

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

**JEANE ELISA FRANCESCON**

**ESTERIFICAÇÃO VIA ENZIMÁTICA**

**CURITIBA**

**2016**

JEANE ELISA FRANCESCON

## ESTERIFICAÇÃO VIA ENZIMÁTICA

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.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ramos da Costa Neto

Co-Orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana

CURITIBA

2016

# **JEANE ELISA FRANCESCON**

## **ESTERIFICAÇÃO VIA ENZIMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

**Membro 1** – Profa. Dra. Marlene Soares  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**Membro 2** – Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**Orientador** – Prof. Dr. Pedro Ramos da Costa Neto  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**Coordenadora de Curso** – Profa. Dra. Danielle Caroline Schnitzler

Curitiba, 12 de dezembro de 2016.

Ao meu pai, pela dedicação, paciência e amor incondicional.

Em memória de Maria Aparecida Cardoso de Brito, minha mãe, amiga de todos e amante da vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial ao professor Pedro, por me acompanhar desde a iniciação científica como meu orientador, sempre me ajudando nos momentos em que mais precisei de alguém com compreensão e paciência.

A Universidade Federal do Paraná pela disponibilização da utilização de seus equipamentos.

Ao professor Paulo Roberto de oliveira, pela doação de reagentes essenciais para o trabalho.

A professora Cristiane Pilissão, por disponibilizar seu laboratório e doação da novozym 435 para o meu trabalho.

Ao professor José Domingos Fontana por ter aberto as portas de seu laboratório e disponibilizar não só o ambiente, mas também a ele para todo e qualquer problema e solução encontrado ao longo do trabalho. Além de se provar um professor com conhecimento massivo e humildade estonteantes.

Aos meus colegas e amigos que sempre estiveram ao meu lado, em especial a Karinna Meinol, que me deu os melhores conselhos e muito apoio em todos os momentos.

A minha família e ao meu amor, por todo o carinho e dedicação que a cada dia eu agradeço a Deus. E que acompanharam toda a minha jornada todas as caídas e levantadas que não teria conseguido superar sem a ajuda deles.

## RESUMO

FRANCESCON, Jeane E. **Esterificação via enzimática**, 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química com Ênfase em Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ecoville, Curitiba, 58 páginas.

O óleo fúsel faz parte dos subprodutos das usinas alcooleiras, sendo composto pela mistura de álcoois superiores obtidos em várias fases do processo de fermentação alcoólica, sendo primordialmente composto pelo álcoois isoamílico e isobutílico. A produção de álcool no Brasil é muito grande, conseqüentemente também é produzida uma grande quantidade de óleo fúsel. A produção de óleo fúsel alcançou, somente em 2014/15, mais de 70 milhões de litros. Algumas indústrias o destinam para a venda, mas para a maioria o destino ainda é o descarte. Assim, abrindo-se uma oportunidade de utilização e pesquisa. Os ésteres de óleo fúsel, produzidos por esterificação via enzimática com o ácido oleico podem ser utilizados como um lubrificante de origem vegetal. Os lubrificantes, compostos por óleos básicos e aditivos, são substâncias de larga utilização que têm como função reduzir atritos, refrigerar e manter limpos componentes móveis de motores e equipamentos. A utilização de enzimas como catalisadores foi algo muito explorado nos últimos anos, devido as suas vantagens em relação aos catalisadores clássicos, como sua alta especificidade, controle na formação de subprodutos e por operarem em condições amenas de temperatura e pressão. Uma classe de enzimas são as lipases, que são muito utilizadas para catalisar reações de esterificação. Para o estudo da esterificação do óleo fúsel com o ácido oleico foram utilizadas doze amostras de enzimas, onde o melhor resultado foi obtido se utilizando a enzima de lipoproteína *Pseudomonas* sp. O produto de esterificação com esta enzima, tendo como substratos o ácido oleico e álcool isoamílico, foi analisado por ATR-FTIR e comparado com espectro padrão do oleato de isoamila.

**Palavras chave:** Esterificação; Óleo fúsel; Lipase; Lubrificantes.

## ABSTRACT

FRANCESCON, Jeane E. **Enzymatic esterification**, 2016. Course conclusion monograph (Bachelor's in Chemistry with emphasis in environmental). Federal Technological University of Paraná – Campus Ecoville, Curitiba, 58 pages.

Fusel oil is part of the by-products of alcoholic plants, it is composed of the mixture of higher alcohols obtained in various phases of the alcoholic fermentation process, being mainly composed of isoamyl and isobutyl alcohols. The production of alcohol in Brazil is very large, consequently a large amount of fusel oil is produced as well. The production of fusel oil reached 70 million liters only in 2014/15. Some industries aim it for sale, but for most the destination still the discard. This opens up an opportunity to use and reaserch. Esters of fusel oil, produced by enzymatic esterification with oleic acid can be used as a lubricant of vegetable origin. Lubricants, consisting of basic oils and additives, are widely used substances that have the function of reducing friction, cooling and keeping clean moving components of engines and equipment. The use of enzymes as catalysts has been very exploited in recent years, due to its advantages over conventional catalysts, such as its high specificity, control in the formation of by-products and by operating under mild conditions of temperature and pressure. One class of enzymes are lipases, which are widely used to catalyze esterification reactions. For the study of the esterification of fusel oil with oleic acid, twelve enzyme samples were used, where the best result was obtained using the enzyme lipoprotein *Pseudomonass* sp. The esterification product with this enzyme, having as substrates oleic acid and isoamyl alcohol, was analyzed by ATR-FTIR and compared to the standard spectrum of isoamyl oleate.

**Keywords:** Esterification; Fusel oil; Lipase; Lubricants.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Coluna de destilação alcóolica, configuração AB.....	18
<b>Figura 2</b> - Coluna de destilação alcóolica, configuração ABB1 .....	19
<b>Figura 3</b> - Estrutura do álcool isoamílico.....	22
<b>Figura 4</b> - Estrutura do álcool isobutílico .....	22
<b>Figura 5</b> - Reações químicas catalisadas por lipases.....	25
<b>Figura 6</b> – Rotas de esterificação ácida, básica e de cloreto de acila pelo tratamento com álcool na presença de base.....	27
<b>Figura 7</b> - Etapas propostas para a esterificação catalisada pela lipase .....	28
<b>Figura 8</b> - Fórmula estrutural do oleato de isoamila .....	29
<b>Figura 9</b> - Fórmula estrutural do oleato de isobutila .....	29
<b>Figura 10</b> - Espectro ATR-FTIR do álcool isoamílico.....	33
<b>Figura 11</b> - Espectro ATR-FTIR do ácido oleico .....	34
<b>Figura 12</b> - Espectro ATR-FTIR do oleato de isoamila .....	35
<b>Figura 13</b> - Revelação da CCD contendo os padrões, realizada com (a) vapores de iodo, (b) $\rho$ -anisaldeido-sulfúrico a quente e (c) “ <i>charring</i> ” ou carbonização com reagente de Vaugh. Reações realizadas com ácido oleico e os álcoois metílico, etílico, isopropílico e isoamílico (1, 2, 3 e 4, respectivamente), e com a presença do dessecante molecular (0*, 1*, 2*, 3* e 4*, respectivamente). .....	43
<b>Figura 14</b> - CCD realizada com amostras de esterificação via química do óleo fúsel e do álcool metílico com e sem resina de troca catiônica, mais amostras da esterificação via enzimática com álcool isoamílico ( $A_n$ ) e óleo fúsel ( $F_n^*$ ) com o zero e as enzimas 1 e 2. ....	44
<b>Figura 15</b> - <b>Figura 15.</b> CCD realizada com amostras de esterificação via enzimática na presença de água nas quantidades de 0, 1, 2 e 4% de água, com os álcoois metílico e etílico, respectivamente .....	45



<b>Figura 16</b> - CCD realizada com amostras de esterificação via enzimática com álcool isoamílico ( $A_n$ ) e óleo fúsel ( $F_n^*$ ) com as enzimas enumeradas de 3 a 12. ....	46
<b>Figura 17</b> - CCD realizada com amostras de esterificação via enzimática das enzimas 2 - <i>Mucor</i> sp; 4 - lipoproteína de <i>Pseudomonas</i> sp; 7 - novozym TL/IM; 9 - novozym 435, nas quantidades em A, B, C e D de 2,5mg, 5,0mg, 10,0mg e 20,0mg, respectivamente .....	47
<b>Figura 18</b> - CCD dos três primeiros ciclos da esterificação via enzimática utilizando enzimas 4 - lipoproteína de <i>Pseudomonas</i> sp; 7 - novozym TL/IM; 9 - novozym 435, tendo como substrato o álcool isoamílico e o óleo fúsel .....	48
<b>Figura 19</b> - CCD dos três últimos ciclos da esterificação via enzimática utilizando enzimas 4 - lipoproteína de <i>Pseudomonas</i> sp; 7 - novozym TL/IM; 9 - novozym 435, tendo como substrato o álcool isoamílico e o óleo fúsel .....	48
<b>Figura 20</b> - Espectro ATR-FTIR do oleato de isoamila isolado.....	49

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Descrição e classificação dos óleos básicos pertencentes aos grupos API .....	32
<b>Quadro 2</b> – Etapas seguidas durante o trabalho .....	37
<b>Quadro 3</b> – Estudos das reações de esterificação pela via química suas variáveis e álcoois utilizados .....	38
<b>Quadro 4</b> – Estudos das reações de esterificação pela via enzimática suas variáveis e álcoois utilizados .....	40
<b>Quadro 5</b> - Bandas presentes nos espectros de referência em correlação com as bandas encontradas no espectro da amostra isolada de oleato de isoamila .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Rendimento em porcentagem de álcool, produzido à partir de diferentes substratos.....	18
<b>Tabela 2</b> - Teores médios de álcoois, ésteres e aldeídos em amostras de óleo fúsel. Concentração média (g.L <sup>-1</sup> ).....	20

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AEAC – Álcool Etílico Anidro combustível

AEHC – Álcool Etílico Hidratado Combustível

AL – Ácido linoleico

AO – Ácido oleico

API – American Petroleum Institute

ATR-FTIR – Infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada

CCD – Cromatografia em camada delgada

FTIR – Infravermelho por transformada de Fourier

POA - Polialfaolefinas

TAS – Triacilglicerídeo

TG – Triglicerídeo

UFPR – Universidade Federal do Paraná

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	15
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>16</b>
<b>4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1 ÓLEO FÚSEL</b> .....	<b>17</b>
4.1.1 Processo de produção e composição.....	17
4.1.2 Álcoois isoamílico e isobutílico .....	21
<b>4.2 LIPASES</b> .....	<b>24</b>
4.2.1 Aspectos gerais .....	24
4.2.2 Vantagens e desvantagens .....	25
<b>4.3 REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO</b> .....	<b>26</b>
4.3.1 Rota Química .....	26
4.3.2 Rota enzimática.....	27
<b>4.4 LUBRIFICANTES</b> .....	<b>29</b>
4.4.1 Óleos básicos.....	31
<b>4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS</b> .....	<b>32</b>
4.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	32
4.5.2 Infravermelho por transformada de Forrier (FTIR) .....	32
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	<b>36</b>
<b>5.1 ESTERIFICAÇÃO QUÍMICA</b> .....	<b>37</b>
<b>5.2 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA</b> .....	<b>38</b>
<b>5.3 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO</b> .....	<b>40</b>
<b>5.4 DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DO OLEATO DE ISOAMILA UTILIZANDO O ATR-FTIR</b> .....	<b>41</b>
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>

<b>6.1 ESTERIFICAÇÃO QUÍMICA</b> .....	42
6.1.1 Leitura dos padrões e efeito do dessecante molecular .....	42
6.1.2 Efeito da substituição do ácido sulfúrico por resina de troca catiônica e da concentração de ácido sulfúrico na esterificação .....	44
<b>6.2 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA</b> .....	<b>44</b>
6.2.1 Teste com diferentes concentrações de água .....	44
6.2.2 Teste com diferentes biocatalizadores .....	45
6.2.3 Efeito da concentração do biocatalizador .....	46
6.2.4 Teste dos ciclos enzimático .....	47
<b>6.3 PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DO OLEATO DE ISOAMILA UTILIZANDO O ATR-FTIR</b> .....	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>

# 1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas causadas principalmente devido ao uso desses produtos e a preocupação com o desenvolvimento sustentável, trazem o uso de fontes renováveis de energia como alternativa como, por exemplo, a biomassa. No Brasil se tem, dentre as fontes alternativas, o uso de biomassa para a produção de etanol e biodiesel (ROSSET, 2011). O álcool utilizado no Brasil como combustível se apresenta na forma de álcool hidratado ou anidro, sendo dois tipos preferencialmente utilizados: Álcool Etílico Anidro combustível (AEAC), que é adicionado à gasolina e o Álcool Etílico Hidratado Combustível (AEHC) (BATISTA, 2008).

A produção total de etanol no Brasil entre os anos de 2014 a 2016 soma mais de 60 bilhões de litros. Sendo de 28,7 bilhões de litros na safra 2014/15 e de 30,5 bilhões de litros para 2015/16, um aumento de 1,8 bilhões de litros ou 6,3%, de uma safra para a outra (CONAB, 2016).

Com a produção de etanol há, também, nos subprodutos gerados no processo de fermentação e destilação da cana-de-açúcar. Dentre estes subprodutos está o óleo fúsel. O termo fúsel é originário de uma palavra alemã “fousel”, que se relaciona a “coisas ruins” (FERREIRA, 2012). Hoje o termo óleo fúsel é utilizado para designar a mistura de álcoois superiores obtidos pelas fases do processo de purificação do álcool etílico (GARCIA, 2008).

A proporção média estimada de óleo fúsel produzida em uma usina de destilação do álcool combustível é de 2,5L para cada 1000L de álcool etílico (MEIRELLES et al., 2013). Assim pode-se calcular uma produção de aproximadamente 148 milhões de litros de óleo fúsel, se somadas as safras de 2014/15 e 2015/16. Apesar da enorme escala de produção, o óleo fúsel ainda não é devidamente aproveitado, assim a busca por uma aplicação deste subproduto torna-se evidente (PÉREZ et al., 2001).

O óleo fúsel é constituído principalmente de álcoois superiores, este líquido possui coloração geralmente clara, podendo apresentar-se também esbranquiçado

ou amarelado e com odor característico. Caracterizado como um líquido oleoso, possuindo aproximadamente 60 % em massa de álcoois na faixa de destilação entre 122°C e 138°C (FERREIRA, M., 2012). O óleo fúsel tem em sua composição majoritária os álcoois isoamílico e isobutílico, com baixos teores médios de ésteres e aldeídos (MEIRELLES et al., 2013).

O óleo fúsel pode ser esterificado via enzimática dando origem a um composto com composição primordial dos oleatos de isoamila e isobutila. O biolubrificante de éster preparado por via enzimática a partir de óleo fúsel e ácido oleico, em sistema aquo-restrito, utilizando a Novozym 435 imobilizada, tem semelhança a um lubrificante de origem sintética do tipo DB 32. O biolubrificante “fúsel” possui baixa viscosidade e é adequado a processos especiais de lubrificação, podendo ser usado na indústria mecânica como, por exemplo, um composto lubrificante refrigerante para processos de processamento de metais, em especial em processos em que possa ocorrer perda de lubrificante como na lubrificação a jato, corrente ou lançamento em motor (DORMO et al., 2004).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Síntese de ésteres à partir do óleo fúsel com ácido oleico por esterificação via enzimática.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudo da reação de esterificação pela rota química.

Construção de uma base de dados através do estudo do potencial qualitativo de esterificação via enzimática de doze amostras de lipases, utilizando como substratos do ácido oleico com o álcool isoamílico e óleo fúsel.

Estudar o processo de esterificação via enzimática e, deste modo, conhecer a quantidade de ciclos para uma mesma quantidade de enzima;

Estudar o rendimento da esterificação enzimática alterando a quantidade das enzimas. E, para tal, utilizar a técnica de cromatografia em camada delgada, para um acompanhamento do consumo do ácido oleico e formação de produtos;

Testar a influência da água na esterificação via enzimática;

Realizar a análise de espectroscopia no infravermelho com transformada.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Com o investimento e conseqüente aumento da produção de etanol há, também, o aumento da produção de subprodutos, dentre eles o óleo fúsel. A metodologia escolhida, que utiliza enzimas como catalizador, se mostrou uma alternativa viável, visto que o óleo fúsel possui uma parcela de água que não pode ser desprezada e que não é de grande interferência para a esterificação enzimática, diferente da esterificação química, onde a presença de água desloca o equilíbrio para os reagentes, diminuindo o rendimento da reação. Assim, através de um sistema simples, um subproduto da indústria alcooleira poderá ser utilizado de modo satisfatório para a produção de um éster que poderá ser utilizado como um lubrificante.

## 4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 4.1 ÓLEO FÚSEL

#### 4.1.1 Processo de produção e composição

O processo de fermentação alcoólica pelo metabolismo anaeróbico faz a transformação de açúcares solúveis em etanol e CO<sub>2</sub> (FONTAN et al., 2011). Este processo tem seu início devido à ação das leveduras que usam os açúcares do mosto (líquido açucarado apto a fermentar), para seu crescimento e multiplicação, oxidando parcialmente o substrato, atuando sobre um ou mais componentes (MAIA, 2013).

A transformação do açúcar em etanol e gás carbônico envolve 11 reações e se dá pela via glicolítica, onde cada reação é catalisada por uma enzima específica. Essas enzimas glicolíticas sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros), alguns que estimulam e outros que reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras. As rotas produtoras de energia geram um produto final significativo, o ácido pirúvico, que em anaerobiose é precursor dos ácidos, álcoois e outros produtos (MAIA, 2013).

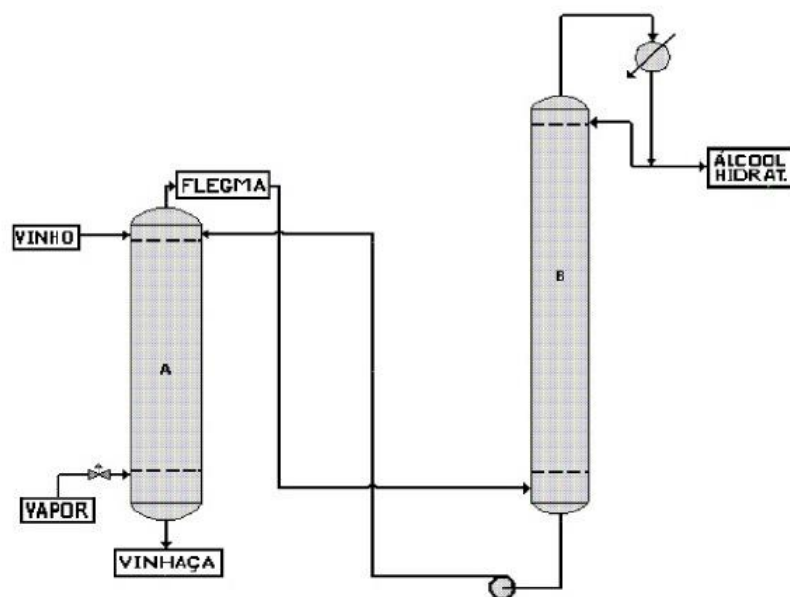
A fermentação de um substrato contendo açúcar produz, além de etanol, outras substâncias como álcoois de cadeia longa, sais, ácidos inorgânicos e gases como dióxido de carbono, devido ao metabolismo celular. Os álcoois superiores são produzidos durante a fermentação como subproduto do catabolismo de aminoácidos ou pela via do piruvato, derivada do metabolismo de carboidratos (FERREIRA, 2012). A **Tabela 1** contém a porcentagem de óleo fúsel produzido por litros de álcool etílico a partir de diferentes substratos.

**Tabela 1** Rendimento em porcentagem de óleo fúsel produzido à partir de diferentes substratos.

Substrato	Rendimento em % v/v de álcool fúsel produzido
Melaço de cana	0,1 a 0,5
Caldo de cana evaporado	0,1 a 0,2
Malte de milho	0,25 a 0,3
Milho	0,4 a 0,5
Trigo	0,2 a 0,3
Batatas	0,5 a 1,1

FONTE – PATIL, 2002

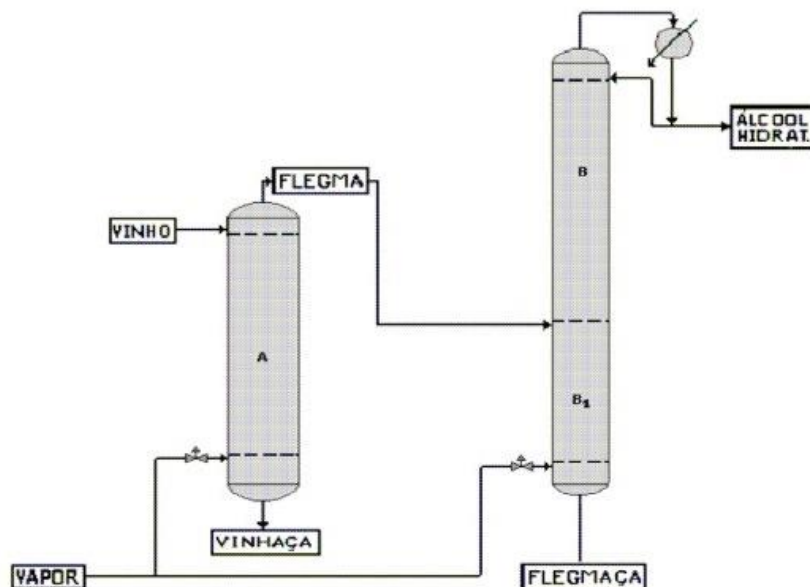
Para a produção de álcool etílico pode-se utilizar um sistema com duas colunas, chamado de sistema AB, como representado na **Figura 1**. Embora se tenham duas colunas, ambas trabalham como se fossem uma única coluna, sendo a primeira (A) a seção de esgotamento do vinho e a segunda (B) a seção de enriquecimento e retificação do flegma (BATISTA, 2008). O flegma é o produto principal de destilação, sendo ele uma mistura hidroalcoólica impura, com graduação alcoólica entre 45 a 50°GL, o vinho é um dos produtos de fermentação do mosto ou mosto fermentado (CASTRO, 2011).

**Figura 1** - Coluna de destilação alcóolica, configuração AB.

FONTE – BATISTA, 2008

O sistema AB pode ser suficiente se o vinho a ser destilado for apenas uma solução água/etanol, mas como o processo de fermentação alcoólica pode gerar vários outros componentes, este sistema geralmente precisa de algumas modificações. Um sistema proposto é o  $ABB_1$  ou  $ABB'$ , mostrado na **Figura 2**. Neste sistema se tem uma seção a mais de esgotamento, chamado de coluna B1 ou coluna B'. Como se pode observar, a corrente líquida que deixa a base da coluna B não retorna à coluna A, mas é esgotada na coluna B<sub>1</sub>. Na parte inferior da coluna B é retirada a corrente chamada de flegmaça ou óleo fúsel (BATISTA, 2008).

**Figura 2** - Coluna de destilação alcoólica, configuração  $ABB_1$ .



FONTE – BATISTA, 2008

Segundo Castro (2011) o óleo fúsel é uma mistura concentrada das impurezas do flegma. A quantidade de óleo fúsel é variável dependendo do substrato utilizado, da presença de compostos nitrogenados, condições de fermentação e de destilação.

O processo de produção do etanol atualmente praticado no Brasil envolve o reciclo das leveduras e, com isto, ocorre o reciclo de contaminantes causando diversos distúrbios tais como: consumo de açúcar e etanol pelos contaminantes, queda da viabilidade e morte das células de levedura devido às toxinas lançadas no

meio pelo contaminante, fermentações secundárias oriundas da atividade destes microrganismos contaminantes, além do problema de floculação das células de levedura provocada tanto por bactérias como por leveduras. A acidez do "vinho" (mosto fermentado e centrifugado), causada por bactérias produtoras de ácidos orgânicos, é comprovadamente aumentada com o aumento da floculação, causando uma significativa queda na viabilidade de leveduras e no rendimento alcoólico (LUDWIG et al, 2011).

LUDWIG et al. (2011), afirma que apesar dos transtornos causados pela floculação das leveduras devido a bactérias indutoras da floculação na indústria, ainda não há métodos de controle industrial para caracterização e monitoramento destes agentes.

A composição do óleo fúsel é mostrada na **Tabela 2**, esta resume os teores médios para os principais compostos presentes. As amostras utilizadas para a determinação da composição foram obtidas de três indústrias produtoras de açúcar e álcool do Estado de São Paulo. As amostras foram codificadas como OF-1, OF-2 e OF-3 (PÉREZ et al., 1998).

**Tabela 2** - Teores médios de álcoois, ésteres e aldeídos em amostras de óleo fúsel. Com concentração média em g.L<sup>-1</sup>.

Concentração média em g/L em 3 séries de amostras para cada usina			
COMPOSTO	OF-1	OF-2	OF-3
Álcool metílico	26,9	17,7	5,0
Álcool etílico	46,9	12,0	26,4
Álcool n-propílico	14,5	6,5	14,6
Álcool isoamílico	380	367	425
Álcool isobutílico	133	140	201
Acetato de metila	ND	8,7 x 10 <sup>-4</sup>	ND
Acetato de amila	3,7 x 10 <sup>-4</sup>	ND	ND
3-pentanol	1,1 x 10 <sup>-4</sup>	ND	8,3 x 10 <sup>-5</sup>
Álcool n-butílico	2,7 x 10 <sup>-3</sup>	2,3 x 10 <sup>-3</sup>	6,0 x 10 <sup>-4</sup>
Acetato de hexila	2,3 x 10 <sup>-4</sup>	2,5 x 10 <sup>-4</sup>	5,8 x 10 <sup>-4</sup>
n-octanol	1,4 x 10 <sup>-4</sup>	9,8 x 10 <sup>-4</sup>	ND

**Tabela 2** - Teores médios de álcoois, ésteres e aldeídos em amostras de óleo fúsel. Com concentração média em g.L<sup>-1</sup>.

Concentração média em g/L em 3 séries de amostras para cada usina			
COMPOSTO	OF-1	OF-2	OF-3
Álcool n-amílico	$1,7 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-3}$
Formiato de etila	$1,1 \times 10^{-4}$	ND	$9,4 \times 10^{-4}$
Álcool 2-butílico	$1,3 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-3}$
Benzoato de metila	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$9,3 \times 10^{-3}$
Acetaldeído	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$5,2 \times 10^{-3}$
Propionaldeído	$1,9 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^{-3}$

ND – não detectados.

Fonte – PÉREZ, 1998

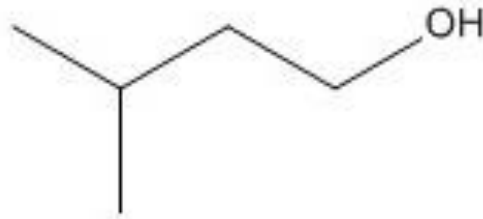
Na **Tabela 2** observa-se que os compostos que se apresentam em maior concentração são os álcoois isoamílico e isobutílico, com uma porcentagem média presente no óleo fúsel de 64,67% e 25,93%, respectivamente, somando aproximadamente de 90% da composição do mesmo. Estes álcoois têm reconhecida importância, visto suas aplicações como reagentes em sínteses orgânicas e como solventes de extração nas análises de compostos de interesse farmacológico (PÉREZ et al., 2001).

#### 4.1.2 Álcoois isoamílico e isobutílico

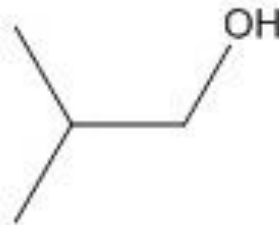
Estes álcoois são líquidos à temperatura ambiente, sendo a densidade e o ponto de ebulição do álcool isoamílico (3-metil-1-butanol) de  $0,8104 \text{ g.cm}^{-3}$  e  $131,1^\circ\text{C}$ , respectivamente, e do álcool isobutílico (2-metil-1-propanol) é  $0,8018 \text{ g.cm}^{-3}$  e  $107,89^\circ\text{C}$ , respectivamente (LIDE, 1998).

Os álcoois isoamílico e isobutílico fazem parte dos álcoois de baixo peso molecular (CAREY, 2011). Suas estruturas estão representadas pelas **Figuras 3 e 4**, respectivamente.

**Figura 3** - Estrutura do álcool isoamílico.



**Figura 4** - Estrutura do álcool isobutílico.



O álcool isoamílico tem uma imensa gama de utilização em diversos tipos de indústria. Pode ser utilizado como um solvente para a preparação de aromas de frutos sintéticos, tais como alperces, bananas, cereja, ameixa-caranguejeira, malte, laranja, ameixa e sabores whisky, e é uma matéria-prima na produção de óleo de banana sintética. É um dos componentes do aroma da trufa negra. Ele também é usado para estimar a quantidade de gordura no leite e produtos lácteos (CHEMOXY, 2016).

O álcool isoamílico é o principal ingrediente do Reagente de Kovac utilizado para o diagnóstico bacteriano do teste de indol. Nos produtos farmacêuticos, é a matéria-prima inicial para uma série de preparações farmacêuticas, tais como Barbamil, validol, Corvalol e nitrito de amila (CHEMOXY, 2016).

A sua combinação de propriedades faz com que seja adequado para utilização como um supressor de espuma, que afeta a tensão de superfície de micro-emulsões, causando a quebra de espuma (CHEMOXY, 2016).

Como solvente, tem um aumento da utilização em um grande número de aplicações industriais. É um diluente em algumas tintas de impressão, vernizes e gomas. Seu poder de solvência fica entre solventes de hidrocarbonetos comuns e



cetonas de baixo peso molecular. A cera de parafina é solúvel em álcool isoamílico quente (CHEMOXY, 2016).

Na formulação, alguns ésteres de elevado peso molecular e plásticos polares incorporam sistemas à base de álcool isoamílico, como ésteres de celulose, goma-laca e ureia-formaldeído (CHEMOXY, 2016).

Um derivado de álcool isoamílico, o p-metoxicinamato é usado como um absorvente de UV em algumas formulações cosméticas, e o próprio produto encontra aplicação como um aromatizante cosmético e no perfume (CHEMOXY, 2016).

O álcool isobutílico é utilizado como solvente e como matéria-prima para sínteses. Uma grande parte da produção de isobutanol puro é convertida em derivados (principalmente ésteres) que são utilizados como solventes na indústria de revestimento. A Vantagem é que o álcool isobutílico impede o rubor de certos revestimentos quando eles secam em condições húmidas. Assim, é amplamente utilizado como diluente em celulose Nitrato e serve para melhorar o seu fluxo, brilho e resistência ao rubor (O rubor só ocorre na presença de solventes voláteis e em humidades elevadas). Para este efeito, as taxas de adição de 5 a 10% são geralmente suficientes (BASF, 1999).

O isobutanol é um solvente apropriado para vernizes curáveis com ácido e finalizadores de cura derivados de ureia, melamina ou resinas fenólicas. Mesmo quando adicionado em pequenas proporções a tintas a base de resinas alquídicas, o isobutanol reduz sua viscosidade e, assim, melhora sua aplicação (BASF, 1999).

O ftalato de di-isobutilo ganhou importância entre os ésteres de isobutanol de ácidos dicarboxílicos como plastificantes para plásticos, dispersões e misturas de borracha. Outros ésteres de isobutanol de ácidos dicarboxílicos, por exemplo, os ácidos adípico, azelaico e sebácico, também possuem boas propriedades para estas aplicações. O isobutanol possui mais as seguintes utilizações (BASF, 1999):

- Solvente para tintas de impressão.
- Agente extrator na produção de drogas e substâncias naturais como antibióticos, hormônios, vitaminas, alcalóides e cânfora.

- Aditivo em polidores e produtos de limpeza como, por exemplo, limpadores de chão e removedores de manchas.
- Solubilizante na indústria têxtil, como aditivo em banhos de fiação ou para colorir plásticos.
- Aditivo em fluidos de descongelação.
- Aditivo na gasolina para motores de ignição comandada (evita a formação de gelo no carburador).
- Fase móvel em papel em cromatografia de camada fina.
- Umectante para nitrato de celulose.
- Agente desidratante (destilação azeotrópica).
- Matéria-prima na produção de éteres de glicol (em reações com etileno ou óxidos de propileno).
- Matéria-prima na produção de auxiliares de flutuação (por exemplo, xantato de isobutilo).
- Material de partida na produção de inibidores de desgaste e aditivos de anticorrosão em óleos para motores, como o diisobutil ditiofosfato de zinco.

Os ésteres de álcool isobutílico de vários ácidos dicarboxílicos, como os ácidos sebácico, adípico e esteárico, são utilizados como lubrificantes sintéticos e semi-sintéticos e fluidos hidráulicos (BASF, 1999).

## 4.2 LIPASES

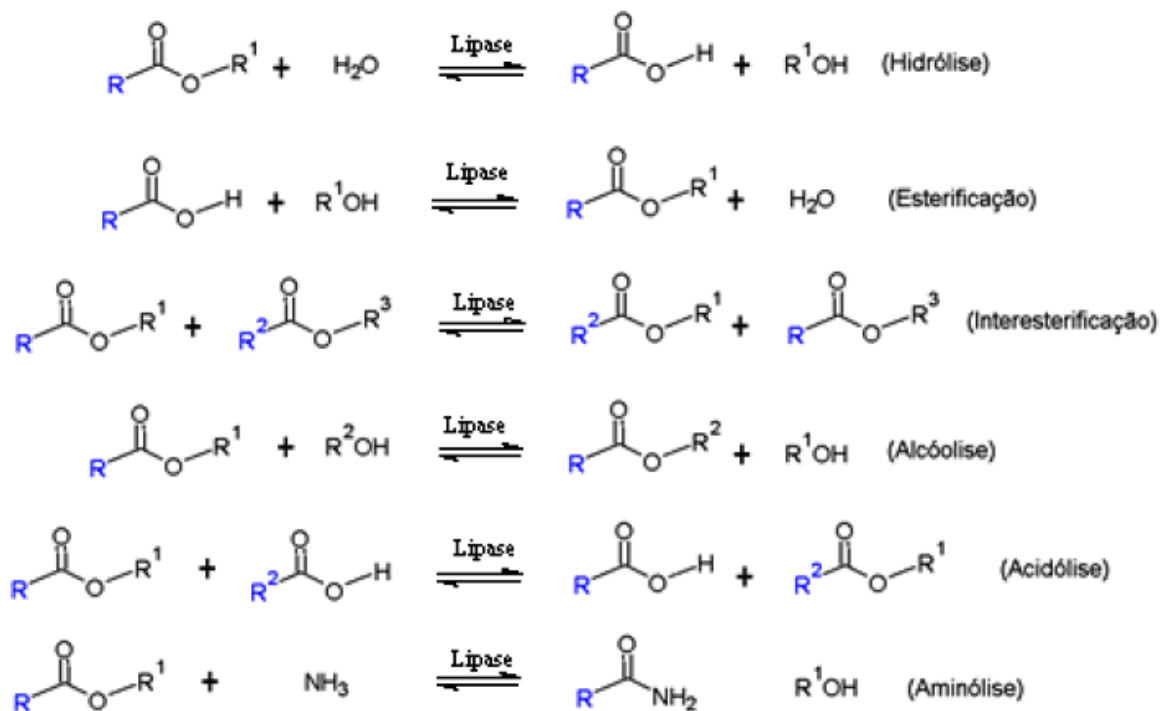
### 4.2.1 Aspectos gerais

As lipases constituem uma classe especial de esterases, sendo classificadas como hidrolases. A diferença entre uma lipase e uma esterase é a que a lipase catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase catalisa reações em substratos solúveis (ZAGO, 2010).

As lipases têm como principal função “*in vivo*” catalisar a reação de hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono) na interface lipídio/água, produzindo os ácidos graxos correspondentes. Apesar dos triacilgliceróis serem seu substrato natural as lipases também são capazes de utilizar outros tipos de substratos e catalisar outros tipos de reações, dependendo do meio

reacional utilizado (aquoso ou orgânico). Assim, na presença de um nucleófilo que pode competir com a água, é possível conduzir um número significativo de reações úteis em biocatálise, como esterificação, interesterificação, alcóólise, acidólise e aminólise (**Figura 5**), com alta especificidade, estabilidade e se aplicando condições brandas (VILLALOBOS, 2016).

**Figura 5** - Reações químicas catalisadas por lipases.



FONTE - VILLALOBOS, 2016

#### 4.2.2 Vantagens e desvantagens

As lipases apresentam muitas vantagens e são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo, porque não requerem cofatores e porque atuam em uma faixa de pH relativamente grande (AOUF et al., 2014).

Elas podem catalisar reações de esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade. Graças a

grande quantidade de reações que elas podem catalisar, as lipases possuem diversas aplicabilidades e alta versatilidade, assim têm sido extensivamente investigadas para aplicações industriais (VECCHIA, 2004).

No caso da síntese de ésteres, elas têm sido empregadas para a síntese de aromas e flavorizantes (ésteres com cadeia alquílica entre 2 a 8 carbonos), que apresentam maior aceitação na indústria de alimentos, pois são considerados naturais, por serem obtidos via biocatálise. Além disso, as lipases são aceitas ecologicamente e não estão limitadas ao seu papel natural (BARON, 2008).

Entretanto, algumas desvantagens podem limitar a utilização destes catalisadores, como o alto custo de isolamento e purificação para algumas enzimas, a possibilidade em causar alergias, a instabilidade em sua estrutura uma vez isolada do meio natural (aquoso), e sua sensibilidade às condições reacionais, pois as enzimas podem ser inibidas por substâncias que estão presentes no meio reacional, desnaturadas por solventes orgânicos ou por temperaturas relativamente elevadas (BARON, 2008).

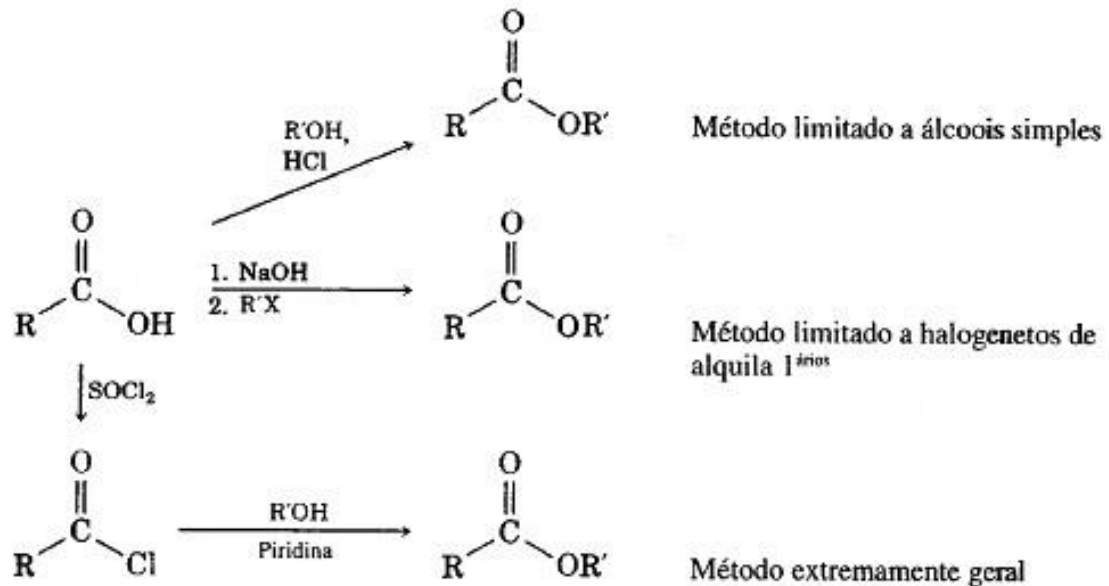
### 4.3 REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO

#### 4.3.1 Rota Química

Os ácidos carboxílicos reagem com álcoois para formar ésteres. A reação deve ser efetuada em solução ácida, não somente para catalisar a reação, mas também para manter o ácido carboxílico em sua forma ácida, para que ele possa reagir com o nucleófilo. Como o intermediário tetraédrico formado na reação tem dois potenciais grupos de saída com aproximadamente a mesma basicidade, a reação deve ser realizada com excesso de álcool para que seja direcionada na direção dos produtos (BRUICE, 2006).

Os ácidos carboxílicos se convertem diretamente a ésteres pela reação  $S_N2$  de carboxilatos com halogenetos de alquila primários ou pela esterificação de Fischer de ácidos carboxílicos por álcoois, na presença de ácido mineral (CAREY, 2011). Esta reação, bem como possíveis reações de esterificação de ácidos carboxílicos, está representada pela **Figura 6**.

**Figura 6** – Rotas de esterificação ácida, básica e de cloreto de acila pelo tratamento com álcool na presença de base.

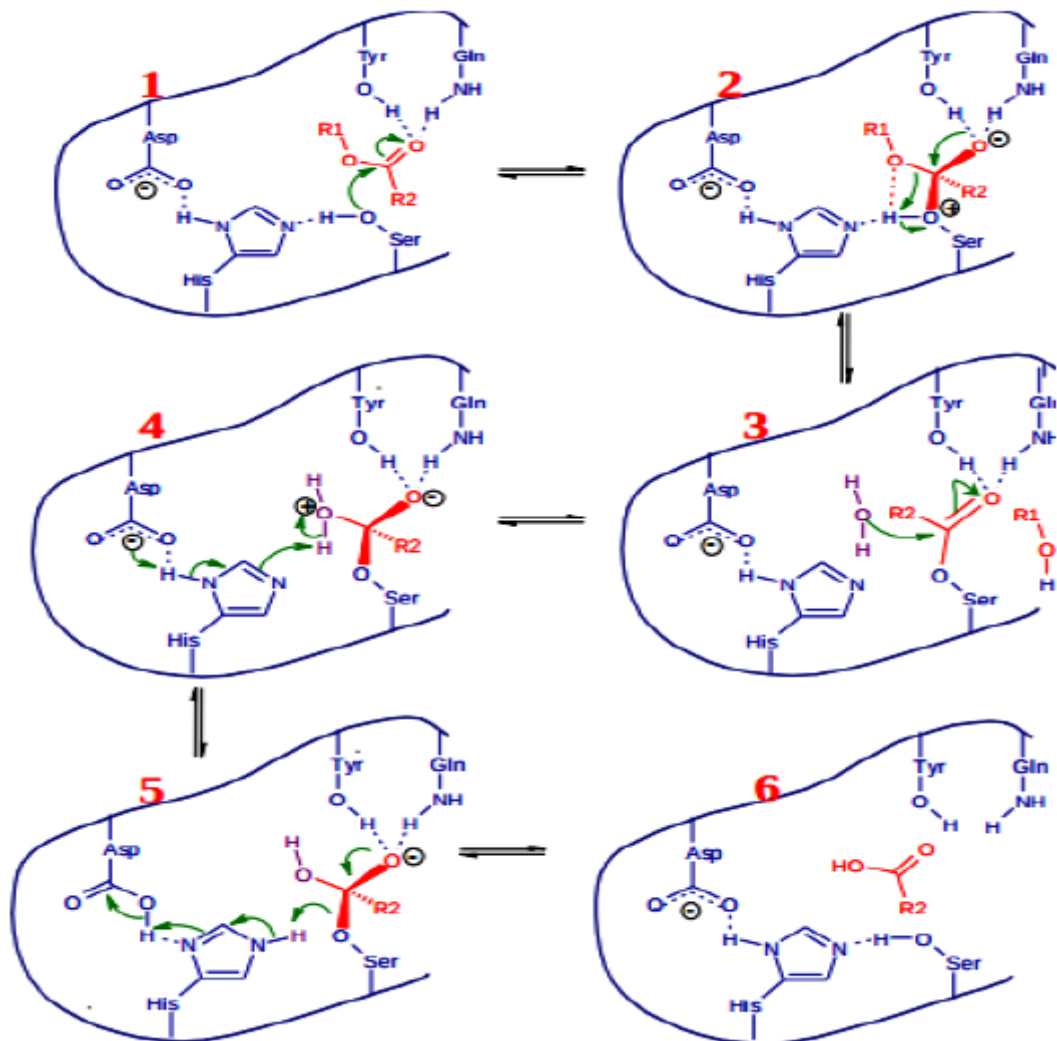


FONTE - MCMURRY, 1997

#### 4.3.2 Rota enzimática

Villalobos (2016) propõem um mecanismo catalítico para a reação de hidrólise de ésteres mediada por lipases (**Figura 7**). Este mecanismo ocorre em seis etapas, no primeiro passo (1) a interação do resíduo negativamente carregado de aspartato (ou glutamato) permite ao resíduo de histidina agir como uma base, removendo um próton do grupo hidroxila do resíduo de serina do sítio ativo, aumentando seu caráter nucleofílico e gerando um íon alcóxido. Na etapa 2 o íon alcóxido ataca a carboxila do substrato éster, formando o primeiro intermediário tetraédrico (oxiânion estabilizado por ligações de hidrogênio). Posteriormente, no passo 3, há uma quebra da ligação éster com saída da porção alcoólica e formação do intermediário acil-enzima, na etapa 4 ocorre a hidrólise do intermediário acil-enzima, seguido pela formação do segundo intermediário tetraédrico (5) e por fim ocorre a formação do produto e regeneração do sítio ativo na última etapa (VILLALOBOS, 2016).

**Figura 7** - Etapas propostas para a hidrólise de ésteres catalisada pela lipase.

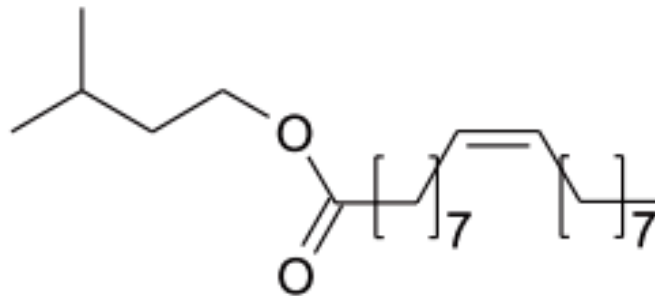


FONTE - VILLALOBOS, 2016

Pode-se assumir que o mecanismo inverso da hidrólise de ésteres será o de esterificação. Para que a enzima trabalhe com o mecanismo inverso se deve proporcionar as condições de meio e os substratos adequados, o álcool e o ácido carboxílico.

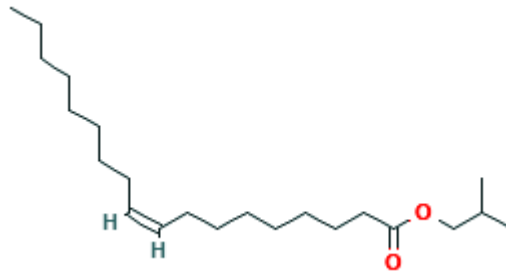
Para a reação de esterificação serão focados como reagentes os álcoois presentes em maior concentração no óleo fúsel, ou seja, os álcoois isoamílico e isobutílico, sendo o álcool isoamílico o de maior interesse industrial. Assim, como os produtos da reação de esterificação destes álcoois com o ácido oleico, se tem o oleato de isoamila e o oleato de isobutila, representados pelas **Figuras 8 e 9**, respectivamente.

**Figura 8** - Fórmula estrutural do oleato de isoamila.



FONTE - MADARASZ et al., 2015

**Figura 9** - Fórmula estrutural do oleato de isobutila.



FONTE - PUBCHEM, 2016

Os ésteres são considerados uma das classes mais importantes dos compostos orgânicos, podendo ser obtidos através de diferentes formas, como por fontes naturais, destilação e extração, catalise química e, mais recentemente, por biocatálise. No caso da biocatálise, as obtenções de ésteres por lipases pode ser através da esterificação, interesterificação e transesterificação (BARON, 2008).

#### 4.4 LUBRIFICANTES

O uso de biomassa para a síntese de vários produtos com valor agregado esta na zona prioritária de investigadores. Pesquisadores têm explorado várias fontes renováveis como proteínas, folhas de árvore, algas variadas, óleos vegetais, polpa de café, lodo de fábrica de papel, lignocelulose e outros resíduos para a síntese de bioplásticos, biolubrificantes, bioadsorventes, bioestimulantes e bioetanol (PANCHAL et al., 2016)

Lubrificantes são materiais que podem ser líquidos, sólidos ou pastosos, que diminuem as resiliências passivas das máquinas substituindo o atrito das peças pelo atrito interno dos lubrificantes interpostos. Eles possuem as funções de proteger peças do atrito, ou seja, contra o desgaste; em alguns casos, proteger contra corrosão; facilitar trocas térmicas quando há lubrificação por circulação; assegurar a vedação das peças das máquinas; e transportar os resíduos metálicos microscópicos, resultantes do funcionamento das peças em atrito (REMY et al., 19--)

Os lubrificantes possuem várias aplicações, como exemplos tem-se a utilização em motores de combustão interna, engrenagens, compressores, turbinas, mancais, sistemas hidráulicos, entre outros. Atualmente encontram-se divididos em duas grandes classes: lubrificantes automotivos e industriais (MATOS, 2011).

Os lubrificantes podem ser classificados como óleos: minerais, graxos, compostos e sintéticos. Óleos minerais são os mais importantes empregados em lubrificação, eles são aqueles obtidos do petróleo e suas propriedades estão relacionadas com a origem do óleo cru e ao processo de refino empregado. Os óleos sintéticos surgiram de necessidade do desenvolvimento de produtos aptos a suportar as condições mais adversas possíveis e são obtidos por síntese química, como o nome sugere (MOURA; CARRETEIRO, 1975).

Os óleos graxos podem ser de origem animal ou vegetal, e foram os primeiros lubrificantes a serem utilizados, sendo mais tarde substituídos pelos óleos minerais. Seu uso nas máquinas modernas é raro, devido à sua instabilidade química, principalmente em altas temperaturas, o que provoca a formação de ácidos e vernizes. Os óleos compostos são constituídos de misturas de óleos minerais e graxos. A percentagem de óleo graxo no lubrificante é pequena, variando de acordo com a finalidade do óleo. Os óleos graxos conferem aos óleos minerais propriedades de emulsibilidade, oleosidade e extrema pressão (SENAI, 1997).

Os ésteres para os lubrificantes podem ser produzidos por meio de catálise química ou enzimática. As lipases são os catalisadores preferidos para estes processos, de fato há muitos relatos sobre as lipases utilizadas para a produção de biodiesel e biolubrificantes. Entretanto, a maior parte destes estudos de síntese foi realizada com os óleos de soja, de girassol e de canola. Além disso, as lipases de



*Rhizomucor miehei*; *Candida antarctica* e *Candida rugosa* têm sido as mais utilizadas na produção de biodiesel e biolubrificante (SILVA et al., 2015).

#### 4.4.1 Óleos básicos

Os óleos básicos são os principais constituintes dos lubrificantes e são subprodutos gerais do processamento de petróleo. Eles podem ser classificados como minerais ou sintéticos dependendo da fonte ou de seu processo de produção. Os óleos minerais são derivados diretamente da destilação e refinação de petróleo; Enquanto os sintéticos são produzidos através de reações químicas (SILVA et al., 2015).

Os óleos básicos são classificados pela American Petroleum Institute (API) em cinco grupos, mostrado no **Quadro 1**, denominados Grupos API. A classificação é ditada pela qualidade, que cresce de acordo com o grupo, e composição química dos óleos básicos (BNDES, 2014).

**Quadro 1** – Descrição e classificação dos óleos básicos pertencentes aos grupos API.

Grupo	Classificação	Origem
I	Mineral	Destilação fracionada do petróleo na refinaria, seguida de processo de extração por solvente
II		Destilação fracionada do petróleo, seguida de processo de hidrotreatamento
III	Sintético ou Mineral	Óleos básicos do Grupo II submetidos a um processo adicional de hidrotreatamento
IV	Sintético	Óleos compostos por polialfaolefinas (PAO)
V		Todos os demais óleos básicos não inclusos nos grupos de I a IV

Fonte – BNDS, 2014

Uma alternativa mais limpa aos óleos base são os chamados de biolubrificantes. Estas moléculas são lubrificantes biodegradáveis (principalmente ésteres) obtidos, em geral, por modificação de óleos vegetais. Que são utilizados como lubrificantes sempre que são possíveis fugas para não contaminar o meio ambiente (SILVA et al., 2015).

## 4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

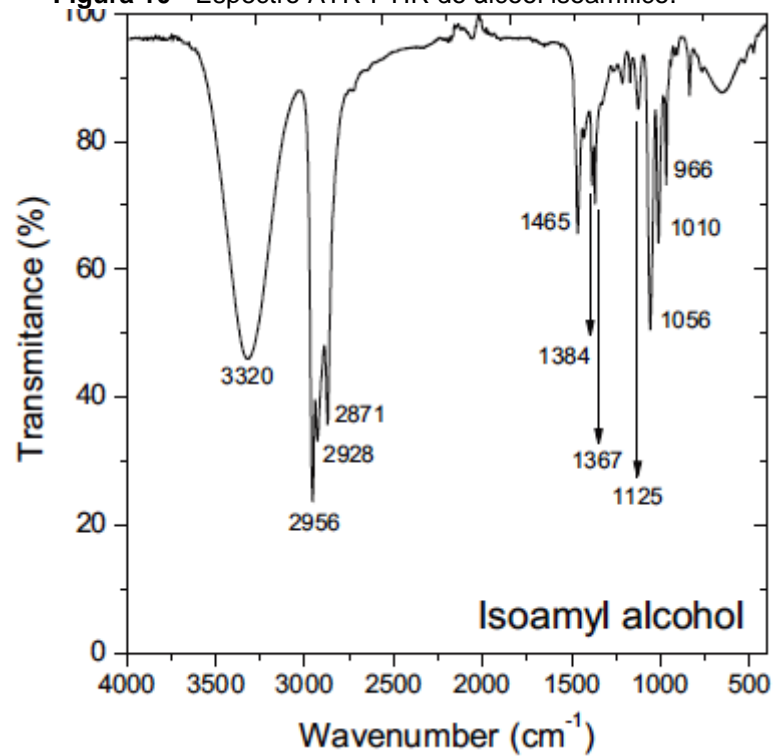
### 4.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD é uma técnica que tem a vantagem, dentre as demais cromatografias, de ser prática, e não o fenômeno em si. Ela é realizada se utilizando uma placa composta por um material adsorvente (podendo ser sílica gel, celulose em pó, alumina e etc), e material rígido e inerte, como uma placa de vidro, folha de alumínio ou de plástico. Esta placa é chamada de fase estacionária. E para a separação dos componentes da amostra é escolhido um solvente adequado, chamado de fase móvel (VOGUEL, 2011).

### 4.5.2 Infravermelho por transformada de Forrier (FTIR)

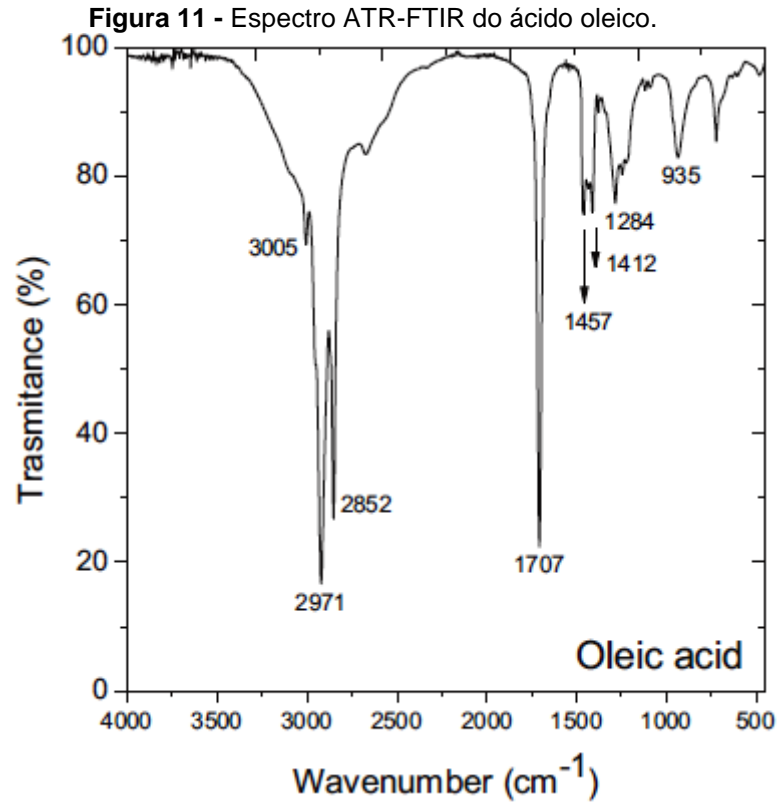
A Espectroscopia de Infravermelho é um método espectroscópico de análise que fornece informações quanto aos grupos funcionais que podem estar presentes na estrutura das substâncias (SKOOG et al., 2009). A leitura foi realizada pelo modo de Refletância Total Atenuada (ATR), onde os espectros obtidos estão em modo de transmissão.

Os espectros ATR-FTIR de álcool isoamílico, ácido oleico e oleato de isoamila são mostrados nas figuras abaixo.

**Figura 10** - Espectro ATR-FTIR do álcool isoamílico.

FONTE - LAGE et al., 2016

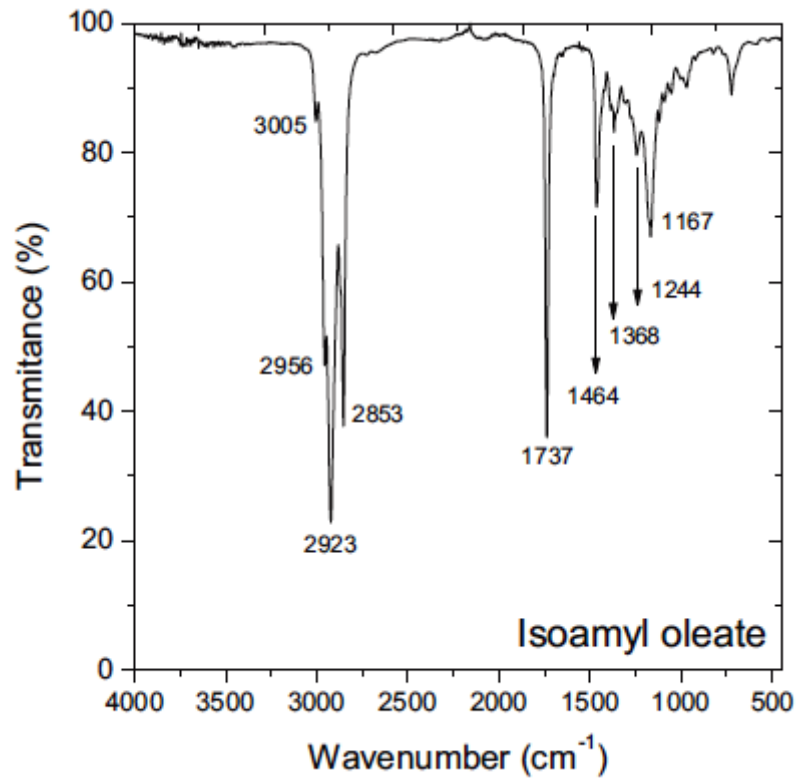
De acordo com o espectro mostrado na **Figura 10**, o álcool isoamílico apresenta uma banda intensa a  $3320\text{ cm}^{-1}$ , que é atribuída à absorção de estiramento de O-H. As bandas entre  $2955\text{ cm}^{-1}$  e  $2871\text{ cm}^{-1}$  correspondem à vibração do estiramento simétrico e assimétrico de grupos metil-metileno C-H e a banda a  $1055\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de estiramento de ligação simples C-O de um álcool primário (LAGE et al., 2016).



FONTE - LAGE et al., 2016

No segundo espectro mostrado na **Figura 11** (ácido oleico), a banda intensa ao redor de  $2971\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento de C-H sobreposto a ligação O-H, enquanto que a vibração de estiramento do grupo carbonila à partir da unidade carboxílica foi observada a  $1707\text{cm}^{-1}$  (LAGE et al., 2016).

Figura 12 - Espectro ATR-FTIR do oleato de isoamila.



FONTE - LAGE et al., 2016

No espectro padrão do oleato de isoamila (**Figura 12**), a banda intensa em  $1737\text{cm}^{-1}$  corresponde a carbonila do éster formado após reação de esterificação. As bandas em  $1244\text{cm}^{-1}$  e  $1167\text{cm}^{-1}$ , correspondem à vibração de estiramento do grupo  $-\text{C}=\text{O}-\text{O}$  (LAGE et al., 2016).

## 5 METODOLOGIA

Para este trabalho foram testadas doze amostras de lipases oriundas de diferentes microorganismos, dentre suas fontes se encontram bactérias gram-negativas, fungos filamentosos e fungos leveduriformes. As lipases utilizadas são de: *Candida lipolytica*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Mucor* sp, *Penicillium nogueforti*, lipoproteína de *Pseudomonas* sp, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei* e Lipase tipo II de pâncreas de porco, totalizando dez tipos de lipases. Dentre elas quatro são vendidas comercialmente. As demais enzimas foram doadas pelo laboratório de biotecnologia do Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT).

As cinéticas das reações de esterificação foram monitoradas em cromatoplasmas de sílica gel 60 da Merck (5980). Utilizando como fase móvel para a saturação da cuba, hexano e éter etílico, na proporção de 30:1. A CCD para ácidos graxos livres esterificados por catálise ácida ou mediante lipases atuando em fase reversa (ausência ou limitação extrema de água no meio reacional) pode sequencialmente revelada com (a) vapores de iodo, (b) *p*-anisaldeído-sulfúrico a quente e (c) “*charring*” ou carbonização com reagente de Vaugh (molibdato - sulfato cérico - ácido sulfúrico) a quente. Este método tem por objetivo a verificação qualitativa da conversão em ésteres etílicos durante a reação, por este motivo, em todas as placas foram aplicados três spots da amostra (100mg/mL) com auxílio do capilar, para uma melhor comparação entre as mesmas e para uma maior aproximação com a realidade da quantidade de reagente consumido e produto formado.

O estudo foi dividido em quatro etapas, para maior compreensão das reações de esterificação pelas vias química e enzimática. As etapas são mostradas no **Quadro 2**.

**Quadro 2** – Etapas seguidas durante o trabalho.

<b>Etapas</b>			
<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
Estudo da esterificação química	Estudo da esterificação enzimática	Isolamento do produto da esterificação via enzimática	Determinação do produto por ATR-FTIR

O óleo fúsel usado para este trabalho foi fornecido pela usina álcooleira Renuka Vale do Ivaí S/A em São Pedro do Ivaí - PR. O processo de produção do óleo fúsel é a fermentação da cana-de-açúcar. A coleta foi realizada em 06/2014.

### 5.1 ESTERIFICAÇÃO QUÍMICA

Verificou-se que o ácido oleico a ser utilizado nas reações estava com uma coloração alaranjada. Assim, foi feita uma purificação, em uma proveta de 50mL se adicionou 50mL do ácido e 2,5g de sílica gel 60, que foi deixada em repouso por 30min. O ácido purificado foi adicionado em um erlenmeyer de 50mL com tampa.

As reações foram realizadas em viais de 1,5mL, onde se adicionou 100µL de ácido oléico e 900µL do álcool estudado, com temperatura 65°C, por uma hora e agitação ocasional. As etapas e suas variáveis foram organizadas no **Quadro 3**.

**Quadro 3** – Estudos das reações de esterificação pela via química suas variáveis e álcoois utilizados.

<b>Esterificação Química</b>				
<b>Etapa</b>	<b>Preparo dos padrões</b>	<b>Presença de dessecante molecular</b>	<b>Troca do catalisador por resina de troca catiônica</b>	<b>Variação da concentração do catalisador</b>
<b>Álcoois</b>	metanol, etanol, isoamílico e isobutílico	metanol, etanol, isoamílico e isobutílico	isoamílico e óleo fúsel	metanol e óleo fúsel
<b>Catalisador</b>	ácido sulfúrico - 2 $\mu$ L	ácido sulfúrico - 2 $\mu$ L	Resina de troca catiônica	ácido sulfúrico
<b>Variações</b>	-	0%-30% (m/v)	0,0mg, 5,0mg, 10,0mg e 20,0mg	0 $\mu$ L, 2 $\mu$ L, 4 $\mu$ L e 6 $\mu$ L

## 5.2 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Para avaliação qualitativa do potencial de esterificação de dez tipos diferentes de lipases e criação de um banco de dados foram realizadas esterificações com doze amostras de enzimas, que foram numeradas a seguir:

1. *Candida lipolytica*
2. *Mucor* sp
3. *Penicillium roqueforti*
4. Lipoproteína de *Pseudomonas* sp
5. *Rhizopus arrhizus*
6. *Rhizopus oryzae*
7. Novozym TL/IM - *Rhizomucor miehei*
8. Lipase Sigma 1754 - *Candida rugosa*



9. Novozym 435 (sem data) - *Candida antarctica*
10. Novozym 435 (2015) - *Candida antarctica*
11. Lipase Sigma 3126 (tipo II) – pâncreas de porco
12. Lipase 3000 UT/G - *Candida rugosa*

Sendo a novozym TL/IM lipase de *Rhizomucor miehei* e a novozym 435 lipase de *Candida antarctica* as únicas enzimas imobilizada em resina de troca catiônica, as demais estavam livres.

O potencial de esterificação qualitativo enzimático foi testado com as três melhores enzimas se realizando um total de seis ciclos, em eppendorf de 1,5mL e 20mg de cada enzima. Depois de cada ciclo foi feita a centrifugação em Minispin para eppendorf a 1300 rpm por cinco minutos, sendo separado o sobrenadante para outro eppendorf de 1,5mL e reutilizada a enzima se adicionando novamente 100µL de ácido oléico e 900µL do respectivo álcool, posteriormente agitado em vórtex labnet (VX-200) para homogeneização da mistura, e adicionado novamente no banho a 35°C, por outras 24 horas.

As reações foram realizadas em viais de 1,5mL, onde se adicionou 100µL de ácido oléico e 900µL do álcool estudado, com agitação a 180rpm e 35°C, por 24 horas. As etapas e suas variáveis foram organizadas no **Quadro 4**.

**Quadro 4** – Estudos das reações de esterificação pela via enzimática suas variáveis e álcoois utilizados.

<b>Etapa</b>	<b>Efeito da concentração de água</b>	<b>Diferentes biocatalizadores</b>	<b>Concentração do biocatalizador</b>	<b>Ciclos enzimáticos</b>
<b>Álcoois</b>	metanol e etanol	isoamílico e óleo fúsel	isoamílico	isoamílico e óleo fúsel
<b>Catalisador</b>	Novozym 435 - 25mg	12 enzimas - 10mg	4 enzimas	3 enzimas - 20mg
<b>Variações</b>	0%, 1%, 2% e 4%	-	2,5mg, 5,0mg, 10,0mg e 20,0mg	6 dias

### 5.3 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO

Para comprovação da síntese do éster foi necessário o isolamento do produto da esterificação. Para ter uma quantidade suficiente para a análise no infravermelho a esterificação foi realizada pela rota enzimática, em duplicata, em viais de 6mL utilizando 125mg da Lipoproteína de *Pseudomonas* sp, 4mL de álcool isoamílico e 500µL de ácido oleico, nas mesmas condições do item 5.2.

Para isolar o oleato de isoamila foi feita uma CCD do modo convencional para este trabalho, ou seja, com hexano e éter etílico 30:1. Mas foi feita apenas uma banda em todo o comprimento da placa. Após a pré-saturação da sílica com a fase móvel, foi possível visualizar as bandas utilizando o cromato-VUE (C-70G), ligando os comprimentos de onda curto (254nm) e longo (365nm). Depois de delimitadas as bandas, as placas foram raspadas e a sílica foi adicionada em tubos de hemólise de 5mL. Para a extração do produto foi adicionado aos tubos 1mL de álcool etílico e 0,5mL de hexano para despolarização da massa oleosa. Os tubos foram levados á

centrífuga CELM (LS3 – plus) por 5 min. Ao separar o sobrenadante, este foi deixado para evaporar o solvente deixando somente o produto de interesse.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DO OLEATO DE ISOAMILA UTILIZANDO O ATR-FTIR

Para verificação da reação de esterificação utilizou-se o espectrofotômetro de ATR-FTIR, Nicolet iS10 da thermo Scientific, com um acessório de salto único de diamante, sendo a análise realizada no laboratório da central analítica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Após a calibração do equipamento com o ar do ambiente laboratorial, a amostra de oleato de isoamila foi aplicada diretamente sobre a célula de cristal. O espectro de ATR-FTIR para o oleato de isoamila foi adquirido após 64 varreduras entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

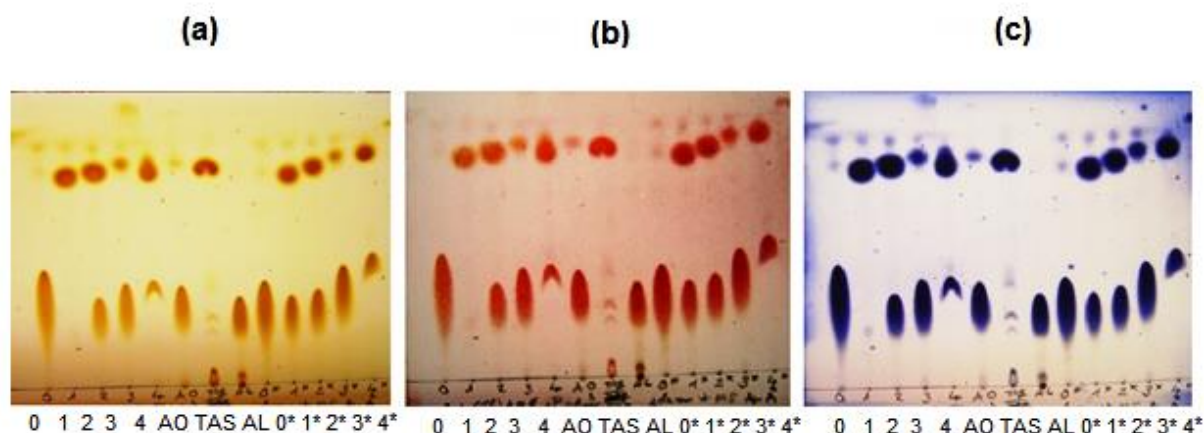
## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 ESTERIFICAÇÃO QUÍMICA

#### 6.1.1 Leitura dos padrões e efeito do dessecante molecular

Os padrões sintetizados através da esterificação ácida, dos quatro alcoóis (metanol, etanol, isoamílico e isobutilíco), foram avaliados depois da corrida com a fase móvel (hexano-éter etílico), em cuba de vidro. Para a revelação, se utilizou outra cuba saturada com iodo, dando a coloração amarelada para os pontos na placa (Fig. 13-a). Por esta primeira ser de característica fulgáz, ou seja, a revelação desaparece, a cromatoplaça foi pulverizado anisaldeído sulfúrico 0,5% aquecido até obter-se a coloração rósea dos pontos (Fig. 13-b). Para finalizar, a presença dos ésteres foi visualizada por uma solução reveladora (Reagente de Vaugh) que deixa os pontos extremamente evidentes com coloração azul escura (Fig. 13-c).

**Figura 13** - Revelação da CCD contendo os padrões, realizada com (a) vapores de iodo, (b) *p*-anisaldeído-sulfúrico a quente e (c) “charring” ou carbonização com reagente de Vaugh. Reações realizadas com ácido oleico e os álcoois metílico, etílico, isopropílico e isoamílico (1, 2, 3 e 4, respectivamente), e com a presença do dessecante molecular (0\*, 1\*, 2\*, 3\* e 4\*, respectivamente).



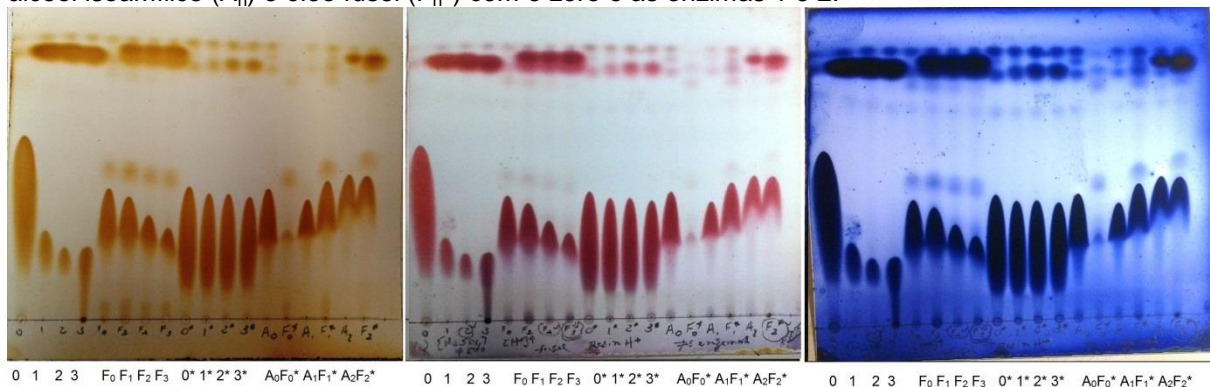
As reações do ácido oleico com metanol, etanol, álcool isopropílico e álcool isoamílico, presentes na **Figura 13**, estão representadas pelos números 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Para comparação foram feitas as mesmas reações com dessecante molecular, chamado de molecular sieves, um zeólito artificial que absorve preferencialmente água e não absorve os álcoois utilizados ou seus produtos, para ver a influência da água na reação de esterificação, estando representado pelos números 0\*, 1\*, 2\*, 3\* e 4\*, respectivamente. As siglas AO, TAS e AL são, respectivamente, representações dos padrões de ácido oleico, triacilglicerídeo e ácido linoleico.

A sequência de fotos exemplifica a poli-valência analítica para a esterificação ácida sulfúrica dos álcoois e ácido oleico em estudo. Com as CCDs apresentadas na **Figura 13** pode-se constatar que a presença do dessecante *molecular sieves* não apresentou influência positiva na eficiência da reação de esterificação tendo até mesmo uma redução da reação no caso do metanol. No caso do álcool isoamílico houve um leve efeito benéfico. Neste caso o excesso de água pode deslocar o equilíbrio a favor da hidrólise do produto, por isto a necessidade do controle do conteúdo de água na síntese em meio orgânico, como é o caso (BARON, 2008).

### 6.1.2 Efeito da substituição do ácido sulfúrico por resina de troca catiônica e da concentração de ácido sulfúrico na esterificação

Na CCD mostrada pela **Figura 14** há o teste de esterificação realizado com a resina de troca catiônica e álcool metílico (0\*, 1\*, 2\* e 3\*), para comparação com a esterificação com ácido sulfúrico com o mesmo álcool (0, 1, 2 e 3) e com a esterificação do óleo fúsel com ácido sulfúrico (F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>).

**Figura 14** - CCD realizada com amostras de esterificação via química do óleo fúsel e do álcool metílico com e sem resina de troca catiônica, mais amostras da esterificação via enzimática com álcool isoamílico (A<sub>n</sub>) e óleo fúsel (F<sub>n</sub>\*) com o zero e as enzimas 1 e 2.



Á partir da **Figura 14** pode-se verificar que a resina de troca catiônica não foi capaz de promover melhorias na esterificação, pois há uma grande quantidade de reagentes e poucos produtos na CCD. No caso da esterificação com ácido sulfúrico, tanto no caso do álcool metílico como no do óleo fúsel, o aumento da quantidade do ácido favoreceu a esterificação, mas na quantidade de 6µL para o álcool metílico a reação foi desfavorecida pelo excesso do reagente.

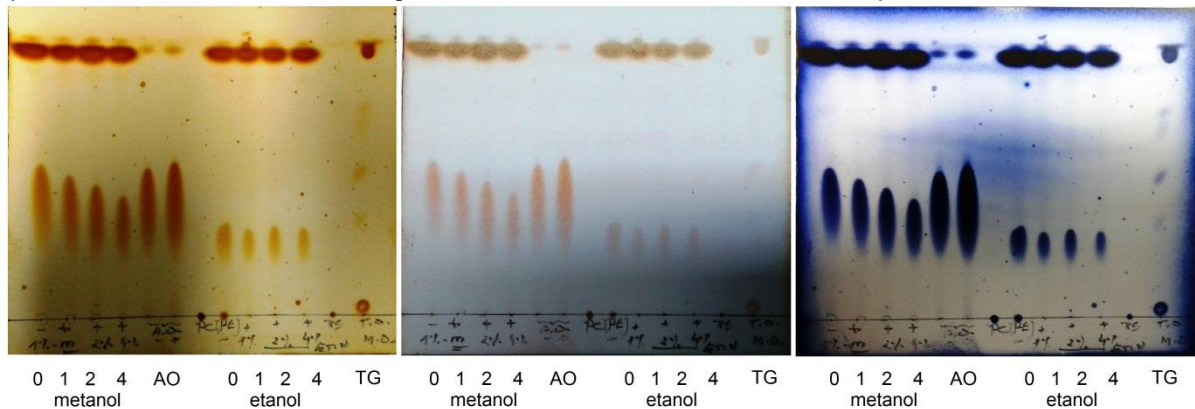
## 6.2 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

### 6.2.1 Teste com diferentes concentrações de água

O teste da capacidade de esterificação da enzima *Candida antarctica* (novozym 435) na presença de água foi realizado com as quantidades de 0%, 1%, 2% e 4% de

água, com os álcoois metílico e etílico, o resultado é mostrado na **Figura 15**, a amostras padrão de ácido oleico (AO) e triglicerídeos (TG), também estão presentes nesta placa.

**Figura 15** - CCD realizada com amostras de esterificação via enzimática na presença de água nas quantidades de 0, 1, 2 e 4% de água, com os álcoois metílico e etílico, respectivamente.

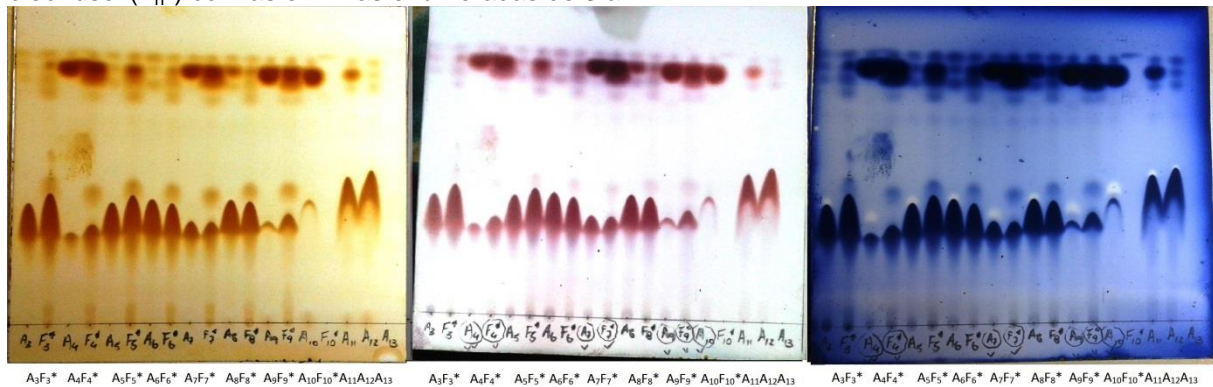


A **Figura 15** evidencia que a esterificação na presença de água para o álcool metílico foi favorável. Isto porque, além do aspecto termodinâmico envolvido na reação, há um fator importante que é de uma quantidade de água mínima para a enzima. Esta água forma uma camada ao redor da molécula de proteína (camada de solvatação), sendo fundamental para a manutenção de sua estrutura terciária e para a atividade catalítica (BARON, 2008).

### 6.2.2 Teste com diferentes biocatalizadores

Os resultados destas esterificações estão representados pelas **Figuras 14 e 16**, elas foram realizadas com álcool isomamílico ( $A_n$ ) e óleo fúsel ( $F_n$ ), sendo o n o número correspondente da enzima acima.

**Figura 16** - CCD realizada com amostras de esterificação via enzimática com álcool isoamílico ( $A_n$ ) e óleo fúsel ( $F_n^*$ ) com as enzimas enumeradas de 3 a 12.



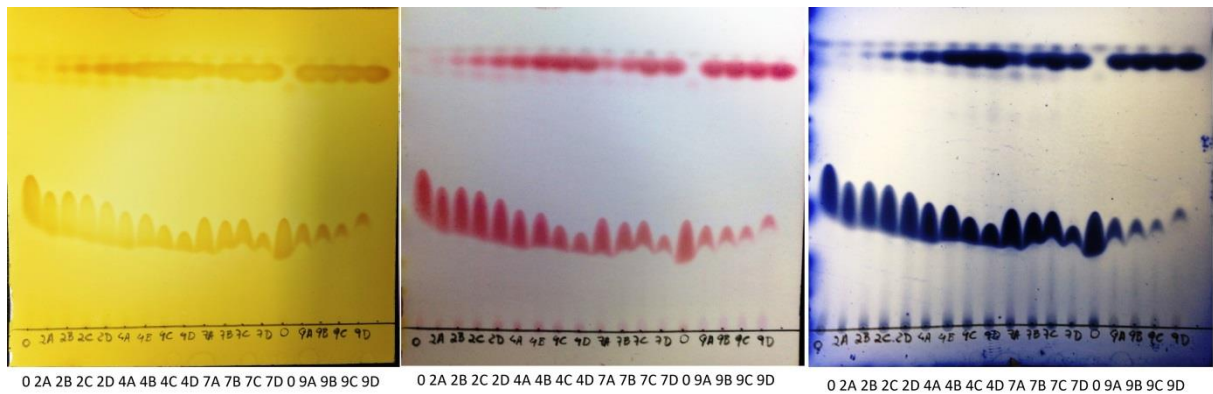
Ao se comparar as duas placas cromatográficas mostradas pelas **Figuras 14 e 16**, nota-se que quatro enzimas se destacam: 2 - *Mucor* sp; 4 - lipoproteína de *Pseudomonas* sp; 7 - novozym TL/IM; 9 - novozym 435 (2015). Pois elas consumiram reagentes e tiveram uma quantidade de produtos formados tanto para o álcool isoamílico, quanto para o óleo fúsel.

### 6.2.3 Efeito da concentração do biocatalizador

Ao se ter o conhecimento das quatro enzimas do tópico 6.2.2, foram realizados testes se variando a quantidade das mesmas, para comparação da relação da quantidade enzimática pelo rendimento para reação de esterificação. A **Figura 17** mostra a CCD com os resultados, sendo as quantidades em A, B, C e D de 2,5mg, 5,0mg, 10,0mg e 20,0mg das enzimas enumeradas em 2, 4, 7 e 9 (descritas no tópico 6.2.2).



**Figura 17** - CCD realizada com amostras de esterificação via enzimática das enzimas 2 - *Mucor* sp; 4 - lipoproteína de *Pseudomonas* sp; 7 - novozym TL/IM; 9 - novozym 435, nas quantidades em A, B, C e D de 2,5mg, 5,0mg, 10,0mg e 20,0mg, respectivamente

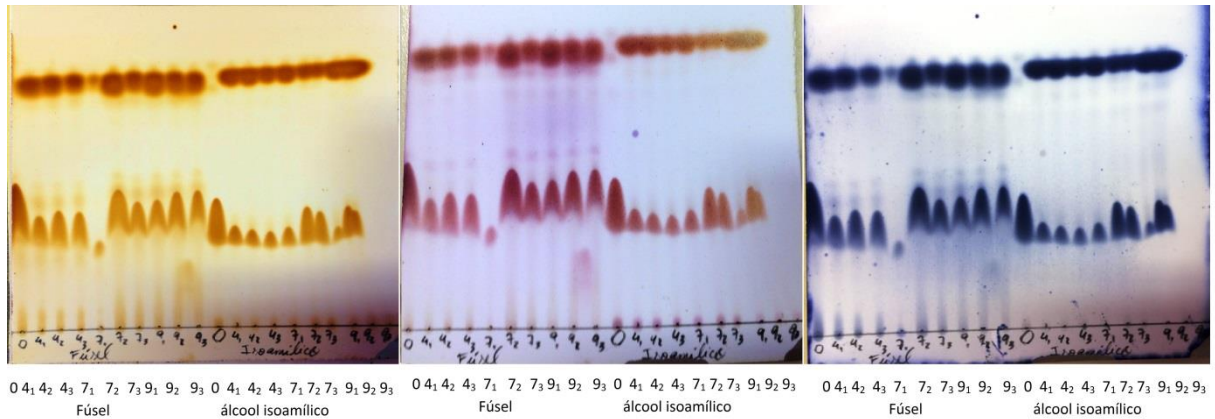


A **Figura 17** evidencia que, das quatro enzimas, três obtiveram um bom resultado e, dentre elas, a que obteve melhor resultado com a maior quantidade de enzima foi a lipoproteína de *Pseudomonas* sp, seguida pela novozym 435.

#### 6.2.4 Teste dos ciclos enzimáticos

Por fim foram feitos os testes de ciclos para três enzimas enumeradas em 4, 7 e 9. Este estudo durou seis dias, onde a **Figura 18** retrata os três primeiros dias e a **Figura 19** os últimos três dias.

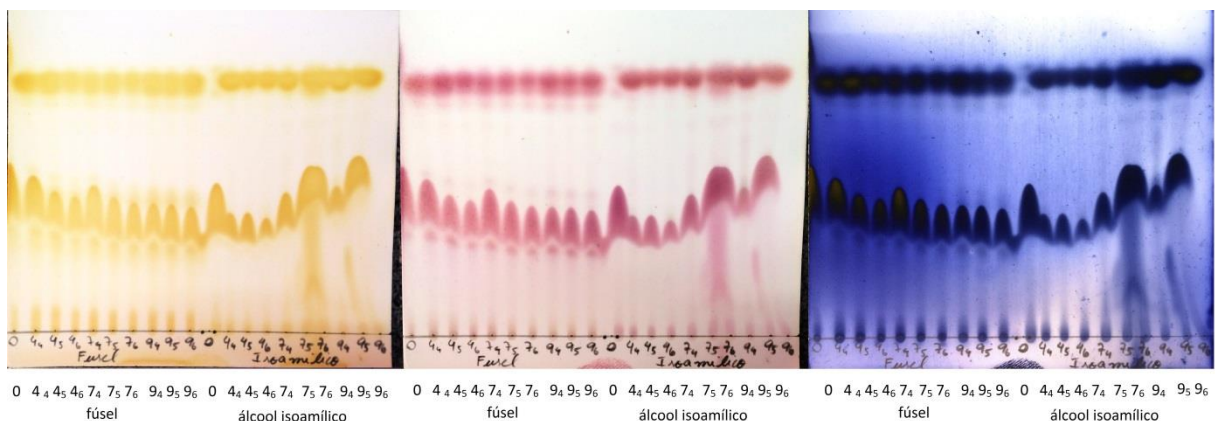
**Figura 18** - CCD dos três primeiros ciclos da esterificação via enzimática utilizando enzimas 4 - lipoproteína de *Pseudomonas* sp; 7 - novozym TL/IM; 9 - novozym 435, tendo como substrato o álcool isoamílico e o óleo fúsel.



A esterificação tendo como substrato o álcool isoamílico foi melhor do que utilizando o óleo fúsel, o que já era de se esperar porque o óleo fúsel possui outros álcoois e substâncias que competem entre si interferindo na reação esterificação.

A **Figura 18** também mostra que, no caso do substrato que utiliza o álcool isoamílico, o rendimento da novozym TL/IM e da novozym 435 decaí já no segundo ciclo, mas o rendimento da lipoproteína de *Pseudomonas* sp continua praticamente o mesmo nestes três primeiros ciclos enzimáticos.

**Figura 19** - CCD dos três últimos ciclos da esterificação via enzimática utilizando enzimas 4 - lipoproteína de *Pseudomonas* sp; 7 - novozym TL/IM; 9 - novozym 435, tendo como substrato o álcool isoamílico e o óleo fúsel.



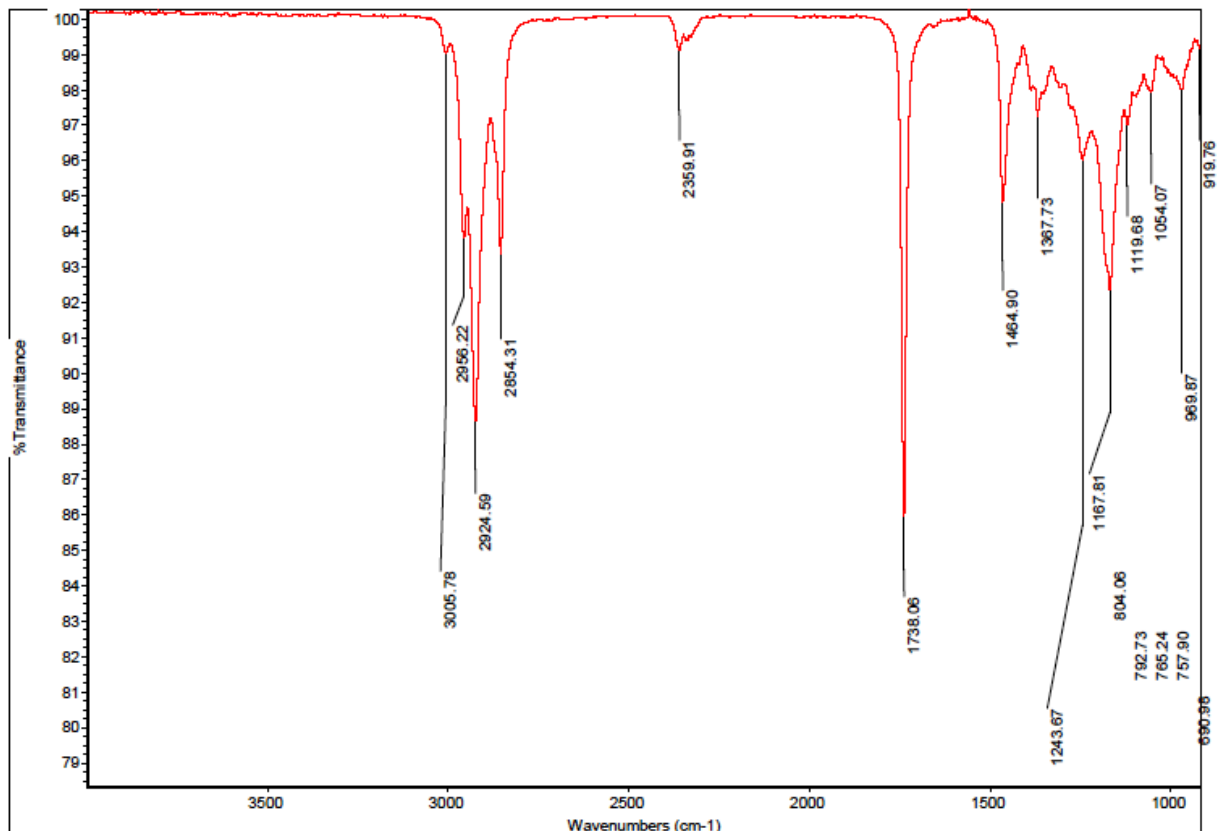
É possível ver que o rendimento da lipoproteína de *Pseudomonas* sp, utilizando como substrato o álcool isoamílico, teve uma redução, na **Figura 18** a mancha dos produtos é mais clara em comparação com a da **Figura 19**, podendo-se

ter tal conclusão. Apesar do deslocamento das linhas na placa é possível verificar que os rendimentos das outras duas enzimas são menores do que o da lipoproteína.

### 6.3 PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DO OLEATO DE ISOAMILA UTILIZANDO O ATR-FTIR

Por fim foi realizado o ATR-FTIR do oleato de isoamila (**Figura 20**) para a comprovação de sua síntese. Onde foi possível isolar este pela raspagem da cromatoplaça, seguindo o procedimento descrito, obtendo aproximadamente 103mg do oleato.

**Figura 20** - Espectro ATR-FTIR do oleato de isoamila isolado.



A banda devido ao grupo OH presente no álcool isoamílico não foi detectada no espectro ATR-FTIR do oleato de isoamila (**Figura 20**), o que confirma a elevada

pureza do produto. Além disso, a banda intensa em  $1738,06\text{ cm}^{-1}$  corresponde à carbonila do éster, está bem próxima da banda de referência que se encontra em  $1737\text{ cm}^{-1}$ . As bandas em  $1243,67\text{ cm}^{-1}$  e  $1167,81\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes à vibração de estiramento do grupo  $\text{-C(=O)-O}$ , também estão presentes aproximadamente nos mesmos comprimentos do espectro de referência, confirmando assim a síntese de oleato de isoamila (LAGE et al., 2016).

Foi feito o cruzamento das bandas presentes nos espectros de referência com aquelas presentes no espectro obtido da amostra, as bandas estão presentes no **Quadro 5**.

**Quadro 5.** Bandas presentes nos espectros de referência em correlação com as bandas encontradas no espectro da amostra isolada de oleato de isoamila.

Bandas ( $\text{cm}^{-1}$ )				
Ácido oleico (literat.)	Álcool isoamílico (literat.)	Oleato de isoamila (literatura)	Oleato de isoamila (isolado)	Interpretação
	(3320) +++++			Absorção de estiramento de O-H
<u>3005</u> ++		<u>3005</u> +	<u>3006</u> +	
(2971) +++++				Estiramento de C-H sobreposto com a ligação O-H
	<u>2956</u> +++++		<u>2956</u> ++	Vibração de estiramento simétrico e assimétrico de metil C-H e de grupos metilenos
	<b>2828</b> +++++	<b>2923</b> +++++	<b>2925</b> +++++	
	(2871) +++++			Vibração de estiramento assimétrico de metil C-H
<b>2852</b> +++++		<b>2853</b> +++++	<b>2854</b> +++	
			(2360) +	
		<u>1737</u> +++++	<u>1738</u> +++++	C=O do éster
(1707) +++++				Vibração de estiramento de C=O da metade carboxílica
	<b>1465</b> ++	<b>1464</b> +++	<b>1465</b> ++	
(1457) ++				
(1412) ++				

**Quadro 5.** Bandas presentes nos espectros de referência em correlação com as bandas encontradas no espectro da amostra isolada de oleato de isoamila.

Ácido oleico (literat.)	Álcool isoamílico (literat.)	Oleato de isoamila (literatura)	Oleato de isoamila (isolado)	Interpretação
	<b>1367 ++</b>	<b>1368 +</b>	<b>1368 +</b>	
(1284) +				
		<b><u>1244</u> +</b>	<b><u>1244</u> +</b>	Estiramento vibracional do grupo -C(=O)O
		<b><u>1167</u> +++</b>	<b><u>1168</u> ++</b>	
	(1125) ++			
			(1120) +	
	(1056) ++			Estiramento vibracional da ligação simples C-O de álcool primário
	<b><u>1010</u> ++</b>		<b><u>1010</u> +</b>	
	<b><u>966</u> +</b>		<b><u>966</u> +</b>	
(935) +				

NOTA - (parêntesis): bandas típicas de apenas um dos compostos; sublinhado : bandas comuns a mais do que um analito; **negrito**: bandas isólogas entre os oleatos de isoamila e um dos dois reagentes (álcool e/ou ácido); **negrito sublinhado** : bandas isólogas exclusivas dos oleatos de isoamila

Na **Quadro 5**, as bandas em parêntesis são aquelas características de apenas um dos compostos. As bandas sublinhadas são bandas comuns a mais de um composto. Em negrito estão as bandas isólogas entre os oleatos de isoamila presentes na literatura e neste trabalho e ainda um dos dois reagentes podendo ser o álcool e/ou o ácido. Por fim as bandas isólogas exclusivas dos oleatos de isoamila estão representadas em negrito sublinhado, e são estas que determinam que a esterificação ocorreu gerando o oleato de isoamila.

## 7. CONCLUSÃO

A presença do dessecante molecular sieves não teve grande influência na eficiência da reação de esterificação tendo até uma má influência no caso do metanol, mas teve efeito benéfico no caso do álcool isoamílico, porque durante a reação a geração e o excesso de água pode deslocar o equilíbrio a favor da hidrólise do produto, por isto a necessidade do controle do conteúdo de água na síntese em meio orgânico.

A esterificação na presença de água para o álcool metílico foi favorável, porque além do aspecto termodinâmico envolvido na reação, há um fator importante que é de uma quantidade de água mínima para a enzima. Esta água forma uma camada ao redor da molécula de proteína (camada de solvatação), sendo fundamental para a manutenção de sua estrutura terciária e para a atividade catalítica.

A resina de troca catiônica não foi capaz de realizar uma boa esterificação. No caso da esterificação química com ácido sulfúrico, tanto no caso do álcool metílico como no do óleo fúsel, o aumento da quantidade do ácido favoreceu a esterificação, mas na quantidade de 6 $\mu$ L para o álcool metílico a reação foi desfavorecida pelo excesso do reagente.

Das doze enzimas testadas na esterificação, quatro mostraram melhores resultados: *Mucor* sp; lipoproteína de *Pseudomonas* sp; novozym TL/IM; novozym 435 (2015). Pois elas consumiram mais reagentes e tiveram uma quantidade maior de produtos tanto para o álcool isoamílico quanto para o óleo fúsel. Destas quatro enzimas, houve destaque da lipoproteína de *Pseudomonas* sp, seguida pela novozym 435. Através da esterificação enzimática foi obtido o oleato de isoamila.

O ATR-FTIR confirmou a síntese de oleato de isoamila isolada, onde foram mostradas as bandas em 1738,06  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde a carbonila do éster, e as bandas em 1243,67 $\text{cm}^{-1}$  e 1167,81 $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes à vibração de estiramento do grupo -C(=O)-O.

Há a possibilidade da continuação do estudo onde seriam necessários alguns testes físico-químicos no produto obtido da esterificação do óleo fúsel, o que poderia ser explorado em outra pesquisa.

Diante do que foi mostrado até agora, também se pode ressaltar que este estudo será de grande importância para trabalhos futuros, pois foi criada uma base de dados para diversos tipos de enzimas que podem ser utilizadas para a esterificação com álcoois. Sabe-se que no óleo de soja existe em sua composição o ácido oleico, entre outros ácidos, então se vê, também, a possibilidade de uma pesquisa onde haverá a síntese de um óleo lubrificante sintético de origem totalmente vegetal e que, deste modo, consegue algo de grande necessidade atual, produtos renováveis.

## 9. REFERÊNCIAS

AOUF, C.; DURAND, E.; LECOMTE, J.; ESPINOZA, M. C. F.; DUBREUCQ, E.; FULCRANDA, H.; VILLENEUVE, P. **The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds**. Green chemistry, vol:16 iss:4 pg:1740 -1754, 2014.

BARON, Alessandra M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. Tese (doutorado). 154f, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Parana, Curitiba, 2008.

BASF. **Isobutanol**. Disponível em <http://www.solvents.basf.com/portal/load/fid245440/ISOBUTANOL>. Acesso em 12/2016.

BATISTA, F. R. M. **Estudo do processo de destilação alcoólica contínua: simulação de plantas industriais de produção de álcool hidratado, álcool neutro e cachaça**. 180 f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

BIOFUEL. **Bioalcohols**. Disponível em <http://biofuel.org.uk/bioalcohols.html>, acesso 10/2016.

BNDES. **Potencial de diversificação da indústria brasileira**. Chamada pública de seleção BNDES/FEP PROPEÇÃO nº03/2011. Rio de Janeiro, distribuição em fevereiro de 2014.

BRUICE, Paula Y. **Química Orgânica**. Ed Pearson, 4ª Ed, volume 2, 2006. ISBN 85-7605-068-1.

CAREY, Francis A. **Química Orgânica**. Ed Bookman, 7ª Ed, 2011. ISBN 978-85-63308-89-4.

CASTRO, H. F. **Indústria Alcooleira**. Escola de engenharia de Loreira, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.



CHEMOXY. **Isoamyl Alcohol**. Disponível em <<http://www.chemoxy.com/products-and-applications/products/isoamyl-alcohol/>>, acesso 10/2016.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar**. Quarto levantamento, v. 2 - Safra 2015/16, nº 4, Brasília, p. 1-76, abril 2016.

DORMO; N. BAKÓ; B. K. BARTHAB; L. EHRENSTEINC; U. GUBICZA; L. **Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system**. Biochemical engineering journal [1369-703X], vol:21 fasc:3 pág:229 -234, 2004.

FERREIRA, Marcela C. **Estudo do processo de destilação de óleo fúsel**. 228p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

FONTAN; R. C. I. VERÍSSIMO; L. A. A. SILVA; W. S. BONOMO; R. C. F. VELOSO; C. M. **Cinética da fermentação alcoólica na elaboração de vinho de melancia**. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos [0102-0323], vol:29 iss:2 pg:203 -210 yr:2011

GARCIA, V. **Subproduto de destilaria de óleo fusel**. 112 p. Dissertação de Mestrado em Engenharia de processos químicos e bioquímicos – Escola de engenharia Mauá, Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2008.

LAGE, F. A. P.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C.C.; TODERO, L. M.; LUIZ, J. H. H.; MENDES, A. A. **Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system**. Enzyme and microbial technology [0141-0229], vol:84, pág:56 -67, 2016.

LIDE, David R. **Handbook of Chemistry and Physics**. 87<sup>a</sup> ed. Boca Raton, Editora CRC, 1998.

LUDWIG; M. NETO; P. O. ANGELIS; D. F. **Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. **Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.21 no.1 Campinas Jan./Abr. 2001**

MADARASZ, J.; NEMETH, D.; BAKOS, J.; GUBICZA, L.; BAKONYI, P. **Solvent-free enzymatic process for biolubricant production in continuous microfluidic reactor.** Journal of cleaner production [0959-6526], vol:93, pg:140 -144, 2015.

MAIA; G. A. R. **Otimizacao da fermentacao alcoolica de extrato aquoso da polpa de jeriva.** Acta Scientiarum / Technology, vol:36 iss:4 pg:699 yr:2014

MATOS, Paulo R. R. **Utilização de óleos vegetais como bases lubrificantes.** 125 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MCMURRY, J. **Química Orgânica**, 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1997.

MEIRELLES, A. J. A.; FERREIRA, M. C.; BATISTA, E. A. C. **Study of the Fusel Oil Distillation Process.** Industrial & engineering chemistry research, vol:52 iss:6 pg:2336 -2351, 2013.

MOURA C. R. S., CARRETEIRO R. **Lubrificantes e lubrificação.** Rio de Janeiro, Ed. Livros técnicos e Científicos, 1975.

ÖZGÜLSÜN, A.; KARAOSMANOĞLU, F.; TÜTER, M. **Esterification reaction of oleic acid with a fusel oil fraction for production of lubricating oil.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 77, nº 1, p. 105-109, 2000.

PATIL, A.G.; KOOLWAL, S.W.; BUTALA, H.D. **Fusel Oil: Composition, removal and potential utilization.** International Sugar Journal. Inglaterra. Vol.104, N°.1238, p. 51 – 58. 2002.

PANCHAL, M. T; PATEL, A.; CHAUHAN, D.D.; THOMAS, M.; PATEL, J. V. **A methodological review on bio-lubricants from vegetable oil based Resources.** Renewable & sustainable energy reviews [1364-0321] Panchal, 2016.

PÉREZ E. R.; CARDOSO D. R; FRANCO D. W. **Análise dos álcoois, ésteres e compostos carbonílicos em amostras de óleo fúsel.** Química Nova, vol. 24, nº 1, p.10-12, 2001.

PUBCHEM. **Isobutyl oleate.** Disponível em <  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6436361#section=Top>>, acesso  
11/2016.

REMY, A.; GAY M.; GONTHIER, R. **Materiais.** São Paulo, Hemus. [19--] 391p.

ROSSET, I. G. **Produção de biodiesel empregando biocatálise via reações de esterificação e transesterificação.** 152p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Carlos, 2011.

SILVA, J. A. C.; SOARES, V. F.; LAFUENTE, R. F.; HABERT, A. C.; FREIRE, D. M. G. **Enzymatic production and characterization of potential biolubricants from castor bean biodiesel.** Journal of molecular catalysis, vol:122, pag:323 -329, 2015.

SENAI. Lubrificação – Mecânica. Apostila Senai/CST (Companhia Siderúrgica de Tubarão) , Vitória, Espírito Santo, 1997).

SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental.** Editora Bookman, 6ª ed. Porto Alegre, 2009.

SOUSA, S. F.; PATROCINIO A. O. T. **A química de coordenação e a produção de combustíveis solares.** Química Nova, vol. 37, nº5, 886-895, 2014.

VECCHIA, D. R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros.** Química Nova, vol.27, nº 4, São Paulo, 2004.

VILLALOBOS, Maribel C. **Síntese enzimática de ésteres de  $\alpha$ -D-glucose utilizando sólido fermentado contendo lipases de *Burkholderia contaminans* LTEB11.** 92f. Dissertação de mestrado, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

VOGUEL, A. I.; **Análise química quantitativa.** Ed LTC, 6ª Ed, Rio de Janeiro, 2011. ISBN 978-85-216-1311-4.

ZAGO, E. C.. **Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná, 2010.