

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
BACHARELADO EM QUÍMICA

MICHELE DO ROCIO GONÇALVES DIAS

**SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA PELA LIPASE
NATIVA DE *ASPERGILLUS NIGER* IMOBILIZADA EM NANOTUBOS
DE CARBONO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA
2015

MICHELE DO ROCIO GONÇALVES DIAS

**SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA PELA LIPASE
NATIVA DE *ASPERGILLUS NIGER* IMOBILIZADA EM NANOTUBOS
DE CARBONO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Bacharelado em Química do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBi – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – *Campus* Curitiba, Sede Ecoville, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Pilissão

CURITIBA
2015

Aos meus pais pela paciência e incentivo,
com carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu guia e me confortar nas horas mais difíceis.

A minha família por acreditar em mim, em especial aos meus pais, Gerson e Lourdes, por seu apoio incondicional, carinho, incentivo e estrutura para que eu pudesse voltar a estudar e a minha irmã Bia, que mesmo nos momentos de dificuldade, sempre teve paciência comigo e me fez sorrir.

A Professora Cristiane Pilissão pela orientação, amizade, incentivo e, principalmente sua paciência e pelos conhecimentos repassados no desenvolvimento deste trabalho.

A Professora Poliana Macedo dos Santos pelos ensinamentos sobre análise multivariada, qual foram utilizadas neste trabalho.

A Professora Patrícia de Oliveira Carvalho, da USF (Universidade São Francisco), pela doação da lipase nativa de *Aspergillus niger*.

Ao Departamento Acadêmico de Química e Biologia da UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná) por disponibilizar os equipamentos GC-FID, FT-IR e UV-Vis para realização das análises.

A Técnica Rúbia pela ajuda na realização das análises de GC-FID e FT-IR, realizadas na UTFPR.

A UFPR (Universidade Federal do Paraná) por disponibilizar o equipamento de RMN para realização das análises.

Aos mestrandos em Química pela UTFPR, Lucas e Patrick, que se disponibilizaram em realizar as análises de RMN de ^1H na UFPR, em especial ao aluno Lucas pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Catálise Enzimática, Rhaisa, Lilian e em especial ao Alysso pela ajuda na realização dos experimentos durante todo o período de execução deste trabalho e prontidão para ajudar em todos os momentos.

Aos Professores da UTFPR pela contribuição na minha formação acadêmica.

Aos meus colegas de graduação, em especial Osmar Pires, Lucas Karas e Francielli Santana pelo incentivo, força e pelos momentos de descontração.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, bem como, para a minha formação.

RESUMO

DIAS, Michele R.G. **Síntese do oleato de etila catalisada pela lipase nativa de *Aspergillus Niger* imobilizada em nanotubos de carbono.** 2015, 83 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) - Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015

A utilização de enzimas como catalisadores tem sido muito explorada nos últimos anos, devido as suas vantagens em relação aos catalisadores clássicos, podendo destacar a sua alta especificidade, o controle na formação de subprodutos, além disso, as enzimas trabalham em condições suaves de temperatura e pressão. Uma classe especial de enzimas são as lipases, que são capazes de catalisar reações de esterificação em ambientes apropriados. As reações de esterificação catalisadas por lipases são um processo de grande importância industrial, atualmente, a obtenção de ésteres metílicos e etílicos produzidos a partir de ácidos graxos de cadeia longa tem sido usado na produção de biodiesel. O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos, aumentar a estabilidade em solventes orgânicos e reduzir o custo do processo. Nos últimos anos, as pesquisas sobre nanomateriais, incluindo os nanotubos de carbono, têm atraído muita atenção devido a sua capacidade em diversas aplicações, dentre elas, como suportes para imobilização de enzimas. Com isso o presente trabalho apresenta o estudo da reação de esterificação do ácido oleico e etanol, utilizando como biocatalisador a lipase nativa de *Aspergillus niger*, na sua forma livre e imobilizada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) ou nanocompósitos (MWCNTs/PVA). Para este estudo foi realizada a otimização das condições reacionais com a lipase na sua forma livre utilizando o planejamento fatorial, variando a temperatura, massa da lipase nativa de *A. niger* e razão molar do ácido oleico:etanol, sendo obtidos como parâmetros ótimos para a reação de esterificação a massa de 15 mg da lipase de *A. niger*, proporção ácido oleico:etanol 1:1 e temperatura de 30°C, sendo que o oleato de etila foi obtido com 66% de conversão quantificada pelo método Lowry-Tinsley e 91% quantificada por CG-FID, em 6 horas de reação. A lipase nativa de *Aspergillus niger* imobilizada nos suportes MWNTCs/PVA e MWNTCs, sem e com funcionalização dos MWNTCs em peróxido (H_2O_2) e meio básico (KOH) apresentou-se inativa quando imobilizada nos nanocompósitos, não sendo observada a formação do oleato de etila, porém ao imobilizar a lipase de *A. niger* nos MWCNTs na ausência do PVA, as conversões em oleato de etila foram de 0-16%. Logo os resultados obtidos mostraram que a lipase de *A. niger* imobilizada sofreu inativação total ou parcial, em relação à obtenção do oleato de etila, evidenciando a influência da relação substrato-enzima-suporte. Por outro lado ao utilizar a lipase nativa em sua forma livre as conversões a oleato de etila foram de boas a ótimas, sendo de 31-97% sob condições reacionais favoráveis em 6 horas de reação, mostrando-se como um catalisador eficiente para a reação de esterificação entre ácido oleico e etanol.

Palavras-chave: Lipase, imobilização, esterificação, nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs).

ABSTRACT

DIAS, Michele R.G. Synthesis ethyl oleate catalyzed by native *Aspergillus niger* lipase immobilized on carbon nanotubes. 2015.83 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) - Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014

The use of enzymes as catalysts has long been exploited in recent years due to their advantages in comparison with conventional catalysts can highlight its high specificity control the formation of byproducts, in addition, enzymes work under mild conditions of temperature and pressure. A special class of enzymes are lipases, which are capable of catalyzing esterification reactions in appropriate environments. The esterification reactions catalyzed by lipases is a very important industrial process nowadays to obtain methyl and ethyl esters produced from long chain fatty acids have been used in the production of biodiesel. The development of immobilization techniques have been important for providing re-use of enzymes to facilitate separation of the product, increasing stability in organic solvents and reduce the cost of the process. In recent years, research on nanomaterials, including carbon nanotubes have attracted much attention due to its ability for applications as carriers for immobilization of enzymes. Thus this paper presents the study of oleic acid and ethanol esterification reaction, using as a biocatalyst native lipase from *Aspergillus niger*, in its free and immobilized form carbon nanotubes multi-walled (MWCNTs) and nanocomposites (MWCNTs / PVA). For this study was undertaken to optimize the reaction conditions with the lipase in its free form using the factorial design, varying the temperature, mass of the native *A. niger* lipase and molar ratio of oleic acid: ethanol, obtaining parameters as optimal for esterification reaction mass of 15 mg of lipase from *A. niger* ratio oleic acid: ethanol 1: 1 and temperature of 30 ° C, wherein the ethyl oleate is obtained with 66% conversion quantitated by Lowry-Tinsley method and 91% quantified by GC-FID, 6 hours of reaction. The native lipase from *Aspergillus niger* immobilized in MWNTCs / PVA and MWNTCs brackets, with and without functionalization of MWNTCs peroxide (H₂O₂) and basic medium (KOH) showed up inactive when immobilized in nanocomposites, not being observed the formation of ethyl oleate. But by immobilizing lipase from *A. niger* MWCNTs in the absence of PVA, conversions in ethyl oleate was 0-16%. So results showed that the immobilized lipase from *A. niger* has undergone partial or total inactivation, relative to obtain ethyl oleate, showing the influence of substrate-enzyme-supported relationship. On the other hand when using the native lipase in free form conversions were the ethyl oleate from good to excellent, being 31-97% under favorable reaction conditions in 6 hours of reaction, showing as an effective catalyst for the reaction esterification between oleic acid and ethanol.

Keywords: Lipase, immobilization, esterification, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da formação de uma ligação peptídica.	16
Figura 2- Representação da estrutura de uma proteína. (a) Estrutura primária; (b) Estrutura secundária (c) Estrutura terciária; (d) Estrutura quaternária. .	17
Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.....	18
Figura 4 - Reações catalisadas por lipases.	20
Figura 5 - Representação da camada aberta da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	21
Figura6- Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida antarctica</i> obtida por raio-X.....	21
Figura 7 - Mecanismo proposto para reação de esterificação catalisada por lipases.	24
Figura 8 - Representação esquemática dos métodos de imobilização de enzimas .	26
Figura 9 - Representação esquemática da estrutura de nanotubos de carbono. (a) SWCNTs, (b) MWCNTs.....	28
Figura 10 - Estrutura do complexo formado entre os íons Cu^{2+} e os ácidos graxos.	32
Figura 11- Representação esquemática das etapas realizadas neste trabalho.	39
Figura 12- Representação esquemática das rotas utilizadas na preparação dos filmes.....	43
Figura 13- Espectros de FT-IR/ATR do (a) ácido oleico e (b) oleato de etila.	49
Figura 14 - Espectros de RMN de ^1H (a) ácido oleico e (b) oleato de etila. (200 MHz, CDCl_3)	50
Figura 15- Cromatograma dos compostos (a) ácido oleico, (b) oleato de etila e (c) amostra do experimento 1, por GC-FID. Condições de análises: Inj. = 240°C, Det. = 260°C , programação: 80°C 10°C/min 240°C, split 1:9, Pressão do N_2 = 101 kPa	51
Figura 16 - Curva de calibração construída com ácido oleico (0,1 a 2 mmol) a 715 nm, onde a equação de reta e o coeficiente de determinação foram: $y=108x-0,011$ e $R^2 = 0,995$	54
Figura 17- Espectros de FTIR para (a) MWCNTs-pristine, (b) MWCNTs-A, (c) MWCNTs-B e (d) MWCNTs-O. (KBr)	58

- Figura 18** - Imagem de microscopia eletrônica de varredura dos (a) MWCNTs-pristine, (b) MWCNTs-O (c) MWCNTs-B e (d) MWCNTs-A. (15 000 x). 60
- Figura 19**- Fotografias mostrando a aparência dos nanocompósitos. (a) 1MWCNTs-pristine/P, (b) 1MWCNTs-A/P, (c) 1MWCNTs-O/P, (d) 1MWCNTs-B/P, (e) 2MWCNTs-pristine/P, (f) 2MWCNTs-A/P, (g) 2MWCNTs-O/P, (h) 2MWCNTs-B/P, (i) 2^TMWCNTs-pristine/P, (j) 2^TMWCNTs-A/P, (k) 2^TMWCNTs-O/P, (l) 2^TMWCNTs-B/P, (m) 3MWCNTs-pristine/P, (n) 3MWCNTs-A/P, (o) 3MWCNTs-O/P e (p) 3MWCNTs-B/P.....62
- Figura 20** - Fotografias mostrando a aparência da lipase imobilizada nos nanocompósitos. (a)1MWCNTs-pristine/P-E, (b)1MWCNTs-O/P-E, (c) 1MWCNTs-B/P-E, (d) 2MWCNTs-pristine/P-E, (e) 2MWCNTs-O/P-E e (f) 2MWCNTs-B/P-E.65
- Figura 21** -Espectros de RMN de ¹H para a amostra (a) experimento 1, (b) experimento 21, (c) 2MWCNTs-B/P-E e (d) MWCNTs-B-E. (200 MHz, CDCl₃)72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das enzimas segundo a UIBBM.....	19
Tabela 2 - Valores-base para as absorções de grupos funcionais.	33
Tabela 3 - Níveis das variáveis independentes para a síntese do oleato de etila.....	40
Tabela 4 - Planejamento composto central para a síntese do oleato de etila.	41
Tabela 5 – Planejamento composto central completo, resultados experimentais e resposta prevista pelo modelo.....	52
Tabela 6 – Análise de variância (ANOVA)	53
Tabela 7 – Resultados para conversão do oleato de etila nos 17 experimentos do planejamento fatorial, através do método Lowry-Tinsley.	55
Tabela 8 – Otimização da massa da lipase de <i>A.niger</i> e tempo reacional na reação de esterificação do ácido oleico e etanol.....	56
Tabela 9 – Conversão do ácido oleico em oleato de etila utilizando a lipase de <i>A. Niger</i> imobilizada em nanocompósitos,	68
Tabela 10 – Conversão do ácido oleico em oleato de etila utilizando a lipase de <i>A. Niger</i> imobilizada em MWCNTs.	69
Tabela 11 - Comparação entre as metodologias GC-FID, Lowry-Tinsley e RMN ¹ H para conversão do ácido oleico em oleato de etila.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A. Niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> - Análise de Variância
CAL-B	<i>Candida antarctica</i>
CCD	<i>Central composite design</i> – Planejamento composto central
GC	<i>Gas Chromatography</i> - Cromatografia gasosa
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama
EC	<i>Enzyme Commission</i> - Comissão de Enzimas
FID	<i>Flame ionization detector</i> - Detector de ionização em chama
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MWCNTs	<i>Multi-walled carbon nanotubes</i> – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
MWCNTs-A	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via H ₂ SO ₄ / HNO ₃
MWCNTs-B	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via KOH
MWCNTs-F	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados
MWCNTs-O	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via peróxido
MWCNTs- <i>pristine</i>	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas sem tratamento
NTCs	Nanotubos de carbono
PVA	Álcool Polivinílico
RMN ¹ H	Espectroscopia de Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMS	Response surface methodology – Metodologia de superfície de resposta
Ser-His-Asp/Glu	Serina, histidina e aspartato ou glutamato
SWCNTs	<i>Single-walled carbon nanotubes</i> – Nanotubos de carbono de parede simples
UIBBM	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> - União Internacional de Bioquímica e Biologia molecular
1MWCNTs-A/P	Nanocompósito preparado pela rota 1 com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via

	H ₂ SO ₄ / HNO ₃ e PVA
1MWCNTs-B/P	Nanocompósito preparado pela rota 1 com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via KOH e PVA
1MWCNTs-O/P	Nanocompósito preparado pela rota 1 com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via peróxido e PVA
1MWCNTs-pristine/P	Nanocompósito preparado pela rota 1 com nanotubos de carbono de paredes múltiplas sem tratamento e PVA
2MWCNTs-A/P	Nanocompósito preparado pela rota 2 (solvente água) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via H ₂ SO ₄ / HNO ₃ e PVA
2MWCNTs-B/P	Nanocompósito preparado pela rota 2 (solvente água) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via KOH e PVA
2MWCNTs-O/P	Nanocompósito preparado pela rota 2 (solvente água) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via peróxido e PVA
2MWCNTs-pristine/P	Nanocompósito preparado pela rota 2 (solvente água) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas sem tratamento e PVA
2 ^T MWCNTs-A/P	Nanocompósito preparado pela rota 2 (solvente tolueno) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via H ₂ SO ₄ / HNO ₃ e PVA
2 ^T MWCNTs-B/P	Nanocompósito preparado pela rota 2 (solvente tolueno) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via KOH e PVA
2 ^T MWCNTs-O/P	Nanocompósito preparado pela rota 2 (solvente tolueno) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via peróxido e PVA
2 ^T MWCNTs-pristine/P	Nanocompósito preparado pela rota 2 (solvente tolueno) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas sem tratamento e PVA
3MWCNTs-A/P	Nanocompósito preparado pela rota 3 com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via H ₂ SO ₄ / HNO ₃ e PVA

3MWCNTs-B/P	Nanocompósito preparado pela rota 3 com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via KOH e PVA
3MWCNTs-O/P	Nanocompósito preparado pela rota 3 com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via peróxido e PVA
3MWCNTs-pristine/P	Nanocompósito preparado pela rota 3 com nanotubos de carbono de paredes múltiplas sem tratamento e PVA
1MWCNTs-B/P-E	<i>A.niger</i> imobilizada em nanocompósito preparado pela rota 1 com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via KOH e PVA
1MWCNTs-O/P-E	<i>A.niger</i> imobilizada em nanocompósito preparado pela rota 1 com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via peróxido e PVA
1MWCNTs-pristine/P-E	<i>A. niger</i> imobilizada em nanocompósito preparado pela rota 1 com nanotubos de carbono de paredes múltiplas sem tratamento e PVA
2MWCNTs-B/P-E	<i>A. niger</i> imobilizada em nanocompósito preparado pela rota 2 (solvente água) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via KOH e PVA
2MWCNTs-O/P-E	<i>A. niger</i> imobilizada em nanocompósito preparado pela rota 2 (solvente água) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via peróxido e PVA
2MWCNTs-pristine/P-E	<i>A. niger</i> imobilizada em nanocompósito preparado pela rota 2 (solvente água) com nanotubos de carbono de paredes múltiplas sem tratamento e PVA
MWCNTs-B-E	<i>A. niger</i> imobilizada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados
MWCNTs-O-E	<i>A. niger</i> imobilizada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento via peróxido
MWCNTs-pristine-E	<i>A. niger</i> imobilizada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas sem tratamento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	15
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1 ENZIMAS	16
3.2 LIPASES	19
3.2.1 Obtenção de Lipases.....	22
3.2.2 Lipases na síntese de ésteres.....	23
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	25
3.3.1 Suportes para imobilização de enzimas.....	27
3.4 PLANEJAMENTO FATORIAL.....	29
3.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS	31
3.5.1 Cromatografia gasosa	31
3.5.2 Método Lowry-Tinsley	32
3.5.3 Espectroscopia na região do Infravermelho	33
3.5.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	34
3.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura	34
4 OBJETIVOS	36
4.1 OBJETIVO GERAL	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5 METODOLOGIA.....	38
5.1 PREPARAÇÃO DO PADRÃO.....	39
5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADO PELA LIPASE NATIVA DE <i>A. NIGER</i>	40
5.3 FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO.....	42
5.4 PREPARAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS MWCNTs/PVA.....	43
5.5 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NATIVA DE <i>A. NIGER</i>	45
5.6 SÍNTESE DOS OLEATOS DE ALQUILA VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	45
5.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS	46
5.7.1 Espectroscopia na região do infravermelho – FT-IR	46
5.7.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear – RMN ¹ H	46
5.7.3 Cromatografia gasosa – GC-FID.....	47
5.7.4 Método Lowry-Tinsley	47
5.7.5 Microscopia eletrônica de varredura	48
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
6.1 CARACTERIZAÇÃO DO OLEATO DE ETILA.....	49
6.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS	50
6.3 FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO.....	57
6.4 PREPARAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NATIVA DE <i>A. NIGER</i>	61
6.4.1 Preparação dos nanocompósitos (MWCNTs/PVA)	61
6.4.2 Imobilização da lipase de <i>A. niger</i> em nanocompósitos (MWCNTs/PVA).....	64
6.4.3 Imobilização da lipase em MWCNTs.....	66
6.5 SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA UTILIZANDO A LIPASE DE <i>A. NIGER</i> IMOBILIZADA.....	67
6.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA	71
7 CONCLUSÕES	75
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores de natureza protéica, que atuam diminuindo a barreira de energia entre reagentes e produtos, aumentando a velocidade da reação. Estas possuem propriedades extraordinárias em relação aos catalisadores clássicos, como a alta especificidade, agem em condições suaves de pressão e temperatura e dificilmente formam produtos laterais.^{1, 2}

Uma classe de enzimas que vem se destacando são as hidrolases, em especial as lipases (triacilglicerol acil hidrolases E.C.3.1.1.3), que em seu meio natural hidrolisam triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e gliceróis.³ As lipases podem ser empregadas em diversos segmentos, tais como, na indústria de alimentos, detergentes e formulações desengordurantes, na síntese orgânica, com ênfase na síntese assimétrica e em reações de esterificação e transesterificação para a obtenção do biodiesel, entre outros.⁴⁻⁶

As reações de esterificação catalisada por lipases têm adquirido atenção crescente em muitas aplicações, devido ao alto valor agregado a seus produtos obtidos, como por exemplo, na resolução de misturas racêmicas na indústria farmacêutica e, produção de bicompostíveis a partir de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa.^{5, 7} No entanto, essas enzimas na sua forma livre apresentam custo elevado, bem como, podem apresentar baixa atividade catalítica em solventes orgânicos. Alguns fatores podem desnaturar as enzimas, como, a variação no pH, o uso de temperaturas mais elevadas, além disso existe a dificuldade de recuperação e reutilização do catalisador. Essas desvantagens podem ser minimizadas utilizando condições apropriadas, com solventes adequados e técnicas de imobilização.^{8, 9} Diversos materiais podem servir como suporte para imobilização, como sílica mesoporosa, polímeros, entre outros, porém o uso de nanomateriais tem ganhado atenção devido às características únicas que esses materiais apresentam como estabilidade térmica, área superficial elevada e resistência mecânica.¹⁰

A partir dessas considerações, viu-se à necessidade de encontrar um suporte eficiente para a imobilização da lipase nativa de *Aspergillus niger*, e utilizar este sistema como catalisador na síntese do oleato de etila, a partir do ácido oleico e etanol. Os suportes selecionados para este estudo foram os nanotubos de carbono de paredes múltiplas e álcool polivinílico.

2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos o interesse na utilização de enzimas como catalisadores na síntese orgânica tem recebido atenção especial, isto se deve ao fato de que esses catalisadores são altamente versáteis e realizam as reações em condições suaves de pressão e temperatura.

As enzimas hidrolíticas, como as lipases estão entre as enzimas mais estudadas nos últimos anos, pois são capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e glicerol, bem como, varias outras reações, entre estas pode-se destacar as reações de esterificação. A esterificação catalisada por lipases têm adquirido cada vez maior atenção devido aos diversos setores que utilizam esses produtos, como a indústria de alimentos, farmacêutica, produtos de limpeza e em crescente ascensão na indústria de bicomcombustíveis.

Diversos métodos vêm sendo estudados para aumentar a atividade catalítica das lipases nas reações de esterificação em meio não-aquoso, podendo citar o uso de diferentes solventes, técnicas de imobilização, mudanças de temperaturas e pH. Porém essas enzimas apresentam questões a serem superadas para sua utilização em escala industrial, como o custo elevado, pois em muitos casos não é possível sua reutilização e quando reutilizadas apresentam sua atividade reduzida em várias ordens de grandeza, e principalmente o tempo de reação que é muito superior quando comparado aos métodos tradicionais.

Diante das diferentes aplicações das lipases, com destaque nas reações de esterificação, fica evidente a realização de pesquisas que buscam aumentar sua atividade catalítica em solventes orgânicos, utilizando variadas faixas de temperatura e pH, bem como, utilizar métodos que proporcionem a recuperação e reutilização destes biocatalisadores mantendo a atividade catalítica inicial, e realizar tais reações em tempos menores, visando tornar o processo mais econômico e atrativo.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ENZIMAS

As enzimas são em geral de natureza protéica, isto é, são formadas por longas cadeias de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas (**Figura 1**). A sequência exata de aminoácidos é chamada de estrutura primária (**Figura 2a**). A conformação tridimensional é chamada de estrutura secundária (**Figura 2b**) e a disposição espacial dessa sequência é designada como estrutura terciária (**Figura 2c**). Algumas proteínas podem ser constituídas de múltiplas cadeias polipeptídicas, chamadas de subunidades, o arranjo dessas subunidades uma em relação à outra é a estrutura quaternária (**Figura 2d**).^{1, 2}

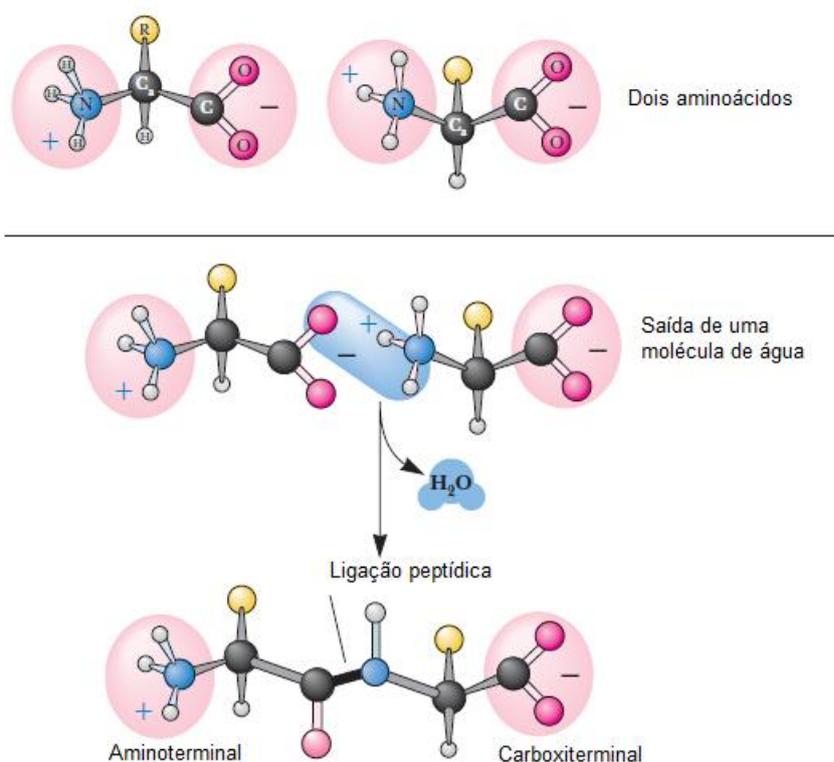


Figura 1- Representação da formação de uma ligação peptídica.¹

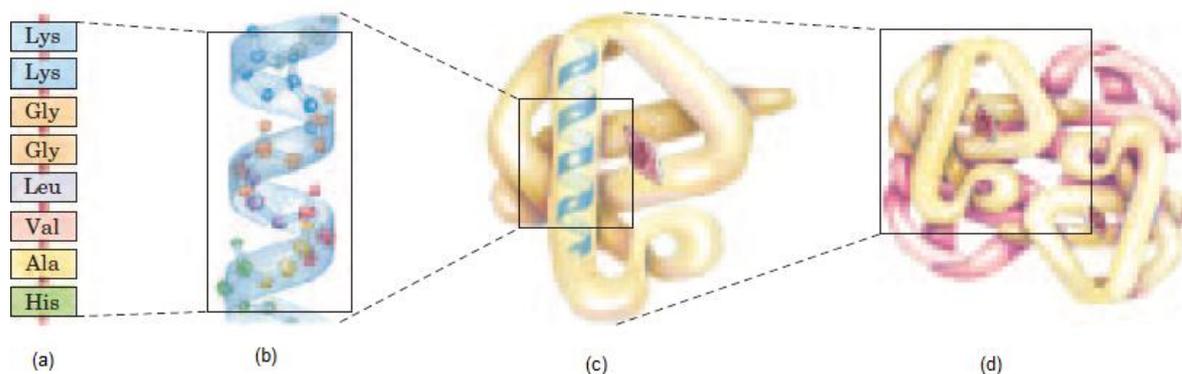


Figura 2-Representação da estrutura de uma proteína. (a) Estrutura primária; (b) Estrutura secundária (c) Estrutura terciária; (d) Estrutura quaternária.²

A utilização de enzimas em diversos processos tem sido muito explorada, pois possuem diversas propriedades catalíticas. As mais interessantes em relação aos catalisadores produzidos sinteticamente são:^{2, 3, 11}

- **Aumento da velocidade de reação:** os processos mediados por enzimas podem aumentar a velocidade de uma reação em até 10^{20} vezes mais rápidos do que os correspondentes não catalisados;^{12, 13}
- **Condições suaves:** atuam em temperaturas abaixo de 100 °C, pressão atmosférica e pH neutro. Essas condições minimizam problemas de reações secundárias indesejáveis, tais como a decomposição, isomerização, racemização e rearranjo, que muitas vezes ocorre na metodologia tradicional;
- **Alta especificidade:** as reações raramente formam produtos secundários;
- **Catalisam um grande número de reações:** aceleram a velocidade da reação, sem alterar o equilíbrio termodinâmico. Apresentam diversos tipos de seletividade tais como, quimiosseletividade, regioseletividade, diastereosseletividade e enantioseletividade.

Porém há algumas desvantagens quanto à utilização desses biocatalisadores:³

- São sensíveis a alteração brusca nos parâmetros operacionais, como temperatura e pH;
- São propensos a sofrerem inibição por agentes físicos e químicos;
- Algumas enzimas necessitam de cofatores (substâncias orgânicas ou inorgânicas) para seu funcionamento;
- Podem apresentar baixa estabilidade em meio orgânico;

- Apresentam alto custo.

Nos últimos anos algumas destas desvantagens têm sido minimizadas pelo uso de técnicas de imobilização, que serão discutidas no decorrer do trabalho, pois podem fornecer estabilidade para as enzimas e facilitar a sua recuperação e reutilização.^{8, 14}

Assim ao trabalhar com enzimas, existe na literatura propostas de como ocorre à interação enzima-substrato, pois como todo catalisador, as enzimas aumentam a velocidade das reações através da diminuição da barreira energética existente entre reagentes (substratos) e produtos sem sofrer alterações permanentes em sua estrutura. As enzimas aproximam os substratos (S) com orientação espacial favorável dentro de uma cavidade, denominada sítio ativo, formando um complexo enzima-substrato (ES). A formação deste complexo conduz a uma diminuição da energia de ativação, aumentando a velocidade da reação.^{1, 2, 11}

Uma ação enzimática pode ser representada conforme **Figura 3**, onde E, S e P representam a enzima, substrato e produto, respectivamente. ES é o complexo da enzima com o substrato.²

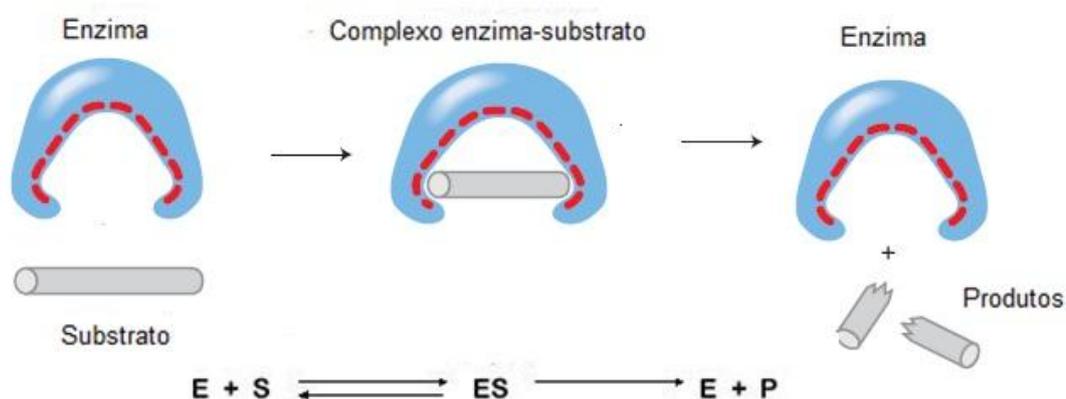


Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo de ação enzimática.²

As enzimas são classificadas de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia molecular (UIBBM- International Union of Biochemistry and Molecular Biology) conforme as reações que catalisam. Existem seis classes principais de enzimas (**Tabela 1**). Para a identificação individual, as enzimas possuem um código de 4 dígitos na Comissão de Enzimas (EC –Enzyme Commission), EC A.B.C.D, onde, A representa a classe principal, B a sub-classe, C indica a sub-subclasse e D é o número individual da enzima em sua sub-subclasse.^{2,}

Tabela 1 - Classificação das enzimas segundo a UIBBM.^{2, 11}

Classificação	Tipo de reação catalisada
1. Oxidorredutases	Transferência de elétrons, reações de oxidorredução
2. Transferases	Transferência de grupos funcionais
3. Hidrolases	Reações de hidrólise
4. Liases	Adição de grupos as duplas ligações ou eliminação de grupos para formação de duplas ligações
5. Isomerases	Isomerização
6. Ligases	Formação de ligações pelo acoplamento com hidrólise de ATP

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais utilizados na síntese orgânica e representam grande parte das enzimas utilizadas na indústria, dentre elas estão as proteases, esterases, amilases, celulasas, e de grande destaque as lipases.^{3-6, 15}

3.2 LIPASES

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases EC 3.1.1.3) são enzimas que pertencem à classe das hidrolases e, em ambiente natural catalisam as reações de hidrólise de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e glicerol.³

As lipases desempenham um papel importante na biocatálise. São capazes de catalisar diferentes reações, tanto em meio aquoso como em orgânico, apresentando excelente atividade.⁵ Além de apresentar diversas vantagens em comparação as demais classes de enzimas, tais como, não necessitam de cofatores; podem atuar em ampla faixa de pH; possuem alta especificidade e propriedades estereosseletivas e regioseletivas.^{4, 7}

Esses biocatalisadores são encontrados em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Os microorganismos são a fonte preferencial de produção de enzimas, especialmente os fungos, pois as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, favorecendo sua extração, isolamento e purificação.^{5, 15-17}

Em solventes orgânicos, as lipases catalisam a transferência de grupos acila denominados doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Dependendo do tipo do doador acila e do aceptor, as reações catalisadas por lipases incluem esterificação, transesterificação, aminólise, entre outras (**Figura 4**).^{3,}

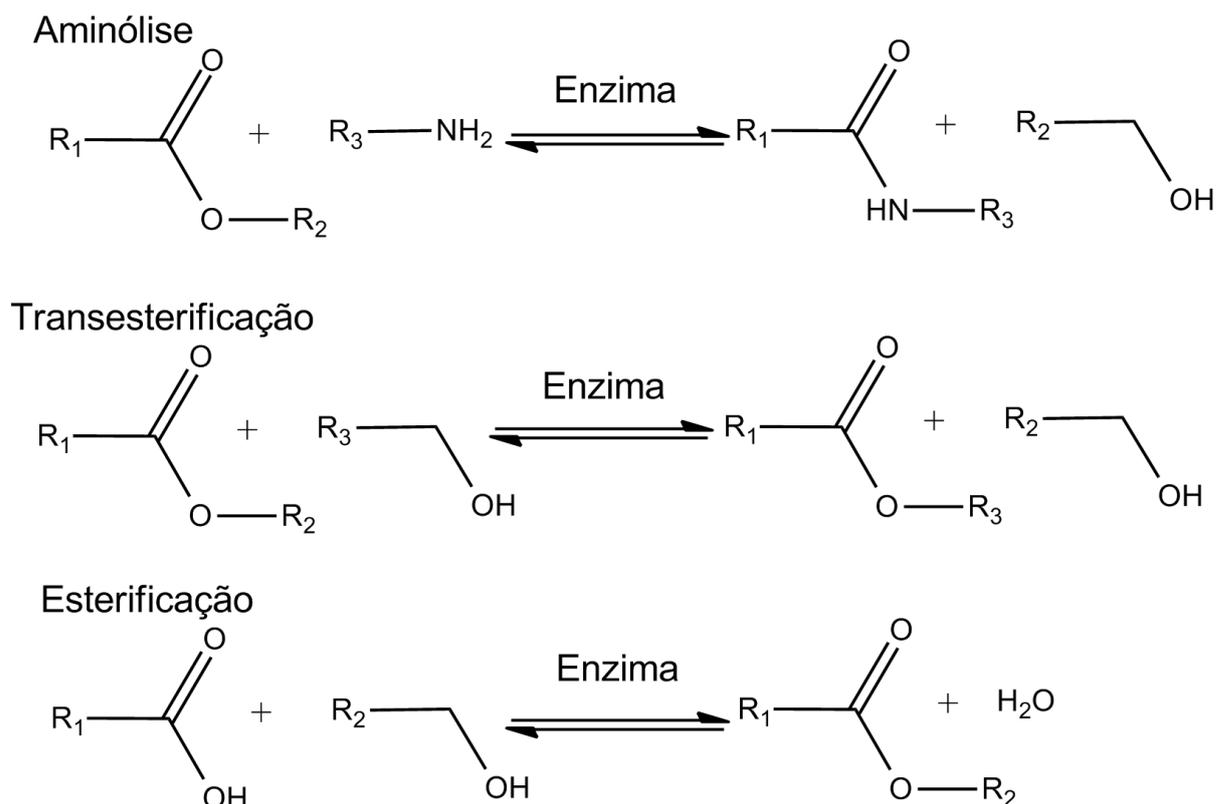


Figura 4 - Reações catalisadas por lipases. ¹⁶

Muitas lipases exibem um aumento na atividade enzimática quando estão na presença de interfaces orgânico/ aquosa. Sarda e col.¹⁹ relataram que a enzima ao entrar em contato com a interface orgânico/ aquosa sofre uma mudança conformacional que aumenta a sua atividade. Este fenômeno ficou conhecido como ativação interfacial. Após a elucidação das estruturas das lipases por cristalografia de Raio-X, verificou-se a presença de uma cadeia polipeptídica cobrindo o sítio ativo da enzima em solução (forma fechada), denominada tampa. A interação com a interface orgânico/ aquosa provoca um rearranjo estrutural, tornando acessível o sítio ativo e permitindo a catálise (forma aberta). Porém algumas lipases não apresentam o sítio ativo recoberto pela tampa e não precisam da interface para desempenhar sua atividade hidrolítica. ^{3, 5, 9, 16}

A **Figura 5** mostra a estrutura de uma lipase com seu sítio catalítico acessível, ou também conhecido como forma aberta. Utiliza-se um inibidor co-cristalizado (em preto), mostrando de forma visível o sítio ativo (forma aberta). A cor vermelha mais intensa ao redor do sítio ativo indica a área hidrofóbica, que ao interagir com uma fase hidrofóbica estabiliza a enzima nessa conformação.

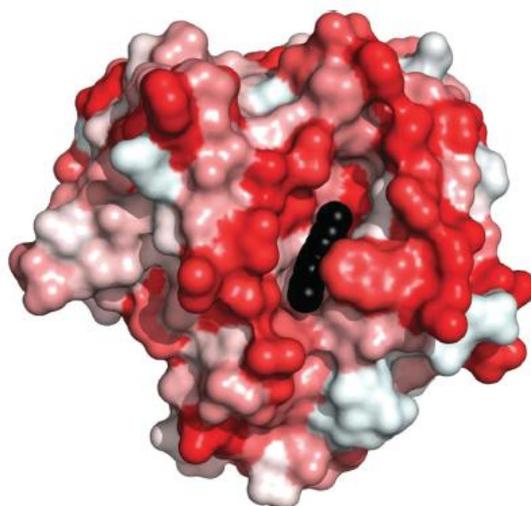


Figura 5—Representação da camada aberta da lipase de *Rhizomucor miehei*.⁹

Essas enzimas realizam a catálise através de um padrão compreendendo três resíduos de aminoácidos que são serina, histidina e aspartato ou glutamato (Ser-His-Asp/Glu).^{5,6} A **Figura 6**, mostra a representação gráfica da estrutura tridimensional da lipase de *Candida Antarctica* (CAL-B) com a ampliação do seu sítio ativo formado pela cadeia lateral da Ser-His-Asp.

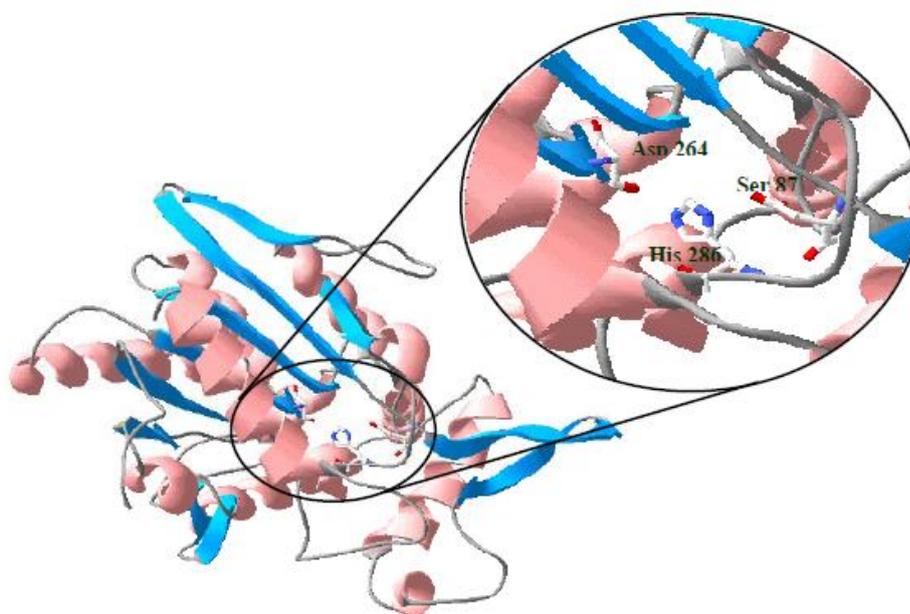


Figura 6 - Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica* obtida por raio-X.¹⁸

As lipases podem ser utilizadas em diversas aplicações industriais, motivo pelo qual o seu uso no mercado vem crescendo nos últimos anos. Elas podem ser

empregadas no processamento de alimentos, detergentes e formulações desengordurantes, produtos farmacêuticos, indústria de polpa e papel, no tratamento de efluentes ricos em óleos e gorduras e em síntese orgânica.^{4, 15, 16}

A utilização de lipases na síntese de ésteres de ácidos graxos vem sendo fonte de estudo para a produção do biodiesel.²⁰ Yin e col.²¹ em seus estudos empregaram a lipase (Lipase LS-20) imobilizada em sílica funcionalizada com ácido organofosfônico na síntese do oleato de etila, a partir do ácido oleico e etanol, obtendo-se uma taxa de conversão de até 89,94% em 10 horas de reação.

Como descrito anteriormente as lipases podem ser extraídas de diferentes fontes, conforme será relatado no próximo tópico.

3.2.1 Obtenção de Lipases

As lipases podem ser obtidas de animais, plantas, bactérias ou fungos. A produção a partir de microorganismos é realizada principalmente através da fermentação submersa (FS) ou pela fermentação em estado sólido (FES).^{7, 16, 22}

Vários microorganismos produtores dessas enzimas têm sido relatados na literatura, tais como, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* (*A. niger*), *Rhizomucor miehei*, entre outros. Porém os fungos filamentosos são fontes preferidas de lipases uma vez que eles tendem a produzir enzimas extracelulares, favorecendo a sua extração e purificação.^{7, 15, 22} As espécies do gênero *Aspergillus* possuem diversas aplicações, dentre elas pode-se citar a sua utilização em reações de esterificação.²²

Carvalho e col.²³ estudaram a esterificação do (*R,S*)-ibuprofeno com 1-propanol utilizando quatro espécies diferentes do gênero *Aspergillus*, na sua forma livre e imobilizada em celite. Este trabalho demonstrou que a lipase de *A. niger* apresentou maior capacidade de esterificação e, melhores rendimentos na sua forma imobilizada em comparação a sua forma livre.

3.2.2 Lipases na síntese de ésteres

A síntese de ésteres catalisada por lipases atraiu interesse de pesquisadores durante a última década, devido a um aumento do uso de ésteres orgânicos na área de biotecnologia e na indústria.⁵ Os ésteres produzidos a partir de ácidos graxos de cadeia curta são importantes componentes de sabores e aromas artificiais na indústria de alimentos, já ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos de cadeia longa têm sido utilizados para a produção do biodiesel.^{15, 24}

As reações de esterificação catalisadas por lipases entre álcoois e ácidos graxos podem ser realizadas em solventes orgânicos e, em sistemas livres de solventes, com baixa atividade de água. Embora a síntese de ésteres possa ser feita quimicamente via catálise ácida ou básica, a utilização dessas enzimas apresentam as vantagens de atuarem em condições suaves de pressão e temperatura, redução de reações paralelas e apresentarem alta especificidade.^{5, 25}

O mecanismo de esterificação catalisada por lipase mostra que um ácido graxo forma um complexo acil-enzima com a lipase, liberando uma molécula de água, seguido pela ligação do álcool ao complexo acil-enzima, este último é então transformado em um complexo de éster-enzima, ocorrendo em seguida a quebra da ligação do complexo, liberando o produto éster e a enzima livre, conforme representação esquemática na **Figura 7**.⁵

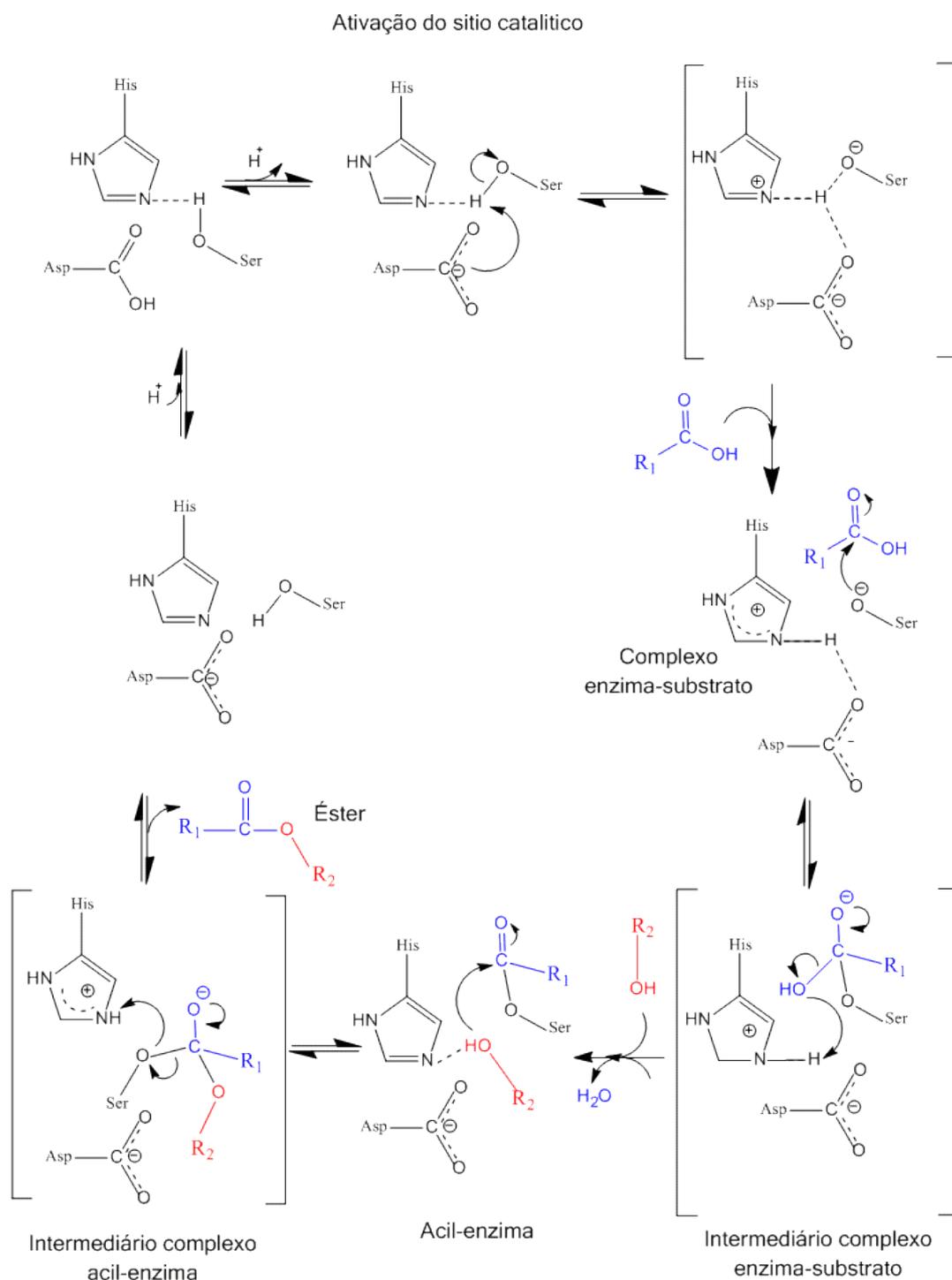


Figura 7 - Mecanismo proposto para reação de esterificação catalisada por lipases.⁵

Entre os principais fatores que podem influenciar o rendimento de ésteres, citam-se as concentrações de enzima e substrato, razão molar entre ácidos e

álcoois, o valor de pH, a temperatura de reação, o teor de água e a área total do substrato.⁵

Zhong e col.²⁶ estudaram a esterificação dos oleatos de alquila em sistemas livre de solvente utilizando a lipase comercial de *Candida sp. 99-125*, em relação aos rendimentos dos ésteres foi observado que quanto maior a temperatura reacional, menor foi a taxa de conversão em ésteres. Além disso, foi observado a necessidade de um teor mínimo de água para que a enzima não sofresse total desidratação e mantivesse sua estrutura nativa, em relação ao tamanho das cadeias alquílicas do álcool foi observado que o rendimento diminuiu com o aumento da ramificação da cadeia alquílica, evidenciando assim, a dificuldade do substrato se aproximar do sítio ativo da enzima.

Visando um maior desempenho desses catalisadores nas reações de esterificação, técnicas de imobilização vêm sendo empregadas com o intuito de aumentara atividade catalítica, estabilidade e facilitar o manuseio e recuperação da enzima do meio reacional.^{8, 9, 14}

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Em muitos casos a atividade catalítica observada nas enzimas em solventes orgânicos é de várias ordens de grandeza mais baixas do que em água, tornando as aplicações práticas pouco atraentes. No entanto, essa situação pode ser melhorada pela escolha de condições apropriadas para a biocatálise em solventes orgânicos, como por exemplo, a utilização de métodos de imobilização de enzimas.^{6, 9} Esses métodos podem fornecer um aumento da atividade catalítica em comparação com a enzima não imobilizada, facilitam a sua reutilização e purificação do produto.^{9, 27, 28}

Existem vários métodos de imobilização, podendo ser divididos em duas categorias, o método químico, onde a enzima é fixada através de ligações covalentes, ligadas através de um único ponto ou formando ligações cruzadas, e o método físico, onde atuam as forças físicas (adsorção, interações eletrostáticas e outras) como também, a inclusão da enzima em espaços confinados, ao qual ela fica aprisionada, mas continua ativa cataliticamente.^{3, 8, 9, 16, 29} A **Figura 8** ilustra alguns métodos utilizados para a imobilização de enzimas.

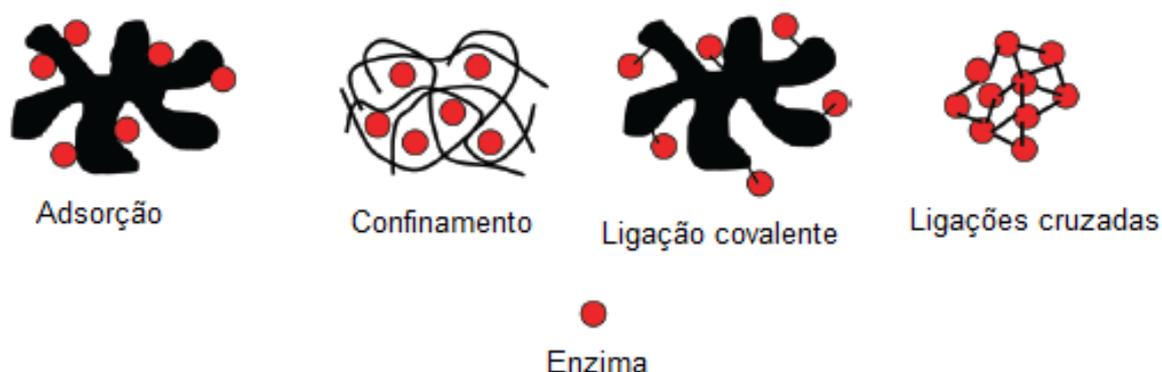


Figura 8-Representação esquemática dos métodos de imobilização de enzimas.⁹

A escolha do método para a imobilização dependerá do tipo de enzima, suporte e sua finalidade enzima-substrato.³⁰

Assim, a catálise homogênea utilizando uma enzima nativa transforma-se em catálise heterogênea quando biocatalisadores imobilizados são utilizados.⁹ Dependendo da técnica de imobilização, as propriedades do biocatalisador, tais como, estabilidade, seletividade, pH e temperatura podem ser alterados significativamente, muitas vezes obtendo-se um maior desempenho do catalisador.^{3, 8, 16} No entanto, a imobilização também pode causar a desativação da enzima e, como em todos os casos de catálise heterogênea, as limitações de transferência de massa podem causar uma diminuição na atividade específica da enzima (mols de substrato convertido por enzima unitária por unidade de tempo).^{8, 9, 30}

Um requisito importante na imobilização de enzimas é que o suporte deve fornecer um ambiente biocompatível, isto é, não deve interferir na estrutura nativa da enzima. A escolha do suporte é essencial para um bom desempenho do sistema com a enzima. Algumas características são desejáveis para um bom suporte, tais como, possuir uma boa área superficial, estabilidade química, mecânica e térmica, resistência ao ataque microbiológico, possuir grupos químicos que possam ser ativados ou modificados de modo a permitir a ligação com a enzima e ser insolúvel no meio reacional.^{8, 28, 29}

3.3.1 Suportes para imobilização de enzimas

Estudos recentes têm demonstrado que a atividade e estabilidade das enzimas imobilizadas nas reações de hidrólise e esterificação podem ser aumentada através da utilização de nanomateriais como suporte.^{30, 31}

Nanomateriais são materiais em escala nanométrica e, que apresentam propriedades diferenciadas daquelas do sólido estendido, por se encontrar abaixo do seu tamanho crítico. As propriedades desses materiais estão diretamente ligadas ao tamanho e a forma dessas partículas.^{32, 33}

Atualmente, existe um interesse considerável no uso de materiais em nanoescala, que visa explorar os fenômenos únicos associados a estes materiais. Os avanços na fabricação desses materiais deram aos pesquisadores acesso a uma variedade de nanomateriais, que possuem propriedades únicas, tais como, eletrônicas, magnéticas, mecânicas, químicas e ópticas.^{30, 31}

Alguns nanomateriais podem servir como excelentes materiais para a imobilização de enzimas, porque oferecem as características ideais para equilibrar os principais fatores que determinam a eficiência dos biocatalisadores, incluindo a elevada área superficial e menor resistência à transferência de massa. Vários nanomateriais como os nanotubos de carbono (NTCs), nanopartículas, nanopartículas magnéticas, matrizes nanoporosas, nanofibras, tem sido relatadas como grande potencial para revolucionar a preparação e utilização de biocatalisadores.^{10, 30, 34}

Os NTCs são divididos em dois grupos os de parede simples (SWCNTs – single-walled carbon nanotubes), e de paredes múltiplas (MWCNTs – multi-walled carbon nanotubes), como representados na **Figura 9**, estes são formados por uma ou várias folhas de grafeno enroladas de forma concêntrica, possuindo cavidade interna oca e tendo as extremidades abertas ou fechadas. Os SWCNTs podem apresentar três estruturas, armchair, zig-zag e chiral, em relação à maneira de como a folha de grafeno é enrolada, possuindo propriedades específicas.^{32, 33}

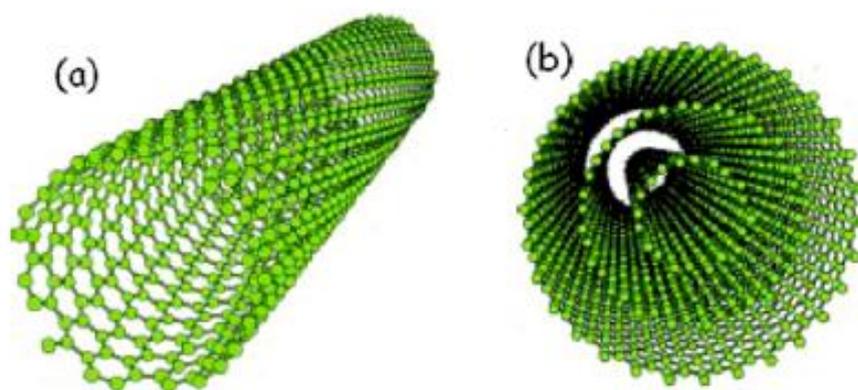


Figura 9 - Representação esquemática da estrutura de nanotubos de carbono. (a) SWCNTs, (b) MWCNTs.³²

Os NTCs possuem propriedades interessantes como alta resistência química e mecânica, resistência à oxidação e à temperatura, grande área superficial sendo assim, um material promissor para diversas aplicações no futuro, incluindo a biocatálise.^{32, 35} Estudos realizados sobre a imobilização da lipase em nanotubos de carbono descrevem este sistema como um promissor biocatalisador na síntese de ésteres.^{36, 37}

Vários esforços têm sido direcionados para a produção de compósitos, polímero/ NTCs para aplicações funcionais. Porém seu uso tem sido limitado devido às dificuldades associadas à dispersão desses materiais na matriz polimérica, pois as partículas tendem a aglomerar-se devido às interações de Van der Waals entre as superfícies hidrofóbicas dos NTCs. Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas para proporcionar uma melhor interação dos NTCs com materiais poliméricos, como a utilização de surfactantes, que são capazes de diminuir a tensão interfacial entre os NTCs, reduzindo a formação de agregados e a funcionalização através de métodos químicos.^{35, 38}

A funcionalização química é um método covalente, com o ataque direto dos grupos funcionais sobre os NTCs, sendo este realizado nas pontas ou paredes laterais. Quando os NTCs possuem defeitos intrínsecos ou induzidos, estes locais podem ser atacados por oxidantes fortes formando grupos carboxílicos ou hidroxilos, que podem ainda ser usados como precursores para o ataque de outros grupos funcionais, além disso, esses compostos se tornam solúveis em diversos solventes orgânicos devido à alteração da natureza hidrofóbica com a adição de grupos polares.^{38, 39, 40}

Dentre os vários polímeros utilizados para produção de compósitos podemos citar o álcool polivinílico (PVA), que trata-se de uma resina sintética, solúvel em água, produzida em grande volume. Este polímero além de ser um excelente adesivo, possui boa resistência a solventes, óleos e graxas. Têm sido muito utilizado em fibras, adesivos, emulsificantes, e como suporte para imobilização de enzimas.⁴¹

A utilização de um suporte NTCs/PVA torna-se interessante, pois a natureza polar do PVA pode facilitar a formação de ligações hidrogênio com as hidroxilas e carboxilas dos nanotubos de carbono funcionalizados, proporcionando um nanocompósito homogêneo, favorecendo a imobilização das enzimas e sua aplicação na síntese de ésteres.

Diante das considerações feitas até então fica claro a necessidade de estudos que envolvam reações de esterificação utilizando biocatalizadores, bem como, a tentativa de melhoria das condições reacionais para que essa reação catalítica seja mais atraente frente aos catalisadores clássicos.

Uma abordagem para melhor compreensão das variáveis envolvidas no sistema (temperatura, razão molar, concentração de enzima) e a resposta (rendimento de ésteres) com o intuito de obter condições reacionais ótimas para o sistema, podem ser obtidas através da utilização de planejamentos fatoriais, onde todos os parâmetros podem ser variados ao mesmo tempo dentro de uma faixa escolhida.⁴²

3.4 PLANEJAMENTO FATORIAL

Em qualquer área da pesquisa, um dos problemas mais comuns é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre a resposta do sistema, com a finalidade de aprimorar o processo, reduzindo tempo e custo, assim os métodos multivariados consistem em realizar o menor número de experimentos a fim de obter o máximo de informações de modo a otimizar o processo.^{43, 44}

Existem vários tipos de planejamentos fatoriais, a escolha do planejamento irá depender dos objetivos que se pretende alcançar. Inicialmente pode-se realizar uma triagem de variáveis, a fim de se obter a influência destas na resposta do sistema, que geralmente são obtidas através de planejamentos fatoriais completos

ou fracionários. Por exemplo, em um planejamento fatorial completo o número de experimentos consistirá em 2^k , onde k representa o número de fatores ou variáveis que se pretende investigar, e o 2 os níveis destes fatores, geralmente denominados pelos sinais (-) o nível mais baixo e sinal (+) o nível mais alto.⁴⁴

Quando já se conhece as variáveis que influenciam a resposta do sistema, utiliza-se para otimização de condições reacionais a metodologia de superfície de resposta (RMS – response surface methodology), que tem o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. Esta metodologia baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que aplicam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado.^{42, 44}

Um exemplo de planejamento que utiliza superfície de resposta é o composto central (CCD – central composite design), no CCD além de um planejamento fatorial inicial (2^k quando se utiliza um planejamento completo) são adicionados pontos axiais ou estrela ($\pm\alpha$) e um ponto central (0). O valor de α pode variar de $\alpha=1$ a $\alpha=\sqrt{k}$, ou ainda pode se utilizar o conceito de rotabilidade, proposto por Box e Hunter (1957) como critério para escolher o valor de α , neste caso $\alpha=\sqrt[4]{2^k}$. O valor de α representa a distância dos pontos axiais ao ponto central e no ponto central é definido o número de replicatas. Após a construção do modelo é avaliado sua capacidade de previsão, neste caso se utiliza principalmente a análise de variância (ANOVA – Analysis of Variance).^{43; 44}

A etapa de otimização das condições reacionais na síntese de ésteres utilizando enzimas livres como catalisador é essencial antes da aplicação no sistema em estudo, a fim reduzir tempo e custo. Diversas técnicas podem ser utilizadas para quantificação e caracterização de ésteres, tais como, ressonância magnética nuclear, cromatografia gasosa, método Lowry-Tinsley e espectroscopia na região do infravermelho (IR), bem como, algumas técnicas são utilizadas para caracterizar os nanotubos de carbono funcionalizados, tais como, IR e microscopia eletrônica de varredura.

3.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Para o sistema em estudo as técnicas de cromatografia gasosa, ressonância magnética nuclear, método colorimétrico Lowry-Tinsley e espectroscopia na região do infravermelho (IR) são ferramentas importantes para caracterização e quantificação de ésteres, bem como as técnicas de espectroscopia na região do infravermelho (IR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) são auxiliares para caracterizar os nanotubos de carbono funcionalizados. Uma breve fundamentação teórica das técnicas analíticas utilizadas neste trabalho está descritas a seguir.

3.5.1 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (GC – gás chromatography) é uma técnica utilizada na separação de misturas de compostos voláteis e seu princípio esta baseado na distribuição dos compostos entre duas fases distintas, uma fase estacionária, podendo ser líquida ou sólida e outra fase móvel, gasosa.⁴⁵

Inicialmente a amostra é introduzida em uma câmara (injetor) e vaporizada, em seguida ela entra através de uma coluna contendo a fase estacionária, os compostos são levados pela fase móvel ao longo da coluna e a interação dos compostos com a fase estacionária irá determinar a saída dos compostos da coluna em tempos diferentes. Os compostos com maior interação com a fase estacionária permanecerão por mais tempo retidos na coluna do que aqueles com menor interação, conseqüentemente apresentando tempos maiores de retenção.⁴⁶

A fase móvel é um gás inerte, geralmente são utilizados nitrogênio, hélio, hidrogênio e argônio. A coluna é um tubo longo contendo a fase estacionária, há vários tipos de colunas disponíveis no mercado e está deve ser escolhida de acordo com os compostos que se deseja separar. A detecção dos compostos de uma amostra é obtida através de um sistema de detecção, existem diversos tipos detectores, sendo o mais comumente utilizado por responder satisfatoriamente há

uma ampla faixa de compostos, o detector de ionização em chama (FID – flame ionization detector). Outros fatores como a pressão do gás de arraste e a temperatura da coluna são importantes na separação dos compostos.⁴⁶

Para a síntese de ésteres a identificação dos compostos baseia-se na comparação dos tempos de retenção dos padrões com a amostra e sua quantificação é efetuada através da integração das áreas dos picos.

3.5.2 Método Lowry-Tinsley

O método Lowry- Tinsley⁴⁷ (1976) é utilizado para determinação de ácidos graxos livres por espectrofotometria, e baseia-se na formação de um complexo azulado (715 nm) formado entre os íons Cu^{2+} (fase aquosa – solução a 5% de acetato de cobre II) e os ácidos graxos livres (**Figura 10**) presentes na fase orgânica. Utilizando uma curva analítica com o ácido graxo correspondente (ácido oleico) é possível calcular o rendimento das reações de esterificação através do desaparecimento do ácido graxo no meio reacional.

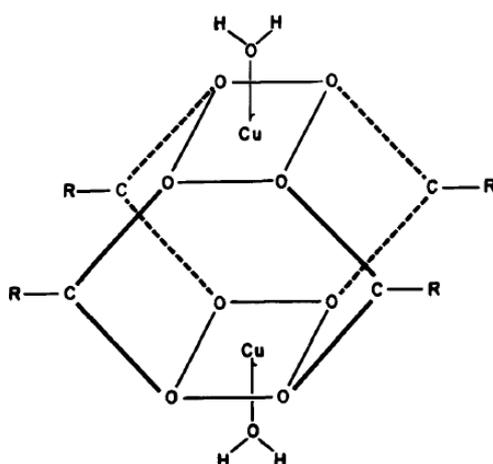


Figura 10 - Estrutura do complexo formado entre os íons Cu^{2+} e os ácidos graxos.

3.5.3 Espectroscopia na região do Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica que permite obter informações sobre a estrutura da molécula, pode ser utilizada para realizar uma análise quantitativa ou qualitativa de compostos orgânicos ou inorgânicos. Esta técnica fundamenta-se na absorção de energia que ocorre nas frequências de vibrações moleculares, acompanhadas da variação do momento dipolar da molécula, sendo a região do espectro situada entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} a mais utilizada.^{48, 49}

O espectro de infravermelho obtido é característico para cada molécula, porém existem certos grupos de átomos que dão origem a bandas que ocorrem em frequências muito próximas, independente da estrutura da molécula, porém é a presença destas bandas características de grupos e consultas em tabelas que permitem a identificação da molécula. A **Tabela 2** apresenta alguns valores-base para absorções de grupos funcionais, porém esses valores podem variar dependendo da função orgânica.^{48, 49}

Tabela 2 - Valores-base para as absorções de grupos funcionais.⁴⁹

Grupo funcional	Número de onda (cm^{-1})
O-H	3400
C-H	3000
C=O	1715
C=C	1650
C-O	1100

A espectroscopia na região do infravermelho é uma ferramenta essencial quando se deseja identificar compostos orgânicos, como é o caso da formação de ésteres, com a utilização de técnicas complementares como a ressonância magnética nuclear pode-se comprovar a formação do composto em estudo. Esta técnica também pode ser utilizada para avaliar a efetividade da funcionalização química realizada em NTCs, através da identificação de grupos funcionais na superfície desse material.

3.5.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é um método de absorção, capaz de estudar vários núcleos, sendo mais usualmente disponíveis o hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C). Ela fornece informações sobre o número de átomos magneticamente distintos do isótopo em estudo. O espectro gerado pela técnica de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos versus as intensidades. Por convenção utiliza-se uma medida independente do campo magnético aplicado, deslocamento químico (δ), com unidade em partes por milhão (ppm) em relação a frequência principal do espectrômetro.^{48, 49}

Nesta técnica o solvente utilizado não deve conter hidrogênios, deve ser inerte e possuir baixo ponto de ebulição, sendo o mais indicado o clorofórmio deuterado (CDCl_3). O composto comumente utilizado como referência é o tetrametilsilano (TMS), pois produz um único sinal de absorção (correspondente exatamente 0,00 ppm), resultado de que seus hidrogênios são mais blindados quando comparado aos hidrogênios da maioria dos compostos orgânicos. O TMS possui algumas características essenciais para um padrão, tais como, ser quimicamente inerte, simétrico, volátil e solúvel na maioria dos solventes orgânicos.^{48, 49}

A técnica de RMN pode ser utilizada para caracterização e quantificação de ésteres obtidos através da reação de esterificação do ácido oleico com etanol.

3.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica muito utilizada em diferentes áreas de pesquisas, pois fornece informações sobre a morfologia de diversas estruturas, sendo está uma análise das características microestruturais da amostra. Essa técnica pode ser empregada em diversos materiais, tais como, metais, cerâmicos, amostras biológicas e polímeros. Possui uma alta resolução, podendo ser observadas amostras na escala de nanômetros.⁵⁰ Sendo uma ferramenta importante para avaliar a morfologia dos nanotubos de carbono.

Portanto a partir dessas considerações, este trabalho teve como finalidade imobilizar a lipase de *A.niger* em nanotubo de carbono (MWCNTs/PVA ou MWCNTs) e este sistema suporte/*A.niger* foi utilizado como catalisador na síntese do oleato de etila.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo imobilizar a lipase nativa de *Aspergillus niger* (*A. niger*) em nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) e /ou em nanocompósitos de MWCNTs e álcool polivinílico (PVA) para posterior aplicação na síntese do oleato de etila.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar o oleato de etila, utilizando a enzima comercial Lipozyme 435 para obtenção do padrão a ser utilizado na quantificação dos ésteres obtidos pela enzima nativa de *Aspergillus niger* (*A. niger*), através da cromatografia gasosa.
2. Caracterizar o padrão pelas técnicas espectroscópicas de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H).
3. Otimizar as condições experimentais na síntese do oleato de etila, aplicando análise multivariada, utilizando o planejamento composto central (CCD) e metodologia de superfície de resposta (RMS).
4. Funcionalizar os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) utilizando diferentes métodos ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$, H_2O_2 e KOH) e caracterizá-los através das técnicas de FT-IR e microscopia eletrônica de varredura (MEV).
5. Utilizar os MWCNTs funcionalizados e sem tratamento na preparação dos filmes (nanocompósitos-MWCNTs/PVA), empregando diferentes metodologias, com o intuito de obter a melhor dispersão dos nanotubos de carbono no filme.
6. Imobilizar a lipase de *A.niger* no(s) filme(s) definido(s) no item 5.

7. Imobilizar a lipase nativa de *A.niger* utilizando apenas os MWCNTs funcionalizados e não funcionalizado em solução tampão fosfato, sem a presença do PVA.
8. Avaliar a eficiência da lipase de *A.niger* imobilizada nos suportes do item 6 e 7 na síntese do oleato de etila a partir do ácido oleico e etanol.
9. Utilizar os mesmos suportes do item 6 e 7 na ausência da lipase na síntese do oleato de etila.
10. Determinar as conversões do oleato de etila por cromatografia gasosa e método Lowry-Tinsley.
11. Validar o método de quantificação utilizando RMN ¹H.

5 METODOLOGIA

Os métodos descritos para este projeto foram adaptados com base em referências da literatura e todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Inicialmente, foi realizada a síntese do oleato de etila utilizando a lipozyme 435 uma enzima comercial para obtenção do padrão. Posteriormente, realizou-se a otimização das condições reacionais para a síntese do oleato de etila utilizando uma lipase nativa de *A.niger*, nesta etapa a lipase foi utilizada em sua forma livre. Para a otimização foi empregado o planejamento fatorial com superfície de resposta, tendo como variáveis a temperatura, proporção ácido oleico/ etanol e concentração da lipase.

Em paralelo a otimização das condições reacionais foi realizada a funcionalização dos MWCNTs utilizando diferentes métodos. Posteriormente foram preparados vários filmes MWCNTs/PVA, utilizando os MWCNTs funcionalizados (MWCNTs-F) e sem tratamento (MWCNTs-pristine), através de diferentes metodologias, com a finalidade de obter a melhor dispersão dos MWCNTs para imobilização da lipase. A última etapa desse trabalho consistiu em realizar a esterificação do ácido oleico com etanol na condição ótima da lipase de *A.niger* em sua forma livre imobilizada nos filmes MWCNTs/PVA/lipase, bem como, MWCNTs/lipase.

A **Figura 11** apresenta um esquema das etapas que foram realizadas neste trabalho. O procedimento que foi utilizado em cada etapa está descrito nas próximas subseções.

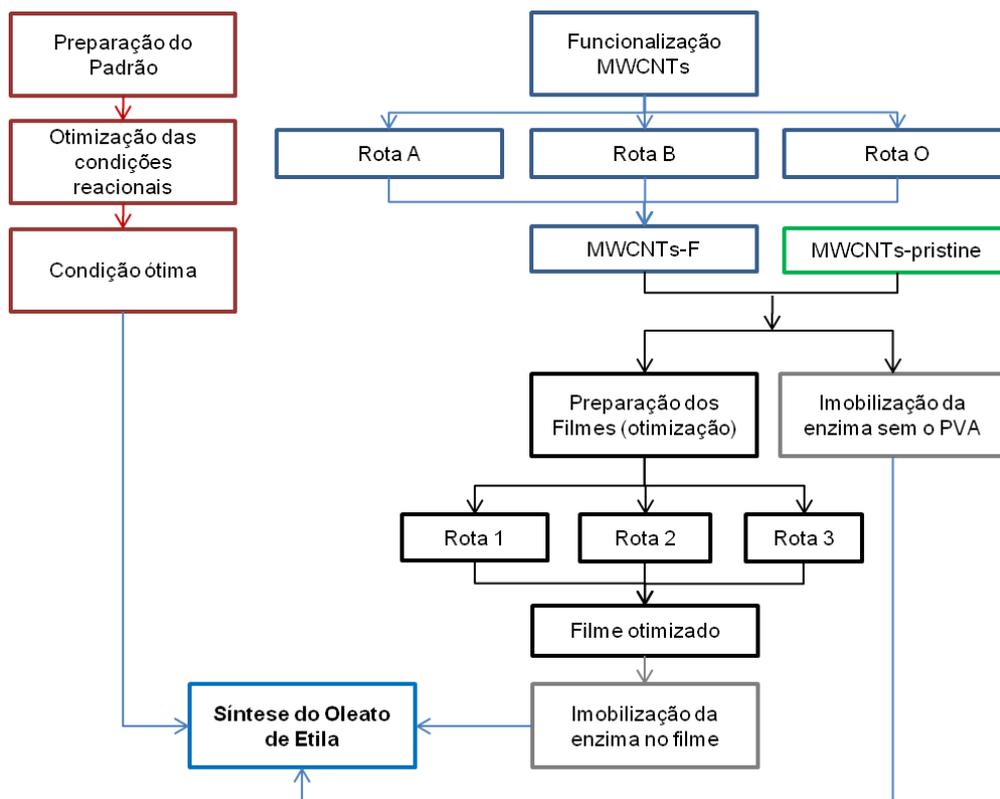


Figura 11- Representação esquemática das etapas realizadas neste trabalho.

5.1 PREPARAÇÃO DO PADRÃO

O oleato de etila utilizado como padrão na quantificação da síntese do oleato de etila a partir do ácido oleico e etanol, através da cromatografia gasosa foi obtido empregando uma enzima comercial que possui excelente capacidade de conversão em éster, de acordo com estudos prévios no grupo de pesquisa. Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 25 mg da lipase comercial Lipozyme 435, 10 mmol do ácido oleico (~3,2 mL), 10 mmol de etanol (~0,59 mL) e 25 mL de hexano. O sistema foi deixado sob agitação à 150 rpm em um agitador tipo Dubnoff, com banho termostatizado, a temperatura de 35°C, por 24 horas. Ao término da reação filtrou-se a solução para remoção da lipase. O produto obtido foi concentrado através do rotaevaporador e posteriormente, o produto obtido caracterizado por técnicas espectroscópicas de Infravermelho (FT-IR) e Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H).

5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADO PELA LIPASE NATIVA *A. NIGER*

Para a otimização das condições experimentais foi realizado um planejamento composto central (CCD) com metodologia de superfície de resposta (RMS), e após a construção do modelo foi avaliado sua capacidade de previsão, utilizando a análise de variância (ANOVA), a escolha das variáveis e seus níveis foram definidos com base na literatura e estudos prévios realizados no grupo de pesquisa.

Temperatura, proporção ácido oleico:etanol e concentração da lipase de *A.niger* (usada na sua forma livre) foram definidos como variáveis independentes, e a conversão em oleato de etila como variável dependente, a combinação das variáveis independentes foi utilizada para otimização das condições reacionais na síntese do oleato de etila. A lipase de *A. niger* foi utilizada na sua forma livre, sendo recebida de doação da prof^a. Patrícia da USF (Universidade de São Francisco), apresentando-se na forma liofilizada. As variáveis e os níveis utilizados no planejamento estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Níveis das variáveis independentes para síntese do oleato de etila.

Variáveis independentes	Níveis das variáveis				
	-1	$-\alpha$	0	$+\alpha$	+1
Razão molar ácido oleico: etanol(mmol) (x_1)	1:1	1:0,32	1:2	1:3,68	1:3
Massa da lipase (mg) (x_2)	25	8	50	92	75
Temperatura (°C) (x_3)	30	20	45	70	60

Para este estudo foi utilizado um conjunto de 17 experimentos, incluindo 2^3 experimentos fatoriais (variáveis codificadas entre -1,+1), 6 pontos estrela(variáveis codificadas entre $-\alpha,+\alpha$) e 3 repetições no ponto central (variáveis codificadas em 0). Para os pontos estrela foi utilizado o conceito de rotabilidade, sendo à distância dos pontos estrela ao ponto central dada por $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$, onde k é o número de variáveis ($\alpha = 2^{3/4} = 1,68$). Os níveis definidos nos pontos estrela foram obtidos de acordo com a Equação (1).⁵¹

$$x_0 = \left(x_c \cdot \frac{\Delta}{2} \right) + PC \quad \text{Equação (1)}$$

Onde, x_0 e x_c são as condições originais e codificadas, respectivamente, PC é a condição no ponto central e Δ é a diferença entre os valores originais dos níveis +1 e -1. Os valores codificados das variáveis independentes para a realização dos experimentos para a síntese do oleato de etila são apresentados na **Tabela 4**.

Cada um dos 17 experimentos foi realizado nas condições definidas pelo CCD, o procedimento utilizado foi o mesmo descrito no item 5.1, entretanto alíquotas em 6, 12 e 24 horas foram retiradas, a fim de otimizar o menor tempo e as maiores conversões em oleato de etila. Ao término da reação o produto foi separado da lipase através da filtração, e as amostras quantificadas por cromatografia gasosa (GC-FID) e pelo método Lowry-Tinsley.

Após a otimização dos parâmetros reacionais, viu-se a necessidade de fazer novos estudos variando a massa da lipase com a finalidade de reduzir o custo e tornar o processo mais atrativo. Para este estudo seguiu o procedimento já descrito anteriormente, porém as quantidades da lipase estudada foram de 5, 15 e 25 mg e as alíquotas retiradas nos tempos de 3 e 6 horas.

Tabela 4 - Planejamento composto central para síntese do oleato de etila.

Experimento	Variáveis independentes		
	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

5.3 FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO

Para a funcionalização dos nanotubos foram utilizados nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) comercial da marca Aldrich, teor de carbono superior a 98%, diâmetro externo $10\pm 0,1$ nm, diâmetro interno $4,5\pm 0,5$ nm e comprimento 3-6 μ m. Os MWCNTs foram funcionalizados empregando três rotas distintas:

Rota A -Em um balão de fundo redondo foram adicionados 20 mg de MWCNTs, 10 mL de solução de ácido nítrico (HNO_3 - 3,0 mol/L) e 10 mL de solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4 - 3,0 mol/L), a mistura permaneceu sob agitação em refluxo durante 6 horas;

Rota B -Em um balão de fundo redondo foram adicionados 100 mg de MWCNTs, 5 g de hidróxido de potássio (KOH) e 100 mL de etanol, a mistura permaneceu sob agitação em refluxo durante 8 horas;

Rota O – Em um balão de fundo redondo foram adicionados 20 mg de MWCNTs e 80 mL de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 -30%), a mistura permaneceu sob agitação em refluxo durante 2 horas.

Posteriormente a cada uma das rotas A, B e O, os MWCNTs foram separados da solução por centrifugação (5000 rpm) e lavados com uma solução água/etanol (1:1 v/v) até pH 7. Após a lavagem os MWCNTs-F foram secos em estufa a 50°C. A morfologia dos MWCNTs-F foi analisada através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), e a sua caracterização realizada pela técnica de FT-IR.

Os MWCNTs-F são referidos no trabalho utilizando as seguintes siglas: MWCNTs-A (nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento ácido – Rota A); MWCNTs-B (nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento básico – Rota B); MWCNTs-O (nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento com peróxido de hidrogênio – Rota O).

5.4 PREPARAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS MWCNTs/PVA

Para a preparação dos nanocompósitos (MWCNTs/PVA) em forma de filme, primeiramente adicionou-se 500 mg de álcool polivinílico (PVA) em um béquer de 100 mL e 10 mL de água deionizada, a mistura foi mantida sob agitação e aquecimento (70°C) até completa solubilização do PVA.

Para a preparação dos filmes foram utilizadas três diferentes metodologias (**Figura 12**), em cada um dos métodos o procedimento de preparação dos nanocompósitos de MWCNTs/PVA foi composto de três etapas principais: dispersão dos MWCNTs em solvente, mistura dos MWCNTs em PVA previamente solubilizado e posterior secagem da mistura em placas de petri para formação do filme (nanocompósito). Em cada uma das rotas foram utilizados os nanotubos de carbono MWCNTs-A, MWCNTs-B, MWCNTs-O e MWCNTs-pristine. Para a preparação dos filmes seguiu as rotas 1,2 e 3, conforme descritas abaixo.

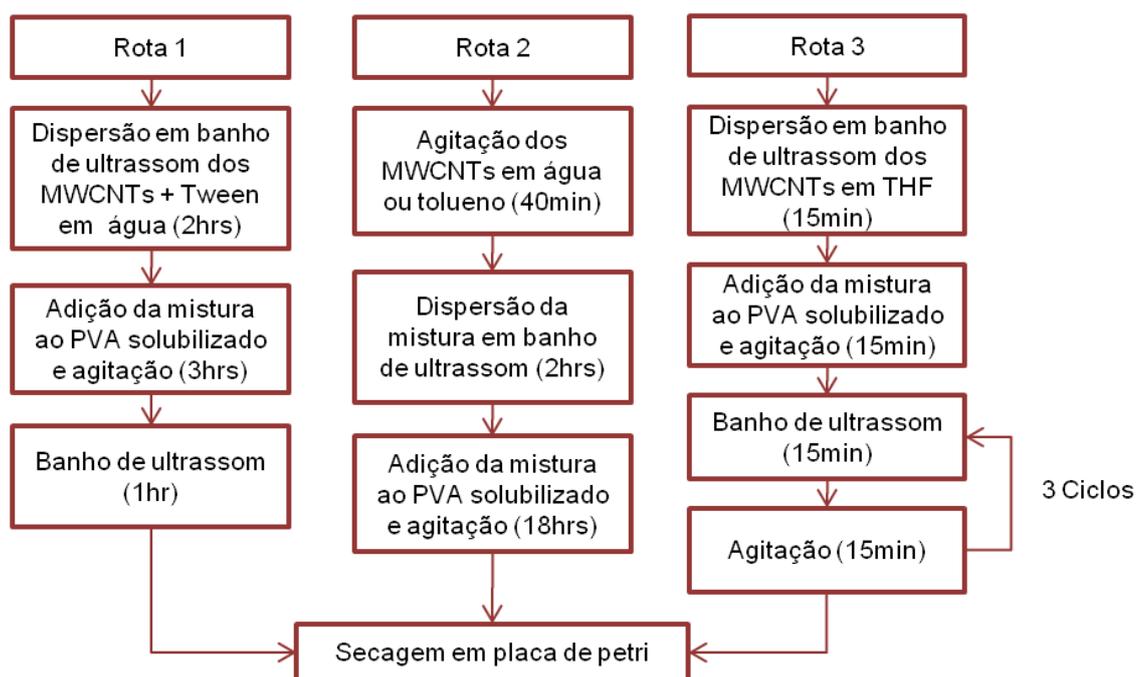


Figura 12- Representação esquemática das rotas utilizadas na preparação dos filmes.

Rota 1: Em um béquer de 50 mL foram adicionados 5 mg de MWCNTs, 7,5 mg de surfactante Tween 80 e 10 mL de água deionizada, a mistura foi dispersa em banho de ultrassom por 2 horas. Em outro béquer conforme descrito anteriormente realizou-se a solubilização do PVA. Posteriormente, a solução do MWCNTs dispersa foi adicionado ao PVA previamente solubilizado e mantido sob

agitação por 3 horas, após este período a mistura permaneceu por mais 1 hora em banho de ultrassom. Ao término deste ciclo a mistura foi transferida para uma placa de petri e mantida a 40°C, em banho termostatizado, até completa secagem do material e formação do filme.

Rota 2 e 2^T: Em um béquer de 50 mL foram adicionados 5 mg de MWCNTs e 10 mL de solvente (água deionizada (2) ou tolueno (2^T)), e mantidos sob agitação constante durante 40 minutos. Após a agitação a mistura foi dispersa em banho de ultrassom por 2 horas. Após este período a solução dispersada foi adicionada ao PVA previamente solubilizado e mantido sob agitação por 18 horas. Ao término desse ciclo a mistura foi transferida para uma placa de petri e mantida a 40°C, em banho termostatizado, até completa secagem do material e formação do filme.

Rota 3: Em um béquer de 50 mL foram adicionados 5 mg de MWCNTs e 5 mL de Tetrahidrofurano (THF), a mistura foi dispersa em banho de ultrassom por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se esta solução ao PVA previamente solubilizado e manteve-se por 15 minutos sob agitação em agitador magnético. Após este período a mistura foi novamente colocada em um banho de ultrassom, o qual permaneceu por mais 15 minutos. Realizou 3 ciclos dessa sequência (ultrassom – agitador magnético-ultrassom). Ao término da sequência dos três ciclos a mistura foi transferida para uma placa de petri e mantida a 40°C, em banho termostatizado, até completa secagem do material e formação do filme.

Para verificar a melhor dispersão dos nanotubos de carbono unidos a formação de um filme homogêneo foram preparados 16 filmes decorrentes da combinação das diferentes rotas de preparação dos filmes (1,2 e 3) e a utilização dos diferentes nanotubos de carbono funcionalizados (A, B e O) e sem funcionalizar (pristine). Os nanocompósitos selecionados para suporte na imobilização da lipase de *A.niger* foram aqueles que apresentaram maior dispersão visualmente.

Os nanocompósitos (filmes) preparados são referidos no decorrer do trabalho utilizando as siglas dos nanotubos de carbono funcionalizados (MWCNTs-A, MWCNTs-B, MWCNTs-O e MWCNTs-pristine), adicionando a frente dessas siglas a numeração 1, 2, 2^T e 3 que representam a rota que o filme foi preparado. Ao final dessa sigla é adicionando a letra P que representa o polímero (PVA). Exemplo: 1MWCNTs-A/P, nanocompósito preparado através da rota 1, utilizando os nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento ácido e PVA.

5.5 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NATIVA DE *A. NIGER*

Primeiramente foram definidos os nanocómpósitos que seriam utilizados para imobilização da lipase de *A. niger* de acordo com o item 5.4. Para imobilizar a lipase de *A.niger* nos filmes (nanocompósitos) foram utilizadas as mesmas metodologias de preparação dos filmes descrita no item 5.4, com o adicional que antes de colocar a mistura para secagem em placas de petri, foi adicionado a lipase de *A. niger*(15 mg). Esta mistura foi agitada por 30 min em agitador magnético e posteriormente esta solução foi colocada em placas de petri e esta submetida à secagem a 40°C. Para referenciar ao longo do texto os filmes com a lipase de *A.niger* imobilizada a letra E foi adicionada ao final da sigla do filme (ex: 1MWCNTs-B/P-E lipase de *A.niger* imobilizada no nanocompósito preparado através da rota 1, utilizando os nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento básico e PVA).

A lipase de *A.niger* também foi imobilizada sem a presença do PVA, utilizando apenas os nanotubos de carbono, empregando a seguinte metodologia: em um béquer de 50 mL foram adicionados 5 mL de solução tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 15 mg de lipase de *A. niger* e 5 mg de NTCs (MWCNTs-B, MWCNTs-O ou MWCNTs-pristine), a mistura permaneceu sob agitação por 24 horas. Ao término desse ciclo a mistura foi mantida a temperatura de 40°C, em banho termostatizado, para completa secagem do material. Para referenciar a lipase de *A.niger* imobilizada apenas nos MWCNTs, a letra E foi adicionada ao final da sigla dos MWCNTs (ex: MWCNTs-B-E lipase de *A. niger* imobilizada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas submetidos ao tratamento básico).

5.6 SÍNTESE DOS OLEATOS DE ALQUILA VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA

Os filmes preparados de acordo com o item 5.5, foram cortados em secções de volumes regulares de aproximadamente 2mm² para posteriormente serem utilizados como catalisadores na síntese do oleato de etila. Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados a lipase de *A. niger* imobilizada, 1 mmol do ácido oleico

(~0,316 mL), 1 mmol de etanol (~0,058 mL) e 25 mL de hexano. O sistema foi deixado sob agitação à 150 rpm em um agitador tipo Dubnoff, com banho termostaticado, a temperatura de 30°C, por 6 horas. Ao término da reação filtrou-se a solução para remoção da lipase de *A. niger* imobilizada. O produto obtido foi quantificado por GC-FID e método Lowry-Tinsley .

5.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS

5.7.1 Espectroscopia na região do infravermelho – FT-IR

Para as análises dos MWCNTs e dos padrões, ácido oleico e o oleato de etila obtido via enzimática, foi utilizado um equipamento da marca Varian-640-IR.

A caracterização dos padrões (oleato de etila e ácido oleico) foi realizada no modo de refletância total atenuada (ATR), utilizando um acessório de ATR (PIKE), os espectros foram obtidos em modo de transmissão.

Os MWCNTs-F foram caracterizados em modo de absorção, empregando pastilhas de KBr, com concentração de 0,1% (m/m).

5.7.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear – RMN ¹H

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas em um equipamento Bruker DPX-200 de 4.7 Tesla. Todas as amostras foram preparadas em tubos de ressonância adicionando-se 5 mg do composto e 0,6 mL do solvente (clorofórmio deuterado - CDCl₃) contendo 0,03% v/v de tetrametilsilano (Si(CH₃)₄-TMS) como referência interna. Os espectros foram obtidos para núcleos de ¹H.

5.7.3 Cromatografia gasosa – GC-FID

A quantificação na síntese do oleato de etila via catálise enzimática ocorreu comparando os tempos de retenção dos padrões (ácido oleico e oleato de etila) com a amostra e integrando a área dos picos. A porcentagem em éster foi obtida de acordo com a Equação (2), onde A_e e A_a são a área do éster e do ácido oleico respectivamente.

$$\% \text{ ester} = \frac{\sum A_e}{\sum A_a + A_e} \cdot 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Como padrões foram utilizados o ácido oleico (comercial, 99,5%, Alphatec) e o oleato de etila sintetizado via enzimática com a lipozyme 435. As amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu GC-17A com detector FID, equipado com coluna capilar HP-INNOWAX, com 30 m de comprimento, 0,250 mm de diâmetro interno, 0,25 μm espessura do filme. A temperatura do detector FID foi de 260°C, a relação split de 1:9, e a quantidade de amostra injetada igual a 1,0 μm . Como gás de arraste foi utilizado nitrogênio, programação de temperatura utilizada no forno foi de 80°C a 240°C na razão de 10°C/min, permanecendo por 9 min. Fluxo do gás de arraste 1 mL/min, pressão na coluna de 101KPa. O tempo total da corrida foi de 25 min.

5.7.4 Método Lowry-Tinsley

O método Lowry-Tinsley é um método indireto para determinação da conversão em oleato de etila, através desse método é medido o teor de ácido oleico residual na amostra.

Inicialmente, foi obtida uma curva analítica, onde foram preparadas amostras contendo entre 0,1 e 2 mmol de ácido oleico, dissolvido em balões volumétricos de 25 mL com hexano. Em seguida 0,5 mL de cada solução inicial do ácido foram diluídas em balões volumétricos de 10 mL contendo hexano. Posteriormente 3 mL da solução final contendo o ácido oleico foram adicionados a 7,5 mL do reagente de

Lowry (solução a 5% de acetato de cobre II – pH 6,0-6,2 corrigido previamente com piridina) formando duas fases que foram misturadas durante 1 min usando um misturador vórtex. Posteriormente a mistura foi centrifugada por 10 min, observando a separação de duas fases: aquosa e orgânica. A curva analítica foi determinada a partir da medida da absorvância da fase orgânica a 715 nm, utilizou um branco como controle que não continha o ácido oleico. O equipamento utilizado foi um ultravioleta visível da marca Varian Cary 50.

Para a determinação do ácido oleico residual nas amostras, foram adicionados 0,5 mL da amostra a ser analisada em balões volumétricos de 10 mL contendo hexano. Posteriormente foi seguido o mesmo procedimento de preparação da curva. A conversão em éster (%) foi determinada a partir da concentração de ácido oleico no meio, relacionando a absorvância através da curva de calibração.

5.7.5 Microscopia eletrônica de varredura

A análise da morfologia dos nanotubos de carbono foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura. Os materiais foram dispostos, na forma de pó, sobre uma fita adesiva dupla face de carbono previamente coladas sobre o porta amostras. Todas as amostras foram metalizadas com ouro.

As análises foram efetuadas em um microscópio da ZEISS modelo EVO MA15, sendo a tensão máxima aplicada às análises de 20 kV. As imagens foram geradas por um detector de elétrons secundários, com ampliações que variaram de 500 a 15 000 vezes. As condições de operação, como a distância de trabalho (WD), tensão aplicada (EHT) e ampliação das imagens estão disponíveis nas micrografias.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 CARACTERIZAÇÃO DO OLEATO DE ETILA

O padrão oleato de etila foi sintetizado a partir do ácido oleico e etanol, utilizando a enzima comercial lipozyme 435. A estrutura química desse material foi confirmada a partir dos espectros de FT-IR e RMN de ^1H .

Devido às interações intermoleculares os ácidos carboxílicos formam dímeros através de ligações hidrogênio. Dímeros de ácidos graxos apresentam um deslocamento da frequência de estiramento da carbonila (C=O) em números de onda menores. Dessa forma para os monômeros de ácidos graxos é observado um estiramento em 1760 cm^{-1} , enquanto que para os dímeros ocorre entre $1720\text{--}1706\text{ cm}^{-1}$.^{48, 49} O espectro de infravermelho do ácido oleico (**Figura 13a**) indica a presença do dímero, evidenciado pelo estiramento C=O em 1709 cm^{-1} , logo no espectro do oleato de etila (**Figura 13b**) o respectivo estiramento aparece em 1738 cm^{-1} , indicando que não há a presença dessas interações intermoleculares.

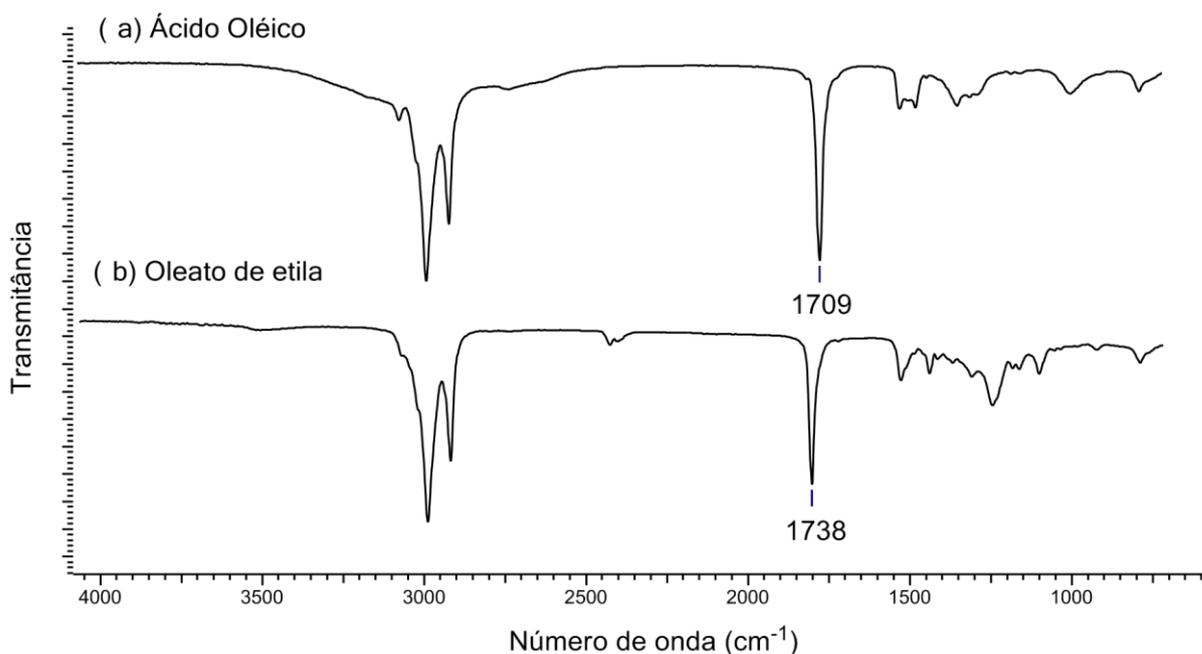
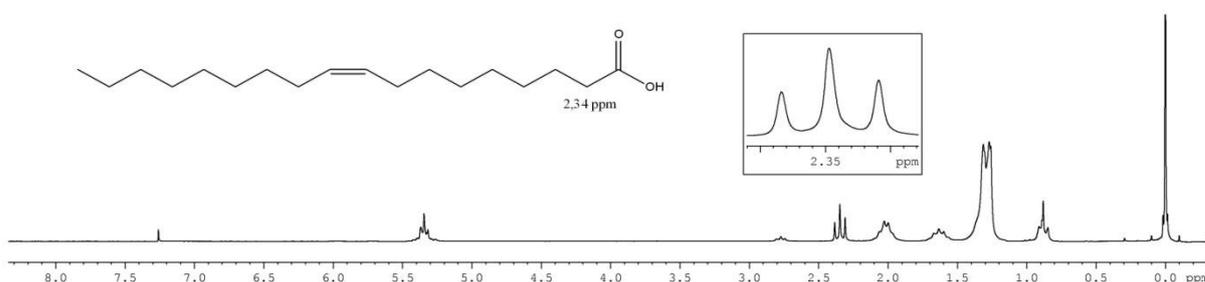


Figura 13- Espectros de FT-IR/ATR do (a) ácido oleico e (b) oleato de etila.

A confirmação da síntese do ácido oleico (**Figura 14a**) em oleato de etila (**Figura 14b**) foi realizada através do espectro de RMN ^1H . Observa-se o aparecimento de um quarteto em $\delta=4,12$ ppm, referente aos prótons do CH_2 da etila da função éster, o triplete relativo ao CH_2 ligado diretamente ao $\text{C}=\text{O}$ aparece nos dois espectros, porém com deslocamentos químicos diferentes, $\delta=2,28$ ppm (éster) e $\delta=2,35$ ppm (ácido), essa diferença é notada pois o ambiente químico que cada H experimenta é diferente em cada composto, tais características comprovam a formação do produto desejado.

(a) Ácido Oleico



(b) Oleato de etila

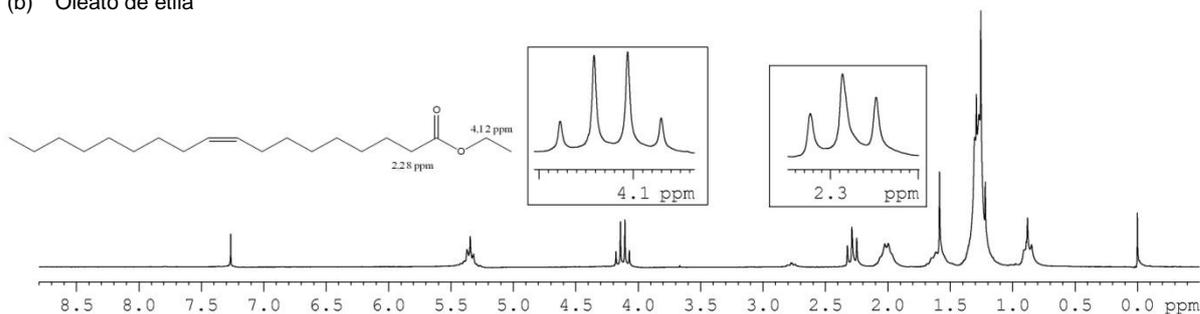


Figura 14 - Espectros de RMN de ^1H (a) ácido oleico e (b) oleato de etila. (200 MHz, CDCl_3)

Assim após confirmar a conversão do ácido oleico em oleato de etila pelas técnicas utilizadas, o produto obtido (oleato de etila), bem como seu precursor (ácido oleico) foram utilizados como padrões na quantificação por GC-FID do oleato de etila obtido utilizando a lipase de *A. niger*.

6.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS

Para a otimização das condições reacionais foram retiradas alíquotas em 6, 12 e 24 horas de reação, entretanto apenas as alíquotas de 6 horas foram

quantificadas através de duas metodologias (GC-FID e Lowry-Tinsley). As alíquotas retiradas nos tempos de 12 e 24 horas não foram quantificadas, pois as amostras em 6 horas de reação já apresentaram alto grau de conversão em oleato de etila.

Para avaliar a condição ótima da reação, foram variados os seguintes parâmetros: razão molar (x_1 , 1:0,32-1:3,68), concentração do biocatalisador (x_2 , 8-92 mg) e temperatura (x_3 , 20-70°C). A fim de estudar a interação destes fatores foram realizados experimentos variando os parâmetros em níveis e utilizado um planejamento fatorial (CCD).

A quantificação pelo método do GC-FID do oleato de etila obtido a partir do ácido oleico e etanol para os 17 experimentos utilizados no planejamento fatorial foi realizada comparando os tempos de retenção dos padrões com a amostra e integrando as áreas dos picos. A **Figura 15** mostra um cromatograma com a sobreposição dos padrões (ácido oleico e oleato de etila obtido via enzimática) e a amostra do experimento 1.

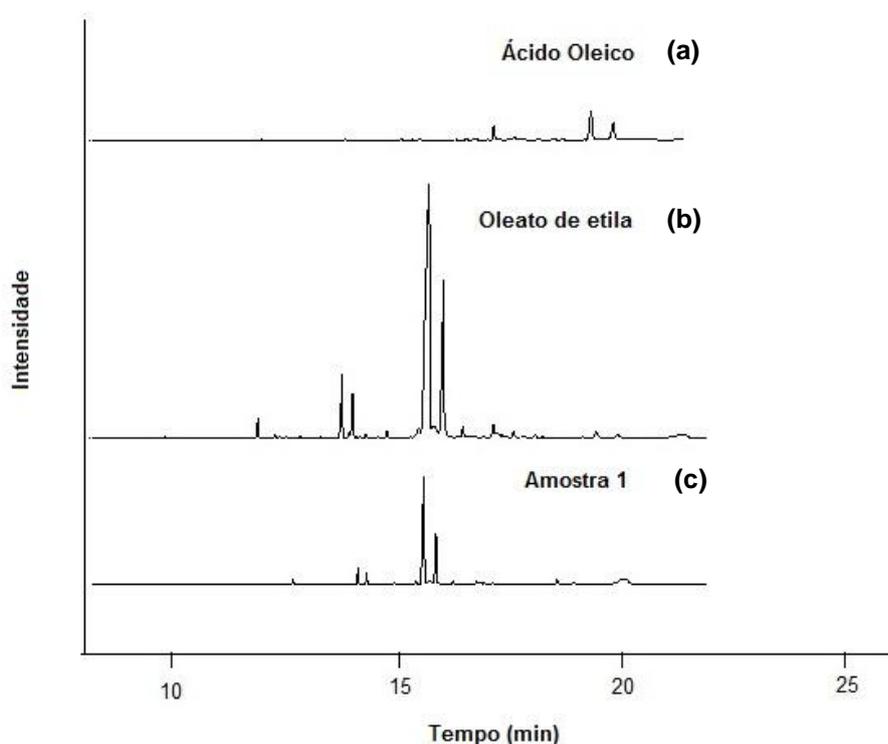


Figura 15 – Cromatograma dos compostos (a) ácido oleico, (b) oleato de etila e (c) amostra do experimento 1, por GC-FID. Condições de análises: Inj. = 240°C, Det. = 260°C, programação: 80°C 10°C/min 240°C, split 1:9, Pressão do N₂ = 101 kPa

O cromatograma da **Figura 15** mostra que os tempos de retenção do ácido oleico são 16,7, 19,1 e 19,6 min (**Fig. 15a**), e do oleato de etila são 13,4, 13,7, 15,4 e 15,7 min (**Fig. 15b**). Após a identificação dos picos dos padrões, determinou-se a

porcentagem de conversão do ácido oleico em oleato de etila para a amostra do experimento 1 (**Fig. 15c**), de acordo com a Equação (2), pág 47, tendo como resultado 96,01% de conversão em éster. Para as demais amostras quantificadas por GC-FID o mesmo procedimento foi realizado.

Após a quantificação das reações no tempo de 6 horas nas diferentes condições reacionais, tais como, temperatura, concentração da lipase e razão molar, o comportamento do sistema foi avaliado construindo inicialmente um modelo quadrático completo, dado pela Equação (3)⁴⁴.

$$y = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \sum_i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_i \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Equação (3)}$$

Os resultados experimentais obtidos por GC-FID utilizados para construção do modelo, bem como, a resposta prevista pelo modelo e os níveis codificados do planejamento fatorial (valores decodificados apresentados na Tabela 3, pág. 40), estão descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Planejamento composto central completo, resultados experimentais e resposta prevista pelo modelo¹.

Experimento	Variáveis independentes			Resultado experimental (GC-FID) Oleato de etila (%)	Resposta prevista pelo modelo
	x ₁	x ₂	x ₃		
1	-1	-1	-1	96,01	87,54
2	+1	-1	-1	98,39	98,48
3	-1	+1	-1	95,24	88,44
4	+1	+1	-1	81,75	85,89
5	-1	-1	+1	95,50	85,82
6	+1	-1	+1	96,74	98,01
7	-1	+1	+1	94,91	89,28
8	+1	+1	+1	85,05	87,98
9	-1,68	0	0	58,67	74,20
10	+1,68	0	0	89,98	82,29
11	0	-1,68	0	90,86	98,18
12	0	1,68	0	89,98	90,51
13	0	0	-1,68	95,22	99,12
14	0	0	1,68	95,48	99,42
15	0	0	0	98,18	97,58
16	0	0	0	97,88	97,58
17	0	0	0	98,06	97,58

¹ Modelo quadrático de acordo com a equação 3.

Na **Tabela 5** é possível observar que a resposta prevista pelo modelo na maioria dos experimentos apresenta valores diferentes dos resultados experimentais, isso reflete diretamente no ajuste do modelo, quanto maior a diferença entre os resultados esperados e obtidos experimentalmente, maior será o

erro associado no modelo a ser ajustado. A fim de verificar o ajuste do modelo quadrático construído foi aplicado o teste estatístico ANOVA (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Análise de variância (ANOVA)

Parâmetro	Soma Quadrática	Graus de liberdade	F calculado
Regressão (SQR)	1078,53	9	1,28
Resíduo (SQres)	656,20	7	
Falta de Ajuste (SQfaj)	656,15	5	

Os parâmetros como a soma quadrática dos resíduos (SQres) nos fornecem informações do que está sendo modelado pelos coeficientes da regressão, logo para adequar-se ao modelo, o valor obtido deve ser o menor possível e a soma quadrática falta de ajuste (SQfaj) também deve resultar em um valor baixo para que o modelo possa ser ajustado à equação 3.^{43, 51}

Logo após aplicar o teste ANOVA no modelo proposto observou-se que de acordo com a **Tabela 6**, os valores elevados para os parâmetros SQres (656,20) e SQfaj (656,15) evidenciaram que o modelo não se ajusta a equação quadrática, porém o erro puro calculado para as réplicas apresentou um valor baixo (0,04), indicando que não existem erros significativos associados aos experimentos realizados. No entanto através dos valores SQres, SQfaj e do teste F indicam que o modelo pode ser considerado estatisticamente não significativo, sendo que o teste F com 95% de confiança, apresentou valores menores para $F_{\text{calculado}}$ (1,28) do que o F_{tabelado} (3,18), característica de que o modelo não é preditivo. O teste F calculado é a razão entre a soma dos quadrados da regressão e a soma dos quadrados dos resíduos, quanto maiores os valores de F mais significativo é o modelo, pois consequentemente apresenta menores valores para os resíduos.

Após a verificação do ajuste ao modelo construído, através dos seguintes parâmetros estatísticos SQres, SQfaj e do teste F, foi possível concluir que os parâmetros reacionais, tais como, temperatura, massa de lipase e razão molar, selecionados para avaliar a influência na reação de síntese do oleato de etila não se ajustam a equação quadrática, foi então aplicado um modelo linear retirando os pontos estrela do planejamento, porém novamente o modelo resultou em falta de ajuste (SQres = 479,60 e SQfaj = 426,51), não sendo possível obter o gráfico de superfície de resposta.

Quando se trabalha com RMS a escolha da faixa inicial de variação dos fatores é essencial, pois a escolha de valores inequívocos pode provocar erros no modelo.⁴⁴ Logo a falta de ajuste no modelo decorre provavelmente do fato de se trabalhar em condições ideais a partir dos níveis das variáveis escolhidas, prontamente ao alterar as condições experimentais não há alteração significativa na resposta.

A quantificação do oleato de etila através do método Lowry-Tinsley para os 17 experimentos utilizados no planejamento fatorial foi realizada utilizando uma curva de calibração. A **Figura 16** apresenta a curva de calibração obtida juntamente com a regressão linear (equação da reta).

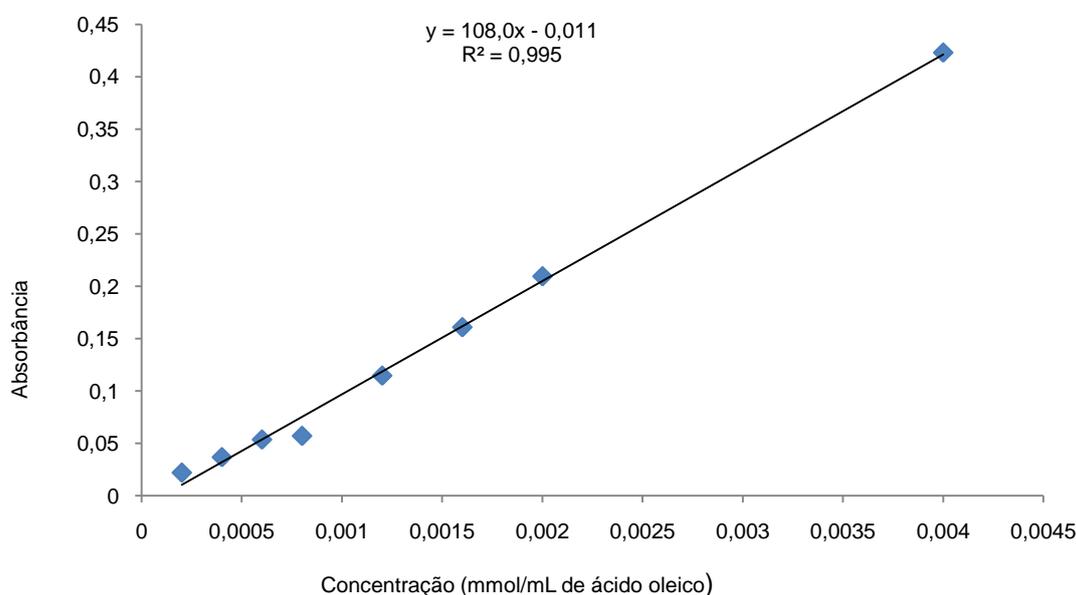


Figura 16 – Curva de calibração construída com ácido oleico (0,1 a 2 mmol) a 715 nm, onde a equação de reta e o coeficiente de determinação foram: $y=108x-0,011$ e $R^2 = 0,995$.

Após obtenção da curva de calibração (**Figura 15**) verificou-se que o coeficiente de determinação apresentou um valor igual a $R^2 = 0,995$, tornando válida a equação obtida através da regressão linear. A quantificação das amostras pelo método Lowry-Tinsley foi realizada utilizando a equação da reta ($y = 108,0x - 0,011$) obtida pela regressão linear e os resultados obtidos para os 17 experimentos do planejamento fatorial são apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Resultados para conversão do oleato de etila nos 17 experimentos do planejamento fatorial, através do método Lowry-Tinsley.

Experimento	Conversão em Oleato de etila (%) (Lowry-Tinsley)	Experimento	Conversão em Oleato de etila (%) (Lowry-Tinsley)
1	90,12	10	91,23
2	81,27	11	82,75
3	86,85	12	93,82
4	93,61	13	89,33
5	67,57	14	82,48
6	75,60	15	91,02
7	76,32	16	91,44
8	75,37	17	97,08
9	66,94		

Ao analisar os resultados experimentais obtidos por GC-FID (Tabela 5) e Lowry-Tinsley (Tabela 7) observa-se uma divergência nos valores quando comparado às duas metodologias. Segundo MADALOZZO⁵² que utilizou em seu trabalho o método Lowry-Tinsley para quantificar a síntese do oleato de etila utilizando uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae*, comprovou a validade do método por meio da GC por padronização interna, obtendo valores muito próximos de conversão em éster ao final da reação através das duas metodologias, GC (78,4% em 90 min) e Lowry-Tinsley (79% ± 1,4 em 90 min). Logo se esperava uma aproximação dos resultados de conversão em oleato de etila através das duas metodologias utilizadas neste trabalho, porém isso não ocorreu, portanto a partir dos resultados obtidos optou-se por utilizar as duas metodologias para quantificação dos demais experimentos.

Os resultados experimentais para as 17 amostras do planejamento fatorial obtidos pelo método Lowry-Tinsley também foram utilizados para construção do modelo quadrático e linear, porém novamente nenhum dos modelos pôde ser ajustado, não sendo possível obter a superfície de resposta.

Como não foi possível obter graficamente a otimização das condições reacionais, optou-se em utilizar as condições que apresentassem uma melhor relação de custo-benefício, tal como, menor temperatura, menores massa da lipase e razão molar, relacionados com uma maior conversão. Para atingir esta relação custo-benefício-rendimento, o melhor resultado obtido foi com o experimento 1, pois comparativamente aos outros resultados obteve-se um alto rendimento (96% de conversão em éster) em menores temperatura (30°C), concentração de enzima

(25 mg) e proporção ácido:álcool (1:1mmol), logo estes parâmetros foram definidos como condições reacionais ótimas.

Com o intuito de reduzir ainda mais a massa da lipase de *A.niger* e o tempo reacional novos experimentos foram propostos, sendo que para este estudo fixou a temperatura em 30°C e razão molar ácido oleico:etanol (1:1 mmol). Variou-se apenas a concentração da lipase de *A.niger* entre 5-25 mg, bem como, o tempo reacional, onde foram retiradas alíquotas em 3 e 6 horas de reação. Para este estudo as alíquotas foram quantificadas pelos métodos GC-FID e pelo método colorimétrico Lowry-Tinsly. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Otimização da massa da lipase de *A.niger* e tempo reacional na reação de esterificação do ácido oleico e etanol.

Massa de <i>A.niger</i> (mg)	Tempo (horas)	Resultado experimental Oleato de etila (%)	
		GC-FID	Lowry-Tinsley
5	3	42,38	34,33
5	6	64,49	44,07
15	3	74,54	31,11
15	6	91,33	66,23
25	3	83,90	65,88
25	6	96,01	90,12

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 8**, observa-se que as conversões do ácido oleico em oleato de etila, variaram entre 42,38-96,01% e 34,33-90,12%, pelos métodos GC-FID e Lowry-Tinsley, respectivamente. Nota-se que quanto maior a quantidade de lipase, maior a taxa de conversão, o mesmo ocorre em relação ao tempo da reação, a porcentagem de conversão em oleato de etila aumenta com o tempo reacional.

Em um trabalho similar realizado por Zhong e col. (2013)²⁶ avaliou-se a influência da concentração da lipase comercial de *Candida sp. 99-125* na esterificação do ácido oleico e etanol (temperatura 30°C, proporção ácido oleico:etanol 0,05:0,15). A partir dos resultados relatados, este grupo obteve uma máxima conversão de 55% em oleato de etila após 4 e 2 horas de reação, utilizando 5%(m/m) e 10%(m/m) de lipase em relação ao ácido oleico, respectivamente. Quando realizaram as reações em 24 horas, não foi observado maiores conversões.

Portanto, em relação aos resultados obtidos na **Tabela 8**, a lipase de *A. niger* apresentou uma ótima eficiência como catalisador na síntese do oleato de etila, sendo que a taxa de conversão ao respectivo éster em sua forma livre, foi de

aproximadamente 90% de conversão obtido pelo método GC-FID e 66% pelo método Lowry-Tinsley, em apenas 6 horas de reação, utilizando 15 mg de lipase o que representa aproximadamente 5% (m/m) de lipase em relação ao ácido oleico. Logo definiu como condição ótima para a síntese do oleato de etila a relação de 15 mg de lipase de *A. niger*, temperatura 30°C, proporção ácido oleico:etanol 1:1, 6 horas de reação.

Sendo que esta condição ótima foi definida para avaliar a influência do suporte na imobilização da lipase de *A. niger* e eficiência deste sistema na esterificação do ácido oleico e etanol.

6.3 FUNCIONALIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE CARBONO

Os nanotubos de carbono por possuir em sua superfície uma alta estabilidade química, acabam interagindo com poucos átomos e moléculas, resultando na falta de solubilidade em diversos solventes orgânicos e em meio aquoso, dificultando sua utilização. Logo alguns tratamentos químicos, como a funcionalização através do uso de diferentes métodos, podem aumentar a solubilidade dos NTCs, por meio da inserção de grupos funcionais em suas paredes, resultando em uma maior interação com compostos orgânicos, inorgânicos e sistemas biológicos.

Logo neste trabalho estudaram-se algumas formas de funcionalização nos MWCNTs comerciais, pelo uso de métodos, com a utilização de ácidos, base e peróxido. Foram realizados 3 tratamentos químicos nesses materiais, sendo o primeiro realizado com uma mistura de soluções de ácidos (H_2SO_4/HNO_3), o segundo com base (KOH) em meio não-aquoso (etanol) e o terceiro com uma solução de peróxido (H_2O_2). Assim para avaliar a efetividade da funcionalização dos MWCNTs utilizaram-se duas técnicas, FT-IR e MEV.

Inicialmente, verificou a eficiência dos tratamentos realizados com os MWCNTs através da técnica de FT-IR. Os espectros obtidos para os MWCNTs funcionalizados estão apresentados na **Figura 17**.

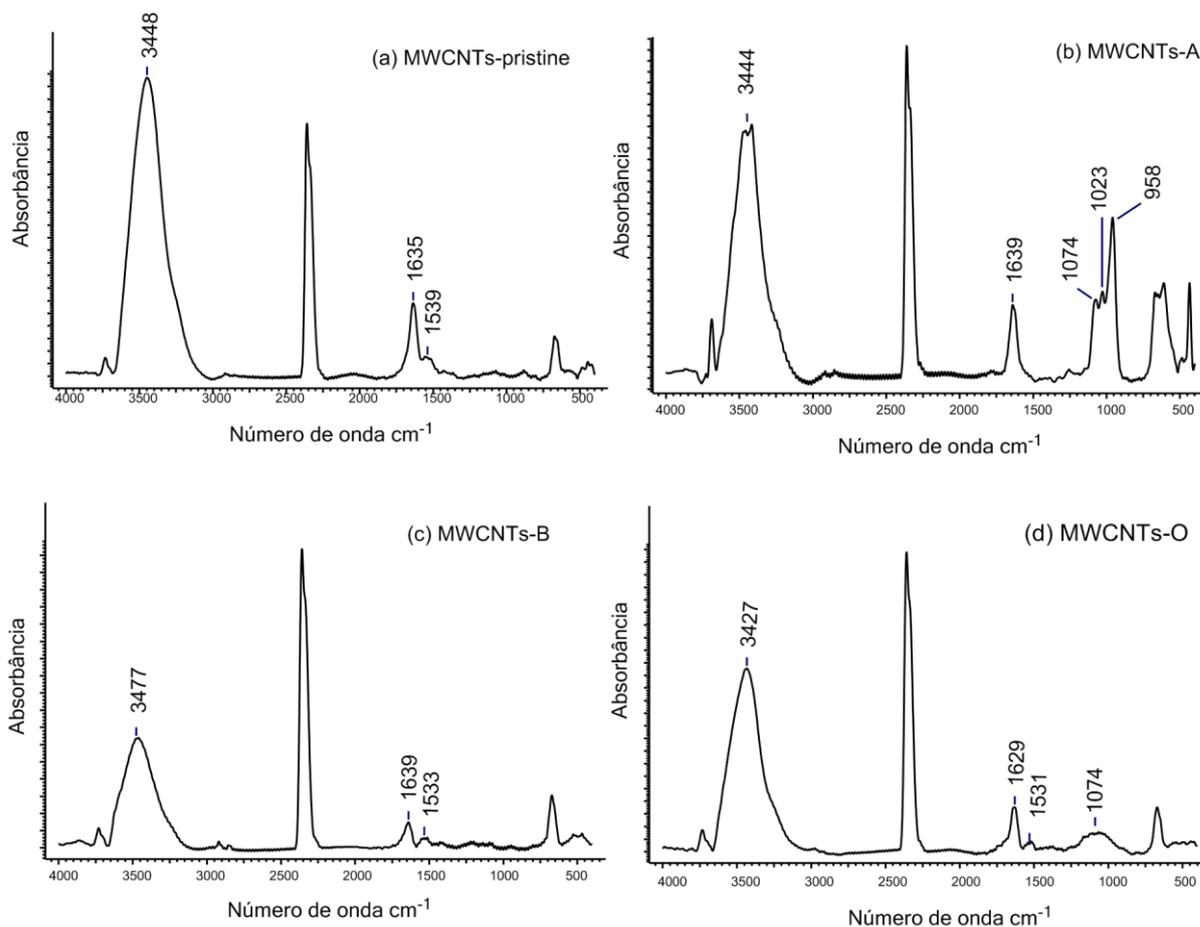


Figura 17- Espectros de FTIR para (a) MWCNTs-pristine, (b) MWCNTs-A, (c) MWCNTs-B e (d) MWCNTs-O. (KBr)

A partir da **Figura 17** pode-se observar uma banda próxima a 3400 cm^{-1} , essas bandas estão relacionadas a vibrações de grupos OH, isolados, em grupos carboxílicos ou água adsorvida, essa banda é observada em todas as amostras.

Comparando o espectro da amostra comercial (MWCNTs-pristine, **Fig. 17a**) com os MWCNTs funcionalizados é possível perceber uma diminuição na intensidade da banda próxima da região em 3400 cm^{-1} , em todas as amostras que receberam tratamento (**Fig. 17b, 17c e 17d**), evidenciando mudanças nas paredes dos nanotubos após os tratamentos. Porém esperava-se um aumento dessa banda, para a amostra tratada com KOH (**Fig. 17c**), devido à inserção de grupos hidroxilados. Yu e col.⁵³ (2015) em seus estudos relataram um aumento dessa banda, sugerindo que havia mais grupos OH na superfície dos nanotubos, evidenciando que os nanotubos foram hidroxilados.

As bandas entre $1750\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídos as vibrações de grupos C=O de grupos carboxílicos, cetonas e quinonas, e as ligações C=C de anéis aromáticos. Nos espectros é possível perceber que a amostra tratada com

$\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (**Fig. 17d**), em relação à amostra sem tratamento (**Fig. 17a**), apresenta um discreto aumento na banda próximo a região de 1600 cm^{-1} , já as amostras que receberam tratamento com KOH e H_2O_2 (**Fig. 17c e 17d**), mostraram um decréscimo nessa banda.

STOBINSKI e col. (2010)⁵⁴ que utilizaram essa técnica para observar a inserção de grupos funcionais nas paredes dos nanotubos de carbono obtidos através de um tratamento oxidativo com ácido nítrico observaram um aumento nas bandas próximas as regiões entre $1700\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$, sugerindo a funcionalização dos nanotubos.

Segundo o STOBINSKI e col. (2010) a presença das bandas entre 1250 e 950 cm^{-1} está relacionada a um aumento de diferentes grupamentos oxigenados na superfície do material. Conforme **Figura 17**, observa-se que essas bandas aparecem apenas nos espectros das amostras tratadas com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ e H_2O_2 (**Fig. 17a e 17c**), mostrando uma efetiva oxidação dos nanotubos. Portanto, a partir dos resultados observados na **Figura 17**, as funcionalizações mais efetivas foram ao utilizar o tratamento com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ e H_2O_2 .

Outra técnica que foi utilizada para avaliar as características morfológicas antes e após a funcionalização química dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas, foi a MEV. Os resultados obtidos estão representados na **Figura 18**, onde a **Figura 18a** tem-se os MWCNTs sem tratamento e **Figuras 18b, 18c e 18d** os MWCNTs funcionalizados.

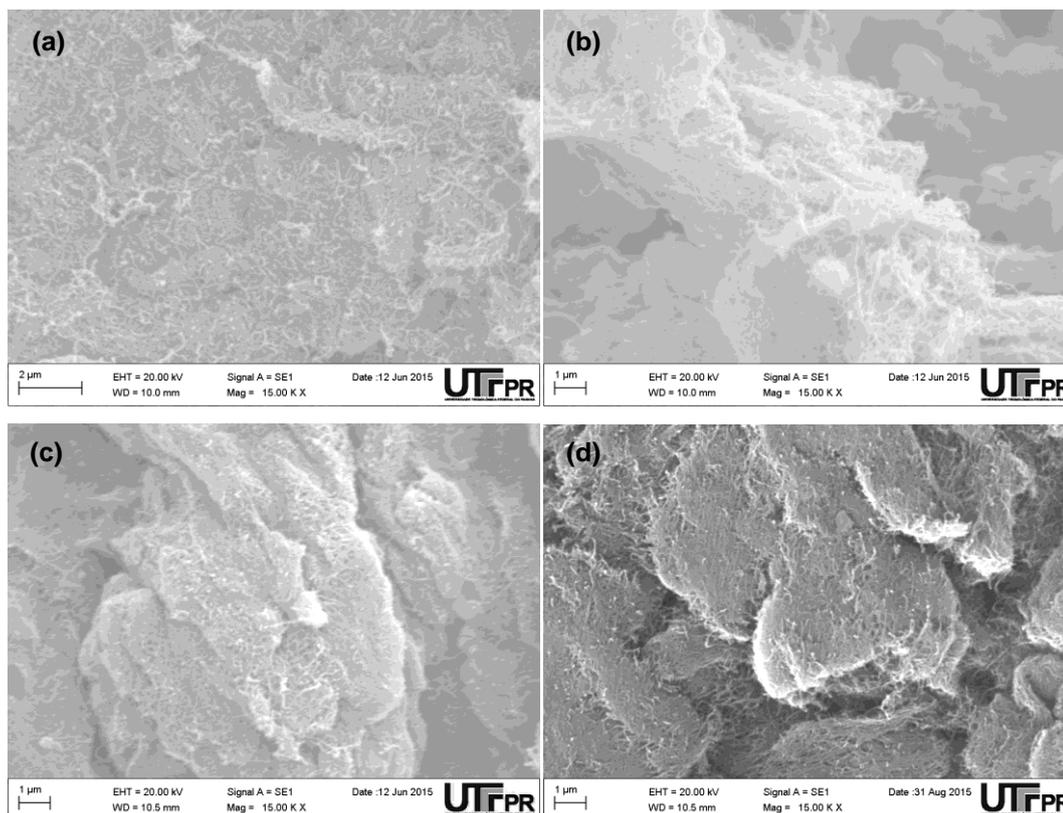


Figura 18—Imagem de microscopia eletrônica de varredura dos (a) MWCNTs-pristine, (b) MWCNTs-O (c) MWCNTs-B e (d) MWCNTs-A. (15 000 x).

A partir da **Figura 18**, observa-se que os MWCNTs apresentam-se como emaranhados, devido às forças de atração entre os mesmos. Os materiais funcionalizados, **Figuras 18b, 18c e 18d** apresentam características morfológicas parecidas com as dos nanotubos comercial, sendo que visualmente as nanotubos parecem estar mais expostos, com os emaranhados mais abertos, no entanto não foi possível observar mudanças significativas através dessa técnica, portanto não sendo conclusivo afirmar as alterações antes e após funcionalização.

Portanto, podemos afirmar a partir desses resultados que com a utilização da microscopia eletrônica de varredura não foi possível comprovar mudanças significativas na morfologia dos materiais tratados, porém esses materiais sofreram modificações nas suas paredes ou extremidades como se pode observar através dos espectros FT-IR. Para a confirmação dessas hipóteses deveriam ser utilizadas técnicas complementares, como por exemplo, a espectroscopia ressonante RAMAN e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

6.4 PREPARAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE NATIVA DE *A. NIGER*

6.4.1 Preparação dos nanocompósitos (MWCNTs/PVA)

Os nanotubos de carbono interagem entre si por meio de interações eletrostáticas, de maneira geral, o grau de dispersão desses materiais em uma matriz polimérica está associado em romper estas forças.

Com o intuito de obter um suporte homogêneo, utilizando PVA e nanotubos de carbono, para posterior imobilização da lipase de *A.niger* neste suporte, foram preparados uma sequência de nanocompósitos combinando diferentes rotas, tais como a rota 1, 2 e 3, descrita no item 5.4, pág. 43, e utilizando os nanotubos de carbono funcionalizados e sem tratamento.

A combinação das diferentes rotas de preparação dos nanocompósitos, bem como, a utilização dos nanotubos de carbono funcionalizados ou sem tratamento (MWCNTs-pristine, MWCNTs-A, MWCNTs-B e MWCNTs-O) originou 16 filmes (nanocompósitos). Os nanocompósitos obtidos estão apresentados na **Figura 19**.

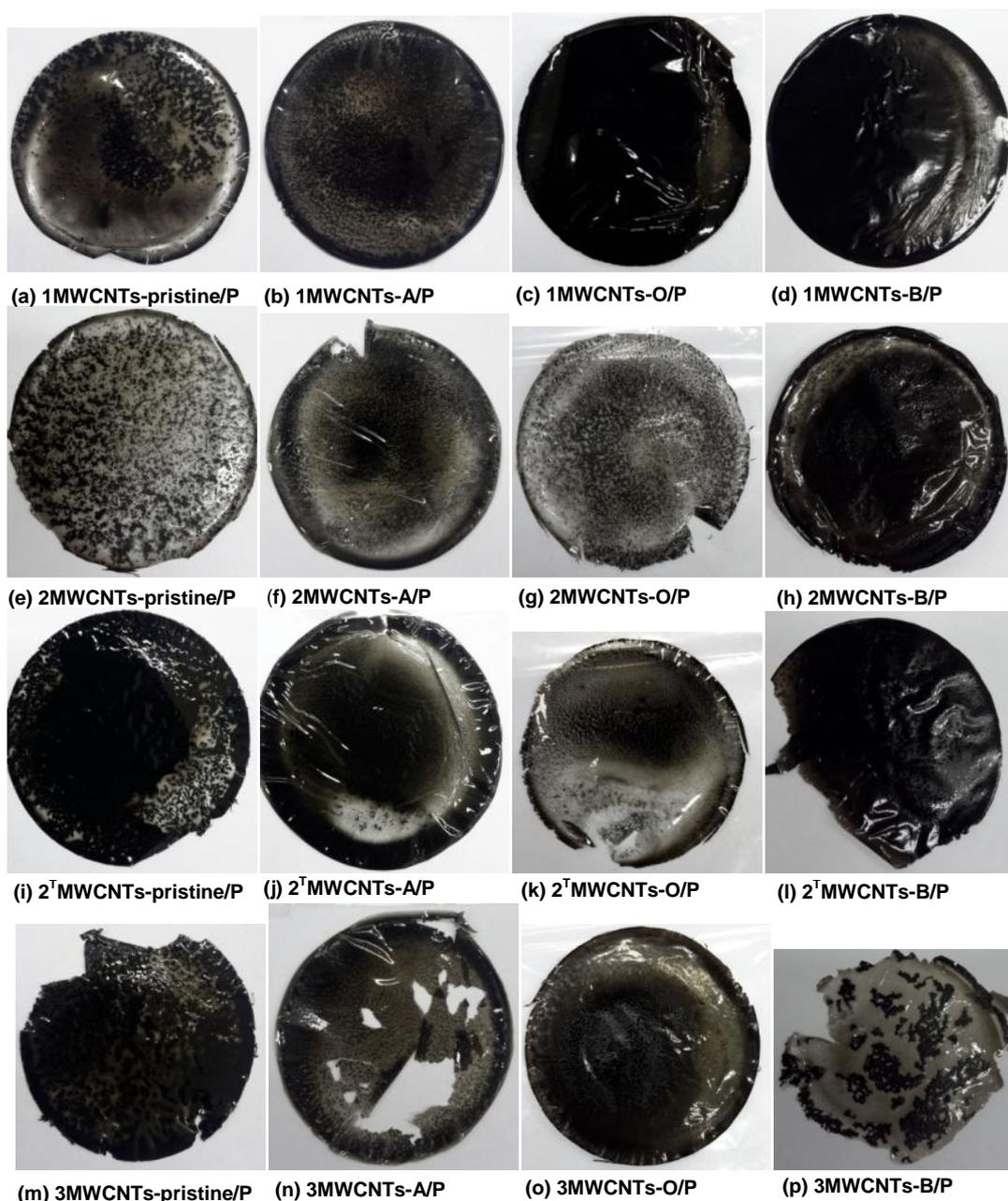


Figura 19 –Fotografias mostrando a aparência dos nanocompósitos. (a)1MWCNTs-pristine/P, (b) 1MWCNTs-A/P, (c) 1MWCNTs-O/P, (d) 1MWCNTs-B/P, (e) 2MWCNTs-pristine/P, (f) 2MWCNTs-A/P, (g) 2MWCNTs-O/P, (h) 2MWCNTs-B/P, (i) 2^TMWCNTs-pristine/P, (j) 2^TMWCNTs-A/P, (k) 2^TMWCNTs-O/P, (l) 2^TMWCNTs-B/P, (m) 3MWCNTs-pristine/P, (n) 3MWCNTs-A/P, (o) 3MWCNTs-O/P e (p) 3MWCNTs-B/P.

Ao observar as **Figuras 19d, 19h e 19l**, em que os nanocompósitos foram preparados utilizando os MWCNTs-B, através das rotas 1, 2 e 2^T, respectivamente, é possível notar que estes filmes possuem um aspecto homogêneo, onde observa-se que os nanotubos se encontram dispersos na matriz polimérica, porém o filme obtido pela rota 3, resultou em pouca dispersão e formação de grandes aglomerados (**Fig. 19p**).

Os filmes mostrados nas **Figuras 19g e 19k**, preparados pelas rotas 2 e 2^T, utilizando os MWCNTs-O, indicam que os nanotubos estão parcialmente dispersos no PVA, formando pequenos aglomerados, já o filme obtido pela rota 3 (**Fig.19o**) mostra-se mais homogêneo em relação aos obtidos pelas rotas 2 e 2^T, porém ainda são observados alguns pontos de agregados próximos as extremidades do filme. Apenas o nanocompósito obtido pela rota 1 (**Fig. 19c**) apresenta-se de forma totalmente homogênea, não sendo observado visualmente agregados de nanotubos.

A análise visual indica uma semelhança entre filmes (**Fig. 17b, 17f, 17j e 17n**) obtidos pelo uso dos MWCNTs-A, independente da rota utilizada, em todos os casos é possível observar regiões de uniformidade e locais onde os nanotubos formam pequenos agregados.

Nas **Figuras 19a e 19e**, onde foram obtidos os nanocompósitos utilizando os MWCNTs-pristine, através das rotas 1 e 2, observa-se a formação de vários agregados de nanotubos, já os filmes obtidos através da rota 2^T e 3 (**Fig. 19j e 19m**) encontraram-se mais dispersos na matriz polimérica.

Através da análise visual observou que os filmes preparados a partir dos nanotubos funcionalizados apresentaram uma melhor dispersão quando comparado aos não funcionalizados, isso pode ser explicado pelo fato da funcionalização química nos nanotubos induzir uma maior interação nanotubos- PVA, pois os grupos polares (COOH e OH) presentes na superfície dos nanotubos funcionalizados são capazes de formar ligações hidrogênio com as moléculas do PVA, reduzindo a formação de agregados de nanotubos.

Em relação às rotas de preparação, a rota 1 (item 5.4, pág. 43) se mostrou mais eficiente, nela foram observadas que os nanotubos apresentaram-se de forma mais dispersa, resultando em filmes com maior uniformidade, independente da funcionalização do nanotubo. Nesta rota de preparação foi utilizado o surfactante (Tween 80). Estudos indicam que um agente tensoativo é capaz de se adsorver na superfície dos nanotubos de carbono, produzindo um recobrimento nas suas paredes, induzindo repulsões eletrostáticas entre os mesmos, consequentemente impedindo a formação de agregados.^{38; 55}

Portanto, a partir da análise visual dos nanocompositos formados e apresentados na **Figura 19**, seis filmes foram selecionados para serem utilizados como suporte na imobilização da lipase de *A. niger*, sendo estes, o 1MWCNTs-pristine/P, 1MWCNTs-O/P, 1MWCNTs-B/P, 2MWCNTs-pristine/P, 2MWCNTs-O/P e

2MWCNTs-B/P. Estes filmes foram escolhidos de acordo com o grau de dispersão dos MWCNTs e a metodologia de preparação. O meio reacional utilizado nestas rotas (1 e 2) de preparação, na qual os filmes foram selecionados, utilizou apenas água, para dispersar os nanotubos e também solubilizar o PVA, sendo o meio mais apropriado para a inserção da lipase, como os filmes obtidos pelas rotas 2^T e 3 utilizaram solventes orgânicos, poderiam levar a inativação da lipase.

6.4.2 Imobilização da lipase de *A. niger* em nanocompósitos (MWCNTs/PVA)

Portanto conforme descrito no item 6.4.1, os nanocompósitos utilizados para imobilizar a lipase de *A. niger* foram 1MWCNTs-pristine/P, 1MWCNTs-O/P, 1MWCNTs-B/P, 2MWCNTs-pristine/P, 2MWCNTs-O/P e 2MWCNTs-B/P, o aspecto dos filmes com a lipase imobilizada estão apresentados na **Figura 20**. Sugere-se para este trabalho que o método utilizado para imobilizar a lipase nos suportes (MWCNTs/PVA) tenha sido a adsorção da lipase ao suporte.

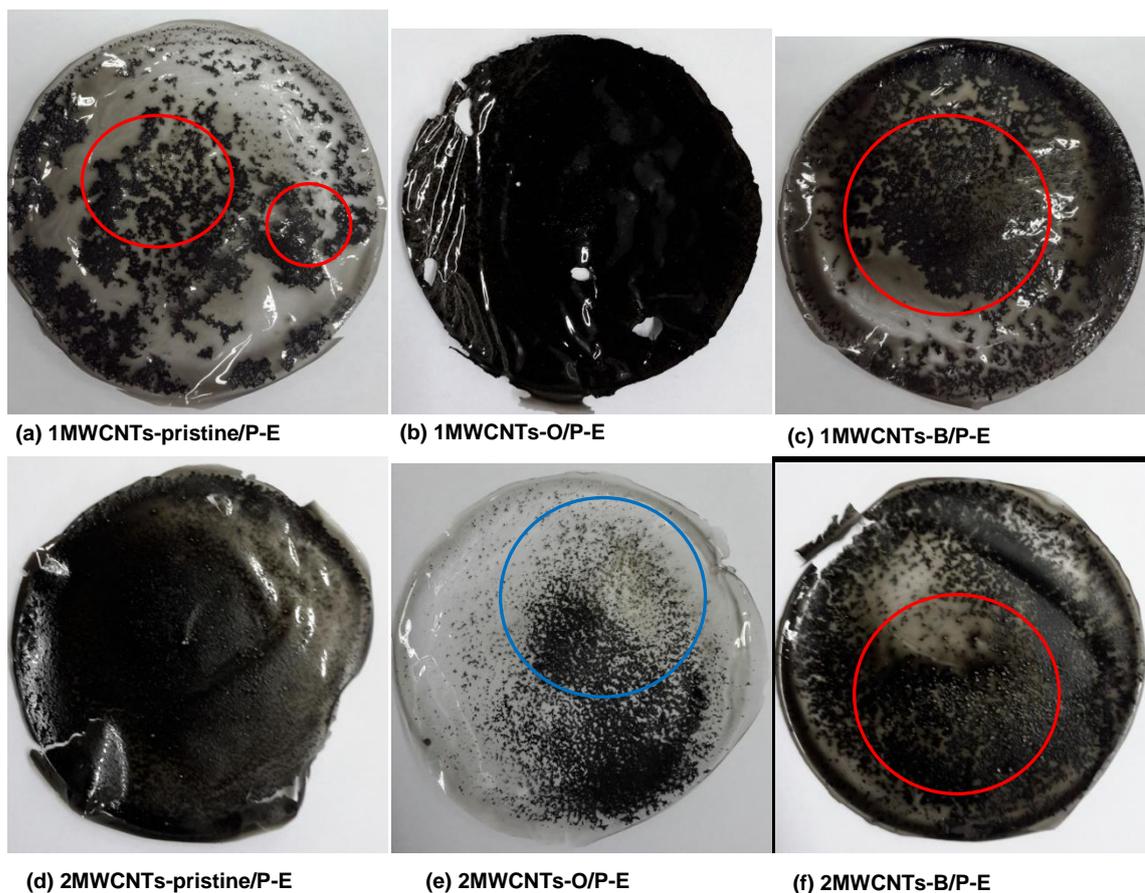


Figura 20 -Fotografias mostrando a aparência da lipase imobilizada nos nanocompósitos. (a)1MWCNTs-pristine/P-E, (b)1MWCNTs-O/P-E, (c) 1MWCNTs-B/P-E, (d) 2MWCNTs-pristine/P-E, (e) 2MWCNTs-O/P-E e (f) 2MWCNTs-B/P-E.

A partir da análise visual dos nanocompósitos/lipase, observou-se que a lipase de *A. niger* imobilizada nos filmes 1MWCNTs-O/P-E e 2MWCNTs-pristine/P-E, encontra-se distribuída em todo o filme, evidenciando uma boa adsorção da lipase nos nanocompósitos, das **Figuras 20b** e **20d**, respectivamente.

As **Figuras 20a**, **20c** e **20f**, mostram a lipase imobilizada nos filmes, 1MWCNTs-pristine/P-E, 1MWCNTs-B/P-E e 2MWCNTs-B/P-E, respectivamente, observa-se nestes suportes, circulado em vermelho, que a lipase de *A. niger* está pouco dispersa no filme, bem como, encontram-se mais próximas dos nanotubos de carbono que estão pouco dispersos. Devido às interações hidrofóbicas enzima-NTCs serem suficientemente fortes, tem-se o indicio de que a adsorção ocorre preferencialmente nesses materiais. Esse fato já era esperado, pois no caso das lipases as interações hidrofóbicas são mais favorecidas para a adsorção da lipase/suporte.⁹

A **Figura 20e** mostra a lipase imobilizada no suporte 2MWCNTs-O/P-E, observa-se nessa imagem que as enzimas permaneceram muito próximas, conforme está circundado em azul na figura, mostrando que nesse caso as interações enzima-enzima superam as interações enzima-NTCs.

Como a enzima foi adicionada ao final de cada método de preparação do nanocompósito em um sistema aquoso, esperava-se que a lipase solubilizasse no meio, porém em todos os filmes é possível observar que ela permaneceu na sua forma original (liofilizada), formada por pequenos grãos.

6.4.3 Imobilização da lipase em MWCNTs

Outro estudo realizado foi avaliar a eficiência da imobilização da lipase de *A. niger* diretamente nos MWCNTs-pristine, MWCNTs-O e MWCNTs-B, sem a presença do polímero PVA. Para tal estudo utilizou a dispersão dos nanotubos em solução tampão fosfato (pH 7,0). A morfologia do material obtido com a lipase imobilizada apenas nos nanotubos de carbono é demonstrada na **Figura 21**.

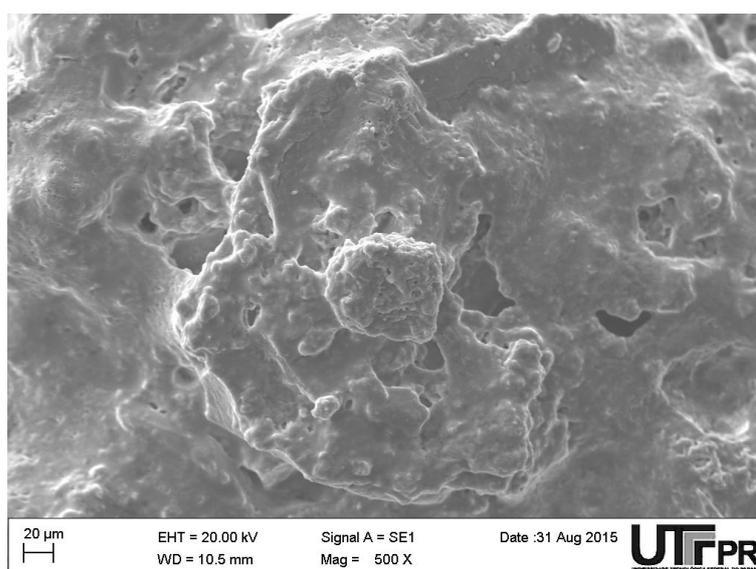


Figura 21 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura do MWCNTs-O-E. (500 x).

Após a imobilização da lipase nos nanotubos observou-se que esta não solubilizou na solução, os materiais obtidos após a evaporação da água foram MWCNTs-pristine-E, MWCNTs-O-E e MWCNTs-B-E, sendo que este sistema suporte/lipase apresentou-se na forma de uma massa compacta, onde foi possível observar que os nanotubos formaram uma cobertura sobre a lipase de *A. niger*, porém era possível observar a presença dos MWCNTs e lipase nos materiais obtidos. Na **Figura 21**, onde é mostrado a morfologia do MWCNTs-O-E, é possível sugerir que os nanotubos estão recobrendo a lipase, como observado visualmente, entretanto como não foi possível obter maiores conclusões através da técnica empregada, não sendo possível afirmar se ocorreu adsorção da lipase nos nanotubos, as demais amostras apresentaram as mesmas características.

Após a imobilização da lipase de *A. niger* em nanocompósitos ou diretamente em MWCNTs, avaliou-se a eficiência catalítica destes sistemas na síntese do oleato de etila a partir do ácido oleico e etanol.

6.5 SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA UTILIZANDO A LIPASE DE *A.NIGER* IMOBILIZADA

Para avaliar a eficiência do suporte/lipase utilizou a lipase de *A. niger* imobilizada nos nanocompósitos 1MWCNTs-pristine/P-E, 1MWCNTs-O/P-E, 1MWCNTs-B/P-E, 2MWCNTs-pristine/P-E, 2MWCNTs-O/P-E e 2MWCNTs-B/P-E como catalisador na síntese do oleato de etila a partir do ácido oleico e etanol.

Os suportes que foram utilizados para imobilizar a lipase, também foram empregados nas reações de esterificação sem a presença da lipase, a fim de avaliar se a catálise estaria sendo realizada pela enzima ou pelo suporte, uma vez que o suporte (nanotubos de carbono e PVA) pode agir como catalisador. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Conversão do ácido oleico em oleato de etila utilizando a lipase de *A. niger* imobilizada em nanocompósitos (MWCNTs/PVA).

Suporte/lipase	Conversão em Oleato de etila (%)		Suporte	Conversão em Oleato de etila (%)	
	GC-FID	LowryTinsley		GC-FID	LowryTinsley
1MWCNTs-pristine/P-E	3,16	**	1MWCNTs-pristine/P	2,49	**
1MWCNTs-O/P-E	3,67	**	1MWCNTs-O/P	2,20	**
1MWCNTs-B/P-E	3,82	**	1MWCNTs-B/P	2,17	**
2MWCNTs-pristine/P-E	7,80	**	2MWCNTs-pristine/P	2,42	**
2MWCNTs-O/P-E	1,72	**	2MWCNTs-O/P	1,27	**
2MWCNTs-B/P-E	0,92	**	2MWCNTs-B/P	1,24	**

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 9**, observa-se que a conversão do ácido oleico em oleato de etila utilizando a lipase imobilizada nos filmes apresentou baixo rendimento, sendo que a maior conversão obtida foi de 7,80%, utilizando a amostra 2MWCNTs-pristine/P-E, quantificada por GC. Entretanto é possível observar que as amostras sem a enzima também resultaram em baixas conversões (1,24-2,49%, GC-FID), evidenciando que a lipase foi inativada neste suporte e que o suporte também não apresentou eficiência catalítica. Em todas as amostras quantificadas pelo método Lowry-Tinsley não foi observado a formação do produto. Logo ao avaliar a eficiência da lipase imobilizada nos nanocompósitos em comparação a sua forma livre, que apresentou conversões em oleato de etila de 91,33 (GC-FID) e 66,23 (Lowry-Tinsley) é possível afirmar que em sua forma imobilizada, a lipase foi inativada.

Em muitos casos pode ocorrer a inativação da enzima, por mais branda que seja o método de imobilização, devido a diversos fatores, dentre eles: efeitos estéricos e conformacionais, que podem resultar na perda dos sítios catalíticos ativos, efeitos difusionais, ocorrendo dificuldade do substrato chegar ao sítio ativo da enzima.^{9, 56}

Como a imobilização da lipase de *A.niger* em nanocompositos foi ineficaz, outro estudo foi realizado utilizando a lipase imobilizada apenas nos nanotubos de carbono. A eficiência desse sistema MWCNTs/lipase foi estudada na síntese do oleato de etila a partir do ácido oleico e etanol.

Para este estudo avaliou a eficiência dos sistemas, MWCNTs-pristine-E, MWCNTs-O-E, MWCNTs-B-E, que continham a enzima imobilizada, e MWCNTs-pristine, MWCNTs-O, MWCNTs-B, na ausência de enzima, para igualmente verificar se a catálise estaria sendo realizada pela enzima ou pelos nanotubos de carbono. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10– Conversão do ácido oleico em oleato de etila utilizando a lipase de *A. Niger* imobilizada em MWCNTs.

Suporte/lipase	Conversão em Oleato de etila (%)		Suporte	Conversão em Oleato de etila (%)	
	GC-FID	LowryTinsley		GC-FID	LowryTinsley
MWCNTs-pristine-E	66,83	**	MWCNTs-pristine	2,95	**
MWCNTs-O-E	53,48	**	MWCNTs-O	1,42	**
MWCNTs-B-E	28,01	15,65	MWCNTs-B	3,56	**

Como pode ser observado na **Tabela 10**, a lipase imobilizada sem a presença do PVA resultou em conversões maiores em oleato de etila quando comparada ao uso dos nanocompositos , sendo de 28,01-66,83% quantificados por GC-FID, e ao quantificar as amostras pelo método Lowry-Tinsley somente com a amostra MWCNTs-B-E apresentou resultados, sendo de 15,65%. Com as amostras na ausência da lipase, as conversões foram baixas e variaram entre 1,42-3,56% (GC-FID) e através do método Lowry-Tinsley não foi observado à formação do produto.

Ao comparar os resultados obtidos em relação à enzima imobilizada nos nanocompósitos (Tabela 9) e apenas nos MWCNTs (Tabela 10), nota-se que a lipase apresentou maior atividade catalítica quando imobilizada sem a presença do PVA, porém em comparação a sua forma livre a atividade catalítica foi reduzida.

Em geral, as lipases apresentam melhores conversões quando imobilizadas comparada a sua forma livre, pois ficam menos suscetíveis a variações bruscas de pH, temperatura, e mudanças de solventes. Como observado no trabalho desenvolvido por Kharrat e col. (2011)⁵⁷ o qual estuda a reação de esterificação entre o ácido oleico e butanol, utilizando a lipase de *Rhizopus oryzae* na sua forma livre e imobilizada, por adsorção em aerogéis de sílica, onde foi obtido 80% de conversão para a lipase imobilizada, enquanto que na sua forma livre apenas 35% de conversão foi observado, mostrando dessa forma que a lipase imobilizada foi mais ativa, ocorrendo um aumento do desempenho desta enzima na sua forma imobilizada.

Entretanto com a lipase nativa de *A. niger* utilizada neste estudo, nas condições propostas no trabalho, na sua forma imobilizada, em nanocompósitos ou diretamente em nanotubos de carbono apresentou-se inativa ou pouco ativada, não sendo observados os resultados esperados, porém tais respostas demonstram que

as interações lipase-suporte são de extrema importância para que o sistema seja promissor, logo o suporte, bem como a metodologia de imobilização e condições reacionais, devem ser realizados de tal maneira, que o sistema contribua para o aumento da atividade catalítica da lipase.

No entanto a lipase nativa de *A. niger* quando utilizada na sua forma livre proporcionou excelentes taxas de conversão em oleato de etila, 91,33 (GC-FID) e 66,23 (Lowry-Tinsley), sendo estes resultados muito promissores, mostrando que esta lipase nativa tem potencial para ser utilizada como catalisador na síntese de ésteres graxos, e tais resultados podem ser comparados com dados da literatura, como em um estudo realizado por Mulalee e col. (2013)⁵⁸ onde realizaram a esterificação do ácido oleico e etanol, utilizando a lipase comercial Novozym 435 (lipase imobilizada em resina acrílica macroporosa), e obtiveram uma conversão em oleato de etila de 91,0% após 8 horas de reação. Logo a lipase nativa de *A. niger* mostrou eficiência similar ou superior em relação a conversão em oleato de etila quando comparada ao uso de lipases comerciais, sendo está uma lipase nativa, extraída no Brasil.²³

Com o intuito de verificar a reutilização da lipase de *A. niger* sua forma livre, já que está lipase está em sua forma liofilizada e não foi solúvel em solução, realizou a esterificação do ácido oleico e etanol, reutilizando esta lipase, sendo que as conversões obtidas em oleato de etila foram de 90,85% (GC-FID) e 48,24% (Lowry-Tinsley), mostrando que esta enzima mesmo após reuso não perdeu sua atividade catalítica.

A partir dos resultados apresentados até o presente momento pode se dizer que novas condições experimentais devem ser testadas, a fim de avaliar a eficiência catalítica da lipase em novas condições de imobilização e assim validar o processo biocatalítico, em relação a enzima livre e imobilizada.

Conforme foi relatado a quantificação da reação de esterificação entre o ácido oleico e etanol foi realizada através de duas técnicas, GC-FID e método colorimétrico Lowry-Tinsley, entretanto comparando os resultados dessas duas metodologias, pode observar que os resultados foram divergentes, sendo assim, viu-se a necessidade de validar o método, logo para fazer está validação buscou-se utilizar a técnica de RMN de ¹H.

6.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO NA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA

Conforme discutido no decorrer do trabalho utilizou duas metodologias para quantificar a reação entre o ácido oleico e etanol, sendo o GC-FID e o método colorimétrico de Lowry-Tinsley, no entanto os resultados foram divergentes comparando os dois métodos, conforme demonstrado ao longo do texto resultados e discussão.

Com o intuito de avaliar a precisão dos métodos empregados, as amostras do experimento 1 (*A.niger* livre, 25 mg), experimento 21 (*A. niger* livre, 15 mg), 2MWCNTs-B/P-E e MWCNTs-B-E, foram quantificadas através do método de RMN de ^1H . Os espectros obtidos para as amostras selecionadas estão apresentados na **Figura 22**.

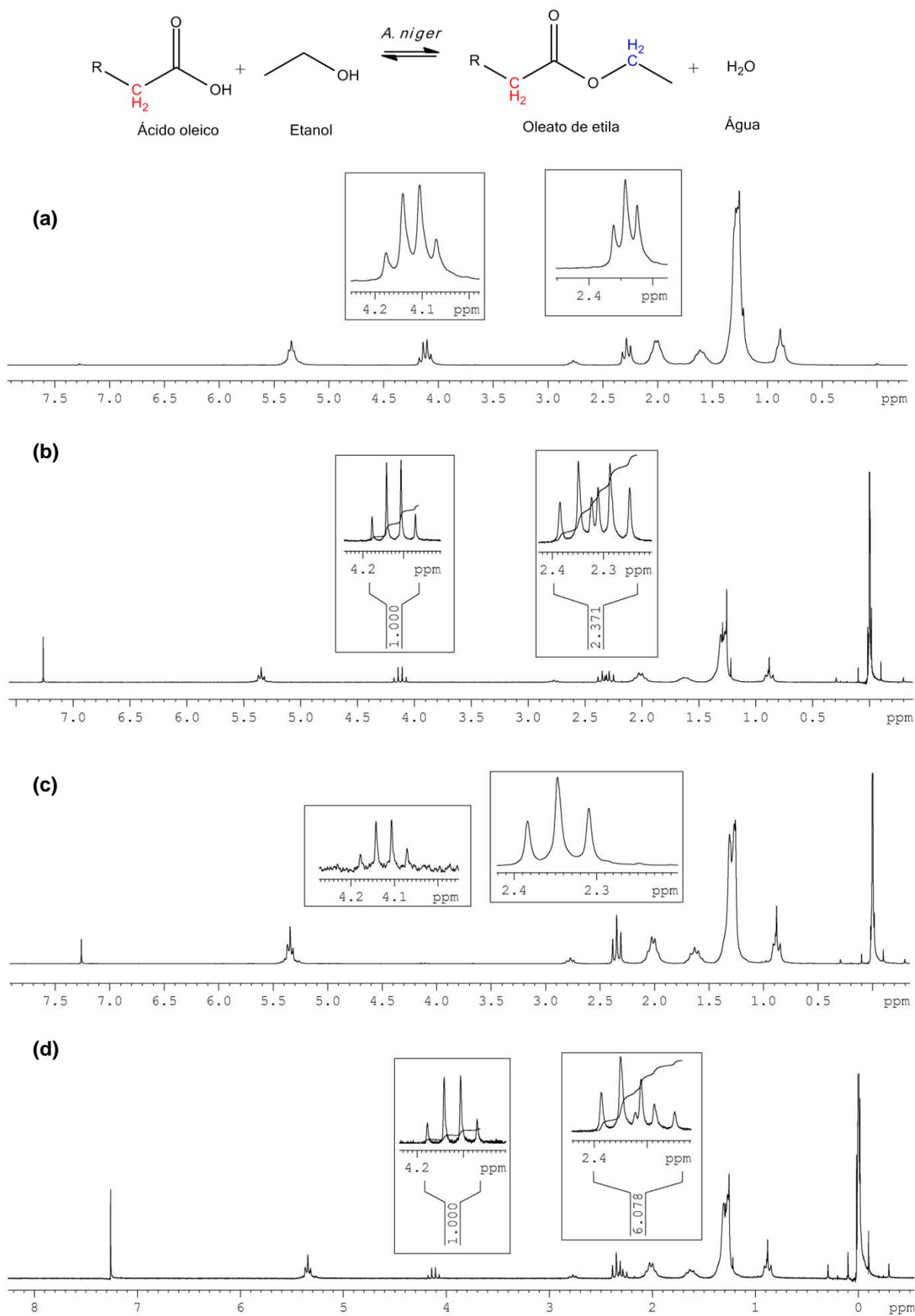


Figura 22 - Espectros de RMN de ^1H para a amostra (a) experimento 1, (b) experimento 21, (c) 2MWCNTs-B/P-E e (d) MWCNTs-B-E. (200 MHz, CDCl_3)

A quantificação por RMN de ^1H foi realizada integrando as áreas dos picos, como demonstrado na **Figura 22**. Os sinais utilizados foram o quarteto (4,12 ppm), referente aos prótons (2H) do CH_2 da etila ligado ao oxigênio da função éster, e os tripletos relativos aos prótons (2H) do CH_2 do ácido oleico (2,34 ppm) e do CH_2 do oleato de etila (2,28 ppm), ligados diretamente a carbonila. O sinal do CH_2 do éster aparece mais blindado em relação ao ácido oleico, no entanto essa diferença é pequena e ocorre a sobreposição parcial desses sinais quando existe uma mistura desses compostos (**Fig. 22b e 22d**), logo foi integrado a área com os dois tripletos, sendo que o resultado da integral obtida é a soma de ácido oleico e do oleato de etila e relacionou está integral com a integração do CH_2 ligado ao oxigênio do éster.

Na **Figura 22a** não é possível observar o sinal do tripleto referente ao ácido oleico, evidenciando que na amostra estaria presente apenas o oleato de etila, por outro lado na **Figura 22c** o sinal do quarteto referente ao oleato de etila aparece próximo ao ruído do equipamento, neste caso não foi verificada uma conversão significativa em oleato de etila. Portanto, como essas amostras apresentaram valores próximos aos limites, não foi realizado a integração das áreas dos picos

Os resultados obtidos com a quantificação das amostras através do RMN de ^1H são apresentados na **Tabela 11**, juntamente com os resultados obtidos através da quantificação pelos métodos GC-FID e Lowry-Tinsley.

Tabela 11- Comparação entre os métodos de quantificação GC-FID, Lowry-Tinsley e RMN ^1H para conversão do ácido oleico em oleato de etila.

Amostra	Resultado experimental - Oleato de etila (%)		
	CG-FID	Lowry-Tinsley	RMN ^1H
Experimento 1	96,01	90,12	~100,00
Experimento 21	91,33	66,23	42,17
2MWCNTs-B/P-E	0,92	**	~ 0,00
MWCNTs-B-E	28,01	15,65	16,45

** não observou a formação do produto (éster).

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 11** é possível observar que ao quantificar as amostras do experimento 1 e 2MWCNTs-B/P-E, os resultados obtidos foram similares nos três métodos de quantificação (CG-FID, Lowry-Tinsley e RMN ^1H), sendo que para o experimento 1 as conversões foram de 90-100%, e com a amostra 2MWCNTs foi de aproximadamente 0%.

Por outro lado, ao realizar a quantificação das amostras do experimento 21 e MWCNTs-B-E através da técnica RMN de ^1H , as conversões foram de 42,17% e 16,45%, respectivamente. Esses resultados mostraram uma maior aproximação com

os resultados obtidos pelo método de Lowry-Tinsley (66,23% e 15,65%) do que comparado a quantificação pelo GC-FID (91,33% e 28,01%).

Portanto a partir desses resultados, obtidos por RMN de ^1H , pode se dizer que as porcentagem de conversão em oleato de etila foram similares as obtidas pelo método de Lowry-Tinsley, sendo assim este método foi mais preciso quando comparado a CG-FID.

Em todas as análises realizadas por GC-FID a conversão foi maior em comparação ao método de Lowry, isso pode ser explicado com relação a compostos que poderiam estar co-eluindo, devido aos reagentes de partida apresentarem algum grau de impureza, bem como, a coluna utilizada não ser a mais adequada para separação desses compostos, porém não é possível mensurar quais erros estariam associados sem a utilização de técnicas complementares.

Portanto a partir desses resultados, para este trabalho, validou-se o método colorimétrico para a quantificação da reação de esterificação entre o ácido oleico e etanol, onde observou que este método foi mais adequado ao comparar com os resultados obtidos por RMN de ^1H .

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que a síntese do oleato de etila pode ser realizada utilizando uma lipase nativa de *A. niger* extraída de solos brasileiros na sua forma livre, com rendimentos elevados. No entanto ao utilizar esta lipase em sua forma imobilizada, as conversões foram baixas. Logo a escolha do suporte, método de imobilização e relação substrato-enzima-suporte são fatores primordiais para o processo biocatalítico e determinantes para obtenção do produto.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho reporta a capacidade catalítica da lipase nativa de *A. niger*, extraída de solo brasileiro na obtenção do oleato de etila, na sua forma livre e/ou imobilizada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

As condições reacionais otimizadas para o estudo foram a quantidade de 15 mg de lipase de *A. niger*, razão molar ácido oleico:etanol 1:1 e temperatura 30°C em 6 horas de reação, nestas condições obteve-se 66,23% de conversão em oleato de etila quantificado pelo método de Lowry-Tinsley e 91,33% de conversão ao quantificar pelo método CG-FID.

Os resultados obtidos para síntese do oleato de etila utilizando a lipase de *A. niger* imobilizada nos nanocompósitos (1MWCNTs-pristine/P , 1MWCNTs-O/P, 1MWCNTs-B/P, 2MWCNTs-pristine/P, 2MWCNTs-O/P e 2MWCNTs-B/P) apresentou baixas porcentagens de conversão em éster, que variaram entre 0,92-7,80% pelo método GC-FID e não sendo observada a formação do produto pelo método Lowry-Tinsley. Ao utilizar a lipase imobilizada apenas nos MWCNTs (MWCNTs-pristine, MWCNTs-O e MWCNTs-B), melhores resultados foram obtidos, sendo que as taxas de conversão foram de 28,01-66,83% pelo método GC-FID e de 0-15,85% pelo método Lowry-Tinsley. Contudo quando comparou a lipase em sua forma imobilizada com a sua forma livre nas mesmas condições reacionais, observou maiores conversões quando a lipase foi utilizada em sua forma livre, sendo que nessas condições o oleato de etila foi obtido com 91,33% de conversão através do método CG-FID e 66,23%, através do método Lowry-Tinsley, mostrando que a relação substrato-enzima-suporte são fundamentais para o êxito do processo catalítico.

Devido a divergência nos resultados das metodologias utilizadas para quantificação do oleato de etila, utilizando a técnica de RMN ¹H, o método colorimétrico Lowry-Tinsley foi validada, pois apresentou maior precisão quando comparada ao método GC-FID.

De modo geral os resultados foram satisfatórios, pois a lipase de *A. niger* é uma lipase nativa extraída de solo brasileiro e em sua forma livre apresentou excelentes conversões a oleato de etila, mostrando ser um ótimo catalisador para a síntese do oleato de etila, que ainda após sua reutilização apresentou resultados

excelentes, onde foi obtido 48,24% de conversão pelo método colorimétrico, mantendo sua atividade catalítica.

Ao utilizar esta lipase imobilizada nos MWNTCs na ausência do PVA, os resultados foram promissores, sendo que acredita-se que com algumas alterações das condições experimentais, pode-se ter um sistema eficiente para a síntese do oleato de etila com boas conversões.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar a imobilização da lipase no suporte MWNTCs-A.

Utilizar a lipase imobilizada nos nanotubos funcionalizados na ausência do PVA nas condições de reação de 25 mg de lipase, 30°C, razão molar 1:1 (ácido oleico:etanol), bem como, 50 mg da lipase, 45°C e razão 1:2 (ácido:etanol) em tempos de reação maiores.

Utilizar novas metodologias de imobilização da lipase nativa de *A. niger*, com a finalidade de aumentar sua atividade catalítica na esterificação do ácido oleico e etanol.

Utilizar técnicas complementares para avaliar a eficiência da funcionalização, bem como, a da imobilização da lipase no suporte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 CAMPBELL, Mary K.; FARRELL, Shawn O. **Biochemistry**. 6th. Belmont: Thomson, 2009.
- 2 NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- 3 Faber, Kurt. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6th. New York: Springer, 2011.
- 4 HASAN, Fariha; SHAH, Aamer A.; HAMEED, Abdul. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- 5 STERGIYOU, Panagiota-Y.; FOUKIS, Athanasios; FILLIPPOU, Michalis; KOUKOURITAKI, Maria; PARAPOULI, Maria; THEODOROU, Leonidas G.; HATZILOUKAS, Efstathios; AFENDRA, Amalia; PANDEY, Ashok; PAPAMICHAEL, Emmanuel M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1846-1859, 2013.
- 6 KAPOOR, Manali; GUPTA, Munishwar N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.
- 7 MESSIAS, Josana M.; COSTA, Bruna Z. da; LIMA, Valéria M. G. de; GIESE, Ellen C.; DEKKER, Robert F. H.; BARBOSA, Aneli de M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.
- 8 HANEFELD, U.; GARDOSSIB, L.; MAGNERC, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.
- 9 ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6406-6436, 2013.
- 10 ANSARI, Shakeel A.; HUSAIN, Qayyum. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 512-523, 2012.
- 11 VOET, Donald; VOET, Judith G. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

12 ARANTES, Guilherme M. Uma perspectiva computacional sobre catálise enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 377-383, 2008.

13 SUAN, Lee C.; SARMIDI, Mohamad R. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 28, n. 2-3, p. 111-119, 2004.

14 MENDES, Adriano A.; OLIVEIRA, Pedro C. de; CASTRO, Heizir F. de; GIORDANO, Raquel de L. Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzima de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

15 SHARMA, Rohit; CHISTI, Yusuf; BANERJEE, Uttam C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

16 BON, Elba P. S.; CASTRO, Heizir F. de; FREIRE, Denise M. G. et al. **Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência Ltda, 2008. Cap. 5, p. 95-122. Cap. 6, p. 123-151. Cap. 16, p. 369-385

17 CARVALHO, Patrícia de O.; CALAFATTI, Silvana A.; MARASSI, Maurício; SILVA, Daniela M.; CONTESINI, Fabiano J.; BIZACO, Renato. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

18 Pilissão, Cristiane. **Aminólise enantiosseletiva do (R,S)-mandelato de metila e síntese do acetato de geranoila mediada por lípases**. 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

19 SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de lipase pancreatique sur les esters em emulsion. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513-521, 1958.

20 CHRISTOPHER, Lew P.; KUMAR, Hemanathan; ZAMBARE, Vasudeo P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.

21 YIN, Ping. et al. Efficient bifunctional catalyst lipase/organophosphonic acid-functionalized silica for biodiesel synthesis by esterification of oleic acid with ethanol. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 146-151, 2013.

22 CONTESINI, Fabiano J. et al. *Aspergillus sp* lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3-4, p. 163-171, 2010.

23 SILVA, Vania C. F. da; CONTESINI, Fabiano J.; CARVALHO, Patrícia de O. Characterization and Catalytic Activity of Free and Immobilized Lipase from *Aspergillus niger*: a Comparative Study. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 8, p. 1468-1474, 2008.

24 LORTIE, Robert. Enzyme catalyzed esterification. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 1997.

25 VILLENEUVE, Pierre; MUDERHWA, Jean M.; GRAILLE, Jean; HAAS, Michael J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

26 ZHONG, Hui; FANG, Zheng; ZOUB, Baohua; LI, Xin; OUYANG, Pingkai; GUO, Kai. Studies on the lipase-catalyzed esterification of alkyl oleates in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 114–117, 2013.

27 RODRIGUES, Rafael C.; MURCIA, Ángel B.; LAFUENE, Roberto F. Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2216-2238, 2011.

28 VECCHIA, Roberto D.; NASCIMENTO, Maria da G.; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

29 JESIONOWSKI, Teofil; ZDARTA, Jakub; KRAJEWSKA, Barbara. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption-Journal of the International Adsorption Society**, v. 20, n. 5-6, p. 801-821, 2014.

30 CIPOLATTI, Eliane P.; SILVA, Maria J. A.; KLEIN, Manuela; FEDDERN, Vivian; FELTES, Maria M. C.; OLIVEIRA, J. V.; NINOW, Jorge L.; OLIVEIRA, Debora de. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, v. 99, p. 56-67, 2014.

31 PURI, Munish; BARROW, Colin J.; VERMA, Madan L. Enzyme immobilization on nanomaterials for biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 31, p. 215-216, 2013.

32 ZARBIN, Aldo J. G. QUÍMICA DE (NANO)MATERIAIS. **Química nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

33 SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

34 MARCIELLO, Marzia; FILICE, Marco; PALOMO, Jose M. Different strategies to enhance the activity of lipase catalysts. **Catalysis Science & Technology**, v. 2, n. 8, p. 1531-1543, 2012.

35 HERBST, Marcelo H.; MACEDO, Maria I. F.; ROCCO, Ana M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: Tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 986-992, 2004.

36 JI, Peijun; TAN, Huishan; Xu, Xin; FENG, Wei. Lipase Covalently Attached to Multiwalled Carbon Nanotubes as an Efficient Catalyst in Organic Solvent. **Aiche Journal**, v. 56, n. 11, p. 3005-3011, 2010.

37 TAN, Huishan; FENG, Wei; JI, Peijun. Lipase immobilized on magnetic multi-walled carbon nanotubes. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 172-176, 2012.

38 MA, Peng-Cheng; SIDDIQUI, Naveed A.; MAROM, Gad; KIM, Jang-Kyo. Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: A review. **Composites: Part A**, v. 41, n. 10, p. 1345-1367, 2010.

39 SAHOO, Nanda G.; RANA, Sravendra; CHO, Jae W.; LI, Lin; CHAN, Siew H. Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 7, p. 837-867, 2010.

40 SOUZA, Antonio G. de S.; FAGAN, Solange B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1695-1703, 2007.

41 ARANHA, Isabele B.; LUCAS, Elizabete F. Poli(Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 174-181, 2001.

42 SILVA, Givanilton F.; CAMARGO, Fernando L.; FERREIRA, Andrea L. O. Application of response surface methodology for optimization of biodiesel production by transesterification of soybean oil with ethanol. **Fuel Processing Technology**, v. 92, n. 3, p. 407-413, 2011.

43 TEOFILO, Reinaldo F.; FERREIRA, Márcia M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

44 NETO, Benício B.; SCARMINIO, Ieda S.; BRUNS, Roy E. **Como fazer experimentos**. Porto Alegre: Bookman, 2010.

45 ALQUINO NETO, Francisco R.; NUNES, Denise da S. e S. **Cromatografia: Princípios básicos e Técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

46 COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006.

47 LOWRY, Robert R.; TINSLEY, Ian J. Rapid colorimetric determination of free fatty-acids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 53, n. 7, p. 470-472, 1976.

48 SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

49 PAVIA, Donald L.; LAMPAMAN, Gary M.; KRIZ, George S. **Introdução à Espectroscopia**. São Paulo - SP: Cengage Learning, 2010.

50 DEDAVID, Berenice A.; GOMES, Carmem I.; MACHADO, Giovanna. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

51 PEREIRA-FILHO, Edénir R. **Planejamento Fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos: EdUFSCar, 2015.

52 MADALOZZO, Aline D. **Síntese de ésteres etílicos utilizando uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae***. 2011. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, 2011.

53 YU, Guangxia; WU, Weixiang; ZHAO, Qiang; WEI, Xiaoyun; LU, Qing. Efficient immobilization of acetylcholinesterase onto amino functionalized carbon nanotubes for the fabrication of high sensitive organophosphorus pesticides biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 68, p. 288-294, 2015.

54 STOBINSKI, L.; LESIAK, B.; KOVER, L.; TOTH, J.; BINIAK, S.; TRYKOWSKI, G. Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 501, n. 1, p. 77-84, 2010.

55 SILVA, Isabella R.; BARRETO, Pedro L. M.; BELLETTINI, Ismael C. Estudo das dispersões de nanotubos de carbono utilizando diferentes surfactantes. **Quimica Nova**, v. 36, n. 1, p. 5-9, 2013.

56 BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibado; LIMA, Urgel de A.; AQUARONE, Eugênio. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: E. Blucher, 2001.

57 KHARRAT, Nadia; ALI, Yassine B.; MARZOUK, Sana; GARGOUR, Youssef-T.; CHAABOUNI, Maha K. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1083-1089, 2011.

58 MULALEE, Sawittree; CHANPRASERT, Jiranan; KERDPOKSUP, Pibbon; SAWANGPANYA, Netnapa; PHISALAPHONG, Muenduen. Esterification Of Oleic Acid And Bioalcohols Using Immobilized Lipase. **Applied Energy Technology**, v. 724-725, p. 1154-1157, 2013.