi de 21 %, enquanto o emprego de reator aberto acarretou em uma conversão de apenas 4 %.

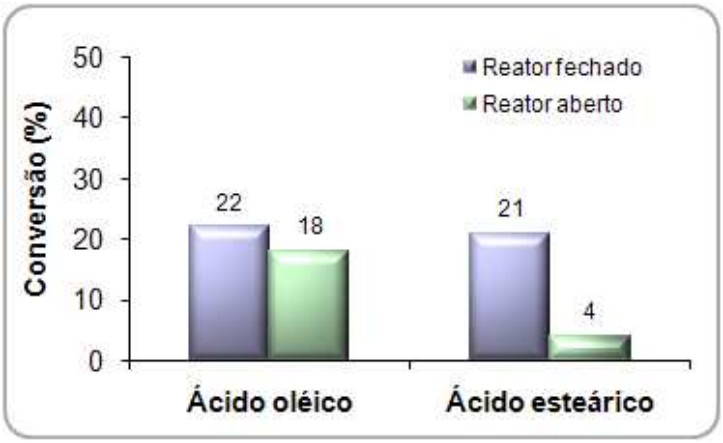


Figura 5.6. Efeito do emprego de reator aberto na conversão após 24 horas de reação entre ácido oléico ou ácido esteárico e ricinoleato de metila. Temperatura de 80℃, 6% (m/m) de Novozym 435 e razão estequiométrica dos reagentes (R=1).

Nas reações conduzidas em reator aberto observou-se emulsificação do meio, o que pode ser atribuído ao fato do biodiesel de mamona ser higroscópico. Os grupamentos hidroxila presentes no ricinoleato de metila fazem com que o reagente possua característica hidrofílica. Desse modo, as moléculas de água presentes no ambiente são adsorvidas, promovendo emulsificação do meio reacional, agregação do catalisador e redução da atividade enzimática. Além disso, a água adsorvida pelas moléculas de ricinoleato de metila pode promover a reação reversa (hidrólise) (FORESTI *et al*., 2007).

5.7.2.2 Emprego de peneira molecular

A adição de peneiras moleculares como uma segunda alternativa para a remoção da água do meio reacional foi estudada empregando-se peneira molecular de 3Å (SIGMA). A peneira molecular foi adicionada no meio reacional no início (t = 0h), após 6 e após 24 horas de reação. As reações foram conduzidas na razão

estequiométrica dos reagentes (R=1), com 6% (m/m) de lipase comercial, 500 mg de peneira, temperatura de 80℃ e reator fechado duran te 48 horas. A peneira molecular foi previamente seca em mufla a 300℃ por 3 horas e o percentual médio de água presente na peneira utilizada foi de 10,5%.

Os resultados estão ilustrados na Figura 5.7. A adição do agente secante no início da reação não acarretou em alteração significativa na conversão em relação à reação sem o emprego de peneira molecular, o que pode ser atribuído à excessiva remoção de água necessária para a manutenção da estrutura catalítica da lipase pelo agente secante adicionado no início da reação. No entanto, quando a peneira foi adicionada após 6 ou 24 horas de reação foi observado um aumento na conversão, devido à remoção da água produzida na reação pelo agente secante.

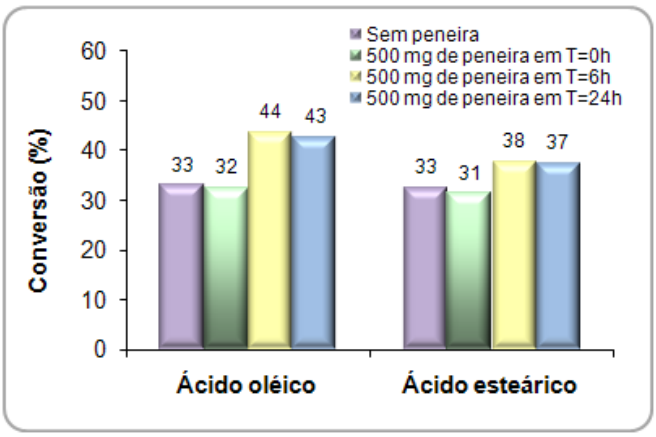


Figura 5.7. Efeito do tempo de adição de peneira molecular na conversão após 48 horas de reação entre ácido oléico ou ácido esteárico e ricinoleato de metila, empregando reator fechado, 6% (m/m) de Novozym 435 e razão estequiométrica dos reagentes (R=1) a 80℃.

Para avaliar os efeitos da quantidade de peneira molecular, foram realizados experimentos com 100, 250, 500 e 650 mg de peneira, na razão estequiométrica dos reagentes, temperatura de 80℃ e teor de Novozym 43 5 de 6% (m/m). Maiores concentrações de peneira não foram investigadas, pois isso acarretaria em dificuldades de agitação do meio reacional. Em todos os experimentos o agente secante foi adicionado após 6 horas de reação, tendo em vista que essa foi a melhor condição obtida com relação ao tempo de adição do agente dessecante. Os resultados encontram-se na Figura 5.8. Após 48 horas de reação ocorreu um aumento da conversão com o aumento na quantidade de peneira molecular. Os

melhores resultados de conversão foram obtidos com 650 mg de peneira adicionadas após 6 horas de reação (45% para o ácido oléico e 41% para o ácido esteárico). Entretanto, pode-se observar que a adição de 650 mg de peneira não produziu uma alteração significativa na conversão quando comparada ao resultado obtido empregando-se 500 mg do agente secante, principalmente nas reações com ácido oléico.

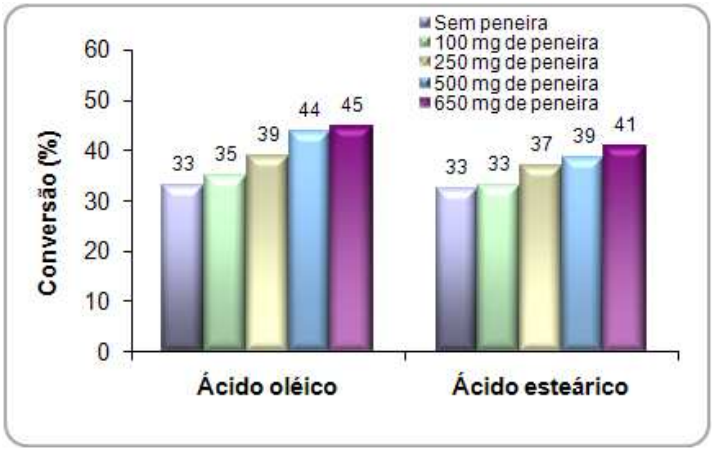


Figura 5.8. Efeitos da quantidade de peneira molecular de 3Å adicionada após 6 horas na conversão após 48 horas de reação entre ácido oléico ou ácido esteárico e ricinoleato de metila empregando razão estequiométrica dos reagentes e 6% (m/m) de Novozym 435 a 80℃.

Tarahomjoo e Alemzadeh (2002) estudaram o efeito da adição de peneira molecular na reação de acilação entre glicose e ácido palmítico, catalisada pela lipase de *Rhizomucor miehei* em meio com solvente e observaram que quantidades superiores a 500 mg de peneira molecular acarretavam em baixos rendimentos. O fato foi atribuído à excessiva remoção da camada de água essencial que reveste a enzima pelo agente secante. Entretanto, Adachi e Kobayashi (2004) investigaram a adição de peneiras moleculares de 3Å na reação de esterificação entre manose e ácido láurico catalisada pela lipase imobilizada de *Candida antarctica* B, e obtiveram elevadas conversões empregando 100 g/L de peneira, ou seja, praticamente o dobro da concentração de agente dessecante utilizada nesse trabalho (50 g/L).

5.7.2.3 Emprego de vácuo

O emprego de vácuo como alternativa para a remoção da água do meio reacional foi investigado em reações realizadas a 80℃, na razão estequiométrica dos

reagentes (R=1) e 6% (m/m) de lipase comercial em reator batelada fechado. Considerando os resultados obtidos nos experimentos com peneira molecular (item 5.7.2.2), o emprego de vácuo também foi avaliado desde o início da reação (t = 0h) e após 6 horas de reação. De acordo com a Figura 5.9, verificou-se que a utilização de vácuo (0,45 mmHg) aumentou a conversão. No entanto, não se observaram diferenças significativas em relação ao seu uso desde o início ou após 6 h de reação (44 e 45% de conversão, respectivamente).

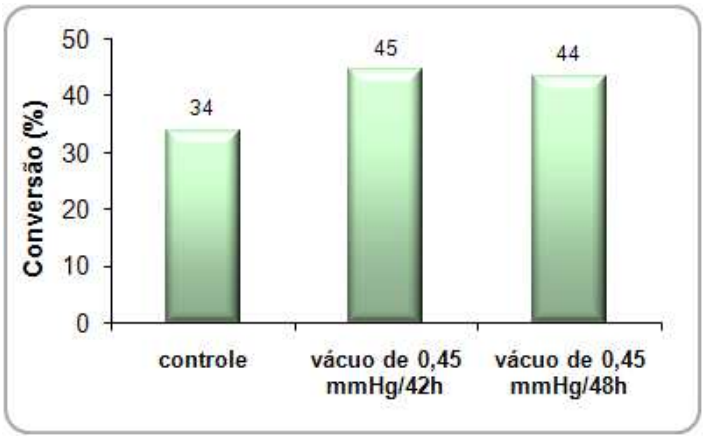


Figura 5.9. Influência do emprego de vácuo na conversão após 48 horas de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila a 80℃, teor de Novozym 435 de 6% (m/m) e razão estequiométrica dos reagentes, sob pressão de 0,45 mmHg a partir de t=0h ou t=6h.

Bódalo-Santoyo e colaboradores (2009) utilizaram um sistema de vácuo (160 mmHg) juntamente com uma corrente de ar seco para remoção da água produzida na reação de síntese de estolides de ácido ricinoléico catalisada pela lipase de *C. rugosa* (atividade hidrolítica de 819U/mg de sólido). O tempo de permanência de secagem exerceu uma grande influência na reação devido à desidratação excessiva da lipase quando o meio foi submetido a longos tempos de secagem (21 horas). Após 48 horas, os melhores resultados foram obtidos quando o sistema de remoção da água permaneceu ligado por 7 horas (68% de conversão).

Na Figura 5.10 são comparados os resultados obtidos após 48 horas de reação, nos experimentos empregando vácuo de 0,45 mmHg e 500 mg de peneira. Pode-se observar que o resultado obtido com emprego de 500 mg de peneira molecular adicionada após 6 horas de reação (44%) foi praticamente o mesmo obtido quando a reação progrediu sob vácuo a partir de 6 horas de reação (45%). Desse modo, tendo em vista os custos operacionais, a adição de peneira molecular para a

remoção da água do meio reacional representa uma metodologia mais eficiente, visto que a peneira molecular pode ser lavada ao final da reação e reutilizada, reduzindo os custos, além do custo energético do processo empregando vácuo.

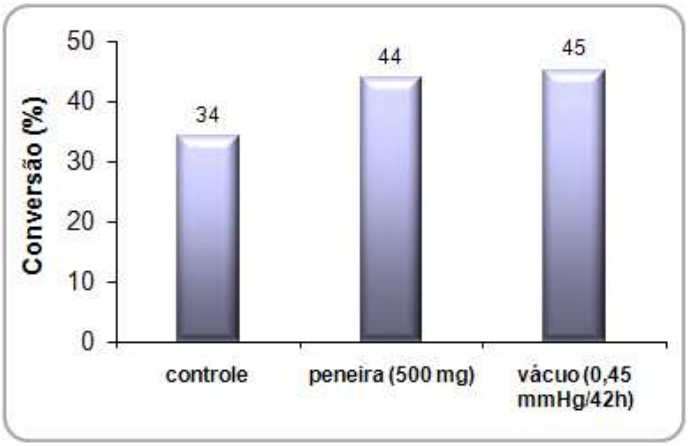


Figura 5.10. Conversões após 48 h na reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila com 500 mg de peneira molecular adicionada após 6 h ou vácuo de 0,45 mmHg ligado após 6 h de reação. Reações conduzidas a 80℃, com 6% (m/m) de Novozym 435 e razão estequiométrica dos reagentes.

Yoshida e colaboradores (1997) estudaram a reação de síntese de estolide catalisada pela lipase de *C. rugosa* imobilizada em cerâmica empregando as seguintes pressões de vácuo: 110 mmHg (0,13 atm), 310 mmHg (0,41 atm), 410 mm Hg (0,54 atm) e 760 mmHg (1 atm). A condição de 110 mmHg mostrou ser a mais vantajosa, com alcance de AV de 40 após 70 horas de reação, enquanto que na pressão atmosférica, foi obtido um AV de 60.

Isbell e colaboradores (1997) observaram que a remoção de água por vácuo de 9 mmHg (0,011 atm) promoveu um aumento no rendimento em reações de síntese de estolides derivados do ácido oléico com ácido sulfúrico como catalisador.

Linko e colaboradores (1998) investigaram o emprego de vácuo na síntese de poliésteres derivados de ácidos dicarboxílicos com dióis utilizando como catalisador a lipase imobilizada de *R. miehei*. Após 20 horas, a pressão no meio reacional foi reduzida para 0,15 mmHg (0,0002 atm), e os autores obtiveram um aumento de quatro vezes na massa molar dos poliésteres obtidos na poliesterificação desses dióis com diácidos, em relação à reação conduzida sob pressão atmosférica.

Mahapatro e colaboradores (2004) utilizaram vácuo de 10 mmHg para remoção da água produzida na reação de poliesterificação de diferentes hidroxiácidos

catalisada pela lipase da *Candida antarctica* (Novozym 435) a 90℃. No início da reação, o grau de polimerização foi maior nas reações onde o vácuo não foi empregado, devido ao fato da quantidade de água encontrar-se abaixo da requerida para a manutenção da atividade enzimática. Após 4 ou 8 horas de reação foi observada uma redução na velocidade de reação das reações conduzidas sem a remoção da água. Entretanto, após 48 horas de reação o grau de polimerização obtido com e sem emprego de vácuo foi similar.

5.8 Velocidade de agitação

A influência da velocidade de agitação foi investigada em micro reator de bancada com capacidade de 50 mL (Reator Parr modelo 4843). Esse parâmetro foi avaliado com o objetivo de se determinar a velocidade de agitação que seria utilizada para o estudo da influência da pressão nesse sistema. As reações foram realizadas por 48 horas, com 6% (m/m) de enzima e razão estequiométrica dos reagentes. A pressão dentro do reator não aumentou durante a reação. Pode ser observado na Figura 5.11 que não houve alteração significativa na conversão para velocidades de agitação de até 550 rpm. No entanto, na velocidade de 650 rpm ocorreu uma redução de 7% na conversão. Além disso, pode ser observado que as conversõas obtidas nesse sistema foram inferiores as obtidas no sistema convencional com agitação magnética (33%). Esse resultado pode ser atribuído a um possível depósito da enzima no fundo do reator devido à grande quantidade de lipase imobilizada requerida no reator Parr para se obter concentração de 6% (m/m) de biocatalisador. Com não era possível observar o que ocorria no sistema reacional, pois o reator era feito de aço, a agitação pode não ter sido suficiente para manter a enzima em suspensão no meio.

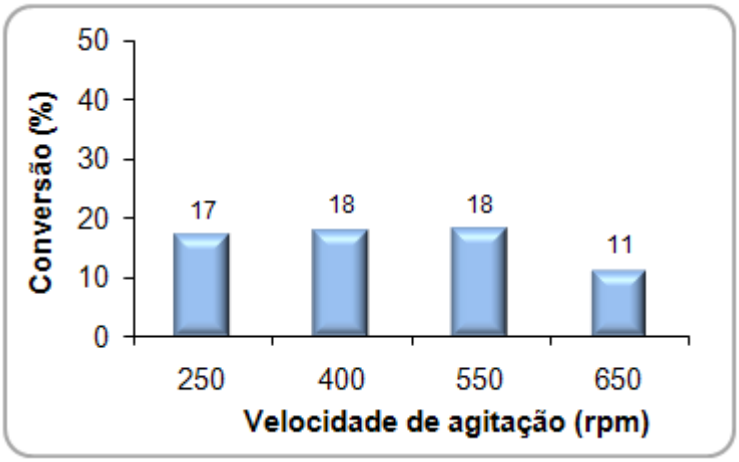


Figura 5.11. Influência da velocidade de agitação na conversão após 48 horas de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila, empregando teor de Novozym 435 de 6% (m/m), razão estequiométrica dos reagentes a 80℃ em micro reator de bancada com agitador do tipo hélice de impulsão.

5.9 Reação sob pressão

Para investigar o efeito do emprego de pressão na conversão do ácido oléico na reação de síntese de estolides, foram conduzidas reações de 48 horas entre ácido oléico e ricinoleato de metila em micro reator de bancada (reator Parr modelo 4843) a 80℃, com razão estequiométrica dos reagentes e 6% (m/m) de Novozym 435. A velocidade de agitação foi de 550 rpm, considerando os resultados obtidos no item 5.8. As pressões investigadas foram de 100 e 250 psi (6,8 e 17 atm). Nitrogênio foi utilizado para a pressurização do sistema.

As conversões estão ilustradas na Figura 5.12 e demonstram que o aumento na pressão promoveu uma redução de 4% na conversão em relação à reação realizada a pressão atmosférica. Entretanto, não foram observadas diferenças nos resultados de conversão obtidos para as pressões de 6,8 e 17 atm.

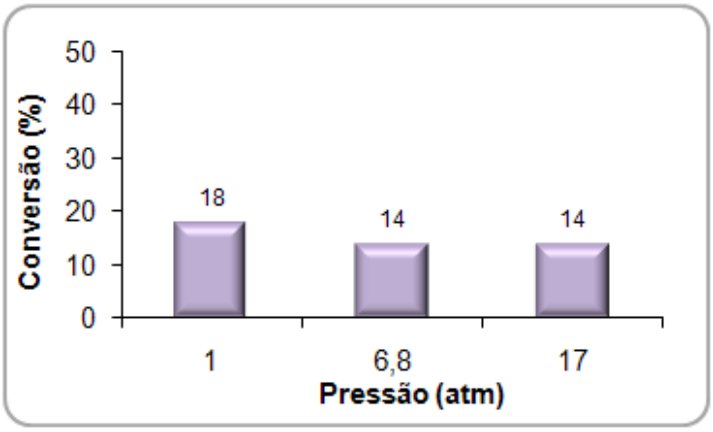


Figura 5.12. Influência do emprego de pressão na conversão após 48 horas de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila a 80℃, empregando 6 % (m/m) de Novozym 435 e razão estequiométrica dos reagentes.

Algumas modificações estruturais induzidas pelo aumento de pressão podem alterar a estabilidade, atividade e especificidade da proteína (MOZHAEV *et al*., 1996). Desse modo o emprego de pressões acima de 1 atm pode ter promovido mudanças conformacionais na estrutura da lipase, acarretando em inativação da proteína.

Embora trabalhos reportem aumento na estabilidade de lipases sob sistemas de alta pressão utilizando principalmente fluidos supercríticos (ROMERO *et al*., 2005; MARIE-OLIVE *et al*., 2000; HLAVSOVA *et al*., 2008), é amplamente reconhecido que a pressão é potencialmente desnaturante para proteínas. A faixa de pressão capaz de desnaturar proteínas depende do tipo e da fonte da enzima, da natureza do meio no qual a enzima encontra-se dispersa, da intensidade da pressão, da temperatura e do tempo de exposição à pressão. Algumas enzimas são facilmente inativadas em baixas pressões (< 400MPa = 3,95 atm) em temperatura ambiente, enquanto outras requerem altas pressões para serem inativadas (RIAHI e RAMASWAMY, 2004).

Mozhaev e colaboradores (1996) investigaram o efeito da pressão sobre a atividade da enzima α-quimotripsina e observaram que, na pressão de 4,5 atm a velocidade de reação aumentou em 6,5 vezes relação à pressão atmosférica. A ativação e estabilização da enzima em alta pressão foram atribuídas ao aumento da hidratação da proteína sob pressões maiores que a atmosférica. No entanto, os mesmos autores observaram redução da atividade catalítica da enzima α-quimotripsina em pressões de 5 a 5.000 atm devido à desnaturação provocada pela alta pressão. Pressões superiores a 4.940 atm levaram a um maior aumento das

flutuações conformacionais e, dessa forma, a hidratação da proteína poderia promover a agregação e perda da estrutura secundária da enzima.

5.10 Efeitos da temperatura

Para avaliar os efeitos da temperatura na reação entre ricinoleato de metila e ácido oléico, experimentos foram realizados nas temperaturas de 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C, durante 24 horas, com razão estequiométrica dos reagentes e 6% (m/m) de Novozym 435. A Figura 5.13 mostra a conversão após 24 h. Pode ser observado que o aumento da temperatura até 90℃ favoreceu a conve rsão, com 31% de conversão sendo obtidos após 24h de reação. Entretanto os valores de conversão obtidos em 90 e 100℃ foram similares, indicando que temperaturas superiores a 100℃ acarretariam em desativação térmica da lipase.

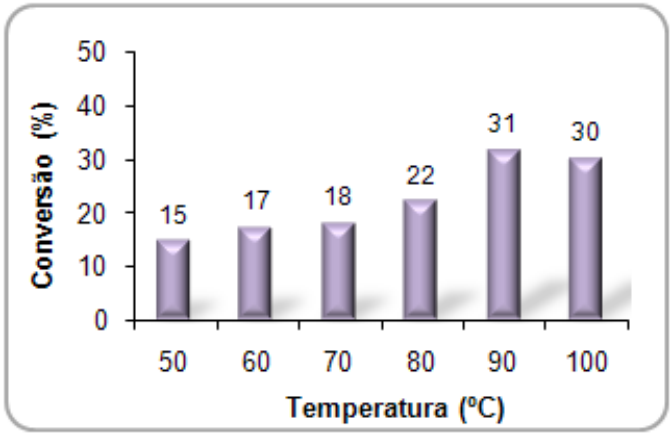


Figura 5.13 Efeitos da temperatura na conversão após 24 horas de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila com razão estequiométrica dos reagentes e 6% (m/m) de Novozym 435.

Embora, a maior parte dos trabalhos relacionados à síntese de estolides de ácido ricinoléico empregando lipases como catalisadores utilize temperaturas mais brandas de reação (40℃), a reação estudada nesse t rabalho foi favorecida em maiores temperaturas.

Mahapatro e colaboradores (2004) também observaram que a lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435) manteve atividade a 90℃ em reações de poliesterificação de diferentes hidroxiácidos. Entretanto, segundo os autores,

temperaturas superiores a 90℃ poderiam acarretar na formação de lactonas e na desnaturação da enzima.

Estudos mostraram que o grau de polimerização e a taxa de reação aumentaram com o aumento da temperatura em reações de síntese de estolides a partir dos ácidos 5-hidroxi pentanóico e 6-hidroxi hexanóico empregando as lipases pancreática e de *Pseudomonas sp.* (UYAMA e KOBAYASHI, 1993; UYAMA *et al*., 1995).

Foi reportado que as taxas de síntese de estolides de ω-HFA bem como de lactonas aumentam em elevadas temperaturas (HAYES, 1996). Entretanto, quando cadeias de ácidos graxos longas com a hidroxila presente no carbono central (ácido ricinoléico C18:1-OH12 e ácido lesquerólico C20:1-OH14) foram expostas a ação das lipases, estolides foram identificados como principais produtos, não sendo detectada a formação de lactonas. Os estudos utilizando ácido ricinoléico tiveram como produto de maior peso molecular tetraestolides e a formação de estolide ocorreu rapidamente tanto em meio com grande quantidade de água como em meio quase anidro (HAYES, 1996).

Com o objetivo de verificar se a reação estaria progredindo devido à ação catalítica da lipase ou devido às altas temperaturas empregadas (90 e 100℃), um teste em branco, conduzido na ausência de biocatalisador, foi realizado a 100℃, com razão estequiométrica dos reagentes (0,015 mol de ácido oléico e 0,015 mol de ricinoleato de metila). Como mostrado na Figura 5.14, não foi observada redução significativa no AV (índice de acidez) após 24 horas de reação, o que demonstra que a reação ocorreu devido à atuação catalítica da enzima.

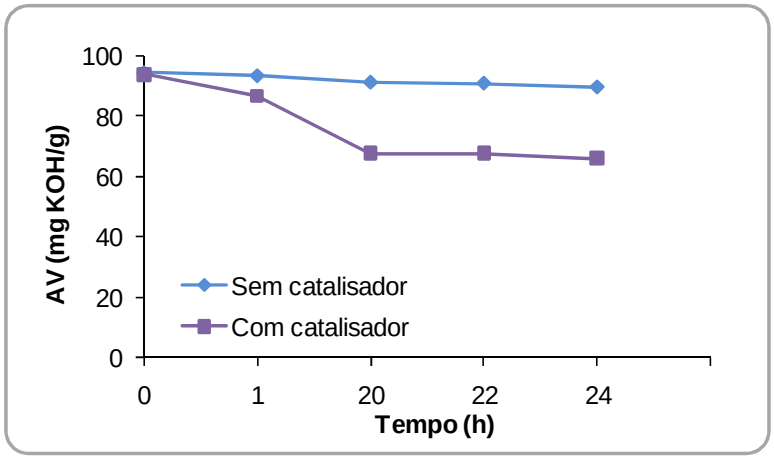


Figura 5.14 Efeito da presença de biocatalisador na redução do índice de acidez determinado nas reações conduzidas a 100℃, na razão estequiométric a dos reagentes, na ausência e na presença de 6% (m/m) de Novozym 435.

5.11 Efeitos da concentração de biocatalisador

Os efeitos da concentração de Novozym 435 na reação entre ricinoleato de metila e ácido oléico foram investigados empregando teores da preparação enzimática comercial de 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18% m/m (massa de preparação enzimática/massa total de reagentes). A faixa de concentração estudada foi escolhida com base em dados obtidos no trabalho de Bódalo e colaboradores (2009) que utilizaram concentração de lipase imobilizada de *C. rugosa* de 8,33 a 33% (m/m) em em reações de síntese de estolides a partir de ácido ricinoléico. Na reação realizada com a maior concentração de lipase (18%) ocorreu formação de grumos, o que impossibilitou a retirada de amostras representativas do meio reacional. Dessa forma, não foi possível acompanhar o progresso da reação, não sendo obtidos os resultados desse experimento.

De acordo com a Figura 5.15, pode-se observar que o aumento na concentração de biocatalisador de 4 até 14% (m/m) promoveu um aumento na conversão (e diminuição do índice de acidez final), como esperado. Entretanto, o emprego de 16% (m/m) de Novozym acarretou em redução na conversão de ácido graxo (43%) em relação ao emprego de 14% (m/m) (53%), o que pode ser atribuído a limitações de transferência de massa externa. Portanto, o melhor resultado de conversão após 24 h foi de 53% com 14% (m/m) de Novozym 435 para a temperatura de 90℃.

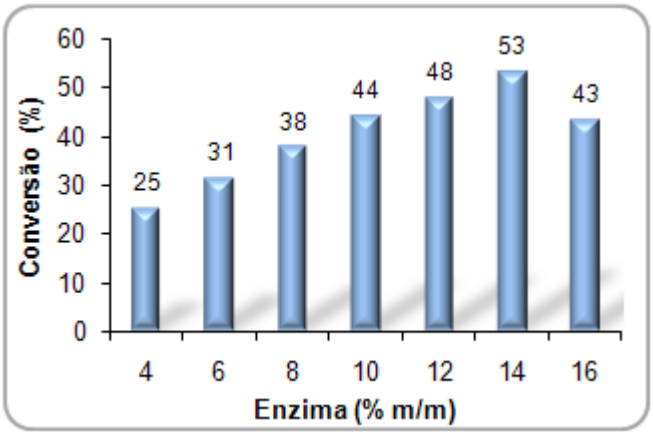


Figura 5.15 Efeitos da concentração de Novozym 435 na reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila empregando razão estequiométrica dos reagentes, a 90ºC.

O fenômeno de formação de grumos acarreta em distribuição não homogênea das lipases. As moléculas de enzima são expostas a altas concentrações de substrato, mas a transferência de massa sobre a partícula do catalisador agregado pode limitar severamente a concentração de substrato dentro da partícula. A baixa atividade de uma fração do catalisador reduz o rendimento global, diminuindo a eficiência por unidade de massa do biocatalisador (FORESTI e FERREIRA, 2005).

Trabalhos que utilizam lipases imobilizadas na obtenção de ésteres a partir de reações de esterificação entre ácido oléico e etanol demonstram que altas concentrações de lipase imobilizada promovem aglomeração enzimática, sem aumento significativo no rendimento (TRUBIANO *et al.*, 2007; FORESTI e FERREIRA, 2005). De acordo com Ramachandran e colaboradores (2006) para baixas concentrações de lipase de *Candida rugosa,* a velocidade inicial de hidrólise de óleo de palma aumentou linearmente com o teor de enzima. No entanto, com elevadas concentrações da lipase, essa relação linear atingiu um platô, especialmente para baixas velocidades de agitação, devido à saturação da área interfacial com moléculas de enzima, o que limitou a disponibilidade de substrato para a reação.

Bódalo e colaboradores (2009) observaram que mudanças mais significativas no AV final foram obtidas quando a concentração de lipase aumentou de 8,33 para 16,6% (m/m) em relação ao aumento de 16,6 para 33% em reações de síntese de estolides a partir de ácido ricinoléico a 40℃. De acordo com os autores, o emprego

de 10g de enzima em 30g de ácido promoveu dificuldade de manipulação dos experimentos devido à alta concentração de lipase no meio.

Mahapatro e colaboradores (2004) investigaram os efeitos da concentração de lipase em reações de poliesterificação do ácido 12-hidroxidodecanóico catalisada pela lipase da *Candida antarctica* (Novozym 435) a 90℃ sob vácuo de 10 mmHg. A polimerização ocorreu mais rapidamente quando a concentração de enzima aumentou de 0,1 até 10% (m/m). No entanto, após 24 horas de reação, os produtos de ambas as reações apresentaram pesos moleculares similares.

5.12 Avaliação dos produtos obtidos por cromatografia em fase gasosa

5.12.1 Reações empregando apenas um reagente

As reações com apenas um reagente foram realizadas com o objetivo de avaliar quais os possíveis produtos gerados na reação do ácido oléico com ricinoleato de metila catalisada pela lipase Novozym 435.

5.12.1.1 Ácido oléico

Inicialmente, estudou-se a reação com 0,030 mol de ácido oléico (8,46g), teor de Novozym de 6% (m/m) a 80℃ para verificar se haveria a formação de um dímero do ácido oléico, conforme a Figura 5.16. Após 48 horas de reação, foi observada redução no índice de acidez de apenas 2,9 (conversão de 1,52%). Da mesma forma, de acordo com a análise cromatográfica apresentada na Figura 5.17, também não foi observada redução na área referente ao pico do ácido oléico, comprovando que o percentual de ácido oléico (tempo de retenção = 7,2 min) no meio reacional não se alterou durante o progresso da reação. Esses resultados indicam que a lipase empregada não catalisou a reação de condensação entre duas moléculas de ácido oléico.

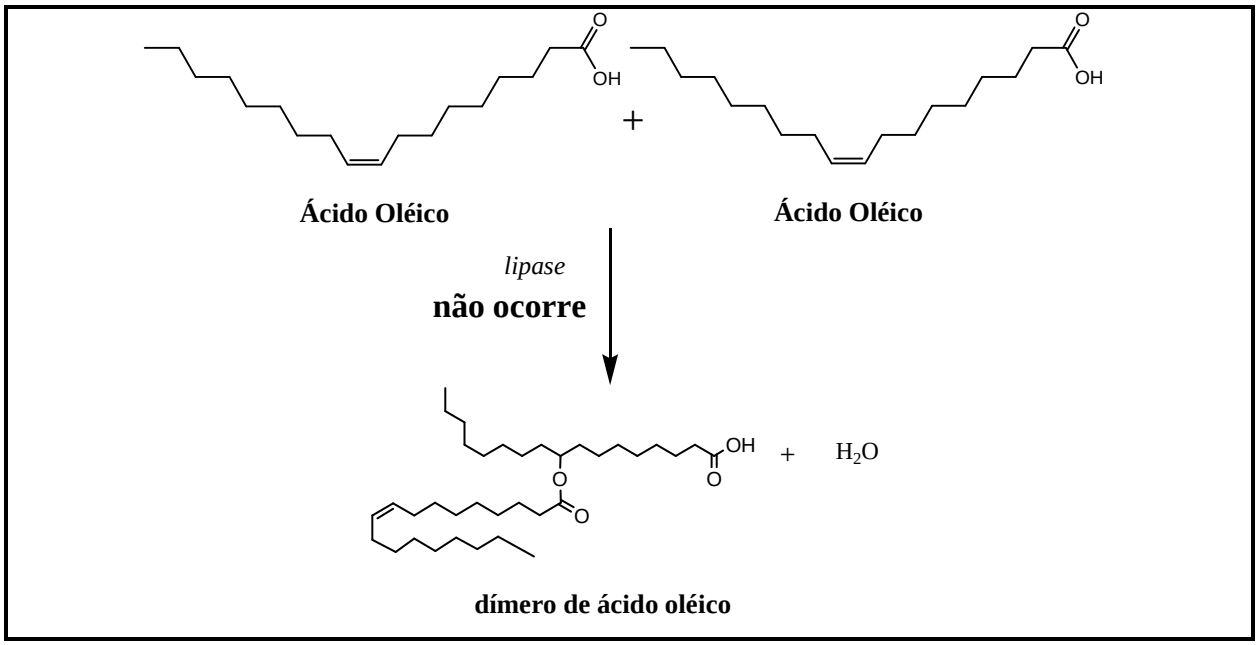
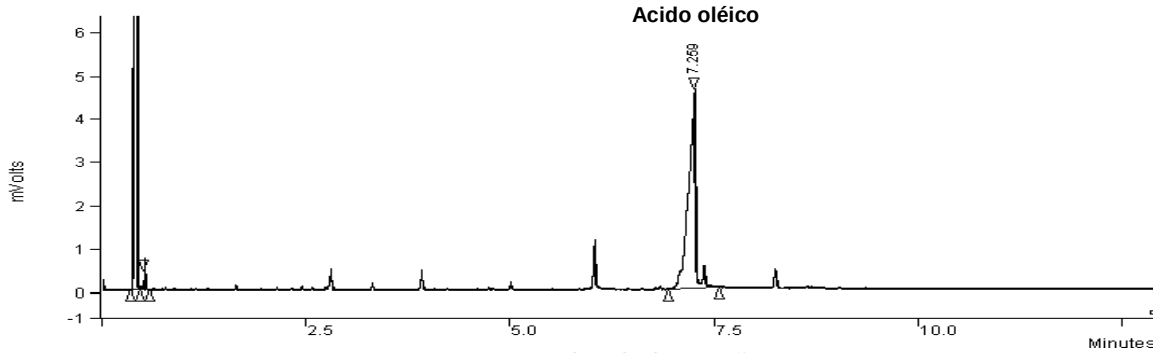
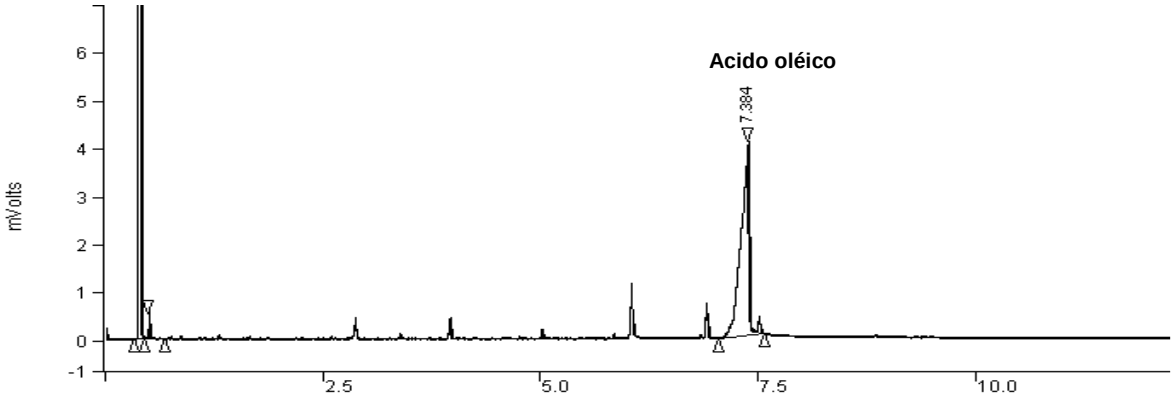


Figura 5.16. Reação empregando ácido oléico como reagente.



a) 0h de reação



b) 48h de reação

Figura 5.17. Perfis cromatográficos obtidos no início (0h) e após 48 horas na reação empregando ácido oléico a 80℃, teor de enzima de 6% (m/m) e reator batelada fechado.

Esses resultados já eram esperados uma vez que lipases são enzimas específicas que catalisam reações de esterificação envolvendo um grupamento carbonila e um grupamento hidroxila com liberação de água como subproduto. A reação entre duas moléculas de ácido oléico caracteriza-se por ser uma reação de adição, envolvendo a ligação dupla presente no ácido.

Peláez e colaboradores (2003) investigaram a produção de estolides empregando cultura bacteriana de *Pseudomonas* sp. contendo ácido oléico como fonte de carbono. A lipase de *Pseudomonas* sp. foi extraída do meio de cultura para verificar a habilidade da enzima em catalisar a condensação de ácido oléico *in vitro*. A reação foi conduzida na presença de 85 µg de ácido oléico, 30 µg de lipase (35% (m/m)). Foi observado que a lipase parcialmente purificada também foi capaz de catalisar a síntese de estolides derivados de ácido oléico. Entretanto, os resultados obtidos pelos autores foram os únicos encontrados na literatura onde lipases foram empregadas na síntese de estolides de ácido oléico e não está claro no texto como foi realizada a quantificação dos estolides formados.

5.12.1.2 Ricinoleato de metila

A segunda reação estudada empregando apenas um dos reagentes foi conduzida com ricinoleato de metila (0,030 mol, 9,36g), com teor de Novozym de 6% (m/m) a 80℃, durante 48 horas. Os resultados mostr aram que ocorreu um aumento no índice de acidez inicial de 1,4 para 7,5 após 48 horas de reação. Esse fato pode ser atribuído à hidrólise do éster com formação de ácido ricinoléico, catalisada pela lipase, promovendo assim o aumento no índice de acidez. Com relação aos cromatogramas obtidos no início e após 48 horas de reação (Figura 5.18), é possível observar o aparecimento de um pico de área bem pequena e tempo de retenção de aproximadamente 21 min (Figura 5.18b), que poderia ser atribuído ao produto da reação de condensação entre duas moléculas de ácido ricinoléico formadas a partir da hidrólise do ricinoleato de metila (TR = 8,6 min).

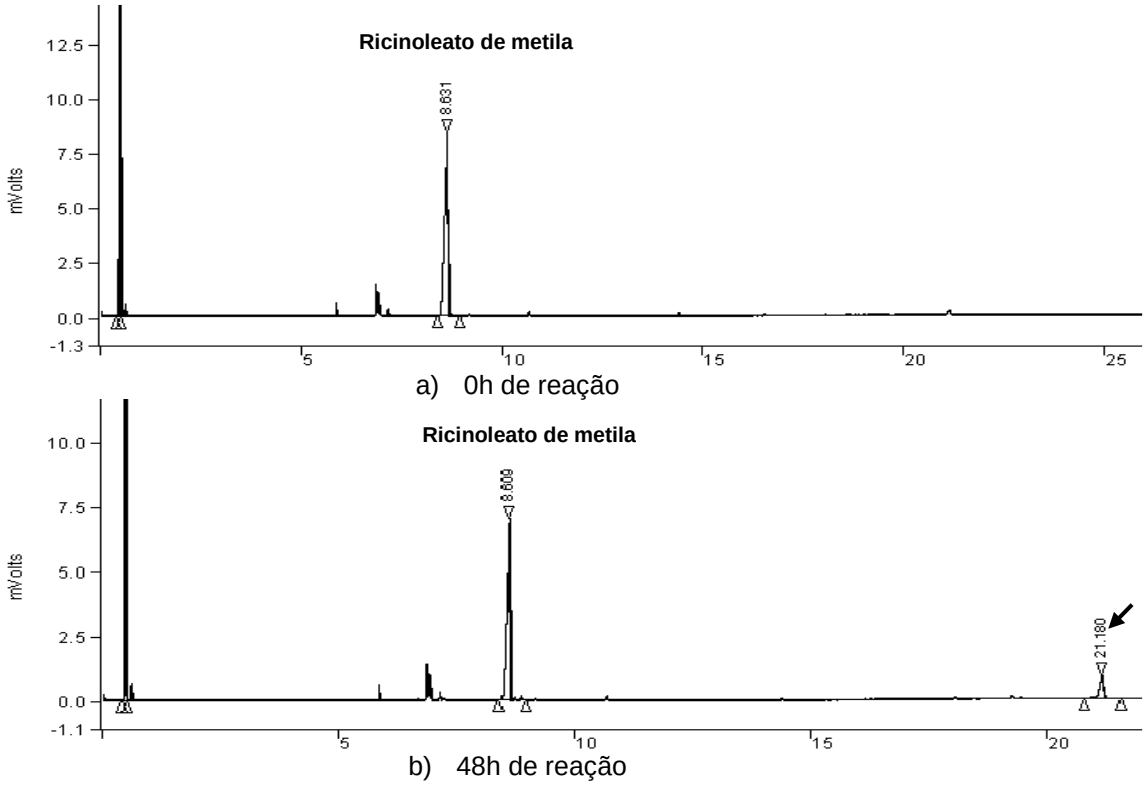


Figura 5.18. Perfis cromatográficos obtidos no início (0h) e após 48 horas na reação empregando ricinoleato de metila a 80℃, teor de enzima de 6% (m/m) e reator fechado.

A Figura 5.19 representa de forma esquemática as possíveis etapas de reações envolvidas com o emprego de ricinoleato de metila como reagente. Nesse caso, a molécula de ricinoleato de metila sofreria hidrólise enzimática produzindo ácido ricinoléico (reação 1), o que justifica o aumento no índice de acidez. O ácido ricinoléico pode então ser esterificado pela lipase (reação 2) formando dímero de estolide.

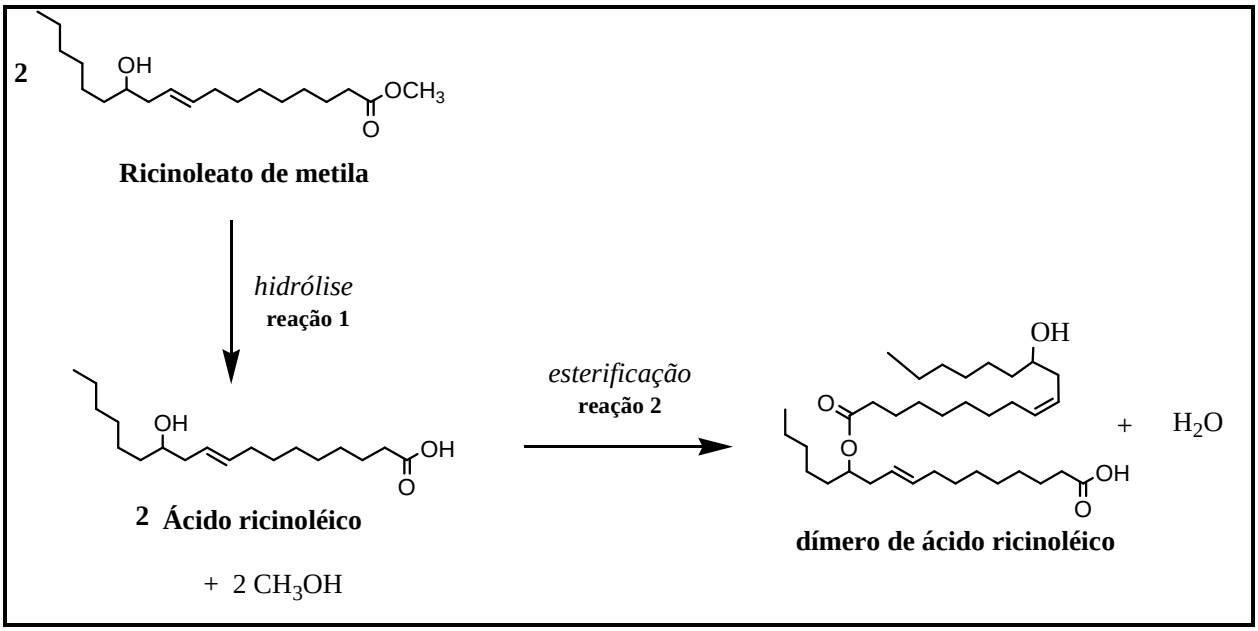


Figura 5.19. Reação empregando ricinoleato de metila como reagente.

5.12.1.3 Ácido ricinoléico

Para confirmar a possibilidade de reação entre duas moléculas de ácido ricinoléico catalisada pela lipase Novozym 435, foram realizadas sínteses empregando ácido ricinoléico comercial (80%) como reagente (0,030 mol, 8,93 g), teor de enzima de 6% (m/m), em reator batelada fechado a 80℃. Após 48 horas de reação foi obtido um valor final de índice de acidez 32,4% menor que o índice de acidez inicial, indicando que a lipase promoveu a condensação das moléculas do ácido ricinoléico.

A partir da análise cromatográfica (Figura 5.20), foi possível observar que o pico referente ao ácido ricinoléico (TR = 8,7 min) praticamente desaparaceu após 48 horas de reação. Além disso, foi observado que a área referente ao tempo de retenção do ácido ricinoléico foi muito baixa até mesmo no início da reação (t = 0h), o que pode ser atribuído a uma possível adsorção do ácido na coluna cromatográfica. Entretanto, não foi observado o pico referente ao produto da reação entre duas moléculas de ácido ricinoléico o que novamente pode estar relacionado com a coluna empregada.

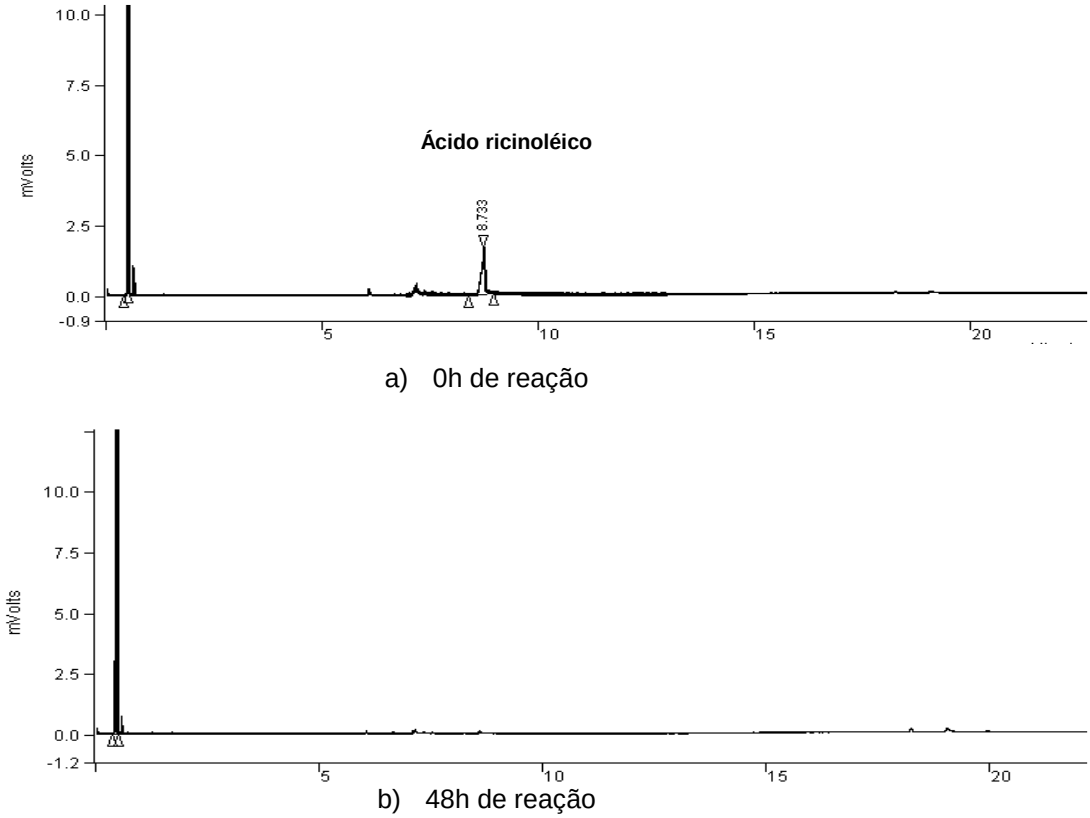


Figura 5.20. Perfis cromatográficos obtidos no início (0h) e após 48 horas na reação empregando ácido ricinoléico a 80℃, teor de enzima de 6% (m/m) e re ator batelada fechado.

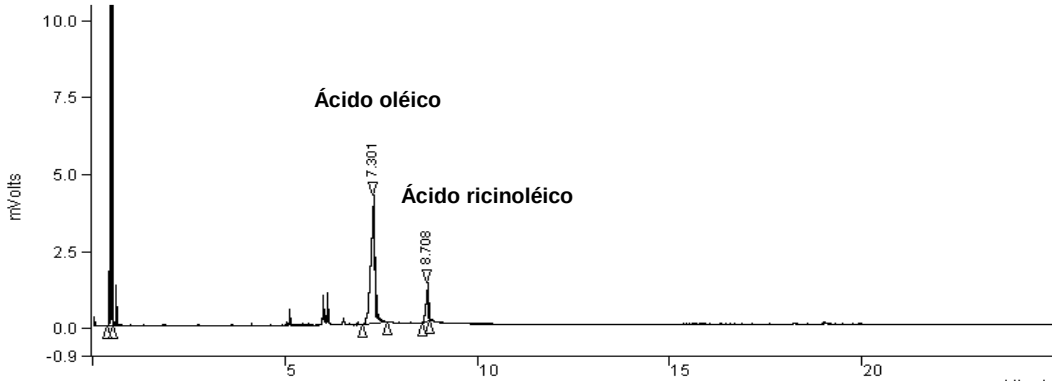
5.12.2 Reações entre ácido oléico e ácido ricinoléico

Considerando os resultados obtidos anteriormente, foi investigada também a reação entre ácido oléico e ácido ricinoléico, a fim de se agrupar os dados e descartar ou validar as possíveis reações que estariam ocorrendo na síntese de estolides de biodiesel de mamona com ácido oléico. As reações entre ácido oléico e ácido ricinoléico foram conduzidas com razão molar dos reagentes igual a 1 (0,015 mol de cada reagente), a 80℃, em reator batelada fechado e com teor de Novozym de 6% (m/m).

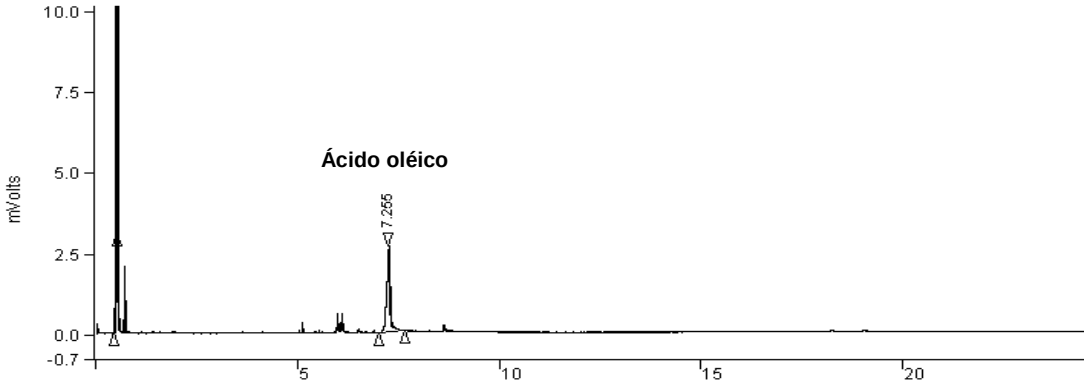
Após 48 horas de reação foi obtido um valor de AV de 155, o que correspondia a uma conversão teórica de 14%, em reação ao valor de AV obtido no início da reação, 180,3.

Na Figura 5.21 estão apresentados os perfis cromatográficos obtidos no início e após 48 horas de reação. Os resultados obtidos por análise cromatográfica mostraram que, enquanto o ácido ricinoléico (TR = 8,7 min) praticamente

desapareceu após 48 horas de reação, o percentual de ácido oléico (TR = 7,2 minutos) presente ainda era alto. Entretanto, cabe ressaltar que apesar de uma provável condensação das moléculas de ácido ricinoléico os dímeros não foram identificados na coluna empregada.



a) 0h de reação



b) 48h de reação

Figura 5.21. Perfis cromatográficos obtidos no início (0h) e após 48 horas na reação entre ácido ricinoléico e ácido oléico a 80℃, teor de enzima d e 6% (m/m), razão molar igual a 1 e reator batelada fechado.

As possíveis reações entre ácido oléico e ácido ricinoléico estão representadas na Figura 5.22.

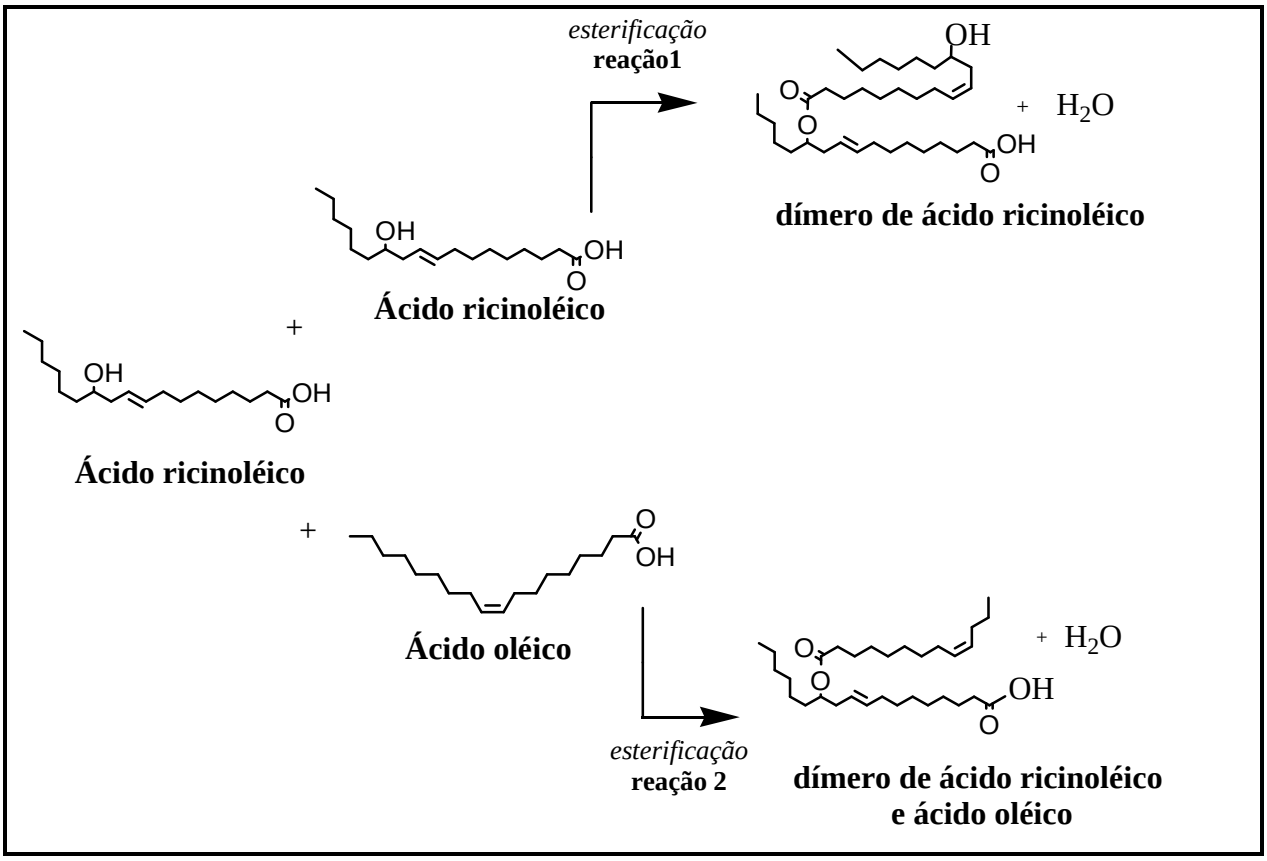
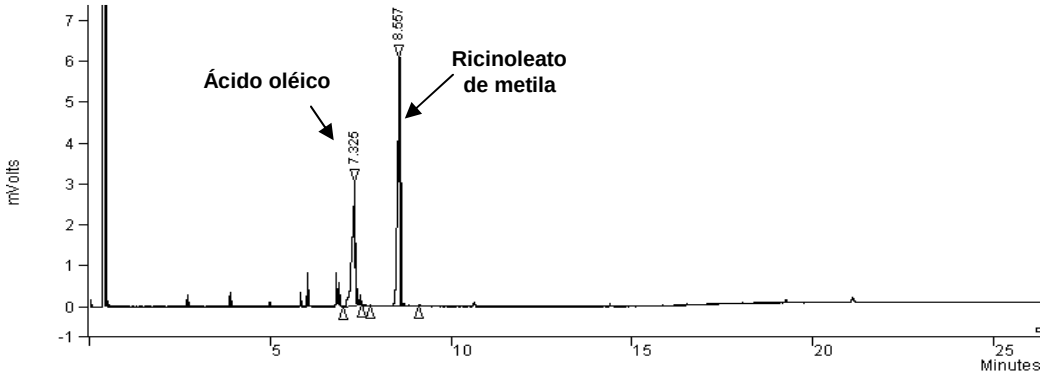


Figura 5.22. Reação empregando ácido oléico e ácido ricinoléico.

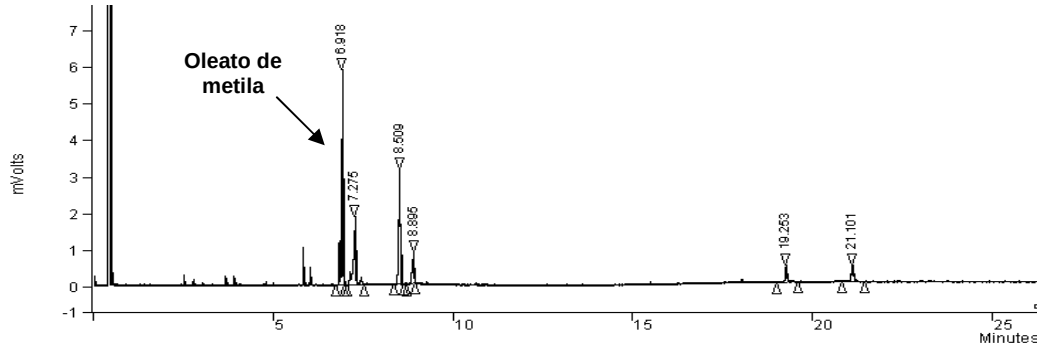
Os resultados indicaram que a lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435) exibiu preferência na catálise de reações de esterificação entre duas moléculas de ácido graxo hidroxilado (ácido ricinoléico, HFA), em relação às reações envolvendo a condensação de uma molécula de ácido graxo hidroxilado (HFA) com uma molécula de ácido graxo não hidroxilado (NHA).

5.12.3 Reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila

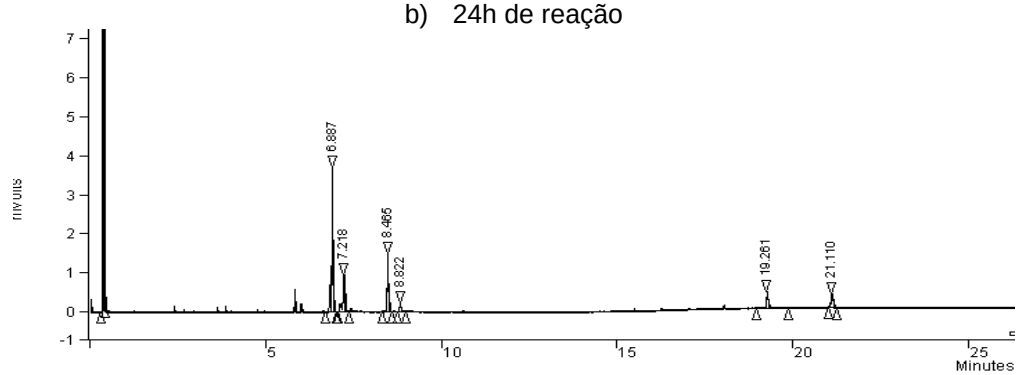
Para a análise dos perfis cromatográficos dos produtos obtidos nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila, as reações foram realizadas a 80℃, com teor de Novozym 435 de 6% (m/m), razão estequiométrica dos reagentes e em reator batelada fechado, durante 72 horas. Os perfis cromatográficos obtidos durante a reação encontram-se na Figura 5.23.



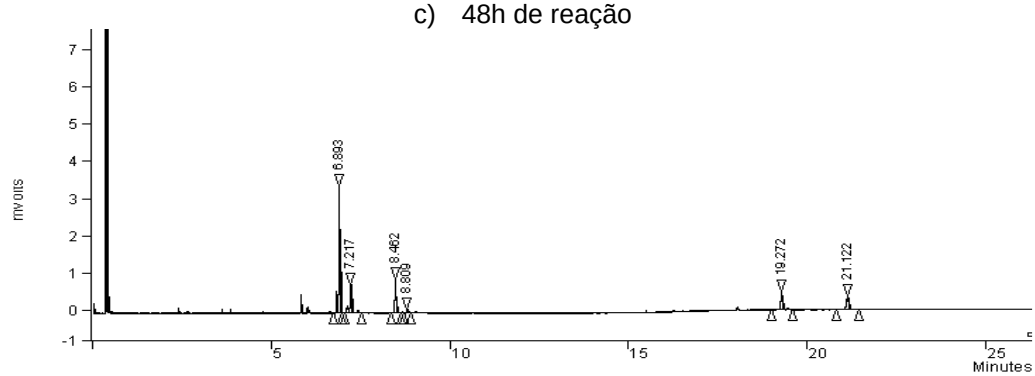
a) 0h de reação



b) 24h de reação



c) 48h de reação



d) 72h de reação

Figura 5.23. Perfis cromatográficos obtidos no início (0h), em 24, 48 e 72 horas na reação entre ricinoleato de metila e ácido oléico a 80℃, teor de enzima de 6% (m/m), razão molar igual a 1 e reator batelada fechado.

Esses resultados indicariam que a lipase utilizada estaria primeiramente catalisando a reação de transesterificação entre os reagentes, com formação de oleato de metila, com tempo de retenção de 6,9 minutos e ácido ricinoléico, com tempo de retenção de 8,8 minutos. Essa hipótese foi constatada a partir da determinação do tempo de retenção do oleato de metila obtido em uma reação de esterificação entre ácido oléico e metanol, onde foi verificado que esse éster possuia tempo de retenção de 6,9 minutos.

Após maiores tempos de reação (48 e 72 horas) foi observada redução nas áreas referentes a ambos os ésteres e ácidos. Os picos com tempos de 19,2 e 21,1 podem representar os dímeros formados a partir de reações de condensação. Entretanto, devido à limitação da coluna empregada e à ausência de padrão cromatográfico para esses produtos, não é possível afirmar que os picos são referentes aos produtos de interesse. A Figura 5.24 apresenta um esquema das possíveis rotas reacionais envolvidas na síntese de estolides de ácido oléico e ricinoleato de metila. A reação 1 (Fig. 5.24) representa a reação de transesterificação entre ácido oléico e ricinoleato de metila, com formação de ácido ricinoléico e oleato de metila. As reações de condensação entre ácido oléico e ácido ricinoléico e entre duas moléculas de ácido ricinoléico (reações 3 e 4) estariam ocorrendo posteriormente, com os produtos sendo detectados em 19,2 e 21,1 min de cromatografia. A reação de condensação entre ácido oléico e ricinoleato de metila (reação 2) envolvendo a hidroxila do éster e a carboxila do ácido também poderia ser catalisada pela lipase como reportado na literatura (Hayes e Kleiman, 1995).

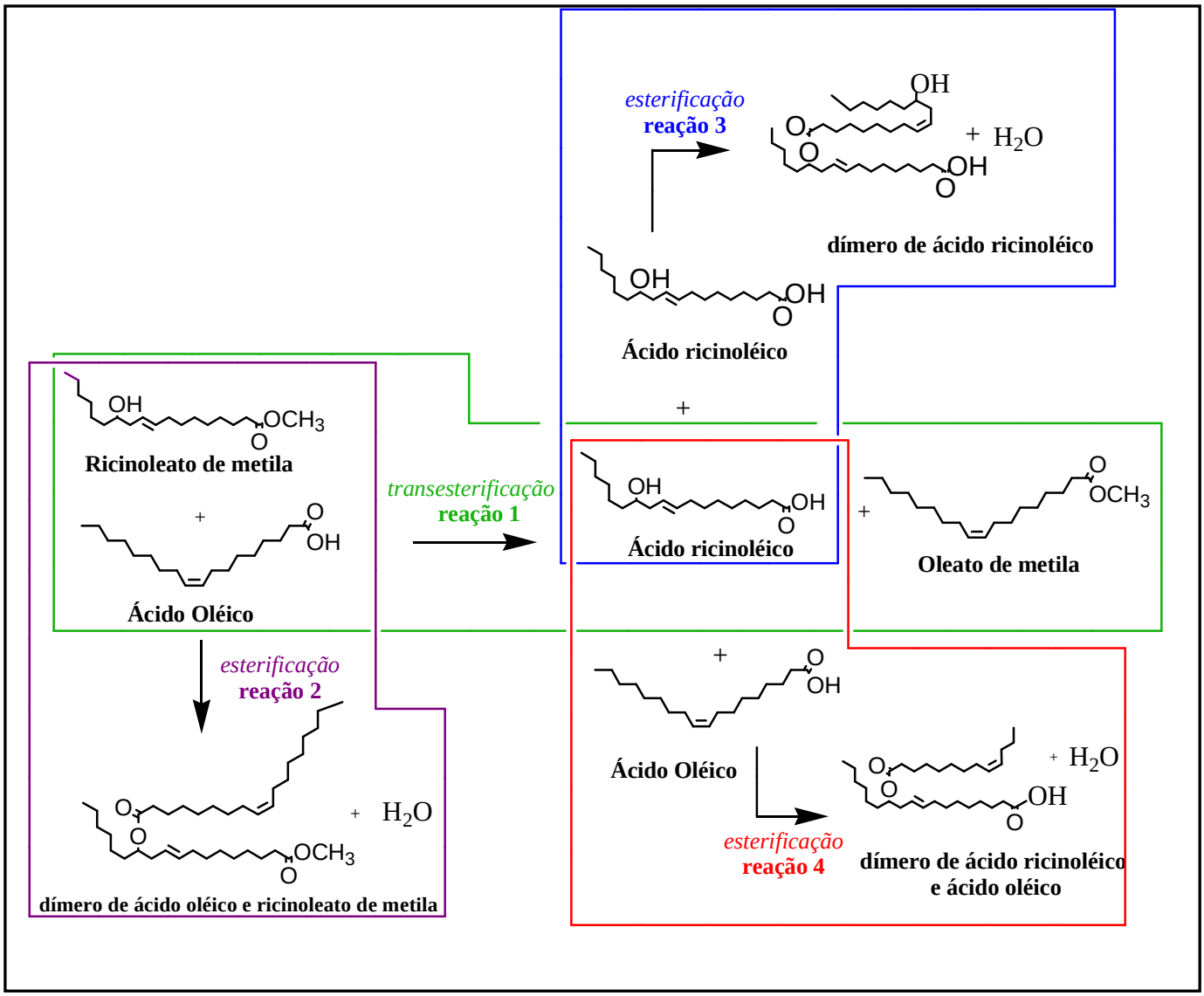


Figura 5.24. Reação empregando ácido oléico e ricinoleato de metila.

A Figura 5.25 compara a redução no percentual de ácido oléico com a redução no índice de acidez em 72 horas de reação. Pode ser observado que o percentual de ácido oléico (diretamente relacionado com a concentração de ácido no meio) foi de 18% após 72 horas de reação. No entanto, a curva de redução do índice de acidez, embora apresente um perfil semelhante, mostrou que a redução no AV foi bem menor, atingindo 55,4 após 72 horas de reação (AV inicial de 99).

Esses resultados já seriam esperados, uma vez que o índice de acidez representa um método quantitativo de determinação da concentração de ácidos graxos presentes na amostra, enquanto que na análise cromatográfica é obtido um perfil quantitativo e qualitativo do consumo e formação dos produtos no meio. Dessa

maneira, embora a concentração de ácido oléico, determinada por cromatografia em fase gasosa, tenha sido reduzida a valores muito baixos, essa redução não se reflete em uma queda no índice de acidez, uma vez que o ácido ricinoléico está sendo formado a partir da transesterificação. O ácido ricinoléico formado é então quantificado juntamente com o ácido oléico por titulação, acarretando em uma baixa redução no AV.

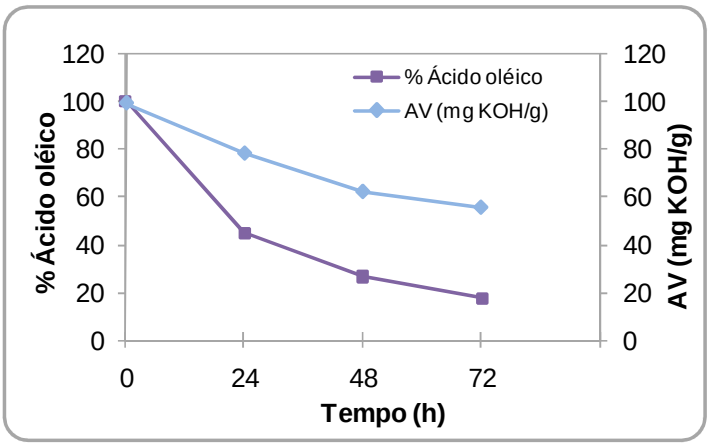


Figura 5.25. Comparação entre a redução no percentual de ácido oléico e o índice de acidez em 72 horas de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila, empregando 6% (m/m) de enzima e reator fechado a 80℃.

De acordo com Hayes (1996), embora lipases randômicas sejam aptas para a síntese de estolides, elas exibem preferência para reações de esterificação (ou transesterificação), o que justifica os resultados obtidos nesse trabalho. Hayes e Kleiman (1995) realizaram reações competitivas entre ácido lesquerólico, ácido octadecenóico e 1-decanol utilizando a lipase de *Pseudomonas sp*. como catalisador. Os resultados mostraram que a formação de ésteres ocorreu rapidamente, enquanto não foi observada formação de estolide livre resultante da condensação entre duas moléculas de ácido lesquerólico ou entre ácido lesquerólico e ácido octadecenóico. No entanto, a formação de éster de estolides ocorreu lentamente após o acúmulo de grandes quantidades de ésteres, que foram utilizados como substratos pela lipase. Quando a lipase de *C. rugosa* catalisou a reação, somente ésteres foram formados, não sendo observada condensação dos ésteres e formação de ésteres de estolides ao contrário do resultado obtido para *Pseudomonas* sp.

5.13 Caracterização físico-química do produto

O produto obtido na reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila foi caracterizado de acordo com algumas propriedades avaliadas para a especificação de um lubrificante. A análise de infravermelho mostrou que o lubrificante obtido assemelha-se ao óleo básico neutro leve (Figura 5.26).

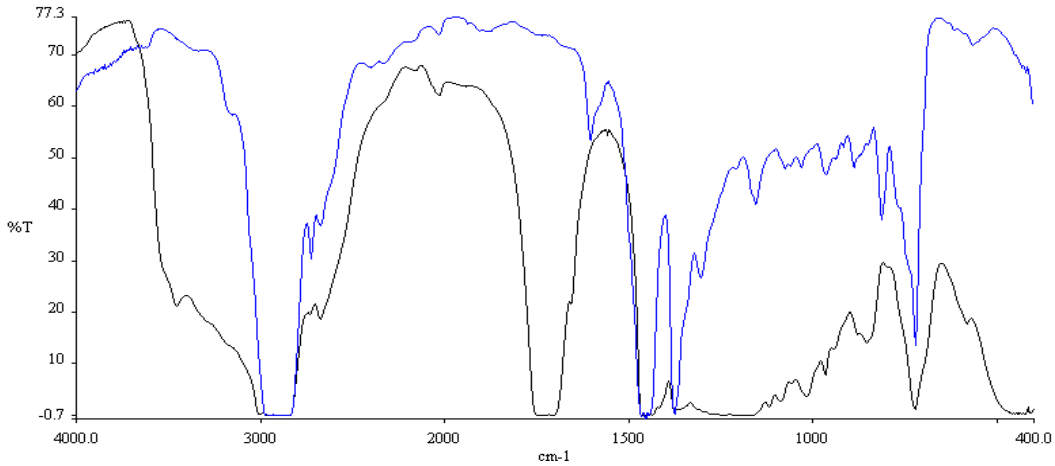


Figura 5.26. Espectros de infravermelho do óleo básico neutro leve (azul) e do biolubrificante obtido na reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila (preto).

Os resultados da caracterização do produto e sua comparação com as características estabelecidas pela ANP para três tipos de lubrificantes derivados de petróleo estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Propriedades físico-químicas do biolubrificante obtido na reação entre ricinoleato de metila e ácido oléico e de três lubrificantes derivados de petróleo.

Lubrificante	Ponto de fluidez (℃)	Viscosidade a 40℃ (cSt)	Viscosidade a 100℃ (cSt)	Índice de viscosidade
Produto de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila	-24	23,9	5,2	153
Óleo básico neutro leve	-6	30-40	5	125
Óleo básico neutro médio	-3	40-50	7	95
Óleo básico neutro pesado	-3	70-300	10-20	95

O baixo ponto de fluidez (-24℃) indica o potencial de aplicação do biolubrificante em temperaturas mais baixas. As viscosidades cinemáticas obtidas a

40 e a 100℃ foram de 23,9 e 5,2 cSt, respectivamente. A viscosidade é uma das características mais importantes no controle do uso dos lubrificantes e deve ser mantida dentro de limites estabelecidos, pois o aumento dessa propriedade pode representar empecilho à fluidez necessária para um bom desempenho de lubrificação. Por outro lado, uma viscosidade abaixo da ideal pode ocasionar elevadas taxas de desgaste. O índice de viscosidade apresentou valor superior ao desejável para aplicação como lubrificantes (150). O índice de viscosidade de um óleo é fundamental na escolha de um lubrificante para determinada aplicação, e é especialmente crítico em climas muito quentes ou frios. A utilização de óleos com baixo índice de viscosidade em climas frios pode resultar em lubrificação deficiente e falha do equipamento. De acordo com o teste de corrosão em lâmina de cobre, o produto não apresentou corrosividade (1A). No entanto, o índice de acidez (ou índice de neutralização) apresentou valor elevado (56,33 mg KOH/g de amostra), não se encontrando dentro da especificação da ANP, que permite o valor máximo de 0,05 mg de KOH/g para aplicação do produto como lubrificante. O elevado índice de acidez se deve a presença de excesso de ácidos graxos (oléico e ricinoléico) no meio.

Hayes e Kleiman (1995) caracterizaram ésteres de estolides obtidos empregando lipase de *R. miehei* para catalisar reações entre os alcoóis oleílico 1-decanol e monoestolides de ácido oléico. A esterificação melhorou as propriedades dos estolides, permitindo a obtenção de produtos com menor viscosidade e alto índice de viscosidade, mas aumentou ligeiramente o ponto de fusão. As propriedades dos monoestolides de ácido oléico foram: temperatura de fusão inferior a -19℃, viscosidade a 41,3℃ e a 97,5℃ de 126,3 cSt e 23,11 cSt, respectivamente e índice de viscosidade de 191. Os ésteres de estolides apresentaram temperatura de fusão de -19℃ a -11,5℃, viscosidade a 41,3℃ e a 97,5℃ nas faixas de 37,2 a 30,43 e 10,88 a 8,16 cSt, respectivamente e índice de viscosidade de 204 a 302.

Cermak e Isbell (2004) sintetizaram estolides e ésteres de estolides derivados de óleo de cuphea e ácido oléico com ácido perclórico como catalisador. Os estolides obtidos apresentaram índice de viscosidade de 146, viscosidade a 40 e 100℃ de 123,4 e 16,7, respectivamente, ponto de fluidez de -27℃ e ponto de névoa de -30℃. A esterificação dos estolides com 2-etilhexanol acarretou em redução dos pontos de fluidez e boa estabilidade oxidativa. Os ésteres de estolides apresentaram

ponto de fluidez e de névoa de -42 e -36℃, respectivamente e índice de viscosidade de 178. As viscosidades a 40 e 100℃ foram de 34,9 e 7,2 cSt, respectivamente.

Cermak e colaboradores (2006) observaram que estolides de óleo de mamona capeados com ácido oléico apresentaram ponto de fluidez de -54℃, ponto de névoa inferior a -54℃, viscosidade a 40 e 100℃ de 34,5 e 7,6 cSt, respectivamente e índice de viscosidade de 196. A estabilidade oxidativa dos ésteres de estolides aumentou com a adição de 3,5% de antioxidante.

Isbell e colaboradores (2006) observaram que estolides do óleo de mamona melhoraram as propriedades físicas dos óleos originais. Quando a cadeia de capeamento foi o ácido esteárico os materiais resultantes apresentavam-se semi-sólidos. A insaturação presente no ácido oléico melhorou o ponto de fluidez (-27℃) em comparação ao ácido esteárico (24℃). O índice de viscosidade variou de 130 a 202 e as viscosidades a 100 e a 40℃ variaram de 13,9 a 26,6 cSt e 74,7 a 260,4 cSt, respectivamente.

Cermak e Isbell (2009) investigaram as propriedades de estolides de ésteres metílicos de estolides de ácido oléico capeados com diferentes ácidos graxos saturados (C2 a C18). O menor ponto de fluidez (-30℃) e as menores viscosidades (9,5 e 2,6 cSt, a 40 e 100℃, respectivamente) foram obtidos com ácido acético como ácido de capeamento. Entretanto, o índice de viscosidade reduziu com a diminuição da cadeia carbônica do ácido de capeamento. Todos os produtos apresentaram cor clara e poderiam ser adequados para o emprego como biolubrificante. Quando ácido esteárico foi empregado com agente de capeamento os valores obtidos foram: ponto de fluidez de 3℃, ponto de névoa de 12℃, viscosidade a 40 e 100℃ de 27,6 e 10,7 cSt, respectivamente e índice de viscosidade de 407.

A Tabela 5.2 compara os resultados obtidos nesse trabalho com dados da literatura. Pode ser observado que o produto obtido apresentou características similares às reportadas pelos demais autores.

A Tabela 5.3 compara as propriedades do lubrificante obtido com as de produtos disponíveis no mercado, onde também se observa que o produto obtido apresentou propriedades similares às de lubrificantes comerciais.

Tabela 5.2. Comparação dos resultados obtidos com dados da literatura.

Lubrificante	Ponto de fluidez (℃)	Viscosidade a 40℃ (cSt)	Viscosidade a 100℃ (cSt)	Índice de viscosidade
Produto de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila	-24	23,9	5,2	153
Cermak e Isbell (2004) [a]	-27	123,4	16,7	146
Cermak e Isbell (2004) [b]	-42	34,9	7,2	178
Cermak *et al*. (2006) [c]	-54	34,5	7,6	196
Hayes e Kleiman (1995) [d]		126,3	23,11	191
Hayes e Kleiman (1995) [e]		30,43	8,16	204
Cermak e Isbell (2002) [f]	-24	389,1	37,7	143
Cermak e Isbell (2002) [g]	-36	104,4	16,8	175
Cermak e Isbell (2009) [h]	3	27,6	10,7	407

[a] Reações entre ácido oléico e óleo de cuphea (0,01% de $HClO_4$)
[b] Éster de estolide (estolide + 2-etil hexanol)
[c] Estolides de óleo de mamona capeados com ácido oléico
[d] Monoestolide de ácido oléico
[e] Éster de monoestolide de ácido oléico (estolide + 1-decanol)
[f] Estolide de ácido oléico capeado com ácido octanóico (catalisador $HClO_4$)
[g] Éster de estolide de ácido oléico capeado com ácido octanóico (estolide + 2-etil hexanol)
[h] Éster de estolide de ácido oléico capeado com ácido esteárico (estolide + metanol)

Tabela 5.3. Comparação entre as características do produto obtido com as de produtos comerciais.

Lubrificante	Ponto de fluidez (℃)	Viscosidade a 40℃ (cSt)	Viscosidade a 100℃ (cSt)	Índice de viscosidade
Produto de reação entre ácido oléico e ricinoleato de metila	-24	23,9		153
Comercial derivado de petróleo [a]	-27	66		152
Comercial sintético [a]	-21	60,5		174
Comercial derivado de óleo de soja [a]	-18	49,6		220
Fluido hidráulico comercial [a]	-33	56,6		146
Óleo mineral Spindle 09	-9	10,7	2,7	95
Lubrax Unitractor [b]	-39	57	9,3	156

[a] formulados com aditivos (Cermak e Isbell, 2004)
[b] Éster sintético biodegradável comercializado pela BR para uso em tratores.

De acordo com esses resultados, é possível concluir que, a despeito do elevado índice de acidez, a rota reacional investigada para a obtenção de um biolubrificante empregando uma tecnologia limpa (catálise enzimática) permitiu a obtenção de um produto com boas características de fluidez, viscosidade e não corrosivo, o que pode ser comprovado pela comparação com os dados reportados na literatura a respeito do mesmo tema.

5.14 Reutilização da lipase comercial

Uma das principais vantagens da utilização de lipases imobilizadas reside na possibilidade do uso consecutivo do biocatalisador (BÓDALO-SANTOYO *et al*., 2008). A possibilidade de recuperação e reutilização da lipase imobilizada comercial Novozym 435 foi investigada nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila e ácido esteárico e ricinoleato de metila. As reações foram conduzidas com 6% (m/m) de enzima, razão molar dos reagentes igual a 1 e a 80℃ por 48 horas. Após cada reação, a enzima foi lavada com n-hexano, centrifugada e utilizada em um novo experimento em batelada. Não foi possível reutilizar a lipase na reação com ácido esteárico, pois a matriz de imobilização da enzima se dissolveu no meio reacional não sendo possível recuperar o biocatalisador.

Os resultados obtidos nas reações com ácido oléico encontram-se na Figura 5.27. No primeiro experimento, a conversão após 48 horas de reação foi de 33% e a conversão foi decrescendo com a utilização sucessiva do catalisador. Após a terceira reutilização, a conversão foi cerca de 50% menor do que a obtida no primeiro experimento.

Resultados semelhantes foram encontrados por Bódalo e colaboradores (2008) que investigaram a possibilidade de reutilização da lipase imobilizada de *Candida rugosa* na reação com ácido ricinoléico a 40℃ com 16,6% (m/m) de enzima. Após 24 horas de reação, os autores obtiveram uma redução no AV de 120 unidades (67% de conversão) na primeira reação em batelada, enquanto na terceira reação em batelada a redução do AV foi de apenas 48 unidades (conversão de 27%). Os autores atribuíram o fato à desativação operacional da lipase após reações consecutivas.

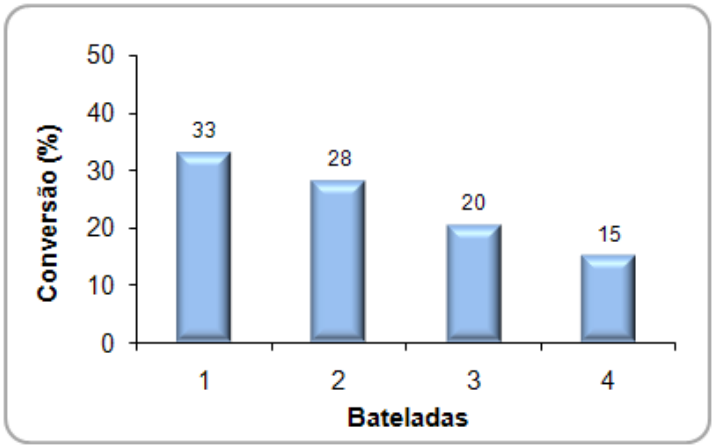


Figura 5.27. Reutilização da lipase comercial Novozym 435 nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila a 80℃, razão estequiométrica dos reagentes e teor de enzima de 6% (m/m).

Yoshida e colaboradores (1997) investigaram a possibilidade de experimentos seqüenciais na síntese de estolides derivados de ácido ricinoléico empregando sistema de biorreator contínuo contendo 19,6 % (m de lipase /m de ácido ricinoléico) de lipase de *Candida rugosa* imobilizada em cerâmica. Após 700 horas, seis reações foram possíveis com 120 mg de lipase/g de suporte e cinco reações foram possíveis com 60 mg de lipase/g de suporte.

Mahapatro e colaboradores (2004) avaliaram a redução da atividade da lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435) durante a reação de poliesterificação do ácido 12-hidroxidodecanóico a 90℃ e observaram que após 48 horas de reação o catalisador apresentou quase 75% de sua atividade original, podendo ser reutilizado em mais um ciclo de reação de polimerização.

Capítulo 6

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho é possível concluir que:

- A lipase comercial Novozym 435 forneceu os melhores resultados de conversão nas reações entre ácido oléico ou ácido esteárico com ricinoleato de metila por se tratar de uma lipase não-específica;

- Maiores temperaturas (acima de 80℃) promoveram aumento na conversão das reações entre ácido oléico com ricinoleato de metila catalisada pela lipase Novozym 435;

- A concentração de biocatalisador também exerceu influência nas reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila, com saturação do meio a partir de 16% (m/m) de lipase;

- Maiores conversões foram obtidas após 72 e 100 horas de reação para os ácidos oléico e esteárico, não sendo identificadas diferenças nos resultados em relação aos reagentes;

- A adição de água no meio reduziu a conversão das reações entre ácido oléico ou ácido esteárico com ricinoleato de metila, enquanto que a remoção da água, por peneira molecular e vácuo, aumentou a conversão;

- A reação entre ricinoleato de metila e ácido oléico catalisada pela lipase Novozym 435 não foi favorecida pelo emprego de pressão no sistema;

- A possibilidade de reutilização da lipase Novozym 435 foi avaliada, e a enzima pôde ser reutilizada em 4 reações em batelada entre ácido oléico e ricinoleato de metila, com redução na conversão após 48 horas de reação conforme as etapas de reuso;

- O produto da reação entre ricinoleato de metila e ácido oléico apresentou bons resultados de fluidez, viscosidade, índice de viscosidade e corrosividade.

Capítulo 7

7 SUGESTÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, as seguintes sugestões são destacadas para trabalhos futuros:

- Caracterizar o produto por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, para determinação da constituição e dos pesos moleculares dos componentes do biolubrificante;

- Determinar a biodegradabilidade e a estabilidade oxidativa do biolubrificante obtido a partir das reações entre ácido oléico e ricinoleato de metila catalisada pela lipase Novozym 435;

- Avaliar possíveis metodologias para a remoção do excesso de ácido do produto final, a fim de se obter um lubrificante com índice de acidez inferior a 0,05 mg KOH/g.

Capítulo 8

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGÁFICAS

Accelerating the Development of the Market for Bio-based Products in Europe. **Report of the Taskforce on Bio-Based Products**. Composed in preparation of the Communication, “A Lead Market Initiative for Europe”, 2007.
Disponível em: <http://ec.europa.eu/enterprise/policies/innovation/files/lead-market-initiative/bio_based_products_taksforce_report_en.pdf>
Acesso em: 09 de junho de 2010.

ADACHI, S., KOBAYASHI, T. Synthesis of esters by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvent. **Journal of Bioscience and Engineering**, v. 99, n. 2, p. 87-94, 2005.

ALLINGER, CAVA, JONGH, JOHONSON, LEBEL, STEVENS, **Química Orgânica**, Editora Guanabara Dois S.A., 2ª edição, 1976.

AL-ZUHAIR, S., JAYARAMAN, K. V., KRISHNAN, S., CHAN, W. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 212-217, 2006.

American Society for Testing Material, Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and Calculation of Dynamic Viscosity), **ASTM D445-09**, 2000.

American Society for Testing Material, Standard Practice for Calculating Viscosity Index From Kinematic Viscosity at 40 and 100°C, **ASTM D2270-04**, 2004.

American Society for Testing Material, Standard Test Method for Pour Point of Petroleum Products, **ASTM D97-07**, 2007.

American Society for Testing Material, Standard Test Method for Acid and Base Number by Color-Indicator Titration, **ASTM D974-08**, 2008.

American Society for Testing Material, Standard Test Method for Corrosiveness to Copper from Petroleum Products by Copper Strip Test, **ASTM D130-04**, 2004.

BÓDALO-SANTOYO, A., BASTIDA-RODRIGUEZ, J., MÁXIMO-MARTÍN, M.F., MONTIEL-MORTE, M.C., MURCIA-ALMAGRO, M.D. Enzymatic biosynthesis of ricinoleic acid estolides. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 155–158, 2005.

BÓDALO-SANTOYO, A., BASTIDA-RODRIGUEZ, J., MÁXIMO-MARTÍN, M.F., MONTIEL-MORTE, M.C., MURCIA-ALMAGRO, M.D. Production of ricinoleic acid estolide with free and immobilized lipase from *Candida rugosa*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 450-456, 2008.

BÓDALO-SANTOYO, A., BASTIDA-RODRIGUEZ, J., MÁXIMO-MARTÍN, M.F., MONTIEL-MORTE, M.C., MURCIA-ALMAGRO, M.D., ORTEGA, S. Influence of the operating conditions on lipase-catalysed synthesis of ricinoleic acid estolides in solvent-free systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 214-219, 2009.

BÓDALO-SANTOYO, A., GÓMEZ, J.L., BASTIDA-RODRIGUEZ, J., MÁXIMO-MARTÍN, M.F., MONTIEL-MORTE, M.C., MURCIA-ALMAGRO, M.D. Physico-chemical characterization of ricinoleic acid estolides. Viscosity and polymerisation degree. **Biotechnology and Biochemical Engineering**. *Em anais do 10th Mediterranean Congress of Chemical Engineering,* Barcelona, Espanha, 15 a 18 de Novembro, 2005. Em: <http://www2.ub.edu/10mediterraneo/accepted.html>.
Acesso em: 23 de junho de 2010.

BOONYARATANAKORNKIT, B. B., PARK, C. B., CLARK, D. S. Pressure effects on intra- and intermolecular interactions within proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1595, p. 235-249, 2002.

BORNSCHEUER, U.T., KAZLAUSKAS, R.J., **Hydrolases in Organic Synthesis-Regio- and Stereoselective Biotransformations**, Editora Wiley-VCH Verlag GmgB e Co. KGaA, 1ª edição, 1999.

BREMMER, B. J., PLONSKER, L. **Bio-based Lubricants A Market Opportunity Study Update**, Prepared for the United Soybean Board, Novembro de 2008. Disponível em:
<http://www.soynewuses.com/downloads/reports/BioBasedLubricantsMarketStudy.pdf>. Acesso em: 09 de junho de 2010.

BUCALÁ, V., FORESTI, M. L., TRUBIANO, G., FERREIRA, M. L., BRIOZZO, M., BOTTINI, S. Analysis of solvent-free ethyl oleate enzymatic synthesis at equilibrium conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 914-920, 2006.

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

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

CERMAK, S.C., BIRESAE, G., ISBELL, T. A. Comparison of a new estolide oxidative stability package. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 879-885, 2008.

CERMAK, S.C., BRANDON, K.B., ISBELL, T.A. Synthesis and physical properties of estolides from lesquerella and castor fatty acid esters. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 54–64, 2006.

CERMAK, S.C., ISBELL, T.A. Physical properties of saturated estolides and their 2-ethylhexyl esters. **Industrial Crops and Products**, v. 16, p. 119-127, 2002.

CERMAK, S.C., ISBELL, T.A. Synthesis and physical properties of cuphea–oleic estolides and esters. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 81, p. 297–303, 2004.

CERMAK, S.C., ISBELL, T.A. Synthesis of estolides from oleic and saturated fatty acids. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 78, p. 577–565, 2001.

CERMAK, S.C., ISBELL, T.A. Synthesis and physical properties of mono-estolides with varying chain lengths. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 205–219, 2009.

EISENMENGER, M. J., REYES-DE-CORCUERA, J. I., High pressure enhancement of enzymes: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 331–347, 2009.

ENGEL, K. H., BOHNEN, M., DOBE, M., Lipase-catalysed reactions of chiral hydroxyacid esters: competition of esterification and transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 655-660, 1991.

ERHAN, S. M., KLEIMAN, R. Biodegradation of estolides from monounsaturated fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 5, p. 605-607, 1997.

FAGUNDES, F. P., BEZERRA, J. P., GARCIA, M. A., MEDEIROS, A. C. R., BORGES, M. R., GARCIA, R. B., COSTA, M. **Avaliação das propriedades do óleo de mamona na produção de biocombustível**. Anais do 3° Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, outubro de 2005, Salvador. Disponível em: <http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0617_05.pdf>. Acesso em: 01 de julho de 2010.

FORESTI, M.L., FERREIRA, M.L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 769-777, 2007.

FORESTI, M.L., FERREIRA, M.L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. 107–108, p. 23-30, 2005.

FORESTI, M.L., PEDERNERA, M., BUCALÁ, V., FERREIRA, M.L. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 62-70, 2007.

FORESTI, M. L., PEDERNERA, M., FERREIRA, M. L., BUCALÁ, V. Kinetic modeling of enzymatic ethyl oleate synthesis carried out in biphasic systems. **Applied Catalysis A: General**, v. 334, p. 65-72, 2008.

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

GIACOMETTI, J., GIACOMETTI, F., MILIN, C., VASIC-RACKI, D. Kinetic characterization of enzymatic esterification in a solvent system: adsorptive control of water with molecular sieves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 921-928, 2001.

HARRY-O KURU, R.E., ISBELL, T.A., WEISLEDER, D. Synthesis of estolide esters from *cis*-9-octadecenoic acid estolides. **Journal of Molecular Catalysis***,* v. 78, p. 219–222, 2001.

HAYES, D.G., KLEIMAN, R. Lipase-catalyzed synthesis and properties of estolides and their esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, p. 1309-1316, 1995.

HAYES, D.G. The catalytic activity of lipases toward hydroxy fatty acids – A review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 5, p. 543-549, 1996.

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

HLAVSOVA, K., WIMMER, Z., XANTHAKIS, E., BERNASEK, P., SOVOVA, H., ZAREVUCKA, M. Lipase activity enhancement by SC-CO_2 treatment. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 63, p. 779-784, 2008.

HOU, C. T., **Handbook of Industrial Biocatalysis**, Editora Taylor e Francis Group, 2005.

http://www.oilbrasil.com.br. Acesso em: 17 de novembro de 2010.

http://www.ibp.org.br. Acesso em: 03 de fevereiro de 2010.

http://www.renewablelubricants.com. Acesso em: 03 de fevereiro de 2010.

http://www.laboroil.com.br/internet_afq.php. Acesso em: 13 de julho de 2010.

ISBELL, T.A., EDGCOMB, M. R., LOWERY, B.A. Physical properties of estolides and their ester derivatives. **Industrial Crops and Products**, v. 13, p. 11-20, 2001.

ISBELL, T.A., FRYKMAN, H.B, ABBOTT, T.P., LOHR J.E., DROZD J.C. Optimization of the sulfuric acid-catalyzed estolide synthesis from oleic acid. **Journal of Molecular Catalysis***,* v. 74, p.473–476, 1997.

ISBELL, T.A., LOWERY, B.A., DEKEYSER, S.S., WINCHELL, M.L., CERMAK, S.C. Physical properties of triglyceride estolides from lesquerella and castor oils. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 256–263, 2006.

ITOH OIL MANUFACTURING CO. LTD. AND CHIYODA CHEMICAL ENGINEERING & CONSTRUCTION CO. LTD. Yamaguchi Chozo, Akita Masatsugu, Asaoka Sachio, Osada Fumika. **Production of castor oil fatty acid estolide**. JP. n. JP1016591 (A), 20 de janeiro de 1989.

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

KARUNA, M.S.L., REDDY, J.R.C., RAO, B.V.S.K., PRASAD, R.B.N. Lipase-mediated synthesis of alkyl ricinoleates and 12-hydroxy stearates and evaluation of the surfactant properties of their sulfated sodium salts. **Journal of Surfactantes and Detergents,** v. 8, p. 271–276, 2005.

KASRAYAN, A., BOCOLA, M., SANDSTRÇM, A.G., LAVÉN, G., BÄCKVALL, J. Prediction of the *Candida antarctica* lipase A protein structure by comparative modeling and site-directed mutagenesis. **ChemBioChem,** v. 8, p. 1409-1415, 2007.

KOSKINEN; A.M.P., KLIBANOV, A.M., **Enzymatic Reactions in Organic Media**, Editora Blackie Academic e Professional, 1ª edição, 1996.

LÉLES, E. P. **Interação de doses de calcário e zinco na mamoneira**. Botucatu, 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas – Unesp, 2008.

LINKO, Y.Y., LÄMSA, M., WU, X., UOSUKAINEN, E., SEPPALA, J., LINKO, P. Biodegradable products by lipase biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 41–50, 1998.

LINKO, Y., WANG, Z., SEPPALA, J. Lipase-catalyzed linear aliphatic polyester synthesis in organic solvent. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 506-511, 1995.

MACEDO, M.H.G., Companhia Nacional de Abastecimento CONAB, **Mamona-Proposta de Preço mínimo Safra 2006/2007**. Diponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/precos_minimos/proposta_de_precos_minimos_safra_2006_07_mamona.pdf >. Acesso em: 18 de outubro de 2009.

MAHAPATRO, A., KUMAR, A., GROSS, R. A. Mild, solvent-free ω-hydroxy acid polycondensations catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 62-68, 2004.

MAPA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – Secretaria de Produção e Agroenergia, **Anuário Estatístico da Agroenergia**, Brasília, DF, 2009.

MARIE-OLIVE, M.N., ATHES, V., COMBES, D. Combined effects of pressure and temperature on enzyme stability. **High Pressure Research**, v. 19, p., 707-712, 2000.

MAURO, S. **Ceará cedia unidade de pesquisa em biolubrificantes da Petrobras**, FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO. Disponível em: <http://www.funcap.ce.gov.br/ceara-sedia-unidade-de-pesquisa-em-biolubrificantes-da-petrobras-1>. Acesso em: 05 de julho de 2010.

MOZHAEV, V. V., KUDRYASHOVA, E. V., BEC, N. Modulation of enzyme activity and stability by high pressure: α-chymotrypsin. **High Pressure Bioscience and Biotechnology**, v. 13, p.221-225, 1996.

Official Methods and Recommended Pratices of The American Oil Chemists' Society, 5th ed. AOCS: Champaign, 1997. AOCS Official Method Te 1a-64.

PAIVA A. L., BALCÃO, V. M., MALCAT, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 187-204, 2000.

PALULIAN, D. One Slick Trick - Building a Better Biolubricant. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 12, setembro, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1241668/pdf/ehp0111-a00654.pdf>. Acesso em: 15 de julho de 2010.

PELÁEZ, M., ORELLANA, C., MARQUÉS, A., BUSQUETS, M., GUERRERO, A., MANRESA, A. Natural estolide produced by *Pseudomonas sp.* 42A2 grown in oleic acid: production and characterization. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 9, p. 859-866, 2003.

RAMACHANDRAM, K.B., AL-ZUHAIR, S., FONG, C.S., GAK, C.W. Kinetic study on hydrolysis of oils by lipase with ultrasonic emulsification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 19-24, 2006.

RIAHI, E., RAMASWAMY, H. S. High pressure inactivation kinetics of amylase in apple juice. **Journal of Food Engineering**, v. 64, p.151–160, 2004.

ROMERO, M. D., CALVO, L., ALBA, C., HABULIN, M., PRIMOZIC, M., KNEZ, Z. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 77-84, 2005.

SCHOLZ, V., SILVA, J. N. Prospects and risks oh the use of castor oil as a fuel. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 95-100, 2008.

SCHNEIDER, R.C.S., BALDISSARELLI, V.Z., TROMBETTA, F., MARTINELLI, M., CAMARÃO, E.B. Optimization of gas chromatographic–mass spectrometric analysis

for fatty acids in hydrogenated castor oil obtained by catalytic transfer hydrogenation. **Analytica Chimica Acta**, v. 505, p. 223-226, 2004.

SILVA, J. A. C. **Desenvolvimento de um lubrificante biodegradável a partir de ésteres do biodiesel de mamona** - RJ. Rio de Janeiro, 2006. v. 73, p. 29,7 cm. Dissertação (Mestrado em Ciências) – COPPE/UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

TARAHOMJOO, S., ALEMZADEH, I. Surfactant production by an enzymatic method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 33-37, 2003.

TRUBIANO, G., BORIO, D., ERRAZU, A. Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 716-722, 2007.

UNITED STATES PATENT. Secretary of Agriculture (Washington, US). Steven C. Cermak, Terry A. Isbell. **Biodegradable oleic estolide ester having saturated fatty acid end group useful as lubricant base stock**. US n. 6316649 B1, 13 de novembro, 2001.

UYAMA, H., KOBAYASHI, S. Enzymatic ring-opening polymerization of lactones catalyzed by lipase. **Chemistry Letters**, v. 1993, p. 11497–1150, 1993.

UYAMA, H., TAKEYA, K., KOBAYASHI, S. Enzymatic ring-opening polymerization of lactones to polyesters by lipase catalyst: unusually high reactivity of macrolides. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 68, p. 56-61, 1995.

VARMA, I. K., ALBERTSSON, A, RAJKHOW, R., SRIVASTAVA, R. K. Enzyme catalyzed synthesis of polyesters. **Progress in Polymer Science***,* v. 30, p. 949–981, 2005.

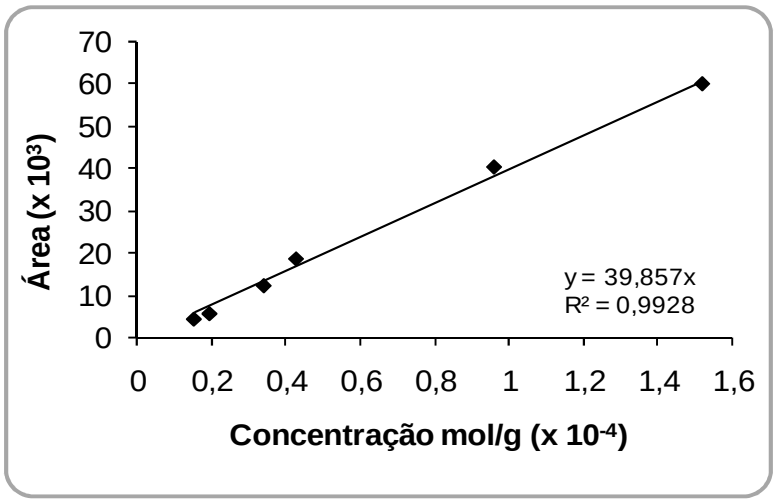
YANG, G., TIAN-WEI, T., KAI-LI, N., FANG, W. Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in shyntesis of biodiesel in low aqueous media. Chinese Journal of Biotechnology, v. 22 (1), p. 114-118, 2006.

YOSHIDA, Y., KAWASE, M., YAMAGUCHI, C., YAMANE, T. Enzymatic synthesis of estolides by a bioreactor. **Journal of Molecular Catalysis***,* v. 74, p. 261–267, 1997.

YU, D., TIAN, L., WU, H., WANG, S., WANG, Y., MA, D., FANG, X. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 519-525, 2010.

ZERKOWSKI, J. A., NUÑEZ, A., SOLAIMAN, D. K. Y. Structured estolides: control of length and sequence. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 277-284, 2008*.*

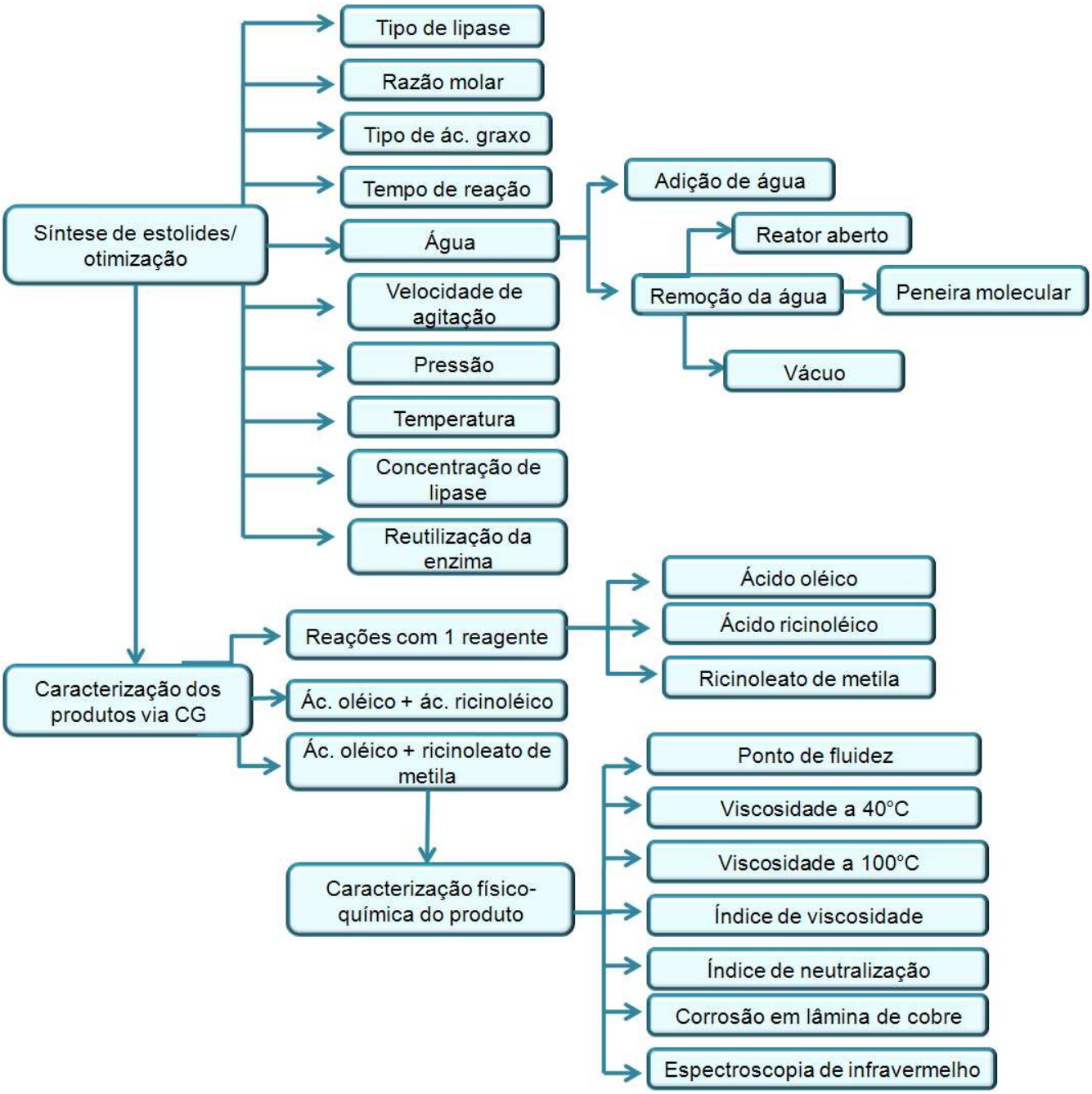
ANEXO 1



Curva padrão do ácido oléico

ANEXO 2

Organograma contendo o resumo dos experimentos de síntese e caracterização.



ANEXO 3

Comparação dos resultados obtidos nesse trabalho com os dados da literatura.

Reação	Lipase/Atividade/Concentração	Tempo	Conversão (%) /rendimento em estolide (%)
Ácido oléico e ricinoleato de metila	Novozym 435;3824 µmols de ácido/min.g de enzima; 6% (m/m)	100 h	52% de conversão
Ácido ricinoléico [a]	Imobilizada de *Candida rugosa;* 819 U/mg de sólido; 1,33 % (m/m)	48 h	64% de conversão
Ácido ricinoléico [b]	Imobilizada de *Candida rugosa*; 819 U/mg de sólido; 16,6 % (m/m)	150 h	72% de conversão
Ácido ricinoléico [c]	Imobilizada de *Candida rugosa*; 120000U/g; 19,6% (m/m) em leito fixo	70 h	73% de conversão
Ácido lesquerólico (ácido 14-hidroxi-11-eicosanóico) e ácido octadecenóico [d]	*Candida rugosa*; 585U/mg;1,12mg/mL	50 h	41,3% de rendimento
Ácido lesquerólico (ácido 14-hidroxi-11-eicosanóico) e ácido octadecenóico [d]	*Pseudomonas* sp.; 0,0403U/mg; 24,6mg/mL	50 h	62,8% de rendimento
Ácido oléico, ácido 10-hidroxi-8-octadecenóico e ácido 7,10-hidroxi-8-octadecenóico [e]	Fermentação do microrganismo *Pseudomonas* sp.; 124U/L; 2% (v/v)	72 h	Dímeros (27,5%), trímeros (19,4%), tetrâmeros (15,0%), pentâmeros (9,7%) e hexâmeros (11,0%)

[a] Bódalo-Santoyo *et al*., 2005
[b] Bódalo-Santoyo *et al*., 2008
[c] Yoshida *et al*., 1997
[d] Hayes e Kleiman,1995
[e] Peláez *et al*., 2003