

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PAULO ANTÔNIO SETTE DE ABRIL

**Transesterificação enzimática de óleo de soja
por lipase presente no concentrado bruto do
fungo *Colletotrichum gloeosporioides*: Uma
abordagem alternativa ao uso de lipases
comerciais**

BELO HORIZONTE

2012

UFMG / ICEx / DQ 890.^a

D. 503.^a

PAULO ANTÔNIO SETTE DE ABRIL

Transesterificação enzimática de óleo de soja por lipase presente no concentrado bruto do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*: Uma abordagem alternativa ao uso de lipases comerciais

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica

BELO HORIZONTE

2012

Sette de Abril, Paulo Antonio

Transesterificação enzimática de óleo de soja por lipase presente no concentrado bruto do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*: Uma abordagem alternativa ao uso de lipases comerciais

99f. : il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi

Co-orientador: Gecernir Colen

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.

Bibliografia: 80-94

1. Química Orgânica - Teses 2. *Colletotrichum gloeosporioides* - Teses 3. Transesterificação enzimática - Teses 4. Biodiesel - Teses I. Takahashi, Jacqueline Aparecida, Orientadora II. Colen, Gecernir, Co-Orientador III. Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



"Transesterificação enzimática de óleo de soja por lipase presente no concentrado bruto do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*: Uma abordagem alternativa ao uso de lipases comerciais"

Paulo Antonio Sette de Abril

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora
UFMG

Prof. Gecernir Colen - Co-Orientador
UFMG

Profa. Henriete da Silva Vieira
UFMG

Prof. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara
UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo inestimável dom da vida.

À Professora e amiga Jacqueline, por ter desde sempre depositado muita confiança em mim, pela orientação segura, pelo apoio e pelo imenso carinho.

A meus pais, meus irmãos e toda minha família, que são a base que sustenta todas as minhas realizações, pelo amor incondicional.

À Fernanda, minha namorada, por ter suportado comigo todas as dificuldades durante a realização deste trabalho, pelo amor, dedicação e paciência e por ser o meu porto seguro nesta travessia.

Ao Professor Gecernir, pela disponibilidade, entusiasmo e pelas decisivas orientações.

Aos colegas dos laboratórios do DQ, Adriana, Ana Paula, Ana Sarah, Arthur, Bruna, Carla, Dhione, Heveline, Fabiana, Fernanda, Giovanni, Jociani, Karine, Mirra, Raquel, pelo ambiente agradável, pela ajuda nas mais diversas situações, pelos conselhos valiosos, enfim, por muitas coisas que não caberiam nestas linhas mas foram imprescindíveis.

A todos do laboratório de Microbiologia Industrial da FAFAR, especialmente à Flávia, pela grande ajuda e pelos conselhos.

À Professora Isabel, pela disponibilidade e auxílio com as análises.

Ao Eduardo, à Sávvia e aos professores do Laboratório de Farmacotécnica, pela ajuda com o equipamento de ultrafiltração.

À Aline e à Mariana, pela grande ajuda na liofilização das amostras.

Aos colegas peritos, Alexandre, Karina e Thábita, pela compreensão e pelas ajudas com as trocas de plantão.

Às funcionárias da Secretaria da Pós-graduação da Química, pela cordialidade com que sempre fui atendido.

Aos professores e funcionários do DQ e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver caridade, sou como o bronze que soa, ou como o címbalo que retine. Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver caridade, não sou nada. Ainda que distribuísse todos os meus bens em sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, se não tiver caridade, de nada valeria!”

(I Cor 13,1-3)

RESUMO

No presente trabalho, empregou-se uma preparação bruta contendo lipase, obtida do fungo filamentoso *Colletotrichum gloeosporioides*, como catalisador em reações de transesterificação de óleo vegetal, com objetivo de produzir biodiesel por via enzimática.

A preparação lipásica foi obtida por fermentação submersa, sob agitação, de *C. gloeosporioides*. O caldo fermentado foi concentrado por ultrafiltração, através de uma membrana de acetato de celulose com peso de corte de 10 kDa, e liofilizado. Foi obtido um pó com atividade lipásica de 9,75 U/mg.

Nas transesterificações empregou-se o óleo de soja refinado e metanol. As reações foram conduzidas em frascos de 125 mL com agitação orbital. Foram estudados os parâmetros concentração de enzima, relação molar álcool óleo, quantidade de água adicionada, adição fracionada de metanol e adição de hexano.

A conversão de triglicerídeos em ésteres metílicos foi determinada pela técnica de cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massas, utilizando o monitoramento seletivo de íons, centrado nos íons em m/z 74 e 87. Obteve-se rendimento máximo de 2,13% m/m em ésteres metílicos, quando se empregou uma concentração de enzima de 30,6 U/mL, relação molar álcool óleo de 4:1, quantidade total de água 45,9% m/m em relação à massa de óleo e adição de 2 mL de hexano. Os estudos sugerem que, para elevar os rendimentos, é necessário obter um preparado com maior atividade lipásica.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*; transesterificação enzimática; biodiesel.

ABSTRACT

In this work, a crude lipase-containing preparation, obtained from filamentous fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, was employed as catalyst in the transesterification of vegetable oils, with the aim of producing biodiesel enzymatically.

The preparation was obtained by submerged fermentation, under orbital shaking, of *C. gloeosporioides*. The fermented broth was concentrated by ultrafiltration, through a cellulose acetate membrane with 10 kDa cut-off weight and lyophilized. The powder obtained showed a lipase activity of 9.75 U/mg.

Refined soybean oil and methanol were used in the transesterifications. These were carried out in 125 mL flasks under orbital shaking. The parameters of enzyme concentration, alcohol to oil molar ratio, amount of added water, stepwise addition of methanol and the addition of hexane were studied.

The conversion of triglycerides to methyl esters was analyzed by gas chromatography, coupled to mass spectrometry, using selective ion monitoring, focusing on ions at m/z 74 and 87. A maximum yield of 2.13% m/m in methyl esters was obtained with an enzyme concentration of 30.6 U/mL, alcohol to oil molar ratio of 4:1, amount of water added 45.9% m/m, related to oil mass, and addition of 2 mL of hexane. The studies suggest that, to increase the yields, it is necessary to obtain a preparation with greater lipase activity.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, enzymatic transesterification, biodiesel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Reação geral de transesterificação de triglicerídeos com um mono-álcool.....15
- Figura 2: Etapas da transesterificação e reação global.....23
- Figura 3: Transesterificação de triglicerídeos com metanol, utilizando hidróxido como catalisador: formação do íon metóxido, formação do éster metílico, formação de sabão a partir de ácido graxo livre.....24
- Figura 4: Mecanismos para a transesterificação de um triglicerídeo e esterificação de um ácido graxo livre com metanol, ambas catalisadas por ácido.....25
- Figura 5: Projeção de Fischer de um triglicerídeo, mostrando as posições de acordo com o sistema de numeração estereoespecífica.....28
- Figura 6: Hidrólise catalisada por lipase 1,3-específica e lipase não específica.....29
- Figura 7: Acidólise régio-específica da tripalmitina com ácidos graxos insaturados, catalisada por lipase, na produção de substitutos para o leite humano.....29
- Figura 8: Alcoólise enantiosseletiva, catalisada por lipase, do *trans*-3-(4-metoxifenil) glicidato de metila, para síntese do cloridrato de diltiazem.....31
- Figura 9: Esquema das etapas para obtenção da preparação lipásica liofilizada.....35
- Figura 10: Montagem para extração de óleos, utilizando o extrator de Soxhlet.....40
- Figura 11: Fragmentações que indicam a presença de ésteres metílicos, por impacto de elétrons..... 46
- Figura 12: Cromatograma, obtido por CG-EM, para o padrão de ésteres metílicos.....54

Figura 13: Fórmulas estruturais dos ácidos graxos presentes no óleo de soja.....	56
Figura 14: Espectro de absorção na região do infravermelho médio, de uma amostra do óleo de soja refinado.....	58
Figura 15: Espectro de RMN de ^1H do óleo de soja refinado.....	59
Figura 16: Atribuições dos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento, dos átomos de hidrogênio do resíduo de glicerol em triglicerídeos.....	60
Figura 17: Placa de CCD de sílica mostrando os produtos da reação com lipase pancreática.....	61
Figura 18: Cromatograma do produto de transesterificação de óleo de soja com lipase pancreática.....	63
Figura 19: Espectro de RMN de ^1H do produto de transesterificação empregando lipase pancreática comercial.....	65
Figura 20: Espectro de RMN de ^{13}C do produto de transesterificação empregando lipase pancreática comercial.....	66
Figura 21: Rendimentos obtidos nas transesterificações para determinação da faixa de trabalho, usando metanol como receptor de acila.....	69
Figura 22: Rendimentos da adição fracionada de metanol.....	72
Figura 23: Cromatograma do produto de transesterificação na avaliação da adição de hexano.....	74
Figura 24: Espectro de RMN de ^1H do produto de transesterificação com lipase fúngica.....	76
Figura 25: Espectro de RMN de ^{13}C do produto de transesterificação com lipase fúngica.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores utilizados no delineamento experimental para duas variáveis.....	48
Tabela 2: Matriz dos experimentos preditivos, para a combinação das variáveis concentração de enzima e relação molar.....	49
Tabela 3: Condições dos experimentos de transesterificação, na determinação preliminar das faixas de trabalho.....	50
Tabela 4: Massas e medidas das atividades lipásicas dos preparados obtidos de <i>C. gloeosporioides</i> e do preparado de lipase pancreática.....	51
Tabela 5: Composição dos óleos de soja refinado e dos óleos obtidos, em relação aos dados da literatura.....	55
Tabela 6: Massas molares empregadas no cálculo para obtenção da massa molar do óleo de soja refinado analisado.....	57
Tabela 7: Rendimentos das transesterificações com lipase pancreática.....	61
Tabela 8: Rendimentos obtidos no delineamento experimental.....	67
Tabela 9: Efeitos observados das variáveis concentração de enzima e relação molar, no delineamento experimental executado.....	68
Tabela 10: Rendimento das transesterificações com metanol, na determinação da faixa de trabalho.....	69
Tabela 11: Rendimentos de acordo com a quantidade total de água adicionada.....	71
Tabela 12: Rendimentos da adição fracionada de metanol.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	–	Cromatografia em camada delgada.
CG-EM	–	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.
CLAE	–	Cromatografia líquida de alta eficiência.
dd	–	Dupleto duplo.
EC	–	Refere-se a esquema de classificação numérica para as enzimas (do inglês <i>enzyme commission</i>).
INPM	–	Instituto Nacional de Pesos e Medidas.
IV	–	Infravermelho.
<i>J</i>	–	Constante de acoplamento.
P.A.	–	Para análise.
q.s.p.	–	Quantidade suficiente para.
RMN	–	Ressonância magnética nuclear.
RPM	–	Rotações por minuto.
SIM	–	Monitoramento seletivo de íons (do inglês <i>single ion monitoring</i>).
<i>sn</i>	–	Numeração estereoespecífica (do inglês <i>stereospecific numbering</i>).
TMS	–	Tetrametil-silano.
U	–	Unidade de atividade lipásica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos	16
1.2 Justificativa	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Cenário global de mudanças climáticas	18
2.2 Biocombustíveis e biodiesel	19
2.3 Produção de biodiesel	20
2.3.1 Composição dos óleos e gorduras de origem natural.....	21
2.3.2 A transesterificação.....	22
2.3.3 Catálise básica.....	22
2.3.4 Catálise ácida.....	24
2.3.5 Catálise enzimática.....	25
2.3.6 Lipases.....	26
2.3.7 Transesterificação catalisada por lipases.....	31
2.3.8 O fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Reagentes, instrumentos e micro-organismos empregados	34
3.2 Obtenção da preparação lipásica	35
3.2.1 Manutenção da cultura fúngica em meio sólido.....	36
3.2.2 Fermentação em meio líquido.....	36
3.2.3 Concentração do caldo fermentado.....	37

3.2.4 Liofilização da fração retida na ultrafiltração.....	37
3.2.5 Testes de atividade lipásica.....	37
3.3 Obtenção de óleo de soja bruto e análises de teor.....	39
3.3.1 Extração do óleo de soja por percolação.....	39
3.3.2 Extração do óleo de soja em extrator de Soxhlet.....	40
3.3.3 Análise dos óleos de soja por cromatografia em camada delgada.....	40
3.3.4 Análise dos óleos vegetais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	41
3.3.5 Caracterização espectrométrica dos óleos.....	41
3.4 Metodologias empregadas nas transesterificações.....	42
3.4.1 Metodologia empregada nas transesterificações com lipase pancreática comercial.....	42
3.4.2 Metodologia empregada nas transesterificações com preparado de lipase fúngica.....	43
3.4.3 Análises dos produtos de transesterificação por cromatografia em camada delgada (CCD).....	44
3.4.4 Análises dos produtos de transesterificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	44
3.4.5 Análises e quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	45
3.4.6 Análise dos produtos de transesterificação por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	46
3.5 Experimentos de transesterificação empregando o preparado liofilizado de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>.....	47
3.5.1 Delineamento experimental.....	47
3.5.2 Determinação preliminar das faixas de trabalho.....	49
3.5.3 Avaliação da adição de água.....	50
3.5.4 Avaliação da adição fracionada de metanol.....	50
3.5.5 Avaliação da adição de solvente.....	51

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Obtenção da preparação lipásica	52
4.2 Análises dos óleos de soja obtidos e do óleo de soja refinado	53
4.2.1 Caracterização do óleo de soja por espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	57
4.2.2 Caracterização do óleo de soja por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹ H.....	57
4.3 Transesterificações	60
4.3.1 Transesterificação utilizando lipase pancreática.....	60
4.3.2 Delineamento experimental.....	64
4.3.3 Determinação da faixa de trabalho com preparado de lipase fúngica.....	67
4.3.4 Avaliação da adição de água.....	70
4.3.5 Avaliação da adição fracionada de metanol.....	72
4.3.6 Adição de solvente.....	73
4.3.7 Análises dos produtos de transesterificação com lipase fúngica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	73
4.3.8 Análises dos produtos da transesterificação com lipase fúngica por espectrometria de RMN de ¹ H e ¹³ C.....	74
5 CONCLUSÕES	78
5.1 Perspectivas	79
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS CG-EM DAS AMOSTRAS OBTIDAS NA DETERMINAÇÃO DAS FAIXAS DE TRABALHO	95

1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, a preocupação com os efeitos climáticos adversos, causados pela emissão de dióxido de carbono e outros poluentes presentes em gases de exaustão, aliada à redução das reservas de combustíveis fósseis e elevação dos preços do petróleo, levaram à busca por fontes de energia limpas ou renováveis. Uma das alternativas encontradas foi a utilização de biocombustíveis, em substituição parcial aos derivados do petróleo no setor de transporte, a qual se encontra em fase avançada em vários países.

O biodiesel, que é definido como combustível obtido de fontes naturais renováveis para ser utilizado em motores de ciclo diesel, vem sendo empregado em misturas com o diesel fóssil, e as quantidades utilizadas têm tido aumentos progressivos em todo o mundo.

A produção do biodiesel dá-se atualmente pela transesterificação de óleos de origem natural. Transesterificação é a reação entre um éster e um álcool, na qual ocorre a troca do álcool esterificado entre as moléculas (Figura 1). A transesterificação dos triglicerídeos, componentes dos óleos, com metanol, produz ésteres metílicos de ácidos graxos que atendem a todos os requisitos técnicos para utilização em misturas com biodiesel, apresentando, ainda, a vantagem de ter um melhor perfil de emissão (ROBLES-MEDINA, 2009; MEHER, 2006).

O processo mais comum de transesterificação emprega a catálise básica, homogênea, pela alta produtividade apresentada, pelo menor tempo de processamento e menores custos. No entanto, requer a utilização de óleos refinados, com baixos teores de ácidos graxos livres, senão há formação de sabões e dificuldades na separação dos produtos. Além disso, o processo consome energia, pela necessidade de aquecimento, e são necessárias etapas posteriores para tratamento dos resíduos e recuperação do glicerol. A catálise ácida pode ser empregada também, mas, na maioria das vezes, é uma etapa adicional ao processo com catalisador alcalino quando o teor de ácidos graxos livres, no material de partida, é elevado (ANTCZAK *et al.*, 2009; KAIEDA *et al.*, 1999).

A catálise enzimática, utilizando lipases, apresenta grande potencial de utilização na produção de biodiesel, possuindo uma série de vantagens comparada

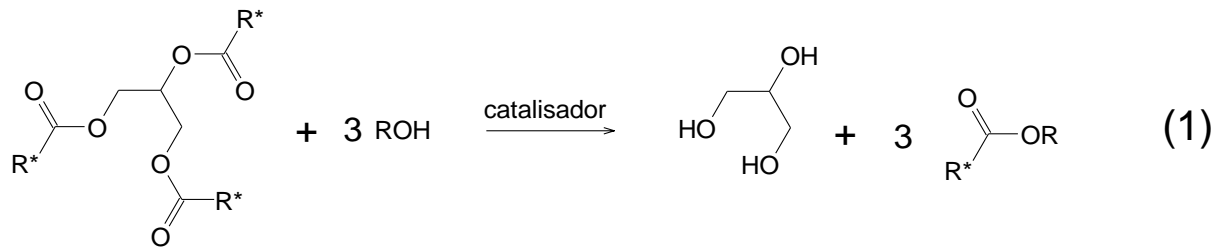


Figura 1: Reação geral de transesterificação de triglicerídeos com um monoálcool.

à catalise alcalina: maior simplicidade do processo de produção, menor consumo de metanol, fácil recuperação do glicerol, condições mais brandas de reação e menor geração de resíduos químicos. Muitos estudos já foram conduzidos indicando que lipases de diferentes fontes foram efetivas na produção de biodiesel (HUANG *et al.*, 2010).

Apesar disso, na atualidade, apenas uma instalação industrial, na China, utiliza catálise enzimática na produção de biodiesel (DU *et al.*, 2008). A principal razão do emprego de lipases não ser maior está centrada no seu alto custo (GOG *et al.*, 2012).

A pesquisa de novas fontes de lipases, bem como o emprego de metodologias mais simples e baratas de purificação das enzimas e de seu emprego na transesterificação, podem contornar a desvantagem do alto custo destes catalisadores e abrir caminho para a produção de biodiesel com impacto ainda menor para o ambiente.

No Brasil, há grande biodiversidade de micro-organismos e vegetais, diferentes *habitats* e, conseqüentemente, grande potencial para a exploração desses recursos naturais como fonte de, por exemplo, enzimas úteis para processos industriais. No entanto, poucos estudos de *screening* de cepas produtoras de lipase, nativas do Brasil, foram conduzidos até hoje.

Partindo de amostras de solo de cerrado, Colen *et al.* (2006) isolaram uma cepa do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* com grande capacidade de produzir lipase, que foi capaz de hidrolisar uma variedade de óleos e gorduras. Em trabalho com a mesma cepa, Faria (2010) determinou as melhores condições de cultivo para produção de lipase e preparou um concentrado com atividade lipásica, submetendo o caldo do cultivo fúngico a ultrafiltração e liofilização. Com este concentrado, realizou experimentos de hidrólise do óleo de macaúba.

1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a transesterificação do óleo de soja com alcoóis de cadeia curta, para a produção de biodiesel, empregando o concentrado liofilizado de lipase extracelular do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Os objetivos específicos foram (a) obter o concentrado liofilizado com atividade lipásica, a partir de cultivos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, (b) obter o óleo de soja bruto, por diferentes métodos de extração, (c) determinar a composição dos óleos brutos obtidos e do óleo refinado comestível, através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, (d) desenvolver uma metodologia para a transesterificação, empregando lipase pancreática bruta, obtida comercialmente, (e) avaliar, dentre óleo de soja refinado ou bruto, e dentre metanol ou etanol, quais os substratos mais vantajosos nas transesterificações, em termos de métodos de extração, composição, rendimento da extração e melhores rendimentos na transesterificação, (f) determinar as melhores condições para a transesterificação de óleo de soja, empregando-se o concentrado liofilizado de *Colletotrichum gloeosporioides*, com os substratos escolhidos, através de delineamento experimental, e (g) determinar condições de análise para caracterização, identificação e quantificação dos materiais de partida e produtos das reações de transesterificação, pelos métodos disponíveis no Departamento de Química da UFMG e no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, da mesma Instituição.

1.2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, busca-se chegar a uma matriz energética mais sustentável, mais limpa e baseada em recursos renováveis. Paralelamente, muitos países buscam diminuir sua dependência ao petróleo, tanto por razões econômicas quanto estratégicas. Considerando o contexto acima, constata-se que há uma extrema necessidade de se aumentar a oferta de biocombustíveis.

Existe um interesse crescente na utilização de lipases como catalisadores em reações de transesterificação, na produção de biodiesel, dadas as muitas vantagens do processo enzimático comparado ao químico. Entretanto, como o custo das lipases representa o maior empecilho para o seu emprego em larga escala, pesquisas de novas lipases e novas metodologias de obtenção, purificação e utilização, podem ajudar a desenvolver preparações eficientes e de custo mais baixo, possivelmente, com aplicações industriais.

Trabalhos realizados com o fungo filamentoso *Colletotrichum gloeosporioides*, nos quais se identificou seu grande potencial como produtor de lipases e, também, obteve-se um concentrado liofilizado com atividade lipásica promissora, trabalhos estes desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Industrial da Faculdade de Farmácia da UFMG, fornecem um amplo alicerce de conhecimento teórico-prático para novos estudos com a preparação lipásica e encorajam a busca de novas aplicações tecnológicas. Ressalte-se que a obtenção de lipases, que apresentem aplicações de interesse, agregaria um enorme valor a um componente da biodiversidade microbológica brasileira.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cenário global de mudanças climáticas

Em todo o mundo, há uma preocupação crescente com possíveis mudanças climáticas globais, cujas causas comuns são atribuídas à elevação da temperatura média do planeta. De fato, a temperatura média da superfície global aumentou 0,8 °C no último século, tendo aumentado 0,2 °C em cada uma das três últimas décadas (HANSEN *et al.*, 2006). Os efeitos danosos, decorrentes do aquecimento global, incluem o derretimento de geleiras, causando elevação do nível dos mares, alterações nos regimes de chuva, implicações na agricultura, extinção de espécies e aumento da ocorrência de eventos climáticos catastróficos.

A temperatura global é afetada por fatores como a exposição à radiação solar, a frequência de erupções vulcânicas explosivas e os níveis de gases de efeito estufa na atmosfera (HEGERL, 2007). Desde a metade do século passado, a elevação das concentrações dos gases de efeito estufa causou a maioria dos aumentos da temperatura média global (HEGERL, 2007).

Do total de emissões antropogênicas dos gases de efeito estufa, o dióxido de carbono representava 76,7%, em 2004, dos quais 56,6% provinham de combustíveis fósseis (ROGNER, 2007). Em 2007, 76,3% das emissões por queima de combustíveis fósseis e produção de cimento deveram-se a combustíveis líquidos e sólidos (BODEN *et al.*, 2010).

Atualmente, é amplamente aceita a tese de que as emissões de dióxido de carbono têm influência no clima, e as nações têm procurado estabelecer políticas de controle dos níveis de emissão, tais como o Protocolo de Kyoto e seu sucedâneo, atualmente em discussão.

Há, ainda, outro aspecto, que se soma à crise climática e que está relacionado às fontes de combustíveis fósseis. A extração indiscriminada e o consumo desses combustíveis levaram à redução nas reservas de petróleo (BISEN, 2010).

Este cenário tem impulsionado a procura por fontes limpas ou renováveis de energia. São fontes que possuem origem natural, como o sol, os ventos, chuvas,

marés e fontes geotérmicas, ou que podem ser repostas naturalmente, como a biomassa. As energias renováveis forneceram cerca de 16% de toda a energia consumida no mundo em 2009, sendo 10% proveniente da biomassa, 3,4% de recursos hídricos e 2,8% das demais fontes (REN21, 2011).

2.2 Biocombustíveis e biodiesel

De acordo com Rogner (2007), 13,1% de todas as emissões de gases de efeito estufa, em 2004, foram produzidas pelo setor de transporte, que é altamente dependente de derivados do petróleo. A participação dos biocombustíveis etanol e biodiesel, no montante mundial de combustíveis utilizados em transporte por rodovias, foi de 2,7% em 2010 (REN21, 2011).

As principais fontes para produção de biodiesel são os óleos vegetais (DEMIRBAS, 2005). Para se obter o combustível, os óleos são submetidos a reações de transesterificação, geralmente com metanol, produzindo ésteres metílicos de ácidos graxos e glicerol. A quase totalidade das indústrias de biodiesel emprega a catálise básica no processo de transesterificação

As produções de etanol e biodiesel, em todo o mundo no ano de 2010, foram 86 bilhões e 19 bilhões de litros, respectivamente (REN21, 2011). Estima-se que o mercado global de biodiesel atinja 37 bilhões de galões (140 bilhões de litros), por volta de 2016, crescendo a uma média anual de 42% (DU *et al.*, 2008). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de cada um destes biocombustíveis, com produção anual de 28 bilhões de litros de etanol e 2,3 bilhões de litros de biodiesel. A produção de ambos os biocombustíveis tem crescido nos últimos anos no país (REN21, 2011).

O Governo brasileiro criou em 2005 o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel e deu forma à política de biocombustíveis através da lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005, que introduz o biodiesel na matriz energética brasileira e determina a mistura do biodiesel ao diesel (BRASIL, 2005). Atualmente, o percentual de biodiesel misturado ao diesel mineral é de 5%.

Esta mesma lei definiu biodiesel como “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil” (BRASIL, 2005). Percebe-se que o legislador buscou uma definição ampla, provavelmente buscando

englobar diversas fontes naturais e diversos processos de obtenção, mas, na prática, as fontes de óleo mais empregadas são os óleos vegetais e as gorduras animais.

2.3 Produção de biodiesel

Três métodos podem ser empregados para obtenção de biodiesel (BISEN *et al.*, 2010; RANGANATHAN *et al.*, 2008; MA e HANNA, 1999): pirólise ou craqueamento, micro-emulsificação e transesterificação. Além desses métodos, a utilização direta de óleos vegetais e a mistura destes, sem qualquer alteração, com o diesel mineral, são também possíveis. Estas formas de uso são, normalmente, consideradas não satisfatórias e pouco práticas, apresentando diversos problemas a longo prazo, como alta viscosidade, acidez, formação de depósitos de carbono e de goma e espessamento do óleo lubrificante dos motores (MEHER *et al.*, 2006; MA e HANNA, 1999).

A pirólise ou craqueamento envolve o aquecimento de óleos vegetais na ausência de oxigênio. Este procedimento tem como produtos majoritários alcanos, alquenos e ácidos carboxílicos (RANGANATHAN, 2008). As desvantagens do método são o elevado preço do equipamento, a produção de materiais de baixo valor, muitas vezes gerando mais gasolina que diesel, e o fato de que o processamento térmico praticamente remove as possíveis vantagens ambientais (MA e HANNA, 1999).

As micro-emulsões, com óleos vegetais e solventes orgânicos, foram estudadas como meio para se diminuir a viscosidade dos óleos. As micro-emulsões são definidas como dispersões coloidais em equilíbrio, exibindo certas características específicas para serem utilizadas como combustíveis, e formadas por dois líquidos imiscíveis e um componente anfifílico (MA e HANNA, 1999). Os solventes mais utilizados são metanol, etanol e 1-butanol. A redução da viscosidade, aumento no número de cetanas e boas características do *spray* são vantagens das micro-emulsões, porém, sua utilização prolongada traz problemas ao motor, relacionados à formação de depósitos de carbono e combustão incompleta (RANGANATHAN, 2008).

A transesterificação parece ser a rota melhor e mais simples para produzir biodiesel em grandes quantidades, com características físicas que se aproximam às do diesel mineral, com pouca ou nenhuma formação de depósito posterior à combustão em motores diesel (AKOH, 2007). É também o método mais popular em todo o mundo para a produção de biodiesel. O relato mais antigo conhecido de transesterificação, com objetivo de produzir combustível a partir de óleos vegetais, data de 1937, na Bélgica, ocasião em que foi concedida uma patente por um processo de etanolise de óleos vegetais (BISEN, 2010).

O biodiesel obtido por transesterificação apresenta características semelhantes às do óleo fóssil, tais como viscosidade, ponto de fulgor, calor de aquecimento e pode ser utilizado sem a necessidade de qualquer alteração nos motores a diesel. Apresenta as vantagens de ser renovável, não tóxico e biodegradável (MEHER, 2006). As emissões decorrentes da queima do biodiesel preparado por transesterificação não contêm enxofre e apresentam menores teores de monóxido de carbono, aromáticos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e de hidrocarbonetos parcialmente queimados (MARCHETTI, 2008; LANG *et al.*, 2001).

2.3.1 Composição dos óleos e gorduras de origem natural

Antes de detalhar o processo de transesterificação, torna-se necessário discorrer sobre a composição dos lipídeos de ocorrência natural, que são fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.

Quimicamente, os óleos, bem como as gorduras, tanto animais quanto vegetais, são ésteres formados a partir de uma molécula de glicerol (1,2,3-propanotriol) e três moléculas de ácidos graxos, por isso, chamados triglicerídeos. Os ácidos graxos apresentam cadeias lineares, cujos comprimentos podem variar de quatro a vinte e seis átomos de carbono, sendo raros os ácidos graxos com números ímpares de carbono.

A composição dos óleos, em termos de ácidos graxos saturados ou insaturados e, em menor grau, do tamanho médio das cadeias, determina o seu estado físico e outras propriedades. Nos óleos predominam os ácidos graxos insaturados, enquanto em gorduras e graxas predominam aqueles de cadeia saturada.

São também encontrados nos óleos os di- e monoglicerídeos, nos quais a molécula de glicerol apresenta uma e duas hidroxilas livres, respectivamente, além de ácidos graxos livres. Outros constituintes presentes nos óleos e gorduras são os esteróis, fosfolípides, terpenos, odorantes e outras impurezas (MEHER *et al.* 2006).

2.3.2 A transesterificação

O termo transesterificação, muitas vezes trocado pelo termo formado tomando-se o nome do álcool com o sufixo -lise (e.g. metanólise), é usado para descrever a reação química, catalisada, entre triglicerídeos e um álcool, para formar ésteres de ácidos graxos com o álcool em questão, tendo como produtos intermediários os di- e monoglicerídeos e, como produto final, além dos ésteres, o glicerol (TURKAN e KALAI, 2006; AL-ZUHAIR, 2007). As etapas de uma transesterificação e a reação global são representadas na Figura 2.

As transesterificações podem ser catalisadas por bases, ácidos ou por enzimas, as lipases. A catálise básica é o processo mais empregado para a produção de biodiesel. Nenhuma indústria de biodiesel que utilize processo catalisado por ácidos foi relatada (AL-ZUHAIR, 2007), e a catálise enzimática apresenta utilização muito restrita em nível industrial, sendo que apenas uma instalação industrial utiliza lipases para produção de biodiesel em larga escala (DU *et al.* 2008).

2.3.3 Catálise básica

A transesterificação catalisada por álcalis é rápida, fornece altos rendimentos (usualmente >96%) e o custo do catalisador é baixo (MA e HANNA, 1999; GOG *et al.*, 2012). Os catalisadores básicos mais comuns são hidróxido de sódio ou de potássio, carbonatos e alcóxidos de sódio ou potássio, como metóxido de sódio (ou potássio) e etóxido de sódio (ou potássio).

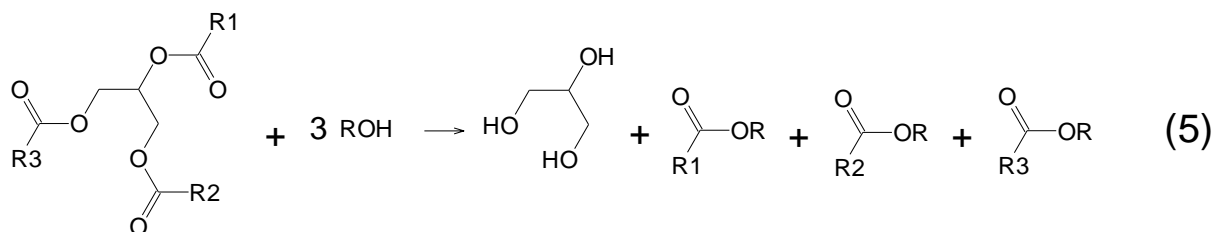
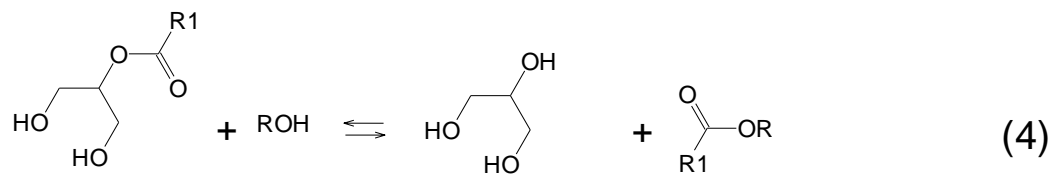
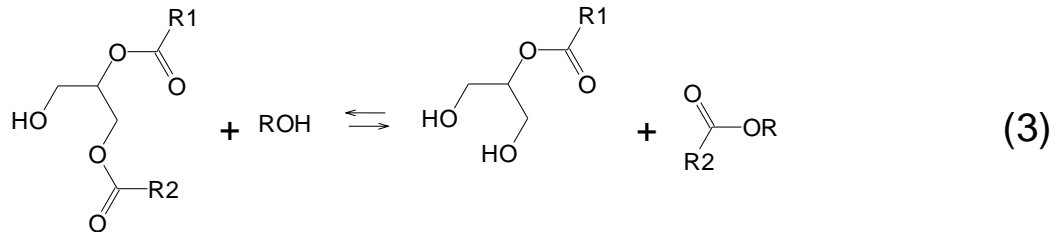
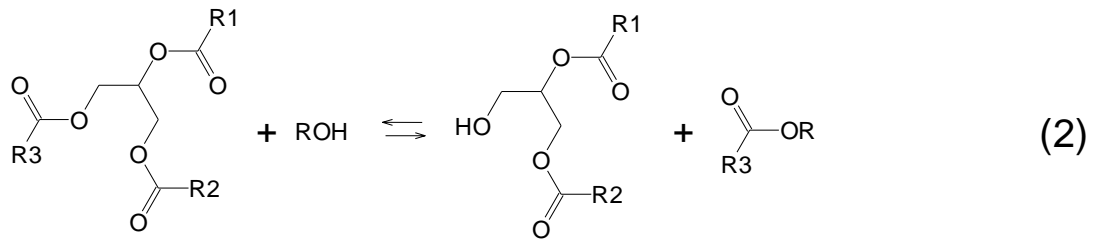
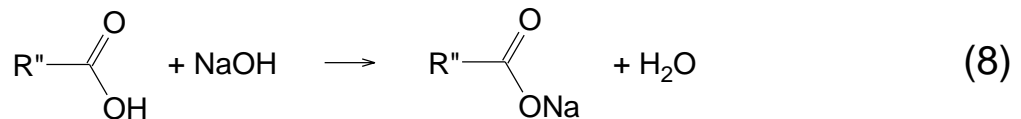
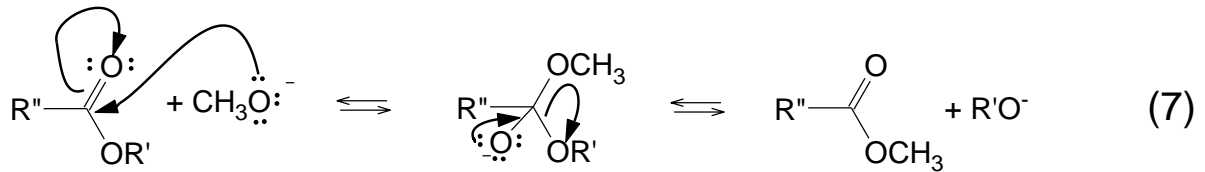
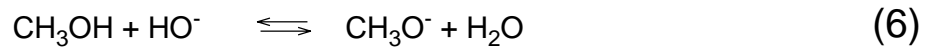


Figura 2: Etapas da transesterificação (2 a 4) e reação global (5).

No entanto, o processo alcalino apresenta também uma série de desvantagens. A utilização de bases pode levar à formação de sabões, caso o óleo apresente água ou teor de ácidos graxos livres superior a 3%, ocasionando maior consumo do catalisador, a formação de emulsões, dificuldades na separação do glicerol e diminuição do rendimento (MEHER *et al.*, 2006). Por esses problemas, os substratos adequados ao processo reduzem-se aos óleos comestíveis refinados, elevando-se os custos com a matéria-prima, que podem chegar a 80% do custo total de produção de biodiesel (LEUNG *et al.*, 2010). Alternativamente, matérias-primas ricas em ácidos graxos livres podem ser submetidas a um processo de duas etapas, com uma esterificação ácida prévia (ANTCZAK *et al.*, 2009).

Para se obter uma alta velocidade de conversão, é necessário realizar o processo de 60 a 70 °C, aumentando-se os custos com energia. As transesterificações pelo método de catálise básica utilizando hidróxido e de formação de sabão são apresentados na Figura 3.



onde $\text{R}' = -\text{CH}_2\text{CHOR}''\text{CH}_2\text{OR}''$,
e $\text{R}'' =$ Longa cadeia linear, saturada ou insaturada.

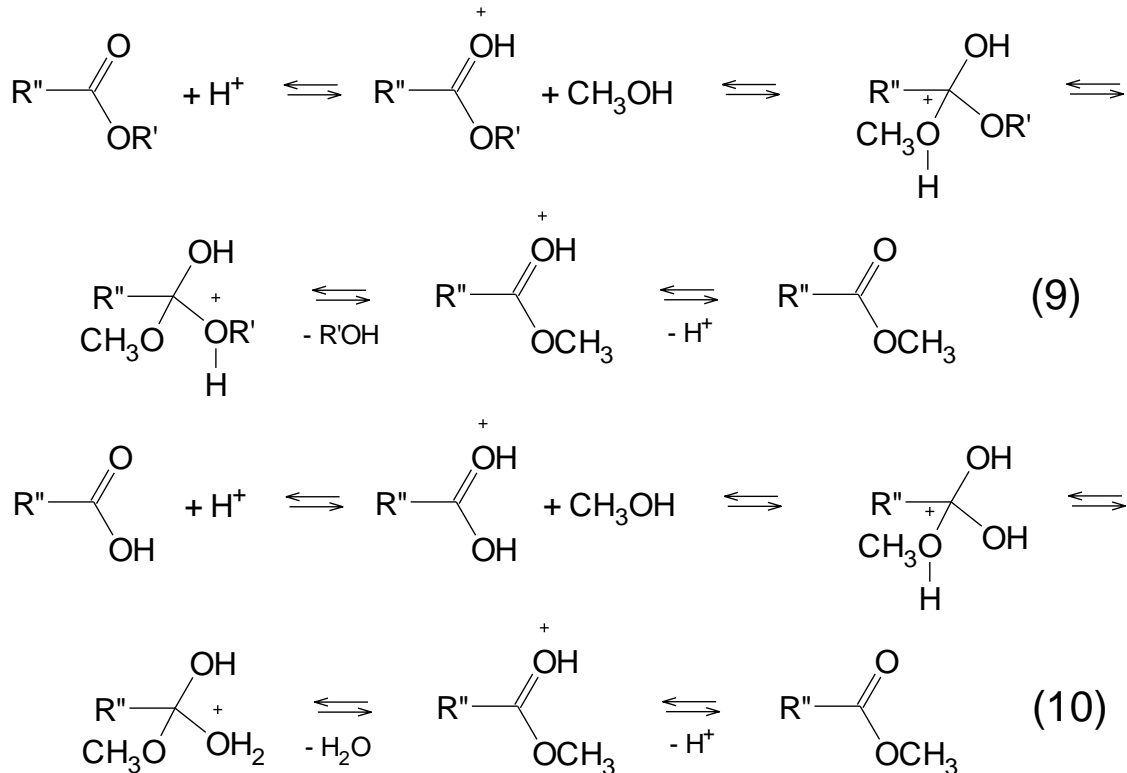
Figura 3: Transesterificação de triglicerídeos com metanol, utilizando hidróxido como catalisador: (6) formação do íon metóxido, (7) formação do éster metílico, (8) formação de sabão a partir de ácido graxo livre.

2.3.4 Catálise ácida

A catálise ácida pode ser empregada na transesterificação mesmo quando o óleo contiver teores elevados de ácidos graxos livres, conforme se pode notar no mecanismo da reação, ilustrado na Figura 4. Altos rendimentos podem ser obtidos, mas são necessários grandes excessos de metanol, maiores quantidades de ácido e temperaturas de reação mais elevadas ($> 100\text{ }^\circ\text{C}$) (GOG *et al.*, 2012).

Além disso, o tempo para completar a transesterificação é maior do que na catálise básica, requerendo maior tempo para se atingir um rendimento satisfatório, e os ácidos são corrosivos para os reatores, afetando no custo de manutenção ou substituição dos equipamentos (RANGANATHAN *et al.*, 2008; GOG *et al.*, 2012).

Qualquer ácido mineral pode ser usado para catalisar o processo de transesterificação, sendo mais usados o ácido sulfúrico e ácidos sulfônicos orgânicos. Em geral, o custo destes ácidos é baixo, mas as condições mais drásticas de reação e o tempo maior de processamento tornam o emprego de catalisadores ácidos menos vantajoso que o uso de bases, a despeito da maior flexibilidade quanto às características do material de partida.



onde $\text{R}' = -\text{CH}_2\text{CHOR}''\text{CH}_2\text{OR}''$,

e $\text{R}'' =$ Cadeia linear longa, saturada ou insaturada.

Figura 4: Mecanismos para a transesterificação de um triglicerídeo (9) e esterificação de um ácido graxo livre (10), com metanol, ambas catalisadas por ácido.

2.3.5 Catálise enzimática

Recentemente, tem havido muito interesse no desenvolvimento de um processo enzimático de produção de biodiesel, para superar as desvantagens dos processos químicos. Uma série de trabalhos científicos publicados mostra que as enzimas são promissoras nesta área como catalisadores (MOREIRA *et al.*, 2007, AL-ZUHAIR, 2007, FJERBAEK *et al.*, 2009, ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009, VASUDEVAN e BRIGGS, 2008).

Os principais atrativos do processo biocatalisado são a maior facilidade para recuperação do glicerol, que não requer etapas complexas, a conversão completa de ácidos graxos livres a ésteres metílicos, a ausência ou simplicidade dos tratamentos posteriores na água residual e ausência de reações indesejadas (ANTCZAK *et al.*, 2009, LEE *et al.*, 2010). Uma comparação entre os processos de

catálise ácida, básica e enzimática, em relação a diversos fatores, pode ser encontrada no Quadro 1.

O glicerol obtido ao final do processo é normalmente de melhor qualidade, não necessitando de etapas de neutralização ou desodorização. Como não são adicionados ácidos, bases ou outros compostos danosos ao ambiente, não é necessário tratar os efluentes, ao final dos processos de produção e purificação. E a habilidade catalítica, tanto para quebra quanto para formação dos ésteres, permite que as enzimas atuem em matérias-primas com alto teor de ácidos graxos livres.

As enzimas são capazes de promover reações a temperaturas amenas, sendo que a velocidade de reação aumenta com o aumento de temperatura, até o ponto onde ocorre desnaturação das enzimas (AL-ZUHAIR, 2007). Outro aspecto que contribui para reduzir os custos de operação em processos enzimáticos é a possibilidade de se reutilizar o catalisador. Para tanto, é necessário imobilizar a enzima em algum suporte físico macroscópico, permitindo sua recuperação por filtração simples.

Apesar disso, o custo das enzimas permanece sendo o maior obstáculo, em relação ao processo catalisado por base, para sua utilização em escala industrial (AL-ZUHAIR, 2007; MEHER *et al.*, 2006, FJERBAEK *et al.*, 2009). A classe de enzimas empregada nas transesterificações é a das lipases, a qual é tratada em detalhes em tópico específico, a seguir.

2.3.6 Lipases

Mais tecnicamente chamadas de triacilglicerol acil-hidrolases (EC 3.1.1.3), as lipases são parte da família das hidrolases que agem sobre ligações éster de ácidos carboxílicos. Sua função natural é hidrolisar triacilgliceróis em diacilglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol (HOUDE *et al.*, 2004). Adicionalmente, as lipases são capazes de catalisar a hidrólise e transesterificação de outros ésteres (TREICHEL *et al.*, 2010). Muitas mostram capacidade catalítica em ambientes tanto aquosos quanto não aquosos (BALAJI e EBENEZER, 2008).

Lipases são produzidas por animais, plantas e micro-organismos. A produção de lipases para aplicações industriais emprega predominantemente micro-organismos, sob diferentes condições de cultivo, alguns dos quais modificados geneticamente. Aproximadamente 200 diferentes lipases encontram-se em uso

atualmente (SHARMA *et al.*, 2001, TREICHEL *et al.*, 2010). As lipases microbianas são fáceis de serem obtidas por processos fermentativos e podem ser purificadas em poucas etapas.

Há certa discussão sobre a forma de atuação das lipases, especialmente sobre as características do sítio ativo e o local onde atuam. Acreditava-se que todas as lipases exibiam ativação interfacial e uma alça anfifílica que cobria o sítio ativo. A ativação interfacial é um aumento da atividade lipásica quando ocorre a formação de emulsão, enquanto que a alça anfifílica funciona como uma tampa, escondendo o sítio ativo quando a lipase encontra-se em solução e descobrindo-o quando na interface água-lipídeo. Entretanto, lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica* e *Burkholderia glumae* não mostram ativação interfacial, embora possuam a alça anfifílica (HOUDE *et al.*, 2004).

Fator	Base	Ácido	Lipase
Ácidos graxos livres no óleo	Saponificação	Esterificação	Esterificação
Recuperação do glicerol	Complexa	Complexa	Simple
Temperatura de reação	Média	Alta	Baixa
Possibilidade de recuperação do catalisador	Sim, porém complexa	Não	Sim
Rendimento da transesterificação (em condições ótimas)	>99%	>96%	Geralmente >90%
Presença de água na matéria-prima	Saponificação	Inativação (leva a um maior gasto)	Pode levar a reações de hidrólise
Tempo de processamento	Baixo	Mais alto que na catálise básica	Médio a alto
Custo do catalisador	Baixo	Baixo	Alto

Quadro 1: Comparação entre os diferentes catalisadores empregados em reações de transesterificação, quanto aos fatores mais relevantes (adaptado de GOG *et al.*, 2012).

As lipases obtidas de micro-organismos podem ser intracelulares ou extracelulares, conforme permaneçam no interior das células ou sejam secretadas no meio externo. A sua produção varia com as cepas e é influenciada fortemente pela composição do meio (fontes de nitrogênio e carbono) além de fatores físico-químicos como temperatura, pH e oxigênio dissolvido (COLEN *et al.*, 2006, SHARMA *et al.*, 2001). O fator principal para a expressão de lipase é a fonte de carbono, pois as lipases são induzidas na presença de triglicerídeos, fazendo com que fontes de carbono de origem lipídica sejam essenciais para uma alta produção de lipase (TREICHEL *et al.*, 2010).

Lipases de diferentes fontes podem apresentar diferentes especificidades quanto ao substrato. A maioria das lipases apresenta regioespecificidade, sendo divididas em dois grupos: *sn*-1,3-específicas, que hidrolisam as ligações éster nas posições *sn*-1 e *sn*-3 do glicerol, e as não específicas ou aleatórias, que agem em todas as três posições (TONGBORIBOON *et al.*, 2010; Figuras 5 e 6). Esta é uma característica das enzimas que representa uma vantagem em relação à maioria dos catalisadores químicos e que permite o desenvolvimento de processos industriais elaborados, como os exemplos a seguir.

As lipases são empregadas amplamente no processamento de gorduras, óleos e alimentos, como componentes de formulações detergentes e desengordurantes, na síntese de compostos químicos e farmacêuticos, na manufatura de papel e produção de cosméticos (SHARMA *et al.*, 2001).

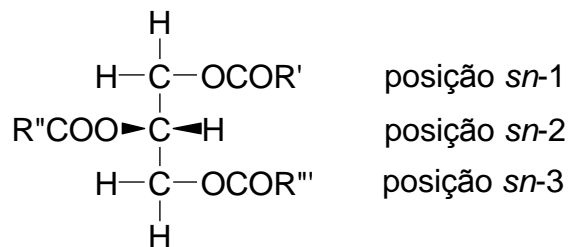
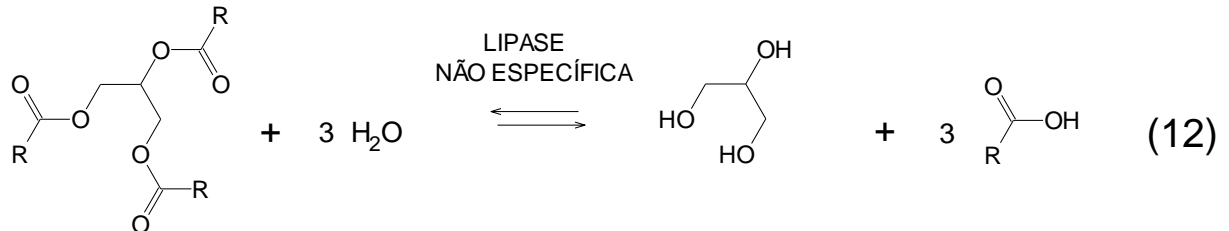
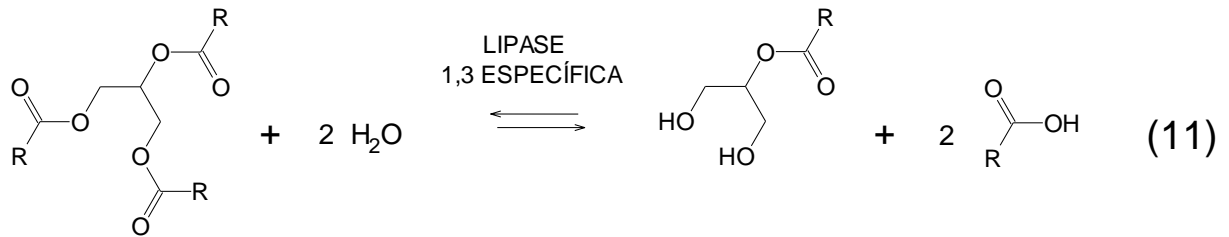


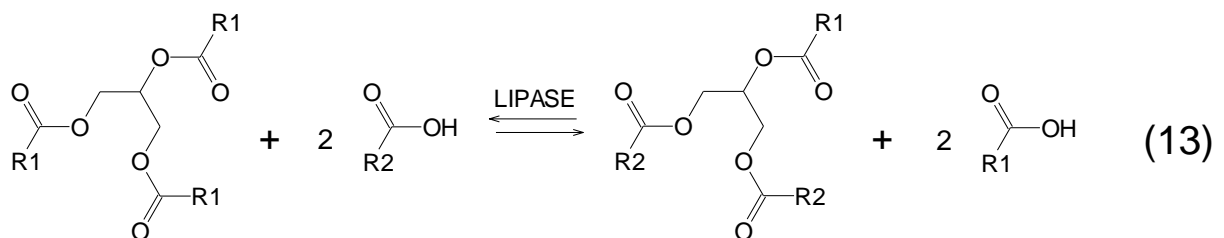
Figura 5: Projeção de Fischer de um triglicerídeo, mostrando as posições de acordo com o sistema de numeração estereoespecífica (*stereospecific numbering, sn*).



onde R = Cadeia linear longa, saturada ou insaturada.

Figura 6: Hidrólise catalisada por lipase 1,3-específica (Equação 11) e lipase não específica (Equação 12).

Alguns lipídeos apresentam grande valor devido à sua estrutura, apresentando propriedades nutricionais e funcionais melhoradas, sendo comumente chamados de lipídeos estruturados (HASAN *et al.*, 2006; OSBORN e AKOH, 2002; D'AGOSTINI e GIOIELLI, 2002). As lipases 1,3 específicas são indispensáveis na obtenção de substitutos para o leite materno. O leite humano possui, predominantemente, triglicerídeos contendo ácidos graxos insaturados nas posições *sn*-1,3, do glicerol, e um ácido graxo saturado na posição *sn*-2. O uso de uma lipase 1,3 específica permite a produção de triglicerídeos contendo ácido palmítico na posição 2 e ácidos insaturados nas posições 1 e 3, pelo tratamento da tripalmitina com ácidos graxos obtidos de óleos, todos de origem vegetal (OSBORN e AKOH, 2002; HOUDE *et al.*, 2004; ver Figura 7).



onde R1 = CH₃(CH₂)₁₄-,

e R2 = Longa cadeia linear insaturada.

Figura 7: Acidólise régio-específica da tripalmitina com ácidos graxos insaturados, catalisada por lipase, na produção de substitutos para o leite humano.

Alguns processos industriais empregam lipases para converter matérias-primas lipídicas mais baratas em lipídeos estruturados. Na indústria de alimentos, a obtenção de substitutos para a manteiga de cacau, a partir de insumos mais baratos, é realizada com o emprego de lipases na transesterificação de óleos com glicerol (glicerólise) (HASAN *et al.*, 2006).

Outras aplicações de lipases na indústria alimentícia incluem a produção de óleos vegetais ricos em ácidos graxos poli-insaturados (ômega-3 e ômega-6), óleos com redução de calorias, lipídeos plásticos (para alteração de propriedades físicas em margarinas, manteigas e massas de confeitaria) e insumos para nutrição enteral e parenteral, voltados para pacientes com necessidades nutricionais especiais (OSBORN e AKOH, 2002).

Outra característica de grande interesse, exibida pelas enzimas em geral e presente em lipases, é a de catalisar transformações químicas com estereoespecificidade definida. Ésteres contendo um centro estereogênico são hidrolisados por lipases, no entanto, com velocidades de reação diferentes para cada enantiômero. Esse é o princípio pelo qual lipases podem ser empregadas na resolução cinética de racematos.

Um processo enantiosseletivo de alcoólise, catalisado por lipase, pode ser encontrado na síntese do diltiazem, um bloqueador de canais de cálcio empregado no tratamento de hipertensão. A mistura racêmica do *trans*-3-(4-metoxifenil) glicidato de metila é resolvida cineticamente, através de alcoólise catalisada por lipase (HWANG *et al.*, 2010; Figura 8).

Alguns trabalhos abordam a utilização de outros derivados do glicidato e várias lipases foram empregadas para se obter resoluções cinéticas. Dentre estas, podem ser citadas a lipase pancreática suína e as lipases dos micro-organismos *Candida antarctica*, *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae* e *Alcaligenes sp.* (LI *et al.* 2008).

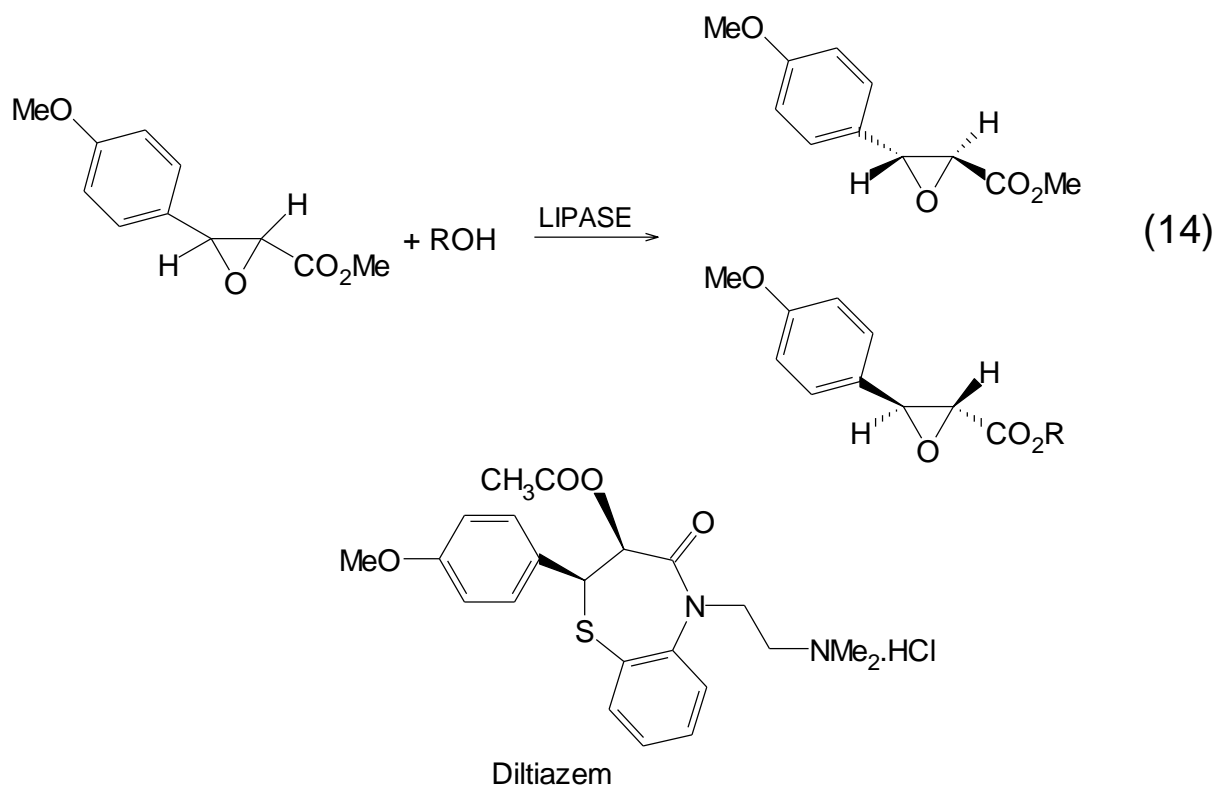


Figura 8: Alcoólise enantiosseletiva, catalisada por lipase, do *trans*-3-(4-metoxifenil) glicidato de metila, para síntese do cloridrato de diltiazem.

2.3.7 Transesterificação catalisada por lipases

Lipases de uma série de micro-organismos são capazes de catalisar a metanólise, com quantidades apropriadas de água e metanol na mistura reacional (KAIEDA *et al.*, 2001). *Pseudomonas fluorescens* (SOUMANOU e BORNSCHEUER, 2003), *Pseudomonas cepacia* (KAIEDA *et al.*, 2001), *Rhizomucor miehei* (SOUMANOU e BORNSCHEUER, 2003; SHIEH *et al.*, 2003), *Rhizopus oryzae* (MATSUMOTO *et al.*, 2001, KAIEDA *et al.*, 1999), *Candida rugosa* (SHAH *et al.*, 2004), *Thermomyces lanuginosus*, *Candida antarctica* (DU *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007; WATANABE *et al.*, 1999), *Candida sp.* 99–125 (NIE *et al.*, 2006) e *Chromobacterium viscosum* (SHAH *et al.*, 2004) são cepas que produzem lipases com atividade em transesterificação, podendo-se acrescentar também a lipase pancreática suína (TAN *et al.*, 2010; VASUDEVAN e BRIGGS, 2008).

Recentemente, muitos trabalhos abordam o emprego de lipases em transesterificação. Estes trabalhos podem ser divididos entre aqueles que investigavam qual a lipase mais eficiente, métodos de imobilização de lipases, a

aplicabilidade a determinadas matérias-primas e as condições de reação para obter o maior rendimento.

Os fatores que influenciam no rendimento das reações, normalmente abordados nos relatos, são: a quantidade de enzima adicionada (alternativamente expressa como concentração em unidades de atividade), a relação molar entre o álcool e os triglicerídeos, a quantidade de água, temperatura e o emprego de solventes. Além desses parâmetros gerais, muitos trabalhos investigam o tipo de álcool empregado, a adição do álcool em múltiplas etapas, os suportes empregados para imobilização, a inativação das enzimas e a estabilidade das preparações enzimáticas a repetidas bateladas.

2.3.8 O fungo *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum gloeosporioides é um fungo filamentosos em fase assexuada, cujo teleomorfo foi descrito como *Glomerella cingulata*. Trata-se de um fungo endofítico, amplamente disseminado, em regiões tropicais e subtropicais, e é um conhecido fitopatógeno, causador de doenças conhecidas como antracnoses. Essas patologias ocorrem em extensa gama de hospedeiros, as plantas estão sujeitas a essa doença em todas as fases de desenvolvimento e o patógeno pode ser disseminado de uma planta para outra por meio de vários agentes do ambiente aéreo (MENEZES, 2006).

Alguns estudos de levantamento de espécies fúngicas produtoras de lipases indicaram cepas de *C. gloeosporioides* como grandes produtoras da enzima: Colen *et al.* (2006) investigaram fungos de solo de cerrado, colhidos sob árvores de frutos oleaginosos, tendo encontrado uma atividade lipolítica de 27,7 U/mL para *C. gloeosporioides*, que foi a cepa com melhores resultados.

Balaji e Ebenezer (2008) estudaram vinte e duas cepas de fungos endofíticos e também identificaram *C. gloeosporioides* como a cepa mais produtiva, tendo obtido, via fermentação em substrato sólido, uma produção de lipase máxima de 2560 U/g de matéria seca.

Venkatesagowda *et al.* (2012) isolaram fungos com grande capacidade de produzir lipases, de dezenove gêneros diferentes, a partir de óleos de sementes. *C.*

gloeosporioides mostrou grande capacidade de produção de lipases, tendo sido identificado como o segundo maior produtor dentre as cepas isoladas, com 98 U/mL.

Faria (2010), investigou a produção de lipase em cultivos submersos e em estado sólido e realizou uma purificação parcial da lipase de *C. gloeosporioides*, aplicando o concentrado obtido na hidrólise do óleo de macaúba. A atividade lipásica determinada foi de 19 U/mL no caldo do cultivo submerso, 709 U/mL no caldo depois de concentrado por ultrafiltração e 75 U/mg do pó obtido por liofilização.

Infelizmente, as metodologias empregadas nestes estudos são diferentes, tanto para a obtenção da lipase quanto para a determinação da atividade lipásica e, dessa forma, não é possível uma comparação entre estes estudos. Pelo mesmo motivo, também não é possível comparar diretamente a lipase de *C. gloeosporioides* com as lipases disponíveis comercialmente, anteriormente citadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes, instrumentos e micro-organismos empregados

Foram empregados os óleos de soja refinado, da marca Soya, e de oliva, da marca Cocinero extra virgem, ambos comestíveis e adquiridos no mercado local. Para a extração do óleo bruto, utilizou-se soja em grãos, obtida em varejistas especializados.

Metanol P.A. foi adquirido da Nuclear ou da Dinâmica, e o etanol hidratado (92,5° INPM) era da marca Minálcool. O hexano empregado foi obtido da empresa Jand Química, porém, foi destilado em aparelhagem para destilação simples a 64 °C, desprezando-se os 25% v/v finais da destilação.

Glicose anidra P.A., fosfato de potássio monobásico, nitrato de sódio, sulfato de sódio anidro e sulfato de magnésio heptaidratado foram adquiridos da Synth. A peptona e o ágar bacteriológico foram da Himedia. Álcool polivinílico foi comprado da Isofar, reagente para preparo de tampão Tris-HCl foi obtido da Vetec e o hidróxido de sódio foi adquirido da Cromoline.

Neste trabalho, foi empregada uma cepa de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolada de solo de cerrado por Colen *et al.* (2006). A lipase pancreática foi fornecida pela empresa Valley Research.

Foi empregado um agitador orbital da marca Cientec, modelo CT712, para o cultivo fúngico em meio líquido, e agitador orbital da marca Goshaker, modelo SK-330 Pro, para realizar os experimentos de transesterificação. O processo de ultrafiltração foi conduzido em aparelho LabScale™ TFF System Millipore. Foi utilizada uma membrana Pellicon™ XL PLCGC10 Millipore, de acetato de celulose, peso de corte de 10 kDa. O agitador dispersador, para preparar emulsões, foi da marca Ika, o banho Maria com agitação foi da marca Solab (Piracicaba, SP).

A centrífuga empregada foi da marca Centribio, modelo TDL80-2B. O agitador tipo vórtex foi da marca Phoenix. Foram utilizadas balanças analíticas e semi-analíticas da marca Shimadzu.

As análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram feitas em cromatógrafo Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, dotado de

sistema automático de injeção AOC-10. As análises por cromatografia líquida de alta pressão foram feitas em aparelho Shimadzu LC-10, dotado de detectores LC-10 e SPD-10. O hélio, utilizado como gás de arraste, foi fornecido por Air Products Brasil. O nonadecanoato de metila, empregado como padrão interno, foi obtido da Fluka, e padrão qualitativo, contendo trinta e sete ésteres metílicos de ácidos graxos (37 Component FAME Mix), foi obtido da Supelco®.

As análises por ressonância magnética nuclear foram realizadas em espectrômetros de RMN Bruker Avance DPX 200, em 200 MHz, operando a 300 K. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm usando o tetrametil-silano (TMS) como padrão de referência. As constantes de acoplamento são fornecidas em Hertz (Hz).

3.2 Obtenção da preparação lipásica

Para se obter o preparado enzimático, a partir do qual foi realizado o restante do trabalho, foi necessário manter a cepa de *Colletotrichum gloeosporioides*, em meio sólido, com repiques frequentes, buscando tê-la sempre viável para utilização.

Para a produção lipásica foi escolhido o método de fermentação submersa, baseando-se nos resultados obtidos em outros trabalhos com a mesma cepa (FARIA, 2010). O método de concentração, para obtenção do preparado, foi o de ultrafiltração do caldo fermentado, seguido por liofilização, baseando-se, ainda, na mesma referência. Os procedimentos para obtenção da preparação lipásica estão esquematizados na Figura 9.

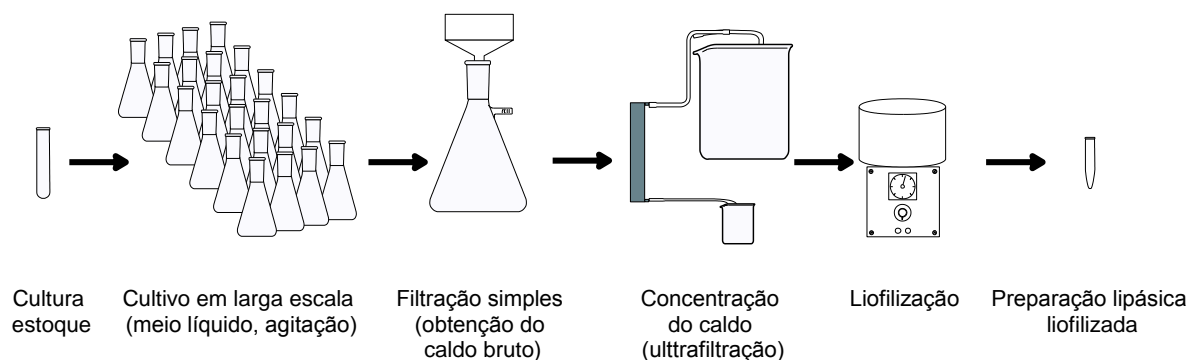


Figura 9: Esquema das etapas para obtenção da preparação lipásica liofilizada.

3.2.1 Manutenção da cultura fúngica em meio sólido

Foi empregado o ágar batata dextrosado, preparado segundo Faria (2010). A 1L de infuso de batata recém-preparado foram adicionados 20 g de glicose e 20 g de ágar bacteriológico, sob aquecimento e agitação, até fundir o ágar. O meio ainda líquido foi distribuído em tubos de ensaio, tampados com rolhas de algodão e esterilizados em autoclave, a 121 °C, por 15 min. O infuso de batata foi preparado colocando-se 250 g de batata descascada e cortada em cubos no interior de um balão de fundo chato, juntamente com 250 mL de água destilada, em seguida, submetendo-se o balão a vapor fluente por 30 min, filtrando-se o conteúdo do balão em pano e completando-se o volume para 1 L.

Para os repiques do fungo, partiu-se de uma cultura estoque da cepa, preservada à temperatura ambiente sob óleo mineral, fazendo-se o transplante de material celular para tubos com ágar batata dextrosado, sempre trabalhando nas proximidades de uma chama.

3.2.2 Fermentação em meio líquido

A fermentação para a produção de lipase foi feita em meio líquido semelhante ao utilizado por Faria (2010). Foi preparada uma solução contendo peptona bacteriológica (10,0 g/L), óleo de oliva (4,0 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,6 g/L), KH_2PO_4 (1,0 g/L) e $NaNO_3$ (1,0 g/L) em água destilada, ajustando-se o pH final para 6,0.

Foram utilizados frascos erlenmeyers de 250 mL, adicionando-se 50 mL do meio a cada um. Os frascos foram fechados com tampões de algodão e gaze e esterilizados em autoclave.

O inóculo fúngico foi feito produzindo-se uma suspensão de esporos em água destilada, a partir das culturas desenvolvidas em tubos com ágar inclinado, e adicionando-se aos frascos, em condições de assepsia.

Depois de inoculados, os frascos permaneceram sob agitação orbital, a 150 RPM, a temperatura ambiente. Findo o tempo de fermentação, o conteúdo dos frascos foi filtrado com papel filtro qualitativo e o líquido dos frascos, denominado caldo fermentado, foi reunido.

3.2.3 Concentração do caldo fermentado

Como início do processo de purificação para obtenção do preparado enzimático, o caldo fermentado foi concentrado pelo processo de ultrafiltração, em membrana de 10 kDa. Terminada a concentração, foram feitos testes de atividade lipásica, buscando verificar qual fração, retida ou permeada, apresenta maior atividade.

3.2.4 Liofilização da fração retida na ultrafiltração

Submeteu-se a fração retida, obtida anteriormente, ao processo de liofilização. As amostras foram congeladas previamente utilizando-se nitrogênio líquido e, então, submetidas a pressão reduzida, no interior do aparelho.

O material obtido, chamado de preparação lipásica liofilizada, foi transferido para frascos limpos e com tampa, pesado e mantido a -4 °C..

3.2.5 Testes de atividade lipásica

Para avaliar a produção de lipase por *Colletotrichum gloeosporioides*, nas etapas realizadas, foram realizados testes de atividade lipásica com o caldo fermentado, com a fração retida da ultrafiltração e com a preparação lipásica liofilizada.

O teste, descrito por WATANABE *et al.* (1977, citado por COLEN *et al.*, 2006), consiste em determinar a quantidade de ácidos graxos livres liberados em uma reação de hidrólise, nas condições padronizadas e descritas a seguir, juntamente com a composição das soluções e da emulsão:

Solução de álcool polivinílico a 2%

A 600 mL de água destilada, a 60 °C e sob agitação vigorosa, adicionaram-se 20,0 g de álcool polivinílico, aqueceu-se até 80 °C e agitou-se por 1 h. Com a solução a temperatura ambiente, acertou-se o volume para 1,0 L com água destilada e filtrou-se. As soluções foram usadas no máximo até 72 h após seu preparo.

Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0

Prepararam-se duas soluções, A e B, que eram reunidas para obtenção da solução tampão. A solução A era preparada dissolvendo-se 24,2 g do reagente Tris-HCl (cloridrato de 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) em 1,0 L de água destilada. Para o preparo da solução B, diluíam-se 6,2 mL de solução concentrada de HCl até 1,0 L com água destilada.

Ao final, adicionaram-se 292 mL da solução B a 500 mL da solução A e ajustou-se o pH para 8,0, utilizando solução de HCl 4 M. Completou-se o volume da solução final para 1,0 L.

Emulsão de óleo de oliva

Para o preparo da emulsão misturavam-se 25 mL de óleo de oliva e 75 mL de solução de álcool polivinílico a 2%. A mistura era homogeneizada a 13500 RPM por 5 min, com o auxílio de um agitador mecânico, tipo dispersador.

Primeira etapa do teste: incubação enzimática

A frascos de 250 mL, adicionaram-se 5 mL de emulsão de óleo de oliva, 5 mL de tampão Tris-HCl pH 8,0 e 1 mL de solução da preparação lipásica. O frasco foi colocado em banho Maria a 30 °C, sob agitação orbital, por 10 min. Ao final deste tempo, foram adicionados 20 mL de uma solução 1:1 de álcool etílico e acetona, com o objetivo de se desnaturar a enzima e interromper a hidrólise. Elaborou-se um frasco para servir de branco, com a mesma composição acima, exceto pela preparação lipásica, que foi desnaturada previamente pela adição da solução de álcool e acetona ou sob aquecimento.

Segunda etapa do teste: titulação dos ácidos graxos liberados na reação

Adicionaram-se cinco gotas de solução de timolftaleína 0,04% e titulou-se com solução de NaOH 0,05 M até o aparecimento de cor azul clara.

Cálculos

Definiu-se como unidade de atividade lipásica a quantidade de enzima que libera um μmol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas. Assim, para o cálculo da atividade lipásica, foi utilizada a fórmula de cálculo dada pela Equação 15.

$$\text{Atividade lipásica (U)} = \frac{(V_{\text{Enzimático}} - V_{\text{Branco}}) * f_c * f_d * 50}{t} \quad (15)$$

em que:

$V_{\text{Enzimático}}$: volume de solução de NaOH 0,05 M, em mL, gasto na titulação da reação enzimática;

V_{Controle} : volume de solução de NaOH 0,05 M, em mL, gasto na titulação do controle (branco);

f_c : fator de correção da solução de NaOH 0,05 M;

f_d : fator de diluição, para a preparação enzimática diluída;

Ainda na equação acima, o fator “50” foi utilizado para se expressar o resultado em micromol de ácido graxo, representando o número de micromol de NaOH por mL da solução 0,05 M do titulante.

3.3 Obtenção de óleo de soja bruto e análises de teor

Foi obtido o óleo de soja bruto, a partir da soja em grão, com o objetivo de compará-lo ao óleo de soja refinado, obtido comercialmente, permitindo estabelecer qual seria utilizado nos experimentos de transesterificação.

Os grãos de soja foram moídos em moinho de facas e foram submetidos à extração por percolação e, também, empregando o extrator de Soxhlet.

3.3.1 Extração do óleo de soja por percolação

Os grãos de soja moídos (290,1 g) foram acondicionados em papel pardo e colocados no interior de uma coluna de vidro com torneira. A coluna foi preenchida com hexano destilado, o sistema foi selado e permaneceu em repouso por 19 dias. O óleo extraído pelo solvente foi, então, recolhido e filtrado. O solvente foi evaporado, o óleo obtido foi transferido para um frasco limpo e acondicionado ao abrigo da luz.

3.3.2 Extração do óleo de soja em extrator de Soxhlet

Os grãos de soja moídos (39,4 g) foram acondicionados em pacotes de papel pardo e foram colocados no interior do extrator de Soxhlet. O conjunto, constituído por manta de aquecimento, balão, extrator e condensador de refluxo, foi montado conforme Figura 10. Colocou-se hexano destilado no balão e foi mantido refluxo do solvente por 4 h. Ao final, o solvente foi evaporado, o óleo obtido transferido para um frasco limpo e acondicionado ao abrigo da luz.

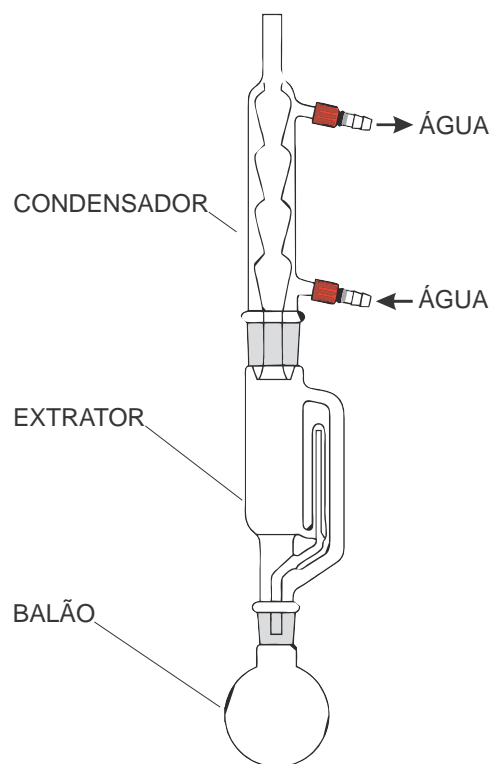


Figura 10: Montagem para extração de óleos, utilizando o extrator de Soxhlet.

3.3.3 Análise dos óleos por cromatografia em camada delgada (CCD)

Foi utilizada a cromatografia de camada delgada de sílica, nas condições descritas por Kaieda *et al.* (1999). Foi usada como fase móvel uma solução hexano / acetato de etila na proporção 9:1, respectivamente, contendo algumas gotas de solução ácido sulfúrico concentrado / metanol (1:1).

Uma pequena quantidade, de cada amostra, foi dissolvida em hexano e aplicada em uma extremidade das placas de CCD. Depois de eluídas, as placas

foram borrifadas com solução de ácido sulfúrico concentrado / metanol (1:1) e aquecidas em estufa a 100 °C, para revelação das manchas das substâncias presentes nas amostras.

3.3.4 Análise dos óleos vegetais por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Para análise por CG-EM, os óleos de soja, tanto comercial quanto obtido por extração, foram previamente metilados, para facilitar as análises e melhorar o perfil cromatográfico, conforme o procedimento a seguir, adaptado de Chaves *et al.* (2004).

Pesaram-se 100 mg de cada óleo, em tubos de ensaio, adicionaram-se 2 mL de hexano e 0,2 mL de solução metanólica de KOH 2 mol/L, a quente. Agitou-se o tubo em agitador do tipo vórtex por 90 s, adicionaram-se 2,0 mL de solução concentrada de NaCl, e submeteu-se o tubo à centrifugação, a 3500 RPM por 10 min. A camada orgânica (superior) foi removida cuidadosamente e transferida para tubos secos contendo Na₂SO₄ anidro, agitada e novamente centrifugada. O sobrenadante foi transferido para frascos utilizados no cromatógrafo a gás, aos quais foram adicionados 25 µL de solução padrão de nonadecanoato de metila 1 mg/mL, como padrão interno.

Empregou-se uma coluna capilar Rxi-1 (100% polidimetil-siloxano), 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm. As condições da análise foram: temperatura do injetor 250 °C, temperatura inicial do forno 50°C, mantida por 2 min, elevada, à taxa de 10 °C/min, até 120 °C e, em seguida, a taxa de aquecimento foi reduzida para 5 °C/min, até a temperatura de 300 °C, mantida por mais 2 min. O volume injetado das amostras preparadas foi de 1 µL, a injeção se deu no modo *split* e na razão de 100:1, o gás de arraste usado foi He e o fluxo pela coluna foi de 2,27 mL/min.

3.3.5 Caracterização espectrométrica dos óleos

Os óleos obtidos foram analisados por espectrometria na região do infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear (RMN), para fins de caracterização do material de partida. A amostragem para se obter o espectro no

infravermelho (IV) foi feita com óleo mineral, em pastilhas de KBr. Para o RMN, foi utilizado, como solvente, CDCl_3 .

3.4 Metodologias empregadas nas transesterificações

Para determinação das condições experimentais, foi empregada inicialmente uma preparação de lipase pancreática comercial. Foram feitas reações de transesterificação, utilizando óleo de soja e metanol ou etanol, com objetivo de estabelecer as metodologias de execução, elaboração e análise das reações.

Uma vez obtida a preparação lipásica de *C. gloeosporioides*, procedeu-se à realização das transesterificações, empregando-se, além da preparação, óleo de soja e metanol.

3.4.1 Metodologia empregada na transesterificação com lipase pancreática comercial

A lipase pancreática foi utilizada, no início dos trabalhos, para se definir a metodologia para a transesterificação, até a obtenção do preparado contendo lipase fúngica. Foram feitos experimentos em quadruplicata, sendo dois com metanol e um com etanol como receptores de acila. Nos experimentos com metanol, variou-se a quantidade de pó de enzima empregada.

A solução contendo lipase pancreática foi preparada adicionando-se a massa do pó, a ser empregada no experimento, a um béquer, em seguida, adicionando-se água destilada e mantendo-se o sistema em agitação magnética por 1 h. A suspensão foi dividida em tubos de ensaio e centrifugada a 3500 rpm, por 10 min, adicionando-se o sobrenadante aos frascos reacionais.

Adicionaram-se a erlenmeyers de 125 mL 8,72 g de óleo de soja refinado e 1,6 mL de metanol, correspondendo a uma relação molar álcool / óleo de 4:1. Nestes experimentos, foram preparadas suspensões com pó de enzima nas concentrações de 500 mg/mL e 100 mg/mL, adicionando-se 1 mL a cada frasco. Além da água utilizada na preparação da suspensão, adicionou-se mais 1 mL de água destilada a cada frasco.

Os frascos foram colocados em agitação orbital por três dias. Ao final deste tempo, o conteúdo dos frascos foi centrifugado e a fase oleosa foi recolhida a frascos limpos.

3.4.2 Metodologia empregada na transesterificação com preparado de lipase fúngica

Foram empregados frascos de vidro de 125 mL, que foram mantidos sob agitação orbital durante o tempo dos experimentos. Aos frascos adicionou-se, primeiramente, a massa de óleo de soja, que permaneceu inalterada em todos os experimentos realizados, sendo de 8,72 g, correspondendo a 0,01 mol de triglicerídeos do óleo de soja, calculada com base na composição encontrada, descrita no item 4.2.

Em seguida, adicionou-se o álcool a ser investigado, sendo a quantidade calculada em relação à quantidade de óleo, considerando que a relação estequiométrica para a transesterificação é de 3 mol do álcool (desde que seja monoálcool) para cada mol de triglicerídeos, de acordo com a equação da Figura 1 (página 15).

Para o preparo da solução de lipase, o pó liofilizado foi pesado em balança analítica, no interior de um tubo de ensaio, e adicionou-se água destilada, em quantidade estabelecida previamente. Então, agitou-se o tubo em aparelho tipo vórtex por 90 s e procedeu-se à centrifugação do tubo, a 3500 RPM, por 10 min. Ao final do processo, adicionou-se o sobrenadante diretamente ao frasco da reação ou, em alguns casos, transferiu-se o mesmo para balão volumétrico, a fim de se obter uma solução mais diluída.

Para elaboração da reação ou retirada de alíquotas, transferiu-se o conteúdo (ou parte do conteúdo) dos frascos a tubos de ensaio, os quais foram centrifugados a 3500 rpm por 10 min. A seguir, recolheu-se a fase oleosa, transferindo-a para frascos limpos. Quando a fase oleosa foi obtida em pequena quantidade, dificultando a sua transferência, utilizou-se hexano para diluição e posterior coleta.

3.4.3 Análises dos produtos de transesterificação por cromatografia em camada delgada (CCD)

Para acompanhar qualitativamente o andamento e os resultados da de transesterificação, as amostras foram analisadas por CCD, nas mesmas condições descritas no item 3.3.3. Em cada placa, aplicou-se um ponto que correspondia ao material de partida, ou seja, o óleo de soja, para efeito de comparação.

3.4.4 Análises dos produtos de transesterificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência para analisar qualitativamente o conteúdo da fase oleosa das reações de transesterificação. Os ésteres saturados de ácidos graxos, bem como ácidos graxos livres, não absorvem luz ultravioleta. Porém, os ácidos graxos insaturados apresentam pico de absorção a 205-210 nm. Ainda assim, a quantificação dos produtos da transesterificação de óleos seria possível com a utilização de curvas de calibração individuais (HOLCAPEK, 1999; TURKAN e KALAY, 2006). Não foi possível estabelecer um método de eluição isocrático, que permitisse analisar as amostras utilizando o detector de índice de refração.

Foi empregado um cromatógrafo líquido, marca SHIMADZU, modelo LC-20 AT, detector UV/VIS (modelo SPD-M20A). A coluna empregada foi ODS HYPERSIL de dimensão 250 mm x 46 mm. As análises foram feitas a 40 °C.

As condições das análises foram aquelas estabelecidas por Holcapek *et al.* (1999). Foram utilizados os seguintes solventes como fase móvel: metanol, 2-propanol e hexano. No reservatório A foi adicionado metanol e, no reservatório B, uma solução contendo 2-propanol e hexano em uma proporção de 5:4 (v/v). Foi empregado um gradiente linear de 100% de A para 50% de A e 50% de B em 15 min. A eluição foi feita isocraticamente com 100% de B, por mais 5 min, totalizando um tempo de análise de 20 min. O fluxo total pela coluna foi de 1 mL/ min. Foi selecionado o comprimento de onda de 205 nm para detecção dos componentes da amostra.

3.4.5 Análises e quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A quantificação do rendimento das transesterificações foi feita utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Adotou-se a metodologia de padrão interno, tendo sido utilizado o nonadecanoato de metila para este fim.

Empregou-se uma coluna capilar Rxi-1 (100% polidimetil-siloxano), com 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 μm .

As condições da separação cromatográfica, para as análises quantitativas, foram: temperatura do injetor 300 °C, temperatura inicial do forno 150 °C, imediatamente elevada, à taxa de 10 °C/min, até 300 °C e mantida nesta temperatura por 50 min, o volume injetado foi de 1 μL , a injeção deu-se no modo *split*, na razão de 5:1, o gás de arraste usado foi hélio e o fluxo pela coluna foi de 2,27 mL/min.

As amostras foram preparadas adicionando-se 100 μL da amostra, anotando-se a massa, 25 μL de uma solução 1 mg/mL de nonadecanoato de metila em hexano e 875 μL de hexano em frascos, que eram agitados até homogeneização do conteúdo e fechados com tampa dotada de septo de silicone. As amostras foram preparadas imediatamente antes das análises cromatográficas.

O espectrômetro de massas foi programado para detectar íons específicos (modo SIM – *single ion monitoring*), tendo sido selecionados os íons de m/z 74 e 87, de acordo com as fragmentações previstas para os ésteres metílicos de ácidos graxos, saturados e insaturados, mostradas na Figura 11. A utilização desta funcionalidade do detector de massas para a análise de ésteres metílicos encontra subsídios em diversos relatos na literatura (HAUFF e VETTER, 2009; ROCHA, 2008, THURNHOFER, 2005). Os resultados das análises foram computados pela contagem total dos dois íons.

A identificação dos componentes das amostras foi feita tanto pela análise do espectro de massas, produzido no modo de varredura, de m/z 45 a m/z 900, quanto por comparação com um padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco 37 Comp. FAME Mix, Supelco™). Para a comparação, utilizou-se um método de análise diferente: temperatura do injetor 250 °C, temperatura inicial do forno 50 °C mantida por 2 min, elevada à taxa de 10 °C/min até 150 °C e, então, elevada a 5 °C/min até

300 °C. O volume injetado de solução 1 mg/mL do padrão foi de 5 µL, a injeção se deu no modo *split* na razão de 5:1. O gás de arraste foi hélio e o fluxo pela coluna foi de 2,27 mL/min.

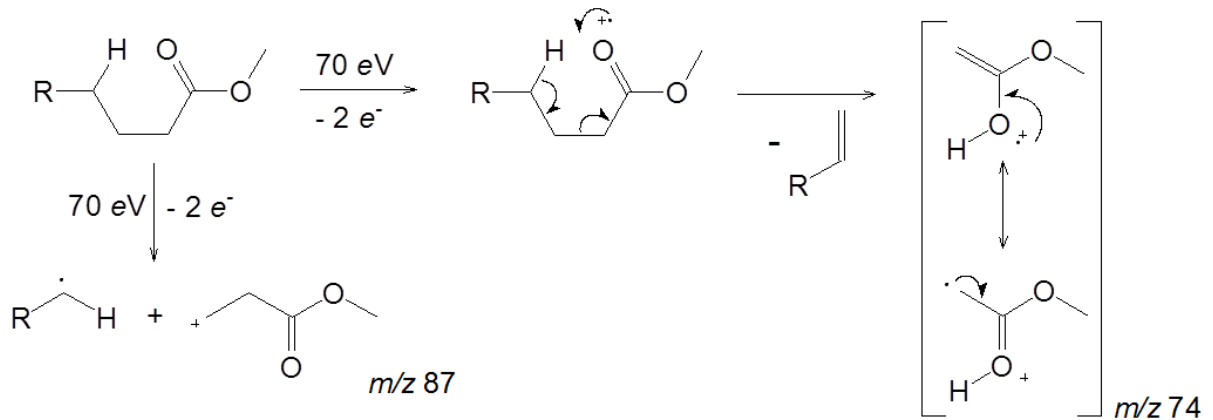


Figura 11 – Fragmentações que indicam a presença de ésteres metílicos, por impacto de elétrons.

Para os resultados da análise quantitativa, avaliou-se a área dos picos dos ésteres metílicos, provenientes do óleo, em relação à área do pico do padrão interno. Como a massa do padrão interno é conhecida, pôde-se estimar a massa dos ésteres presentes na amostra e, para o cálculo final do rendimento, a massa calculada para todos os picos, referentes a ésteres metílicos, foi correlacionada à massa de amostra adicionada.

3.4.6 Análise dos produtos de transesterificação por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

Amostras selecionadas das transesterificações foram analisadas por espectrometria de RMN de ¹H e ¹³C, tendo CDCl₃ como solvente.

Os espectros de RMN de ¹H fornecem informações quantitativas, permitindo estimar o rendimento das transesterificações comparando-se o valor da integral dos átomos de hidrogênio metilênicos em posição alfa à carboxila do grupo éster e da porção alcoólica. No caso dos ésteres metílicos, onde há três átomos de hidrogênio metoxílicos, aplica-se a fórmula dada pela Equação 16 para o cálculo da porcentagem de conversão (GELBARD *et al.*, 1995, citado por KNOTHE, 2006):

$$C = 100 X (2 X \text{Área}_{\text{átomos de H metoxílicos}} / 3 X \text{Área}_{\text{átomos de H } \alpha}) \quad (16)$$

3.5 Experimentos de transesterificação empregando o preparado liofilizado de *Colletotrichum gloeosporioides*

3.5.1 Delineamento experimental

Diversas variáveis podem influenciar os resultados das transesterificações enzimática, tais como a relação molar entre os reagentes (óleo e álcool), quantidade de enzima, a quantidade total de água e de álcool, temperatura, tempo e a presença de outros solventes. (HERNÁNDEZ-MARTINS e OTERO, 2008; SHIEH *et al.*, 2003). Por isso, adotou-se uma abordagem sistemática quanto a alguns desses fatores, procurando verificar principalmente a sua influência no rendimento da reação.

Planejou-se um delineamento composto central rotacional, procurando prever, quantitativamente, a influência da quantidade de enzima e relação molar álcool / óleo, no rendimento da reação. Estas variáveis determinam a quantidade de material de partida e do catalisador e, por isso, implicam diretamente no resultado da reação, tornando-se necessário fixar estes parâmetros para, então, buscar a otimização dos demais.

A quantidade de enzima num preparado enzimático não pode ser determinada diretamente, mas, em reações empregando seu substrato específico. Por esta razão, a padronização da metodologia exige que os preparados enzimáticos sejam submetidos a testes de atividade específica, e a concentração de enzima seja expressa em termos de unidade de atividade enzimática.

Para a concentração de enzima, Faria (2010), trabalhando com uma preparação idêntica à obtida neste trabalho, determinou que a concentração de melhor rendimento em reações de hidrólise de óleo de oliva, empregando uma solução de enzima de 306 U / 25 mL de solução, correspondente a aproximadamente 107 U/g de óleo. Chattopadhyay (2011) empregando lipase pancreática bruta, porém, submetendo o material a uma etapa prévia de purificação, utilizou de 0,24 a 14,7 U/g de óleo, na transesterificação de óleo de semente de algodão.

Experimentos preliminares com a preparação lipásica de *C. gloeosporioides* mostraram que concentrações superiores a 5 mg/mL levavam à formação de um precipitado leitoso, nos frascos reacionais, possivelmente por precipitação de enzima.

Como, nesta etapa, empregou-se o primeiro preparado de lipase fúngica obtido, cuja atividade lipásica era baixa (Tabela 4, página 51), optou-se por explorar uma faixa de concentrações inferior, partindo de 2,5 U até 12,5 U, adicionadas por frasco, evitando-se a ocorrência de precipitação. Dessa forma, a concentração de enzima empregada variou de 0,29 a 1,43 U/g de óleo de soja.

Quanto à relação molar álcool / óleo, relatos da literatura indicam que lipases diferentes podem apresentar diferentes níveis de sensibilidade ao metanol e ao etanol (KAMINI e IEFUJI, 2001; FREITAS *et al.*, 2009a), de modo que uma faixa ampla de relações deve ser considerada. Sendo a relação estequiométrica, para a reação de transesterificação, de 3:1, investigaram-se as relações de 4:1, 8:1 e 12:1, variando desde um pequeno excesso de álcool até o correspondente a quatro vezes a relação estequiométrica. Os parâmetros do experimento estão relacionados na Tabela 1.

Com os valores acima estabelecidos, elaborou-se uma matriz 2^2 , com quatro ensaios axiais e três repetições do ponto central, totalizando onze ensaios. Os parâmetros de cada ensaio, em termos de valores empregados e da codificação das variáveis, podem ser vistos na Tabela 2. A duração dos experimentos foi de 72 h.

Tabela 1 – Valores utilizados no delineamento experimental para duas variáveis

Variável	Código	-1,41	-1,0	0	+1,0	+1,41
Concentração de enzima (U/frasco)	x_1	2,5	3,95	7,5	11,05	12,5
Relação molar álcool / óleo	x_2	4:1	5,16:1	8:1	10,84:1	12:1

Tabela 2 – Matriz dos experimentos preditivos, para a combinação das variáveis concentração de enzima e relação molar

Ensaio	Concentração (U/frasco)	Relação molar	x_1	x_2
1	3,95	5,16	-1	-1
2	11,05	5,16	+1	-1
3	3,95	10,84	-1	+1
4	11,05	10,84	+1	+1
5	2,5	8	-1,41	0
6	12,5	8	+1,41	0
7	7,5	4	0	-1,41
8	7,5	12	0	+1,41
9	7,5	8	0	0
10	7,5	8	0	0
11	7,5	8	0	0

3.5.2 Determinação preliminar das faixas de trabalho

A fim de se delimitar faixas de trabalho para os parâmetros de quantidade de preparação enzimática, tempo de reação e de relação molar álcool / óleo, realizaram-se experimentos em uma ampla faixa de concentrações e de relação, colhendo-se alíquotas em três tempos diferentes. O objetivo foi iniciar uma série de ensaios para se avaliar individualmente cada um dos parâmetros.

Os experimentos foram feitos em batelada. Alíquotas foram colhidas nos tempos de 24 e 48 h, e a reação foi elaborada em 72 h.

Tabela 3 – Condições dos experimentos de transesterificação, na determinação preliminar das faixas de trabalho.

CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA (por frasco)	RELAÇÃO MOLAR ÁLCOOL / ÓLEO
0,05 U	4:1
	8:1
	12:1
2,5 U	4:1
	8:1
	12:1
12,5 U	4:1
	8:1
	12:1

3.5.3 Avaliação da adição de água.

Avaliou-se a influência causada pela variação na quantidade total de água adicionada aos frascos, no rendimento da reação. Foram monitoradas as melhores condições, determinadas pelos experimentos anteriores. A quantidade total de água adicionada, em relação à massa de óleo, foi 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 ou 8,0 mL de água, correspondendo a 5,7%, 11,5%, 22,9%, 45,9%, 68,8% e 91,7%, respectivamente. As reações foram feitas em duplicata e foram feitos dois frascos controle, aos quais não foi adicionado o preparado lipásico, sendo um frasco com 0,5 mL e outro com 4,0 mL de água.

3.5.4 Avaliação da adição fracionada de metanol.

Prosseguindo-se com os experimentos, foi investigada a adição fracionada de metanol. Relatos da literatura indicam que esse procedimento diminui os efeitos de inibição da atividade lipásica, que possam ser causados pelo álcool (KAIEDA *et al.*, 1999).

Foram executados experimentos com quatro diferentes quantidades de metanol, adicionados em três etapas com intervalos de 24 h, correspondentes às

relações molares de 1:1, 2:1, 3:1 e 4:1, ou seja, a quantidade total de metanol adicionada ao final das adições foi, respectivamente, 3:1, 6:1, 9:1 e 12:1.

Antes de cada adição, foram colhidas amostras e todas foram analisadas por CG-EM, conforme o método estabelecido. Depois de colhidas as amostras da fase oleosa, o conteúdo de cada frasco foi recolocado no seu frasco de origem, de modo a se minimizar as perdas de reagentes e do catalisador.

3.5.5 Avaliação da adição de solvente

A adição de solvente ao sistema pode melhorar o rendimento da reação por facilitar o transporte de massas no interior do frasco reacional. Na metodologia aqui empregada, o metanol fica na fase aquosa, juntamente com a enzima, e o contato de ambos com os triglicerídeos pode acontecer somente na interface óleo-água. A adição de um solvente pode melhorar a dispersão do álcool na fase oleosa e melhorar o rendimento por facilitar o contato de ambos os reagentes com a enzima.

Foram feitos dois experimentos, nos quais adicionaram-se 2 e 8 mL de hexano a frascos de reação. A massa de óleo manteve-se em 8,72 g, o volume de metanol foi de 1,6 mL (relação molar 4:1) e a quantidade total de água adicionada foi de 4 mL. A quantidade de enzima foi aumentada, sendo adicionados 30,6 U (3,14 mg), no frasco com 2 mL de hexano, e 39,6 U (4,06 mg), no frasco com 8 mL de hexano.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção da preparação lipásica

A preparação lipásica foi obtida em ocasiões diferentes, segundo o mesmo procedimento. O fungo foi cultivado em 1 L do meio de cultura para obtenção da lipase. Depois de obtido o pó liofilizado, foram feitos testes de determinação da atividade lipásica. Os resultados encontram-se listados na Tabela 4, onde foi incluído o valor encontrado para a lipase pancreática, usada para estabelecer a metodologia das reações de transesterificação.

Tabela 4 – Massas e medidas das atividades lipásicas dos preparados obtidos de *C. gloeosporioides* e do preparado de lipase pancreática.

Preparado	Massa (mg)	Atividade lipásica (U/mg)
1	466,6	0,5
2	605,9	9,75
Lipase pancreática (comercial)	NA ¹	1,28

¹ : não se aplica, obtida comercialmente;

Faria (2010), trabalhando com a mesma cepa e executando o mesmo procedimento para obtenção do preparado, relatou atividade de 75 U/mg. No procedimento para determinação da atividade lipásica, este autor utilizou um volume maior de água (25 mL) na solubilização do preparado enzimático, multiplicando o valor encontrado pelo fator de diluição.

Outro fator importante que pode explicar a diferença na atividade é o estado da membrana utilizada para a ultrafiltração. Para obtenção do preparado 1, foi empregada uma membrana que sofreu diversas lavagens e retro-lavagens com soluções alcalinas, o que pode ter causado o rompimento de alguns poros, causando a permeação de lipase. O preparado 2 foi obtido com uma membrana nova.

Outras possíveis explicações para a diferença entre o valor de atividade obtido e o relatado na referência anterior são diferenças na peptona empregada, cuja composição pode variar muito entre fabricantes diferentes, e a perda de capacidade de produção de lipase pela cepa fúngica depois de um longo período estocada em geladeira e em meio de cultura sem lipídeos.

4.2 Análises dos óleos de soja obtidos e do óleo de soja refinado

A extração de óleo, a partir de grãos de soja, utilizando o aparelho de Soxhlet, teve um rendimento de 14,4% de óleo bruto, em massa, obtendo-se um óleo de cor amarela. A extração por percolação teve rendimento de 20,4% m/m, obtendo-se um óleo com as mesmas características. Bonato *et al.* (2000) relataram teores de óleo de soja em torno de 20%, para cultivares de soja do Rio Grande do Sul, valor semelhante ao obtido por Tanaka *et al.* (1995), que relataram teores de 20,2 a 22,4%, em cultivares de soja do estado de São Paulo. O rendimento mais baixo obtido na extração por Soxhlet pode ser devido à utilização de uma massa elevada de grãos de soja, em relação à capacidade do extrator (aproximadamente 40 g de grãos, aparelho com capacidade para aproximadamente 150 mL de solvente), levando à baixa eficiência da extração.

Os ácidos graxos que compunham os óleos de soja obtidos foram identificados por CG-EM, tanto pela análise dos espectros de massas obtidos e sua comparação com bibliotecas de espectros, quanto por comparação com os tempos de retenção de padrões. O cromatograma obtido do padrão de ésteres metílicos (Supelco® 37 Component FAME Mix) encontra-se na Figura 12.

A composição encontrada para o óleo de soja refinado e para os óleos obtidos de grãos de soja, por percolação e em extrator de Soxhlet, encontram-se na Tabela 5, onde são comparadas às composições relatadas por Kincs (1985) e por Mounts *et al.* (1988). As fórmulas estruturais, em modelos de bola e bastão, podem ser vistos na Figura 13.

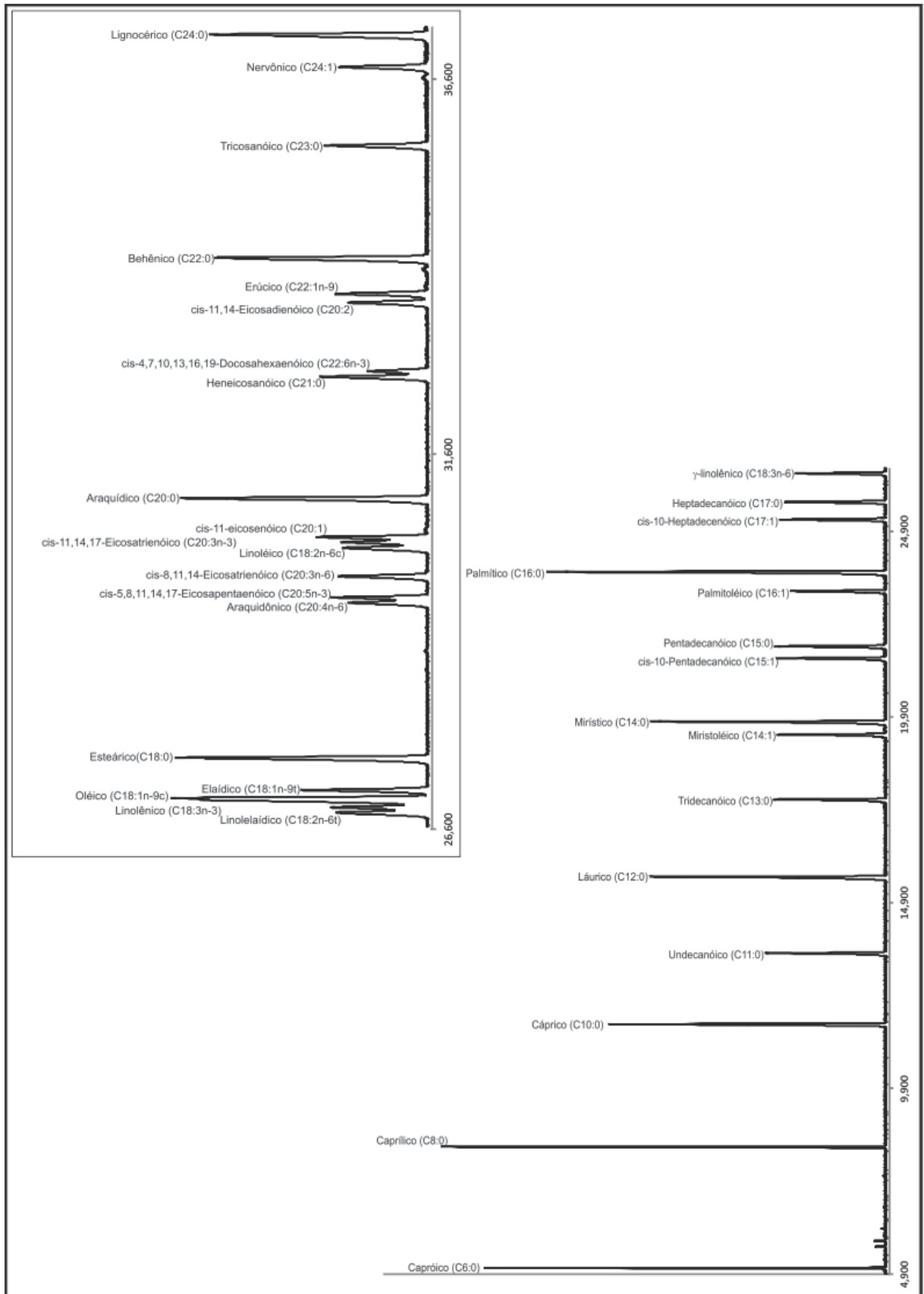


Figura 12: Cromatograma de CG-EM para o padrão de ésteres metílicos, com ampliação da parte final do cromatograma.

Tabela 5 – Composição dos óleos de soja refinado e dos óleos obtidos, em relação aos dados da literatura:

Ácido graxo	Óleo de soja (% m/m)				
	Refinado	Extraído por percolação	Extraído em Soxhlet	Referência ¹	Referência ²
Ácido palmítico (C16:0)	11,0	9,0	9,4	10,2	10,5
Ácido linoleico (C18:2n-6)	55,3	44,6	49,7	53,7	54,4
Ácido α -linolênico (C18:3n-3)	4,1	3,1	ND	8,6	7,7
Ácido oleico (C18:1n-9)	23,8	23,9	24,1	22,8	23,8
Ácido esteárico (C18:0)	3,8	2,2	2,4	3,7	3,6
Ácido láurico (C12:0)	ND	ND	ND	0,1	ND
Ácido mirístico (C14:0)	ND	ND	ND	0,1	ND
TOTAIS	98,0	82,8	85,6	99,2	100

¹ : KINCS (1985); ² : MOUNTS (1988); ND : não detectado.

Observou-se que a extração, tanto por percolação quanto pelo uso do Soxhlet, levou a menores teores totais, em relação ao óleo de soja refinado. Além disso, o perfil encontrado foi diferente, principalmente em relação aos ácidos graxos com duas ou mais insaturações. Tal fato pode ser devido à degradação dos ácidos graxos insaturados, durante o processo de extração. No entanto, as diferenças encontradas podem indicar variação na composição dos grãos empregados na extração ou ser decorrentes de peculiaridades das técnicas adotadas.

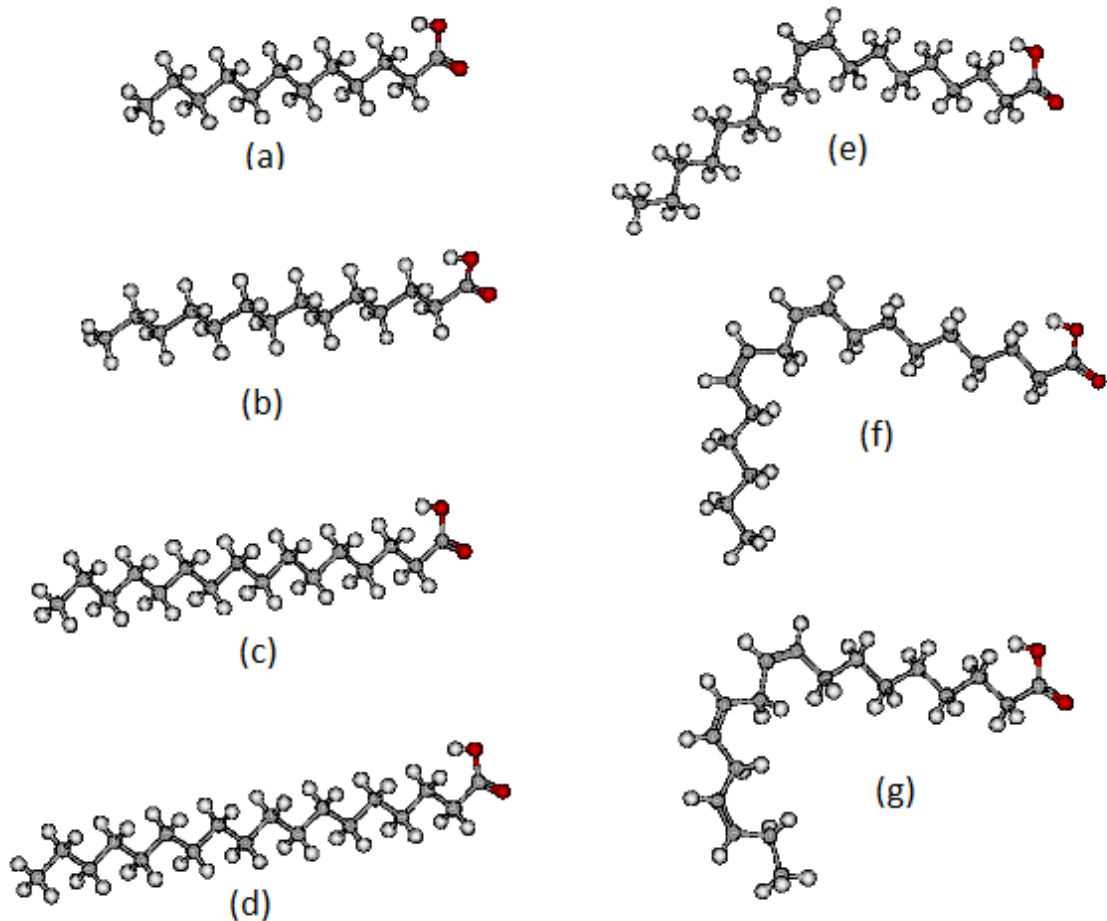


Figura 13: Fórmulas estruturais dos ácidos graxos presentes no óleo de soja; (a) ácido láurico, (b) ácido mirístico, (c) ácido palmítico, (d) ácido esteárico, (e) ácido oleico, (f) ácido linoleico, (g) ácido α -linolênico.

Por essas razões e pela sua ampla disponibilidade a baixo custo, decidiu-se trabalhar somente com o óleo de soja refinado. A composição encontrada mostrou-se semelhante à relatada na literatura, possibilitando compararem-se os resultados deste trabalho a outros, que citem a mesma referência. Além disso, foi verificado por Watanabe *et al.* (2002) que a utilização de óleo de soja bruto, em reações de transesterificação, leva à inibição da lipase, devido à presença de fosfolípidios no óleo.

Conhecida a composição do óleo de soja refinado, foi possível o cálculo da massa molar. Determinou-se as massas molares de triglicerídeos formados exclusivamente por cada um dos ácidos graxos que compõem o óleo e aplicou-se a fórmula de cálculo dada pela Equação 17.

$$MM_{\text{ÓLEO DE SOJA}} = \frac{\sum(\text{Teor}_{\text{ÁC.GRAXO}} \times MM_{\text{TRIGLICERÍDEO ÁC.GRAXO}})}{\sum \text{Teores}} \quad (17)$$

As massas molares calculadas para os ácidos graxos do óleo de soja refinado e seus respectivos teores encontram-se na Tabela 6. Com estes valores, obteve-se, para o óleo de soja empregado, o valor de 871,6 g/mol.

Tabela 6: Massas molares empregadas no cálculo para obtenção da massa molar do óleo de soja refinado analisado

ÁCIDO	TEOR (%)	MM TRIGLICERÍDEO (g/mol)
Linoleico C18:2	55,3	878
Oleico C18:1	23,8	884
Palmítico C16:0	11,0	806
Linolênico C18:3	4,1	872
Esteárico C18:0	3,8	890

4.2.1 Caracterização do óleo de soja por espectroscopia na região do infravermelho (IV)

O óleo de soja refinado, utilizado nas reações de transesterificação, foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho. O espectro de absorção de uma amostra do óleo pode ser visto na Figura 14.

No espectro, podem-se observar bandas de absorção em 3008 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C-H sp^2 , 2921 e 2852 cm^{-1} , referentes aos estiramentos C-H sp^3 , 1741 cm^{-1} , referente ao estiramento de ligação C=O de carboxila, 1458 cm^{-1} , atribuído ao dobramento de CH_2 , 1159 cm^{-1} , referente a estiramento da ligação C-O e em 721 cm^{-1} , atribuída ao movimento de *rocking* associado a quatro ou mais grupos CH_2 (banda de cadeia longa).

4.2.2 Caracterização do óleo de soja por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H

O espectro de RMN de hidrogênio do óleo de soja (200MHz, CDCl_3) é mostrado na Figura 15.

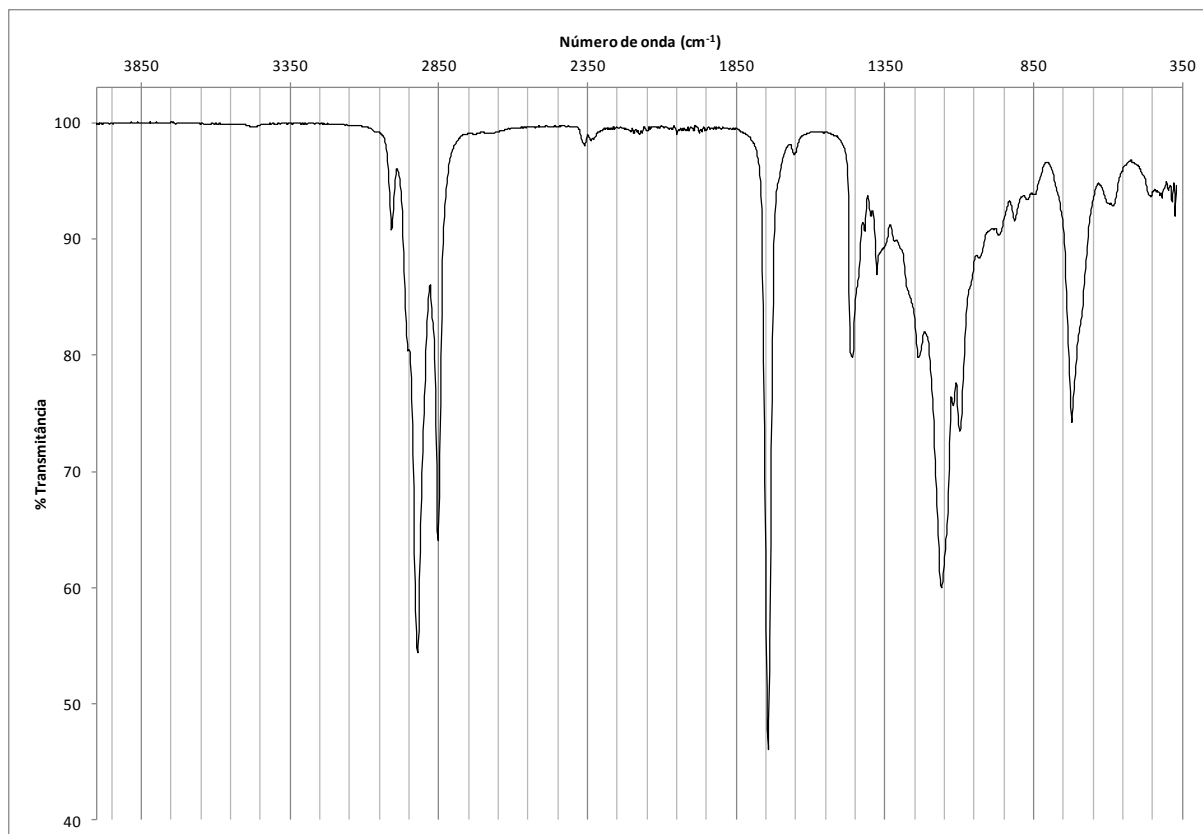


Figura 14: Espectro de absorção na região do infravermelho médio do óleo de soja refinado (Nujol)

Observam-se no espectro um multipletto referente aos átomos de hidrogênio olefínicos, registrado a δ 5,31, dois dupletos duplos, a δ 4,30 e δ 4,14, referentes aos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos primários do glicerol, sinais a δ 2,77 atribuídos a átomos de hidrogênio metilênicos bis-alílicos, sinais em torno de δ 2,30 atribuídos aos átomos de hidrogênio em posição alfa à carboxila, em torno de δ 2,00 atribuídos a hidrogênios alílicos, destacando-se dois sinais intensos, referentes aos átomos de hidrogênio metilênicos registrados a δ 1,26 e δ 1,30 e os sinais referentes aos hidrogênios metílicos, que aparecem como um multipletto, em torno de δ 0,90 (VLAHOV, 1999).

A constante de acoplamento entre os átomos de hidrogênio geminados, ligados aos carbonos sn-1 e sn-3 do glicerol, foi calculada em 11,8 Hz e as constantes entre cada um destes e o átomo de hidrogênio ligado ao carbono sn-2 do glicerol foram calculadas em 4,4 Hz e 6,0 Hz. O sinal do hidrogênio da posição sn-2 do glicerol se funde ao multipletto em δ 5,26, não tendo sido possível determinar a sua multiplicidade ou as constantes de acoplamento. Os valores calculados para as constantes de acoplamento são semelhantes aos já descritos na literatura (LIE KEN JIE e LAM, 1995a, Figura 16).

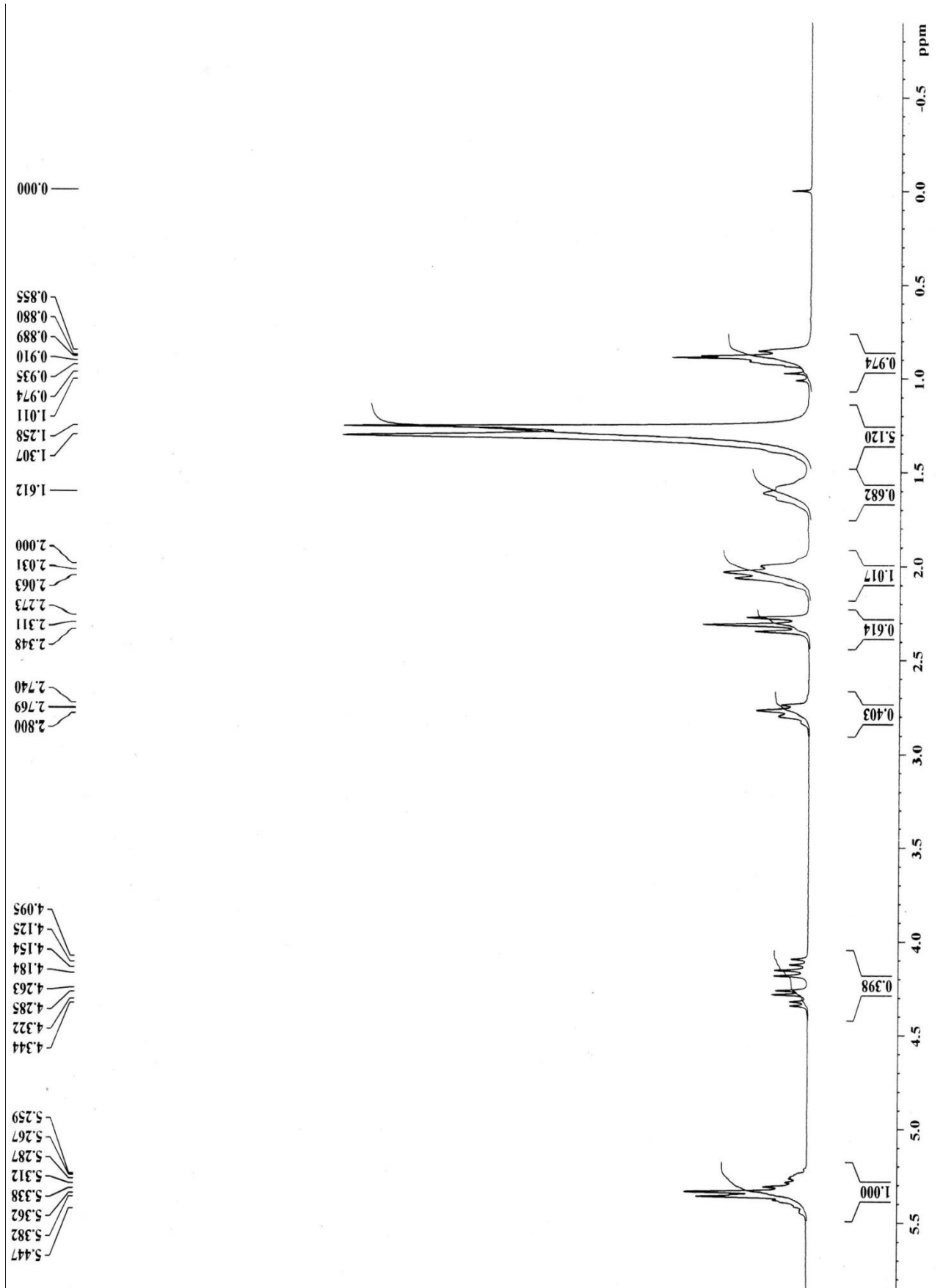
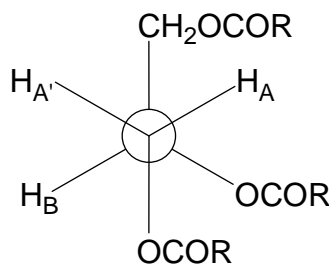


Figura 15: Espectro de RMN de ^1H do óleo de soja refinado (200 MHz, CDCl_3).



δ 4,14: dd H_A' ($J_{A'A} = 11,8$ Hz, $J_{A'B} = 6$ Hz).

δ 4,30: dd H_A ($J_{AA'} = 11,8$ Hz, $J_{AB} = 4,4$ Hz).

Figura 16: Atribuição dos deslocamentos químicos e constantes de acoplamento dos átomos de hidrogênio do glicerol em triglicerídeos, aqui mostrado na conformação mais estável (Adaptado de LIE KEN JIE e LAM, 1995a).

4.3 Transesterificações

4.3.1 Transesterificação utilizando lipase pancreática

Os experimentos empregando a lipase pancreática como catalisadora permitiram padronizar a metodologia a ser empregada nos demais experimentos. Em todos os experimentos, foi empregada relação molar, álcool / óleo, de 4:1, utilizando 8,72 g de óleo de soja (0,01 mol) e 1,6 mL de metanol ou 2,25 mL de etanol (0,04 mol de cada).

As reações foram acompanhadas por CCD de sílica, permitindo distinguir o material de partida, os ésteres metílicos produzidos, os ácidos graxos livres e monoglicerídeos. Uma dessas placas pode ser visualizada na Figura 17. Os quatro pontos aplicados na placa abaixo foram extraídos de reações feitas sob as mesmas condições.

O rendimento das reações com lipase pancreática foram determinados por CG-EM. Os resultados estão expressos na Tabela 7.

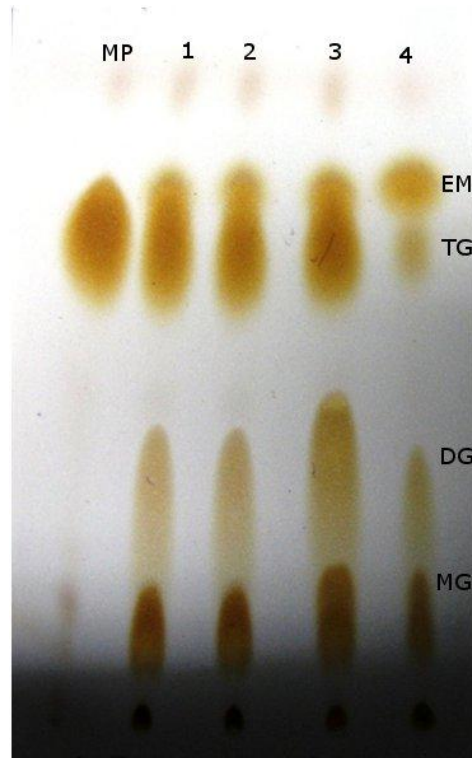


Figura 17: Placa de CCD de sílica mostrando os produtos da reação com lipase pancreática; MP (material de partida): óleo de soja; 1 a 4: reações com metanol e 100 mg/frasco; EM: ésteres metílicos; TG: triglicerídeos; DG: diglicerídeos; MG: monoglicerídeos.

Tabela 7: Rendimentos das transesterificações com lipase pancreática.

Álcool empregado	Concentração de lipase pancreática (mg/mL)	Concentração de lipase pancreática (U/mL)	Rendimento médio (% m/m)
Metanol	500	390,6	1,75
	100	78,1	2,75
Etanol	100	78,1	0,04

Shah *et al.* (2003) relataram baixos rendimentos para a transesterificação do óleo de *Jatropha* com etanol, catalisado por lipase pancreática suína, tanto na forma de enzima livre quanto imobilizada. Chattopadhyay *et al.* (2011) relatou conversão máxima de 75 a 80% com 4 h de reação, a 37 °C, empregando lipase pancreática bruta, realizando uma etapa prévia de purificação da enzima envolvendo centrifugação e liofilização do sobrenadante.

Embora esta seja uma etapa preliminar e os resultados possam ser melhorados, os baixos rendimentos podem ser atribuídos à baixa atividade lipásica (Tabela 4, página 52).

Observou-se na reação com 500 mg/mL de pó contendo lipase pancreática, a ocorrência de precipitação nos frascos, sendo esse o motivo da diminuição da concentração para 100 mg/mL. Como o rendimento da reação melhorou com a diminuição da concentração, é possível que a utilização do preparado enzimático em excesso possa prejudicar o rendimento da reação.

Os rendimentos obtidos nos experimentos com etanol foram mais baixos e, por esse motivo, os experimentos subsequentes foram feitos exclusivamente com metanol.

Selecionou-se uma das amostras de transesterificação com 100 mg/mL de pó e metanol, para análise por CLAE, a fim de se vislumbrar o perfil dos componentes da fase oleosa. A amostra selecionada, numerada como 602, apresentou o maior rendimento dentre todas, com 3,7% m/m de ésteres metílicos. O cromatograma encontra-se na Figura 18.

Observam-se, no cromatograma obtido, quatro conjuntos de picos, correspondendo aos componentes da fase oleosa. Como foi utilizada uma coluna de fase reversa (coluna apolar), a ordem de eluição observada para as classes de compostos corresponde à ordem crescente do número de cadeias (mono- < di- < triglicerídeos). Assim, os monoglicerídeos eluem primeiro, entre 2,5 e 5,0 min, tendo ocorrido co-eluição com os ácidos graxos livres. Em seguida, detectam-se os ésteres metílicos, entre 5,0 min e 7,5 min, que, assim como os anteriores, possuem apenas uma cadeia hidrocarbônica, mas não apresentam grupos polares, ficando mais retidos na coluna. Por fim, seguem-se grupos de picos referentes aos di- e triglicerídeos, dentro dos quais os picos individuais correspondem a glicerídeos, em ordem crescente de número de átomos de carbono equivalentes (HOLCAPEK *et al.*, 1999). O número de átomos de carbono equivalentes corresponde ao número de átomos de carbono da molécula menos duas vezes o número de duplas ligações.

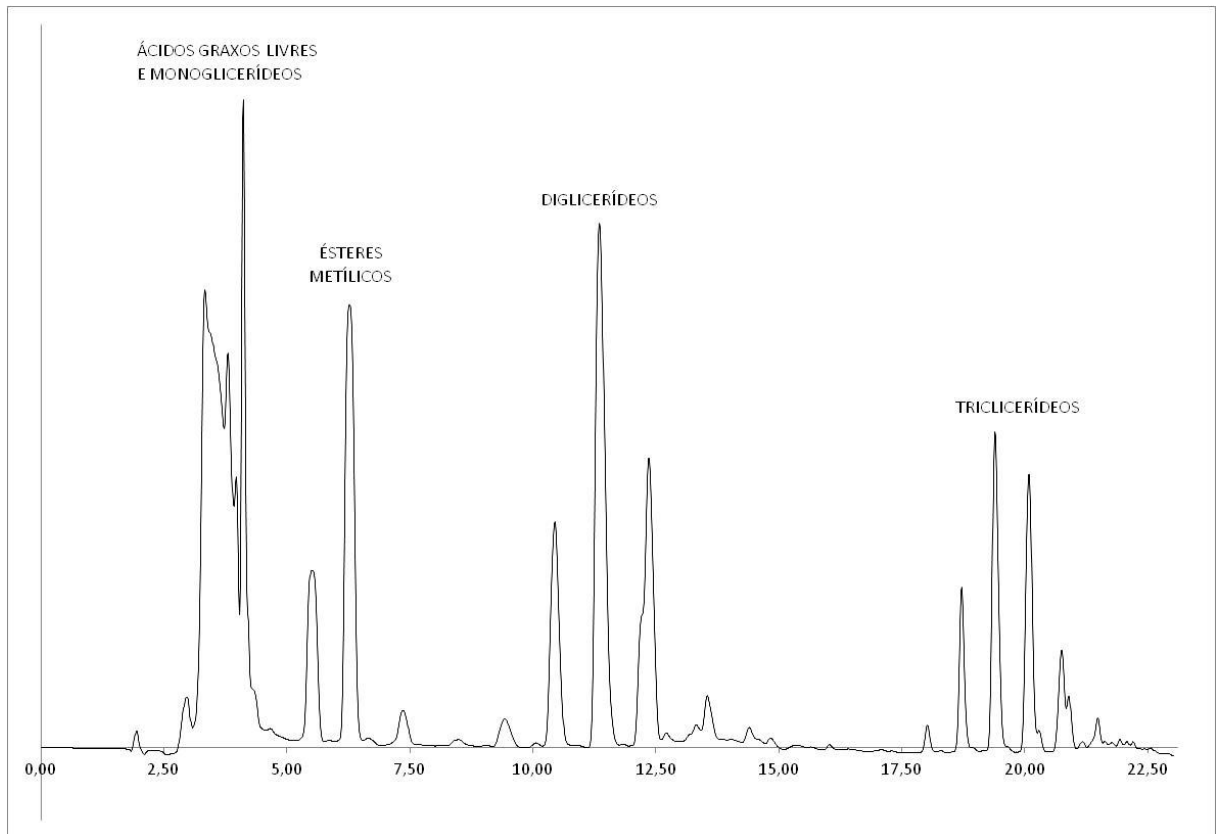


Figura 18: Cromatograma do produto de transesterificação de óleo de soja com lipase pancreática; o rendimento em ésteres metílicos, calculado para esta mesma amostra, por CG-EM, foi de 3,8 % m/m.

O perfil cromatográfico observado indica que a lipase pancreática apresenta capacidade de catalisar a transesterificação e que, provavelmente, a hidrólise está ocorrendo em extensão semelhante ou maior, dada a aparente concentração elevada de ácidos graxos livres.

Assim, através da técnica de CLAE, pode-se ter um perfil completo dos componentes das amostras de transesterificação, podendo-se avaliar a extensão da reação.

A mesma amostra acima foi analisada também por espectrometria de RMN de ^1H e de ^{13}C . Os espectros obtidos podem ser vistos nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

Observa-se no espectro de RMN de ^1H o aparecimento de um simpleto em δ 3,67, atribuído aos átomos de hidrogênio do grupo metoxila, comprovando a ocorrência da transesterificação. Observa-se um multipletto em torno de δ 4,15, feição diferente dos dois dupletos duplos observados no espectro obtido para o óleo

(Figura 15). Isto indica a presença na amostra de mono e diglicerídeos, cujos átomos de hidrogênio do glicerol apresentam deslocamentos químicos ligeiramente diferentes daqueles nos triglicerídeos. Os demais sinais são semelhantes aos observados para o óleo de soja (item 4.2.2).

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinais referentes a átomos de carbono carboxílicos registrados de δ 172,0 a δ 179,0, olefínicos de δ 127,0 a δ 132,0, átomos de carbono oxigenados de δ 51,0 a δ 70,0, metilênicos (CH_2) de δ 20,0 a δ 34,0 e metílicos (CH_3) em torno de δ 14,0 (VLAHOV, 1999). O sinal a δ 51,4 foi atribuído ao átomo de carbono da extremidade alcoólica proveniente do metanol, comprovando a formação de ésteres metílicos.

O espectro obtido permite o cálculo da conversão de triglicerídeos em ésteres metílicos, utilizando as áreas dos sinais dos átomos de hidrogênio metoxílicos e dos vizinhos à carboxila, através da Equação 16 (página 46). O valor encontrado para a amostra acima foi de 19,1% de conversão, bem superior ao valor encontrado por CG-EM, de 3,7% m/m.

A utilização de espectrometria de RMN para determinação do teor de ésteres metílicos em misturas tem sido documentada e alguns trabalhos encontraram boas correlações entre os valores obtidos por CG e RMN (KNOTHE, 2006; CHOPRA *et al.*, 2011; DIEHL e RANDEL, 2007). Neste trabalho, poucas amostras foram analisadas por RMN, mas espectros (não incluídos nesta dissertação) em que a concentração de éster metílico foi determinada em torno de 0,9% por CG-EM, não mostraram nenhum sinal ou apenas indícios muito fracos, nos espectros de RMN de ^1H , na região de δ 3,67.

Uma vez que não foram feitos outros experimentos com a lipase pancreática, priorizando-se os trabalhos com a lipase fúngica, os dados disponíveis são escassos para se tecerem comentários adicionais, a respeito da utilização deste preparado enzimático em transesterificações.

4.3.2 Delineamento experimental

Os experimentos foram realizados e as amostras obtidas foram analisadas quantitativamente por CG-EM. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.

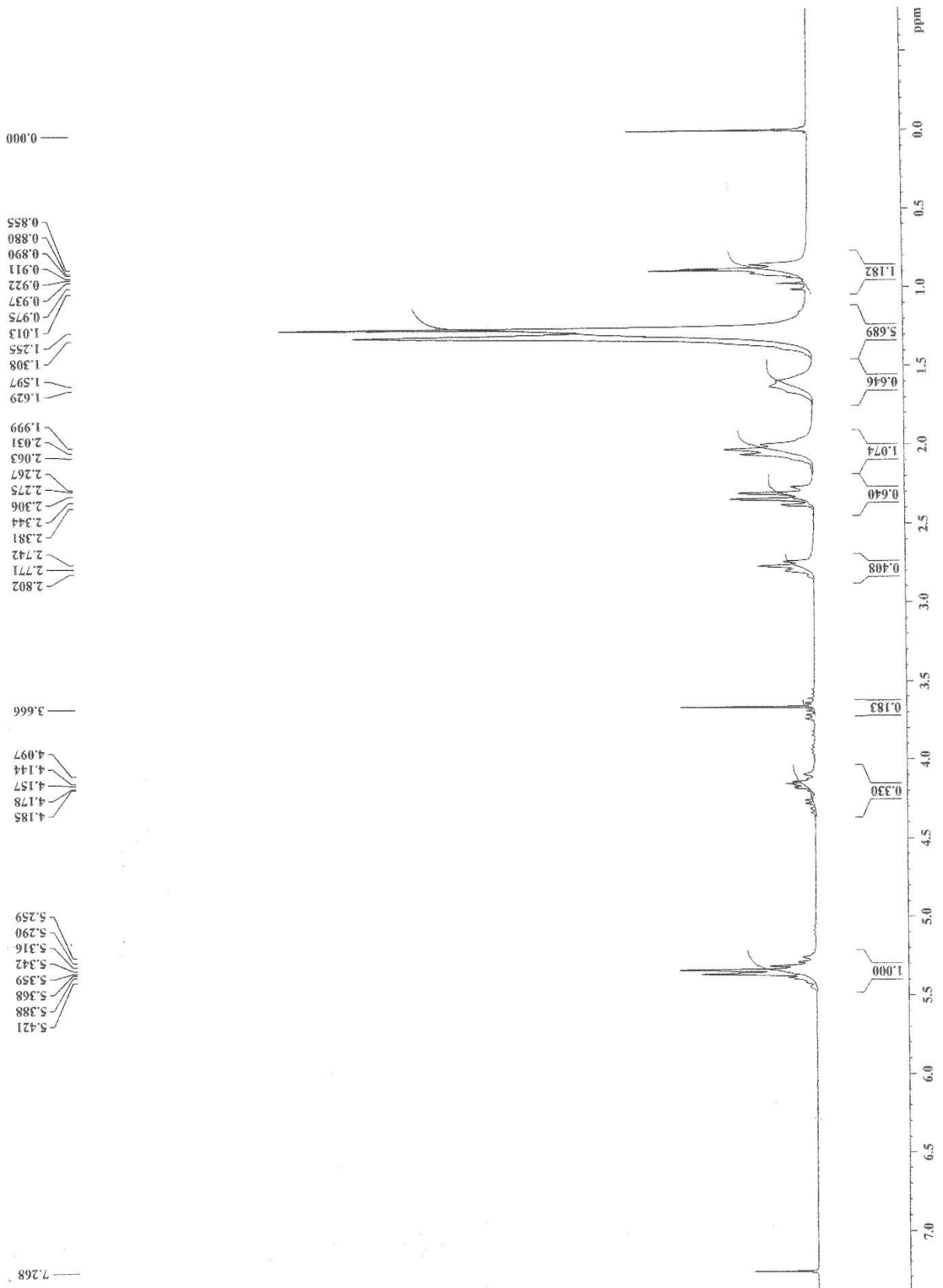


Figura 19: Espectro de RMN de ^1H do produto de transesterificação empregando lipase pancreática comercial (CDCl_3 , 200MHz).

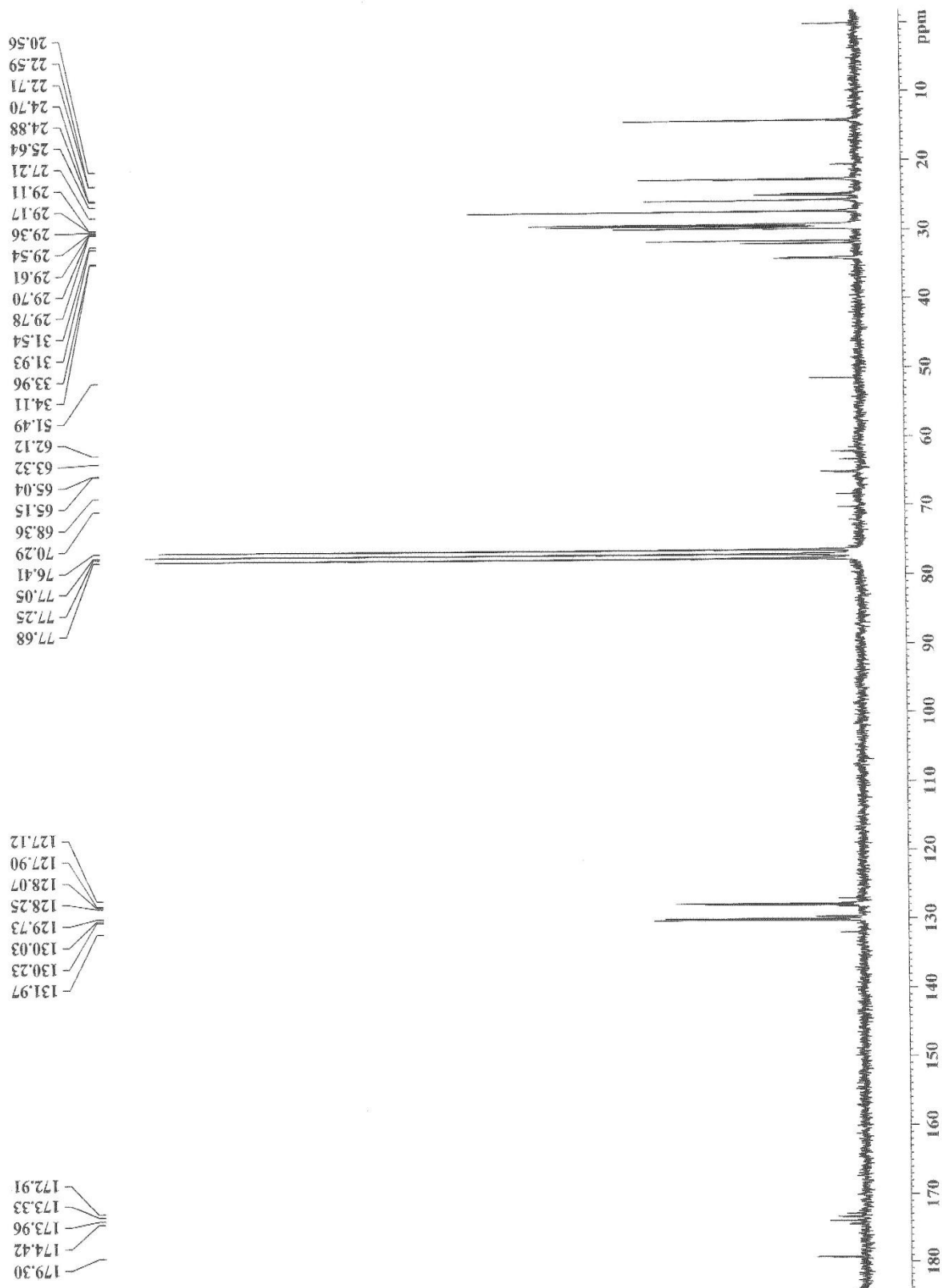


Figura 20: Espectro de RMN de ^{13}C do produto de transesterificação empregando lipase pancreática comercial (CDCl_3 , 200MHz)

Tabela 8: Rendimentos obtidos no delineamento experimental

Concentração de enzima (U/Frasco)	Relação molar metanol : óleo	Teor de ésteres metílicos (% m/m)
3,95	5,16	0,79
11,05	5,16	0,05
3,95	10,84	0,04
11,05	10,84	0,04
2,5	8	0,13
12,5	8	0,03
7,5	4	0,17
7,5	12	0,03
7,5	8	0,01
7,5	8	0,01
7,5	8	0,05

Apesar dos baixos rendimentos obtidos, ao serem comparados aos rendimentos conseguidos com a lipase pancreática (Tabela 7, página 61), o preparado de lipase fúngica apresentou-se mais ativo, quando se calcula a massa de ésteres metílicos produzidos por unidade de atividade enzimática. Com a lipase pancreática, calcula-se um rendimento máximo de 3,1 mg de éster metílico por unidade de atividade lipásica, enquanto com a lipase de *C. gloeosporioides*, obteve-se uma conversão máxima de 17,4 mg de éster por unidade de atividade lipásica.

De posse dos resultados acima, a análise estatística não apontou nenhum efeito significativo, ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$), de acordo com a Tabela 9. Assim, não foi possível estabelecer um modelo matemático para se estimar as condições ótimas para as variáveis estudadas.

4.3.3 Determinação da faixa de trabalho com preparado de lipase fúngica

Utilizando metanol como receptor de acila, foram obtidos os resultados expressos na Tabela 10 e esquematizados na Figura 21. Os cromatogramas CG-EM de todas as amostras podem ser encontrados no Apêndice A.

Tabela 9: Efeitos observados nas variáveis concentração de enzima e relação molar, no delineamento experimental executado (Elaborada com auxílio do programa Statistica 7.0, Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA)

Fator	Efeito	Desvio padrão	t (5)	p	- 95% LC	+ 95% LC	Coefficiente	Desvio padrão do coeficiente	- 95% LC	+ 95% LC
Média / Intercepto	0,000259	0,000908	0,28558	0,786650	-0,002074	0,002592	0,000259	0,000908	-0,002074	0,002592
Concentração de enzima (L)	-0,002213	0,001114	-1,98692	0,103657	-0,005076	0,000650	-0,001107	0,000557	-0,002538	0,000325
Concentração de enzima (Q)	0,001239	0,001330	0,93120	0,394490	-0,002181	0,004659	0,000619	0,000665	-0,001090	0,002329
Relação molar (L)	-0,002383	0,001114	-2,13922	0,085402	-0,005246	0,000480	-0,001191	0,000557	-0,002623	0,000240
Relação molar (Q)	0,001498	0,001330	1,12623	0,311200	-0,001921	0,004918	0,000749	0,000665	-0,000961	0,002459
Concentração de enzima (L) X Relação molar (L)	0,003726	0,001572	2,36998	0,063954	-0,000315	0,007767	0,001863	0,000786	-0,000158	0,003883

(Nota: L – linear; Q – quadrático; LC – limite de confiança)

Tabela 10 – Rendimento das transesterificações com metanol, na determinação da faixa de trabalho

Concentração de enzima (U / frasco)	Relação molar álcool / óleo	Rendimento (% m/m)		
		24h	48h	72h
0,05	4:1	0,01	0,03	0,04
	8:1	0,02	0,03	0,03
	12:1	0,01	0,04	0,03
2,5	4:1	0,28	0,40	0,90
	8:1	0,03	0,05	0,05
	12:1	0,02	0,03	0,03
12,5	4:1	0,15	0,21	0,33
	8:1	0,03	0,05	0,01
	12:1	0,02	0,03	0,01

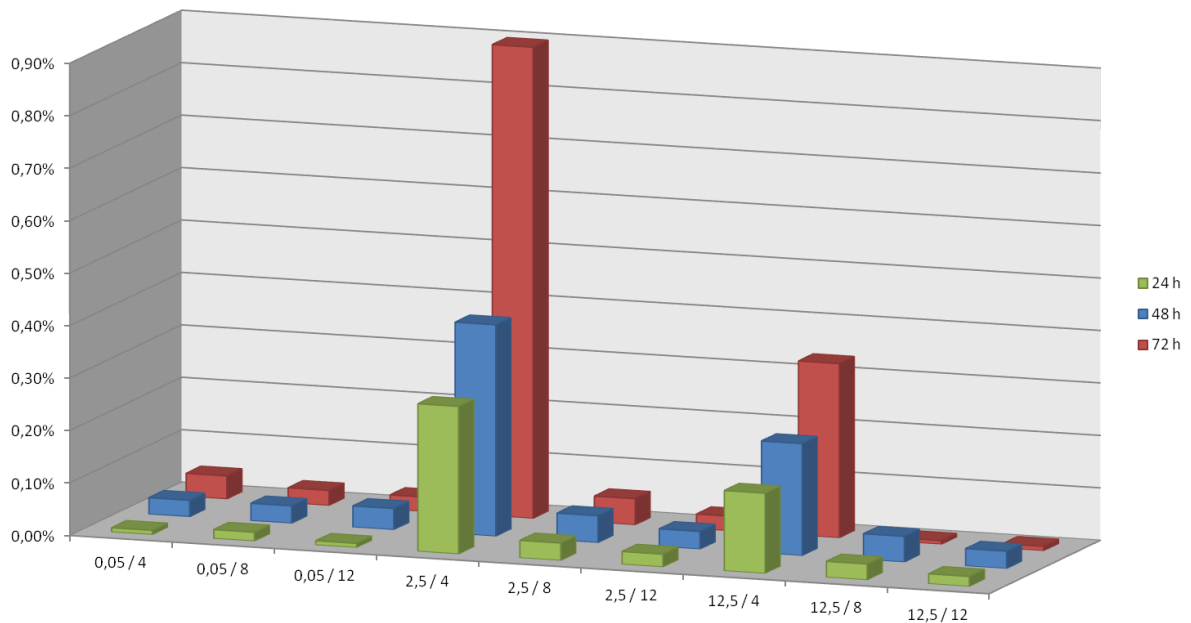


Figura 21 – Rendimentos obtidos nas transesterificações para determinação da faixa de trabalho, usando metanol como receptor de acila

Os maiores rendimentos foram obtidos com a concentração de 2,5 U e com a relação molar álcool / óleo de 4:1, destacando-se também os rendimentos obtidos com 12,5 U e relação 4:1. Os demais experimentos apresentaram rendimentos comparativamente baixos.

Dessa maneira, o experimento mostrou uma faixa de concentrações de enzima, próxima a 2,5 U por frasco, que conduz a melhores rendimentos, nas condições testadas. O rendimento específico foi de 31,4 mg de éster metílico por unidade de atividade lipásica.

Da mesma forma, os resultados sinalizam que o emprego de metanol em grande excesso estequiométrico (razão molar igual ou superior a 8:1 relativa ao óleo) leva a rendimentos mais baixos, possivelmente por inativação da enzima, sendo que este efeito encontra-se relatado na literatura (WATANABE *et al.*, 1999; KAIEDA *et al.*, 1999).

Quanto aos rendimentos obtidos, Chen X. *et al.* (2008) relataram rendimentos baixos, semelhantes aos descritos (0,936% m/m), obtidos na transesterificação catalisada por lipase NS81006, produzida por uma cepa de *Aspergillus oryzae* geneticamente modificada. Shah *et al.* (2003) também relataram rendimentos baixos com lipase pancreática suína e lipase de *Candida antarctica*, ambas obtidas comercialmente.

Por outro lado, Kamini e Iefuji (2001) trabalharam com lipase bruta de *Cryptococcus spp.* S-2, realizando purificação por ultrafiltração em disco com poros de 10 kDa, obtiveram rendimentos bem mais elevados, chegando a 80,2% m/m, com relação molar 4:1 (álcool : óleo), 80 % m/m de água, 2000 U de lipase bruta, tempo total de 120 h e temperatura de 30 °C.

Em face destes relatos, é importante salientar que a lipase de *C. gloeosporioides* apresentou potencial para utilização em transesterificação, atribuindo-se o baixo rendimento obtido à concentração de lipase muito baixa.

4.3.4 Avaliação da adição de água

Para avaliar o efeito da adição de água, foram feitos experimentos empregando as melhores condições determinadas no experimento anterior, ou seja, 2,5 U de enzima por frasco e relação molar metanol : óleo de 4:1.

As análises dos experimentos com diferentes quantidades de água adicionada aos frascos, depois de calculadas as médias das duas reações, tiveram os resultados mostrados na Tabela 11.

Tabela 11: Rendimentos de acordo com a quantidade total de água adicionada

Água adicionada (% m/m óleo)	Rendimento (% m/m)
5,7	0,004
11,5	0,028
22,9	0,587
45,9	0,968
68,8	0,030
91,7	0,032
Controle (5,7)	0,000
Controle (45,9)	0,011

Estes experimentos foram feitos com o segundo preparado liofilizado de lipase fúngica, que apresentou atividade maior que o primeiro preparado (Tabela 4). Sendo assim, para se manter a mesma atividade lipásica, as massas de preparado adicionadas a cada frasco foram reduzidas. De alguma maneira, isso pode ter influenciado no resultado dos experimentos, pois verificou-se que, nas mesmas condições anteriores (com 11,5% de água), o rendimento foi de apenas 0,028%, contra 0,9% obtido no item anterior. Ao menos, rendimento semelhante a este foi obtido quando se utilizou 45,9% de água, levando ao rendimento específico mais alto obtido, de 33,76 mg de éster por unidade de atividade enzimática.

Assim, os resultados sugerem que a quantidade ideal de água a ser adicionada é de aproximadamente 4 mL, correspondendo a 45,9% da massa do óleo. A quantidade de água influencia a formação da interface óleo – água, podendo levar ao aumento da atividade da lipase uma vez que a maioria das lipases são ativas somente em tal interface (TONGBORIBOON *et al.*, 2010; AL-ZUHAIR, 2007). Entretanto, o excesso de água pode estimular também a hidrólise, que compete com a transesterificação, levando a maior produção de ácidos graxos livres e reduzindo o rendimento em biodiesel.

4.3.5 Avaliação da adição fracionada de metanol

Os experimentos foram conduzidos nas condições que produziram os melhores resultados: 2,5 U de atividade enzimática e 4 mL de água total, tendo sido adicionado o metanol em três etapas, nas condições descritas no item 3.5.4. Os resultados estão sumarizados na Tabela 12 e ilustrados na Figura 22.

Os resultados não mostram uma tendência definida para a adição fracionada. Com 24 h de reação, o melhor resultado foi obtido com a proporção de 1:1, com 48 h foi obtido o melhor rendimento com proporção de 4:1 e, ao final do experimento, observaram-se rendimentos maiores com adição de 3:1.

Tabela 12: Rendimentos da adição fracionada de metanol

Metanol adicionado	1:1	2:1	3:1	4:1
Tempo	(% m / m)			
24 h	0,184	0,027	0,017	0,112
48 h	0,463	0,158	0,295	0,939
72 h	0,265	0,208	0,455	0,437

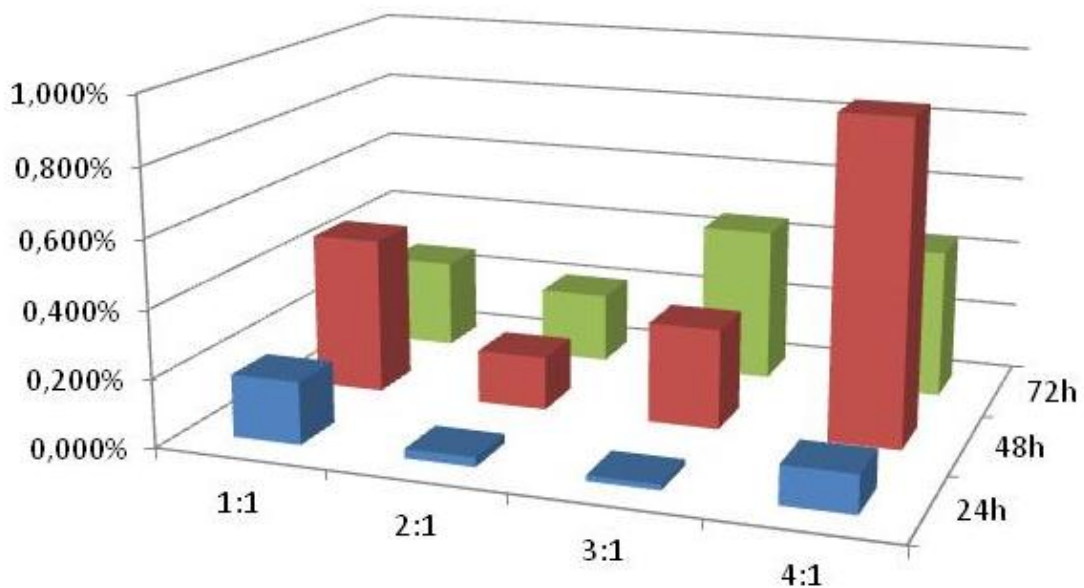


Fig. 22: Rendimentos da adição fracionada de metanol

No entanto, foram observados dois resultados anômalos, uma vez que o rendimento da reação diminuiu de 48 h para 72 h, com as proporções de 4:1 e 1:1.

O melhor rendimento obtido permaneceu em torno de 0,9%, como nos experimentos anteriores, o que leva a crer que não houve vantagem significativa na adição fracionada do álcool.

4.3.6 Adição de solvente

Nas duas condições testadas, os rendimentos foram iguais, ambos de 2,1% m/m de éster metílico, sendo estes os rendimentos mais altos obtidos com a lipase fúngica e próximos aos obtidos com a lipase pancreática.

Além da presença do solvente, que melhora a solubilidade do metanol no óleo, a elevação do rendimento pode ter sido também decorrente da maior concentração de atividade lipásica empregada. O rendimento específico foi de 6,1 mg de éster por unidade de atividade enzimática, bem inferior ao máximo obtido, de 33,76 mg por unidade.

Dessa forma, os resultados indicam que soluções mais diluídas do preparado enzimático apresentam maior atividade específica, mas, levam a menores rendimentos, em termos absolutos. Para contornar este problema e obter rendimentos mais altos, uma alternativa seria diminuir a quantidade de óleo, mantendo-se inalteradas a relação molar álcool : óleo, a quantidade de enzima e a quantidade de água adicionada.

Se o rendimento específico for mantido, poder-se-ia supor um rendimento quase quantitativo partindo-se de uma massa de 84,4 mg de óleo. Trata-se de uma massa muito pequena, não sendo uma metodologia atraente sob o ponto de vista prático, além do que não haveria meios para proporcionar uma agitação eficiente para o sistema.

4.3.7 Análises dos produtos de transesterificação com lipase fúngica, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi analisada amostra do experimento para avaliação da adição de solvente (item 4.3.6) por CLAE, buscando caracterizar os componentes da fase oleosa. Tal amostra (com 8 mL de hexano e 39,6 U de lipase) foi selecionada por ter

apresentado o maior rendimento, dentre as reações com lipase fúngica, no presente trabalho. O cromatograma é apresentado na Figura 23.

Observam-se três picos correspondendo a ésteres metílicos, entre 5,0 e 7,5 min, além da presença do material de partida, mono- e diglicerídeos, e ácidos graxos livres. Este perfil é semelhante ao descrito no item 4.3.1.

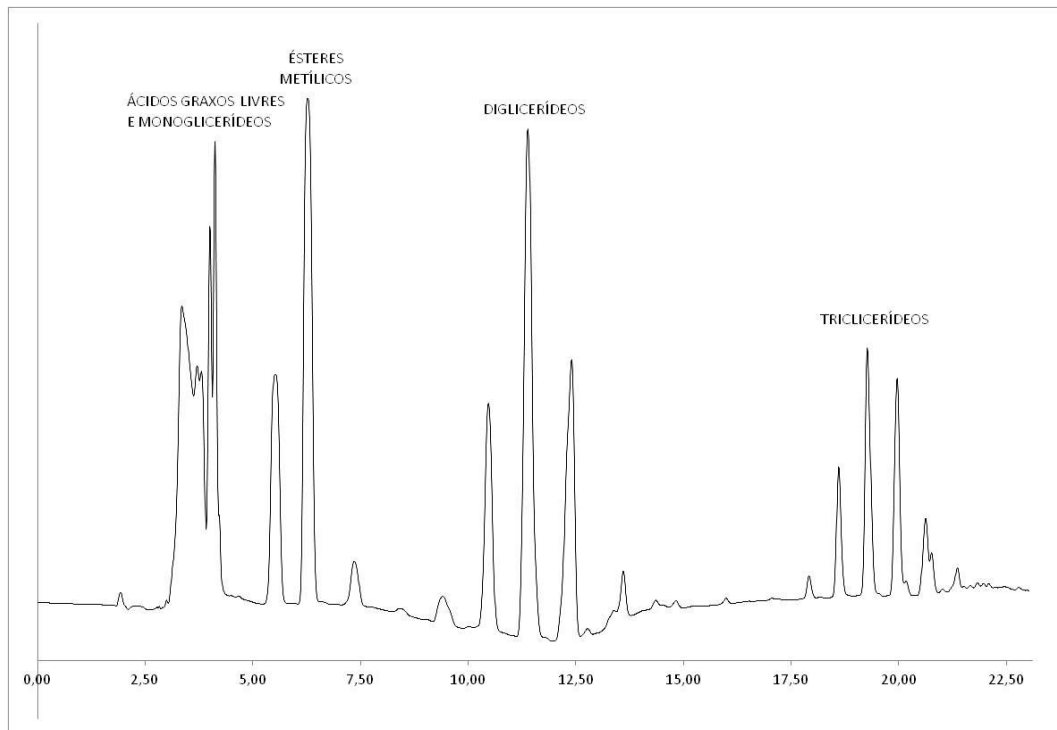


Figura 23: Cromatograma do produto de transesterificação na avaliação da adição de hexano.

4.3.8 Análise dos produtos da transesterificação com lipase fúngica por espectrometria de RMN de ^1H e de ^{13}C

A mesma amostra anterior foi selecionada para análise por espectrometria de RMN. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C são apresentados nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

Ambos os espectros mostraram sinais típicos de triglicerídeos. O espectro de RMN de ^1H foi semelhante ao descrito para os espectros do produto de transesterificação com lipase pancreática, conforme descrito no item 4.3.1. Os espectros confirmam a produção de ésteres metílicos, observando-se a presença de

um simpleto em δ 3,67, no espectro de ^1H . O espectro de RMN de ^{13}C mostra-se semelhante ao descrito no mesmo item e o sinal do carbono metoxílico em δ 51,4 indica a presença de ésteres metílicos na amostra.

O cálculo da conversão de triglicerídeos em ésteres metílicos, utilizando as áreas dos sinais dos átomos de hidrogênio metoxílicos e dos vizinhos à carboxila, utilizando a Equação 15, fornece um valor de 34,8% de conversão. Observa-se uma grande discrepância entre este valor e o teor de ésteres, obtido por CG-MS, que foi de 2,13%. Neste caso, a discrepância foi ainda maior do que a observada com a amostra obtida dos experimentos com lipase pancreática (item 4.3.1).

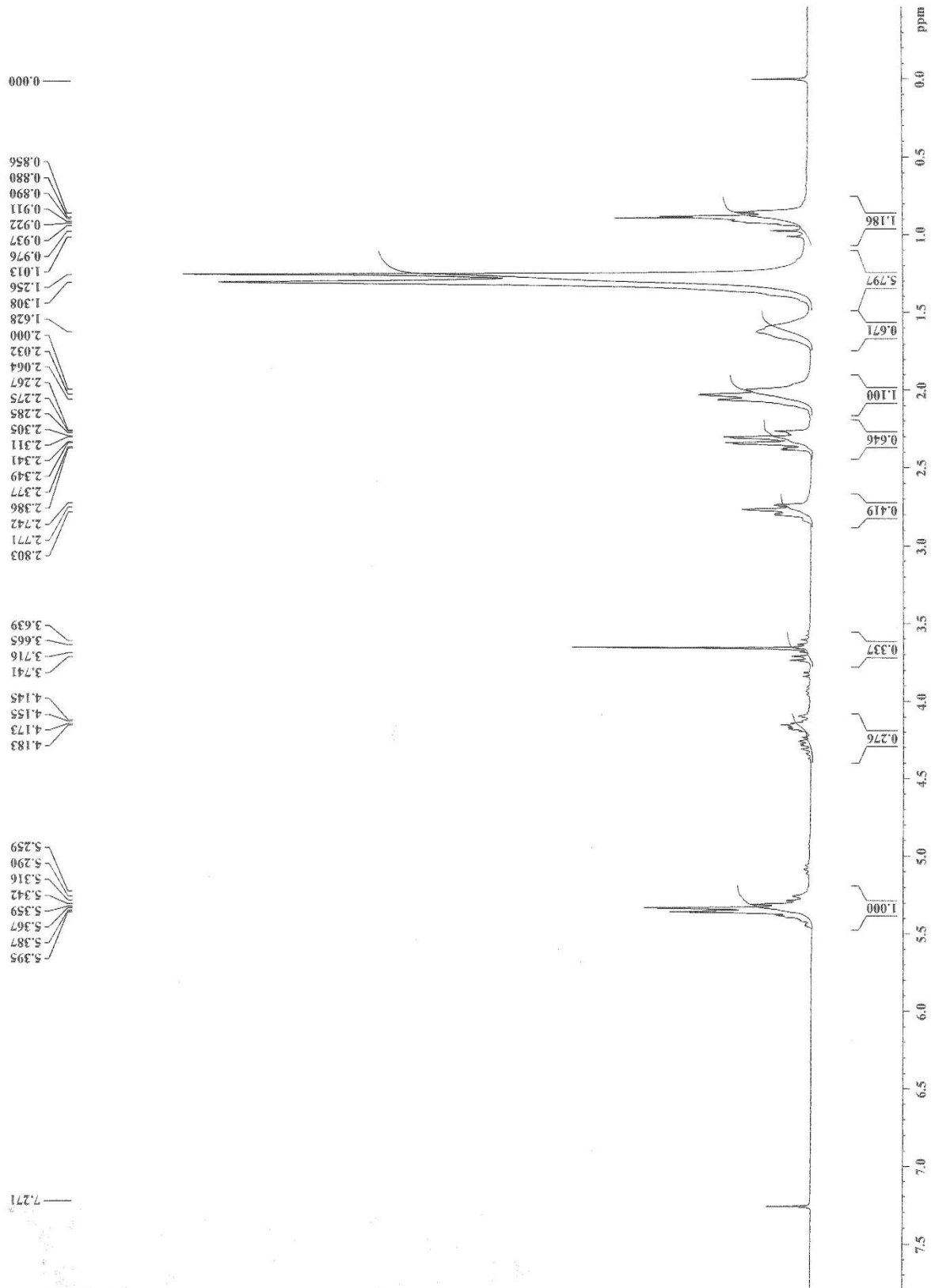


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H do produto de transesterificação com lipase fúngica (200 MHz, CDCl_3)

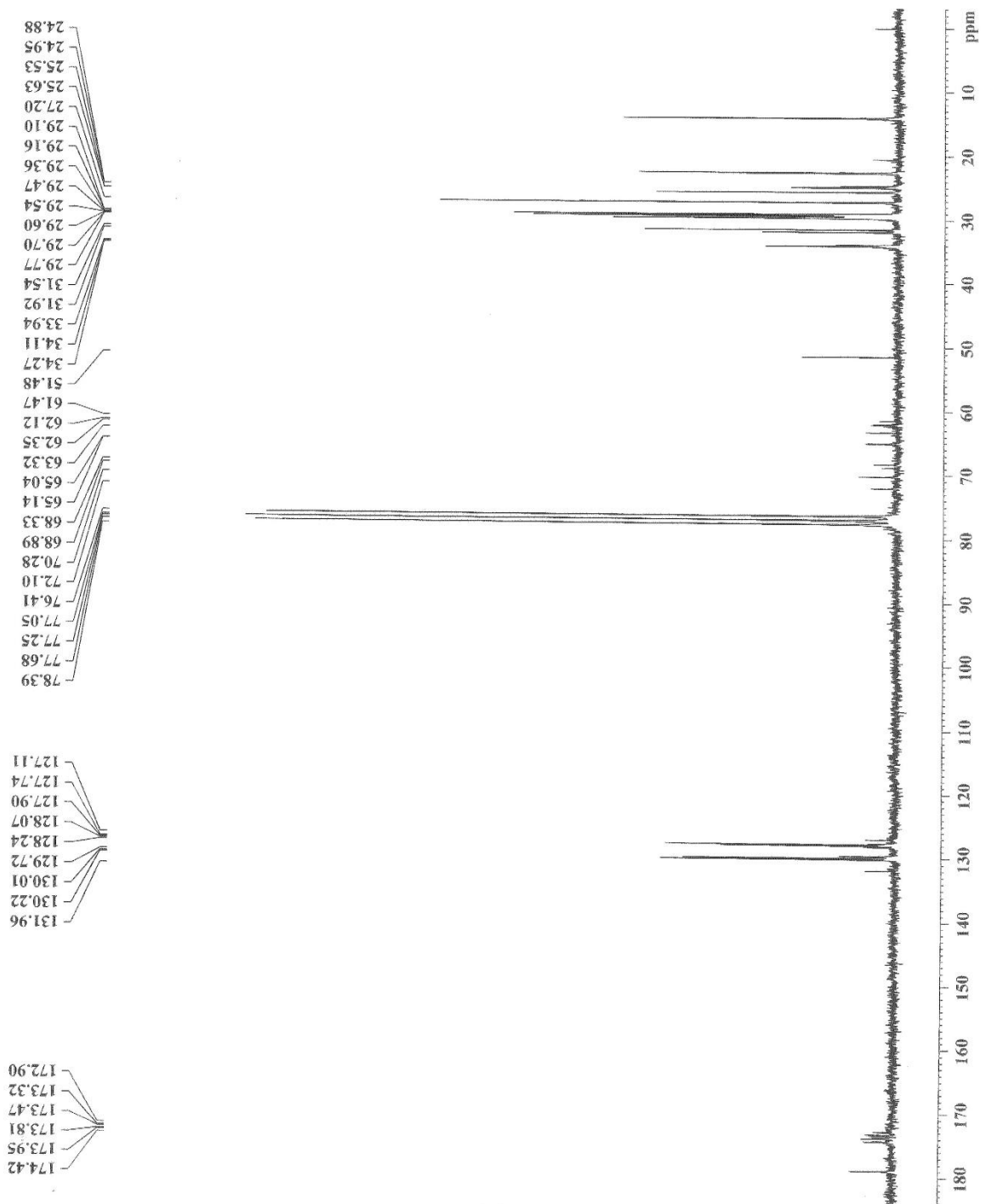


Figura 25: Espectro de RMN de ^{13}C do produto de transesterificação com lipase fúngica (200 MHz, CDCl_3).

5 CONCLUSÕES

O trabalho permitiu obter preparados com atividade lipásica, a partir de cultivos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. A atividade dos preparados obtidos foi avaliada, em testes de hidrólise, mas mostraram atividade baixa comparada com trabalhos prévios empregando a mesma cepa.

Os preparados obtidos foram empregados em transesterificação com óleo de soja refinado e alcoóis metanol e etanol. Comprovou-se a obtenção de ésteres metílicos e etílicos pelas análises por CG-EM e espectrometria de RMN.

A quantificação dos teores de ésteres metílicos obtidos nos diversos experimentos foi feita por análises por CG-EM, empregando a técnica de monitoramento seletivo de íons.

Análises por CG-EM auxiliaram a escolha do óleo de soja empregado na transesterificação. Foram obtidos óleos brutos a partir de grão de soja, pelos métodos de extração por percolação e no extrator de Soxhlet. Estes foram comparados com o óleo de soja refinado comestível. Pelas diferenças na composição e pela disponibilidade, decidiu-se empregar somente o óleo de soja refinado.

Foi empregada uma preparação comercial de lipase pancreática para estabelecer a metodologia de transesterificação, estabelecendo-se procedimentos para o preparo da solução contendo enzima e parâmetros para a concentração do preparado e quantidade de substrato. Foram obtidos ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos e decidiu-se empregar somente metanol, visto que as transesterificações com este álcool apresentaram rendimentos maiores que os obtidos com etanol.

Foram feitos ensaios para determinar os fatores que influenciavam a transesterificação com a lipase fúngica. Elaborou-se um planejamento experimental para os fatores concentração de enzima e relação molar álcool / óleo, cujos resultados não mostraram efeitos significativos destes parâmetros no teor de ésteres metílicos obtido. Estes fatores e, ainda, a quantidade de água, a adição fracionada de álcool e a presença de um solvente no frasco reacional foram avaliados individualmente.

O maior rendimento, de 2,13% m/m de ésteres metílicos, foi obtido quando se empregou uma concentração de enzima de 30,6 U/mL, relação molar álcool / óleo de 4:1, quantidade total de água 45,9% m/m em relação à massa de óleo e adição de 2 mL de hexano. Entretanto, análises por espectrometria de RMN de ^1H sugerem que o rendimento foi mais elevado, estando em torno de 35%.

5.1 Perspectivas

O objetivo inicial deste trabalho foi a produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos vegetais. Embora o rendimento máximo alcançado tenha sido baixo para este propósito, não foram esgotadas as possibilidades de aprimoramento da transesterificação, podendo ser consideradas alterações na metodologia empregada, especialmente, para melhorar a atividade lipásica do preparado e utilizar menores volumes de óleo.

Além disso, novas aplicações da lipase de *C. gloeosporioides* podem ser pesquisadas, aproveitando-se as metodologias de análise descritas neste trabalho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (2008) Resolução N.º 7, de 19 de março de 2008. *Diário Oficial da União*. Brasília, 20 de março de 2008.
- AKOH, C. C., CHANG, S., LEE, G., SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**, 55 (22), 8997-9008.
- AL-ZUHAIR, S., The effect of substrate concentrations on the production of biodiesel by lipase-catalysed transesterification of vegetable oils. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **2006**, 81 (3), 299-305.
- AL-ZUHAIR, S., Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*. **2007**, 1 (1), 57-66.
- AL-ZUHAIR, S.; JAYARAMAN, K.; KRISHNAN, S.; CHAN, W., The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. *Biochemical Engineering Journal*. **2006**, 30 (2), 212-217.
- ANTCZAK, M. S., KUBIAK, A., ANTCZAK, T., BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*. **2009**, 34, 1185-1194.
- APOSTOLAKOU, A. A., KOOKOS, I. K., MARAZIOTI, C., ANGELOPOULOS, K. C., Techno-economic analysis of a biodiesel production process from vegetable oils. *Fuel Processing Technology*. **2009**, 90, 1023-1031.
- AZOCAR, L.; CIUDAD, G.; HEIPIEPER, H.; MUNOZ, R.; NAVIA, R., Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **2010**, 109 (6), 609-614.
- BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P.; MEHROTRA, R., Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. **2010**, 62 (1), 9-14.

- BALAJI, V., EBENEZER, P. Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation. *Indian Journal of Science and Technology*. **2008**, 1 (7), 1-8.
- BISEN, P. S., SANODIYA, B. S., THAKUR, G. S., BAGHEL, R. K., PRASAD, G. B. K. S. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnology Letters*. **2010**. 32 (8), 1019-1030.
- BODEN, T.A., G. MARLAND, AND R.J. ANDRES. **2010**. Global, Regional, and National Fossil-Fuel CO₂ Emissions. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tenn., U.S.A. <doi 10.3334/CDIAC/00001_V2010>
- BONATO, E. R., BERTAGNOLLI, P. F., LANGE, C. E., RUBIN, S. A. L. Teor de óleo e de proteína em genótipos de soja desenvolvidos após 1990. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **2000**, 35, 12, 2391-2398.
- BRASIL. (2005) Lei No 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 14 de janeiro de 2005.
- CALABRO, V.; RICCA, E.; DE PAOLA, M.; CURCIO, S.; IORIO, G., Kinetics of enzymatic trans-esterification of glycerides for biodiesel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **2010**, 33 (6), 701-710.
- CHANG, C., CHEN, J. CHANG, C. J., WU, T., SHIEH, C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by isopropanolysis in a continuous packed-bed reactor using response surface methodology. *New Biotechnology*. **2009**, 26 (3/4), 187-192
- CHATTOPADHYAY, S., KAREMORE, A., DAS, S., DEYSARKAR, A., SEM, R. Biocatalytic production of biodiesel from cottonseed oil: Standardization of process parameters and comparison of fuel characteristics. *Applied Energy*. **2011**, 88, 1251-1256.

- CHAVES, M. H., BARBOSA, A. S., NETO, J. M. M. Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St. Hil. Et Naud. *Química Nova*. **2004**, 27, 3, 404-408.
- CHEIRSILP, B., KITTIKUN, A. H., LIMKATANYU, S. Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. *Biochemical Bioengineering Journal*. **2008**, 42, 261-269.
- CHEN, J., LIN, G. Optimization of Biodiesel Production Catalyzed by Fungus Cells Immobilized in Fibrous Supports. *Applied Biochemistry Biotechnology*. **2010**, 161, 181-194.
- CHEN, X.; DU, W.; LIU, D.; DING, F., Lipase-mediated methanolysis of soybean oils for biodiesel production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2008**, 83 (1), 71-76.
- CHOPRA, A., TEWARI, A. K., VATSALA, S., KUMAR, R., SARPAL, A. S., BASU, B. Determination of Polyunsaturated Fatty Esters (PUFA) in Biodiesel by GC/GC-MS and ¹H-NMR Techniques. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **2011**, 88, 1285-1296.
- COLEN, G. *Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais. **2006**. 206p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World J. Microb. Biotech.* **2006**, 22, p. 881-885.
- D'AGOSTINI, D., GIOIELLI, L. A. Distribuição estereoespecífica de lipídeos estruturados a partir de gordura de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **2002**, 38 (3), 345-354.
- DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Progress in Energy and Combustion Science*. **2005**, 31, 466-487.
- DEMIRKOL, S.; AKSOY, H.; TUTER, M.; USTUN, G.; SASMAZ, D., Optimization of enzymatic methanolysis of soybean oil by response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **2006**, 83 (11), 929-932.

- DIEHL, B., RANDEL, G. Analysis of biodiesel, diesel and gasoline by NMR spectroscopy – A quick and robust alternative to NIR and GC. *Lipid Technology*. **2007**, 19, 11, 258-260.
- DIZGE, N.; KESKINLER, B., Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass & Bioenergy* **2008**, 32 (12), 1274-1278.
- DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A., Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*. **2002**, 30 (1), 90-94.
- DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J., Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. **2004**, 30 (3-4), 125-129.
- DU, W.; LI, W.; SUN, T.; CHEN, X.; LIU, D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2008**, 79 (3), 331–337.
- FARIA, L.A. *Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de Colletotrichum gloeosporioides produzida por fermentação em substrato líquido*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais. **2010**. 145p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- FARIA, R. C. M., REZENDE, M. J. C., REZENDE, C. M., PINTO, A. C. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel: diesel utilizando cromatografia gasosa – espectrometria de massas. *Quimica Nova*. **2007**, 30, 8, 1900-1905.
- FJERBAEK, L., CHRISTENSEN, K. V., NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*. **2009**, 102 (5), 1295-1315.
- FREEDMAN, B., BUTTERFIELD, R. O., PRYDE, E. H. Transesterification kinetics of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **1986**, 63, 10, 1375-1380a.
- FREEDMAN, B., KWOLEK, W. F., PRYDE, E. H. Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capillary gas chromatography. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **1986**, 63, 10, 1370-1375b.

- FREITAS, L., DA RÓS, P. C. M., SANTOS, J. C., CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interesterification of babassu oil (*Orbinya sp.*). *Process Biochemistry*. **2009**, *44*, 1068-1074a.
- FREITAS, L., SANTOS, J. C., BARCZA, M. V., CASTRO, H. F. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel: síntese enzimática de monolaurina por esterificação. *Química Nova*. **2009**, *32* (9), 2277-2281b.
- FU, B.; VASUDEVAN, P., Effect of Solvent-Co-solvent Mixtures on Lipase-Catalyzed Transesterification of Canola Oil. *Energy & Fuels*. **2010**, *24*, 4646-4651.
- GERIS, R., SANTOS, N. A. C., AMARAL, B. A., MAIA, I. S., CASTRO, V. D., CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja – Reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Química Nova*. **2007**. *30*, 5, 1369-1373.
- GOG, A.; ROMAN, M.; TOSA, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. *Renewable Energy*. **2012**, *39* (1), 10-16.
- GOH, S.; YEONG, S.; WANG, C., Transesterification of cocoa butter by fungal lipases – Effect of solvent on 1,3-specificity. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **1993**, *70* (6), 567-570.
- GUARIEIRO, L. L. N., PINTO, A. C., AGUIAR, P. F., RIBEIRO, N. M. Metodologia analítica para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel : diesel utilizando espectrometria na região do infravermelho. *Química Nova*. **2008**, *31*, 2, 421-426.
- HA, S.; LAN, M.; LEE, S.; HWANG, S.; KOO, Y., Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology*. **2007**, *41* (4), 480-483.
- HAJAR, M., SHOKROLLAHZADEH, S., VAHABZADEH, F., MONAZZAMI, A., Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. *Enzyme and Microbial Technology*. **2009**, *45*, 188–194.

- HANSEN, J., SATO, M., RUEDY, R., LO, K., LEA, D. W., MEDINA-ELIZADE, M. Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2006**, *103*, 39, 14288-14293.
- HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. **2006**, *39*, 235-251.
- HAUFF, S., VETTER, W. Quantitation of cis- and trans- monounsaturated fatty acids in dairy products and cod liver oil by mass spectrometry in the selected ion monitoring mode. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2009**, *57*, 3423-3430.
- HEGERL, G.C., F. W. ZWIERS, P. BRACONNOT, N.P. GILLETT, Y. LUO, J.A. MARENGO ORSINI, N. NICHOLLS, J.E. PENNER AND P.A. STOTT. Understanding and Attributing Climate Change. *In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, **2007**.
- HE, Q., XU, Y., TENG, Y., WANG, D. Biodiesel production catalysed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. *Chinese Journal of Catalysis*. **2008**, *29* (1), 41-46.
- HEJAZI, L., EBRAHIMI, D., GUILHAUS, M., HIBBERT, D. B. Determination of the composition of fatty acid mixtures using GC x FI-MS: A comprehensive two-dimensional separation approach. *Analytical Chemistry*. **2009**, *81*, 1450–1458.
- HOLCAPEK, M., JANDERA, P., FISCHER, J., PROKES, B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high performance liquid chromatography with various detection methods. *Journal of Chromatography A*. **1999**, *858*, 13–31.
- HOUDE, A., KADEMI, A., LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **2004**, *118*, 155-170.
- HSU, A., JONES, K. C., FOGLIA, T. A., MARMER, W. N. Continuous production of ethyl esters of grease using na immobilized lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **2004**, *81* (8), 749-752.

- HUANG, Y.; ZHENG, H.; YAN, Y., Optimization of Lipase-Catalyzed Transesterification of Lard for Biodiesel Production Using Response Surface Methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **2010**, 160 (2), 504-515.
- HWANG, S., CHOI, C.Y., LEE, E. Y. Bio- and chemo-catalytic preparations of chiral epoxides. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. **2010**, 16, 1-6.
- IBETO, C. N., OFOEFULE, A. U., EZUGWU, H. C. Analytical methods for quality assessment of biodiesel from animal and vegetable oils. *Trends in Applied Sciences Research*. **2011**, 6, 6, 537-553.
- JEON, D.; YEOM, S., Comparison of methods for preventing methanol inhibition in enzymatic production of biodiesel. *Korean Journal of Chemical Engineering*. **2011**, 28 (6), 1420-1426.
- JEONG, G.; PARK, D., Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert-butanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **2008**, 148 (1-3), 131-139.
- JONES, P. D., WIGLEY, T. M. L., WRIGHT, P. B. Global temperature variations between 1861 and 1984. *Nature*. **1986**, 322, 430-434
- KAIEDA, M., SAMUKAWA, T., MATSUMOTO, T., BAN, K., KONDO, A., SHIMADA, Y., NODA, H., NOMOTO, F., OHTSUKA, K., IZUMOTO, E., FUKUDA, H. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **1999**, 88 (6), 627-631.
- KAIEDA, M., SAMUKAWA, T., KONDO, A., FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **2001**, 91 (1), 12-15.
- KAMINI, N. R., FUJII, T., KUROSU, T., IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*. **2000**, 36, 317-324.
- KAMINI, N. R., IEFUJI, H. Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by *Cryptococcus* spp. S-2. *Process Biochemistry*. **2001**, 37, 405-410.

- KINCS, F.R. Meat fat formulation. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **1985**, 62 (4) 815-818,.
- KNOTHE, G. Rapid monitoring of transesterification and assessing biodiesel fuel quality by near-infrared spectroscopy using a fiber-optic probe. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **1999**, 76, 7, 795-800.
- KNOTHE, G. Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*. **2001**, 44, 21, 193-200.
- KNOTHE, G. Analyzing biodiesel: standards and other methods. . *Journal of the American Oil Chemists Society*. **2006**, 83, 10, 823-833.
- KOSE, O.; TUTER, M.; AKSOY, H., Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresource Technology*. **2002**, 83 (2), 125-129.
- KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V.; BANERJEE, R., Enzymatic transesterification of *Jatropha* oil. *Biotechnology For Biofuels*. **2009**, 2.
- LAI, C.; ZULLAIKAH, S.; VALI, S.; JU, Y., Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **2005**, 80 (3), 331-337.
- LEE, J, KIM, S. B., PARK, C., TAE, B., HAN, S. O., KIM, S. W. Development of batch and continuous processes on biodiesel production in a packed-bed reactor by a mixture of immobilized *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **2010**, 161, 365-371.
- LEUNG, D.; WU, X.; LEUNG, M., A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*. **2010**, 87 (4), 1083-1095.
- LI, C., WANG, P., ZHAO, D., CHENG, Y., WANG, L., WANG, L., WANG, Z. Enantioselective enzymatic hydrolysis of racemic glycidyl butyrate by lipase from *Bacillus subtilis* with improved catalytic properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2008**, 55, 152-156.
- LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z., Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the

- reaction medium. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. **2006**, *43* (1-4), 58-62.
- LIE KEN JIE, M. S. F., LAM, C. C. ¹H-Nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of saturated, acetylenic and ethylenic triacylglycerols. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1995**, *77*, 155-171a.
- LIE KEN JIE, M. S. F., LAM, C. C. ¹³C-NMR studies of polyunsaturated triacylglycerols of type AAA and mixed triacylglycerols containing saturated, acetylenic and ethylenic acyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1995**, *78*, 1-13b.
- LIMA, J. R. O., SILVA, R. B., SILVA, C. C. M., SANTOS, L. S. S., SANTOS JR, J. R., MOURA, E. M., MOURA, C. V. R. Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. *Quimica Nova*. **2007**, *30* (3), 600-603.
- LIN, H., LIU, J., WANG, H., AHMED, A. A. Q., WU, Z. Biocatalysis as an alternative for the production of chiral epoxides: A comparative review. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. **2011**, *72*, 77-89.
- LÔBO, I. P., FERREIRA, S. L. C., CRUZ, R. S. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quimica Nova*. **2009**, *32*, 6, 1596-1608.
- MARCHETTI, J.; MIGUEL, V.; ERRAZU, A., Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*. **2008**, *89* (8), 740-748.
- MARQUES, M. V., NACIUK, F. F., MELLO, A. M. S., SEIBEL, N. M., FONTOURA, L. A. M. Determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel metílico de soja por cromatografia gasosa utilizando oleato de etila como padrão interno. *Quimica Nova*. **2010**, *33*, 4, 978-980.
- MEHER, L. C., SAGAR, D. V., NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2006**, *10*, 248-264.
- MENEGHETTI, S. M. P., MENEGHETTI, M. R., WOLF, C. R., SILVA, E. C., LIMA, G. E. S., SILVA, L. L., SERRA, T. M., CAUDURO, F., OLIVEIRA, L. G. Biodiesel from castor oil: A comparison of ethanolysis versus methanolysis. *Energy & Fuels*. **2006**, *20*, 2262-2265.

- MENEZES, M. Aspectos Biológicos e Taxonômicos de Espécies do gênero *Colletotrichum*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*. **2006**, 3, 170-179.
- MODI, M.; REDDY, J.; RAO, B.; PRASAD, R., Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor. *Biotechnology Letters* **2006**, 28 (9), 637-640.
- MONTEIRO, M. R., AMBROZIN, A. R. P., LIÃO, L. M., FERREIRA, A. G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta*. **2008**, 77, 593-605.
- MOREIRA, A. B. R., PEREZ, V. H., ZANIN, G. M., CASTRO, H. F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. . *Energy & Fuels*. **2007**, 21, 3689-3694.
- MOUNTS, Y. L., WARNER, K., LISTA, G. R., KLEIMANA, R. FEHR, W. R., HAMMOND, E. G., WILCOX, J. R. Effect of altered fatty acid composition on soybean oil stability. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **1988**, 65, 4, 624-628.
- NEBEL, B., MITTELBACH, M., URAY, G. Determination of the Composition of Acetylglycerol Mixtures by ¹H NMR Followed by GC Investigation. *Analytical Chemistry*. **2008**, 80, 22, 8712-8716.
- NELSON, L. A., FOGLIA, T. A., MARMER, W. N. Lipase catalysed production of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **1996**, 73 (8), 1191-1195.
- NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T., Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. **2006**, 43 (1-4), 142-147.
- NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R., Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource Technology*. **2005**, 96 (7), 769-777.
- OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC, Z., Optimization of the production of biodiesel by a commercial immobilized lipase in a solvent-free system using a

- response surface methodology. *Journal of the Serbian Chemical Society*. **2008**, 73 (2), 147-156.
- OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z., Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. *Bioresource Technology*. **2009**, 100 (21), 5146-5154.
- OLIVEIRA, A.; ROSA, M., Enzymatic transesterification of sunflower oil in an aqueous-oil biphasic system. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **2006**, 83 (1), 21-25.
- OLIVEIRA, M. R. *Obtenção de biodiesel via catálise enzimática e caracterização através de técnicas cromatográficas e espectrometria de infravermelho associada à calibração multivariada*. Belo Horizonte: Departamento de Química – Universidade Federal de Minas Gerais. **2009**. 110p. (Dissertação, Mestrado em Química).
- OSBORN, H. T., AKOH, C. C. Structured lipids – Novel fats with medical, nutraceutical and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2002**, 3, 110-120.
- PESSOA, F.; MAGALHAES, S.; FALCAO, P.; DE BRITO ALVES, R.; DO NASCIMENTO, C.; BISCAIA, E., Kinetic Study of Biodiesel Production by Enzymatic Transesterification of Vegetable Oils. *10th International Symposium on Process Systems Engineering: Part a*. **2009**, 27, 1809-1814.
- REN21. 2011. *Renewables 2011 Global Status Report*. Paris: REN21 Secretariat. **2011**.
- ROBLES-MEDINA, A., GONZALEZ-MORENO, P. A., ESTEBAN-CERDAN, L., MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*. **2009**, 27, 398-408.
- ROCHA, D. Q., BARROS, D. K., COSTA, E. J. C., SOUZA, K. S., PASSOS, R. R., VEIGA JR, V. F., CHAAR, J. S. Determinação da matéria-prima utilizada na produção de biodiesel adicionado ao diesel mineral através de monitoramento seletivo de íons. *Quimica Nova*. **2008**, 31, 5, 1062-1066.

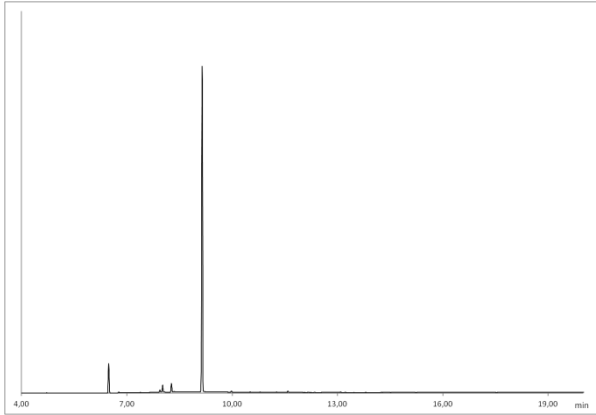
- ROGNER, H.-H. D. ZHOU, R. BRADLEY. P. CRABBÉ, O. EDENHOFER, B.HARE, L. KUIJPERS, M. YAMAGUCHI. Introduction. *In* Climate Change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [B. Metz, O.R. Davidson, P.R. Bosch, R. Dave, L.A. Meyer (eds)], Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press,. **2007**.
- ROSSET, I.; TAVARES, M.; ASSAF, E.; PORTO, A., Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and (1)H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. *Applied Catalysis a-General*. **2011**, 392 (1-2), 136-142.
- RUIZ-SAMBLAS, C., GONZALEZ-CASADO, A., CUADROS-RODRIGUEZ, L., GARCIA, F. P. R. Application of selected ion monitoring to the analysis of triacylglycerols in olive oil by high temperature-gas chromatography/mass spectrometry. *Talanta*. **2010**, 82, 255-260.
- SANCHEZ, F.; VASUDEVAN, P., Enzyme catalyzed production of biodiesel from olive oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **2006**, 135 (1), 1-14.
- SCHOBBER, S., SEIDL, I., MITTELBACH, M. Ester content evaluation in biodiesel from animal fats and lauric oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*. **2006**, 108, 309-314.
- SHAH, S., SHARMA, S., GUPTA, M.N. Biodiesel preparation by lipase-catalysed transesterification of *Jatropha* oil. *Energy and Fuels*. **2004**, 18, 154-159.
- SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. **2001**, 19, 627-662.
- SOUMANOU, M. M., BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*. **2003**, 33, 97-103a.
- SOUMANOU, M. M., BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. *European Journal of Lipid Sciences and Technology*. **2003**, 105, 656-660b.

- STRAUSS, U. T., FELFER, U., FABER, K. Biocatalytic transformation of racemates into chiral building blocks in 100% chemical yield and 100% enantiomeric excess. *Tetrahedron: Asymmetry*. **1999**, *10*, 107-117.
- SUZAKI, K. Improved method to induce sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal fungus of grape ripe rot. *Journal of General Plant Pathology*. **2011**, *77*, 81-84.
- TALUKDER, M.; DAS, P.; FANG, T.; WU, J., Enhanced enzymatic transesterification of palm oil to biodiesel. *Biochemical Engineering Journal*. **2011**, *55* (2), 119-122.
- TAN, T., LU, J., NIE, K., DENG, L., WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*. **2010**. *28*, 628-634.
- TANAKA, R. T., MASCARENHAS, H. A. A., REGITANO-D'ARCE, M. A. B., GALLO, P. B. Concentração de produtividade de óleo e proteína de soja em função da adubação potássica e da calagem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **1995**, *30*, 4,463-469.
- THURNHOFER, S., VETTER, W. A gas chromatography / electron ionization – mass spectrometry - selected ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after formation of fatty acid methyl esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, *53*, 8896-8903.
- TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A., Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. **2010**, *67* (1-2), 52-59.
- TREICHEL, H., OLIVEIRA, D., MAZUTTI, M. A., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*. **2010**, *3*, 182-196.
- TURKAN, A.; KALAY, S., Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases. *Journal of Chromatography a*. **2006**, *1127* (1-2), 34-44.
- TUTER, M.; SECUNDO, F.; RIVA, S.; AKSOY, H.; USTUN, G., Partial purification of *Nigella sativa* L. seed lipase and its application in transesterification reactions. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **2003**, *80* (1), 43-48.

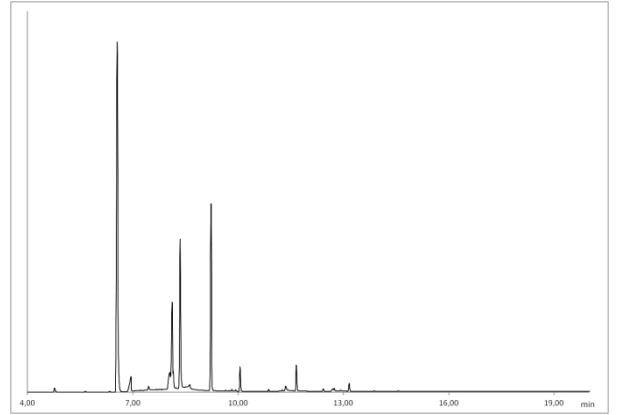
- URIOSTE, D., CASTRO, M. B. A., BIAGGIO, F. C., CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. *Quimica Nova*. **2008**, 31, 2, 407-412.
- VARGAS, V. A., DELGADO, O. D., HATTI-KAUL, R. MATTIASSON, B. Lipase-producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake. *Biotechnology Letters*. **2004**, 26, 81-86.
- VASUDEVAN, P. T., BRIGGS, M. Biodiesel production—current state of the art and challenges. *Journal of industrial Microbiology Technology*. **2008**, 35, 421-430.
- VENKATESAGOUDA, B., PONUGUPATY, E., BARBOSA, A. M., DEKKER, R. F. H. Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **2012**, 28, 71-80.
- VLAHOV, G. Application of NMR to the study of olive oils. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. **1999**, 35, 341-357.
- WANG, Y.; WU, H.; ZONG, M., Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. *Bioresource Technology*. **2008**, 99 (15), 7232-7237.
- WATANABE, Y., SHIMADA, Y., SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y. Stepwise ethanolysis of tuna oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **1999**, 88 (6), 622-626.
- WATANABE, Y., SHIMADA, Y., SUGIHARA, A., TOMINAGA, Y. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2002**, 17, 151-155.
- YANG, J., GUO, D., YAN, Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **2007**, 45, 91-96.
- YASUDA, M.; OGINO, H.; KIGUCHI, T.; KOTANI, T.; TAKAKURA, S.; ISHIBASHI, T.; NAKASHIMA, T.; FUKUDA, H.; ISHIKAWA, H., Purification and characterization of lipase from *Rhizopus chinensis* cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **1999**, 88 (5), 571-573.

- YUCEL, Y.; DEMIR, C.; DIZGE, N.; KESKINLER, B., Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola oil using immobilized lipase. *Biomass & Bioenergy*. **2011**, 35 (4), 1496-1501.
- ZHAO, X.; EL-ZAHAB, B.; BROSNAHAN, R.; PERRY, J.; WANG, P., An organic soluble lipase for water-free synthesis of biodiesel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **2007**, 143 (3), 236-243.
- ZHENG, Y.; QUAN, J.; NING, X.; ZHU, L.; JIANG, B.; HE, Z., Lipase-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production in tert-amyl alcohol. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **2009**, 25 (1), 41-46.

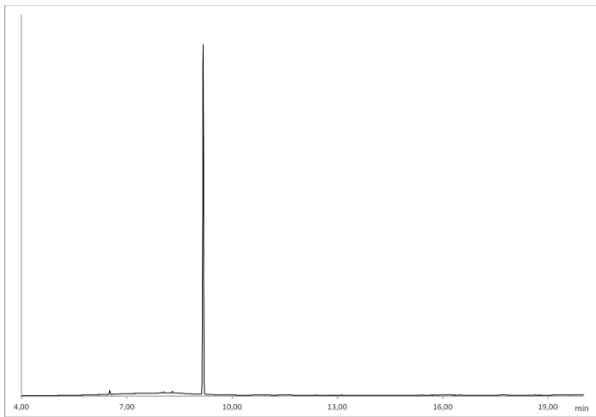
APÊNDICE A
CROMATOGRAMAS CG-EM DAS AMOSTRAS OBTIDAS NA DETERMINAÇÃO
DAS FAIXAS DE TRABALHO (ITEM 4.3.3)



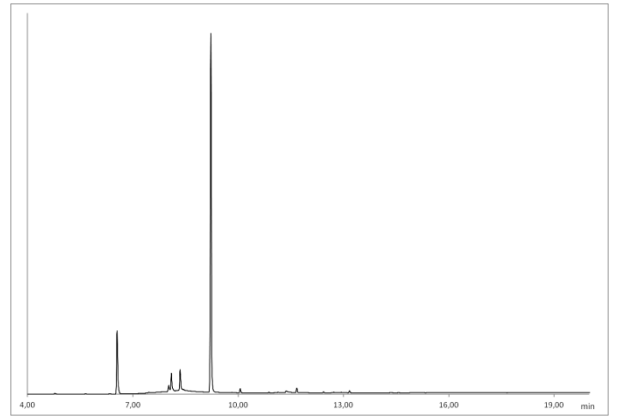
24 h, 0,05 U, 4:1



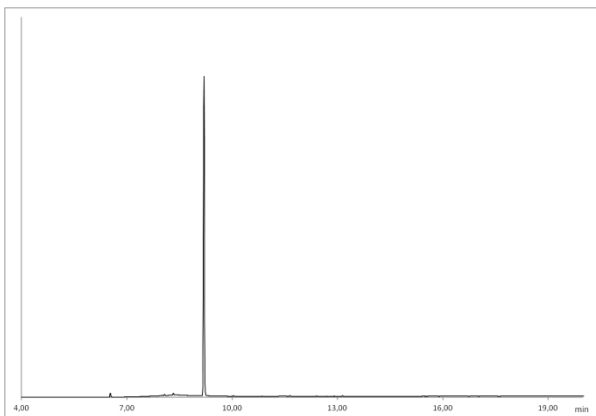
24 h, 2,5 U, 4:1



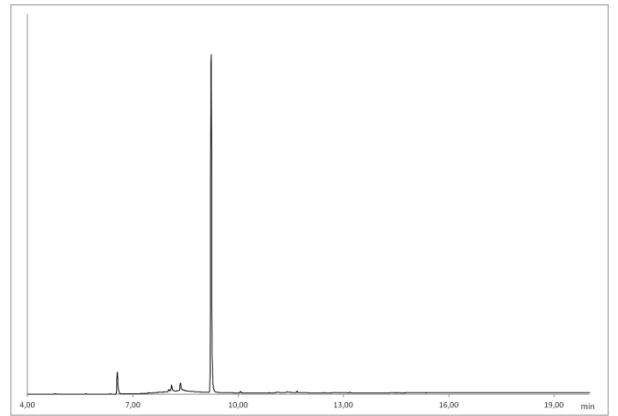
24 h, 0,05 U, 8:1



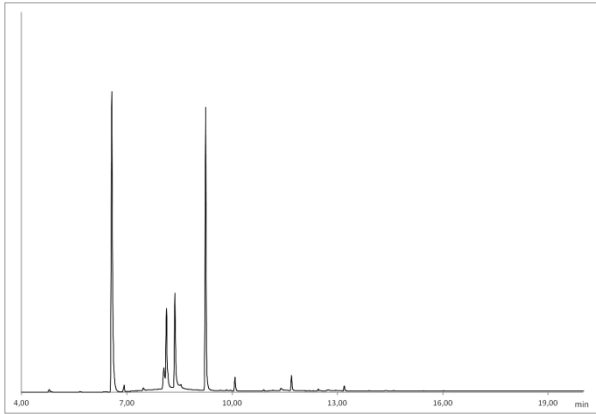
24 h, 2,5 U, 8:1



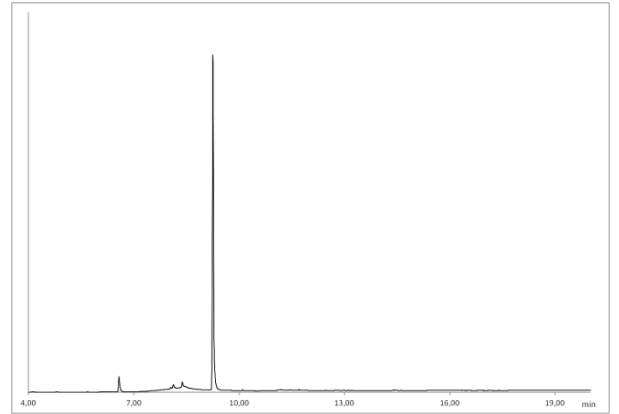
24 h, 0,05 U, 12:1



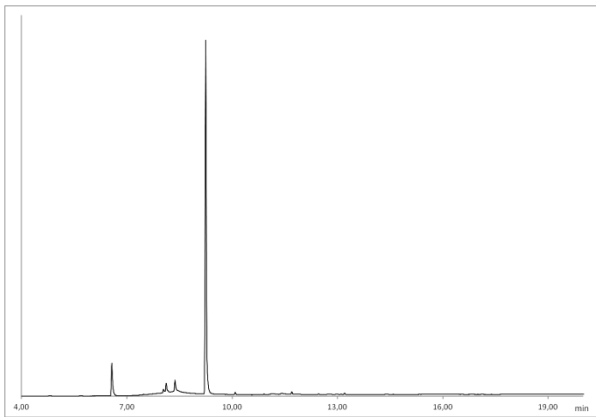
24 h, 2,5 U, 12:1



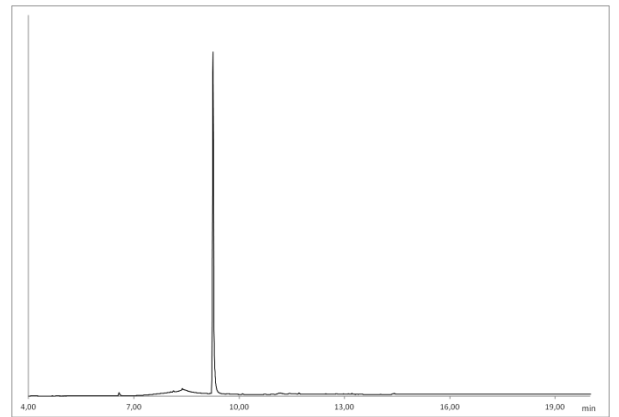
24 h, 12,5U, 4:1



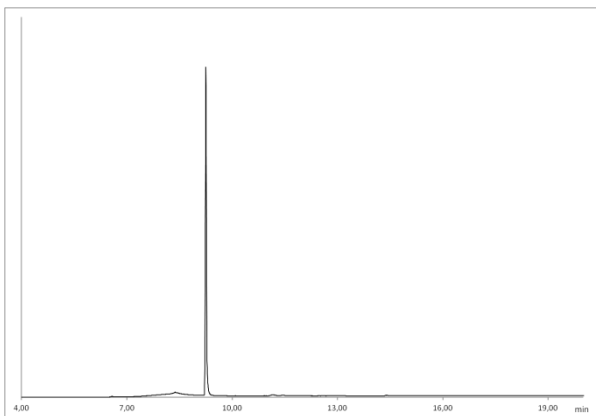
48 h, 0,05 U, 4:1



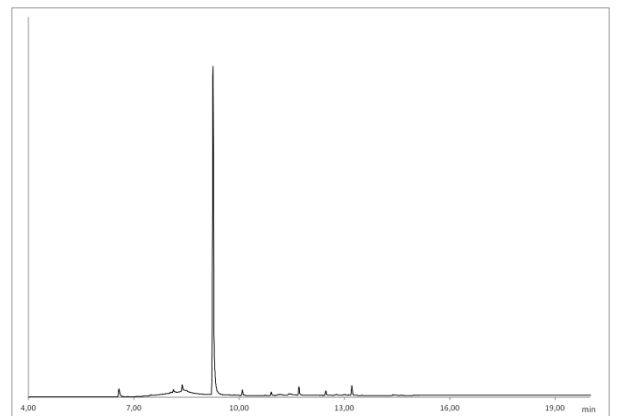
24 h, 12,5 U, 8:1



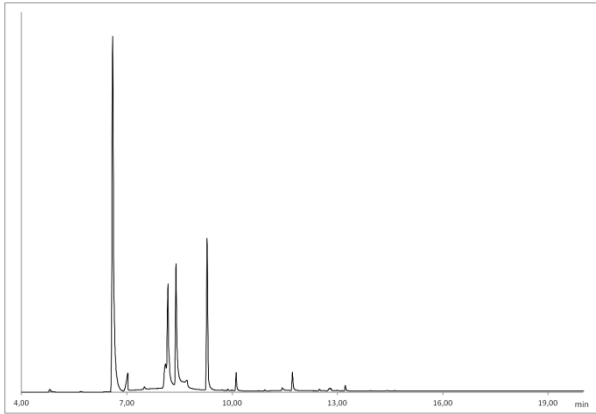
48 h, 0,05 U, 8:1



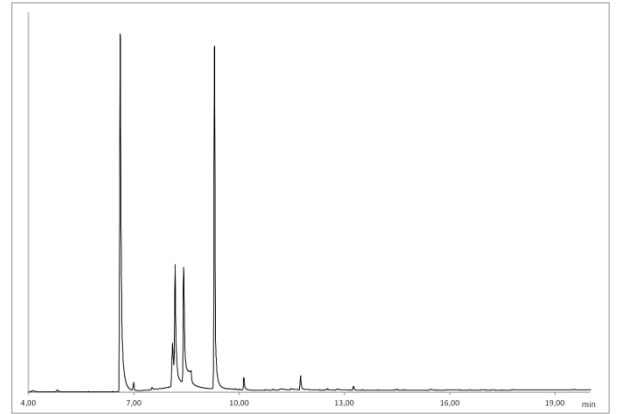
24 h, 12,5 U, 12:1



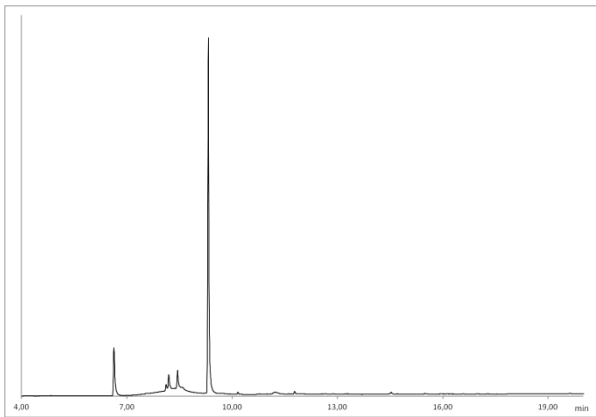
48 h, 0,05U, 12:1



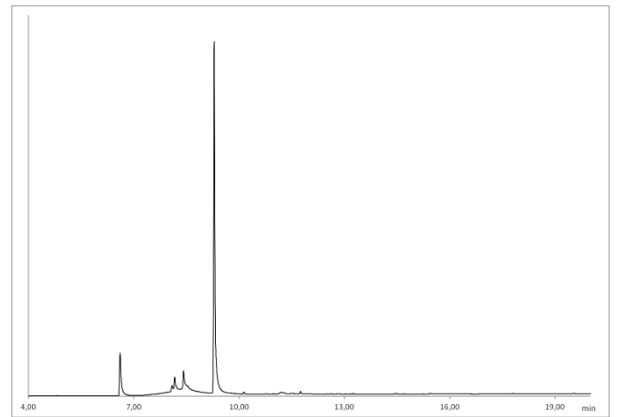
48 h, 2,5 U, 4:1



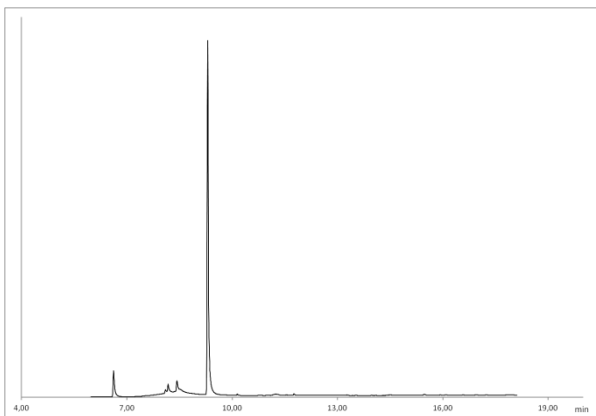
48 h, 12,5 U, 4:1



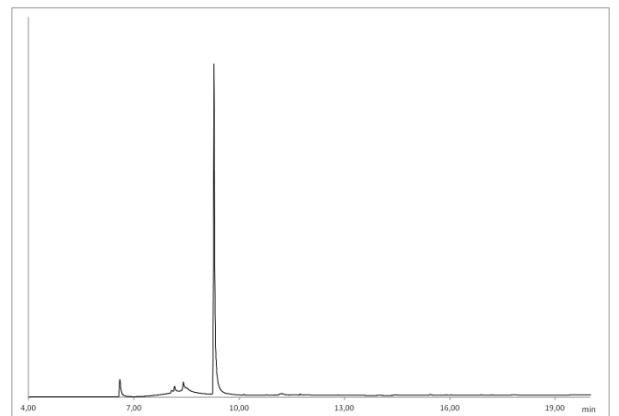
48 h, 2,5 U, 8:1



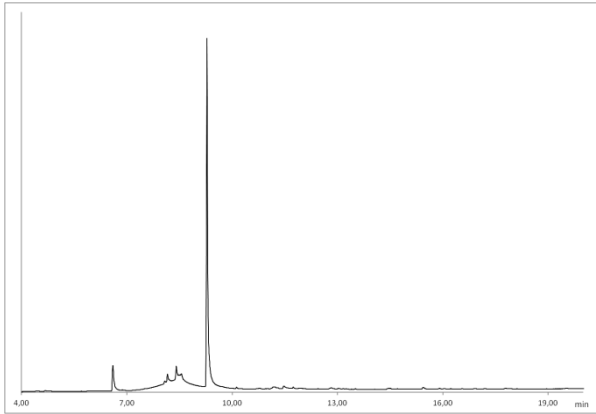
48 h, 12,5 U, 8:1



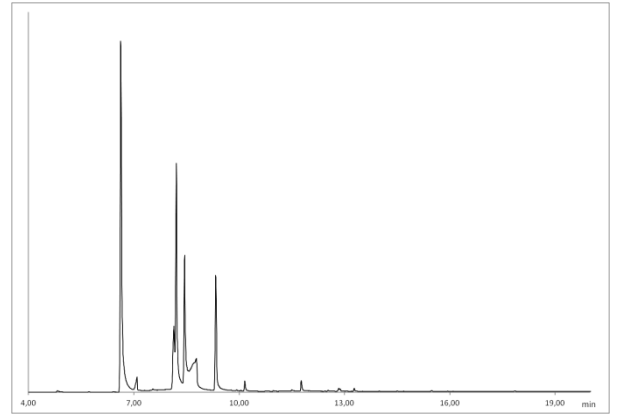
48 h, 2,5 U, 12:1



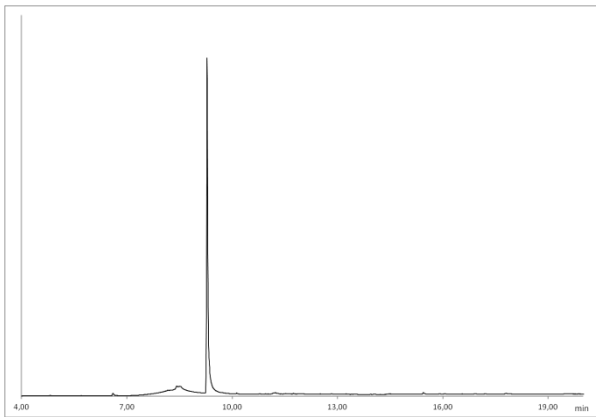
48 h, 12,5 U, 12:1



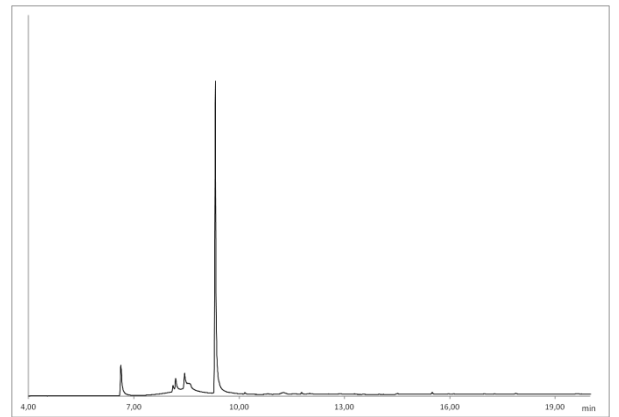
72 h, 0,05 U, 4:1



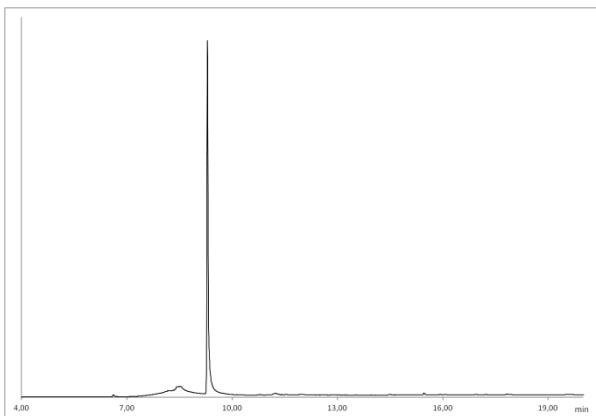
72 h, 2,5 U, 4:1



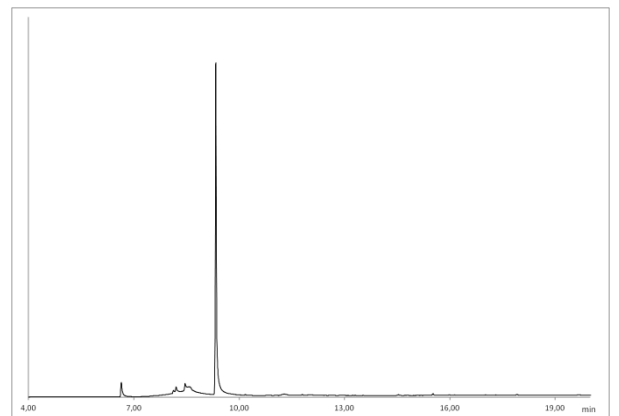
72 h, 0,05 U, 8:1



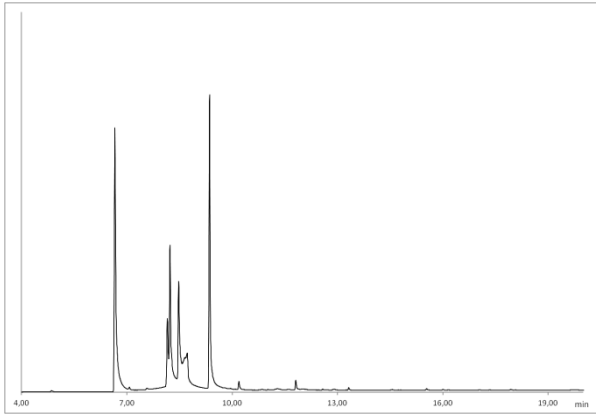
72 h, 2,5 U, 8:1



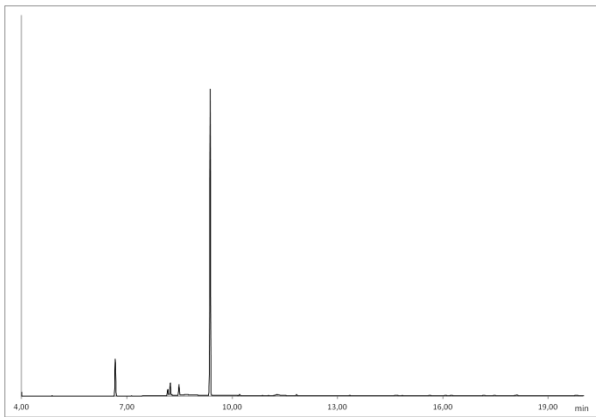
72 h, 0,05 U, 12:1



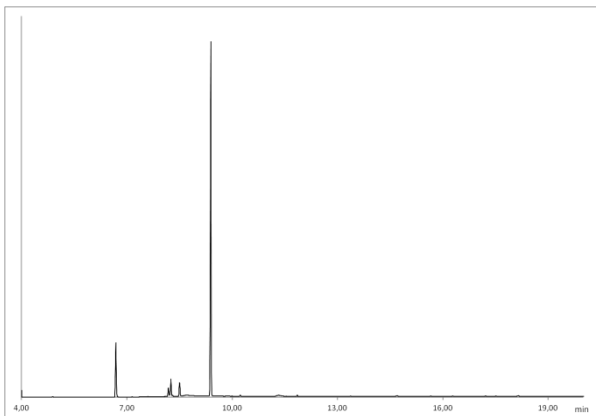
72 h, 2,5 U, 12:1



72 h, 12,5 U, 4:1



72 h, 12,5 U, 8:1



72 h, 12,5 U, 12:1