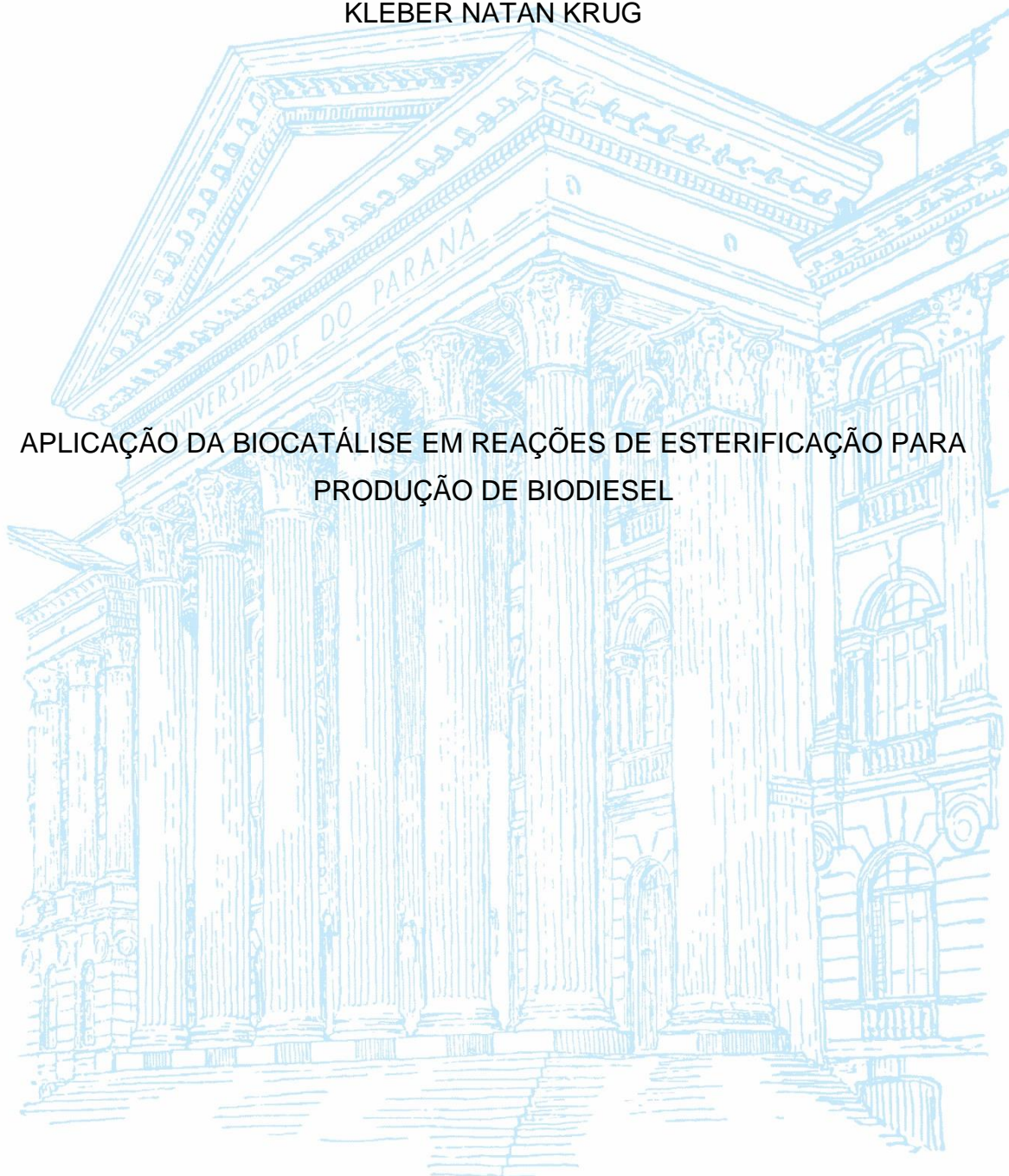


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KLEBER NATAN KRUG

APLICAÇÃO DA BIOCATÁLISE EM REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO PARA  
PRODUÇÃO DE BIODIESEL



PALOTINA

2021

**KLEBER NATAN KRUG**

**APLICAÇÃO DA BIOCATÁLISE EM REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO PARA  
PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Isac G. Rosset

PALOTINA

2021



## UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

## ATA DE REUNIÃO

Aos quatorze dias do mês de dezembro do ano de 2021, às dezenove horas, na Sala virtual [https://teams.microsoft.com/l/channel/19%3aatFY3JJ0MaMMK\\_o0XsK-jiG2AckWpWhxAl-KXQQ\\_2h41%40thread.tacv2/Geral?groupId=b3a37f89-2a2a-45f1-9450-e6da81b071b5&tenantId=c37b37a3-e9e2-42f9-bc67-4b9b738e1df0](https://teams.microsoft.com/l/channel/19%3aatFY3JJ0MaMMK_o0XsK-jiG2AckWpWhxAl-KXQQ_2h41%40thread.tacv2/Geral?groupId=b3a37f89-2a2a-45f1-9450-e6da81b071b5&tenantId=c37b37a3-e9e2-42f9-bc67-4b9b738e1df0) da Plataforma Microsoft Teams, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Aplicação da Biocatálise em Reações de Esterificação para Produção de Biodiesel" apresentado pelo discente Kleber Natan Krug, orientado pelo Prof. Dr. Isac George Rosset, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, o orientador e Presidente da Banca concedeu a palavra ao discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir o discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído ao discente as seguintes notas: **Prof. Dr. Isac George Rosset, nota: 96 (noventa e seis), Prof.(a) Dr.(a) Adriana Ferla de Oliveira, nota: 95 (noventa e cinco), e Prof.(a) Dr. (a) Raquel Stroher, nota: 95 (noventa e cinco).** A nota final do discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi **95 (noventa e cinco)**. As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pelo discente sob acompanhamento de seu orientador. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **RAQUEL STROHER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/12/2021, às 20:48, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ISAC GEORGE ROSSET, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/12/2021, às 20:48, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FERLA DE OLIVEIRA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 14/12/2021, às 20:48, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4113238** e o código CRC **D3B1F3B0**.

Este trabalho é todo dedicado aos meus pais, pois é graças ao seu esforço que hoje posso concluir o meu curso.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado saúde e força para superar os momentos de dificuldades.

A meu orientador, Prof. Dr. Isac George Rosset, pelo acompanhamento, orientação, compreensão e honestidade, que nunca me deixou faltar uma explicação.

A universidade, seu corpo docente, direção e administração.

Ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, do Setor de Palotina da Universidade Federal do Paraná.

A todos os professores da universidade, mas em especial, aos que tive o prazer de ter levado comigo seus ensinamentos.

Aos meus pais por me darem suporte em todos os momentos da minha vida pessoal e acadêmica.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

## RESUMO

Levando em conta que o combustível fóssil não é renovável e agride o meio ambiente, várias pesquisas estão sendo desenvolvidas à procura de alternativas ecologicamente corretas e renováveis, como por exemplo o biodiesel, que pode ser obtido através de fontes renováveis (óleo de soja, gordura animal, óleo de algodão). O biodiesel se dá por reações de esterificação e transesterificação, reações de ácidos graxos livres com catalisadores químicos ou enzimáticos (lipases). A biocatálise vem sendo visada por diversos pesquisadores como uma área em potencial para síntese química, com uma grande faixa de atuação e promessas inovadoras. Os processos biocatalíticos diferem dos processos químicos convencionais, devido principalmente à cinética enzimática, proteínas possuem estabilidade sob determinadas condições e características do catalisador que derivam de seu papel na fisiologia da célula, como crescimento, indução da atividade enzimática ou uso de vias metabólicas para reações em várias etapas. Essa proposta estudou as reações de esterificação do ácido oleico utilizando-se as enzimas lipases em substituição aos catalisadores químicos, parâmetros como a temperatura, percentual de enzima, agitação tempo de reação e a capacidade da enzima ser reutilizada. Foram avaliados com relação ao rendimento da conversão de ácido oleico em oleato de etila. Foi desenvolvido um novo método de quantificação, a micro titulação, utilizando seringas graduadas de 1 mL, as titulações foram feitas com hidróxido de sódio 0,5 M, utilizando tubos de vidro e um agitador magnético, para se ter uma forma de quantificar foi necessário fazer uma curva padrão utilizando oleato de etila sintético e ácido oleico em diversas concentrações, após obter a curva padrão foi possível realizar as quantificações das reações catalisadas pelas enzimas. As reações mostraram que a melhor lipase foi a de *Candida antartida* do tipo B (CALB), fornecendo um rendimento superior a 91%, seguido da lipase de *T. Lanuginosus* com 90,3%. A quantidade ideal de CALB mostrou-se ser de 4 % (m/m), temperatura entre 30 a 35 °C, rotação de 200-250 rpm, 16h de reação apresentou grande eficiência e uma quantidade de água no etanol de 2%. As reações de esterificação enzimática do ácido oleico se mostraram promissoras.

Palavras-Chave: Biocatálise. Biodiesel. Esterificação. Enzimas. CALB.

## ABSTRACT

Taking into account that fossil fuel is not renewable and harms the environment, several researches are being developed in search of ecologically correct and renewable alternatives, such as biodiesel, which can be obtained from renewable sources (soybean oil, animal fat, cotton oil). Biodiesel is produced by esterification and transesterification reactions, reactions of free fatty acids with chemical or enzymatic catalysts (lipases). Biocatalysis has been targeted by several researchers as a potential area for chemical synthesis, with a wide range and innovative promise. Biocatalytic processes differ from conventional chemical processes mainly due to enzyme kinetics, proteins have stability under certain conditions, and catalyst characteristics that derive from its role in cell physiology, such as growth, induction of enzyme activity, or use of metabolic pathways for multistep reactions. This proposal studied the esterification reactions of oleic acid using lipase enzymes as a substitute for chemical catalysts, parameters such as temperature, enzyme percentage, stirring reaction time, and the ability of the enzyme to be reused. They were evaluated with respect to the yield of the conversion of oleic acid to ethyl oleate. A new method of quantification was developed, the micro titration, using graduated 1 mL syringes, the titrations were made with 0.5 M sodium hydroxide, using glass tubes and a magnetic stirrer, to have a way to quantify it was necessary to make a standard curve using synthetic ethyl oleate and oleic acid in various concentrations, after obtaining the standard curve it was possible to perform the quantifications of the reactions catalyzed by enzymes. The reactions showed that the best lipase was that of *Candida antartida* type B (CALB), providing a yield of over 91%, followed by lipase from *T. Lanuginosus* with 90.3%. The optimal amount of CALB was shown to be 4 % (m/m), temperature between 30 and 35 °C, rotation of 200-250 rpm, 16 h of reaction showed high efficiency and an amount of water in ethanol of 2%. The enzymatic esterification reactions of oleic acid showed promise.

Key-words: Biocatalysis. Biodiesel. Esterification. Enzymes. CALB.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - MECANISMO GERAL DA ESTERIFICAÇÃO DE FISCHER.....	17
FIGURA 2 - CATÁLISE DO OLEATO DE ETILA.....	22
FIGURA 3 - BIOCATÁLISE DO OLEATO DE ETILA.....	22
FIGURA 4 - GRÁFICO DA MICROTITULAÇÃO.....	26



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PADRÃO DA TITULAÇÃO.....	26
TABELA 2 - ENZIMAS.....	27
TABELA 3 - QUANTIDADE DE ENZIMA.....	28
TABELA 4 - TEMPERATURA .....	28
TABELA 5 - AGITAÇÃO .....	29
TABELA 6 – HIDRATAÇÃO DO SOLVENTE .....	29
TABELA 7 - TEMPO DE REAÇÃO .....	30
TABELA 8 – REUSO DA ENZIMA .....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
CALB	-	<i>Candida antarctica</i> tipo B
ENT	-	Entrada
EXP	-	Experimento
FFA	-	Free fatty acids (ácidos graxos livres)
°C	-	Graus Celsius
Kg	-	Kilograma
pH	-	Potencial hidrogeniônico
RPM	-	Rotação por minuto
TG	-	Triacilglicerídeos

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  - alfa

Å - Ångström

$\beta$  - beta

© - Copyright

® - marca registrada

™ - marca comercial

$\mu$  - micro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
1.1	GERAL .....	13
1.2	ESPECÍFICO.....	13
<b>2</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
3.1	BIODIESEL .....	16
3.2	REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO .....	17
3.3	LIPASE.....	18
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
4.1	MATERIAIS .....	21
4.1.1	Enzimas.....	21
4.1.2	Reagentes .....	21
4.1.3	Equipamentos.....	21
4.1.4	Vidrarias.....	21
4.2	SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA VIA CATÁLISE QUÍMICA.....	22
4.3	SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA UTILIZANDO LIPASES .....	22
4.3.1	Avaliação da Proporção de Enzima em Relação ao Substrato.....	23
4.3.2	Avaliação da Temperatura.....	23
4.3.3	Avaliação da Velocidade de Agitação.....	23
4.3.4	Avaliação do nível de hidratação .....	24
4.3.5	Avaliação do Tempo de Reação .....	24
4.3.6	Avaliação da Reutilização da Enzima .....	24
4.4	QUANTIFICAÇÃO DAS REAÇÕES .....	24
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>26</b>
5.1	RENDIMENTO DA REAÇÃO .....	26
5.2	AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS .....	27
5.2.1	Avaliação da Proporção de Enzima em Relação ao Substrato.....	27
5.2.2	Avaliação da Temperatura.....	28
5.2.3	Avaliação da Velocidade de Agitação.....	28
5.2.4	Avaliação do Nível de hidratação.....	29
5.2.5	Avaliação do Tempo de Reação .....	29
5.2.6	Teste de reutilização da enzima .....	30
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>

## 1 OBJETIVOS

Realizar a esterificação do ácido oleico utilizando a biocatálise, afim de obter oleato de etila, visando sua capacidade de ser utilizado na produção do biodiesel.

### 1.1 GERAL

Avaliar reações de esterificação do ácido oleico, através de biocatalizadores enzimáticos para a produção de biodiesel.

### 1.2 ESPECÍFICO

Testar diferentes lipases com o intuito de descobrir a enzima com a maior capacidade catalítica, e posteriormente, avaliar seu rendimento sob diferentes variáveis, como a temperatura; agitação; proporção de enzima; adição de água à reação; tempo de reação; reutilização do biocatalisador.

## 2 INTRODUÇÃO

Com uma demanda gigantesca, o diesel é um dos combustíveis mais consumidos no mundo. Oriundo do petróleo, além de emitir grande quantidade de gases poluentes, não é uma fonte renovável. Desta forma, o biodiesel aparece como uma opção viável e atrativa, tendo em vista os fatores ambientais e sendo um produto renovável (OLIVEIRA, 2008).

A produção de biodiesel recebeu recentemente muita atenção em todo o mundo. Por causa da crise energética mundial (KÖRBITZ, 1999), muitos países começaram a tomar uma série de medidas para resolver esse problema. Encontrar recursos energéticos alternativos é uma missão para muitos países (RYAN; CONVERY; FERREIRA, 2006).

Nas décadas de 1930 e 1940, os óleos vegetais foram utilizados como combustível em substituição ao diesel em situações de emergência. Com o rápido desenvolvimento da indústria moderna, a demanda por energia aumentou bastante nos últimos anos, e, portanto, fontes alternativas de energia estão sendo exploradas. Assim, o termo "biodiesel" tem aparecido com muita frequência em muitos relatórios recentes (FISCHER; SCHRATTENHOLZER, 2001).

O biodiesel é um recurso energético atraente por várias razões. Primeiro, o biodiesel é um recurso renovável de energia que poderia ser fornecido de forma sustentável. Segundo, o biodiesel tem várias propriedades ambientais favoráveis, resultando em nenhum aumento líquido de liberação de dióxido de carbono e baixo teor de enxofre (ANTOLÁN, 2002; VICENTE; MARTÍNEZ; ARACIL, 2004).

Quimicamente o biodiesel é composto de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais. É produzido através da transesterificação de um óleo ou gordura que reage com um álcool, utilizando um catalisador (MEHER; VIDYASAGAR; NAIK, 2006). Tempo curto e altos rendimentos são obtidos quando transesterificação química é aplicada. No entanto, alta energia é requerida, dificuldades na recuperação de catalisadores e glicerol e poluição para o meio ambiente são grandes desvantagens em processos de catalise alcalina e ácida (LU et al., 2007).

Recentemente, tem-se observado um crescente número de pesquisas com outra forma de produção de biodiesel, com a utilização de enzimas (lipases) para

realizar a catálise da reação, que ocorre em condições amenas. (ROYON et al., 2007).

A biocatálise vem de milhares de anos atrás, como por exemplo a fabricação de pão, queijo, cerveja e vinho. Processamento de alimentos e bebidas juntamente com ração e detergentes para animais ainda representam mais 60% do mercado total de enzimas. O restante deste mercado é constituído principalmente pelo processamento de amido, couro e celulose e papel, e isso se reflete nas três enzimas industriais de maior volume sendo proteases, amilases e glicose isomerase (ILLANES, 2008; SHELDON; PEREIRA, 2017)

Foi o desenvolvimento da tecnologia de recombinantes de DNA na década de 1970, no entanto, que forneceu o base para a mudança das fontes tradicionais de animais e plantas. Com microrganismos recombinantes a produção se tornou-se muito mais eficiente, proporcionando enzimas mais baratas e de maior pureza. Hoje quase todas as enzimas industriais são recombinantes, com a exceção daquelas usadas no processamento de alimentos. A biocatálise geralmente se refere ao uso de enzimas, ou células contendo enzimas, em transformações químicas (ILLANES, 2008; PATEL, 2018; SHELDON; PEREIRA, 2017).

As lipases são enzimas altamente estáveis, e, mesmo sob condições desfavoráveis, permanecem ativas (PANDEY et al., 1999). O papel fisiológico das lipases é a conversão catalítica de triglicerídeos em di, ou monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol (CORRÊA et al., 2020). Várias lipases são incapazes de hidrolisar ligações éster em posições secundárias, como a maioria das lipases microbianas enquanto outro grupo dessas enzimas hidrolisa tanto os primários quanto os ésteres secundários. Um terceiro grupo de lipases exibe seletividade de ácidos graxos, e cliva ligações éster de tipos específicos de ácidos graxos (PANDEY et al., 1999).

Neste estudo, foi realizado a esterificação enzimática de ácido oleico com etanol, utilizando 13 diferentes lipases com o objetivo de avaliar o comportamento enzima para as reações de esterificação. Após a seleção da lipase com melhor rendimento, foram realizados testes de temperatura, agitação, tempo, quantidade de enzima, adição de H<sub>2</sub>O, a fim de encontrar a máxima eficiência catalítica. Para a quantificação, foi utilizado um novo método, a microtitulação, realizou-se um padrão de medições com o oleato de etila obtido através da catalise química, para assim obter uma equação que possibilita a quantificação das reações.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 BIODIESEL

Desde o século passado os combustíveis derivados do petróleo têm sido a principal fonte de energia mundial. Porém, as previsões são de que este recurso deva chegar ao fim, somado às preocupações ambientais, vem instigando a busca por combustíveis renováveis (GHASSAN et al., 2003).

O biodiesel é uma mistura de ésteres de ácidos graxos com álcoois de cadeia curta, como o metanol ou o etanol (SUAREZ et al., 2007). Essa mistura obtida pelos processos de transesterificação ou esterificação é a que vem sendo comercializada no Brasil com o nome de biodiesel. Apesar de suas propriedades possibilitarem a substituição do diesel, a composição química do biodiesel é bem diferente da do diesel. Segundo Oliveira (2008), o óleo diesel é um combustível obtido a partir do refino do petróleo por destilação fracionada em temperaturas na faixa de 150 a 400 °C. É constituído basicamente por hidrocarbonetos, apresentando em baixas concentrações átomos de enxofre, oxigênio e nitrogênio. A cadeia de hidrocarbonetos que forma o óleo diesel varia, podendo chegar até vinte e oito átomos de carbono.

O biodiesel é um substituto adequado para o diesel derivado do petróleo. É biodegradável, quase sem enxofre e um combustível renovável, embora ainda não seja produzido por rotas ambientalmente corretas. Esta alternativa de combustível consiste em ésteres metílicos ou etílicos, um resultado da transesterificação de triacilglicerídeos (TG) ou esterificação de ácidos graxos livres (MA; HANNA 1999). O biodiesel tornou-se mais atraente devido aos seus benefícios ambientais, ao fato de que plantas e óleos vegetais e gorduras animais serem renováveis (oriundos de biomassa) (ZHENG et al., 2006).

Os processos comuns de produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixo custo usam ácidos minerais como catalisadores, Cardoso, Neves e Silva (2008) dizem que devido às grandes quantidades de *free fatty acids* (FFAs) que esses recursos contêm, que tornam a produção de biodiesel a partir dessas matérias-primas incompatíveis com catalisadores alcalinos. Assim, duas abordagens alternativas são normalmente usadas. O primeiro é um processo de duas etapas, que requer uma esterificação catalisada por ácido inicial do FFA, seguida por uma transesterificação



catalisada por base do TG. Segundo, um processo de uma etapa que usa apenas um catalisador ácido que promove simultaneamente a esterificação e reações de transesterificação (ZULLAIKAH et al. 2005).

É produzido através da transesterificação de um óleo ou gordura que reage com um álcool, utilizando um catalisador (MEHER; VIDYASAGAR; NAIK, 2006). Tempo curto e altos rendimentos são obtidos quando transesterificação química é aplicada. No entanto, alta energia é requerida, dificuldades na recuperação de catalisadores e glicerol e poluição para o meio ambiente são grandes desvantagens em processos de catalise alcalina e ácida (LU et al., 2007).

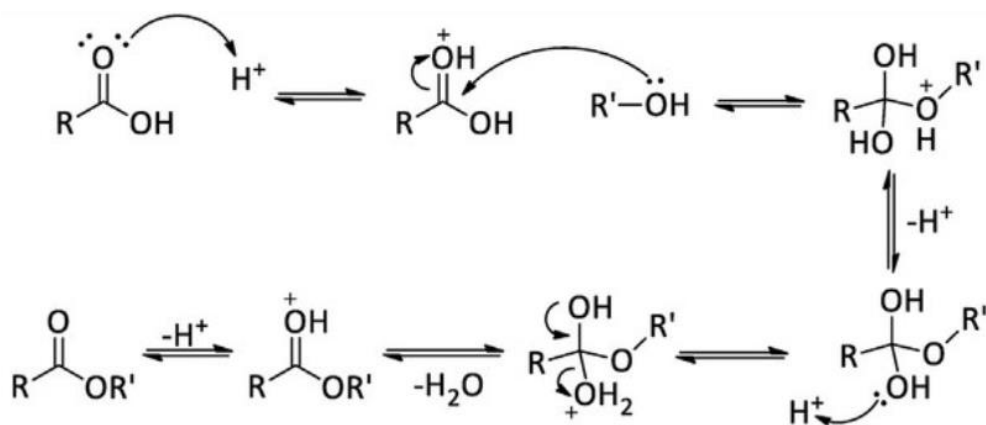
O processo de esterificação para a produção de biodiesel apresenta como principais vantagens a possibilidade de produção desse combustível a partir de resíduos de baixo valor agregado, não do óleo vegetal, e a formação apenas de água como subproduto (OLIVEIRA et al. 2010). Por exemplo, tem sido produzido no Brasil biodiesel a partir de ácidos graxos residuais do refino do óleo de palma (SILVA et al., 2011).

Outra forma de produção do biodiesel seria utilizando enzimas para realizar a catálise da reação, as lipases. Elas são capazes de catalisar a reação em condições amenas, recentemente, há um número crescente de pesquisas sobre este assunto (ROYON et al., 2007).

### 3.2 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

A reação de esterificação de Fischer (FIGURA 1), como é conhecida, consiste em uma reação de substituição nucleofílica do grupamento acila de um ácido carboxílico com um álcool, formando éster e água (MCMURRY, 2005).

FIGURA 1 - MECANISMO GERAL DA ESTERIFICAÇÃO DE FISCHER.



FONTE: MORAES CALVALCANTE et al. (2015, p. 322)

A formação de ésteres tem caráter reversivo, assim para deslocar o equilíbrio a favor da esterificação deve-se remover a água ou utilizar em excesso os reagentes, álcool ou ácido (NEVES, 2008). O mecanismo de reação mais comum é quando um ácido carboxílico é protonado por um ácido de Bronsted, que torna o ácido carboxílico muito mais reativo e facilita o ataque do álcool à carbonila, formando um composto intermediário que sofre rearranjo e perde uma molécula de água e uma molécula de éster (LEÃO, 2009).

Embora o mecanismo de reação seja bastante conhecido, vários estudos têm sido desenvolvidos para otimizar as esterificações e para aplicações industriais, como a adição de novos catalisadores e a modificação das condições de reação, como a análise da temperatura e pressão do ambiente, além da concentração limite dos reagentes (MEDEIROS, 2008). Alto consumo de energia, corrosão de equipamentos, baixa seletividade, tratamento de efluentes, formação de subprodutos opticamente inativos são exemplos das desvantagens da esterificação catalisada por ácido (SILVA, 2014). Como alternativa à esterificação catalisada por produtos químicos, a reação biocatalisada com lipase tem várias vantagens, tais como: Valor de pH quase neutro sem reação colateral ou formação de subproduto, o que reduz a necessidade de processos de separação catalisador-produto e reduz os custos do processo (RAJENDRAN et al., 2009).

### 3.3 LIPASE

Lipases (triglicerol acil-hidrolase, EC 3.1.1.3) são enzimas capazes de atuar principalmente em reações de hidrólise nas ligações de éster de acilglicerol, mas sob condições específicas podem catalisar reações de esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação (DALLA-VECCHIA, 2004). De acordo com Lotti e Alberghina (2007), tais biocatalisadores são potencialmente interessantes devido às suas sofisticadas seletividades, como regioseletividade (a posição da ligação éster no substrato é reconhecida); quimioseletividade (a natureza do substrato é reconhecida); estereosseletividade (a presença de isômeros é reconhecida).

Embora apresentem diferenças em seus sítios ativos e na estrutura ao seu redor, as lipases compartilham algumas características em comuns (POPPE, 2012). Coletivamente, sua natureza tridimensional apresenta um dobramento padrão na conformação  $\alpha/\beta$  hidrolase e seu sítio catalítico é composto por uma tríade de resíduos de aminoácidos Ser- His- Asp/Glu protegidos por uma cadeia polipeptídica hidrofóbica em  $\alpha$ -helice denominada *lid* ou tampa (MATTE, 2015; RODRIGUES, 2009; SUDBRACK, 2012). Rodrigues (2009) esclarece que estas características explicam o fenômeno de ativação da interface, que segundo Jaeger e Reetz (1998) é um mecanismo específico das reações lipolíticas e que diverge do modelo cinético proposto por Michaelis-Menten. A ativação interfacial envolve uma modificação da estrutura tridimensional da molécula ao entrar em contato com interfaces hidrofílicas ou com interfaces hidrofóbicas (RODRIGUES, 2009; POPPE, 2012). Quando em meio aquoso homogêneo, na ausência de solventes orgânicos e interfaces, a tampa permanece fechada e a enzima exibe baixa atividade, entretanto quando estão presentes interfaces hidrofóbicas, a tampa é aberta, expondo uma ampla zona hidrofóbica na região do sítio ativo e permitindo o acesso dos substratos (DEREWENDA *et al.*, 1992; MATTE, 2015; RODRIGUES, 2009; POPPE, 2012). No entanto, a ativação da superfície e a presença da tampa, que são características específicas destas enzimas, não devem ser consideradas como critérios para classificar uma enzima como lipase ou não, visto que lipases provenientes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae*, *Candida antarctica* B e a lipase pancreática de um roedor, não apresentam ativação interfacial, todavia possuem a tampa em volta do sítio ativo (BRIGIDA, 2000; JAEGER e REETZ, 1998).

A aplicação biotecnológica industrial de lipases está crescendo rápida e constantemente (JAEGER e REETZ, 1998), e é o terceiro maior grupo de enzimas

em termos de *turnover* (HASAN et al. 2005). Hasan et al. (2005) e Houde et al. (2003) descrevem que as aplicações mais importantes em escala industrial de lipases são na indústria de alimentos, detergentes têxteis, oleoquímica, farmacêutica e química e como ferramentas para o diagnóstico e tratamento de doenças.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Enzimas

Foram utilizadas 13 diferentes enzimas para a elaboração das reações: *Candida antarctica* Tipo B (CALB), *Lipozyme TL IM*, Lipase from *Rhizopus Niveus*, Amano lipase PS from *Burkholderia cepacia*, Lipase from Hog *Pancreas*, *Lipozyme 435*, *Lipozyme RM IM*, Lipase from *Candida Rugosa*, Amano Lipase *P. fluorescens*, Lipase from *Porcine Pancreas* Tipo II, Lipase *CAS Spectrum 9001-62-1*, Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*, *Lecitase Ultra*. Sendo que a CALB foi doada pela Novo Nordisk e as demais adquiridas comercialmente (Sigma Aldrich™)

#### 4.1.2 Reagentes

Também, os seguintes reagentes foram utilizados: ácido oleico, etanol anidro, iodo (Synth®), tolueno, acetato de etila, ácido clorídrico, clorofórmio, sulfato de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio (Alphatec®), ácido sulfúrico (Quemis®), cicloexano (Vetec®), água destilada, fenolftaleína (Neon®).

#### 4.1.3 Equipamentos

Equipamentos como: balança analítica (Shimadzu™) modelo AY220, incubador refrigerado shaker (Cinelab®) modelo CE-725IR, tubos de 5 mL, agitador magnético (Centauro®), sistema Dean Stark, evaporador rotativo (Tecnal®) modelo TE-211, seringas hipodérmicas. Outros materiais foram utilizados, como: Placas de sílica (Fluka analytical™) modelo F<sub>254</sub>, papel filtro (Qualy®), peneira molecular (H<sub>2</sub>O).

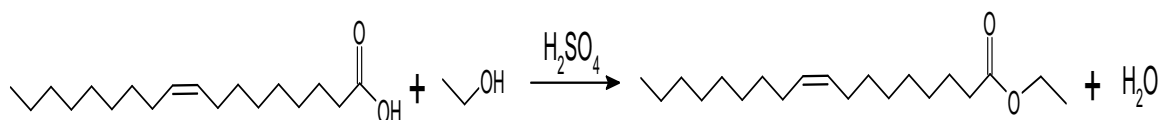
#### 4.1.4 Vidrarias

Algumas vidrarias como: Beckers, Erlenmeyer, funis, coluna cromatográfica, cuba cromatográfica e funis de separação.

## 4.2 SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA VIA CATÁLISE QUÍMICA

Para a síntese do oleato de etila via catalisador químico adicionou-se em um Erlenmeyer 5 mL de ácido oleico com 9,3 mL de etanol, 32 mL de tolueno em um sistema Dean-Stark, aquecido em 50 °C e depois adicionou-se 100 µL de ácido sulfúrico e a solução permaneceu a 110 °C por 6 horas em refluxo. Posteriormente, a amostra foi transferida para um funil de separação, adicionado 40 mL de solução de bicarbonato de sódio 5%, e removendo a fase aquosa. Em seguida a amostra foi colocada em um Erlenmeyer, com sulfato de sódio para retirar toda água. Foi também realizada purificação por cromatografia em coluna com sílica e um sistema eluente *n*-hexano:acetato de etila (95:05).

FIGURA 2 - CATÁLISE DO OLEATO DE ETILA

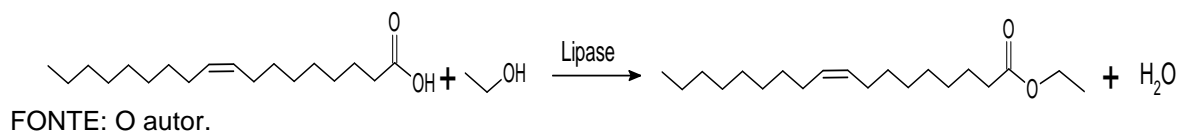


FONTE: O autor.

## 4.3 SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA UTILIZANDO LIPASES

Na biocatálise, o procedimento foi o mesmo para as 13 enzimas. Em um tubo criogênico de 5 mL adicionou-se 200 mg de ácido oleico, 500 µL de etanol anidro, 20 mg de peneira molecular (4 Å) para remoção da água da reação e 20 mg de enzima 10% (m/m). Em seguida o tubo foi levado ao agitador orbital (shaker) a 32 °C, 200 rpm por 24 horas. Após as 24h o produto foi filtrado utilizando um funil de vidro e papel filtro comum (qualitativo) em um becker com 1 g de sulfato de sódio e novamente filtrado. Para análise qualitativa da reação, utilizou-se uma placa de sílica, empregando como eluente ciclohexano:acetato de etila (95:05) e revelada em vapor de iodo. A amostra permaneceu na capela para evaporação do restante do solvente, e posteriormente realizada a pesagem e em seguida a quantificação por microtitulação.

FIGURA 3 - BIOCATÁLISE DO OLEATO DE ETILA



#### 4.3.1 Avaliação da Proporção de Enzima em Relação ao Substrato

Para realizar o teste de proporção da enzima, utilizou-se a enzima lipase proveniente da *Candida Antartica* tipo B (CALB), pois apresentou maiores rendimentos (

*TABELA 3*). As reações foram conduzidas em tubos criogênicos de 5 mL, adicionando 200 mg de ácido oleico, 500 µL de etanol anidro, 20 mg de peneira molecular (4 Å), a 32 °C, 200 rpm por 24 horas, variando-se apenas a quantidade da enzima utilizada. A quantidade de enzimas avaliadas foi nas proporções de: 1, 2, 4, 7, 10, 15, 20% (m/m), e posteriormente todas as amostras foram quantificadas por microtitulação.

#### 4.3.2 Avaliação da Temperatura

A temperatura é um fator muito importantes na reação, então, foram feitas 8 reações para avaliar a melhor temperatura para a lipase. As reações foram conduzidas em frascos criogênicos conforme os experimentos anteriores, com temperaturas variando de 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50 e 60 °C, utilizando a enzima CALB com 2% de enzima (m/m), e posteriormente fazendo a quantificação utilizando a microtitulação (*TABELA 4*).

#### 4.3.3 Avaliação da Velocidade de Agitação

Para o teste de agitação foram preparadas 6 reações em tubos criogênicos, a 32 °C, por 24 horas com 2% de enzima CALB (m/m) e variando apenas a agitação durante a reação. Nos testes, variamos a velocidade de 0, 50, 100, 150, 200 e 250 rpm (*TABELA 5*).

#### 4.3.4 Avaliação do nível de hidratação

A presença de água foi avaliada. Neste experimento foi adicionado porcentagens de H<sub>2</sub>O (2, 5, 10, 15, 20, 30 e 50%) ao etanol anidro, onde 0% seria 500 µL de etanol, e 50% de água são 250 µL de etanol e 250 µL de água. As reações foram conduzidas em frascos criogênicos a 32 °C, 200 rpm por 24 horas, utilizando a enzima CALB com 2% de enzima (m/m), e posteriormente fazendo a quantificação utilizando a microtitulação. (TABELA 6).

#### 4.3.5 Avaliação do Tempo de Reação

Neste experimento, as reações foram conduzidas em frascos criogênicos, utilizando 2% da enzima CALB (m/m), 32 °C, 200 rpm e variando o tempo de reação entre: 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 horas. Posteriormente as amostras foram quantificadas utilizando a microtitulação (TABELA 7).

#### 4.3.6 Avaliação da Reutilização da Enzima

O experimento de reutilização da enzima foi realizado em 10 ciclos, a enzima foi reutilizada 10 vezes. As reações ocorreram em frascos criogênicos a 32 °C, 24 horas, 200 rpm, utilizando a enzima CALB 2% (m/m) (TABELA 8).

### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DAS REAÇÕES

O rendimento da reação foi avaliado por meio da conversão de ácido oleico em oleato de etila. Para isso, após as reações de esterificação, foram realizadas as quantificações de oleato de etila por meio do método de microtitulação. Para esse método de quantificação foi feito uma curva analítica com variações de quantidade de ácido oleico e oleato de etila (sintético), e titulando para se ter um padrão de comparação para as futuras amostras. Em um tubo de vidro adicionou-se 100 mg do produto da reação, 3 mL de etanol, uma gota de fenolftaleína e uma barra magnética, colocou-se o vidro em um agitador magnético e adicionou-se gota a gota de hidróxido de sódio na amostra até o indicador de alcalinidade mudar a cor, então observa-se a



quantidade de NaOH gasto que é então comparado com a curva analítica, obtendo-se assim a quantidade de oleato de etila gerado.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 RENDIMENTO DA REAÇÃO

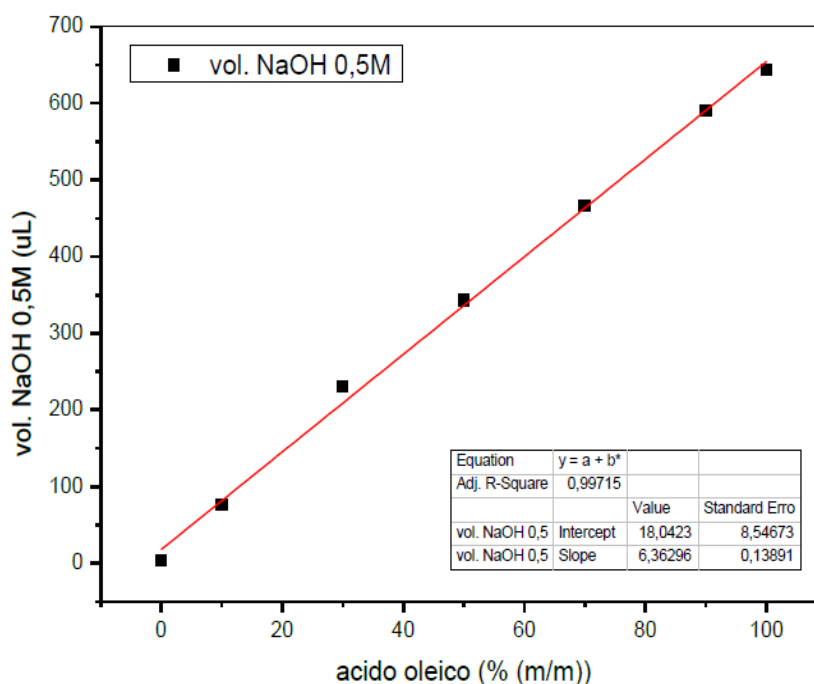
A quantificação das reações foi feita através da titulação ácido-base, por meio de uma curva analítica padrão. Utilizou-se amostras com porcentagens de ácido oleico e oleato de etila previamente definidas para realizar a titulação das mesmas. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e do valor gasto da solução de NaOH 0,5% na titulação representa uma média das medidas (TABELA 1).

TABELA 1 - PADRÃO DA TITULAÇÃO.

Amostra	Oleato de etila (%)	Ácido oleico (%)	NaOH 0,5% (µL)
1	100	0,00	6,670 ± 2,88
2	90,0	10,0	86,67 ± 5,77
3	70,0	30,0	233,3 ± 5,77
4	50,0	50,0	390,0 ± 17,3
5	30,0	70,0	553,3 ± 28,8
6	10,0	90,0	711,7 ± 2,88
7	0,00	100	780,0 ± 0,00

FONTE: O autor.

FIGURA 4 - GRÁFICO DA MICROTITULAÇÃO.



FONTE: O autor.

## 5.2 AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS

No primeiro experimento (TABELA 2), foram testadas 13 diferentes enzimas visando encontrar a melhor lipase capaz de catalisar a reação de esterificação.

As enzimas obtidas a partir de *Candida antarctica* tipo B e a *T. Lanuginosus*, obtiveram os melhores resultados na conversão de ácido oleico em oleato de etila, com um rendimento de 91,8% e 90,3%. Rodrigues e Fernandez-Lafuente (2010) comentam em sua revisão que estas duas lipases oferecem os melhores resultados para este tipo de reação, entretanto, também depende do álcool utilizado.

Já a enzima produzida pelo microrganismo *R. Niveus* não apresentou eficiência nesta reação, e, de acordo com Tweddell et al. (1998), isso pode ocorrer pois a enzima necessita uma quantidade mínima de água para ser ativada, no presente estudo não havia presença de água, o que pode estar ligado ao fato dessa enzima não ter sido ativada para catalisar a reação.

TABELA 2 - ENZIMAS

Ent.	Lipase	Enzima (%)	Rotação (rpm)	Temp. (°C)	H <sub>2</sub> O (%)	Rendimento (%)
Exp.-1						
1	<i>Candida antarctica</i> tipo B	10	200	32	-	91,8
2	<i>Lipozyme TL IM</i>	10	200	32	-	57,3
3	Lipase from <i>R. Niveus</i>	10	200	32	-	0,00
4	Amano lipase from <i>B. cepacia</i>	10	200	32	-	32,1
5	Lipase from <i>Hog Pancreas</i>	10	200	32	-	8,50
6	<i>Lipozyme 435</i>	10	200	32	-	76,1
7	<i>Lipozyme RM IM</i>	10	200	32	-	87,1
8	Lipase from <i>C. Rugosa</i>	10	200	32	-	4,60
9	Amano Lipase <i>P. Fluorecens</i>	10	200	32	-	38,4
10	Lipase from <i>Porcine Pancreas</i> Tipo II	10	200	32	-	36,0
11	Lipase <i>CAS Spectrum</i>	10	200	32	-	30,5
12	Lipase from <i>T. Lanuginosus</i>	10	200	32	-	90,3
13	<i>Lecitase Ultra</i>	10	200	32	-	40,0

FONTE: O autor.

### 5.2.1 Avaliação da Proporção de Enzima em Relação ao Substrato

A proporção de enzima foi testada em 7 reações, variando somente a quantidade de enzima em relação a massa do ácido oleico, onde pode-se observar que utilizando 4 mg de enzima obtém-se o melhor rendimento 88,7 % (

## TABELA 3).

TABELA 3 - QUANTIDADE DE ENZIMA

Ent.	Lipase	Enzima (%)	Tempo (h)	Rotação (rpm)	Temp. (°C)	H <sub>2</sub> O (%)	Rendimento (%)
Exp.-2							
14	CALB	1	24	200	32	-	80,8
15	CALB	2	24	200	32	-	88,7
16	CALB	4	24	200	32	-	82,4
17	CALB	7	24	200	32	-	84,8
18	CALB	10	24	200	32	-	80,8
19	CALB	15	24	200	32	-	76,9
20	CALB	20	24	200	32	-	71,4

FONTE: O autor.

## 5.2.2 Avaliação da Temperatura

As lipases têm sua cinética enzimática alterada dependendo da temperatura. Avaliando os resultados, podemos observar que a CALB apresentou o melhor rendimento na faixa de 25 a 35 °C, 91,8 % (TABELA 4). De acordo com Boros et al. (2013), a *Candida antarctica* pode oferecer mudanças em sua cinética dependendo da forma que foi imobilizada. A CALB utilizada é imobilizada em resina acrílica.

TABELA 4 - TEMPERATURA

Ent.	Lipase	Enzima (%)	Tempo (h)	Rotação (rpm)	Temp. (°C)	H <sub>2</sub> O (%)	Rendimento (%)
Exp.-3							
21	CALB	2	24	200	10	-	80,8
22	CALB	2	24	200	20	-	87,1
23	CALB	2	24	200	25	-	91,8
24	CALB	2	24	200	30	-	91,8
25	CALB	2	24	200	35	-	91,8
26	CALB	2	24	200	40	-	90,3
27	CALB	2	24	200	50	-	90,3
28	CALB	2	24	200	60	-	89,5

FONTE: O autor.

## 5.2.3 Avaliação da Velocidade de Agitação

Observou-se que a agitação favorece a conversão do ácido oleico em oleato de etila, pois o experimento 29, onde não foi realizada a agitação, apresentou o menor valor de rendimento.

E ainda, os experimentos que utilizaram agitações de 200 e 250 rpm, alcançaram o maior percentual de conversão, 91,8 %.

TABELA 5 - AGITAÇÃO

Ent.	Lipase	Enzima (%)	Tempo (h)	Rotação (rpm)	Temp. (°C)	H <sub>2</sub> O (%)	Rendimento (%)
Exp.-4							
29	CALB	2	24	0,00	32	-	79,3
30	CALB	2	24	50,0	32	-	87,1
32	CALB	2	24	100	32	-	90,3
33	CALB	2	24	150	32	-	90,3
34	CALB	2	24	200	32	-	91,8
35	CALB	2	24	250	32	-	91,8

FONTE: O autor.

#### 5.2.4 Avaliação do Nível de hidratação

A presença de água no álcool é um fator muito importante a se considerar. As lipases podem necessitar uma certa quantidade de água para manter a atividade (JEGANNATHAN et al., 2008). A água se faz necessária para manter a estrutura tridimensional da enzima, na ausência dela, pode ocorrer alterações irreversíveis na estrutura da enzima (LU et al., 2009). Algumas enzimas necessitam da presença de água na reação para serem ativadas (TWEDDELL et al., 1998). Em nossos testes, a CALB mostrou melhor eficiência utilizando 2% de H<sub>2</sub>O no solvente (TABELA 6). Para Rosset et al. (2011), a enzima CALB se mostrou mais eficiente utilizando 4% de água na reação.

TABELA 6 – HIDRATAÇÃO DO SOLVENTE

Ent.	Lipase	Enzima (%)	Tempo (h)	Rotação (rpm)	Temp. (°C)	H <sub>2</sub> O (%)	Rendimento (%)
Exp.- 5							
36	CALB	2	24	200	32	2,0	92,6
37	CALB	2	24	200	32	5,0	66,7
38	CALB	2	24	200	32	10	69,8
39	CALB	2	24	200	32	15	80,8
40	CALB	2	24	200	32	20	68,2
41	CALB	2	24	200	32	30	73,8
42	CALB	2	24	200	32	50	88,7

FONTE: O autor.

#### 5.2.5 Avaliação do Tempo de Reação

O tempo necessário para uma reação ocorrer pode variar conforme a quantidade de enzima no substrato, e as condições a qual a reação foi exposta. Em nossos testes, podemos observar que a lipase CALB já atingiu altos resultados em 16 horas, mas continua reagindo até as 48 horas, mas já chegando no limite da biocatálise (TABELA 7), sendo viável a utilização de 16 horas, pelo fato de consumir menor tempo para reagir e proporcionando ótimas concentrações. Para Rosset et al. (2013), o tempo aceitável para a reação da CALB também foi de 24 horas.

TABELA 7 - TEMPO DE REAÇÃO

Ent.	Lipase	Enzima (%)	Tempo (h)	Rotação (rpm)	Temp. (°C)	H <sub>2</sub> O (%)	Rendimento (%)
Exp.-6							
43	CALB	2	0,5	200	32	-	0,70
44	CALB	2	1,0	200	32	-	13,3
45	CALB	2	2,0	200	32	-	28,9
46	CALB	2	4,0	200	32	-	52,5
47	CALB	2	8,0	200	32	-	79,3
48	CALB	2	16	200	32	-	91,0
49	CALB	2	24	200	32	-	91,8
50	CALB	2	48	200	32	-	93,4

FONTE: O autor.

### 5.2.6 Teste de reutilização da enzima

Foram realizados ensaios para avaliar o rendimento de conversão da reação de ácido oleico em oleato de etila após até 10 ciclos de reutilização da enzima lipase de *Candida antarctica* do tipo B. Podemos notar que ela se manteve estável após os 10 ciclos (TABELA 8), mantendo-se semelhante com os resultados obtidos por Rosset et al, 2011.

TABELA 8 – REUSO DA ENZIMA

Ent.	Ciclos	Lipase	Enzima (%)	Tempo (h)	Rotação (rpm)	Temp. (°C)	Rendimento (%)
Exp. -7							
51	1	CALB	2	24	200	32	80,8
52	2	CALB	2	24	200	32	83,9
53	3	CALB	2	24	200	32	80,8
54	4	CALB	2	24	200	32	85,5
55	5	CALB	2	24	200	32	83,9
56	6	CALB	2	24	200	32	80,8
57	7	CALB	2	24	200	32	78,5
58	8	CALB	2	24	200	32	82,4
59	9	CALB	2	24	200	32	83,9
60	10	CALB	2	24	200	32	83,9

FONTE: O autor.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo sobre a esterificação e a utilização de lipases como biocatalisadores para a produção de biodiesel e também realizar um estudo mais aprofundado de uma lipase em específico, a CALB.

Com base nos dados obtidos experimentalmente, foi possível constatar a capacidade de se utilizar lipases na produção de biodiesel, dentre as lipases estudadas, apenas uma não reagiu, porém, necessitava de água para ser ativada.

Dentre as 13 enzimas testadas, a lipase imobilizada de *Candida antarctica do tipo B* e a oriunda de *T. Lanuginosus* apresentaram resultados parecidos, mas a CALB foi a melhor devido aos seus níveis de conversão mais elevados. A *Candida antarctica do tipo B* apresentou bons rendimentos utilizando 2% (m/m) da lipase, com melhores resultados a uma temperatura de 25 a 35 °C. Necessitando de uma agitação de pelo menos 200 rpm, para facilitar a reação, utilizando um nível de hidratação de 2% a lipase apresentou melhores resultados. O tempo necessário para a reação ocorrer de forma satisfatória foi de 16 horas, mas com uma leve melhora nos tempos de 24 e 48 horas. E também se mostrou estável após 10 ciclos de reutilização. O método de quantificação utilizado, a microtitulação, mostrou-se viável para estas análises realizadas.



## REFERÊNCIAS

ANTOLÃN, G. Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 2, p. 111–114, jun. 2002.

BOROS, Z. et al. How the mode of *Candida antarctica* lipase B immobilization affects the continuous-flow kinetic resolution of racemic amines at various temperatures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85–86, p. 119–125, jan. 2013.

BRÍGIDA, A. I. S. **Imobilização de Lipases utilizando fibra de casca de coco verde como suporte para aplicações industriais**. 2010. 193 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.  
CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 544 p.p. 544 2006.

CARDOSO, A.; NEVES, S.; DA SILVA, M. Esterification of Oleic Acid for Biodiesel Production Catalyzed by SnCl<sub>2</sub>: A Kinetic Investigation. **Energies**, v. 1, n. 2, p. 79–92, 24 set. 2008.

CORRÊA, L. DA S. et al. Lipase-Catalyzed Esterification of Geraniol and Citronellol for the Synthesis of Terpenic Esters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 2, p. 574–583, fev. 2020.

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

DEREWENDA, U. *et al.* Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. **Biochemistry**, v. 31, n. 5, p.1532-1541, fev. 1992.

FISCHER, G.; SCHRATTENHOLZER, L. Global bioenergy potentials through 2050. **Biomass and Bioenergy**, p. 9, 2001.

GHASSAN, T. A. et al. Combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace. **Appl. Thermal Eng.**, v.23, p.285-293, 2003.

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

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p.155-170, 2004.

JAEGER, K.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends In Biotechnology**, v. 16, n. 9, p.396-403, 1 set. 1998.

ILLANES, A. (ED.). **Enzyme biocatalysis: principles and applications**. Dordrecht: Springer, 2008.

JEGANNATHAN, K. R. et al. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase. A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 253–264, jan. 2008.

KÖRBITZ, W. Biodiesel production in Europe and North America, an encouraging prospect. **Renewable Energy**, v. 16, n. 1–4, p. 1078–1083, jan. 1999.

LEÃO, L. S. **Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o ácido nióico**. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Química, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

LOTTI, M.; ALBERGHINA, L. Lipases: molecular structure and function. Em: POLAINA, J.; MACCABE, A.p. **Industrial Enzymes**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 263-282.

LU, J. et al. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 1367–1370, set. 2007.

LU, J. et al. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 in organic solvent system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 2–3, p. 122–125, fev. 2009.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, p. 15, 1999.

MATTE, C. R. **Estudos de imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em Immobead 150, caracterização dos derivados e suas aplicações em reatores contínuos e em batelada para a síntese de butirato de butila e biodiesel**. 2015. 163 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

MCMURRY, J. **Química Orgânica**. V. cap. 21. São Paulo/SP, editora Pioneira Thomson Learning, 6a edição, 2005.

MEDEIROS, C. R. **Otimização da síntese de ésteres usados na indústria de sabores e aromas**. 2008. 46 f. Relatório Técnico (Estágio Supervisionado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

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

MORAES CALVALCANTE, P. M. et al. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, v. 26, n. 4, p. 319–329, out. 2015.

NEVES, A. A. S. **Avaliação do Aproveitamento de Óleos Alimentares Usados Para a Produção de Biodiesel na Área Metropolitana do Porto**. 2008. 296 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto, 2008.

OLIVEIRA, C. F. et al. Esterification of oleic acid with ethanol by 12-tungstophosphoric acid supported on zirconia. **Applied Catalysis A: General**, v. 372, n. 2, p. 153–161, 15 jan. 2010.

OLIVEIRA, F. C. C. Biodiesel: Possibilidades e Desafios. **QUÍMICA NOVA NA ESCOLA**, p. 6, 2008.

PANDEY, A. et al. The realm of microbial lipases in biotechnology. p. 13, 1999.

PATEL, R. N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1252–1274, abr. 2018.

POPPE, J. K. **Síntese de Ésteres Metílicos catalisada por Lipase de Candida antartica Imobilizada em Suporte Hidrofóbicos**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p.207-219, 2009.

RODRIGUES, R. C. **Síntese de Biodiesel através da Transesterificação Enzimática de Óleos Vegetais Catalisada por Lipase Imobilizada por Ligação Covalente Multipontual**. 2009. 183 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 1–2, p. 1–22, jun. 2010.

ROSSET, I. G. et al. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and <sup>1</sup>H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, n. 1–2, p. 136–142, jan. 2011.

ROSSET, I. G. et al. Enzymatic Esterification of Oleic Acid with Aliphatic Alcohols for the Biodiesel Production by *Candida antarctica* Lipase. **Catalysis Letters**, v. 143, n. 9, p. 863–872, set. 2013.

ROYON, D. et al. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 648–653, fev. 2007.

RYAN, L.; CONVERY, F.; FERREIRA, S. Stimulating the use of biofuels in the European Union: Implications for climate change policy. **Energy Policy**, v. 34, n. 17, p. 3184–3194, nov. 2006.

SILVA, G. D. S. et al. Desempenho de diferentes lipases imobilizadas na síntese de biodiesel de óleo de palma. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 2, p. 197–203, 20 abr. 2011.

SILVA, J. B. **Produção de acetato de isoamila via esterificação enzimática em sistema livre de solvente. 2014.** 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pósgraduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

SHEEHAN, J. et al. An Overview of Biodiesel and Petroleum Diesel Life Cycles. p. 60, 1998.

SHELDON, R. A.; PEREIRA, P. C. Biocatalysis engineering: the big picture. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 10, p. 2678–2691, 2017.

SUAREZ, P. A. Z. et al. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 667–676, jun. 2007.

SUDBRACK, T. S. **Imobilização de lipase em montmorilonita e aplicação em reações oleoquímicas. 2012.** 79 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

TWEDDELL, R. J. et al. Esterification and Interesterification Activities of Lipases from *Rhizopus niveus* and *Mucor miehei* in Three Different Types of Organic Media: A Comparative Study. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 6, p. 439–445, maio 1998.

VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 3, p. 297–305, maio 2004.

ZHENG, S. et al. Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 3, p. 267–272, mar. 2006.

ZULLAIKAH, S. et al. A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 17, p. 1889–1896, nov. 2005.