

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
PRH-30 ANP/MCT



Programa de Pós-Graduação
em Química



Síntese enzimática de biosurfactante e sua aplicabilidade
na indústria do petróleo

Suzan Ialy Gomes de Medeiros

Dissertação de Mestrado
Natal/RN, março de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Dissertação de Mestrado

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BIOSURFACTANTE E SUA APLICABILIDADE NA
INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

Suzan Ialy Gomes de Medeiros

Orientadora: Profa. Dra. Marta Costa

**Natal/ RN
Março/ 2007**

Suzan Ialy Gomes de Medeiros

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BIOSURFACTANTE E SUA APLICABILIDADE NA
INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Costa.

**Natal/ RN
Março/ 2007**

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / SISBI / Biblioteca Setorial
Especializada do Centro de Ciências Exatas e da Terra – CCET.

Medeiros, Suzan Ialy Gomes de.

Síntese enzimática de biosurfactante e sua aplicabilidade na indústria do petróleo / Suzan Ialy Gomes de Medeiros. – Natal, 2007.

136 f.: il.

Orientadora: Marta Costa, Dra.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química.

1. Síntese enzimática – Indústria do petróleo. 2. Biosurfactantes - Dissertação. 3. Biocatálise - Dissertação. 4. Óleo de mamona - Dissertação. 5. Glicose - Dissertação. 6. Sacarose - Dissertação. I. Costa, Marta.

RN/UF/BSE-CCET

CDU: 663.18

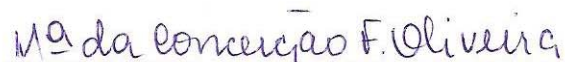
SUZAN IALY GOMES DE MEDEIROS

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BIOSURFACTANTE E SUA APLICABILIDADE NA
INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

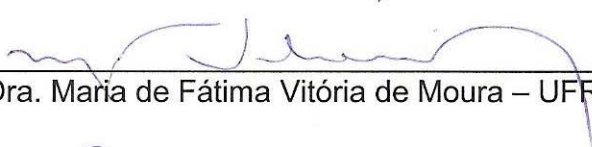
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 02/03/2007


Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira – UFC



Profa. Dra. Maria de Fátima Vitória de Moura – UFRN



Profa. Dra. Marta Costa – UFRN (orientadora)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível. Aos meus pais, Wernat e Verônica, e aos meus irmãos, Igor, Stephanie e Wernat Jr., pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela onipresença no meu coração em todas as horas.

A minha família: mãe, pai, irmã e irmãos que estão sempre como esteio e sentido na minha vida.

Agradeço aos amigos do LAPET e LABPOL, Ana Catarina, Alexsandra, Bruna, Emanuella, Ítalo, Jaciara, Jeane, Jefferson, Keila, Luanna, Luciana, Mariane, Nívia, Oldemar, Rodrigo, Rosângela Vidal, Ruza e Thiago, que contribuíram com ajuda técnica e emocional para a realização deste trabalho, me ensinando que as diferenças são importantes e contribuem para o amadurecimento do pensamento coletivo.

Há pessoas com as quais tudo começa. Agradeço a oportunidade dada pela professora Marta Costa que acreditou na viabilidade do trabalho e me acolheu não só como orientanda, mas com tal zelo e dedicação que me fez crescer espiritualmente e entender que tudo tem seu momento certo. Agradeço a Professora Rosângela Balaban e ao professor Helder Girão pelo incentivo, reconhecimento e apoio ao meu esforço empreendido. À Telma Pitanga pela generosidade, competência profissional e sensibilidade humana inigualável.

Existem outras pessoas que estão sempre antes do começo formal. Agradeço ao Maurício Borges pela base deste trabalho e pelas demonstrações de amizade, simplicidade e grande companhia de trabalho. Ao Fábio Fagundes, meu amigo irmão, pela paciência e ajuda em momentos difíceis e de inseguranças.

Agradeço, em especial, ao Gláucio de Moraes, pára-raios das minhas emoções, porto seguro de um sentimento grandioso, lindo e único.

Ao PRH-ANP, pela bolsa concedida.

MEDEIROS, Suzan Ialy Gomes – “Síntese enzimática de biosurfactante e sua aplicabilidade na indústria do petróleo”.

Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Química.

Área de concentração: Físico-Química, Natal – RN / Brasil.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Costa

Resumo

Enzimas têm sido largamente utilizadas em biossíntese/transformações de compostos orgânicos em substituição aos métodos sintéticos clássicos. Esta dissertação de mestrado é o primeiro relato escrito em literatura de síntese enzimática para obtenção de biosurfactantes utilizando como substratos glicose, ácido ricinoléico e óleo de mamona, e como biocatalizador, foram empregadas lipases imobilizadas (*Thermomyces lanuginosa*, *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica B*), proteases (*Bacillus subtilis* alcalina e *Bacillus subtilis* neutra) e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). A análise por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) mostrou que maiores conversões foram alcançadas pelo uso da *Bacillus subtilis* alcalina. Testes de laboratório, para avaliar sua aplicabilidade, indicaram que os biosurfactantes produzidos apresentam boa estabilidade em presença de NaCl e temperaturas de 55 e 25°C, são efetivos na redução da tensão superficial e ângulo de contato, mas possuem pouca capacidade espumante, quando comparados aos detergentes tradicionais. Estes resultados sugerem que os surfactantes obtidos têm potencial aplicação como agente de molhabilidade e estabilizador de fluidos de perfuração.

PALAVRAS-CHAVE: biocatálise, biosurfactante, enzimas, glicose, óleo de mamona, sacarose.

MEDEIROS, Suzan Ialy Gomes – “Enzymatic synthesis of the biosurfactant and application in the petroleum industry”.

Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Química.

Área de concentração: Físico-Química, Natal – RN / Brasil.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Costa

ABSTRACT

Enzymes have been widely used in biosynthesis / transformation of organic compounds in substitution the classic synthetic methods. This work is the first writing in literature of enzymatic synthesis for attainment the biosurfactants, the use glucose sucrose, ricinoleic acid e castor oil as substratum, and as biocatalyst, used immobilized lipase *Thermomyces lanuginose*, *Rhizomucor miehei* and the *Candida antarctica* lipase *B*; alkaline protease and neutral protease from *Bacillus subtilis* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The analysis of HPLC (high performance liquid chromatography) showed that highest conversions were reached of used the alkaline protease from *Bacillus subtilis*. Laboratory tests, to evaluate the applicability, indicated that the produced biosurfactantes had good stability in presence of salts (NaCl) and temperature (55 e 25°C), they are effective in the reduction of the superficial tension and contac angle, but they have little foaming capacity, when compared with traditional detergents. These results suggest that the prepared surfactants have potential application as wetting agent and perforation fluid stabilizer.

Key words: biocatalysis, biosurfactant, castor oil, enzymes, glucose, sucrose.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Definição do ângulo de contato θ entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal	33
FIGURA 2	Influência do pH sobre a velocidade de reação enzimática	45
FIGURA 3	Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática	49
FIGURA 4	Variação da quantidade do produto formado com o tempo a diferentes temperaturas	49
FIGURA 5	Velocidades de reação enzimática com diferentes concentrações de enzima	50
FIGURA 6	Velocidades de reação enzimática em função das concentrações de enzima	50
FIGURA 7	Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação enzimática relacionado com a curva de Michaelis-Menten	51
FIGURA 8	Intermediários incluídos no complexo ES	53
FIGURA 9	Sistema reacional de hidrólise do óleo de mamona	58
FIGURA 10	Procedimento de neutralização da hidrólise do óleo de mamona	59
FIGURA 11	Reação de hidrólise do óleo de mamona	59
FIGURA 12	Reação de acidificação do ricinoleato de sódio para a formação do ácido ricinoléico	59
FIGURA 13	Reação de esterificação do ácido ricinoléico	61
FIGURA 14	Reação de transesterificação do óleo de mamona	61
FIGURA 15	Modelo de um diagrama de fases	69
FIGURA 16	Espectros de RMN ^{13}C do ácido ricinoléico	74
FIGURA 17	Espectros de Infravermelho do ricinoleato de D-glicose catalisado por diferentes biocatalisadores	75
FIGURA 18	Espectro de Infravermelho do éster de mamona catalisado por diferentes biocatalisadores	77
FIGURA 19	Cromatogramas da D-glicose em diferentes concentrações	78
FIGURA 20	Curva padrão da D-glicose	79

FIGURA 21	Eficiência catalítica da lipase <i>Thermomyces lanuginosa</i> imobilizada	80
FIGURA 22	Eficiência catalítica da lipase <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada	81
FIGURA 23	Eficiência catalítica da lipase <i>Candida antarctica B</i>	82
FIGURA 24	Eficiência catalítica da protease de <i>Bacillus subtilis</i> alcalina	83
FIGURA 25	Eficiência catalítica da protease de <i>Bacillus subtilis</i> neutra	84
FIGURA 26	Eficiência catalítica da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85
FIGURA 27	Determinação da CMC do biosurfactante catalisado pela lipase <i>Thermomyces lanuginosa</i> imobilizada	86
FIGURA 28	Determinação da CMC do biosurfactante catalisado pela lipase <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada	87
FIGURA 29	Determinação da CMC do biosurfactante catalisado pela lipase de <i>Candida antarctica B</i>	88
FIGURA 30	Determinação da CMC do biosurfactante catalisado pela protease de <i>Bacillus subtilis</i> alcalina	89
FIGURA 31	Determinação da CMC do biosurfactante catalisado pela protease de <i>Bacillus subtilis</i> neutra	90
FIGURA 32	Determinação da CMC do biosurfactante catalisado pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
FIGURA 33	Superfícies de resposta tendo como variáveis o tempo de reação, taxa de conversão e atuação das diferentes enzimas como catalisador.	92
FIGURA 34	Histograma dos efeitos para o planejamento fatorial 2^{4-1} , utilizando como substrato o ácido ricinoléico (a) e o óleo de mamona (b)	95
FIGURA 35	Histograma representativo dos efeitos das variáveis e suas interações para o planejamento fatorial 2^{4-1} , utilizando como substrato ácido ricinoléico.	96
FIGURA 36	Representação geométrica do planejamento 2^{4-1} , utilizando como substrato ácido ricinoléico.	97
FIGURA 37	Representação geométrica do planejamento 2^{4-1} , utilizando como substrato óleo de mamona.	98

FIGURA 38	Resumo dos parâmetros para a validade do modelo na otimização de variáveis para a síntese do ricinoleato de D-glicose	99
FIGURA 39	Resumo dos parâmetros para a validade do modelo na otimização de variáveis para a síntese do éster de mamona	99
FIGURA 40	Comparação entre os resultados experimentais e os resultados numéricos do planejamento adotado utilizando como substrato ácido ricinoléico	100
FIGURA 41	Comparação entre os resultados experimental e os resultados numéricos do planejamento adotado utilizando como substrato óleo de mamona	101
FIGURA 42	Conversão de D-glicose em ricinoleato de D-glicose, em função do aumento da razão molar e da temperatura de reação	102
FIGURA 43	Conversão de D-glicose em ricinoleato de D-glicose, em função do aumento da concentração de enzima e da temperatura de reação	102
FIGURA 44	Conversão de D-glicose em ricinoleato de D-glicose, em função do aumento do tempo e da temperatura de reação	103
FIGURA 45	Conversão de D-glicose em ricinoleato de D-glicose, em função do aumento da razão molar e da concentração de enzima	103
FIGURA 46	Conversão de D-glicose em éster de mamona em função do aumento da razão molar e o tempo de reação	104
FIGURA 47	Conversão de D-glicose em éster de mamona em função do aumento da razão molar e temperatura de reação	104
FIGURA 48	Conversão de D-glicose em éster de mamona, em função do aumento do tempo e da temperatura de reação	105
FIGURA 49	Conversão de D-glicose em éster de mamona em função do aumento da concentração de enzima e temperatura de reação	105
FIGURA 50	Conversão de D-glicose em éster de mamona em função do aumento da concentração de enzima e tempo de reação	106
FIGURA 51	Determinação da CMC do ricinoleato de D-glicose em diferentes concentrações de NaCl	107
FIGURA 52	Determinação da estabilidade do ricinoleato de D-glicose em diferentes concentrações de NaCl	108

FIGURA 53	Determinação da CMC do éster de mamona em diferentes concentrações de NaCl	109
FIGURA 54	Determinação da estabilidade do éster de mamona em diferentes concentrações de NaCl	110
FIGURA 55	Determinação da CMC do ricinoleato de D-glicose a 25 e 55 °C	112
FIGURA 56	Determinação da CMC do éster de mamona a 25 e 55 °C	112
FIGURA 57	Percentual de separação de fases para o surfactante comercial e os biosurfactantes derivados do ácido ricinoléico e do óleo de mamona, utilizados como desemulsificante, a 0,10% (v/v)	116
FIGURA 58	Percentual de separação de fases para o surfactante comercial e os biosurfactantes derivados do ácido ricinoléico e do óleo de mamona, utilizados como desemulsificante, a 0,20% (v/v)	117
FIGURA 59	Percentual de separação de fases para o surfactante comercial e os biosurfactantes derivados do ácido ricinoléico e do óleo de mamona, utilizados como desemulsificante, a 0,30% (v/v)	118
FIGURA 60	Percentual de separação de fases para o surfactante comercial e os biosurfactantes derivados do ácido ricinoléico e do óleo de mamona, utilizados como desemulsificante, a 0,40% (v/v)	119
FIGURA 61	Diagrama pseudoternário utilizando razão C/T = 4	121
FIGURA 62	Diagrama pseudoternário utilizando razão C/T = 2	121
FIGURA 63	Diagrama ternário utilizando água destilada como fase aquosa	122
FIGURA 64	Diagrama ternário utilizando água salina como fase aquosa	122

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética	25
TABELA 2	Principais classes de biosurfactantes e microrganismos envolvidos	26
TABELA 3	Correlação entre valor do HLB e função do biosurfactante	29
TABELA 4	Principais aplicações comerciais dos biosurfactantes	29
TABELA 5	Tensoativos utilizados em dispersão de pigmentos	37
TABELA 6	Principais classes, subclasses e sub-subclasses das enzimas	40
TABELA 7	Critérios para a seleção do solvente orgânico	47
TABELA 8	Composição e especificações para o óleo de mamona refinado Tipo I	56
TABELA 9	Especificações para o petróleo	56
TABELA 10	Especificações para o biodiesel	35
TABELA 11	Intervalo de estudo das variáveis para o planejamento estatístico adotado	71
TABELA 12	Planejamento fatorial adotado utilizando o ácido ricinoléico como substrato	72
TABELA 13	Planejamento fatorial adotado utilizando o óleo de mamona como substrato	72
TABELA 14	Deslocamento químico dos carbonos presentes no ácido ricinoléico	74
TABELA 15	Identificação espectrométrica dos grupos funcionais no infravermelho dos espectros do ricinoleato de D-glicose	76
TABELA 16	Identificação espectrométrica dos grupos funcionais no infravermelho dos espectros do éster de mamona	76
TABELA 17	Dados teóricos e experimentais da D-glicose adquiridos pela análise de cromatografia líquida de alta eficiência	78
TABELA 18	Rendimento reacional catalisado pela lipase <i>Thermomyces lanuginosa</i> imobilizada	79

TABELA 19	Rendimento reacional catalisado pela lipase <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada	80
TABELA 20	Rendimento reacional catalisado pela lipase <i>Candida antarctica B</i>	81
TABELA 21	Rendimento reacional catalisado pela protease de <i>Bacillus subtilis</i> alcalina	82
TABELA 22	Rendimento reacional catalisado pela protease de <i>Bacillus subtilis</i> neutra	83
TABELA 23	Rendimento reacional catalisado pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84
TABELA 24	Tensão superficial das soluções aquosas dos biosurfactantes catalisados pela lipase <i>Thermomyces lanuginosa</i> imobilizada	86
TABELA 25	Tensão superficial das soluções aquosas dos biosurfactantes catalisados pela lipase <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada	87
TABELA 26	Tensão superficial das soluções aquosas dos biosurfactantes catalisados pela lipase de <i>Candida antarctica B</i>	88
TABELA 27	Tensão superficial das soluções aquosas dos biosurfactantes catalisados pela protease de <i>Bacillus subtilis</i> alcalina	89
TABELA 28	Tensão superficial das soluções aquosas dos biosurfactantes catalisados pela protease de <i>Bacillus subtilis</i> neutra	90
TABELA 29	Tensão superficial das soluções aquosas dos biosurfactantes catalisados pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
TABELA 30	Planejamento fatorial adotado utilizando o ácido ricinoléico como substrato	94
TABELA 31	Planejamento fatorial adotado utilizando o óleo de mamona como substrato	94
TABELA 32	Tensão superficial do ricinoleato de D-glicose em diferentes concentrações de NaCl.	107
TABELA 33	Influencia do ricinoleato de D-glicose na tensão superficial da solução salina.	108
TABELA 34	Tensão superficial do éster de mamona em diferentes concentrações de NaCl	109
TABELA 35	Influencia do éster de mamona na tensão superficial da solução salina	110

TABELA 36	Tensão superficial do ricinoleato de D-glicose a 25 e 55°C	111
TABELA 37	Tensão superficial do éster de mamona a 25 e 55°C	111
TABELA 38	Ângulo de contato do ricinoleato de D-glicose e do éster de mamona a 25°C	113
TABELA 39	Determinação da eficiência do ricinoleato de D-glicose como agente espumante	114
TABELA 40	Determinação da eficiência do éster de mamona como agente espumante	114
TABELA 41	Determinação da eficiência do ricinoleato de D-glicose e do éster de mamona como biopesticida	115
TABELA 42	Determinação da eficiência do ricinoleato de D-glicose e éster de mamona a 0,1% em comparação ao surfactante comercial	116
TABELA 43	Determinação da eficiência do ricinoleato de D-glicose e éster de mamona a 0,2% em comparação ao surfactante comercial	117
TABELA 44	Determinação da eficiência do ricinoleato de D-glicose e éster de mamona a 0,3% em comparação ao surfactante comercial	118
TABELA 45	Determinação da eficiência do ricinoleato de D-glicose e éster de mamona a 0,4% em comparação ao surfactante comercial	119

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1	SURFACTANTES	24
2.2	BIOSURFACTANTES	25
2.2.1	Função fisiológica dos biosurfactantes	27
2.2.2	Propriedades dos biosurfactantes	27
2.2.3	Aplicações industriais	28
2.2.3.1	Utilização do biosurfactante na indústria do petróleo	30
2.2.3.1.1	Limpeza de reservatórios	30
2.2.3.1.2	Recuperação melhorada do petróleo (IOR)	30
2.2.3.1.3	Inversão de molhabilidade de superfície	31
2.2.3.2	Biosurfactantes em aplicações biocida	33
2.2.3.3	Biosurfactantes na agricultura	35
2.2.3.4	Biosurfactantes em produtos de higiene e cosméticos	35
2.2.3.5	Biosurfactantes como umectante e dispersante de pigmentos	36
2.3	ENZIMAS	37
2.3.1	Características das enzimas	38
2.3.2	Classificação e nomenclatura das enzimas	39
2.3.2.1	Lipases	41
2.3.2.2	Proteases	43
2.3.3	Cinética da catálise enzimática	44
2.3.3.1	Fatores que influenciam a ação enzimática	44
2.3.3.2	Influência do pH	45
2.3.3.3	Influência e seleção do solvente orgânico	46
2.3.3.4	Efeito da água na atividade e estabilidade do biocatalisador	47

2.3.3.5	Efeito da temperatura	48
2.3.3.6	Efeito da concentração do catalisador (enzima)	50
2.3.3.7	Efeito da concentração de substrato	51
3	MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1	REAGENTES	55
3.2	AMOSTRAS	55
3.3	EQUIPAMENTOS	56
3.4	HIDRÓLISE DO ÓLEO DE MAMONA: OBTENÇÃO DO ÁCIDO RICINOLÉICO	57
3.5	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO ÁCIDO RICINOLÉICO	60
3.5.1	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (¹³C RMN)	60
3.6	OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES	60
3.7	CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES	62
3.7.1	Cromatografia em camada fina ou plana (CCD)	62
3.7.2	Cromatografia em coluna (CC)	63
3.7.3	Espectroscopia na região de infravermelho médio	63
3.7.4	Quantificação da conversão através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	63
3.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)	64
3.8.1	Influencia da salinidade na concentração micelar crítica (CMC)	65
3.8.2	Influencia da temperatura sobre a concentração micelar crítica (CMC)	65
3.9	MOLHABILIDADE DO BIOSURFACTANTE (ÂNGULO DE CONTATO)	65

3.10	EFICIÊNCIA DOS BIOSURFACTANTES COMO AGENTE ESPUMANTE	66
3.11	EFICIÊNCIA DO BIOSURFACTANTE COMO BIOPESTICIDA	67
3.12	AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO BIOSURFACTANTE COMO PREVENTOR DE EMULSÃO	67
3.13	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE EMULSIFICANTE E INFLUÊNCIA DA SALINIDADE	68
3.13.1	Diagrama de fases	68
3.13.2	Determinação da região de microemulsão	70
3.14	MODELO ESTATÍSTICO	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1	ANÁLISE ESPECTRÓSCOPIA DE RMN ¹³ C DO ÁCIDO RICINOLÉICO	74
4.2	ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO (FTIR) RICINOLEATO DE D-GLICOSE E ÉSTER DE MAMONA	75
4.3	DETERMINAÇÃO DA CONVERSÃO REACIONAL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	78
4.4	DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL E DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)	85
4.5	SELETIVIDADE DO BIOCATALISADOR	91
4.6	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	93
4.6.1	Principais efeitos dos fatores na resposta	94
4.6.2	Valores de R², Q², Validade do Modelo e Reprodutibilidade	98
4.6.3	Resultados experimentais versus resultados numéricos	100
4.6.3.1	Resultados experimentais versus resultados numéricos utilizando como substrato ácido ricinoléico	100

4.6.3.2	Resultados experimentais versus resultados numéricos utilizando como substrato óleo de mamona	100
4.6.4	Superfície de resposta	101
4.7	INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)	106
4.8	INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC).	111
4.9	MOLHABILIDADE DO BIOSURFACTANTE (ÂNGULO DE CONTATO)	113
4.10	EFICIÊNCIA DO BIOSURFACTANTE COMO AGENTE ESPUMANTE	114
4.11	EFICIÊNCIA DOS BIOSURFACTANTES COMO BIOPESTICIDA	115
4.12	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS BIOSURFACTANTES COMO PREVENTOR DE EMULSÃO	115
4.13	DETERMINAÇÃO DA REGIÃO DE MICROEMULSÃO	120
4.13.1	Avaliação da capacidade emulsificante e influência da salinidade	120
4.13.1.1	Diagrama de fases	120
5	CONCLUSÕES	124
6	SUGESTÕES	127
7	REFERÊNCIAS	128

1 Introdução e Objetivos

“Tudo posso naquele que me fortalece” Filipenses 4:13

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Nos últimos anos, observa-se um crescente interesse no desenvolvimento de processos envolvendo modificação de óleos e gorduras (triglicerídeos). Isto pode ser atribuído, principalmente, ao fato desses materiais serem de origem natural, abundantes e empregados como matérias-primas nas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias (GUNSTONE, 1999).

Diversos processos têm sido desenvolvidos pelo setor industrial para manipular essas misturas de triglicerídeos, cuja estrutura básica pode ser redesenhada por modificação química (hidrogenação, hidrólise ou transesterificação) dos ácidos graxos. Estas reações necessitam normalmente de condições drásticas, tais como, pressão/temperatura altas e catalisadores químicos; condições que normalmente são evitadas quando se trata de aplicações em larga escala, como na indústria. Para atender esses requisitos, avanços importantes têm sido alcançados pela enzimologia moderna no desenvolvimento e aplicação de enzimas como catalisadores. A alta eficiência de atuação, em condições mais brandas possibilita, assim, o uso de processos enzimáticos nas indústrias, especialmente de detergentes, couros, panificação e farmacêutica com desempenho similar ao dos catalisadores clássicos, das reações heterogêneas (LIE KEN JIE *et al*, 1991; MOJOVIC *et al*, 1993; PANDEY *et al*, 1999).

A escolha do biocatalisador é geralmente efetuada entre microorganismos vivos ou enzimas que possuam propriedades significativas, tais como, alta eficiência catalítica (elevando a velocidade de reação de 10^6 a 10^{12} vezes), seletividade, atuem em condições brandas de temperatura (30 a 70 °C) e pressão atmosférica, tenham fácil recuperação e reabilitação, rendimentos altos e baixos níveis de contaminação do produto e meio-ambiente (POSORSKE, 1984; LANGRAND *et al*, 1988; WISEMAN, 1985).

Um grande número de pesquisadores vem estudando a síntese enzimática de produtos contendo açúcares ramificados. Park e colaboradores usaram estratégias de síntese quimio-enzimática para incorporar sacarose em poliacrilatos e poliaminas. A utilização de enzimas foi empregada por Yutaka e colaboradores para obtenção de éster de açúcar contendo grupo vinila, enquanto Patil e colaboradores sintetizaram um poliéster linear contendo sacarose. Posteriormente, Matsumura e colaboradores efetuaram a copolimerização de anidridos dicarboxilados, com abertura de anéis

oxiranas, formando poliéster com grupos carboxila. Por terem alta massa molar e serem solúveis em água, estes materiais são importantes em diversas aplicações na indústria (PATIL *et al*, 1991; YUTAKA *et al*, 1998; MATSUMURA *et al*, 1999; PARK *et al*, 2001).

Outro campo de aplicação importante desta tecnologia é a produção de ésteres de ácidos graxos e açúcares; esses apresentam larga aplicação como emulsificantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Além de seu efeito conservante, ésteres de carboidratos e ácidos graxos têm sido associados como agentes antineoplásicos e inibidores do crescimento de plantas, e têm-se apresentado como uma vertente bastante promissora, em função da importância de inúmeros ésteres na vida cotidiana (CHAMOULEAU *et al*, 2001; JAEGER *et al.*, 1994; YAHYA *et al.*, 1998).

Os ésteres de açúcares são biosurfactantes, ou seja, são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica, freqüentemente uma cadeia hidrocarbônica, e uma porção hidrofílica, que pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfótera. Em função disso, eles tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo) formando um filme molecular que reduz as tensões interfacial e superficial, atribuindo propriedades únicas, tais como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (DESAI & BANAT, 1997; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Quando comparados aos surfactantes sintéticos, o emprego de biosurfactantes em aplicações industriais apresenta vantagens. São atóxicos, inodoros, biocompatíveis, biodegradáveis e contribuem para o aumento dos créditos das chamadas “Reduções Certificadas de Emissões” (CERs). As CERs são metas que precisam ser atingidas pelos países em desenvolvimento definidos a partir do MDL (Mecanismo de Desenvolvimento Limpo) estabelecido no artigo 12 do Protocolo de Kyoto, que entrou em vigor em 16 de fevereiro de 2005, sendo, um instrumento que busca a redução de gases causadores do efeito estufa, responsáveis pelo aquecimento global da terra, e a contribuição para o desenvolvimento sustentável de países em desenvolvimento (MICHAELOWA, 2001).

Na indústria do petróleo, utiliza-se biosurfactantes e biopolímeros contendo açúcares ramificados tanto nos processos de recuperação melhorada de petróleo (extração de volumes adicionais de hidrocarbonetos líquidos ou gás natural usando

outros métodos de recuperação que não use a depleção natural ou a manutenção de pressão), como, também, incorporados em formulações de óleos lubrificantes, em pastas cimentantes para poços de petróleo, na biorremediação, na dispersão do derramamento de óleo e na remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, como substitutos aos surfactantes e polímeros convencionais. (MCPHALEN & JAMES, 1988; BANAT *et al*, 1991).

Em casos de derramamento de óleo, os biosurfactantes com baixos valores de HLB (balanço hidrofílico/lipofílico da molécula surfactante) são usados para aumentar a interação superficial água/óleo (A/O), acelerando a degradação desses pela ação de microorganismos, promovendo a biorremediação de águas e solos (REHM & REED, 1996; BOGNOLO, 1999).

O objetivo dessa dissertação de mestrado se constituiu, então, na obtenção de produtos biodegradáveis e de baixa toxicidade ao meio ambiente com ação surfactante através da esterificação da D-glicose com ácido graxo (ricinoléico) e interesterificação de triglicerídeos usando lipases, proteases e fungo. Os biosurfactantes obtidos foram analisados por metodologias qualitativas e quantitativas, tais como, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), tensão superficial e sua CMC (concentração micelar crítica) respectiva, estabilidade em sal e temperatura, ângulo de contato e formação de emulsões água/óleo e óleo/água. A otimização do processo foi realizada através de estudos estatísticos variando razão molar, tempo, temperatura, concentração de enzima, e tendo como variável resposta, a conversão.

2 Revisão Bibliográfica

“Em tudo somos atribulados, mas não angustiados; perplexos, mas não desesperados; perseguidos, mas não desamparados; abatidos, mas não destruídos;” II Coríntios 4: 8, 9

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfifílicas, do grego: *amphi* = "nos dois lados", "de dois tipos"; *philos* = "forte afinidade", ou seja, compostos que apresentam na mesma molécula uma parte apolar (hidrofóbica), denominada cauda, com afinidade por moléculas apolares, e uma parte polar (hidrofílica), cuja atração é por moléculas polares, denominada cabeça (TARAHOMJOO & ALEMZADEH, 2003).

De acordo com a região polar ou hidrofílica, os tensoativos podem ser classificados em iônicos (catiônicos e aniônicos), anfóteros ou não iônico. A parte apolar ou hidrofóbica, em geral são hidrocarbonetos, podendo ser cadeias alifáticas, grupos aromáticos ou policíclicos. Esta parte da molécula tem uma baixa solubilidade em água devido ao "efeito hidrofóbico", provocado não tanto pela atração entre grupos apolares, mas principalmente pela dificuldade em romper as fortes interações entre as moléculas de água (HELENIUS & SIMONS, 1975; LICHTENBERG *et al.*, 1983).

Os surfactantes apresentam propriedades peculiares e, em consequência de sua estrutura anfifílica, tendem a se distribuir nas interfaces das fases fluidas formando, entre elas, um filme molecular ordenado, reduzindo assim, a tensão interfacial e superficial. Estas propriedades fazem com que os surfactantes sejam adequados para um grande número de aplicações industriais, entre elas destacam-se, detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. A maior utilização destes produtos é na indústria de produtos de limpeza, sabão e detergente, petróleo, cosméticos e produtos de higiene (MORAES & REZENDE, 2004; TARAHOMJOO & ALEMZADEH, 2003).

Recentemente, em função de uma legislação ambiental cada vez mais restritiva, testes de biodegradabilidade e toxicidades aquáticas têm sido usados como critérios importantes na seleção dos tensoativos a serem empregados nos detergentes domésticos e industriais (MADSEN *et al.*, 1996).

2.2 Biosurfactantes

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Atualmente, nos países industrializados há um consumo de 70-75% desses produtos, enquanto que, nos países em desenvolvimento, predomina o uso de surfactantes de origem natural. Existe uma tendência mundial para a substituição de materiais sintéticos pelos naturais. Buscam-se, sobretudo, produtos mais brandos, biodegradáveis e com alta especificidade para uma dada aplicação (BOGNOLO, 1999).

Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até microrganismos (glicolipídios) e, também, no organismo humano (sais biliares), sendo considerados surfactantes naturais (BOGNOLO, 1999). Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades tensoativas, isto é, diminuem a tensão superficial e interfacial possuem alta capacidade emulsificante e são metabólitos secundários de bactérias, fungos e leveduras sendo denominados biosurfactantes (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

As principais classes de biosurfactantes (DESAI & DESAI, 1993) são glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Tabela 1).

TABELA 1 – Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.

Naturais	Sintéticos
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biosurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos e Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betaínas
Ésteres de sacarose	Copolímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

FONTE: NITSCHKE & PASTORE, 2002.

Várias células microbianas apresentam elevada hidrofobicidade superficial, sendo consideradas, por si só, como biosurfactantes, por exemplo, microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. Algumas espécies de *Cyanobacterium* e alguns patógenos, como *Staphylococcus aureus* e *Serratia sp.*, bactérias do gênero *Acinetobacter*, produzem vesículas extracelulares que têm função importante na captação de alcanos para a célula (KAPPELI & FINNERT, 1979).

Os biosurfactantes possuem também uma porção hidrofóbica, usualmente, uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos (saturado, insaturado, hidroxilado ou ramificado) ligada a uma porção hidrofílica que pode ser éster, hidroxila, fosfato, carboxilato ou carboidrato (BOGNOLO, 1999; CAMEOTRA & MAKAR, 1998). Os biosurfactantes, em sua maioria, são neutros ou aniônicos, variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. A Tabela 2 evidencia as principais classes de biosurfactantes e alguns microrganismos envolvidos em sua síntese (DESAI & BANAT, 1997).

TABELA 2 – Principais classes de biosurfactantes e os microrganismos envolvidos.

Tipo de Biosurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	
Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sofrolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. Cândida</i>
Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina, Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ac.graxos, lipídios e fosfolipídios	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Biodispersan, Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactantes particulados	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

FONTE: FONTE: NITSCHKE & PASTORE, 2002.

2.2.1 Função fisiológica dos biosurfactantes

Embora a exata função fisiológica dos biosurfactantes oriundos do metabolismo secundário de microorganismos ainda não tenha sido completamente elucidada, alguns microrganismos têm funções específicas, que podem estar associadas aos metabólitos secundários produzidos pelos mesmos. São exemplos destas funções:

- Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água – podem se reproduzir nestes substratos (FRANCY *et al.*, 1991);
- Transporte de hidrocarbonetos – função atribuída aos biosurfactantes ligados à parede celular de *Candida tropicalis*, onde um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana foi detectado quando a mesma crescia em alcanos; indicando que o complexo polissacarídeo-ácido graxo presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarbonetos (KAPPELI & FIECHTER, 1977).
- Aderência-liberação da célula a superfícies – uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar. Esses podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular com o objetivo de aderir ou se desligar de um determinado local, de acordo com sua necessidade, para encontrar novos *habitat* com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (ROSENBERG & RON, 1999).
- Atividade antibiótica – demonstrada por vários biosurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídios e glicopeptídios (LIN, 1996).

2.2.2 Propriedades dos biosurfactantes

Apesar da diversidade na composição e propriedades químicas, algumas características são comuns à maioria dos biosurfactantes (BOGNOLO, 1999).

- Atividade superficial e interfacial – são mais eficientes que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações (COOPER & PADDOK, 1984);

- Tolerância à temperatura, pH e força iônica – apresentam elevada estabilidade térmica e a variações de pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. Por exemplo, o lipopeptídio de *B. licheniformis*, JF-2, é estável a temperaturas em torno de 75 °C por até 140 h e pH entre 5 e 12 (HOROWITZ *et al.*, 1990);
- Estabilidade em presença de sais – suportam concentrações de 10% de NaCl, enquanto que uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999);
- Biodegradabilidade – são facilmente degradáveis na água e no solo, sendo adequados, portanto, para aplicações de biorremediação e tratamento de resíduos (MULLIGAN & GIBBS, 1993);
- Toxicidade – têm baixa toxicidade, podendo ser usados em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Nestes casos, minimizam os efeitos alérgicos característicos de produtos artificiais, motivo freqüente de reclamações por parte dos consumidores (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998; FLASZ *et al.*, 1998).

2.2.3 Aplicações industriais

Para obter uma medida do balanço de tamanho e intensidade das partes hidrofílica e hidrofóbica de um agente tensoativo, Griffin, em 1949, quantificou empiricamente o "balanço hidrofílico-lipofílico" (HLB), do inglês: *hydrophilic-lipophilic balance*. A quantificação desta grandeza é feita em uma escala de 0 (totalmente lipofílico) a 20 (totalmente hidrofílico), podendo ser calculada através da Equação 1, que avalia a estrutura média do tensoativo, ajudando a prever a utilidade deste para aplicações particulares (GRIFFIN, 1949; YAN *et al.*, 2001).

$$HLB = \frac{20 * M_h}{M} \quad (1)$$

Onde,

M_h = Massa molar da fração hidrofílica da molécula;

M = Massa molar total da molécula.

A Tabela 3 mostra um resumo das funções dos biosurfactantes, de acordo com seu HLB.

TABELA 3 – Correlação entre valor do HLB e função do biosurfactante.

	Valor do HLB	Função	
↓ Hidrofilicidade ↓	1 - 3	Anti-espumante	↑ Lipofilicidade ↑
	3 - 6	Emulsificante Água/Óleo (a/o)	
	7 - 9	Agente de molhabilidade	
	8 -18	Emulsificante Óleo/ Água (o/a)	
	13 -15	Detergente	
	15 -18	Solubilizante	

FONTE: SILVA, 2003.

Na Tabela 4, observam-se as principais aplicações industriais dos biosurfactantes correlacionadas com sua funcionalidade (BANAT, 2000; BANAT *et al.*, 2000).

TABELA 4 – Principais aplicações comerciais dos biosurfactantes.

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos.
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e higiene.
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas.
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura.
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios.
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos.
Desemulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo.
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos.
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

FONTE: NITSCHKE & PASTORE, 2002.

2.2.3.1 Utilização do biosurfactante na indústria do petróleo

2.2.3.1.1 Limpeza de reservatórios

Resíduos e frações de óleos pesados que sedimentem no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biosurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões O/A, facilitando o bombeamento dos resíduos e, após a quebra da emulsão, a recuperação do óleo. Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biosurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos problemático (BOGNOLO, 1999). A utilização de biosurfactantes para a limpeza de tanques, em substituição aos surfactantes convencionais, promove a limpeza e recuperação de 90% dos hidrocarbonetos presentes no resíduo (BANAT *et al.*, 1991).

2.2.3.1.2 Recuperação melhorada do petróleo (EOR – *Enhanced oil recovery*)

Na recuperação melhorada do petróleo (EOR), pode-se lançar mão também de microrganismos, ou seu produto de metabolismo, para produção de surfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, minimizam as forças capilares que impedem a movimentação do óleo por emulsificação e/ou quebra do filme de óleo retido nas rochas, aumentando, conseqüentemente, a recuperação do óleo residual (BANAT, 1995). A utilização desses biosurfactantes pode envolver estratégias como:

- Injeção de microrganismos produtores de biosurfactantes no reservatório e subsequente propagação *in situ*;
- Injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento de microrganismos;
- Produção de biosurfactantes em reatores e introdução posterior no reservatório.

Nos dois primeiros exemplos, é necessário que o reservatório contenha bactérias em quantidade suficiente e, no último caso, são necessárias etapas iniciais de produção, purificação e injeção do surfactante (BANAT, 1995; BANAT *et al.*, 2000).

Para serem úteis na EOR *in situ*, os microrganismos devem-se desenvolver em condições extremas, como alta temperatura, pressão, salinidade e baixa concentração de oxigênio. Vários microorganismos adaptados a condições extremas e com capacidade para recuperação de óleo têm sido isolados e estudados (JENNEMAN *et al.*, 1983). O mecanismo *in situ* deve-se, provavelmente, a múltiplos efeitos dos microrganismos no ambiente e no óleo. Estes efeitos incluem formação de gás e aumento da pressão, produção de ácido e degradação da matriz calcárea, redução na viscosidade do óleo e da tensão interfacial (JACK, 1988; KHIRE & KHAN, 1994).

2.2.3.1.3 Inversão de molhabilidade de superfície

Molhabilidade é, usualmente, definida como uma tendência do fluido se espalhar ou aderir sobre a superfície sólida. Essa informação é de fundamental importância para entender os problemas com o fluxo multifásico, desde a migração do óleo na rocha de origem até os mecanismos de produção primária e os processos de recuperação de óleo pesado (CRAIG, 1971).

Variações na molhabilidade são freqüentemente relatadas pela presença ou ausência de um filme de água entre o óleo e a superfície sólida. Kaminsky e Radke, em 1997, atribuíram importância fundamental ao filme aquoso na prevenção da molhabilidade da superfície sólida pelo óleo. Para esses autores, a presença de um fino filme aquoso previne o contato entre o óleo e a superfície, restringindo o fenômeno de inversão da molhabilidade (KAMINSKY & RADKE, 1997).

Hirasaki, em 1991, argumentou que a molhabilidade pode ser determinada pela espessura do filme de água. Se o filme que separa o óleo da superfície sólida for estável, o sistema continua molhado por água. Se o filme for instável, poderá se romper possibilitando a saída de algumas camadas de água, deixando então que o óleo entre em contato com a superfície sólida (HIRASAKI, 1991).

Buckley *et al.* relataram que a existência do filme de água estável, que possui espessura na faixa de 1-100 nm, é consequência da repulsão entre as duplas camadas elétricas, ou seja, é necessário que as cargas superficiais da interface sólido-água e da interface água-óleo sejam de mesmo sinal (BUCKLEY *et al.*, 1998).

Componentes polares do óleo podem sofrer adsorção ou deposição na superfície sólida. Os asfaltenos são considerados responsáveis pela alteração na molhabilidade, devido à presença de seus grupos polares e apolares que podem interagir com a superfície sólida (SANTOS, 2003).

A influência da temperatura na molhabilidade foi analisada por Basu *et al.* em um sistema trifásico de vidro/água/betume (fase inicial do óleo no reservatório). Eles descrevem que medidas estáticas do ângulo de contato são menos sensíveis à temperatura do que medidas dinâmicas. Os autores argumentam que o ângulo de contato dinâmico do betume depende da viscosidade e da tensão interfacial entre o betume e a água, enquanto que o ângulo de contato estático depende apenas das tensões interfaciais relacionadas pela equação de Young (Equação 2) (BASU *et al.*, 1996; ZISMAN, 1964):

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_s - \gamma_{SL} \quad (2)$$

Onde,

γ_{LV} = Tensão superficial do líquido;

γ_s = Energia de superfície do solo;

γ_{SL} = Energia de superfície do solo em um líquido.

São consideradas superfícies molháveis pela água, aquelas que apresentam ângulo de contato menor que 90°, superfícies neutras, igual a 90° e superfícies molháveis pelo óleo, maior do que 90°, uma vez que o ângulo de contato é medido na fase aquosa, por convenção da literatura (SHAW, 1992).

A Figura 1 ilustra a definição do ângulo de contato entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal. Nesta figura, γ_s e γ_{LV} são a energia de superfície do sólido e a tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor, respectivamente; γ_{SL} é a energia da interface sólido-líquido.

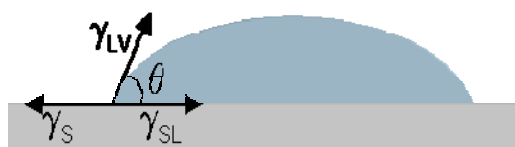


FIGURA 1 – Definição do ângulo de contato θ entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal.

Quanto menor for o ângulo de contato, mais molhável pela água será a superfície sólida, então, mais estável será o filme lubrificante de água estabelecido no transporte de óleo pesado pelo método de *core-flow*. Esse método é visto atualmente como alternativa viável para o transporte e produção de petróleo altamente viscoso presente no Brasil, pois sua grande vantagem é que se utiliza pequena quantidade de água, representando um passo significativo em direção à sua implantação definitiva (SILVA, 2003).

Um problema encontrado no método *core-flow*, relaciona-se com a tendência do óleo em aderir às paredes da tubulação. À medida que o óleo se acumula em pontos das paredes do duto, existe uma tendência de aumento da perda de carga, chegando algumas vezes até ao bloqueio total da seção de fluxo da tubulação. Esse grau de aderência nas paredes metálicas do duto está diretamente relacionado com a composição do óleo e com o material interno da tubulação (SILVA, 2003).

Com isso, vem-se estudando a possibilidade de revestir esses dutos com filmes aquosos, onde são adicionados soluções de agente de molhabilidade, produtos hidrofílicos ou oleofóbicos, com o intuito de inverter sua molhabilidade, ou seja, diminuir sua atratividade pelo óleo (SILVA, 2003).

2.2.3.2 Biosurfactantes em aplicações biocida

O Sistema de Produção Integrada (PIF) é uma exigência de alguns mercados importadores de frutas. Neste sistema é previsto o cultivo de frutas de alta qualidade e sanidade, seguindo normas de sustentabilidade ambiental, mediante o uso de tecnologias não agressivas ao meio ambiente e ao homem. A mudança do perfil do

consumidor, aliado à conscientização dos riscos da presença de resíduos de agrotóxicos em frutos, têm motivado cientistas na busca de alternativas ecologicamente corretas para o controle de insetos-praga (RAGA, 2003).

A família Tephritidae, conhecida como moscas das frutas verdadeiras, inclui cerca de 4000 espécies arranjadas em 500 gêneros. Entre os tefritídeos prejudiciais à fruticultura brasileira, destacam-se diversas espécies, em especial, a *Ceratitis capitata*, que produz danos de grande proporção às culturas de mamão, citros, maçã, maracujá, nectarina, nêspera, pêra, acerola e ameixa. Em sua fase larval danificam frutos, ocasionando perdas significativas em pomares comerciais. Por isso, existe um interesse crescente no desenvolvimento de novos produtos com características específicas, tais como, os biopesticidas (RAGA, 2003).

Segundo Boscolo, um novo biopesticida, considerado um exterminador de pragas, é composto principalmente por ésteres derivado de açúcares. Este tem ação tóxica destruindo a camada de gordura do exoesqueleto e impedindo que os mesmos desenvolvam defesas contra essas substâncias. Ao se romper tal defesa, cuja principal função é evitar a perda de água desses organismos, eles morrem por desidratação. O produto tem efeito tanto ao atingir o corpo do animal quanto ao se depositar na superfície dos vegetais. Por ser composto derivado de açúcar, é atóxico ao ser humano e ao meio ambiente, biodegradável e de ação seletiva, ou seja, não elimina os insetos predadores das pragas, como ocorre com os pesticidas tóxicos (BOSCOLO *et al.*, 2006).

Em função da atividade biológica sobre insetos e vegetais, alguns sucroésteres são classificados como pesticidas naturais (CHORTIK *et al.*, 1996; CHORTIK *et al.*, 1997). Uma série de sucroésteres alifáticos com cadeia alquílica, entre 7 e 12 carbonos, extraídos de vegetais da família do tabaco (*Nicotiniana sp*) foi eficiente no controle de pestes agrícolas, como a mosca branca (*Bemisia argentifolii*), que está se tornando um sério problema para a agricultura do Brasil, pois ataca diversas culturas como, por exemplo, a batata doce e o tomate (CHORTIK *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 1996). A vantagem deste tipo de pesticida é a sua biodegradabilidade e a atoxicidade para o homem e meio ambiente. Neste sentido, pesquisas estão sendo dirigidas para um maior conhecimento de síntese em grande escala e caracterização de suas atividades biológicas de diversos sucroésteres (OSCARSON & RITZÉN, 1996).

A surfactina, um dos mais conhecidos biosurfactantes, possui aplicações como bactericida, antifúngico, antiviral e antineoplásico (ARIMA *et al.*, 1968; PEYPOUX *et*

al., 1999). O biosurfactante produzido por *R. erythropolis* inibiu o vírus do herpes simples e vírus parainfluenza (NITSCHKE & PASTORE, 2002). A iturina, lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis*, demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras (THIMOM *et al.*, 1995). A inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por biosurfactante produzido por *Lactobacillus* também foi relatada (VALRAEDS-MARTINE *et al.*, 1996).

2.2.3.3 Biosurfactantes na agricultura

Os biosurfactantes podem ser utilizados na agricultura como herbicidas, pesticidas e em formulações, atuando como agente emulsificante de outros compostos ativos que são geralmente hidrofóbicos (LIN, 1996).

Surfactantes oriundos das espécies de *Bacillus* foram utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis. Os rhamnolipídios possuem um grande potencial para o controle biológico de fitopatógenos que produzem zoósporos (PATEL & GOPINATHAN, 1986; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

2.2.3.4 Biosurfactantes em produtos de higiene e cosméticos

A preparação de biosurfactantes pela ação enzimática sobre moléculas hidrofóbicas promoveu um novo direcionamento na produção destes compostos, principalmente para utilização em produtos de higiene e cosméticos, devido a sua compatibilidade com a pele (BANAT *et al.*, 2000; BROWN, 1991).

Um produto comercial à base de sofrorolipídios/propilenoglicol apresentou excelente compatibilidade dérmica, sendo utilizado como hidratante em cremes faciais (YAMANE, 1987). Alguns sofrorolipídios são utilizados como umectantes para incorporação em produtos de maquiagem. A KAO Co. Ltda desenvolveu um processo fermentativo para produção de sofrorolipídios que, posteriormente, sofrem

esterificação, resultando em um produto com aplicação em batons e como hidratante para pele e cabelos (DESAI *et al.*, 1997).

2.2.3.5 Biosurfactantes como umectante e dispersante de pigmentos

Nos processos têxteis, nenhuma das propriedades funcionais é mais importante do que a detergência e a umectação. A umectação permite abrir as estruturas compactas dos substratos têxteis para permitir a remoção dos contaminantes ou a penetração dos corantes e agentes de acabamento, e a detergência remove, suspende e emulsiona os contaminantes (MENEZES, 2005).

Para um surfactante ter ação de umectante, é necessário que reduza significativamente a tensão superficial da água, concentrando-se em toda a superfície das partículas, provocando assim, um aumento da molhabilidade. Conseqüentemente, haverá a remoção de gases, como o ar, e de outros contaminantes que estarão na superfície das partículas (MENEZES, 2005).

Na ausência de um agente redutor da tensão superficial, a umectação é prejudicada, o que dificulta a penetração da água nas partículas de pigmento, provocando sedimentação. Este efeito é também importante na aderência da tinta em superfícies porosas como a madeira, em que o ar adere nas fibras hidrófilas e precisa ser substituído pelo material de recobrimento (SILVA *et al.*, 2003).

Um agente dispersante faz com que haja a manutenção do movimento das partículas umectadas no interior do líquido, que resulta em uma suspensão permanente. O objetivo desta suspensão é que as partículas do pigmento, recobertas por um tensoativo, já não se atraiam. O primeiro estágio da dispersão de um pigmento em tintas líquidas corresponde à separação das partículas de pigmentos, destruindo aglomerados. O segundo é a estabilidade da emulsão, ou seja, a manutenção das partículas separadas entre si, distribuídas uniformemente no meio líquido e, assim, permanecendo ao longo do tempo (SILVA *et al.*, 2003).

Uma boa dispersão do pigmento contribui com o brilho do filme da tinta, pois mantém ao mínimo a irregularidade no filme seco. Os tensoativos escolhidos de modo adequado, segundo as diferentes necessidades, conferem as propriedades de

emulsão e dispersão. A Tabela 5 mostra alguns tensoativos utilizados em dispersão de pigmentos, com seus respectivos HLBs (SILVA *et al.*, 2003).

TABELA 5 – Tensoativos utilizados em dispersão de pigmentos.

Produto	HLB	Aplicação
Nonilfenol etoxilado	13,3	Umectante
Nonilfenol etoxilado	14,1	Umectante, alastrante
Nonilfenol etoxilado	12,3	Agente de nivelamento, evita o fenômeno de flotação
Álcool láurico etoxilado	12,9	Umectante
Monooleato de sorbitan	4,3 - 8,6	Co-dispersante umectante

FONTE: SILVA *et al.*, 2003.

2.3 Enzimas

Enzimas são catalisadores de reações químicas em sistemas biológicos *in vivo*, envolvendo reações com substratos naturais e não naturais *in vitro*. São designadas proteínas com atividade catalítica de alta massa molar formadas por subunidades conhecidas como aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas de natureza protéica, podendo ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em microrganismos. Entretanto, quando a permeabilidade da membrana celular é insuficiente para a passagem do substrato ou quando ocorrem reações laterais indesejáveis, é necessário conduzir a biotransformação com enzimas isoladas ou purificadas. Sua função é viabilizar a atividade das células, quebrando moléculas ou juntando-as para formar novos compostos. A singularidade desses compostos decorre do elevado grau de especificidade ao substrato em condições moderadas, sob as quais atuam. Apresentam elevado poder catalítico e possuem em suas estruturas grupos polares, tais como COOH, OH, NH₂, SH e CONH₂, que atuam como catalisadores (STRYER, 1992; FABER, 1997).

O interesse em utilizar enzimas como catalisadores vêm aumentando gradativamente devido a sua alta versatilidade e às condições suaves de temperatura e pH em que se realizam as reações, apresentando grande importância na pesquisa

científica, nos diagnósticos clínicos e na indústria. Entre as muitas vantagens da utilização de enzimas, três características são consideradas as mais importantes: quimiosseletividade, regioseletividade e enantioseletividade (FABER, 1997).

Entre todos os tipos de reações catalisadas por enzimas, as transformações hidrolíticas, envolvendo a formação de ligações imídicas e ésteres, podem ocorrer facilmente usando-se proteases, esterases ou lipases, sendo, portanto, os biocatalisadores mais empregados em biotransformação. Entre as várias razões que as tornam uma opção particularmente atrativa, pode-se citar ampla disponibilidade, baixo custo, condições suaves de síntese e ampla especificidade para substratos (FABER, 1997).

A aplicação de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, devido à alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais, e ao fato de atuarem com alta eficiência em condições reacionais bastante suaves. Sua utilização se deu no início do século XX, mas o interesse por estes sistemas só tomou força após a publicação dos trabalhos de Zaks e Klibanov, no início dos anos 80 (ZAKS & KLIBALOV, 1984; 1985; 1988 a, b).

Aplicações analíticas também têm se beneficiado das reações enzimáticas em meio orgânico. Lima e Angnes mostraram várias aplicações envolvendo reações enzimáticas com biossensores amperométricos, os quais são empregados para a resolução de problemas analíticos em diversas áreas, como clínica, na análise de alimentos e de amostras ambientais (LIMA & ANGNES, 1999).

2.3.1 Características das enzimas

Desde a era de Pasteur, a pesquisa bioquímica tem mostrado que, embora estejam sujeitas às mesmas leis da natureza que governam o comportamento de outras substâncias, as enzimas diferem-se dos catalisadores químicos comuns em vários aspectos (MOTTA, 2003):

- As velocidades das reações catalisadas por enzimas são tipicamente 10^6 a 10^{12} vezes maiores que reações não catalisadas, e são, no mínimo, várias ordens de magnitude maiores do que a mesma reação catalisada quimicamente.

- Condições de reação mais suaves – as reações catalisadas enzimaticamente ocorrem em condições brandas, temperaturas inferiores a 100°C, pressão atmosférica e pH próximo da neutralidade. Em contraste, a catálise química frequentemente requer temperaturas e pressões elevadas, bem como valores de pH extremos.
- Maior especificidade – As enzimas apresentam um grau de especificidade imensamente maior do que os catalisadores químicos em relação à identidade dos seus substratos (reagentes) e dos seus produtos, ou seja, as reações enzimáticas apresentam pouca formação de subprodutos.
- Capacidade de regulação – As atividades catalíticas de muitas enzimas variam em resposta às concentrações de substâncias diferentes dos seus substratos. Os mecanismos destes processos de regulação incluem o controlo alostérico, a modificação covalente das enzimas e a variação nas quantidades de enzima sintetizada.

2.3.2 Classificação e nomenclatura das enzimas

A União Internacional de Bioquímica e Biologia molecular (IUBMB) coloca todas as enzimas em seis grandes classes, assim como subclasses. Para cada enzima, são atribuídos dois nomes e um número de classificação de quatro subdivisões, onde o primeiro número designa à qual classe a enzima pertence; o segundo número indica o tipo de ligação que a enzima atua; o terceiro número é uma subclassificação do tipo de ligação e o quarto número é apenas um número de série (FURIGO & PEREIRA, 2001).

A Tabela 6 apresenta a classificações das principais das enzimas, subclasses, o tipo de reação catalisada e os grupos funcionais em que atuam.

TABELA 6 – Principais classe, subclasses e sub-subclasses das enzimas.

Classe		Subclasse		Sub-subclasse	
Nº	Classificação	Nº	Tipo de reação catalisada	Nº	Atuação
1	Oxidorreductase	1	Desidrogenase em O-H	1; 3	CH-OH
		2	Dehidrogenase em formaldeido	1; 3; 4	H-C=O
		3	Oxidoreductase em oxigênio	3	CH-CH
		4	Oxidoreductase em diamina	1; 3	CH-NH ₂
		5	Dehidrogenase em tetrahidrofolate	1; 3	CH-NH-
		6	Oxidoreductase em ferrihemoproteína	2; 4; 6	NADPH
		7	Oxidoreductase de oxigênio	3	NAD/NADP
		8	Dehidrogenase	1; 3	Doadores de S
		9	Oxidoreductase de nitrato	6	Outros
		10	Ascorbase	3	Difenóis
		11	Oxidoreductase dos H ₂ O ₂	1	Peróxido receptor
2	Transferase	1	Metiltransferase	1-3	C ₁
		2	Glicolaldeidotransferase	1	H-C=O; C=O
		3	Aciltransferase	1; 2	C-C
		4	Glicosiltransferase	1; 2	Glicosil
		5	Glutathiona S-transferase	1	Aril ou alquil
		6	Aminotransferase	1	Nitratos
		7	Fosfotransferase	1-4; 7	Fosfatos
		8	Thiosulfato S-transferase	1	Enxofre
3	Hidrolases	1	Carboxilesterase (lipase)	1-4;6;11;16;21;27;30	Ésteres
		2	Glicosidase	1-3	Carboidratos
		3	Epoxihidrolase	1-3	C-O-C
		4	Amino-peptidase	11;13-17;19;21-24	C-N
		5	Amidohidrolase	1-4	C-N
		6	Fosfohidrolase	1	Anidrido acético
4	Liasas	1	Carboxilase	1-3	-C-C-
		2	Carboidrase	1; 2	-C-O-
		3	Desaminase	1	-C-N-
		4	Glioxalase	1	-C-S-
5	Isomerases	1	Racemase e epimerase	-	-
		3	Oxidoreductase intramolecular	-	-
		4	Redutase intramolecular	-	-
6	Ligases	2	Tioquinase	1	C-S
		3	Amônia-ligase	1; 5	C-N
		4	CO ₂ ligase	1	C-C

FONTE: Sigma-Aldrich Co., 2007.

Por exemplo, no caso da lipase *Candida antarctica*, seu nome sistêmico é Triacilglicerol lipase e seu nome alternativo pode ser Lipase, Tributirase ou Triglicerídeo lipase. Seu número de classificação enzimática é EC 3.1.1.3, onde EC é abreviatura de *Enzyme Commission*; o primeiro dígito (3) denota o nome da classe (hidrolase); o segundo dígito (1) a subclasse (carboxilesterase); o terceiro dígito (1), hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis; e o quarto dígito (3), posição de ataque na qual ele atua (JAEGER *et al.*, 1999).

2.3.2.1 Lipases

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases que atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases. A diferenciação entre uma lipase e uma esterase (EC. 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis (JAEGER *et al.*, 1999; ALVAREZ-MACARIE *et al.*, 1999). Entretanto, a diferenciação entre lipases e esterases ainda não está completamente definida. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética, que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água (SARDA & DESNUELLE, 1958).

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais com os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum sp*, por leveduras de *Tulopsis sp* e *Candida sp* e bactérias como *Pseudomonas sp*, *Achromobacter sp* e *Staphylococcus sp*. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases de fontes animal e vegetal são preferíveis, devido ao custo do seu isolamento (CASTRO & ANDERSON, 1995).

O sítio catalítico é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas, e é freqüentemente protegido na molécula por uma “tampa” hidrofóbica, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e as propriedades de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases (BRADY *et al.*, 1990).

Mais recentemente, entretanto, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, sendo que as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica B*, que apresentam a “tampa” em suas estruturas, não sofrem ativação interfacial. Por outro lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a “tampa” e não precisam da interface para exercer a atividade hidrolítica (JAERGE & REETZ, 1998; CYGLER & SCHRAG, 1997).

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis neste meio, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Possuem a habilidade de catalisar reações de esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade. O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto ou inverso, é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional. As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, mais recentemente, para aplicações industriais (PANDEY *et al.*, 1999; GANDHI, 1997).

Nos últimos anos, com o intuito de aumentar a atividade catalítica de lipases, foram apresentados na literatura vários procedimentos de imobilização ou modificações na estrutura nativa, sendo que estes processos envolvem diferentes graus de complexidade e eficiência. Os métodos de imobilização requerem uma interação fraca ou a formação de ligações covalentes entre a lipase e o suporte. A engenharia genética de lipases envolve a modificação do gene que codifica para a enzima. Esta tecnologia inclui a habilidade de isolar e expressar os genes de interesse e modificar algum aminoácido que ocupe um sítio importante para a atividade catalítica da enzima (VILLENEUVE *et al.*, 2000; WINKLER & GUBERNATOR, 1994).

2.3.2.2 Proteases

As proteases representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos. Além disto, elas possuem aplicação comercial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por 60% da venda internacional de enzimas (BEYNOM & BOND, 2001).

Tendo em vista os recentes acordos mundiais para uso de tecnologias não poluentes, as proteases começaram a ser usadas em larga escala no tratamento do couro, em substituição aos compostos tóxicos e poluentes até então usados. Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos. Proteases hidrolisam as proteínas em peptídeos e aminoácidos, facilitando a sua absorção pelas células (BEYNOM & BOND, 2001).

As enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases ou proteinases (EC 3.4. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. Estas endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em serina- (EC 3.4.21), cisteína- (EC 3.4.22), aspártico-proteinases ou endopeptidases (EC 3.4.23) e metalloproteinases ou metalloendopeptidases (EC 3.4.24). As enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99 (RAWLING & BARRET, 1994 c).

As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N ou C terminal. Aquelas que atuam na região amino terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases). As exopeptidases que atuam na região carboxi terminal livre liberam um único aminoácido (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases). Algumas exopeptidases são específicas para dipeptídeos (dipeptidases) ou removem resíduos terminais que são substituídos, ciclizados ou ligados por ligações isopeptídicas, que são ligações peptídicas

diferentes daquelas entre uma α -carboxila e um α -amino grupo, e estes tipos de enzimas são denominados omega peptidases (RAWLING & BARRET, 1994 a, b, d).

As Endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal. A presença de grupos α -amino ou α -carboxila tem um efeito negativo na atividade da enzima.

Proteases são encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos. Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética. Numerosas proteinases são produzidas por microrganismos distintos, dependendo da espécie, ou mesmo por diferentes cepas de uma mesma espécie. Proteinases diferentes também podem ser produzidas pela mesma cepa, variando as condições de cultura. A maioria das serina proteinases comerciais, principalmente as alcalinas e neutras, são produzidas por microrganismos que pertencem ao gênero *Bacillus subtilis*. Proteases microbianas contam aproximadamente por 40% da venda total mundial de enzimas, pois são preferidas uma vez que elas possuem a maioria das características desejadas para aplicação em biotecnologia (RAO *et al.*, 1998).

2.3.3 Cinética da catálise enzimática

2.3.3.1 Fatores que influenciam a ação enzimática

A cinética enzimática é a parte da Enzimologia que estuda a velocidade das reações enzimáticas bem como os fatores que a influenciam. Os princípios gerais da cinética das reações químicas aplicam-se às reações catalisadas enzimaticamente, embora estas também mostrem um padrão distinto que não é usualmente encontrado nas reações não enzimáticas: saturação com o substrato (SAILEY & OLLIS, 1986).

2.3.3.2 Influência do pH

As moléculas biológicas são particularmente sensíveis a variações de pH porque são constituídas por diversos grupos químicos que ionizam em pH aproximadamente igual a 7,0. O motivo pelo qual a seleção natural escolheu biomoléculas tão sensíveis a variações de pH está, em parte, relacionado com a importância de reações de transferência de prótons em catálise enzimática (SAILEY & OLLIS, 1986).

A condição para que um grupo químico participe eficientemente em uma reação de transferência de prótons é que o mesmo seja apto a doar ou receber prótons. Adicionalmente, este grupo químico deve ser capaz de retornar prontamente ao estado de ionização anterior à transferência de prótons, regenerando assim o estado enzimático ativo. Para que um grupo químico preencha estes requisitos, o mesmo deve possuir um pK_a aproximadamente igual ao pH do ambiente. Conseqüentemente, catálise enzimática é necessariamente sensível às variações do pH, influenciando diretamente na velocidade de reação, como mostrado na Figura 2 (MOTTA, 2003).

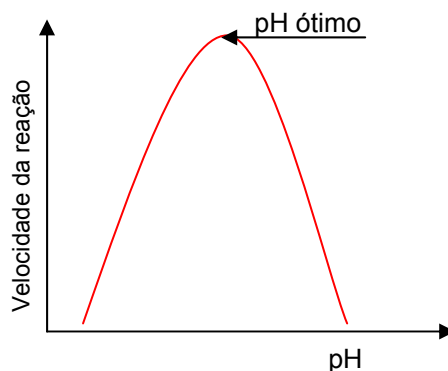


FIGURA 2 – Influência do pH sobre a velocidade de reação enzimática (MOTTA, 2003).

A dependência entre a estrutura e a função de biomoléculas com relação ao pH é um desafio importante à compreensão e manipulação de propriedades biomoleculares. Em proteínas, a variação de pH é de origem predominantemente eletrostática. Assim, a determinação de cargas fracionárias de grupos químicos em função de propriedades como conformação e pH do ambiente seriam de enorme valor para a elucidação de inúmeros processos biológicos. Como exemplo pode-se citar,

além dos mecanismos de catálise enzimática, o enovelamento de proteínas e o reconhecimento molecular. Diversos resíduos constituintes da estrutura nativa de proteínas apresentam um comportamento de ionização diferente daquele quando isolados em solução, devido à influência do ambiente eletrostático da proteína sobre o grupo ionizável (DAVES & McCAMMON, 1990).

2.3.3.3 Influência e seleção do solvente orgânico

A seleção do solvente orgânico é um fator importante na catálise enzimática em meio não aquoso, devido à interferência direta do solvente na atividade, estabilidade e especificidade da enzima (AYRES-BARROS, 2002; CASTRO *et al*, 1995). Os solventes menos nocivos às enzimas são os mais hidrofóbicos, por não interagirem significativamente com a água necessária à enzima (LAANE *et al*, 1987). Solventes hidrofílicos tendem a retirar a água essencial da camada protéica, levando à perda da atividade enzimática. As enzimas, quando em suspensão em solventes hidrofóbicos, requerem substancialmente uma menor quantidade de água para manutenção de sua atividade, em comparação às enzimas suspensas em solventes hidrofílicos (AYRES-BARROS, 2002; CASTRO *et al*, 1995).

Na Tabela 7 são apresentados os principais critérios a considerar na seleção de um solvente orgânico, incluindo critérios físico-químicos, biológicos, segurança, logísticos e econômicos (FERNANDES *et al.*, 2001).

TABELA 7 – Critérios para a seleção do solvente orgânico.

Físico - Químico
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Capacidade de extração (coeficiente de partição) ▪ Capacidade de solubilização de substratos e/ou produtos ▪ Pontos de ebulição ▪ Tensão superficial ▪ Viscosidade reduzida ▪ Densidade
Biológicos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Toxicidade para o biocatalisador
Segurança
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Toxicidade ▪ Inflamabilidade
Logística
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Facilidade de obtenção ▪ Eliminação de resíduos (reciclagem)
Econômicos
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baixo custo

FONTE: AIRES- BARROS, 2002.

A toxicidade da fase pode ser reduzida através da utilização de nutrientes e inóculos mais concentrados, para compensar a extração de nutrientes, e diminuindo a área interfacial, usando assim, uma agitação mais suave e/ou diminuindo a razão volumétrica de fases orgânica/aquosa, de modo a reduzir os fenômenos de agregação e emulsão (FERNANDES *et al*, 2001).

2.3.3.4 Efeito da água na atividade e estabilidade do biocatalisador

Mesmo em um meio não-convencional, constituído essencialmente por uma fase orgânica, a quantidade de água no sistema influencia fortemente a atividade catalítica da enzima. Para baixos teores de água, a atividade enzimática é geralmente baixa. Normalmente, a atividade enzimática aumenta com o aumento da camada de hidratação da enzima, o que é devido à ação lubrificante da água que aumenta a flexibilidade interna da enzima. A curva típica de variação da atividade específica da enzima em função da atividade da água, normalmente, apresenta um máximo. A diminuição de atividade pode ser devida a limitações quanto à transferência de massa,

em função do transporte do substrato através de uma fase aquosa, ou agregação das partículas de catalisador (WISEMAM, 1985).

A estabilidade enzimática normalmente diminui com o aumento da quantidade de água, participando, assim, de uma variedade de mecanismos que causam a desnaturação da proteína, conduzindo à inativação das enzimas (FERNANDES *et al*, 2001).

2.3.3.5 Efeito da temperatura

A influência da temperatura sobre a cinética de reação enzimática deve ser entendida em duas fases distintas: com a elevação da temperatura pode-se observar aumento na velocidade de reação, pois as moléculas envolvidas no sistema têm uma energia cinética mais elevada. Isto faz com que aumentem a probabilidade de colisão entre as moléculas e que uma maior proporção de moléculas tenha a energia de ativação necessária para a reação ocorra (Figura 3, curva a).

O efeito positivo do aumento da temperatura na energia das moléculas é contrariado pela desnaturação das moléculas de enzima. Temperatura mais elevadas provoca a destruição das interações que mantêm a estrutura tridimensional da proteína, podendo levar a um efeito irreversível na atividade catalítica (Figura 3, curva b). A temperatura que provoca a desnaturação está, geralmente, um pouco acima de sua temperatura ótima, que para a maioria das enzimas esta temperatura é de 30-40°C.

Essa influência da temperatura sobre a atividade da enzima é, geralmente, representada em termos de atividade ou velocidade de reação em função da temperatura, ou seja, a maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. A Figura 3 ilustra esse efeito sobre a atividade enzimática e a temperatura ótima de reação que é a interação entre dois fatores com efeito contrário, o aumento da velocidade de reação pela temperatura e a inativação das moléculas de enzima (MOTTA, 2003).

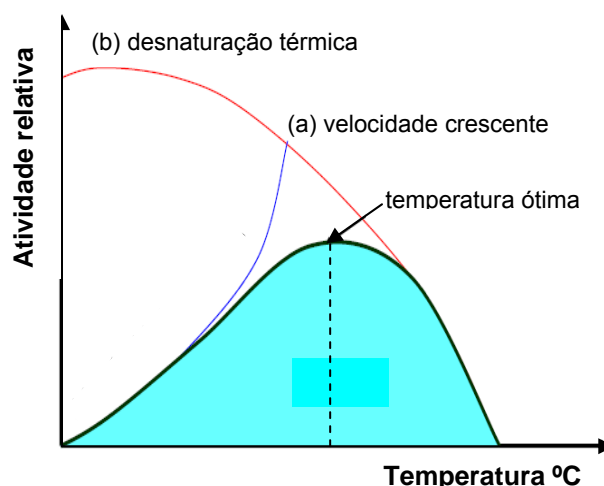


FIGURA 3 – Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática (MOTTA, 2003).

O efeito da temperatura nas enzimas depende de um número de fatores, dentre eles, pH, força iônica do meio, presença ou ausência de ligantes e concentração do substrato, que frequentemente protege as enzimas da desnaturação. Toda enzima tem uma temperatura ótima para que atinja sua atividade máxima, ou seja, é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um período de tempo, como representado na Figura 4.

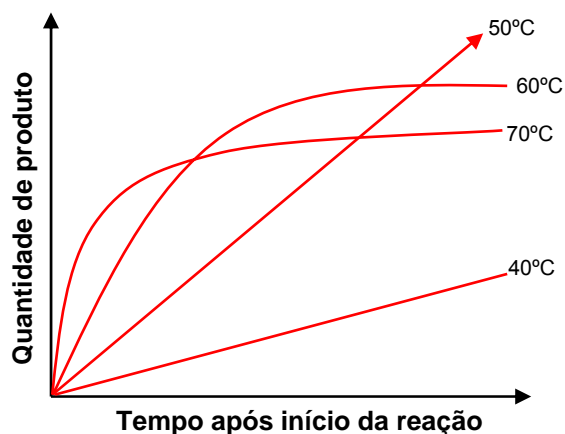


FIGURA 4 – Variação da quantidade do produto formado com o tempo a diferentes temperaturas (NOVONORDISK, 1995).

2.3.3.6 Efeito da concentração do catalisador (enzima)

A velocidade de uma reação enzimática depende da concentração de enzima, [E]. Se realizarmos uma série de ensaios com diferentes concentrações de enzima, obteremos resultados idênticos aos da Figura 5 (SAILEY & OLLIS, 1986).

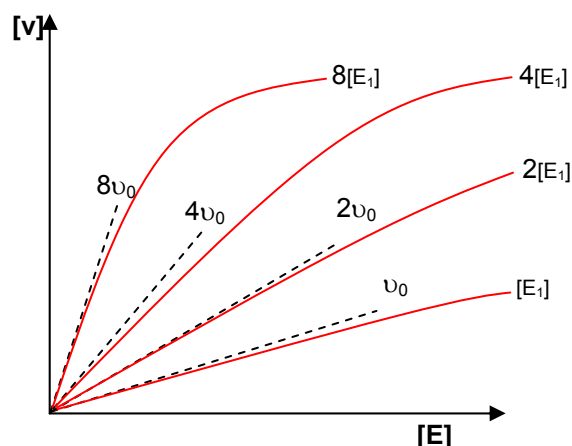


FIGURA 5 – Velocidades de reação enzimática com diferentes concentrações de enzima (SAILEY & OLLIS, 1986).

Traçando um gráfico com as velocidades obtidas na Figura 5, em função das concentrações de enzima, verifica-se que a variação é linear, como ilustrado na Figura 6.

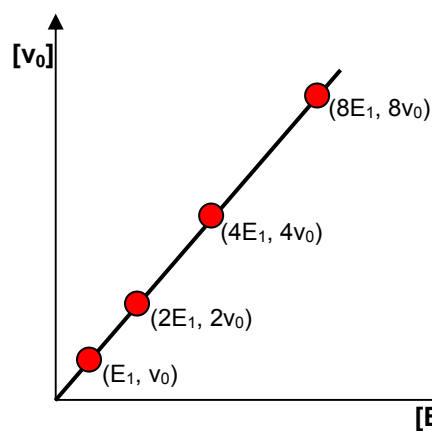


FIGURA 6 – Velocidades de reação enzimática em função das concentrações de enzima (SAILEY & OLLIS, 1986).

2.3.3.7 Efeito da concentração de substrato

A concentração do substrato de uma reação enzimática, [S], é outro fator que afeta a velocidade de reação, pois se fixarmos a concentração de enzima, um aumento na concentração de substrato provocará inicialmente elevação muito rápida na velocidade da reação. Se realizarmos uma série de ensaios com diferentes concentrações de substrato, obteremos resultados idênticos aos da Figura 5.

Quando se duplica a concentração do substrato [S] partindo de concentrações reduzidas, o valor da velocidade inicial será duplicado, isto é, aproxima-se de uma cinética de primeira ordem; com o aumento da concentração de substrato, a velocidade começa a variar cada vez menos, tendendo a uma *velocidade máxima* ($v_{m\acute{a}x}$), aproximando, assim, de uma cinética de ordem zero, ou seja, a velocidade, a qual independe da concentração de substrato (SAILEY & OLLIS, 1986).

A Figura 7 ilustra o efeito da concentração de substrato na velocidade de reação enzimática relacionado com a curva de Michaelis-Menten. A velocidade máxima, $v_{m\acute{a}x}$, corresponde a assíntota da curva, que é o valor para o qual tende a velocidade à medida que se aumenta a concentração de substrato; a constante de Michaelis, K_M , é uma medida de afinidade da enzima por um determinado substrato, ou seja, é a concentração de substrato para o qual $v_0 = v_{m\acute{a}x}/2$.

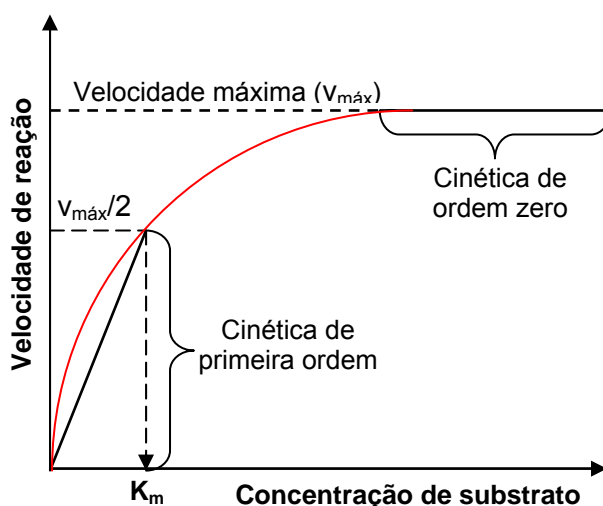


FIGURA 7 – Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação enzimática relacionado com a curva de Michaelis-Menten (SAILEY & OLLIS, 1986).

Com baixa concentração de substrato, a relação entre a velocidade e concentração de substrato é quase linear obedecendo à cinética de primeira ordem, isto é, a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração do substrato [S], como mostrado na Equação 3.

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x}[S]}{K_M} \quad (3)$$

$$\text{Considerando } \frac{v_{m\acute{a}x}}{K_M} = k \quad \therefore v_0 = k[S] \quad (4)$$

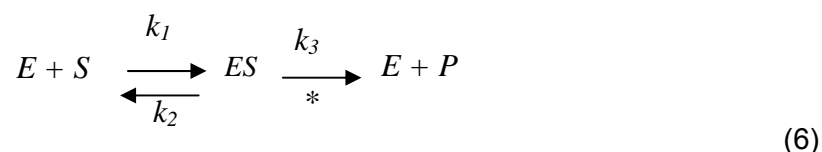
Onde, k é a constante de velocidade de primeira ordem (min^{-1}).

A Equação 4 indica que quando [S] é muito pequeno e continua decrescendo, a velocidade absoluta diminui a cada momento.

Em altas concentrações de substrato, a velocidade da reação é máxima e independente da [S]; obedece à cinética de ordem zero (Equação 5).

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x}[S]}{[S]} \quad \therefore v_0 = v_{m\acute{a}x} \quad (5)$$

O fato de $v_{m\acute{a}x}$ depende de [S], tem a ver com a formação de um complexo enzima-substrato (E-S) como produto intermediário das reações enzimáticas (Equação 6).



Em condições de velocidade inicial, a concentração do produto formado [P] é quase zero, de modo que podemos considerar $ES \rightarrow E + P$ como unidirecional* (SAILEY & OLLIS, 1986). De acordo com este modelo, quando a concentração de substrato é suficientemente elevada para converter todo o enzima na forma ES, o segundo passo da reação torna-se limitante, de modo que a velocidade global de reação torna-se cada vez mais insensível ao aumento de [S], aproximando-se de uma velocidade máxima, $v_{m\acute{a}x}$. A equação que traduz o comportamento da curva de v em

função de [S] (curva de Michaelis-Menten) é a equação de Michaelis-Menten (Equação 7).

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

Onde,

v_0 : velocidade inicial para cada [S];

K_M : Constante de Michaelis, que engloba as constantes k_1 , k_2 e k_3 . É o valor de [S] para o qual $v_0 = v_{m\acute{a}x}/2$, e é uma medida da afinidade da enzima por um determinado substrato;

$v_{m\acute{a}x}$: Velocidade máxima da reação é o valor para qual tende a velocidade à medida que se aumenta [S];

[S] : Concentração do substrato.

A Figura 8 é uma simplificação da teoria de Michaelis-Menten, válida para a maioria das enzimas. Em primeiro lugar, o complexo ES engloba um conjunto de intermediários, desde que o substrato se liga, incluindo as várias transformações que sofre, até que este se liberta.

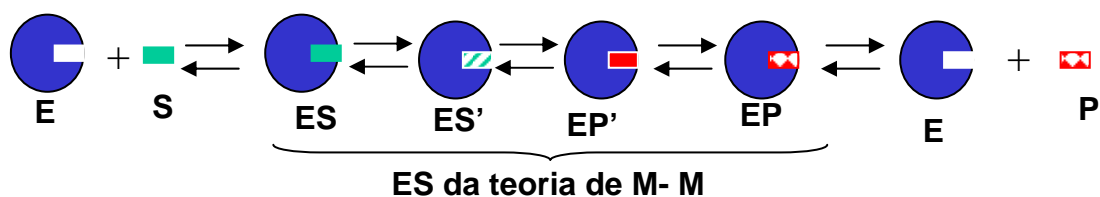


FIGURA 8 – Intermediários incluídos no complexo ES.

Por outro lado, esta análise é válida quando se varia apenas a concentração de um substrato. Quando houver mais que um substrato, estuda-se cada um isoladamente, com os outros em concentração de saturação.

3 Materiais e Métodos

“Eu, na verdade, sou pobre e necessitado, mas o Senhor cuida de mim. Tu és o meu auxílio e o meu libertador; não te detenhas, ó Deus meu.”
Salmo 40:17

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento desse trabalho foram todos de grau analítico: Acetato de etila P.A. (MERCK); Acetona (Quimex- F. MAIA Indústria e comércio Ltda); Álcool etílico 99,8% P. A. (Dinâmica Química Contemporânea Ltda); Álcool metílico 99,8% P. A. (VETEC Química Fina Ltda); Alkaline Proteinase (BIOVET[®] PESHTERA); Cloreto de sódio P.A. (Quimex-F.MAIA Indústria e comércio Ltda); Clorofórmio (Quimex-F.MAIA Indústria e comércio Ltda); Cromatofolha-Alumínio CCF-C/25 (MERCK); D-Glicose Anidra (Dextrose) P.A. (Synth-Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda); Dimetilsulfóxido deuterado (MERCK); Éter Etílico P.A. (QEEL-Química Especializada Erich Ltda); Fermento Biológico seco instantâneo (Gist Brocades Chile S.A.); Hidróxido de potássio P.A. (VETEC Química Fina Ltda); Lipozyme TL IM (Novozymes Latin América Ltda); Lipozyme RM IM (Novozymes Latin América Ltda); Neutral Proteinase (BIOVET[®] PESHTERA); *N,N*-Dimetilformamida P.A. (CRQ Cromato Produtos Químicos Ltda); Novozym 435 (Novozymes Latin América Ltda); Óleo de mamona (PROQUINOR Produtos químicos do nordeste Ltda), Sílica gel 60 (Kieselgel 60 – Fluka Chemie AG); Sulfato de sódio anidro P.A. (MERCK).

3.2. AMOSTRAS

Nesse trabalho foi utilizada amostras de óleo de mamona, petróleo e biodiesel. O óleo de mamona comercial, refinado e sem nenhum tratamento prévio, Tipo I, apresentou as especificações descritas pelo fabricante mostradas na Tabela 8. A amostra do petróleo e do biodiesel, foram cedidas pela Petrobras e suas especificações estão descritas nas Tabelas 9 e 10.

TABELA 8 – Composição e especificações para o óleo de mamona refinado Tipo I.

Ácidos graxos	%
Ricínoléico	90,0
Linoléico	4,2
Oléico	3,0
Estearíco	1,0
Palmítico	1,0
Linolênico	0,3
outros	0,5

Propriedades	Especificações
Densidade (25 °C)	0,957 - 0,961
Cor Gardner (máx.)	2
Índice de acidez	1,5 mg KOH/g
Índice de saponificação	176-184
Índice de hidroxilas	160-168 mg KOH/g
Solubilidade em álcool	Completa
Umidade	1,0% Karl Fischer

TABELA 9 – Especificações para o petróleo.

Especificações do petróleo	
Tipo de Fluido:	Petróleo
Órgão: LAB-MO	Ramal: 8372310
Campo/ Poço:	CJ-N
Data da coleta:	02-7-2006.
% BSW:	5,32
Densidade:	0,878 g/cm ³ á 25°C

TABELA 10 – Especificações para o biodiesel.

Especificações do biodiesel	
Tipo de Fluido:	biodiesel de mamona
Data da coleta:	20-09-2006.

3.3 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados os equipamentos listados a seguir.

- Agitador magnético com placa aquecedora – QUIMIS M25006;
- Agitador mecânico – Hamilton Beach;

- Agitador mecânico – IKA LABOTERCHNIK RW 20.n;
- Balança analítica – SCIENTECH modelo AS 210;
- Banho cinemático para viscosímetro MA-135 – Marconi equipamentos para laboratório;
- Banho termostático - FISATAM M550;
- Centrífuga a vácuo e temperatura - Centrivap Concentrador LABCONCO;
- Centrífuga modelo Himac CR 21G, da HITACHI;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência- Varian® 9002 com detector de índice de refração;
- Espectrofotômetro de infravermelho, modelo ABB, série MB 104, da BOMEN;
- Espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear, modelo Mercury 200 MHz, da VARIAN.
- Incubadora de bancada refrigerada – CIENTEC Equipamentos para laboratório CT-712R;
- Manta aquecedora – QUIMIS;
- Rotavaporador - FISATAM M802;
- Tensiômetro - Termo Cahn DCA 315.

3.4 HIDRÓLISE DO ÓLEO DE MAMONA: OBTENÇÃO DO ÁCIDO RICINOLÉICO

O óleo de mamona é uma fonte teoricamente pura do ácido ricinoléico, constituído de quase 90% de sua composição, como mencionado na Tabela 8. A cadeia carbônica do ácido ricinoléico proporciona sítios em que são realizadas reações químicas, com inúmeras possibilidades de obtenção de derivados pela modificação da estrutura da cadeia carbônica, sendo, portanto, a motivação de utilização neste trabalho.

Em um balão de três bocas, de fundo redondo, equipado com termômetro e condensador de refluxo adicionou-se 30g de óleo de mamona. O sistema foi mantido sob aquecimento a 70°C usando manta aquecedora termostatizada (Figura 9). Cerca de 60 mL de álcool etílico e 6g de KOH (hidróxido de potássio) solubilizados em 10 mL de água destilada foram adicionados em um balão reacional de 250 mL. A mistura permaneceu sob aquecimento por duas horas, sendo, posteriormente submetida a lavagens intercaladas com água destilada, a 80°C, e solução de ácido sulfúrico 30% (Figura 10). O pH da mistura foi medido com papel indicador universal após cada ciclo de lavagem, sendo esta interrompida quando foi atingido o pH entre 3-4. Secou-se a mistura com sulfato de sódio anidro, sendo então adicionado acetona P.A. numa mesma proporção. A mistura resultante foi resfriada a 0°C e mantida sob resfriamento por duas horas. A acetona foi utilizada para promover a cristalização dos ácidos graxos, sendo, o ácido ricinoléico o único a permanecer líquido nestas condições. Em seguida, a mistura resfriada foi centrifugada a 15.000 rpm e filtrada por gravimetria para a separação dos cristais dos ácidos graxos e do ácido ricinoléico, obtendo-se, aproximadamente, 25g de ácido ricinoléico (ácido *cis* 12-hidroxi-9-octadecenóico).

A Figura 9 ilustra o sistema reacional da hidrólise do óleo de mamona.

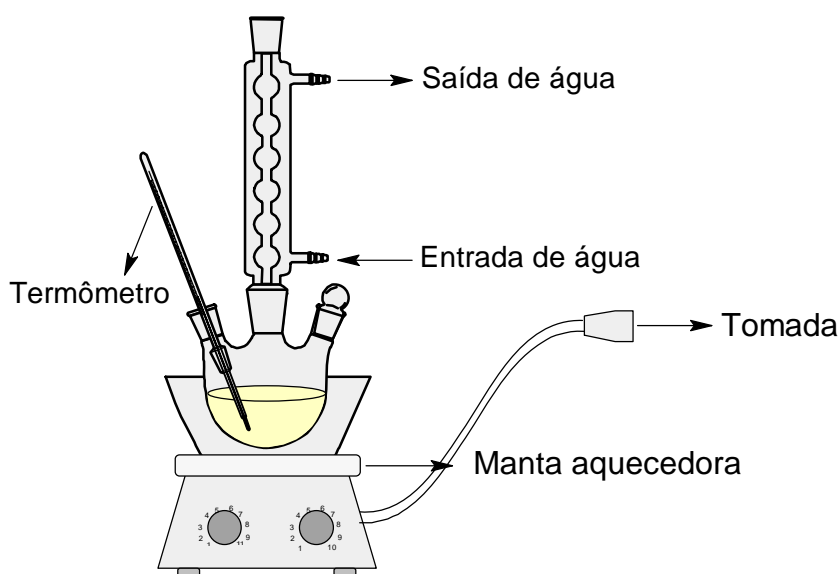


FIGURA 9 – Sistema reacional de hidrólise do óleo de mamona.

A Figura 10 ilustra o ciclo de lavagem do produto reacional obtido por hidrólise do óleo de mamona, para a neutralização do catalisador.

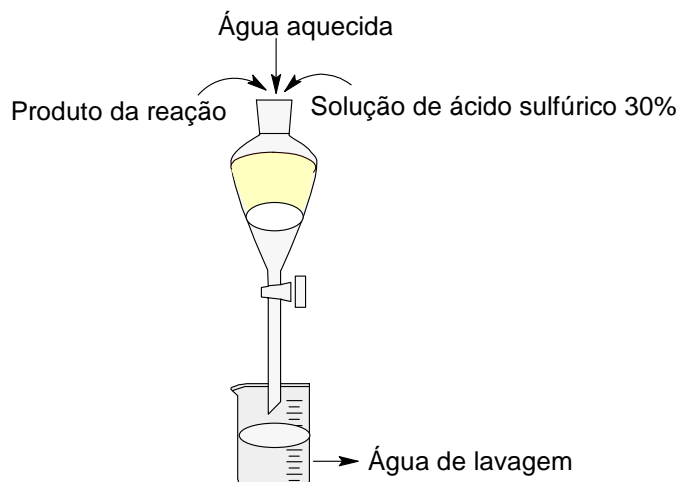


FIGURA 10 – Procedimento de neutralização da hidrólise do óleo de mamona.

A Figura 11 ilustra a reação de hidrólise do óleo de mamona.

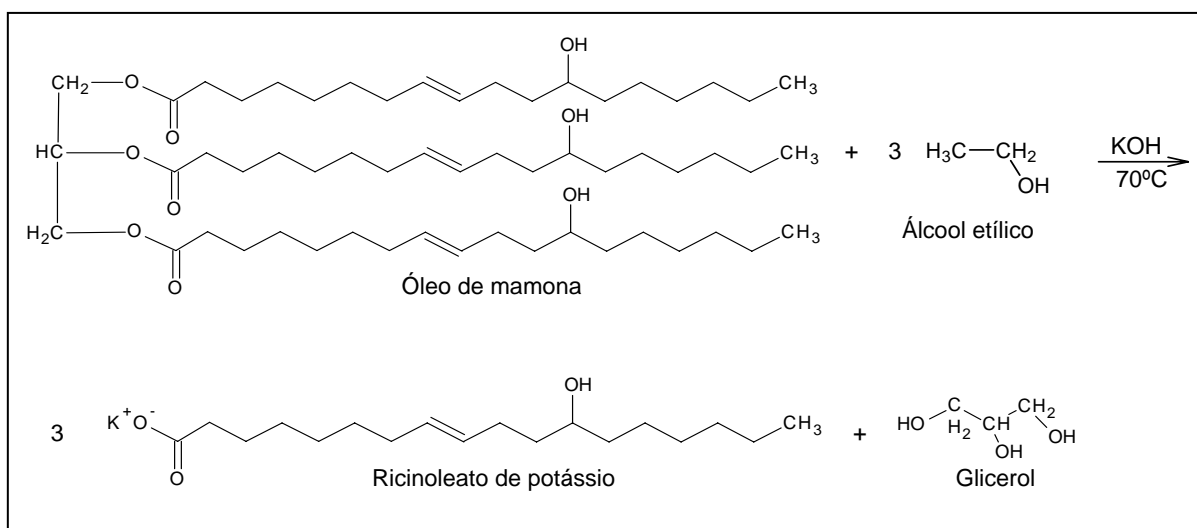


FIGURA 11 – Reação de hidrólise do óleo de mamona

A Figura 12 mostra a reação de acidificação do ricinoleato de sódio para a formação do ácido ricinoléico.

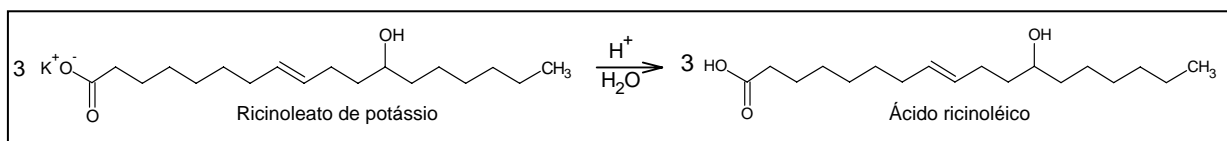


FIGURA 12 – Reação de acidificação do ricinoleato de sódio para a formação do ácido ricinoléico.

3.5. Caracterização estrutural do ácido ricinoléico

3.5.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^{13}C RMN)

Com o objetivo de caracterizar o produto obtido pela hidrólise do óleo de mamona, cerca de 100 mg do produto da reação purificado foi solubilizado em 0,7 mL de Dimetil-sufóxido deuterado (DMSO) e, em seguida, analisados em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear da Varian, modelo Mercury 200, à temperatura ambiente.

3.6 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES

As reações de esterificação e transesterificação foram realizadas em sistema constituído por erlenmeyer de vidro graduado, boca e tampa esmerilhados, termômetro e incubadora de bancada refrigerada.

Amostra de D-glicose (0,125 mol/L) foi solubilizada em DMF (dimetilformamida) em um erlenmeyer e, em seguida, foi adicionado 0,5 mol/L de ácido ricinoléico ou óleo de mamona. A mistura reacional foi homogeneizada e retirada alíquotas antes e depois da adição do catalisador (enzimas) por um período de 7 (sete) dias, para o monitoramento da conversão da D-glicose em Ricinoleato de D-glicose e éster de mamona, por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). Fez-se necessário utilizar a D-glicose como reagente limitante devido às limitações e especificações da coluna utilizada no CLAE, e esse monitoramento, implicou no consumo do açúcar e, conseqüentemente, na conversão dos produtos.

As figuras 13 e 14 mostram as reações de esterificação e transesterificação mencionados anteriormente.

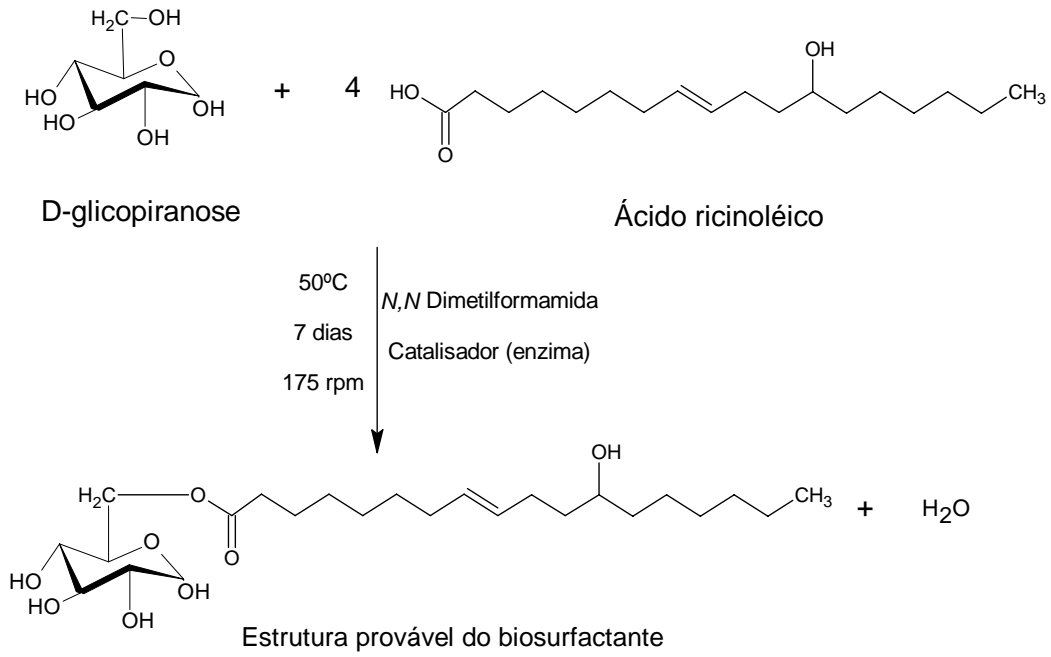


FIGURA 13 – Reação de esterificação do ácido ricinoléico.

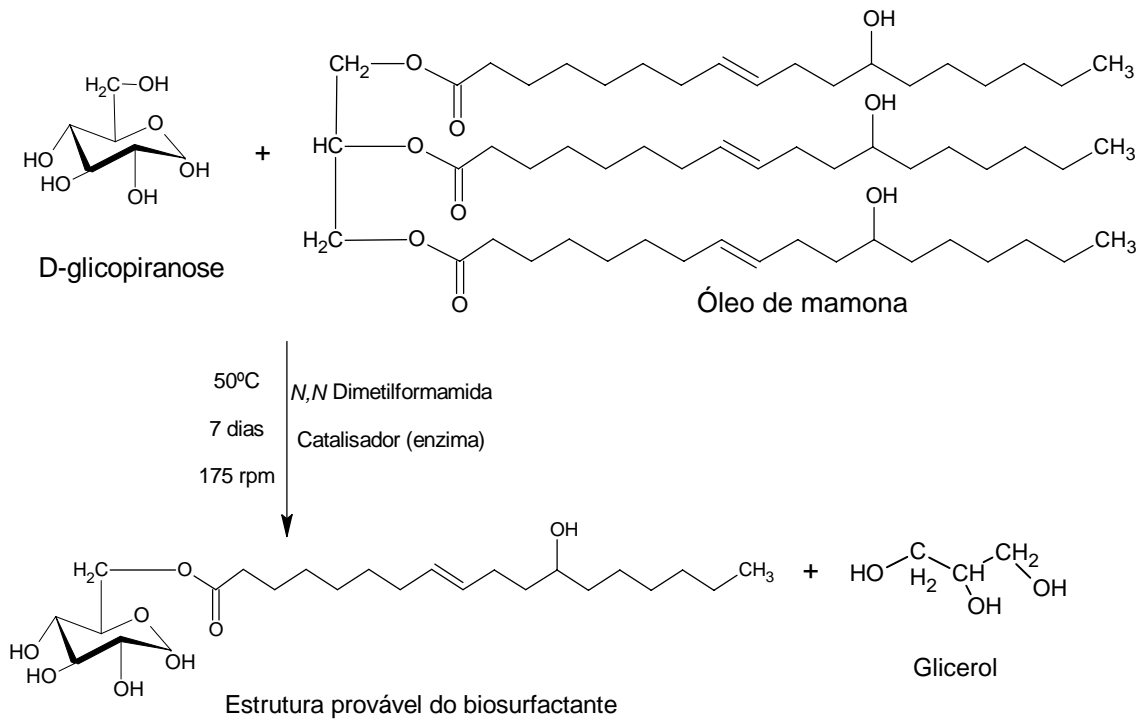


FIGURA 14 – Reação de transesterificação do óleo de mamona

Com o término da reação, os produtos foram filtrados em um funil de vidro contendo filtro de papel para a retirada total do catalisador (enzima), pois a mesma não foi solúvel no meio reacional. O filtrado foi inserido num balão de fundo redondo e colocado no rotavaporador a vácuo, a 60°C, para a retirada do DMF – *N,N*-Dimetilformamida (solvente orgânico). A retirada do solvente proporcionou a formação de duas fases, uma fluida que foi retirada por inversão e uma mais viscosa, que foi solubilizada em acetona. De modo que, através do CCD (cromatografia de camada delgada), foi possível observar que a fase fluida é o excesso de óleo de mamona ou ácido ricinoléico que não reagiu com resíduos do biosurfactante. A solubilização em acetona foi utilizada para separar o produto obtido na reação, da D-glicose residual. Essa solução contendo biosurfactante e acetona foi refrigerada e filtrada em filtro de papel, e em seguida, concentrada, em um rotavaporador a vácuo a 50°C. O açúcar tem baixa solubilidade em acetona, ou seja, a D-glicose cristaliza em presença de acetona facilitando assim o processo de separação do açúcar e do produto por meio de um processo de filtração.

3.7 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES

3.7.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Através da polaridade dos constituintes presentes no meio, foi utilizada uma fase adsorvente de sílica depositada sobre uma placa de alumínio e uma fase móvel composta por acetato de etila, metanol e água na proporção 8,5:1,0:0,5. Pequenas gotas de solução das amostras foram aplicadas em um ponto próximo ao extremo inferior da placa, deixando-a secar e, em seguida, colocou-se a placa em um béquer contendo a fase móvel. Como somente a base da placa fica submersa, o solvente começou a molhar a fase estacionária por capilaridade. Concluído o deslocamento da fase móvel, retirou-se a placa do béquer, que foi deixada secar a temperatura ambiente. A revelação da placa foi possível através da aplicação de uma solução de ácido sulfúrico 10% (v/v). Em seguida, a placa cromatográfica foi mantida sob aquecimento em uma placa aquecedora.

Através do CCD, foi possível monitorar o andamento da reação de transesterificação do óleo de mamona e esterificação do ácido ricinoléico e a purificação dos produtos.

3.7.2 Cromatografia em Coluna (CC)

Pesou-se uma quantidade de amostra e de sílica referente ao tamanho da coluna a ser utilizada, tomando como base a fórmula para o cálculo de volume para o cilindro ($\pi r^2 h$). Com posse desses dados, a coluna foi recheada com a sílica e preenchida com clorofórmio, abrindo ocasionalmente a torneira para o controle do nível de solvente. Em seguida, a amostra solubilizada a 50°C, em metanol, foi adicionada na coluna. Após a sua adsorção na coluna, foi dado prosseguimento à eluição com clorofórmio, vertendo o eluente cuidadosamente pelas paredes internas da coluna e, ao mesmo tempo, abrindo a torneira para o escoamento do solvente até a extração total da fase oleosa, em seguida foi feita a substituição do eluente anterior para uma mistura de clorofórmio/ metanol (9:1) e adicionado até a extração total do produto. As frações foram recolhidas em frascos de vidro enumerados e analisadas através do CCD. Definido qual a fração do produto, o mesmo foi concentrado em um rotavaporador a vácuo, a 50°C, e refrigerado para as futuras análises.

3.7.3 Espectroscopia na região de infravermelho médio

A caracterização estrutural dos biosurfactantes obtidos foi realizada através da deposição da solução do surfactante em clorofórmio sobre uma pastilha de KBr, utilizando um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) da BOMEN, modelo ABB, série MB 104, na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} .

3.7.4 Quantificação da taxa de conversão através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação do teor de D-glicose contido no meio reacional foi realizada em um cromatógrafo líquido Varian modelo 9002, acoplado a um detector de índice de refração Varian modelo 9040. Um *software* Galaxie Workstation versão 1.8 foi usado para registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Utilizou-se uma coluna

Varian HPLC - Metacarb 87P (150 mm x 7,8mm). O solvente utilizado foi água de alta pureza (milique), sendo sua desgazeificação realizada em microondas por 10 minutos. A análise de cromatografia foi realizada à temperatura de 60°C, onde as alíquotas de 20 µl das amostras foram injetadas com seringa Hamilton de 100µl e o seu tempo de corrida foi de 30 minutos. Os cálculos da conversão foram baseados nas áreas abaixo do cromatograma das amostras subtraídos das amostras sem a adição do catalisador (branco).

3.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

A concentração micelar crítica do biosurfactante foi determinada pela variação de tensão superficial em função da concentração do biosurfactante. A tensão superficial foi obtida pelo método da placa de Wilhelmy, no qual uma placa de vidro (23,5mm x 0,2 mm) foi imersa no líquido a ser analisado como descrito por Shaw (1992).

O método da placa de Wilhelmy mede o peso do líquido arrastado por uma placa quando esta é levantada da superfície do líquido. O peso do líquido é proporcional à tensão superficial do mesmo. A placa é movida em direção à superfície do líquido até o menisco se conectar com a placa, e depois, a placa é levantada. A tensão superficial é calculada pela força resultante, isto é, a placa é elevada gradualmente e a força máxima de empuxo ($F_{m\acute{a}x}$) necessária para deslocar a placa do líquido é medida por uma balança de precisão e, então, automaticamente relacionada à tensão superficial (γ) pela Equação 8.

$$\gamma = \frac{F_{m\acute{a}x} - mg}{2(l + t)} \quad (8)$$

Onde,

m = Massa;

l = Comprimento;

t = Espessura da placa;

g = Força da gravidade;

γ = Tensão superficial expressa em mN/m.

Os experimentos foram realizados a 20-22°C em duplicata. A tensão superficial foi determinada a pH 5, característico da água destilada. A CMC, que é a concentração do biosurfactante na qual a tensão superficial não decresce mais com o aumento da concentração do biosurfactante, como consequência do processo de formação de micelas, foi estimada através do ponto de inflexão na curva de tensão superficial *versus* concentração do biosurfactante.

3.8.1 Influência da salinidade na concentração micelar crítica (CMC)

A estabilidade do biosurfactante em meio salino foi determinada através das medidas de tensão superficial pelo método de placa de Wilhelmy, tendo como função a tensão superficial *versus* concentração do biosurfactante em soluções salinas variando entre 0, 50, 72 e 115 g/L de NaCl.

3.8.2 Influência da temperatura sobre a concentração micelar crítica (CMC)

Para determinar a influência da temperatura sobre a concentração micelar crítica, foram preparadas soluções aquosas do biosurfactante em concentrações de 10; 5; 1; 0,5; 0,1 e 0,05 g/L. Posteriormente, a tensão superficial foi obtida como descrito na seção 3.8, a 25 e 55 °C.

3.9 MOLHABILIDADE DO BIOSURFACTANTE (ÂNGULO DE CONTATO)

O ângulo de contato é uma medida que auxilia no entendimento dos fenômenos capilares. Por exemplo, quando um tubo capilar fino é colocado em contato com uma superfície líquida e, se $\theta < 90^\circ$ (típico do sistema ar-água-vidro), o líquido invadirá o capilar até que a força capilar seja equilibrada pelo peso da coluna líquida formada com a invasão. Neste caso, diz-se então que o líquido é *molhante* para aquele sólido. Porém, se $\theta > 90^\circ$ (típico do sistema ar-mercúrio-vidro), observa-se que

o líquido é repelido pelo capilar, originando uma depressão na superfície líquida. Neste caso, o líquido é *não-molhante* para aquele sólido. Quando $\theta = 90^\circ$, as forças capilares são nulas e nada ocorre (WOLF *et al*, 2006).

A determinação do ângulo de contato foi realizada pelo método da placa de Wilhelmy, onde foi medido o ângulo de avanço e de retrocesso, indiretamente, através de medidas de força em função da profundidade de imersão do líquido. Essas medidas foram realizadas a temperatura ambiente (20-22°C), de modo que não houvesse oscilação de medidas da tensão superficial do líquido durante o experimento e nas concentrações de biosurfactante de 12; 8; 5; 1; 0,5 e 0,1 g/L.

3.10 EFICIÊNCIA DOS BIOSURFACTANTES COMO AGENTE ESPUMANTE

Para a avaliação do biosurfactante como agente espumante, foi escolhida uma concentração acima da concentração micelar crítica (CMC), pois o volume de espuma neste ponto mantém-se praticamente constante ou aumenta lentamente até atingir um valor constante (Salager *et al*, 2003).

Além da eficácia na geração de espuma, um outro parâmetro importante para avaliar o desempenho do biosurfactante como agente espumante é a estabilidade da espuma gerada. Por este motivo, mediu-se esta estabilidade por meio da determinação do tempo necessário para a drenagem da fase líquida da espuma, já que este mecanismo de degradação da espuma é o primeiro a ocorrer após sua formação (Rosen, 1979).

Nesse contexto, mediu-se o volume da espuma gerada pelos biosurfactantes derivados do óleo de mamona e do ácido ricinoléico. Cerca de 50 mL de solução aquosa de biosurfactante com concentração 1g/100mL foram mantidos sob agitação mecânica com um agitador de hélice tripla por 3 minutos. Em seguida, o líquido foi transferido para uma proveta graduada de 1000mL e verificado o volume da espuma. A eficiência de formação de espuma foi medida através da Equação 9.

$$\%Espuma = \frac{(Vol. \text{ após agitação} - Vol. \text{ antes da agitação})}{(Vol. \text{ antes da agitação})} \times 100 \quad (9)$$

3.11 EFICIÊNCIA DO BIOSURFACTANTE COMO BIOPESTICIDA

Foram coletadas amostras de moscas em uma população de *Ceratitis capitata* (mosca da fruta) adulto, onde cada uma continha 10 unidades sem distinção de sexo. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram colocados para refrigerar a 0° C por aproximadamente quatro (4) minutos, com o objetivo de paralisar as moscas, e assim, alcançar um maior controle sobre a superfície a ser pulverizada com a solução do biosurfactante, nas concentrações de 100, 50, 20, 10, 5, 1 e 0 (controle) g/L. Após pulverização do biosurfactante, retirou-se o excesso do produto ativo com papel toalha, e as moscas foram colocadas em gaiola para se observar a possível atuação do biosurfactante e, conseqüentemente, a quantificação do índice de mortalidade.

3.12 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO BIOSURFACTANTE COMO PREVENTOR DE EMULSÃO

A eficiência do biosurfactante como preventor de emulsão foi avaliada segundo o método descrito na norma PETROBRÁS N-2381.

Inicialmente, foi preparado um litro do fluido teste (solução de NaCl com 72g/L). Em seguida, foi observada a existência de compatibilidade entre o preventor de emulsão e o fluido teste, à temperatura de 38°C, em 0,4% (v/v). Foram preparados 200mL de emulsão do óleo cru com o fluido teste nas proporções 1:3, 1:1 e 3:1, observando a tendência de formação de emulsão mais estável e suas características. Essa emulsão foi preparada em um béquer de 400mL, onde a fase de menor volume foi adicionada primeiro, seguido da fase de maior volume. Com o disco do agitador posicionado a 1 cm do fundo, a agitação foi iniciada com velocidade média de 16.000 a 18.000 rpm por um período de 15 segundos. Após esse tempo, adicionou-se lentamente a quantidade restante que se apresentava em maior volume, ao longo de 30 segundos, dando continuidade à agitação por mais 15 segundos, completando um tempo total de mistura de 1 minuto. Passado o tempo total de mistura, 100mL da emulsão foi transferida para um tubo graduado de centrífuga para monitorar a separação de fases e para verificar o tipo de emulsão formada, 5 mL da emulsão foi transferido para erlenmeyers contendo 100 mL de água destilada e outros, 5 mL para um erlenmeyer contendo 100mL de n-parafina. As misturas contidas nos erlenmeyers

foram agitadas manualmente com movimentos rotatórios. O tubo graduado de centrífuga foi levado a um banho termostatzado a 38°C (100°F).

A evolução da quebra de emulsão foi acompanhada pela percentagem da fase aquosa liberada em intervalos de 5 minutos, durante os primeiros 30 minutos. Após mais 30 minutos, foi observado o aspecto da emulsão, a deposição de sedimentos e o aspecto da fase aquosa.

O percentual de separação da fase aquosa foi determinado pela Equação 10.

$$\% \text{ Fase aquosa separada} = \frac{\text{Vol. da fase aquosa liberada}}{\text{Vol. total} - \text{Vol da fase oleosa}} \times 100 \quad (10)$$

Depois de selecionada a melhor razão óleo/fluido teste, pela maior estabilidade de emulsão, fez-se o teste com o biosurfactante (preventor) em diferentes concentrações: 0,1;0,2;0,3 e 0,4% (v/v).

3.13 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE EMULSIFICANTE E A INFLUÊNCIA DA SALINIDADE

3.13.1 Diagrama de fases

Para a obtenção do diagrama de fases, foram realizadas misturas iniciais de tensoativo e fase oleosa, nas seguintes proporções: 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9. Também foi necessária a realização de outras misturas, com diferentes proporções dos componentes, para melhor delimitar as regiões de transição de uma fase para outra.

Cada preparação foi titulada com fase aquosa com o auxílio de uma micropipeta, sob agitação em tubos de ensaio com capacidade adequada. As preparações obtidas foram centrifugadas e mantidas em repouso para observação de eventuais mudanças em suas características.

A cada alíquota de água adicionada foram detectadas visualmente mudanças nas características das diferentes preparações, como transição de sistemas

ópticamente transparentes (sistema microemulsionado) para sistemas contendo separação de fases. Os pontos foram colocados em gráfico (diagrama ternário) para a obtenção do diagrama de fases, sendo as concentrações de cada um dos componentes transformadas em porcentagem.

Representados como triângulos equiláteros, os diagramas de fase construídos mostram tanto a proporção de cada componente utilizado (diagrama de pontos), bem como as regiões de domínio dos diferentes sistemas encontrados (diagrama de linhas). Cada vértice do triângulo corresponde a 100% de cada fase, estando representados no vértice superior o tensoativo, no vértice esquerdo a fase aquosa (FA) e, no direito, a fase oleosa (FO).

Para a leitura das concentrações, em porcentagem, de cada componente em qualquer ponto do diagrama de fases, deve-se seguir a orientação horária, sendo que no eixo oposto ao vértice superior está representada a fase oleosa, no eixo oposto ao vértice esquerdo, o tensoativo, e no eixo oposto ao vértice direito, a fase aquosa.

A Figura 15 representa um modelo de diagrama, no qual na linha contínua lê-se a fase aquosa, na linha pontilhada o tensoativo e na linha tracejada a fase oleosa. O ponto destacado no diagrama é de uma preparação com composição de 30% de fase aquosa, 30% de fase oleosa e 40% de tensoativo.

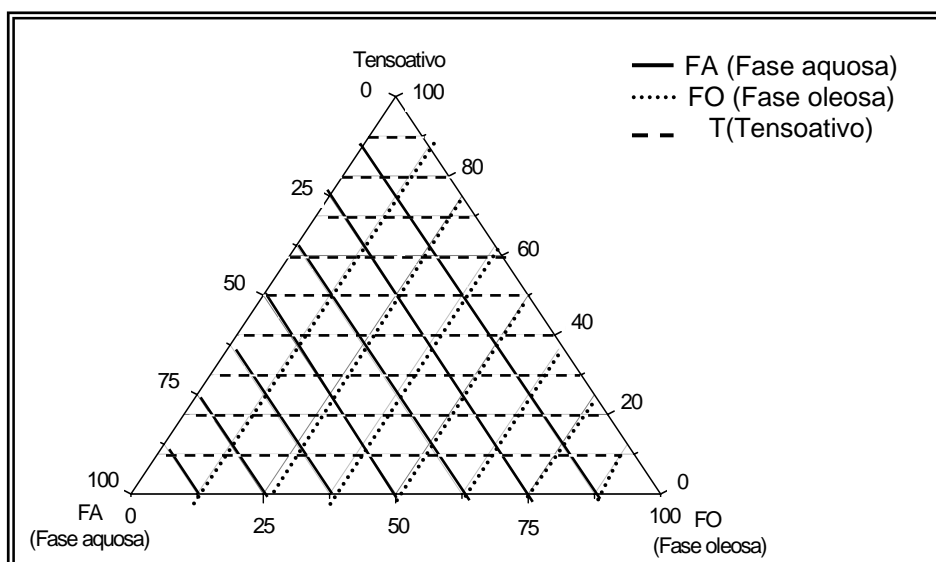


Figura 15 – Modelo de um diagrama de fases.

As regiões delimitadas no diagrama de fases foram sistemas de classificação definido por Winsor em 1948. Essa classificação define os vários equilíbrios existentes entre a microemulsão e as fases aquosa e oleosa, que são:

- Winsor I - É representado pelo equilíbrio entre a fase emulsionada com a fase oleosa em excesso. Por possuir densidade menor que a da emulsão, a fase oleosa posiciona-se acima da emulsão;
- Winsor II - Representa o equilíbrio entre a fase emulsionada e a fase aquosa em excesso. Por possuir densidade menor que a da fase aquosa, a emulsão posiciona-se na parte superior à fase aquosa;
- Winsor III - Existem três fases em equilíbrio, óleo, emulsão e água, em que o óleo é a fase superior, a emulsão a fase intermediária e a água, a fase inferior;
- Winsor IV - É um sistema em que apenas existe a fase microemulsão, isto é, um sistema visualmente monofásico (Winsor, 1948).

3.13.2 Determinação da região de microemulsão

A obtenção das regiões de microemulsão foi feita através da construção dos diagramas de fases, os quais mostram o aparecimento de regiões de aspecto límpido, formado por microgotículas do biodiesel em água destilada. A construção desses diagramas foi realizada à temperatura ambiente de 28° C.

Visando a otimização dos sistemas microemulsionados, foi analisada a razão Cotensoativo/Tensoativo, pois, como mencionado na literatura, quanto menor a razão C/T, menor será a região de microemulsão. A escolha do álcool etílico P.A. como cotensoativo foi feita pela sua solubilidade no biosurfactante e pelo tamanho da sua cadeia hidrocarbônica. As proporções de cotensoativo e tensoativo utilizadas foram 2 e 4.

A influência da salinidade na estabilidade da microemulsão foi observada pela adição da fase aquosa salina com 50 g/L de NaCl.

3.14 MODELO ESTATÍSTICO

Para a determinação das condições experimentais que maximizem o processo de conversão, ou seja, um melhor rendimento mássico relacionado à síntese de ricinoleoil D-glicose, foi realizado um planejamento experimental fatorial com 2 níveis e 4 variáveis e um ponto central escolhido aleatoriamente. As variáveis escolhidas foram: temperatura do sistema reacional, tempo de reação, concentração de enzima, tipo de substrato e razão molar do substrato/D-glicose. Baseado em estudos realizados preliminarmente, a agitação foi mantida constante a 175 rpm e sem adição de água na mistura reacional, pois o seu excesso inativa os biocatalisadores tendo, portanto, uma influência negativa sobre a conversão da D-glicose em Ricinoleato de D-glicose. O intervalo de estudo das variáveis foi determinado de modo a abranger a maioria dos dados relatados na literatura. A Tabela 11 mostra os intervalos de estudo das variáveis nesse trabalho.

TABELA 11 – Intervalo de estudo das variáveis para o planejamento estatístico adotado.

Variáveis	Intervalo de estudo
Temperatura (T)	30 – 60°C
Tempo de reação (tempo)*	3 – 7 dias
Concentração de enzima (Conc. Enz.)	20 – 40 mg/mL
Razão molar do substrato (RM)	2:1 – 4:1 (mol/L)

* ponto central = 5 dias

A matriz experimental utilizada para o planejamento fatorial é mostrada nas Tabelas 12 e 13. Cabe ressaltar que os experimentos foram realizados aleatoriamente e o erro experimental foi obtido através da média e do desvio padrão do último ponto. O uso do planejamento fatorial e a análise estatística permitiram expressar o rendimento do processo utilizando um modelo estatístico, podendo a resposta ser escrita como uma função das variáveis significativas.

TABELA 12 – Planejamento fatorial adotado utilizando o ácido ricinoléico como substrato.

Ensaio	T (°C)	Tempo (dias)	Conc. Enz. (mg/mL)	RM Ac.Ricínoléico/Glicose (mol/L)
1	60	3	20	2
2	30	3	40	2
3	30	3	20	4
4	60	3	40	4
5	60	5	20	4
6	30	5	20	2
7	30	7	20	2
8	60	7	40	2
9	60	7	20	4
10*	30	7	40	4
11*	30	7	40	4
12*	30	7	40	4

* Ensaio realizado para a determinação do erro experimental.

TABELA 13 – Planejamento fatorial adotado utilizando o óleo de mamona como substrato.

Ensaio	T (°C)	Tempo (dias)	Conc. Enz. (mg/mL)	RM Óleo de Mamona/Glicose (mol/L)
1	60	5	20	4
2	30	5	20	2
3	30	3	20	4
4	60	3	40	4
5	60	3	20	2
6	30	3	40	2
7	60	7	20	4
8	30	7	40	4
9	30	7	20	2
10*	60	7	40	2
11*	60	7	40	2
12*	60	7	40	2

* Ensaio realizado para a determinação do erro experimental.

4 Resultados e Discussão

“Certamente Deus é a minha salvação; confiarei e não temerei. O Senhor Deus é a minha força e o meu cântico, ele se tornou a minha Salvação.” Isaías 12:2

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE RMN ^{13}C DO ÁCIDO RICINOLÉICO

Através do espectro de RMN ^{13}C foi possível comprovar a transformação do triglicerídeo em ácido ricinoléico (12-hidroxi-9-octadecenoico) pela presença dos deslocamentos químicos (δ) mostrados na Tabela 14.

TABELA 14 – Deslocamento químico dos carbonos presentes no ácido ricinoléico.

Identificação	Deslocamento químico (δ) (ppm)	Tipo de Carbono
1	179,45	C_0
2	133,33	$\text{CH} (\text{C sp}^2)$
3	125,32	$\text{CH} (\text{C sp}^2)$
4	71,85	$\text{CH} (\text{C sp}^3)$
5	36,83	CH_2
6	35,34	CH_2
7	34,21	CH_2
8	31,99	CH_2
9	29,66	CH_2
10	29,50	CH_2
11	29,25	CH_2
12	29,18	CH_2
13	29,10	CH_2
14	27,48	CH_2
15	25,82	CH_2
16	24,83	CH_2
17	22,78	CH_2
18	14,24	CH_3

A Figura 16 mostra os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do ácido ricinoléico.

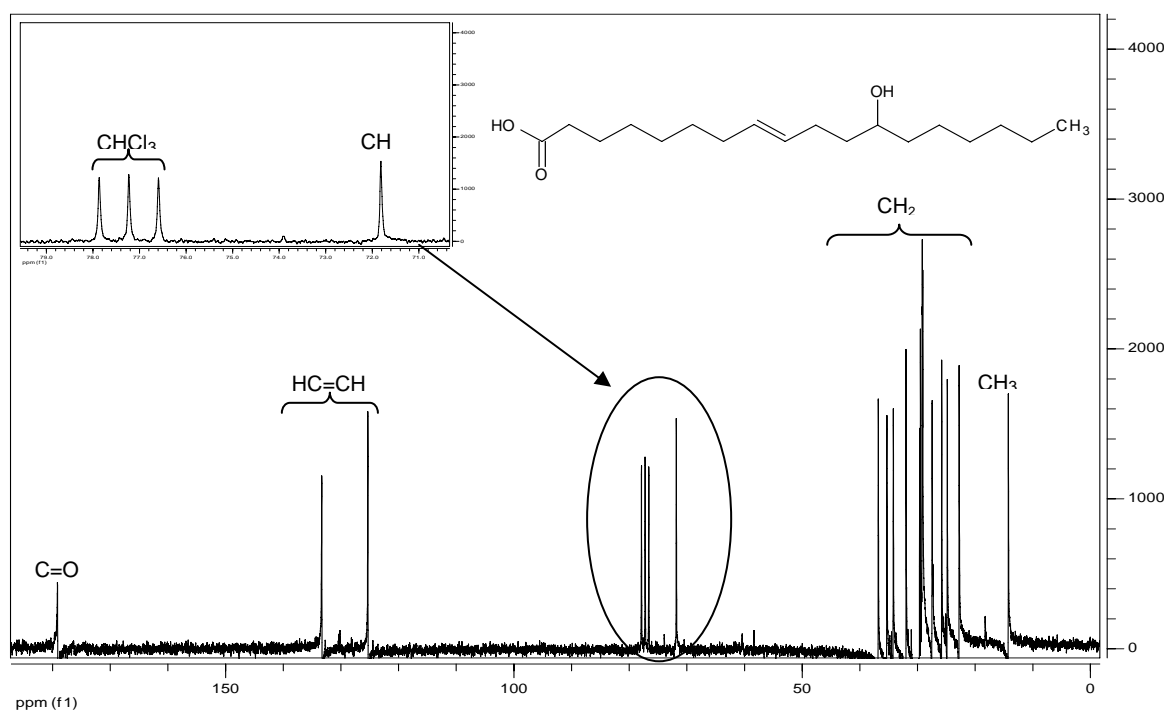


Figura 16 – Espectros de RMN de ^{13}C do ácido ricinoléico.

4.2 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO (FTIR) DO RICINOLEATO DE D-GLICOSE E ÉSTER DE MAMONA

A análise na região do infravermelho médio possibilitou a avaliação qualitativa da conversão da D-glicose em ricinoleato de D-glicoses e éster de mamona através do reconhecimento das bandas de absorção, característico dos principais grupos funcionais presentes no éster.

A Figura 17 mostra os espectros de infravermelho do produto de reação da D-glicose com ácido ricinoléico catalisada pela lipase *Thermomyces lanuginosa* imobilizada (a), lipase *Rhizomucor miehei* imobilizada (b), lipase *Candida antarctica B* (c), protease *Bacillus subtilis* alcalina (d), protease *Bacillus subtilis* neutra (e) e levedura *Saccharomyces cerevisiae* (f).

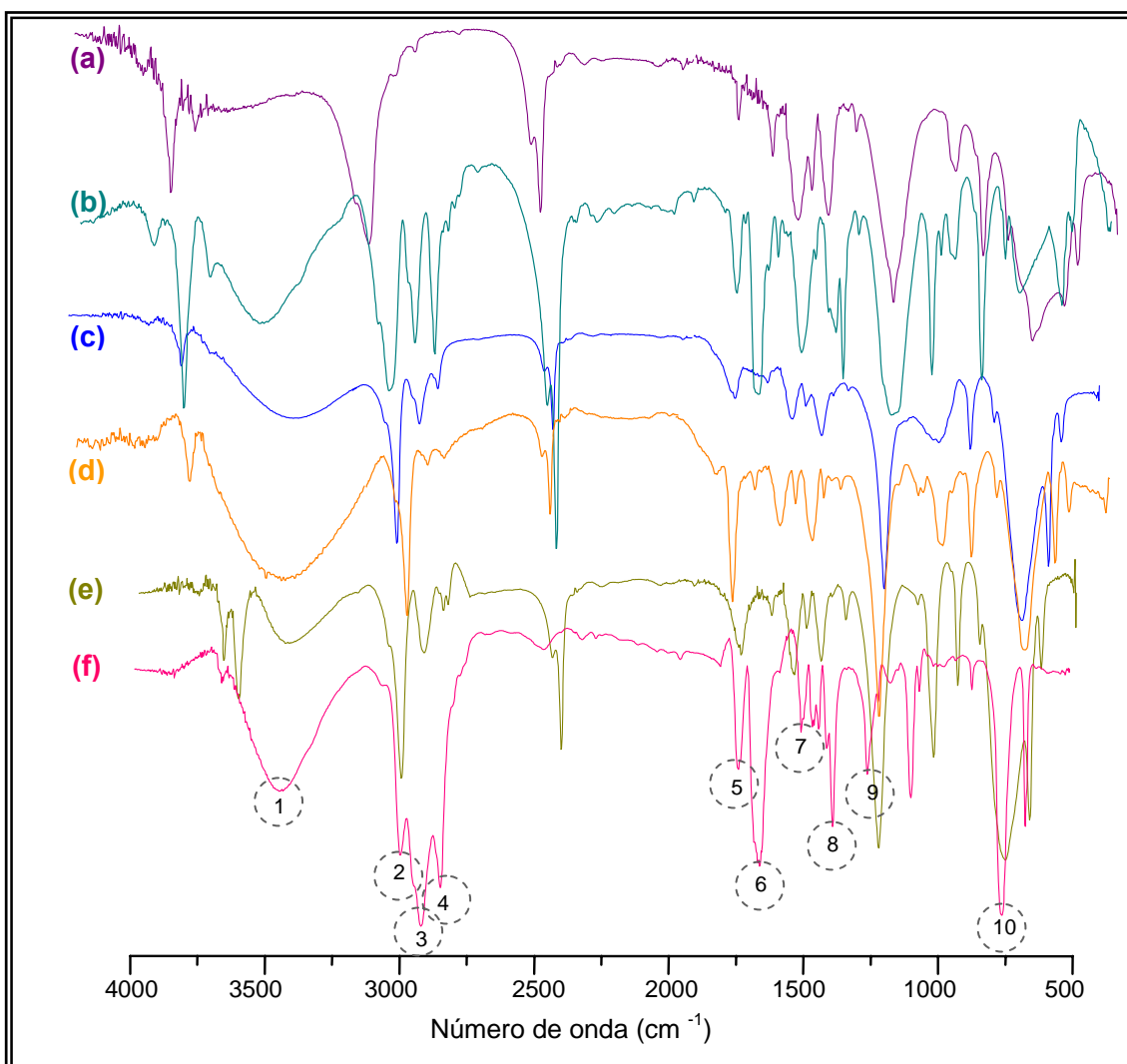


FIGURA 17 – Espectros de infravermelho do ricinoleato de D-glicose catalisado por diferentes biocatalisadores.

As modificações químicas observadas na Figura 17 estão enumeradas e identificadas de 1 a 10 quanto à absorção correspondente aos grupos funcionais, mostrados na Tabela 15.

TABELA 15 – Identificação espectrométrica dos grupos funcionais no infravermelho dos espectros do ricinoleato de D-glicose.

Identificação	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração e o grupo funcional
1	~ 3460	v OH
2	~ 3020	v CH (C sp ²)
3	~ 2930	v CH ₂ (C sp ³)
4	~ 2856	v CH ₃
5	~ 1730	v C=O
6	~ 1600	v C=C
7	~1423	δ C-O-H
8	~ 1220	δ C-O
9	~930	δ O-H
10	~770	δ CH ₂

Os diferentes espectros obtidos numa região de 4000 a 500 cm⁻¹ estão sendo diferenciados de acordo com o tipo de biocatalisador e, suas absorções estão enumeradas de 1 a 10, como ilustrado na Figura 18. A Tabela 16 faz a correlação das absorções correspondentes aos grupos funcionais mostrados na Figura 18.

TABELA 16 – Identificação espectrométrica dos grupos funcionais no infravermelho dos espectros do éster de mamona.

Identificação	Número de onda (cm ⁻¹)	Tipo de Vibração e o grupo funcional
1	~ 3430	v OH
2	~ 3020	v CH (C sp ²)
3	~ 2931	v CH ₂ (C sp ³)
4	~ 2856	v CH ₃
5	~ 1735	v C=O
6	~ 1600	v C=C
7	~1438	δ C-O-H
8	~ 1215	δ C-O
9	~929	δ O-H
10	~756	δ CH ₂

A Figura 18 mostra os espectros de infravermelho da reação da D-glicose com óleo de mamona catalisada pela lipase *Thermomyces lanuginosa* imobilizada (a), lipase *Rhizomucor miehei* imobilizada (b), lipase *Candida antarctica B* (c), protease *Bacillus subtilis* alcalina (d), protease *Bacillus subtilis* neutra (e) e levedura *Saccharomyces cerevisiae* (f).

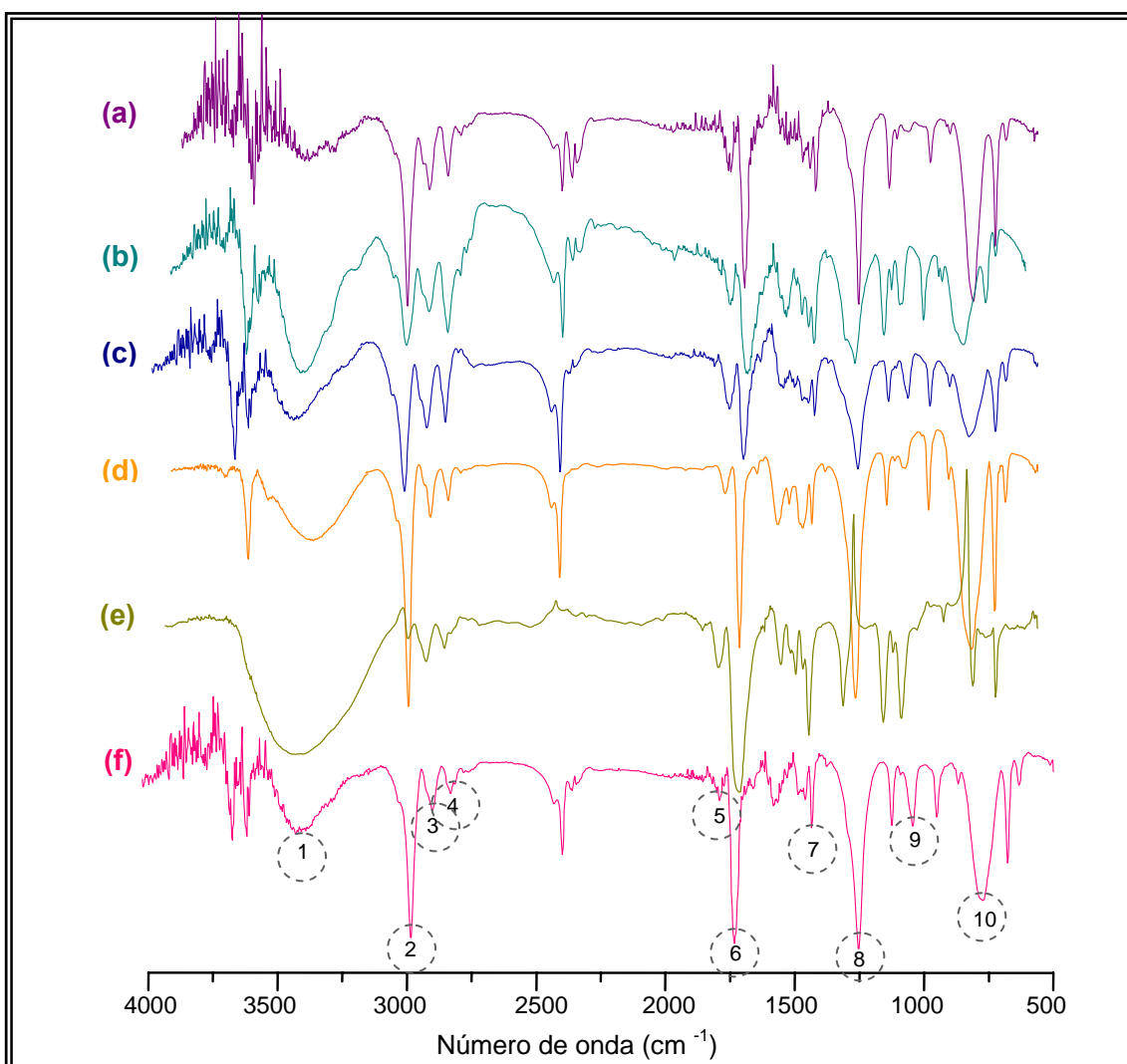


FIGURA 18 – Espectros de Infravermelho do éster de mamona catalisado por diferentes biocatalisadores.

Por se tratar de ésteres derivados do óleo de mamona e do ácido ricinoléico, (um constituinte deste óleo) observam-se no espectro IV, essencialmente, as absorções referentes à carbonila do éster e aos grupos metila, metileno e metínico da cadeia hidrocarbônica do ácido graxo incorporado. As absorções de C–O–H, C–O e

O–H, características do açúcar, também indicam a formação do éster de D-glicose. As análises por CCD realizadas no monitoramento da reação e na purificação do produto adquirido, mostram que um composto menos polar que o açúcar e mais polar que o óleo/ácido ricinoléico foi produzido.

4.3 Determinação da conversão reacional por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para diminuir o erro experimental foi construída uma curva padrão com a D-glicose a partir das seguintes concentrações: 100, 80, 50, 30 e 10%. Em seguida, essas amostras foram solubilizadas em *N,N*-Dimetilformamida P.A, centrifugadas, filtradas e, posteriormente, injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência. Através da redução da área de cada solução analisada (Figura 19), foi construída a curva de consumo da D-glicose, mostrada na Figura 20.

A Tabela 17 exhibe os valores teóricos (calculados) e experimentais (analisados) obtidos pela curva padrão.

TABELA 17 – Dados teóricos e experimentais da D-glicose adquiridos pela análise de cromatografia líquida de alta eficiência.

Concentração teórica da D-glicose (%)	Concentração experimental da D-glicose (%)
100	100,0
80	75,02
50	45,06
30	25,30
10	6,76

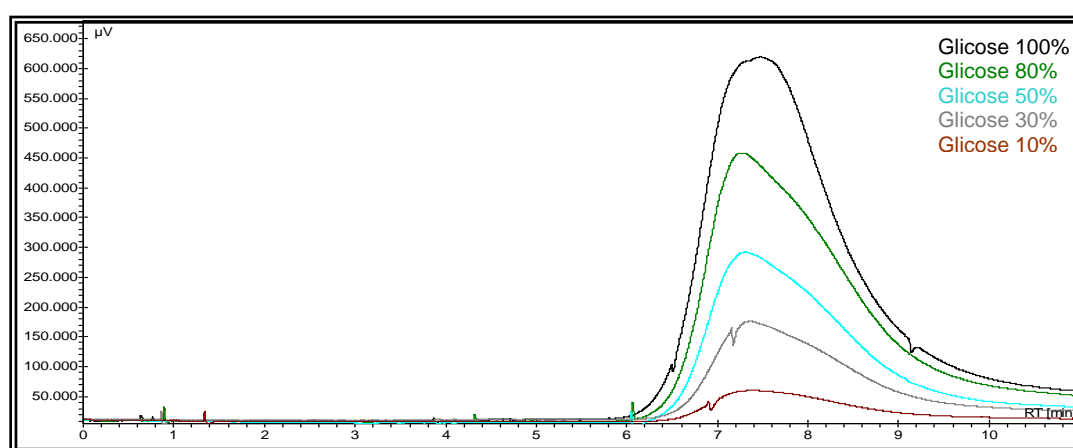


FIGURA 19 – Cromatogramas da D-glicose em diferentes concentrações.

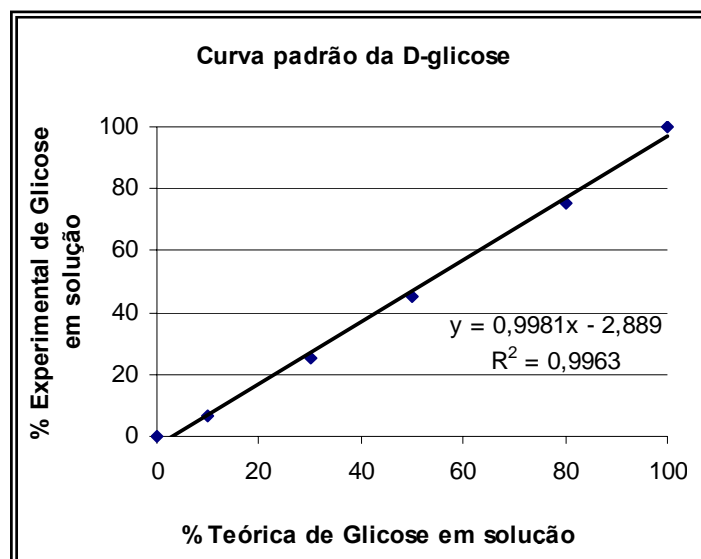


FIGURA 20 – Curva padrão da D-glicose.

A conversão da D-glicose, em ricinoleato de D-glicose e éster de mamona, foram acompanhados pelas análises realizadas no CLAE que possibilitou a comparação da eficiência catalítica de cada enzima utilizada, ilustradas nas Tabelas 18 a 23 e Figuras 21 a 26.

Os resultados destas análises evidenciaram que houve, provavelmente, uma inativação catalítica, que pode ter sido causada por diversos fatores, pois o consumo da D-glicose nos diferentes meios reacionais foi muito baixo.

Na Tabela 18 e Figura 21 pode-se observar que a conversão da D-glicose em ricinoleato de D-glicose foi, em média, 40% superior, à conversão do éster de mamona.

TABELA 18 – Rendimento reacional catalisado pela lipase *Thermomyces lanuginosa* imobilizada.

Tempo de reação (dias)	Conversão (%)	
	Éster de mamona	Ricinoleato de D-glicose
1	0,00	1,03
2	3,90	6,66
4	4,24	17,63
5	6,77	21,77
7	9,73	23,59

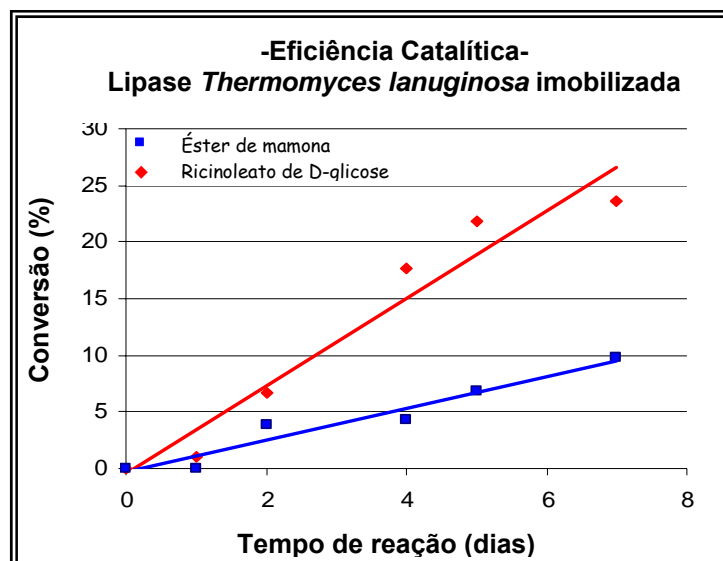


FIGURA 21 – Eficiência catalítica da lipase *Thermomyces lanuginosa* imobilizada.

Na Tabela 19 observa-se que a eficiência catalítica da lipase *Rhizomucor miehei* imobilizada foi gradativa nos dois sistemas reacionais, apesar de que, no meio reacional contendo o óleo de mamona como substrato ter obtido uma conversão máxima de aproximadamente 37%. Pode-se observar esse comportamento catalítico na Figura 22.

TABELA 19 – Rendimento reacional catalisado pela lipase *Rhizomucor miehei* imobilizada.

Tempo de reação (dias)	Conversão (%)	
	Éster de mamona	Ricinoleato de D-glicose
1	0	0
2	26,7	0
4	27,05	18,44
5	36,79	22,15
7	36,92	34,61

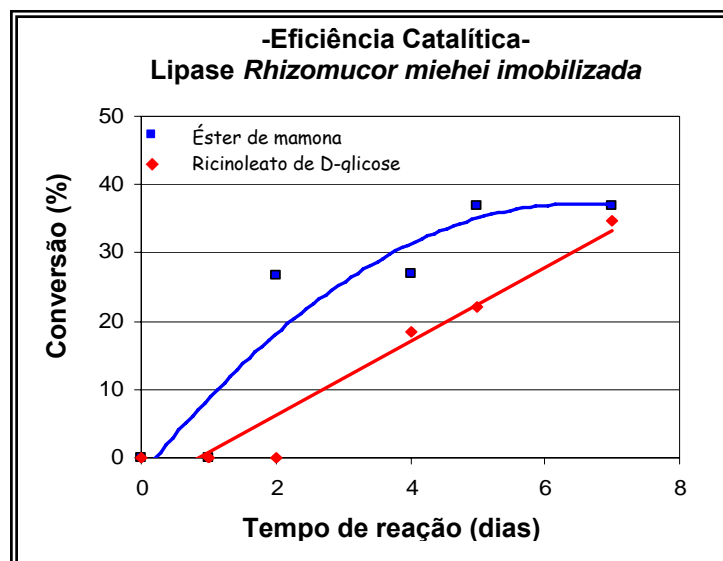


FIGURA 22 – Eficiência catalítica da lipase *Rhizomucor miehei* imobilizada.

A eficiência catalítica da lipase *Candida antarctica B* no substrato ácido ricinoléico foi bem mais evidente, pois a sua conversão de D-glicose foi progressiva nas primeiras 24 horas e tendo um comportamento gradativo posteriormente alcançando uma conversão máxima de 42%. No substrato óleo de mamona também foi progressivo, mas inferior ao ácido ricinoléico. Na Tabela 20 e Figura 23 pode-se observar esse avanço de cada meio reacional.

TABELA 20 – Rendimento reacional catalisado pela lipase *Candida antarctica B*.

Tempo de reação (dias)	Conversão (%)	
	Éster de mamona	Ricinoleato de D-glicose
1	4,97	24,35
2	5,11	38,34
4	19,61	39,41
5	26,08	39,97
7	31,24	42,51

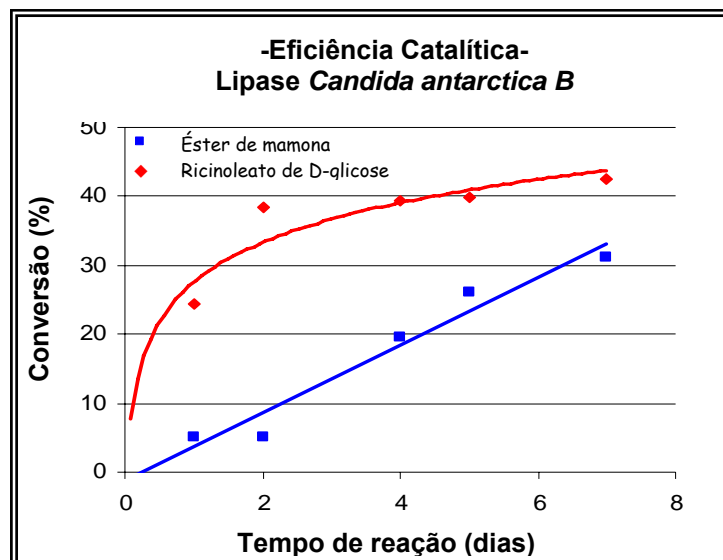


FIGURA 23 – Eficiência catalítica da lipase *Candida antarctica B*.

Na Tabela 21, é possível observar que no meio reacional do substrato óleo de mamona, o catalisador foi bastante eficiente nas primeiras 24h, mas depois se manteve constante até obter uma conversão máxima de 52%. Já com o substrato ácido ricinoléico, a sua eficiência foi gradativa, superando o meio reacional do substrato óleo de mamona com uma conversão máxima de 55%. Na Figura 24 pode-se observar esse avanço gradativo de cada meio reacional.

TABELA 21 – Rendimento reacional catalisado pela protease de *Bacillus subtilis* alcalina.

Tempo de reação (dias)	Conversão (%)	
	Éster de mamona	Ricinoleato de D-glicose
1	34,9	10,15
2	33,26	17,42
4	38,74	19,8
5	42,13	21,61
7	52,15	55,75

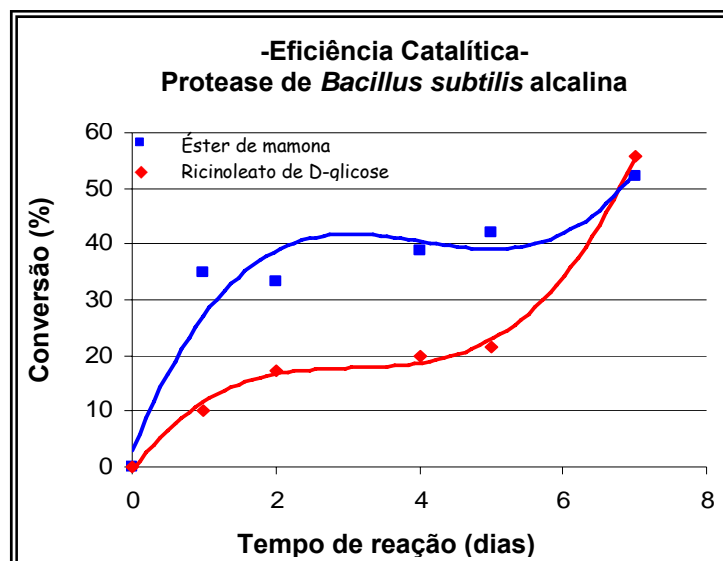


FIGURA 24 – Eficiência catalítica da protease de *Bacillus subtilis* alcalina.

Na Tabela 22, observa-se que a eficiência catalítica foi gradativa nos dois sistemas reacionais, apesar do meio reacional do substrato ácido ricinoléico ter obtido uma conversão máxima de 51%. Na Figura 25 pode-se observar esse comportamento catalítico.

TABELA 22 – Rendimento reacional catalisado pela protease de *Bacillus subtilis* neutra.

Tempo de reação (dias)	Conversão (%)	
	Éster de mamona	Ricinoleato de D-glicose
1	10,07	19,04
2	15,04	26,64
4	21,67	33,95
5	22,73	45,76
7	34,27	51,15

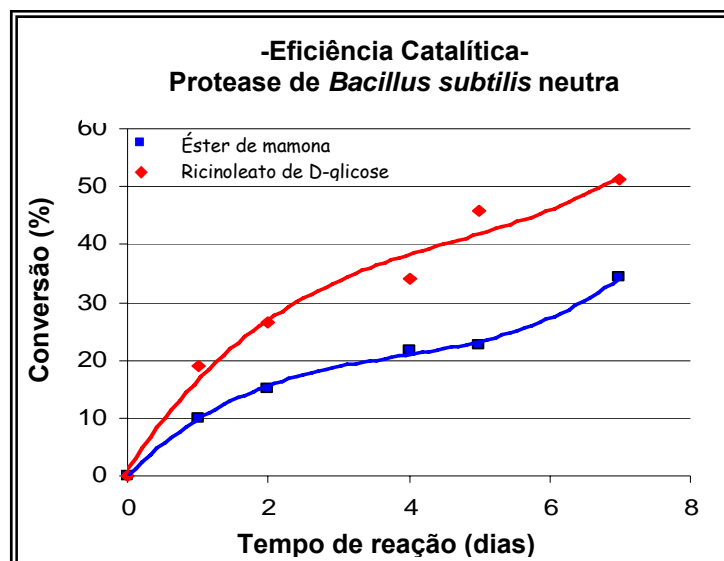


FIGURA 25 – Eficiência catalítica da protease de *Bacillus subtilis* neutra.

As reações catalisadas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos diferentes substratos, apresentaram uma conversão gradual e máxima, de aproximadamente 24%, como mostrada na Tabela 23. A Figura 25 evidencia esse resultado.

TABELA 23 – Rendimento reacional catalisado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Tempo de reação (dias)	Conversão (%)	
	Éster de mamona	Ricinoleato de D-glicose
1	5,87	15,19
2	6,7	15,43
4	10,47	19,07
5	15,99	23,04
7	24,52	24,67

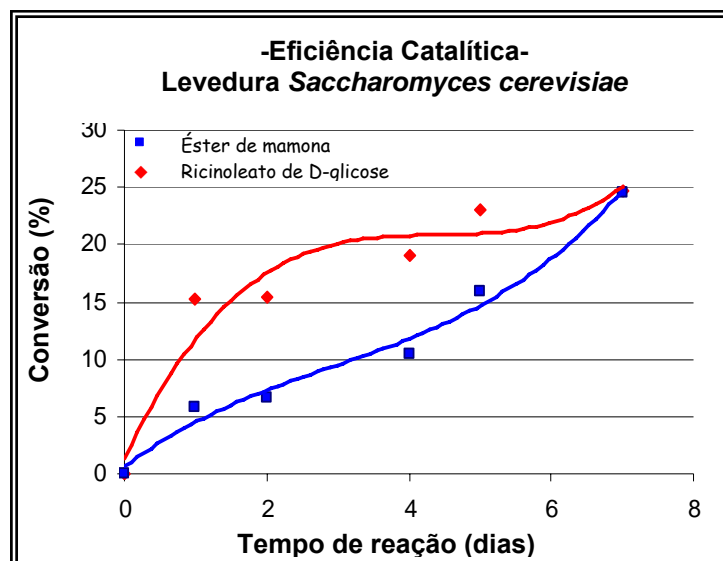


FIGURA 26 – Eficiência catalítica da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

4.4 DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL E DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

Uma das propriedades mais importantes dos tensoativos, ou seja, produto que atuam diretamente nas tensões, é a sua eficiência quanto à redução da tensão, seja ela superficial e/ou interfacial. Essa medida foi realizada pelo método da placa de Wilhelmy, onde foram utilizadas diferentes concentrações do biosurfactante para verificar seu comportamento na solução aquosa em superfície plana, e quantificar o seu ponto crítico de formação de micelas, ou seja, determinar a sua concentração micelar crítica (CMC).

Nas Tabelas 24 a 29 estão descritos as concentrações utilizadas e seus respectivos valores de tensão superficial de cada produto derivado do óleo de mamona e ácido ricinoléico, sintetizados por diferentes enzimas. A concentração micelar crítica de cada produto é mostrada nas Figuras 27 a 32.

A Tabela 24 mostra a eficiência dos produtos sintetizados pela lipase *Thermomyces lanuginosa* imobilizada, a partir do óleo de mamona e do ácido ricinoléico. A tensão superficial da água foi reduzida de 72 mN/m para 43 e 33, respectivamente, quando se utilizou como substrato o óleo de mamona e o ácido ricinoléico. As análises foram realizadas em aproximadamente 20-22°C.

TABELA 24 – Tensão superficial das soluções aquosas dos biosurfactantes catalisados pela lipase *Thermomyces lanuginosa* imobilizada.

Conc. biosurfactante (g/L)	Tensão superficial (mN/m)	
	Éster de mamona	Ricinoleato de D-glicose
12,0	43,58	33,30
10,0	46,24	33,54
8,0	46,26	35,13
5,0	48,88	38,31
2,5	50,86	41,09
1,0	53,00	45,00
0,5	55,29	46,26
0,1	56,74	47,92
0,05	56,47	51,13

O ricinoleato de D-glicose e o éster de mamona apresentaram reduções consideráveis de tensão superficial na água, mas suas CMCs foram consideradas muito elevadas (Figura 27).

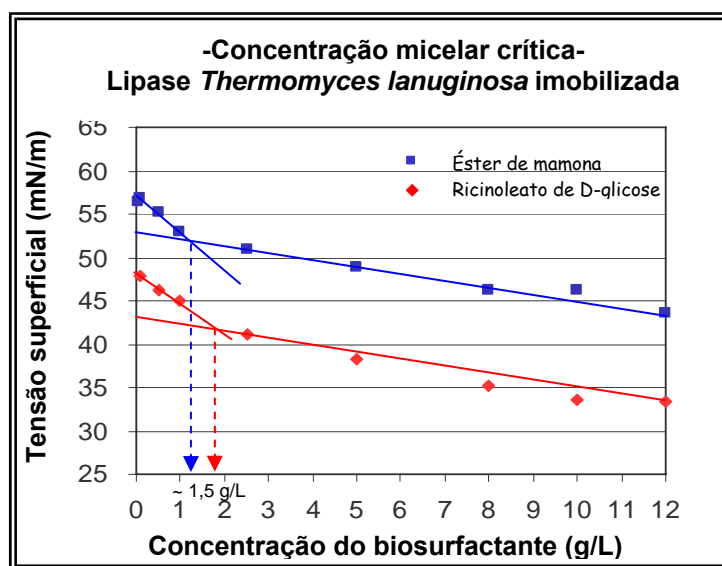


FIGURA 27 – Determinação da CMC do biosurfactante catalisado pela lipase *Thermomyces lanuginosa* imobilizada.

O éster de mamona e o ricinoleato de D-glicose catalisados pela lipase *Rhizomucor miehei* imobilizada demonstraram ser mais eficientes do que as catalisadas pela lipase *Thermomyces lanuginosa* imobilizada, pois os valores obtidos tanto de

tensão superficial da água quanto de concentração micelar crítica foram significativamente maiores como mostram a Tabela 25 e Figura 28.

TABELA 25 – Tensão superficial das soluções aquosas dos biosurfactantes catalisados pela lipase *Rhizomucor miehei* imobilizada.

Conc. biosurfactante (g/L)	Tensão superficial (mN/m)	
	Éster de mamona	Ricinoleato de D-glicose
12,0	38,23	32,53
10,0	40,20	33,17
8,0	41,86	33,98
5,0	44,31	36,14
2,5	45,25	37,07
1,0	49,58	39,47
0,5	50,05	42,8
0,1	52,93	47,91
0,05	53,22	51,47

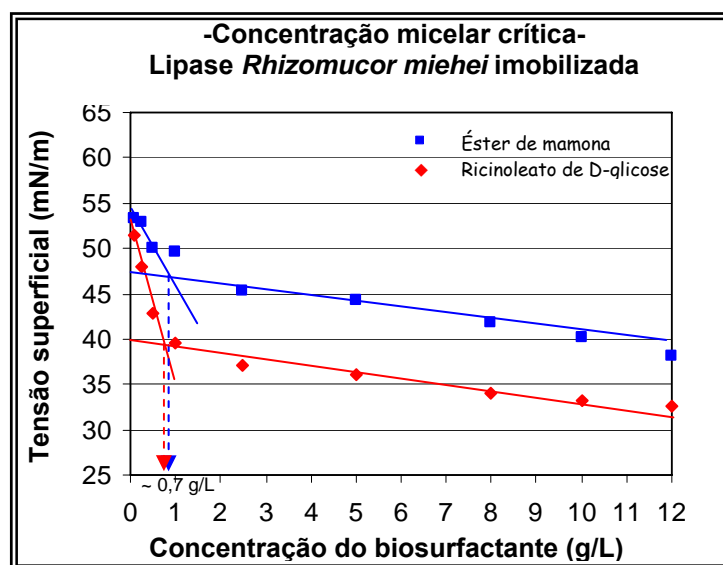


FIGURA 28 – Determinação da CMC dos biosurfactantes catalisados pela lipase *Rhizomucor miehei* imobilizada.

A lipase de *Candida antarctica B* sintetizou produtos muito similares, como evidenciado pelos valores de tensão superficial da água, apresentados na Tabela 26. Entretanto, o ricinoleato de D-glicose atingiu sua estabilidade (CMC) em concentrações menores como mostrado na Figura 29.

TABELA 26 – Tensão superficial das soluções aquosas dos biosurfactantes catalisados pela lipase de *Candida antarctica* B.

Conc. biosurfactante (g/L)	Tensão superficial (mN/m)	
	Éster de mamona	Ricinoleato de D-glicose
12,0	34,59	33,28
10,0	34,32	33,30
8,0	34,99	33,80
5,0	36,40	37,61
2,5	38,71	39,20
1,0	45,47	43,55
0,5	48,94	45,56
0,1	51,70	53,85
0,05	51,93	55,56

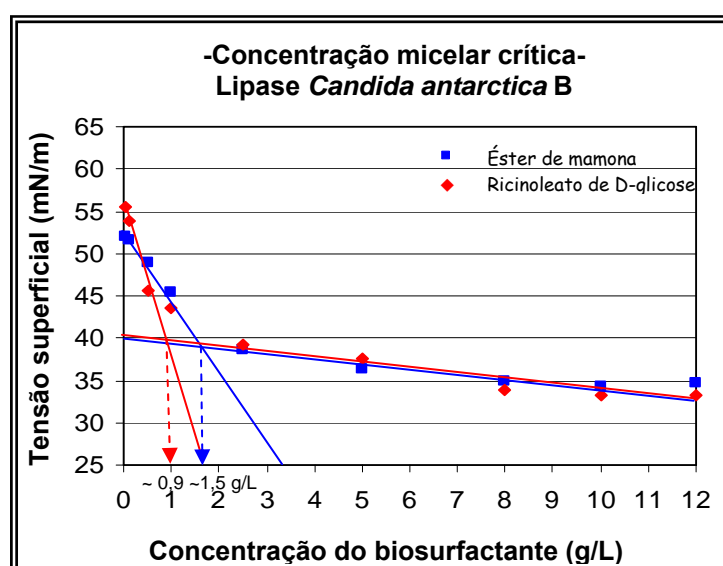


FIGURA 29 – Determinação da CMC dos biosurfactantes catalisados pela lipase de *Candida antarctica* B.

O éster de mamona e o ricinoleato de D-glicose, catalisados pela protease de *Bacillus subtilis* alcalina, apresentaram características muito similares, e foram mais eficazes na redução da tensão superficial da água, que mudou de 72 mN/m para aproximadamente 34 mN/m (Tabela 27). Os valores da concentração micelar crítica foram de, aproximadamente, 0,2 g/L, como mostra a Figura 30.

TABELA 27 – Tensão superficial das soluções aquosas dos biosurfactantes catalisados pela protease de *Bacillus subtilis* alcalina.

Conc. biosurfactante (g/L)	Tensão superficial (mN/m)	
	Éster de mamona	Ricinoleato de D-glicose
12,0	34,07	33,35
10,0	34,25	33,28
8,0	34,55	33,99
5,0	35,66	36,21
2,5	37,03	37,80
1,0	40,17	41,97
0,5	43,46	45,49
0,1	46,09	48,39
0,05	54,14	58,88

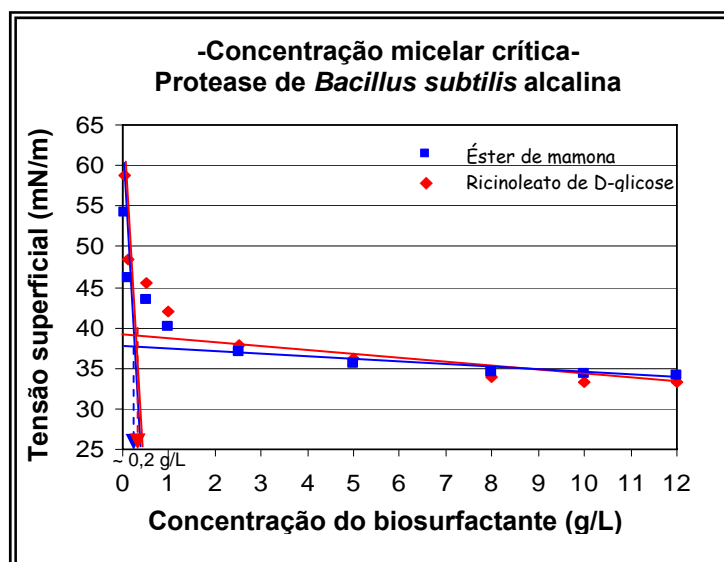


FIGURA 30 – Determinação da CMC dos biosurfactantes catalisados pela protease de *Bacillus subtilis* alcalina.

A Tabela 28 e a Figura 31 apresentam os resultados obtidos a partir da protease de *Bacillus subtilis* neutra. O ricinoleato de D-glicose produzido reduziu mais a tensão superficial da água. Entretanto, a CMC ficou em torno de 0,5 g/L para o ricinoleato de D-glicose e o éster de mamona.

TABELA 28 – Tensão superficial das soluções aquosas dos biosurfactantes catalisados pela protease de *Bacillus subtilis* neutra.

Conc. biosurfactante (g/L)	Tensão superficial (mN/m)	
	Éster de mamona	Ricinoleato de D-glicose
12,0	37,54	34,05
10,0	37,46	34,29
8,0	38,83	35,03
5,0	39,78	37,40
2,5	42,14	38,54
1,0	45,27	41,74
0,5	49,72	45,78
0,1	56,09	49,01
0,05	63,29	55,34

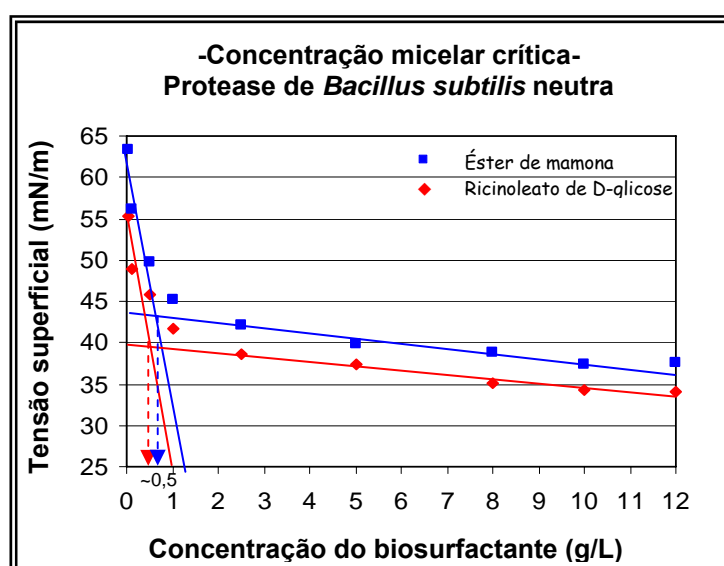


FIGURA 31 – Determinação da CMC dos biosurfactantes catalisados pela protease de *Bacillus subtilis* neutra.

Os biosurfactantes catalisados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e derivados do óleo de mamona e do ácido ricinoléico obtiveram valores de tensão superficial e da concentração micelar crítica muito similares, mas não foram tão eficazes quanto os produtos obtidos pela protease de *Bacillus subtilis* alcalina, pois a tensão superficial mínima da água foi de, aproximadamente, 37mN/m, enquanto que a CMC (concentração micelar crítica) foi de ~ 45 mN/m. A Tabela 29 e a Figura 32 ilustram essas observações.

TABELA 29 – Determinação da tensão superficial das soluções aquosas dos biosurfactantes catalisados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Conc. biosurfactante (g/L)	Tensão superficial (mN/m)	
	Éster de mamona	Ricinoleato de D-glicose
12,0	38,51	36,79
10,0	38,65	36,66
8,0	38,66	36,88
5,0	40,37	38,53
2,5	43,07	40,12
1,0	47,06	43,10
0,5	49,03	45,12
0,1	52,30	47,29
0,05	67,32	59,29

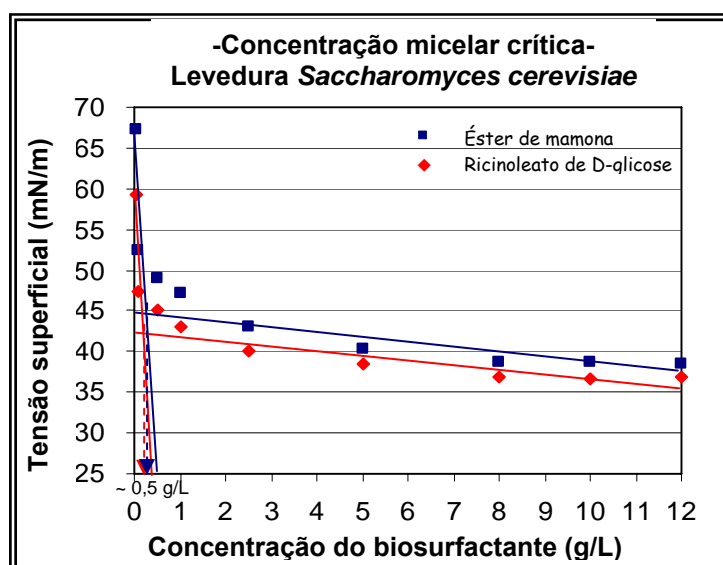


FIGURA 32 – Determinação da CMC dos biosurfactantes catalisados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

4.5 SELETIVIDADE DO BIOCATALISADOR

Com o objetivo de otimizar e selecionar o processo de produção do biosurfactante, foi levado em consideração as taxas de conversão da D-glicose em ricinoleato de D-glicose e éster de mamona catalisados por diferentes enzimas. Os valores obtidos na redução da tensão superficial da água também foram levados em consideração para sabermos se a enzima mais eficiente produziria o biosurfactante mais estável e eficiente.

Esse método de comparação e seletividade do processo foi realizado através do *software* STATISTICA 6.0, tendo como base de dados as Tabelas 18 a 23, referente a conversão da D-glicose em produto, e as Tabelas 24 a 29, referente a redução da tensão superficial.

As Figuras 33 A, B e C relacionam o tempo de reação, a conversão e a atuação das diferentes enzimas com o catalisador.

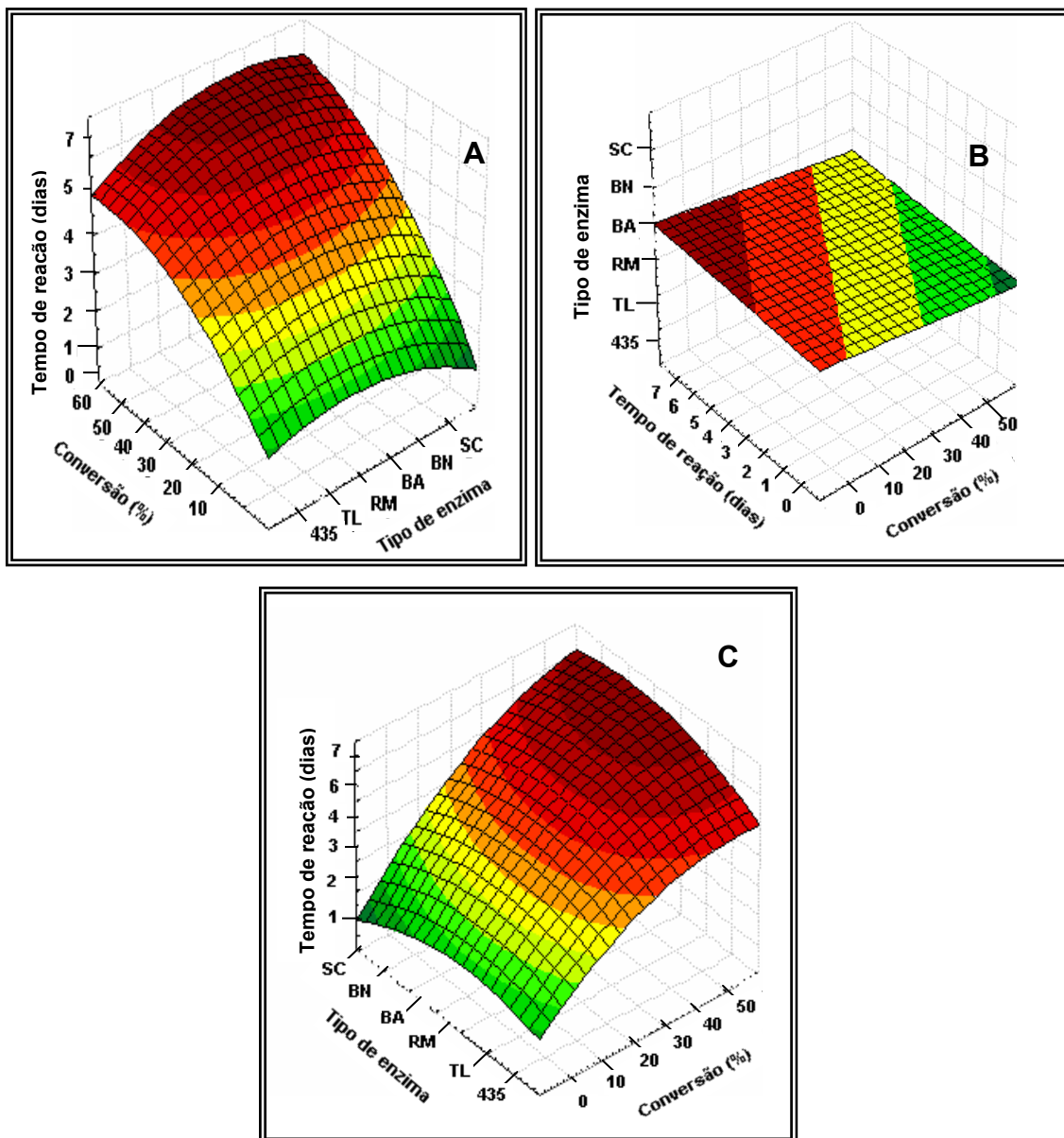


FIGURA 33 – Superfícies de respostas tendo como variáveis o tempo de reação, a conversão e atuação das diferentes enzimas como catalisador.

Essas superfícies de resposta concluem que, para os sete dias de reação, o biocatalisador protease de *Bacillus subtilis* alcalina obteve maior conversão. Partindo desse pressuposto e da concordância dos resultados obtidos acima, a continuação deste trabalho se limitará ao uso da protease de *Bacillus subtilis* alcalina, quanto à caracterização química, física e biológica do biosurfactante sintetizado, visando sua aplicabilidade industrial.

4.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para verificar a influência da temperatura no sistema reacional, tempo de reação, concentração de enzima, tipo de substrato e razão molar do substrato/D-glicose sobre o rendimento do processo, experimentos foram realizados de acordo com um planejamento experimental fatorial 2^{4-1} (2 níveis, 4 variáveis e um planejamento reduzido), conforme descrito na seção 3.14.

A matriz foi gerada por um software específico em otimização de experimentos, MODDE 7.0™, onde utilizou-se combinações estratégicas entre as variáveis através do método dos mínimos quadrados, também conhecido na literatura como MLR (Multiple Linear Regression). Esta combinação de variáveis foi arquitetada de acordo com um modelo fatorial completo (D-Optimal) com 8 experimentos, mais 2 pontos centrais e uma repetição, totalizando 11 ensaios.

A escolha destas condições foi baseada em estudos realizados em laboratório e teve como objetivo alcançar os melhores rendimentos, facilitando as etapas de purificação dos ésteres. A matriz do planejamento experimental desenvolvido nesse trabalho, bem como os resultados obtidos referentes ao rendimento dos respectivos experimentos, foram listados nas Tabelas 30 e 31.

TABELA 30 – Planejamento fatorial adotado utilizando o ácido ricinoléico como substrato.

Ensaio	T (°C)	Tempo(dias)	Conc. Enz.(mg/mL)	RM (mol/L)	Conversão (%)
1(11)	1	-1	-1	-1	12,17
2 (8)	-1	-1	1	-1	6,39
3 (9)	-1	-1	-1	1	6,73
4 (4)	1	-1	1	1	22,29
5(10)	1	0	-1	1	13,63
6 (3)	-1	0	-1	-1	4,63
7 (6)	-1	1	-1	-1	5,61
8 (7)	1	1	1	-1	25,70
9 (5)	1	1	-1	1	18,15
10(2)	-1	1	1	1	12,72
11*(1)	-1	1	1	1	12,49

() ordem de realização dos experimentos;* Ensaio realizados para a determinação do erro experimental.

TABELA 31 – Planejamento fatorial adotado utilizando o óleo de mamona como substrato.

Ensaio	T (°C)	Tempo (dias)	Conc. Enz.(mg/mL)	RM	Conversão
1(11)	1	0	-1	1	7,57
2 (8)	-1	0	-1	-1	5,48
3 (9)	-1	-1	-1	1	2,27
4 (4)	1	-1	1	1	18,35
5(10)	1	-1	-1	-1	18,7
6 (3)	-1	-1	1	-1	9,35
7 (6)	1	1	-1	1	22,73
8 (7)	-1	1	1	1	8,22
9 (5)	-1	1	-1	-1	7,95
10(2)	1	1	1	-1	23,73
11*(1)	1	1	1	-1	22,88

() ordem de realização dos experimentos;* Ensaio realizados para a determinação do erro experimental.

4.6.1 Principais efeitos dos fatores na resposta

De acordo com o valor calculado pelo *software* MODDE 7.0 com um nível de confiança igual a 95%, ficou evidenciado que os efeitos da temperatura, concentração de enzima, tempo e razão molar apresentaram significância estatística, ou seja, o rendimento da reação é favorecido pelo aumento da temperatura (T), tempo de reação

(Tempo), razão molar ácido ricinoléico/glicose (RM) e concentração de enzima (Conc.Enz), como apresentado na Figura 34 (a). Já na Figura 34 (b), esse aumento só é válido para as variáveis temperatura (T), tempo de reação (Tempo) e concentração de enzima (Conc.Enz), pois o aumento da razão molar óleo de mamona/glicose(RM) influencia negativamente na conversão. Entretanto, as suas interações pouco influenciam no processo de síntese do ricinoleato de D-glicose, como ilustrado na Figura 35.

A variável temperatura mostrou uma influência mais significativa em relação à conversão, variável resposta, obtida para o planejamento experimental adotado. Sendo assim, a temperatura foi considerada superior em relação ao efeito da concentração de enzima, tempo e razão molar, sem distinção de processos, utilizando o ácido ricinoléico ou o óleo de mamona como substrato.

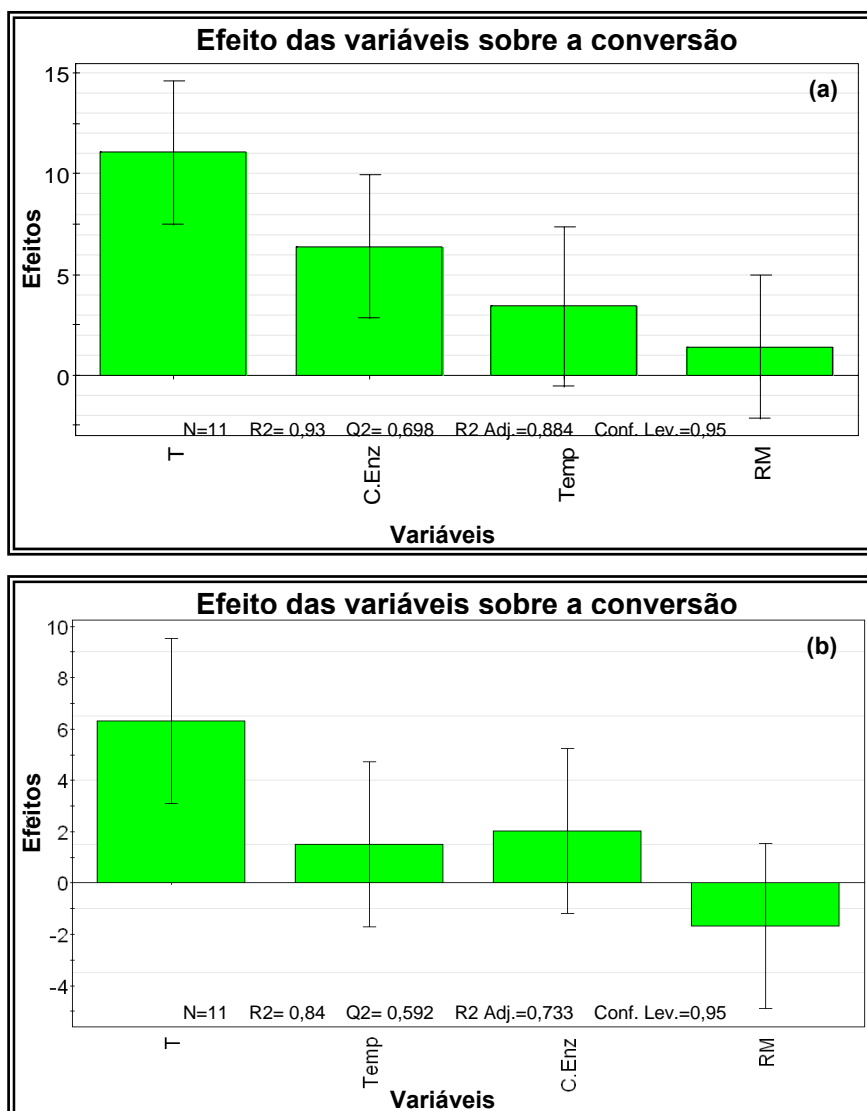


FIGURA 34 – Histograma dos efeitos para o planejamento fatorial 2^{4-1} , utilizando como substrato o ácido ricinoléico (a) e o óleo de mamona (b).

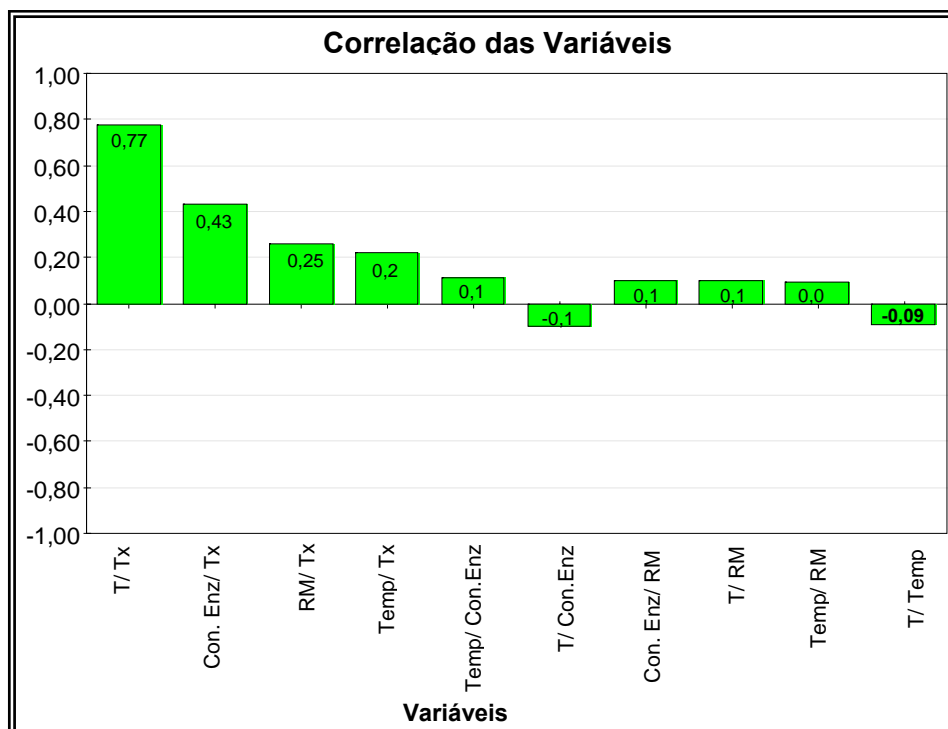


FIGURA 35 – Histograma representativo dos efeitos das variáveis e suas interações para o planejamento fatorial 2^{4-1} , utilizando como substrato o ácido ricinoléico.

A aplicação desse planejamento permite a elaboração de uma equação do rendimento da reação em função da temperatura, concentração de enzima (catalisador), tempo de reação e razão molar (Equação 11).

$$y(x_1, x_2, x_3, x_4) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ijk} x_i x_j x_k + \sum \beta_{ijkl} x_i x_j x_k x_l \quad (11)$$

Levando-se em consideração o nível de significância das variáveis e suas interações, a equação do modelo geral pôde ser simplificada eliminando-se os efeitos que não apresentaram significância estatística. Então, reescrevendo a Equação 11, obteve-se a Equação 12 do modelo simplificado.

$$y(x_1, x_2, x_3, x_4) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 \quad (12)$$

As Figuras 35 e 36 mostram uma interpretação geométrica dos efeitos no planejamento fatorial adotado (2^{4-1}), utilizando como substrato o ácido ricinoléico e o

óleo de mamona. Os efeitos principais são contrastes entre faces opostas, enquanto os efeitos de interação são contrastes entre os planos diagonais.

O modelo geométrico apresentado na Figura 36 mostra que os pontos 4 e 8, nos níveis negativo e positivo da razão molar respectivamente, representam as melhores condições reacionais, podendo ser considerados referências para a otimização do processo. E de acordo com o modelo, a obtenção do biosurfactante pode se tornar viável economicamente quando se utiliza uma menor quantidade de substratos e maior energia, ou menor energia e maior quantidade de substratos.

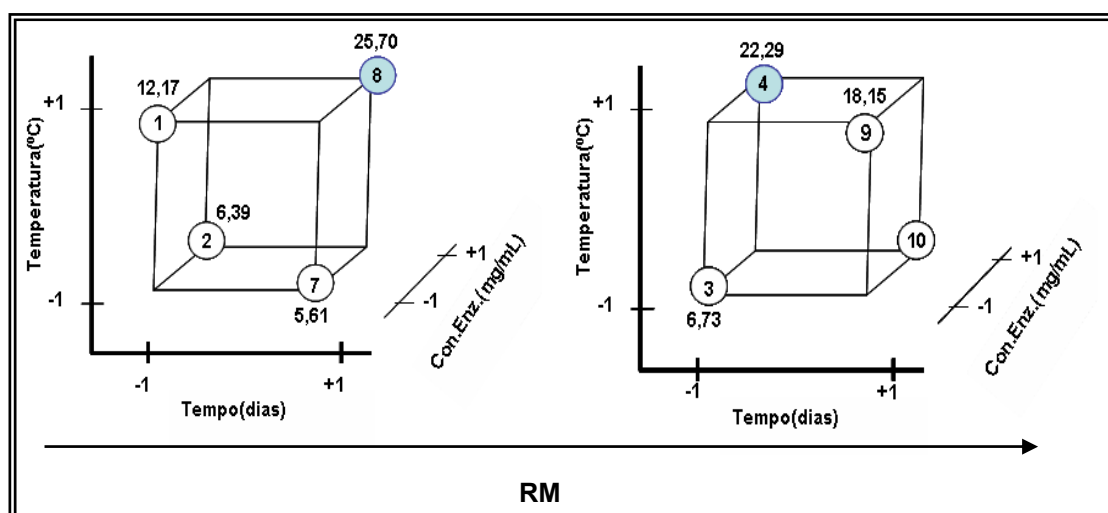


FIGURA 36 – Representação geométrica do planejamento 2^{4-1} , utilizando como substrato o ácido ricinoléico.

E, o modelo geométrico apresentado na Figura 37 mostra que os pontos 7 e 10, nos níveis negativo e positivo da razão molar respectivamente, são as melhores representações reacionais, podendo ser considerados referências para a otimização do processo. No caso do experimento de número 7 (sete) a obtenção do biosurfactante foi favorecida pelo aumento da razão molar, tempo e temperatura, e com a redução da concentração de enzima. No experimento de número 10 (dez), para se obter uma conversão significativa tem-se que trabalhar com os níveis superiores de temperatura, tempo e concentração de enzima e níveis inferiores de razão de substrato.

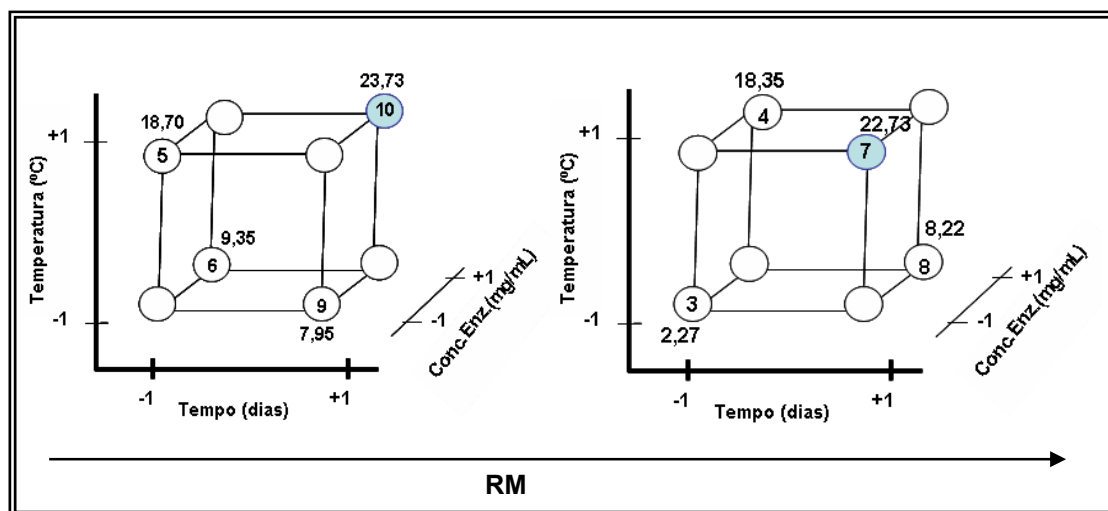


FIGURA 37 – Representação geométrica do planejamento 2^{4-1} , utilizando como substrato o óleo de mamona.

4.6.2 Valores de R2, Q2, Validade do Modelo e Reprodutibilidade

Em Metodologia de Superfície de Resposta, R2 significa a porcentagem da variação da resposta gerada pelo modelo, indicando o quanto este se aproxima dos dados experimentais. Um alto valor de R2 (próximo de 1,0) é condição necessária, mas não suficiente para um bom modelo. Para que este seja bem representativo, ainda são necessárias uma boa reprodutibilidade e uma boa validade do modelo. Q2 é a porcentagem de variação das respostas obtidas numericamente. Valores de Q2 menores que 0,8 indicam que termos insignificantes do modelo devem ser eliminados. Para a Validade do Modelo, valores acima de 0,25 indicam que não existem falhas significantes, ou seja, o erro do modelo é da mesma ordem de grandeza que o erro puro. A Reprodutibilidade é a variação da resposta sob as mesmas condições. Quando a Reprodutibilidade é igual a 1,0, significa que o erro puro é zero, ou seja, para as mesmas condições, os valores das respostas são idênticas.

Para o estudo da síntese do ricinoleato de D-glicose, os valores obtidos foram R2: 0,9301; Q2: 0,6694 Validade do Modelo: 0,2374 e Reprodutibilidade: 0,9994. E para a síntese do éster de mamona, os valores obtidos foram R2: 0,84; Q2: 0,59; Validade do Modelo: 0,42 e Reprodutibilidade: 0,9942. As Figuras 38 e 39 apresentam, graficamente, estes valores.

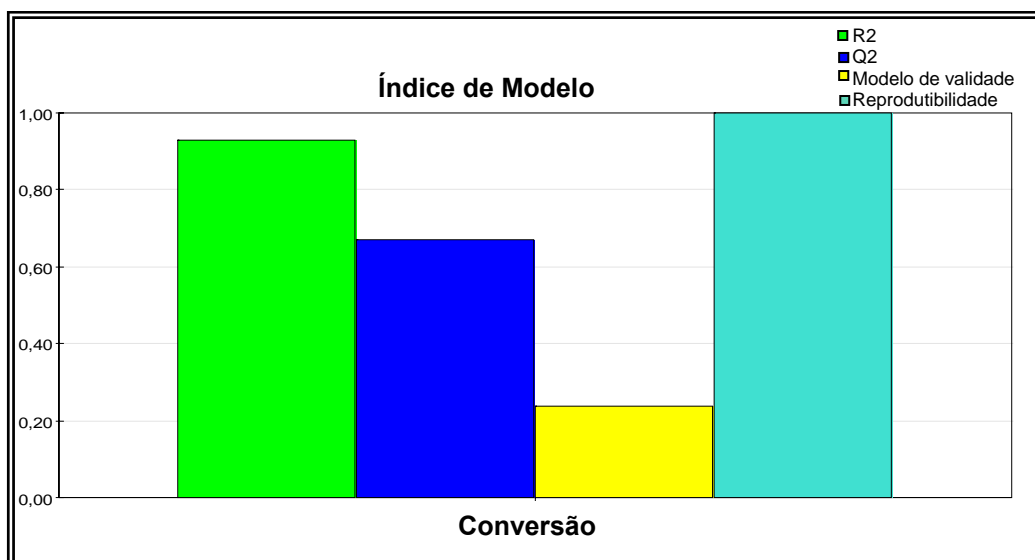


FIGURA 38 – Resumo dos parâmetros para a validade do modelo na otimização de variáveis para a síntese do ricinoleato de D-glicose.

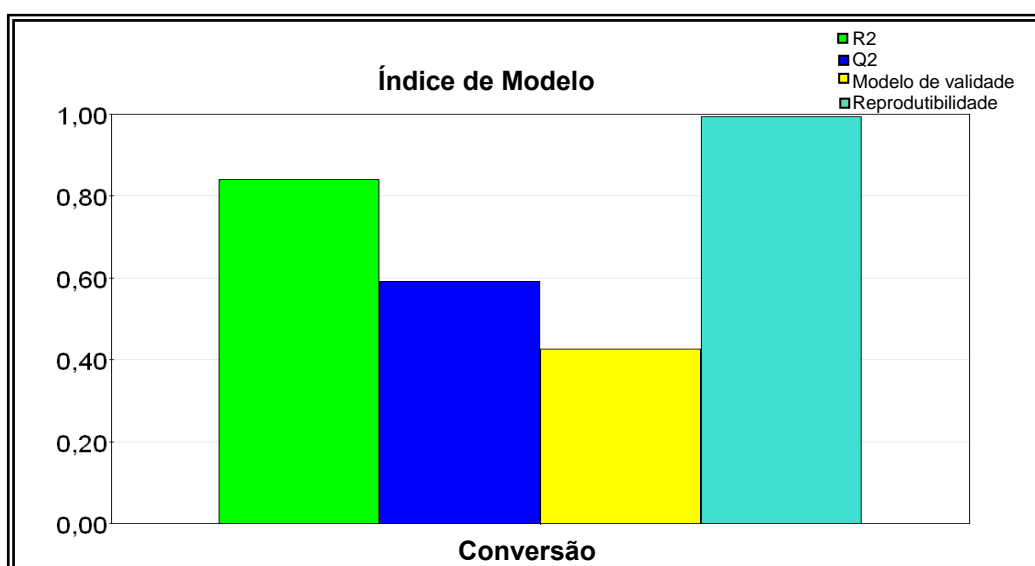


FIGURA 39 – Resumo dos parâmetros para a validade do modelo na otimização de variáveis para a síntese do éster de mamona.

4.6.3 Resultados experimentais versus resultados numéricos

4.6.3.1 Resultados experimentais versus resultados numéricos utilizando como substrato o ácido ricinoléico

A Figura 40 apresenta a comparação entre os resultados experimentais e os resultados numéricos. O valor de R2 foi de 0,9302 e os pontos da curva ficaram próximos à curva de 45°. Isto implica que o modelo representa bem as relações entre os parâmetros reacionais.

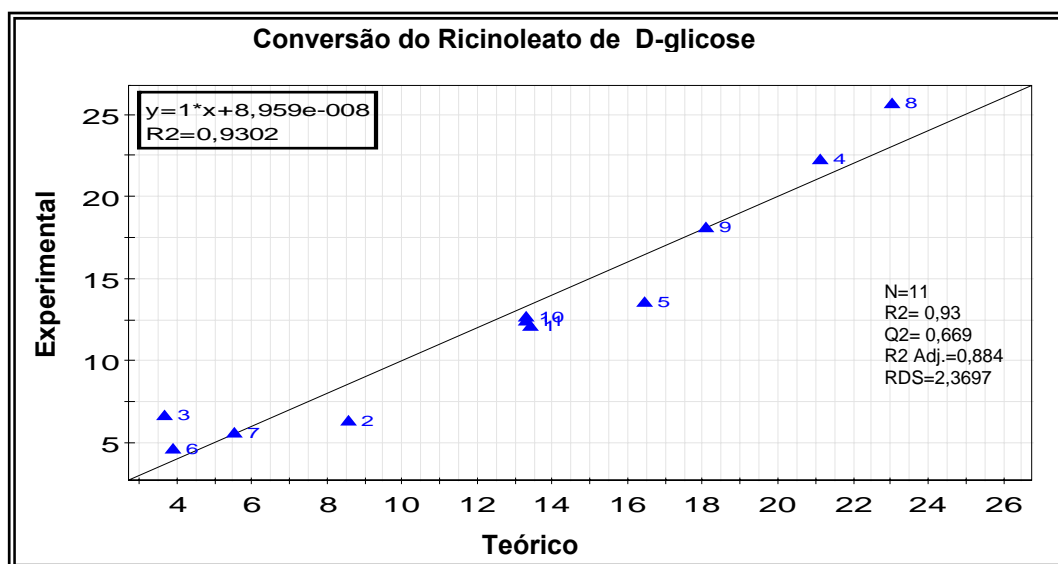


FIGURA 40 – Comparação entre os resultados experimentais e os resultados numéricos do planejamento adotado utilizando como substrato o ácido ricinoléico.

4.6.3.2 Resultados experimentais versus resultados numéricos utilizando como substrato o óleo de mamona

Como o valor de R2 não foi muito satisfatório, fizemos à exclusão dos experimentos de número 1 e 7, onde foi possível observar uma melhora significativa nos valores. Foi feita a reformulação e R2 e Q2 foram reajustados: R2 de 0,992 e Q2 de 0,975, pois os pontos da curva ficaram mais próximos à curva de 45°. Isto implica

que o modelo passou a representar melhor as relações entre os parâmetros reacionais. A Figura 41 apresenta a comparação entre os resultados experimentais e os resultados numéricos.

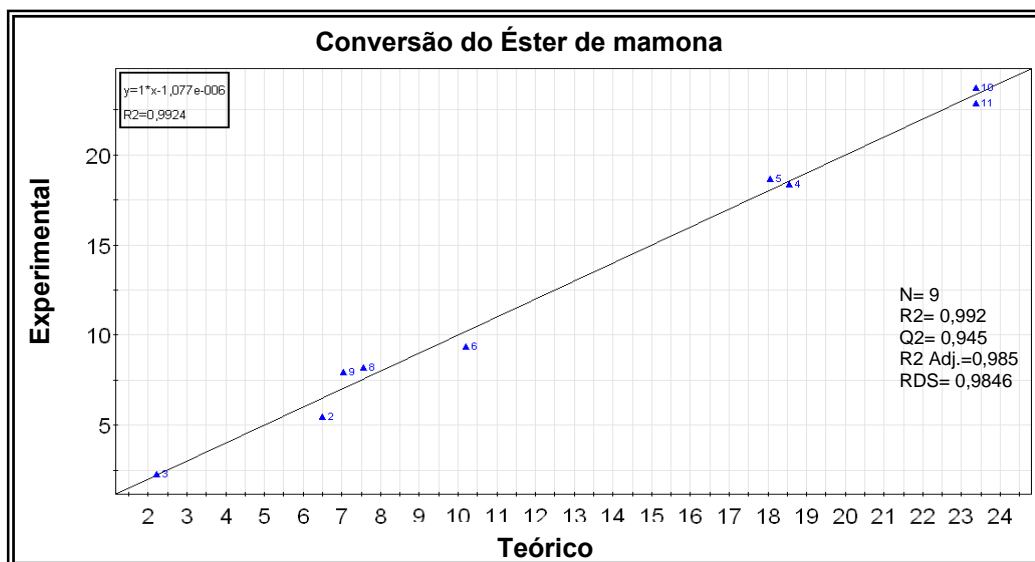


FIGURA 41 – Comparação entre os resultados experimentais e os resultados numéricos do planejamento adotado utilizando como substrato o óleo de mamona.

4.6.4 Superfície de resposta

Para uma melhor observação da influência das variáveis do planejamento utilizando o ácido ricinoléico como substrato, foram feitas superfícies de respostas mantendo-se constante o tempo e a concentração de enzima em seus níveis superiores (Figuras 42 e 43); razão molar e a concentração de enzima (Figura 44) e o tempo e temperatura (Figura 45).

Na Figura 42 pode-se observar que a interação dos efeitos razão molar ácido ricinoléico/ D-glicose e da temperatura parece influenciar o processo, pois a conversão máxima ocorreu a nível constante. Já no efeito da temperatura, a influência ocorreu em seu nível superior.

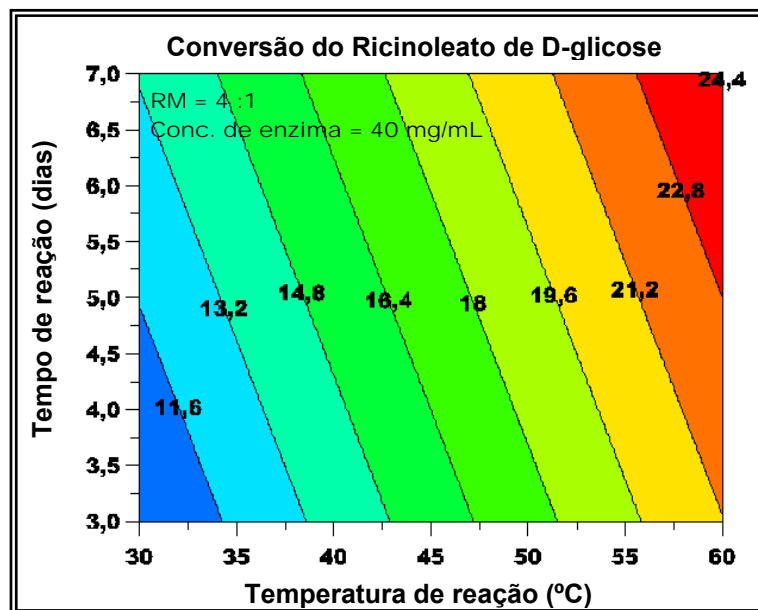


FIGURA 44 – Conversão de D-glicose em ricinoleato de D-glicose, em função do aumento do tempo e da temperatura de reação.

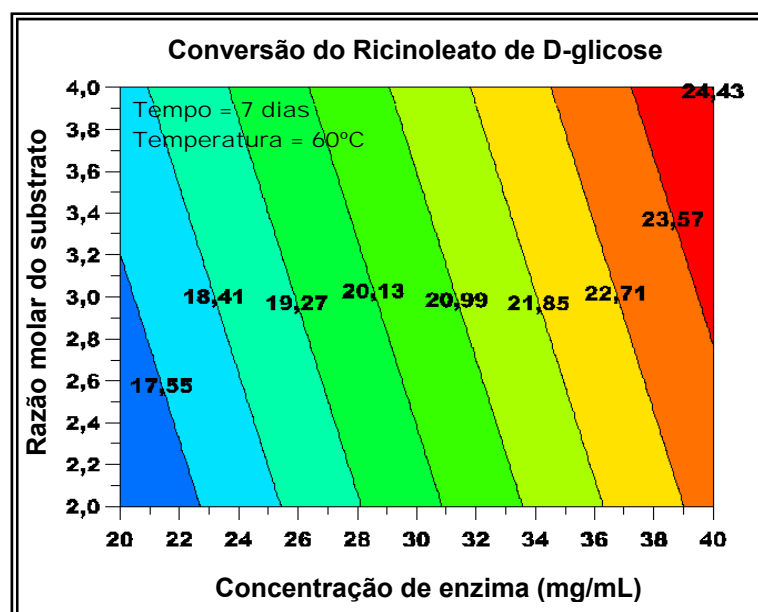


FIGURA 45 – Conversão de D-glicose em ricinoleato de D-glicose, em função do aumento da razão molar do substrato e da concentração de enzima.

As Figuras 46 a 50 mostram a influência das variáveis do planejamento utilizando o óleo de mamona como substrato, no qual, foram feitas superfícies de respostas mantendo-se constante a temperatura e a concentração de enzima em seus níveis superiores para as Figuras 46 e 47, razão molar e a concentração de enzima na Figura 48 e tempo e razão molar na Figura 49 e 50.

As Figuras 46 e 47 ilustram a influência negativa da razão molar sobre a temperatura e o tempo de reação, ou seja, quanto maior for a razão molar menor será a conversão da D-glicose em éster de mamona.

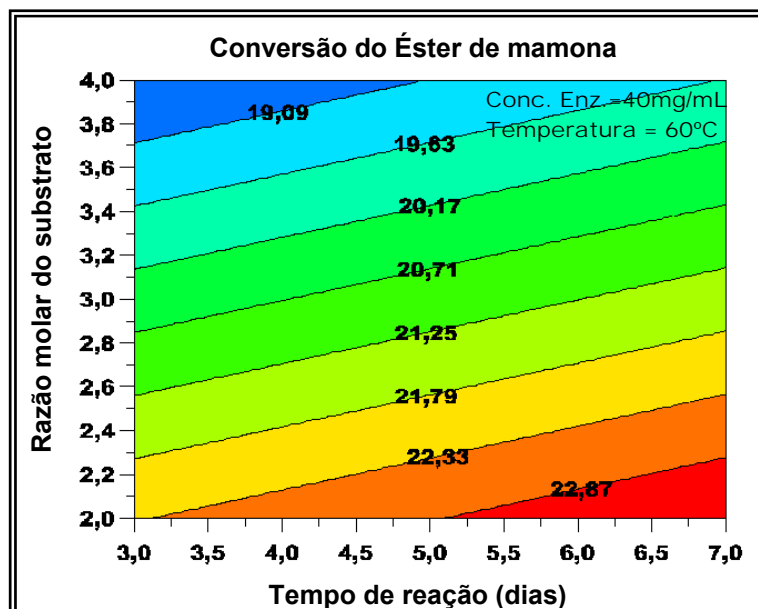


FIGURA 46 – Conversão de D-glicose em éster de mamona, em função do aumento da razão molar do substrato e o tempo de reação.

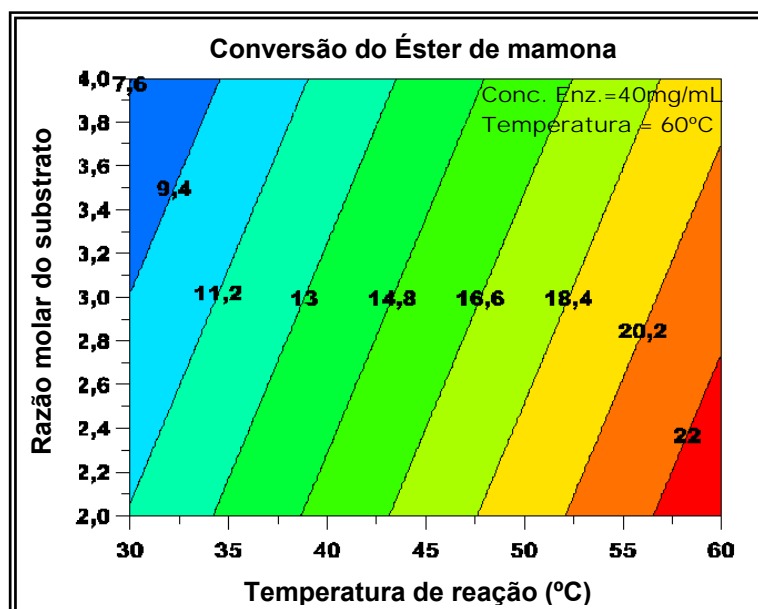


FIGURA 47 – Conversão de D-glicose em éster de mamona, em função do aumento da razão molar e temperatura de reação.

A Figura 48 mostra que em um sistema reacional utilizando a concentração de enzima igual a 40 mg/mL e uma razão molar óleo de mamona/ D-glicose igual a 4, o tempo de reação não tem influência sobre a temperatura, pois no nível superior da temperatura, a influência do tempo, permaneceu constante.

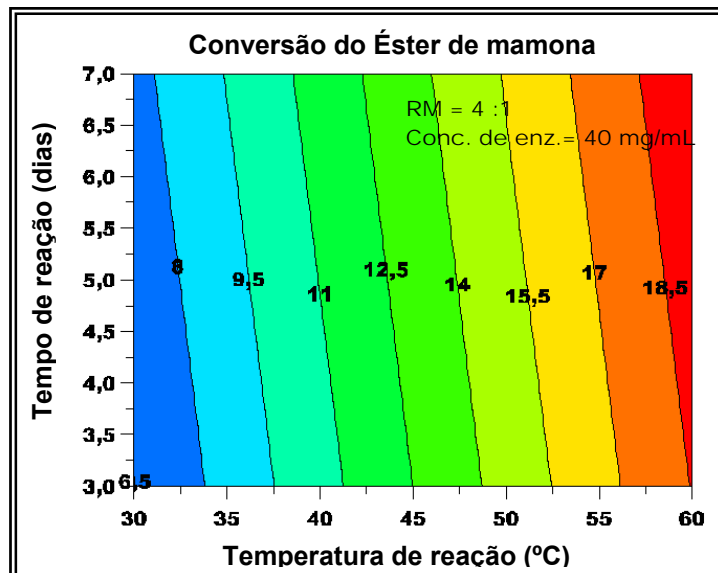


FIGURA 48 – Conversão de D-glicose em éster de mamona, em função do aumento do tempo e da temperatura de reação.

As Figuras 49 e 50 evidenciam a influência da concentração de enzima, temperatura e tempo, confirmando as observações feitas na Figura 34 (b), pois, como essas variáveis sofrem influência da mesma ordem de grandeza, a sua maior eficiência sobre a conversão acontece em seus níveis superiores.

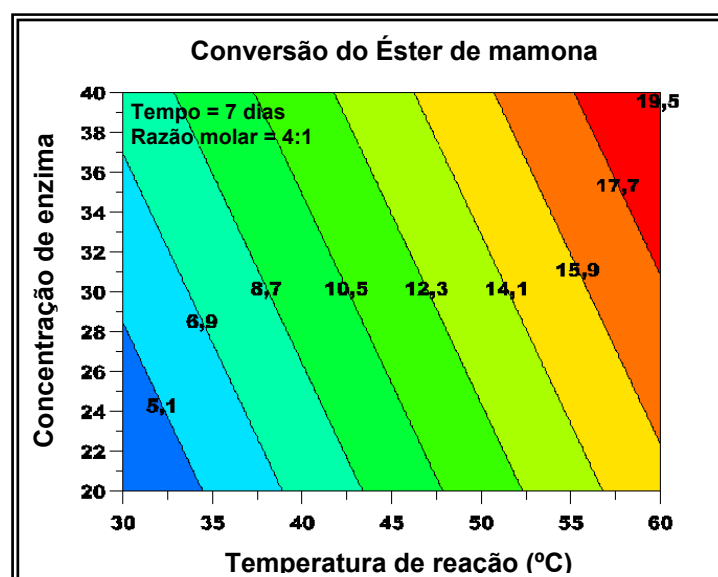


FIGURA 49 – Conversão de D-glicose em éster de mamona, em função do aumento da concentração de enzima e temperatura de reação.

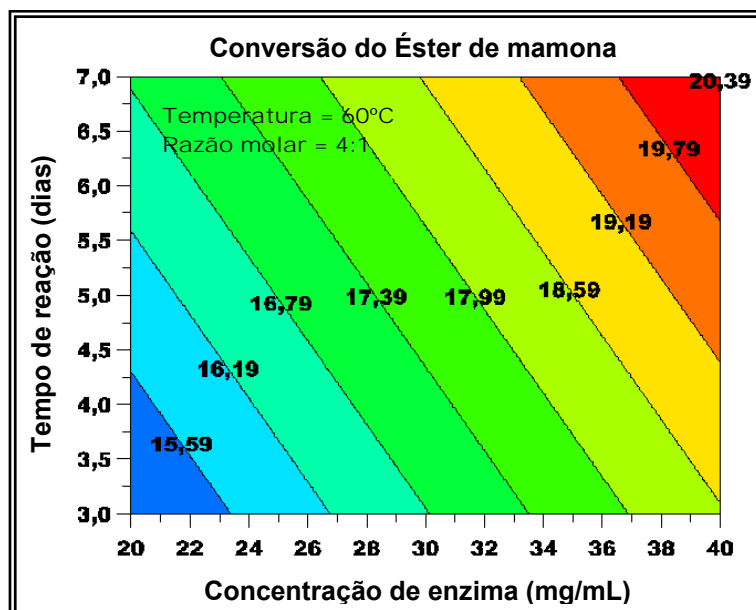


FIGURA 50 – Conversão de D-glicose em éster de mamona, em função do aumento da concentração de enzima e tempo de reação.

4.7 INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC).

Com o intuito de verificar a estabilidade do biosurfactante em diferentes concentrações de sal, foram preparados soluções dos biosurfactantes contendo NaCl na faixa de 0 – 115 g/L como descrito na seção 3.8.1.

O ricinoleato de D-glicose, se mostrou estável tanto na solubilidade em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl), pois sua solubilização foi completa, quanto a efetividade na redução da tensão superficial da solução salina, pois o resultado foi coerente com o branco (solução salina sem o biosurfactante). A Tabela 32 mostra as diferentes concentrações do biosurfactante utilizados e os respectivos valores de tensão superficial da solução salina.

TABELA 32 – Tensão superficial do ricinoleato de D-glicose em diferentes concentrações de NaCl.

Concentração do biosurfactante (g/L)	Tensão superficial (mN/m)			
	Concentração de NaCl (g/L)			
	0	50	72	115
12,0	33,35	29,10	28,40	30,54
10,0	33,28	28,94	28,40	30,39
8,00	33,99	29,14	28,42	30,32
5,00	36,21	28,90	28,48	29,87
2,50	37,80	30,03	28,99	30,04
1,00	41,97	32,85	30,03	31,94
0,50	45,49	39,38	30,82	34,90
0,10	48,39	48,89	39,18	41,23
0,05	58,88	57,49	40,78	43,19
0,00	72,94	60,30	52,90	52,96

Através da Figura 51 é possível observarmos que apesar de ter ocorrido uma redução na tensão superficial devido à salinidade, a concentração micelar crítica (CMC) permaneceu constante em todas as salinidades. Evidenciando mais uma vez a estabilidade do biosurfactante em solução salina.

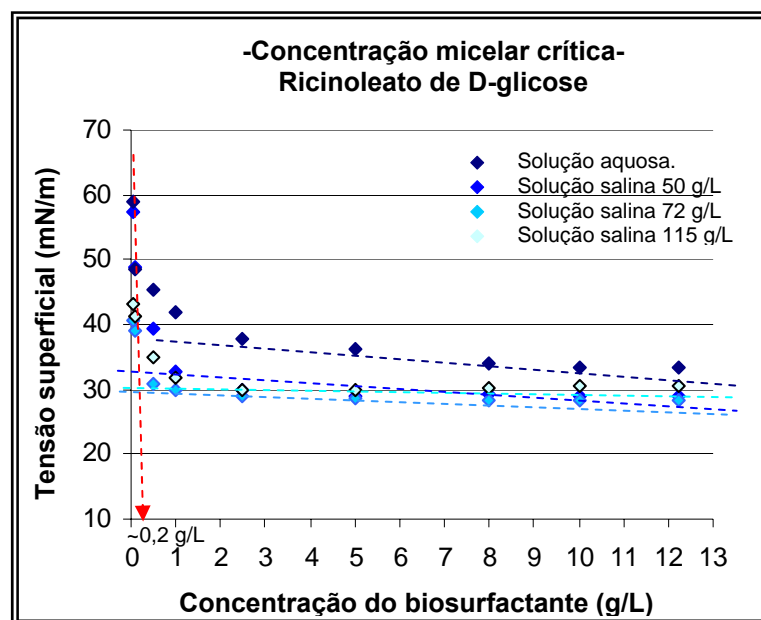


FIGURA 51 – Determinação da CMC do ricinoleato de D-glicose em diferentes concentrações de NaCl.

A Tabela 33 mostra que quanto maior a salinidade da água menor será sua tensão superficial. Esse comportamento também pode ser observado para a solução salina do biosurfactante, até uma determinada concentração de sal, pois quando a mesma se torna saturada, seu comportamento é invertido, ou seja, a proporcionalidade da tensão superficial com a concentração de sal só é possível até o seu limite de saturação, que ocorreu a 115 g/L de NaCl.

TABELA 33 – Influência do ricinoleato de D-glicose na tensão superficial da solução salina.

Conc. NaCl (g/L)	Tensão superficial da solução salina (mN/m)	
	Sem biosurfactante	Com biosurfactante
0	72,94	33,28
50	60,29	29,10
72	52,89	28,40
115	52,95	30,54

Através da Figura 52, pode-se observar e avaliar o comportamento do biosurfactante em várias concentrações de sal. Comparando a estabilidade da solução salina sem o biosurfactante, através das linhas de tendência, e os valores obtidos da regressão linear, pode-se concluir que o biosurfactante em solução salina se comportou mais adequadamente, devido a sua regressão linear ter se aproximado do valor ótimo.

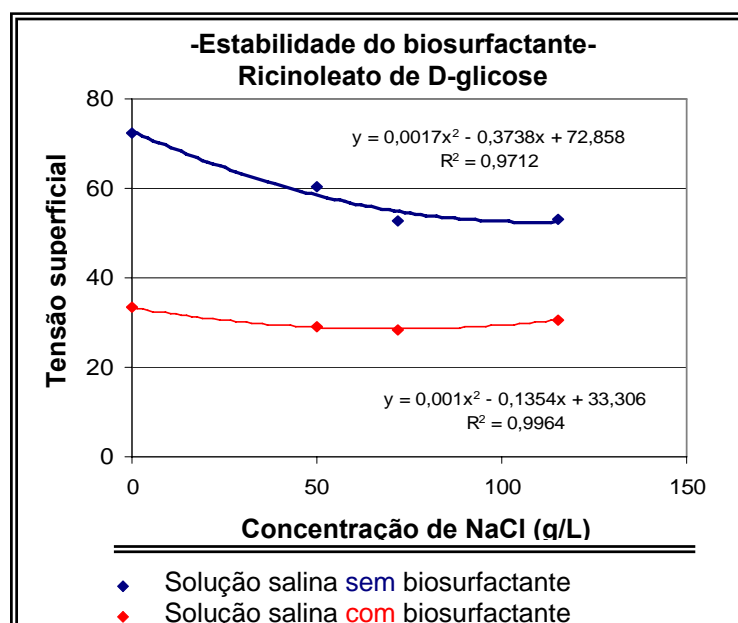


FIGURA 52 – Determinação da estabilidade do ricinoleato de D-Glicose em diferentes concentrações de NaCl.

O éster de mamona também se mostrou estável tanto na solubilidade em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl), quanto na redução da tensão superficial da solução salina, sendo o resultado coerente com os valores obtidos na solução salina sem o biosurfactante. A Tabela 34 mostra as diferentes concentrações do éster de mamona com suas respectivas análises de tensão superficial.

TABELA 34 – Tensão superficial éster de mamona em diferentes concentrações de NaCl.

Concentração do biosurfactante (g/L)	Tensão superficial (mN/m)			
	Concentração de NaCl (g/L)			
	0	50	72	115
12,0	34,27	31,24	31,74	29,43
10,0	34,25	31,19	31,87	29,59
8,00	34,55	31,65	32,54	29,53
5,00	35,66	32,47	33,11	29,91
2,50	37,03	33,10	36,27	29,81
1,00	40,17	35,29	39,97	32,55
0,50	43,46	39,00	46,31	33,79
0,10	54,14	51,76	46,69	41,06
0,05	59,48	58,37	48,37	43,79
0,00	72,34	60,05	52,89	52,96

O comportamento observado na Figura 53 foi diferente do observado na Figura 51, pois além de ter ocorrido uma redução na tensão superficial devido a altas concentrações de sal, a concentração micelar crítica (CMC) variou de 0,5 a 1,0 g/L.

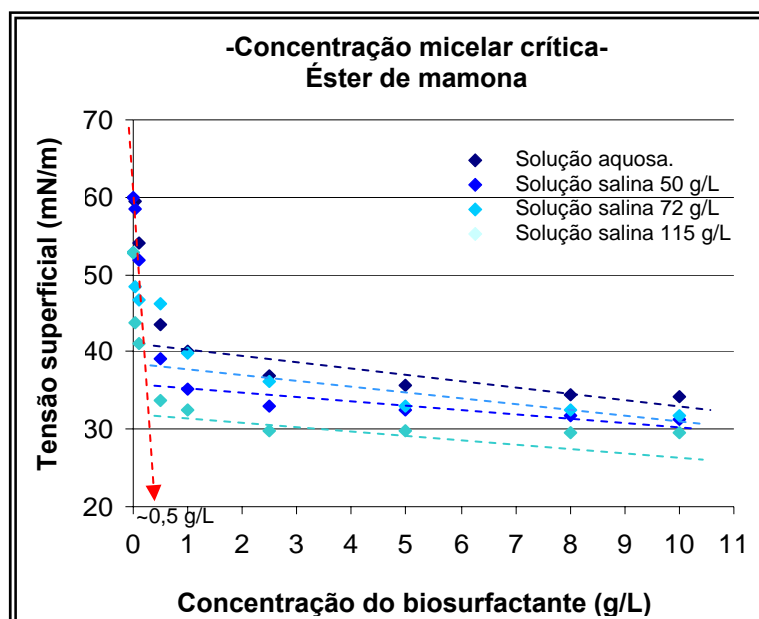


FIGURA 53 – Determinação da CMC do éster de mamona em diferentes concentrações de NaCl.

Com a Tabela 35 foi possível observar que a saturação do éster de mamona ocorre, provavelmente, em concentrações maiores que 115 g/L, pois os valores obtidos através das análises de tensão superficial da solução salina foram decrescentes, sem apresentar mudança brusca de comportamento, ou seja, quanto maior a concentração de sal, menor foi a tensão superficial, indicando que a saturação da solução ainda não foi atingida.

TABELA 35 – Influência do éster de mamona na tensão superficial da solução salina.

Conc. NaCl (g/L)	Tensão superficial da água salina (mN/m)	
	Sem biosurfactante	Com biosurfactante
0	72,34	34,27
50	60,05	31,24
72	52,89	31,74
115	52,96	29,43

O éster de mamona apresentou pouca variação da tensão superficial com o aumento da concentração de sal (Figura 54), possuindo, assim, uma estabilidade muito boa.

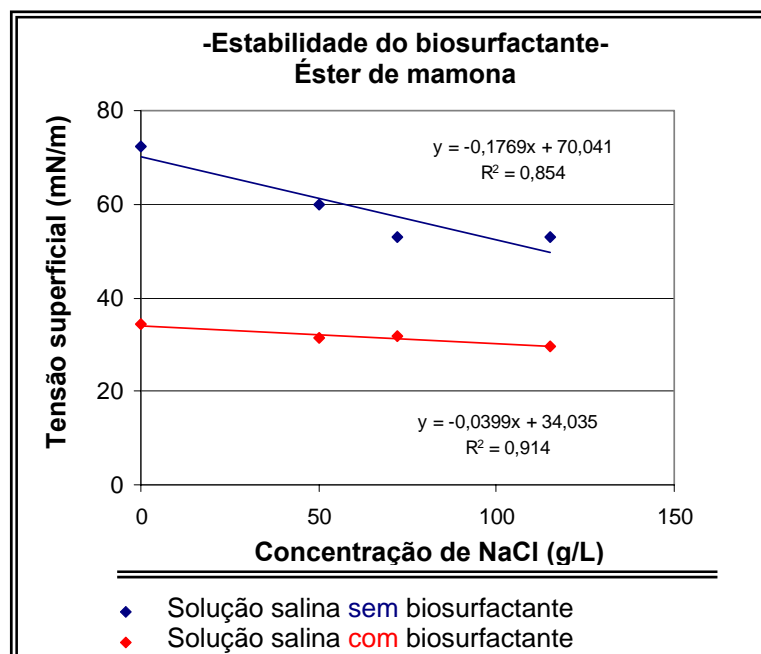


FIGURA 54 – Determinação da estabilidade do éster de mamona em diferentes concentrações de NaCl.

4.8 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC)

Aumentos de temperatura estão tipicamente associados à diminuição da tensão superficial até o ponto crítico em que as densidades do líquido e do vapor saturados são iguais e a tensão superficial se aproxima de zero. Para o caso da água líquida em contato com vapor puro, a correlação entre tensão superficial e temperatura crítica é dada pela Equação 13.

$$\sigma = 235,8 \left(1 - \frac{T_{sat}}{T_{cr}}\right)^{1,256} \left[1 - 0,625 \left(1 - \frac{T_{sat}}{T_{cr}}\right)\right] \quad (13)$$

Onde, T_{cr} é a temperatura crítica (em Kelvin) e σ é a tensão superficial (mN/m).

As Tabela 36 e 37 mostram a tensão superficial das soluções do ricinoleato de D-glicose e do éster de mamona a 25 e 55°C.

TABELA 36 – Tensão superficial do ricinoleato de D-glicose a 25 e 55°C.

Conc. do biosurfactante (g/L)	T. superficial a 25°C (mN/m)	T. superficial a 55°C (mN/m)
12,0	33,35	33,13
10,0	33,28	33,25
8,0	33,99	33,41
5,00	36,21	33,57
2,50	37,80	34,26
1,00	41,97	36,79
0,50	45,49	40,37
0,10	58,88	47,35
0,05	64,16	49,78
0,00	72,94	63,94

TABELA 37 – Tensão superficial do éster de mamona a 25 e 55°C.

Conc. do biosurfactante (g/L)	T. superficial a 25°C (mN/m)	T. superficial a 55°C (mN/m)
12,0	34,07	31,38
10,0	34,25	31,42
8,00	34,55	31,59
5,00	35,66	32,77
2,50	37,03	35,24
1,00	40,17	36,15
0,50	43,46	38,31
0,10	54,14	41,65
0,05	59,48	43,71
0,00	72,34	63,94

Como previsto pela literatura, a tensão superficial sofreu redução linear com o aumento da temperatura em 30°, sendo que a concentração micelar crítica não sofreu influência, permanecendo constante em ~ 0,2-0,5 g/L, como ilustrado nas Figuras 55 e 56.

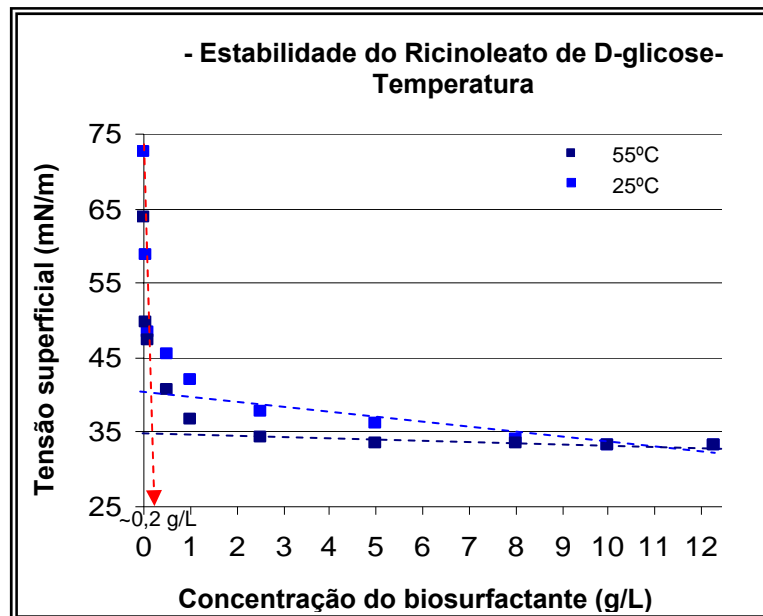


FIGURA 55 – Determinação da CMC do ricinoleato de D-glicose a 25 e 55 °C

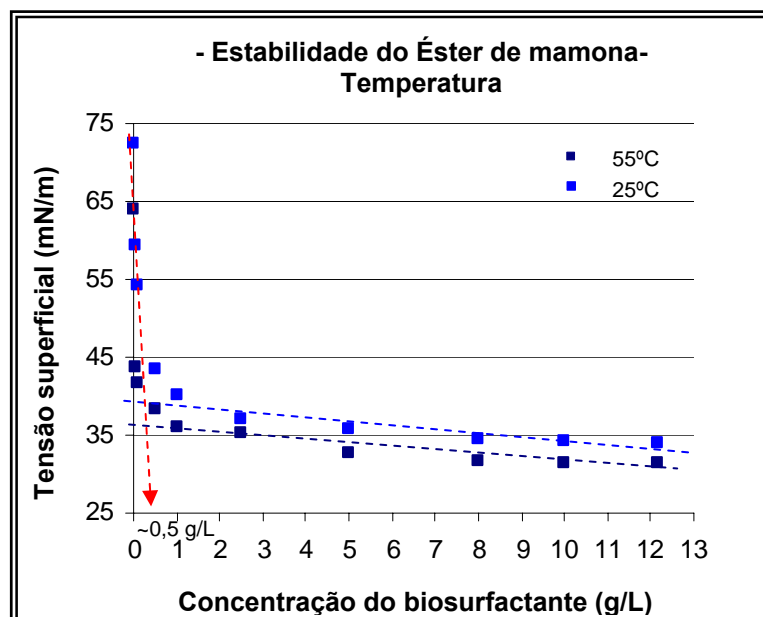


FIGURA 56 – Determinação da CMC do éster de mamona a 25 e 55 °C.

4.9 MOLHABILIDADE DO BIOSURFACTANTE (ÂNGULO DE CONTATO)

Atualmente, vêm-se estudando maneiras de melhorar o método *core-flow*, que consiste em um método de transporte de óleo que utiliza água como lubrificante. Todavia, um dos problemas operacionais relaciona-se à aderência do óleo sobre a superfície da tubulação, ocasionando a perda de eficiência do processo. Uma forma de solucionar tal problema é a utilização de materiais hidrofílicos e/ou oleofóbicos como revestimento interno das tubulações, induzindo modificação de superfícies, ou seja, a molhabilidade das superfícies sólida para diminuir ou até mesmo evitar essa adesão, durante seu transporte (SILVA, 2003).

Segundo Manichand (2006), o valor do ângulo de contato entre o arenito da formação de Botucatu e a solução salina de cloreto de sódio com 21 g/L a 55°C foi de 68°, classificando essa formação como molhável à água (MANICHAND, 2006). Com isso, tivemos como finalidade determinar a molhabilidade do ricinoleato de D-glicose e do éster de mamona, em superfície que contivesse características de molhabilidade à água, com o vidro, visando uma futura aplicação como redutor de ângulo de contato através de injeção de soluções tensoativas na formação Botucatu, aumentando sua molhabilidade à água e reduzindo, assim, a interação com o óleo.

A Tabela 38 apresenta os resultados do ângulo de contato obtidos através das análises realizadas pelo método de placa de Wilhelmy, descrito na seção 3.8 e 3.9.

TABELA 38 – Ângulo de contato do ricinoleato de D-glicose e do éster de mamona.

Conc. biosurfactante (g/L)	Ângulo de contato	
	Ricinoleato de D-glicose	Éster de mamona
12,00	0,00°	0,00°
8,00	0,00°	0,00°
5,00	0,00°	0,00°
1,00	0,00°	0,00°
0,50	0,00°	0,00°
0,10	0,00°	22,4°
0,00	40,0°	40,0°

4.10 EFICIÊNCIA DOS BIOSURFACTANTES COMO AGENTES ESPUMANTES

Segundo Salvini (2006), a olefina sulfonada caracteriza-se como um bom agente espumante, pois 50 mL da solução aquosa contendo 1 g/L de concentração produziu 400mL de espuma estável. Tomando como base a olefina sulfonada, será feita uma comparação com os dados adquiridos nessa dissertação e apresentados nas Tabelas 39 e 40.

TABELA 39 – Determinação da eficiência do ricinoleato de D-glicose como agente espumante.

Degradação da espuma (min)	Volume após agitação (mL)	% Espuma
0	180	260
10	150	200
20	140	180
30	120	140
60	110	120
70	100	100
80	80	60
90	50	0

TABELA 40 – Determinação da eficiência do éster de mamona como agente espumante.

Degradação da espuma (min)	Volume após agitação (mL)	% Espuma
0	65	30
10	60	20
20	60	20
30	60	20
60	55	10
70	55	10
80	55	10
90	50	0

Tomando como base a conclusão de Salvini, o ricinoleato de D-glicose e o éster de mamona não se caracterizam como agentes espumantes, pois a espuma formada foi inferior, em volume, ao medido por ele e se desmancha com o passar do tempo, não apresentando estabilidade.

4.11 EFICIÊNCIA DOS BIOSURFACTANTES COMO BIOPESTICIDAS

A espécie adulta de *Ceratitis capitata* se mostrou resistente à ação do biosurfactante, como mostrado na Tabela 41, a concentrações inferiores de 10 g/L. Entretanto, a concentrações superiores, foi conseguida uma mortalidade de 80%, o que foi considerado uma resposta significativa, pois o ricinoleato de D-glicose e o éster sendo derivado de açúcar e obtido por processo natural, é provavelmente, inofensivo ao homem e ao meio ambiente como um todo. Isso significa que a sua ação é seletiva, ou seja, não elimina os insetos predadores das pragas, como ocorre com os pesticidas tóxicos.

TABELA 41 – Determinação da eficiência do ricinoleato de D-glicose e do éster de mamona como biopesticida.

Conc.biosurfactante (g/L)	% Mortalidade	
	Ricinoleato de D-glicose	Éster de mamona
0	0,0	0,0
1	0,0	0,0
5	0,0	0,0
10	18,1	36,3
20	36,3	63,6
50	50,0	73,3
100	40,0	80,0

4.12 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DOS BIOSURFACTANTES COMO PREVENTORES DE EMULSÃO

Segundo Silva (2000), preventores de emulsão são produtos químicos que, dependendo da sua afinidade, desemulsificam e desestabilizam as emulsões de água em óleo ou de óleo em água. Nas emulsões de água em óleo, os desemulsificantes agem na superfície das gotículas de água, de modo que estas se rompam. Já nas emulsões de óleo em água, os aditivos têm de ser solúveis na água e agir na superfície das gotículas do óleo emulsificado, fazendo com que se coagulem e se separem da água (SILVA E KIPERSTOK, 2000).

A avaliação do desempenho dos biosurfactantes como preventores de emulsão foi desenvolvida segundo a seção 3.12, e as especificações da amostra de óleo utilizada estão descritas na Tabela 9.

As Tabelas 42 a 45 e as Figuras 57 a 60 quantificam e comparam a eficiência de um surfactante comercial e dos biosurfactantes derivados do ácido ricinoléico e do óleo de mamona, em concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4% (v/v). Tanto o surfactante comercial quanto os biosurfactantes apresentaram dificuldade para desestabilizar a emulsão água/ óleo formada. Segundo Silva (2002), isso ocorreu devido à afinidade desses surfactantes pela água. Como sua solubilidade é maior em água, sua eficiência como desemulsificante ocorreria em emulsões diferentes das utilizadas, ou seja, emulsões de óleo em água. Mesmo assim, os produtos utilizados como desemulsificantes foram mais efetivos a 0,4% (v/v), como mostrado na Tabela 45 e Figura 60.

TABELA 42 – Determinação da eficiência do ricinoleato de D-glicose e éster de mamona a 0,1% em comparação ao surfactante comercial.

Tempo (min)	% de separação da fase aquosa		
	Surfactante		
	Comercial	Ricinoleato de D-glicose	Éster de mamona
5	0,27	0	0
10	0,27	0,09	0
15	0,27	0,09	0
20	0,27	0,09	0
25	0,27	0,09	0,09
30	0,27	0,09	0,09
60	0,27	0,09	0,09

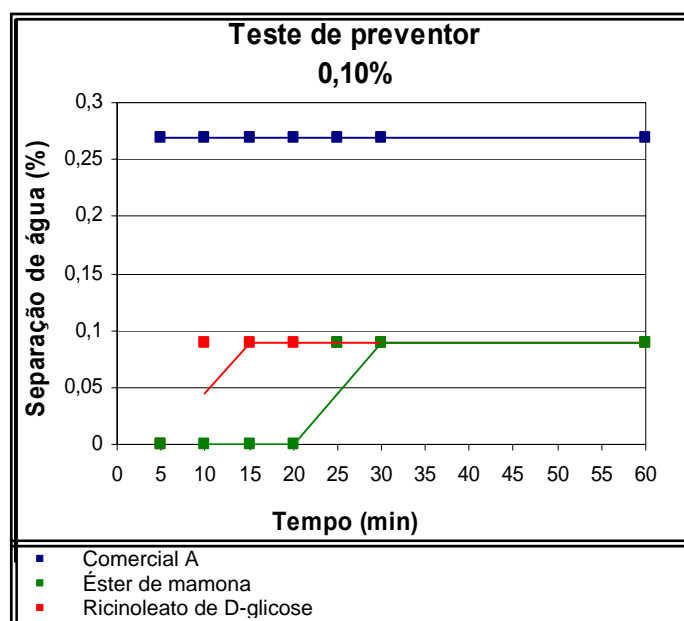


FIGURA 57 – Percentual de separação de fases para o surfactante comercial e os biosurfactantes derivados do ácido ricinoléico e do óleo de mamona, utilizados como desemulsificante, a 0,10% (v/v).

TABELA 43 – Determinação da eficiência do ricinoleato de D-glicose e éster de mamona a 0,2% em comparação ao surfactante comercial.

Tempo (min)	% de separação da fase aquosa		
	Surfactante		
	Comercial	Ricinoleato de D-glicose	Éster de mamona
5	0	0	0
10	0	0	0
15	0	0	0
20	0	0,09	0
25	0	0,09	0
30	0	0,09	0
60	0,09	0,09	0

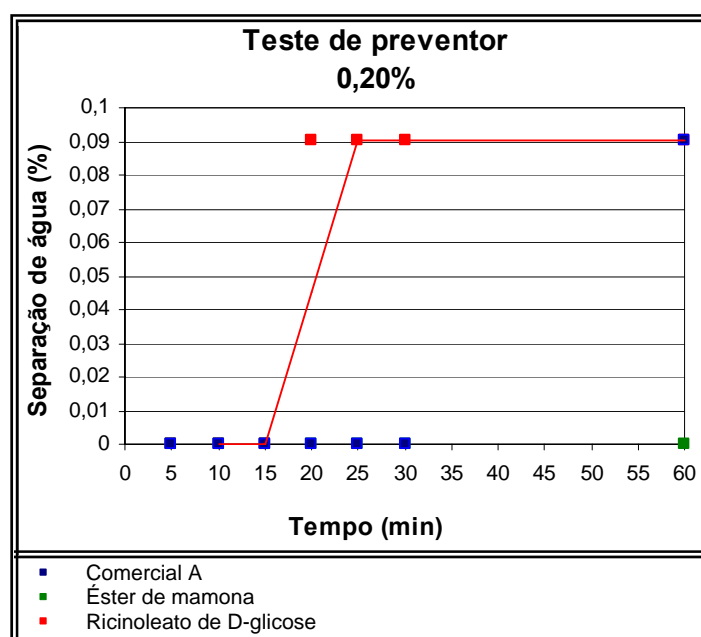


FIGURA 58 – Percentual de separação de fases para o surfactante comercial e os biosurfactantes derivados do ácido ricinoléico e do óleo de mamona, utilizados como desmulsificante, a 0,20% (v/v).

TABELA 44 – Determinação da eficiência do ricinoleato de D-glicose e éster de mamona a 0,3%, em comparação ao surfactante comercial.

Tempo (min)	% de separação da fase aquosa		
	Surfactante		
	Comercial	Ricinoleato de D-glicose	Éster de mamona
5	0	0	0
10	0	0	0
15	0	0	0
20	0	0,09	0
25	0	0,09	0
30	0	0,09	0
60	0,09	0,09	0

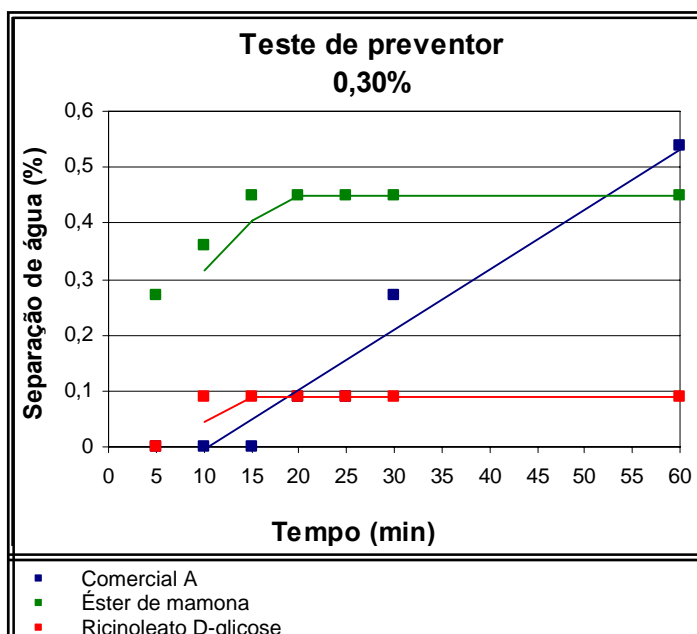


FIGURA 59 – Percentual de separação de fases para o surfactante comercial e os biosurfactantes derivados do ácido ricinoléico e do óleo de mamona, utilizados como desmulsificante, a 0,30% (v/v).

TABELA 45 – Determinação da eficiência do ricinoleato de D-glicose e éster de mamona a 0,4% em comparação ao surfactante comercial.

Tempo (min)	% de separação da fase aquosa		
	Surfactante		
	Comercial	Ricinoleato de D-glicose	Éster de mamona
5	0	0	0
10	0,09	0	0
15	0,27	0,09	0
20	0,36	0,09	0
25	0,72	0,09	0,18
30	0,81	0,09	0,18
60	3,615	0,09	0,18

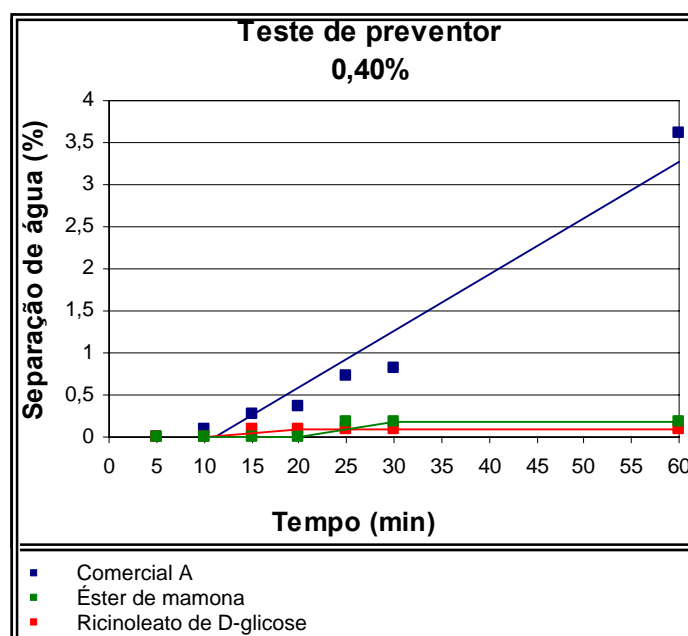


FIGURA 60 – Percentual de separação de fases para o surfactante comercial e os biosurfactantes derivados do ácido ricinoléico e do óleo de mamona, utilizados como desemulsificante, a 0,40% (v/v).

4.13 Determinação da região de microemulsão

4.13.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE EMULSIFICANTE E INFLUÊNCIA DA SALINIDADE

4.13.1.1 DIAGRAMA DE FASES

O método escolhido para a construção do diagrama de fases foi o método da titulação, por apresentar a vantagem da possibilidade do estudo de grande número de pontos com relativa rapidez, visto que as preparações adquirem o equilíbrio rapidamente. Foi necessária, porém, a preparação de amostras de diferentes composições para a completa definição do diagrama.

Após as titulações aquosas, foi calculada a concentração de cada componente utilizado em cada ponto preparado e detectada, visualmente, a formação de diversas fases.

Esses pontos foram colocados em gráficos (diagrama ternário/ pseudoternário) para a obtenção do diagrama de fases, sendo as concentrações de cada um dos componentes transformadas em porcentagem.

As regiões delimitadas nos diagramas de fases foram sistemas microemulsionados (WIV) e separação de fases (WI). Esses diagramas estão apresentados nas Figuras 61 a 64.

A escolha da razão C/T mostrou que para o sistema água/biosurfactante/álcool etílico/biodiesel, a variação encontrada para a região de microemulsão foi pouco significativa, mas concordante com a literatura, pois, com a redução da razão C/T, a região de microemulsão foi ligeiramente afetada, como se pode observar nas Figuras 61 e 62.

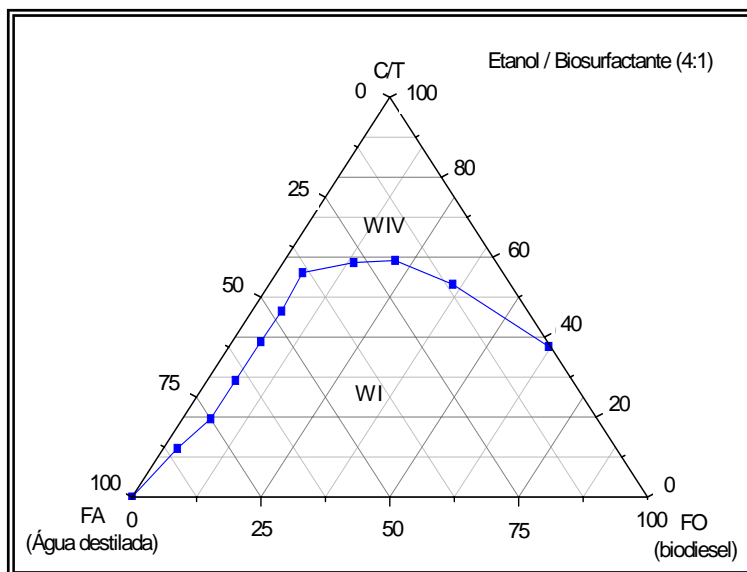


FIGURA 61 – Diagrama pseudoternário utilizando razão C/T = 4

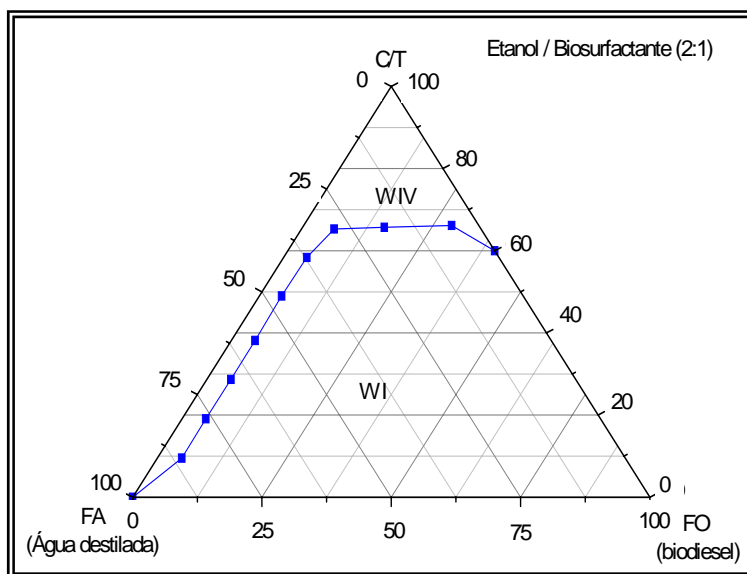


FIGURA 62 – Diagrama pseudoternário utilizando razão C/T = 2

Como visualizado nos diagramas de fases, a utilização da água salina não influenciou no aumento da região de microemulsão, mas a transição da região Winsor IV para Winsor I foi evidenciada, pois o sistema microemulsionado precisou de um tempo maior para separar as fases, como mostram as Figuras 63 e 64.

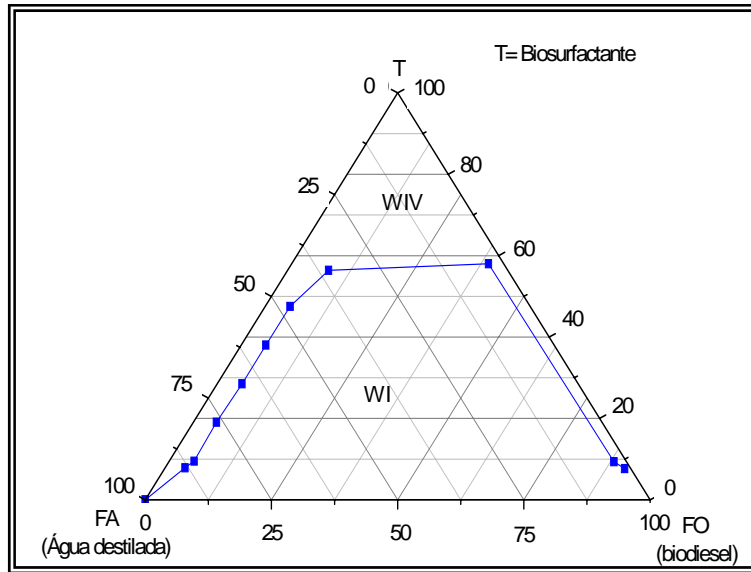


FIGURA 63 – Diagrama ternário utilizando água destilada como fase aquosa.

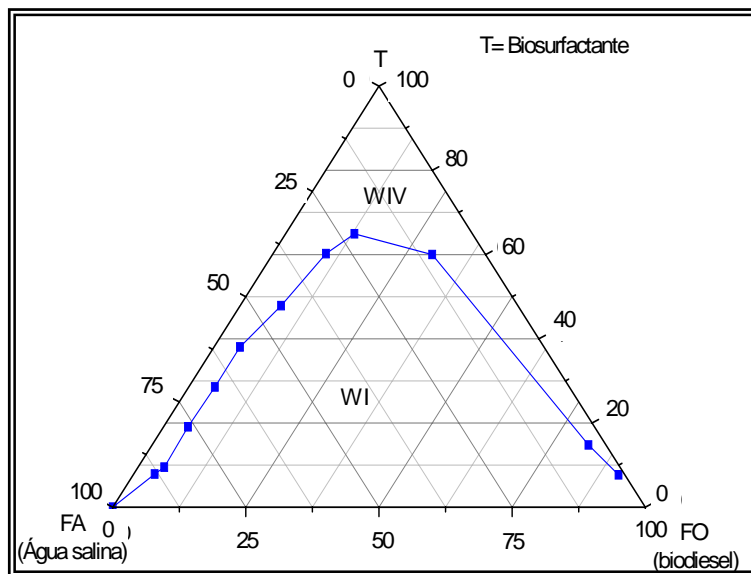


FIGURA 64 – Diagrama ternário utilizando água salina como fase aquosa

5 Conclusões

***“O que segue a justiça e a bondade achará a vida, a justiça e a honra”
Provérbios 21:21***

5 CONCLUSÕES

- As enzimas utilizadas como catalisadores apresentaram um comportamento satisfatório na conversão da D-glicose em ricinoleato de D-glicose. A reação foi monitorada por cromatografia em camada fina (TLC).
- A espectroscopia na região do infravermelho (IV) confirmou a formação do produto. Observaram-se absorções em aproximadamente 3400 cm^{-1} , característica das hidroxilas presentes no anel do açúcar, e em 1730 cm^{-1} , correspondente à carbonila de éster. Análises de RMN ^1H e ^{13}C se fazem necessário para uma caracterização mais refinada das estruturas;
- O planejamento experimental foi realizado na tentativa de quantificar a influência das variáveis (temperatura, tempo de reação, concentração do catalisador e razão molar do substrato/glicose). Os resultados confirmaram as observações de laboratório; para as reações catalisadas em temperaturas e concentrações de catalisador (enzima) mais elevadas, maiores conversões foram obtidas;
- Medidas de tensão superficial foram realizadas com os produtos obtidos em diferentes condições de reação. Em todos os casos, observou-se redução da tensão superficial, o que comprova a eficiência dos biosurfactantes. Os resultados obtidos indicaram redução na tensão superficial da água de 72 mN/m para $33\text{-}36\text{ mN/m}$, com os derivados do ácido ricinoléico, e de $34\text{-}43\text{ mN/m}$ para os derivados do óleo de mamona, sugerindo que, provavelmente, foram formados produtos diferentes.
- As análises de HPLC mostraram que a protease de *Bacillus subtilis* alcalina apresentou maior eficiência catalítica, maior conversão da D-glicose em éster. Os resultados de tensão superficial indicaram que o melhor biocatalisador produziu também o melhor biosurfactante; nas concentrações empregadas, ocorreu a maior redução na tensão superficial da água, de 72 mN/m para 33 mN/m . Este produto foi selecionado para realização das análises da capacidade espumante, desemulsificante, biopesticida e estabilidade, a $55\text{ }^\circ\text{C}$, e em solução salina;
- Os testes em soluções salinas concentradas foram satisfatórios no que diz respeito à solubilidade. Observou-se que, à medida que se aumenta a concentração do biosurfactante, ocorre redução de tensão até atingir uma concentração salina ótima; a

partir deste ponto, não ocorre mais diminuição da mesma mesmo que a solução salina fique mais concentrada. Para o ricinoleato de D-glicose, a tensão superficial chegou a 28mN/m, para 72 g/L de NaCl e, no caso do éster de mamona, a 115 g/L de NaCl, observou-se tensão superficial de 29mN/m;

- A influência da temperatura só foi perceptível no valor da tensão superficial na CMC. Houve uma redução significativa de 45mN/m para 40mN/m, com o ricinoleato de D-glicose, e de 43mN/m para 38mN/m, na solução aquosa do éster do óleo de mamona;
- O ricinoleato de D-glicose e o éster do óleo de mamona mostraram ser ótimos redutores de ângulo de contato; acima da CMC, o ângulo de contato independe da concentração, reduzindo de 40° para 0°;
- Nenhum dos biosurfactantes foi efetivo como agente espumante. A quantidade de espuma formada foi inferior aos surfactantes convencionais, não se mostrando estável com o passar do tempo. Este resultado é satisfatório porque a presença de espuma em fluido de perfuração não é desejável, pois resulta em leituras incorretas de peso específico, reologia, volume, etc, acarretando sérios danos ao poço;
- Os biosurfactantes apresentaram eficiência contra a espécie *ceratittis captata* e a concentração inibitória foi proporcional ao porte da mosca;
- Como preventor de emulsão, os testes não foram conclusivos. A amostra de óleo empregada não tinha propriedades desejáveis devido ao seu baixo percentual de água. Outras análises com amostras contendo diferentes percentuais de água são necessárias. Em testes de hidrofobicidade, observou-se que toda a água adicionada ao óleo foi separada pelo biosurfactante;
- A variação encontrada para a região de microemulsão nos diferentes sistemas microemulsionados utilizados foi pouco significativa, pois a solubilização da fase oleosa foi de aproximadamente 25%. Esse resultado pode ser satisfatório nos casos em que a solubilização de alguns fármacos em solução aquosa é bastante reduzida, e o sistema microemulsionado pode ser utilizado para aumentar a velocidade de liberação desses fármacos, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade, de absorção e do controle da biodisponibilidade de princípios ativos, diminuindo assim a toxicidade e aumentando a eficácia clínica dos fármacos.

6 Sugestões para trabalhos futuros

***“O que atenta para o ensino, acha o bem, e o que confia no Senhor,
esse é feliz.” Provérbios 17:20***

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterização estrutural dos biosurfactantes através do RMN ^1H e ^{13}C para a confirmação da regioseletividade de cada enzima utilizada como biocatalisador.
- Determinação do ângulo de contato em outras superfícies.
- Aplicação do biosurfactante em fluido de perfuração.
- Teste de biopesticida com outras espécies de inseto.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Alvarez-Macarie, E.; Augier-Magro, V.; Guzzo, J.; Baratti, J.; *Biotechnol.Lett.*: Molecular characterisation of the gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases, v. 21, p. 313-319, **1999**.

Arima, K.; Kakinuma, A.; Tamura, G.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation, v. 31, n. 3, p. 488-494, **1968**.

Ayres-Barros, M.R.; *Boletim de Biotecnologia*: Biocatálise em solventes orgânicos, v. 72, p. 2-6, **2002**.

Banat, I.M.; *Bioresour. Technol.*: Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review, v. 51, n. 1, p. 1-12, **1995**.

Banat, I.M.; Samarah, N.; Murad, M.; Horne, R.; Banerjee, S.; *World J.Microbiol. Biotechnol.*: Biosurfactants production and possible uses in Microbial enhanced oil recovery and oil Pollution remediation: a review, v. 7, n.1, p. 80-88, **1991**.

Banat, I.M.; *Biofutur.*: Biosurfactants, more in demand than ever, v. 198, n. 20, p. 44-47, **2000**.

Banat, I.M.; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: Potential commercial applications of microbial surfactants, v.53, n. 5, p. 495-508, **2000**.

Basu, S., Nandakumar, K., Masliyah, J.H.; *J. Colloid Interface Sci.*, A study of oil displacement on model surfaces. v.182, p. 82-94, **1996**.

Beynom, R.J.; Bond, J.S.; *Proteolytic enzymes - A practical approach*: Catalysis, n. 247, 2^a ed., Academic press, Oxford, **2001**.

Bognolo, G.; *Colloids Surf., A*: Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, v. 41, p. 152, **1999**.

Boscolo, M.; Cardoso, G.; Feres, R.J.F.; Efeito biopesticida de éster de sacarose sobre *Calacarus Heveae* (Acari, Eriophyidae). Anais In: XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia, Londrina, **2006**.

Brady, L.; Brzozowski, A.M.; Derewenda, Z.S.; *Nature*: A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase, v. 343, n. 6260, p. 767-770, **1990**.

Brown, M.J.; *Int. J. Cosm. Sci.*, 13, p. 61, **1991**.

Buckley, J.S.; Hirasaki, G.J.; Liu, Y.; Von Dreseck, S.; Wang, J-X.; *Petrol Sci Tech: Asphaltene precipitation and solvent properties of crude oils*, v. 16, n. 3-4, p. 251-285, **1998**.

Cameotra, S.S.; Makkar, R.S.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, v. 50, n. 5, p. 520-529, **1998**.

Castro, H.F.; Anderson, W.A.; *Quim. Nova: Fine Chemicals by Biotransformation Using Lipases*, v. 18, n. 6, p. 544-554, **1995**.

Chamouleau, F.; Coulon, D.; Girardin, M.; Ghoul, M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*: Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media, v. 11, p. 949-954, **2001**.

Chortik, O.T.; Pomonis, J.G.; Johnson, A.W.; *J. Agric. Food Chem.*: Syntheses and characterizations of Insecticidal sucrose esters, v. 44, p. 1551- 1557, **1996**.

Chortik, O.T.; Kays, S.J.; Teng, Q.; *J. Agric. Food Chem.*: Characterization of insecticidal sugar esters of petunia, v. 45, n. 1, p. 270-275, **1997**.

Cooper, D.G.; Paddock, D. A.; *Appl. Environ. Microbiol.*: Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*, v. 47, n. 1, p. 173-176, **1984**.

Craig Jr., F.F. *Monograph Series SPE: The reservoir engineering aspects on water-flooding*, Dallas, **1971**.

Cyglar, M.; Schrag, J. D.; *Methods Enzymol.* : Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases, v. 284, p. 3-27, **1997**.

Daves, M.E.; McCammon, J.A.; *Chem. Rev.*: Electrostatics in biomolecular structure and dynamics, v. 90, n. 3, p. 509-521, **1990**.

Desai, J.D.; Banat, I.M.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*: Microbial production of surfactants and their commercial potential, v. 61, n. 1, p. 47-64, **1997**.

Desai, J.D.; Desai, A.J.; *Surfactants science series* : Biosurfactants: production, properties, applications, v. 48, cap. 2, p. 65-97, **1993**.

Faber, K.; *Biotransformations in organic chemistry: A Textbook*, v 3, n. 3, **1997**.

Fernandes, P., Aires-Barros, M.R.; Cabral, J.M.S.; "Biocatálise Aplicada" em Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações (N-Lima e M.Mota, eds.), LIDEL-Edições Técnicas LDA, Cap.10, **2001**.

Flasz, A.; Rocha, C. A.; Mosquera, B.; Sajo, C.; *Med. Sci. Res.* : A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* atcc 55925, v. 25, n. 33, p.181-185, **1998**.

Francy, D.S.; Thomas, J.M.; Raymond, R.L.; Ward, C.H.; *J. Ind.Microbiol.:* Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria, v. 8, n. 4, p. 237-245, **1991**.

Furigo Jr, A.; Pereira, E. B.; Enzimas e suas aplicações: Cinética enzimática, UFSC, Dep. de engenharia química e engenharia de alimentos, **2001**.

Gandhi, N.N.; *J. Am. Oil Chem. Soc.:* Applications of lipase, v. 74, n. 6, p. 621-634, **1997**.

Griffin, W.C. ; *J. Soc. Cosmetic Chem.:* Classification of surface active agents by "HLB", v.1, p. 311-326, **1949**.

Gunstone, F.D.; *Fett-Lipid.:* What else besides commodity oils and fats? v. 101, n. 4, p. 124-130, **1999**.

Helenius, A.; Simons, K.; *Biochim. Biophys. Acta:* Solubilization of membranes by detergents, v. 415, n. 1, p. 29-79, **1975**.

Hirasaki, G.J.; *SPE Formation Evaluation:* Wettability- Fundamentals and surface forces, p. 217-226, **1991**.

Horowitz, S.; Gilbert, J.N.; Griffin, W.M.; *J. Ind.I Microbiol. Biotechnol.:* Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86, v. 6, n. 4, p. 243-348, **1990**.

<http://www.sigmaaldrich.com/> acessa em jan 2007.

Jack, T.R.; *Biorecovery.:* Microbially enhanced oil recovery, v. 1, n. 1, p. 59-73, **1988**.

Jaeger, K.E.; Ransac, S.; Dijkstra, B.W.; Colson, C.; Van Heuvel, M.; Misset O.; *FEMS Microbiol Rev.:* Bacterial lipases, v. 15, n. 1, p. 29-63, **1994**.

Jaeger, K.E.; Reetz, M.T.; *Trends Biotechnol.* : Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, v. 16, n. 9, p. 396-403, **1998**.

Jaeger, K.E.; Dijkstra, B.W.; Reetz, M.T.; *Annu. Rev. Microbiol.* : Bacterial biocatalysts: Molecular Biology, Three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases, v. 53, n. 1, p. 315-351, **1999**.

Jenneman, G.E.; Mcinerney, M.J.; Knapp, R.M.; Clark, J.B.; Feero, J.M.; Revus, D.E.; Menzie, D.E.; *Dev. Ind. Microbiol.*: A halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus* species potentially useful for enhanced oil recovery, v. 24, p. 485-492, **1983**.

Kaminsky, R.; Radke, C.J.; *SPE J.*: Water films and wettability reversal, v. 2, p. 485-493, **1997**.

Kappeli, O.; Fiechter, A.; *J. Bacteriol.*: Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport., v. 131, n. 3, p. 917-921, **1977**.

Kappeli, O.; Finnerty, W.R.; *J. Bacteriol.* : Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*, v. 140, n. 2, p. 707-712, **1979**.

Khire, J.M.; Khan, M.I.; *Enzyme Microb. Technol.*: Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 1. Importance and mechanism of MEOR, v. 16, n. 2, p. 170-172, **1994**.

Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veger, C.; *Biotechnol. Bioeng.*: Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, v. 30, n. 1, p. 81-87, **1987**.

Langrand, G.; Triantaphylides, C.; Baratti.; *Biotechnol.Lett.*: Lipase catalized formation of favour esters, v. 10, n. 8, p. 549-554, **1988**.

Lichtenberg, D.; Robson, R.J.; Dennis, E.A.; *Biochim. Biophys. Acta*: Solubilization of phospholipids by detergents structural and kinetic aspects, v. 737, n. 2, p. 285-304, **1983**.

Lie Ken Jie, M. S. F.; Cheung, Y. K.; Chau, S. H. ; Yan, B. F. Y.; *Chemistry and Physics of Lipids*: ¹³C-NMR spectra of positional isomers of long-chain conjugated diacetylenic fatty esters, v. 60, n. 2, p. 179-188.

Lima, A.W.O.; Angnes, L.; *Quim. Nova*: Biocatálise em meios aquo-restritos: Fundamentos e aplicações em química analítica, v. 22, n. 2, p. 229-245, **1999**.

Lin, S.C.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.*: Biosurfactants: Recent advances, v. 66, n. 2, p. 109-120, **1996**.

Liu, T.X.; Stansly, P.A.; Chortyk, O.T.; *J. Econ. Entomol.*: Insecticidal activity of natural and synthetic sugar esters against *Bemisia argentifolii*-Homoptera: *Aleyrodidae*, v. 89, p. 1233-1289, **1996**.

Madsen, T.; Petersen, G.; Seiero, C.; Torslov, J.; *J. Am. Oil Chem. Soc.*: Biodegradability and aquatic toxicity of glycoside surfactants and a nonionic alcohol ethoxylate, v. 73, n. 7, p. 929-933, **1996**.

Manichand, R.N.; Tese de doutorado: Simulação da injeção de polímeros como método de recuperação avançada de petróleo, UFRN, **2006**.

Matsumura, S.; Okamaoto, T.; Tsukada, K.; Mizutani, N.; Toshima, K.; *Macromolecular Symposium*: Novel lipase-catalyzed ring-opening copolymerization of oxiranes and dicarboxylic anhydride forming polyesters bearing carboxyl groups and their physicochemical properties and biodegradability, v. 144, p. 219-235, **1999**.

Menezes, P. Â. V.; *Química Têxtil*: Tensoativos na indústria têxtil, n. 80, p. 54-75, **2005**.

Michaelowa, A.; *The Clean Development Alternatives Newsletter*: The Clean Development Mechanism after Bonn: A European Perspective, v. 11, p. 5-6, **2001**.

Mcphalen, C.A.; James, M.N.G.; *Biochemistry*: Structural comparison of two serine proteinase-protein inhibitor complexes: Eglin-C-subtilisin Carisberg and CI-2-subtilisin novo, v. 27, p. 6582-659, **1988**.

Mojovic, L.; Siler-Marinkovic, S.; Kukic, G.; Vunjak-Novakovic G.; *Enzyme microb. technol.*: *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat, v. 15, n. 5, p. 438-443, **1993**.

Moraes, S. L.; Rezende, M. O. O.; *Quim. Nova*: Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia, v. 27, n. 5, p. 701-705, **2004**.

Motta, V.T.; *Bioquímica básica*: Enzimas, cap.3, p. 69-101, EDUCS-SP, **2003**.

Mulligan, C.N.; Gibbs, B.F.; *Surfactants science serie - Biosurfactants: production, properties, applications*: v. 48, **1993**.

Nitschke, M.; Pastore, G.M.; *Quim. Nova*: Biosurfactantes: propriedades e aplicações, v. 25, n. 5, p. 772-776, **2002**.

NOVONORDISK, apostila sobre uso de enzimas, **1995**.

Oscarson, S.; Ritzén, H.; *Carbohydr. Res.*: Synthesis of 6-O-acetyl-2,3,4-tri-O-[(S)-2-methylbutyryl]sucrose and the three regioisomers of 6-O-acetyl-2,3,4-O-[(S)-2-methylbutyryl]-di-O-[(S)-3-methylpentanoyl]sucrose, naturally occurring fatty acid esters of sucrose found in tobacco, v. 284, n. 2, p. 271-277, **1996**.

Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C.R.; Nigan, P.; Krieger, N.; Soccol, V.T.; *Biotechnol. Appl. Biochem.*: The realm of microbial lipases in biotechnology, v.29, n.2, p. 119 -131, **1999**.

Park, H.G.; Chang, H.N.; Dordick, J.S.; *Biotechnol. Bioeng*: Chemoenzymatic synthesis of sucrose-containing aromatic polymers, v. 72, n. 5, p. 541-547, **2001**.

Patel, M.N.; Gopinathan, K.P.; *Appl. Environ. Microbiol.*: Lysozyme-sensitive bioemulsifier for immiscible organophosphorus pesticides, v. 52, n. 5, p. 1224-1226, **1986**.

Patil, D.R.; Rethwisch, D.G.; Dordick, J.S.; *Biotechnol. Bioeng*: Enzymatic synthesis of a sucrose-containing linear polyester in nearly anhydrous organic media, v. 37, n. 7, p. 639 - 646, **1991**.

Peypoux, F.; Bonmatin, J.M.; Wallach, J.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: Recent trends in the biochemistry of surfactin, v. 51, n. 5, p. 553-563, **1999**.

Posorske, L.H.; *J. Am. Oil Chem. Soc.*: Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry, v.61, n. 11, p. 38-4, **1984**.

Raga, A.; Atratividade de *Dacona* para monitoramento e controle de moscas-das-frutas - *Diptera: Tephritidae* em citros: Instituto Biológico de Campinas/ SPa e BIO CONTROLE:Métodos de Controles de Pragas Ltda., **2003**.

Rao, M.B.; Tanksale, A.P.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V.; *Microbiology and molecular biology reviews*: Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, v. 62, n. 3, p. 597-635, **1998**.

Rawling, N.D.; Barret, A.; *Meth. Enzymol.* : Families of serine peptidases, v. 244, p. 18-61, **1994** (a).

Rawling, N.D.; Barret, A.; *Meth. Enzymol.* : Families of cysteine peptidases, v. 244, p. 461-486, **1994** (b).

Rawling, N.D.; Barret, A.; *Meth. Enzymol.*: Families of aspartic peptidases, and those of unknown mechanism, v. 248, p. 105-120, **1994** (c).

Rawling, N.D.; Barret, A.; *Meth. Enzymol.*: Families of *metallopeptidases*, v. 248, p. 183-228, **1994** (d).

Rehm, H.J.; Reed, G.; Biosurfactants . Biotechnology, second edition, v.6, p.660-696, **1996**.

Rosen, M.J.; *Book Review: Surfactants and interfacial phenomena*, v. 18, n. 5, p. 419-420, **1979**.

Rosenberg, E.; Ron, E.Z.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*: High-and low-molecular-mass microbial surfactants, v. 52, n. 2, p. 154-162, **1999**.

Sailey, J. E; Ollis, D.F.; *Biochemical engineering fundamental: The kinetics of enzyme-catalyzed reactors*, 2ª ed, p. 86-156, 1986.

Salager, J.L.; Anderez, J.M.; Forgiarini, A.; *Cuaderno FIRP 263-A - modulo de enseñanza en fenomenos interfaciales: Influencia de la Formulacion sobre las Espumas*, FIRP, Mérida, **2003**.

Santos, R. G.; *Dissertação de mestrado: "Avaliação da molhabilidade de superfícies de oleodutos através de medidas de ângulo de contato: Efeito de asfaltenos e de ácidos naftênicos"*. São Paulo: Departamento de Engenharia de Processos, FEQ-UNICAMP, 105p. **2003**.

Sarda, L.; Desnuelle, P.; *Biochim. Biophys. Acta.*: Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion, v. 30, p. 513-521, **1958**.

Shaw, D.J.; *Introduction to colloid and surface chemistry*. Oxford: Reed Education and Professional Publishing Ltd, p. 306, **1992**.

Silva, A.L.C; Panzetto, E; Rosa, F.; *Artigo Técnico Oxiteno: Tensoativos- conceitos gerais e suas aplicações em tintas*, ART TV007, **2003**.

Silva, C. R. R.; Kiperstok A.; *Monografia: água produzida na extração de petróleo*, Escola politécnica- Departamento de hidráulica e saneamento, **2000**.

Silva, R.C.R.; *Dissertação de mestrado: "Alteração da molhabilidade de superfícies internas de tubulações utilizadas no transporte de óleos pesados via core-flow"*, UNICAMP, **2003**.

Stryer, L.; "Bioquímica", 3ª ed., Guanabara Koogan S.A., p.186, RJ, **1992**.

Tarahomjoo, S.; Alemzadeh, I.; *Enzyme and Microbial Technology*: Surfactant production by an enzymatic method, v. 33, p. 33-37, **2003**.

Thimon, L.; Peypoux, F.; Wallach, J.; Michel, M.G.; *FEMS Microbiol. Lett.*: Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells, v. 128, n. 2, p. 101-106, **1995**.

Valraeds-Martine, M.C.; Vandermei, H.C.; Reid, G.; Busscher, H.J.; *Colloids Surf. B: Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by Lactobacillus strains*, v. 8, n.1, p. 51 - 61, **1996**.

Villeneuve, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J.; Hoss, M.J.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.: Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches*, v. 9, n. 4 - 6, p. 113-148, **2000**.

Winkler, F.K.; Gubernator, K.; *Cambridge University Press: Cambridge: Lipases - their structure, biochemistry and application*, **1994**.

Winsor P. A.; *Trans. Faraday Soc.: Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes*, v. 44, p. 376-398, **1948**.

Wisemam, A.; *Handbook of enzyme biotechnology*, 2^a ed, department of biochemistry, University of Serrey, UK, **1985**.

Wolf, F.G.; Santos, L.O.E.; Philippi, P.C.; *Revista Brasileira de Ensino de Física: Formation and dynamics of the liquid-vapor interface simulated by the Lattice-Boltzmann method*, v. 28, n. 2, p. 167-175, **2006**.

Yahya, A.R.M.; Anderson, W.A.; Moo-Young M.; *Enz. Microb. Tech.: ester synthesis in lipase-catalyzed reactions*, v.23, n.7-8, p. 438-450, **1998**.

Yamane, T.; *J. Am. Oil Chem. Soc.: Enzyme technology for the lipids industry: An engineering overview*, v. 64, n. 12, p. 1657-1662, **1987**.

Yan, Y., Bornscheuer, U.T., Stadler, G., Wahl, S.L., Reuss, R.; Schmid, R.D., *J. Amer. Oil Chem. Soc.: Production of sugar fatty acid esters by enzymatic esterification in a stirred-tank membrane reactor: Optimization of Parameters by Response Surface Methodology*, v.78, n. 2, p. 147-152, **2001**.

Yutaka, T.; Kitagawa, M.; *Science and Technology of Polymers and Advanced Materials: Chemoenzymatic synthesis of water-soluble sugar-branched poly (Vinyl Alcohol)*, P.N. Prasad Ed., Plenum Press, N.Y., p.447-491, **1998**.

Zaks, A.; Klibanov, A.M.; *J. Biol. Chem.: The effect of water on enzyme action in organic media*, v. 263, n. 17, p. 8017-8021, **1988(a)**.

Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *J. Biol. Chem.: Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents*, v. 263, n. 7, p. 3194-3201, **1988 (b)**.

Zaks, A.; Klibanov, A.M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.: Enzyme-Catalyzed Processes in Organic Solvents*, v. 82, n. 15, p. 3192-3196, **1985**.

Zaks, A.; Klibanov, A. M.; *Science*: Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C, v. 224, n. 4654, p. 1249-251, **1984**.

Zisman, W. A.; Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution. In: Contact angle, wettability and adhesion. Washington, D.C.: American Chemical Society. Advances in chemistry series 43, p.1-51, **1964**.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)