



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA

**TESE DE DOUTORADO**

**SÍNTESE SUSTENTÁVEL DE BIOFLUIDO  
COM PERSPECTIVAS DE UTILIZAÇÃO EM  
TRANSFORMADORES DE POTÊNCIA**

**ANDRESSA APARECIDA ALVES**

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar Queiroz

Coorientadora: Profa. Dra. Karina Arruda Almeida

ITAJUBÁ

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA

**ANDRESSA APARECIDA ALVES**

**SÍNTESE SUSTENTÁVEL DE BIOFLUIDO COM  
PERSPECTIVAS DE UTILIZAÇÃO EM  
TRANSFORMADORES DE POTÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Materiais para Engenharia da Universidade Federal de Itajubá, como requisito para o título de Doutora em Materiais para Engenharia.

Área de concentração: Materiais para Engenharia

Linha de pesquisa: Polímeros e Cerâmicas

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar Queiroz

Coorientadora: Profa. Dra. Karina Arruda Almeida

ITAJUBÁ

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA

**SÍNTESE SUSTENTÁVEL DE BIOFLUIDO COM PERSPECTIVAS DE  
UTILIZAÇÃO EM TRANSFORMADORES DE POTÊNCIA**

**ANDRESSA APARECIDA ALVES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Materiais para Engenharia da Universidade Federal de Itajubá, como requisito para o título de Doutora em Materiais para Engenharia.

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar Queiroz**  
(Orientador) - UNIFEI

---

**Profa. Dra. Karina Arruda Almeida**  
(Coorientadora) - UNIFEI

---

**Prof. Dr. Adhimar Flávio de Oliveira**  
UNIFEI

---

**Prof. Dra. Maria Fernanda Xavier Pinto  
Medeiros**  
UNIFEI

---

**Prof. Dr. Edson Giulliani Ramos Fernandes**  
UNIFESP

---

**Prof. Dr. Nirton Cristi Silva Vieira**  
UNIFESP

## Agradecimentos

À Deus, por todas as oportunidades concedidas a mim, pela força e tranquilidade para superar todas as dificuldades.

À minha mãe, ao meu pai e aos meus irmãos, pelo amor, carinho e atenção que sempre me deram.

De forma incondicional à minha filha, que é a razão do meu viver.

Ao meu namorado, pelo amor, pela presença constante, incentivo e paciência, me fazendo acreditar que posso mais do que imagino.

À minha amiga Larissa, por sempre estar ao meu lado, pelo apoio, carinho e confidências.

Aos meus orientadores, professor Doutor Alvaro Queiroz e professora Doutora Karina Almeida, pela dedicação, apoio, disponibilidade e ensinamentos. Pela compreensão, pelo aconselhamento assertivo e pelo estímulo permanente que muito contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À todos aqueles que contribuíram de maneira direta ou indireta durante a minha caminhada e tornaram possível a realização deste trabalho.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.” (Cora Coralina)*

## Resumo

Um dos problemas mais desafiadores que a sociedade enfrentará nos próximos anos é o impacto das mudanças climáticas. Devido a crescente preocupação sobre o futuro, a busca contínua por formas de superar a crise ambiental global tornou-se imprescindível e, assim, diversas ações estão sendo tomadas em todo mundo para reverter essa situação. Frente ao cenário atual, tem havido um intenso interesse nas inovações disruptivas ecologicamente amigáveis que são particularmente importantes no desenvolvimento de máquinas elétricas de potência (MEPs) como, por exemplo, o transformador de distribuição de potência (TDP). Os TDPs utilizam fluidos dielétricos para refrigeração do equipamento, como o óleo mineral isolante (OMI). De uma perspectiva ambiental, em razão as inúmeras desvantagens do uso do OMI, têm sido envidados esforços concernentes à procura por fluidos isolantes alternativos. Os líquidos isolantes a partir de óleos vegetais (OVs) são considerados substitutos confiáveis ao OMI e constituem uma abordagem relevante para promover a sustentabilidade. Diante desse contexto, nesse trabalho pretende-se realizar modificações moleculares no óleo de coco de babaçu (OCB) com a finalidade de se obter um biofluido isolante ecologicamente correto para utilização em TDPs. Com esse propósito, foi realizada a encapsulação de lipase (LIP) em microcápsulas de poliglicerol hiper-ramificado (HPG) através da tecnologia microfluídica. As microcápsulas de HPG-LIP foram caracterizadas através das seguintes técnicas: MEV, ATR-FTIR e TGA. A otimização dos parâmetros celulares microfluídicos para imobilização da LIP foi realizada por rede neural artificial (RNA). As microcápsulas de HPG-LIP resultantes são esféricas e tem diâmetro médio de 29  $\mu\text{m}$  com distribuição de tamanho monomodal. As condições ótimas determinadas por RNA foram: concentração de HPG de 10% (peso), carga de LIP de 20% (peso) e taxa de fluxo total na célula microfluídica de 1,0 mL/h. Nessas condições, a capacidade máxima de LIP que pode ser microencapsulada é de 85%. O  $K_m$  aparente e o  $V_{m\acute{a}x}$  aparente do HPG-LIP foram 1,13814 mM e 0,49 U/mg, respectivamente. A reutilização do HPG-LIP mostrou 81,5% da atividade retida mesmo após 10 ciclos. Com base nos resultados obtidos, a microfluídica guiada por RNA pode ser útil para produzir microcápsulas de HPG-LIP para aplicações em biotecnologia. Dessa forma, as microcápsulas preparadas foram utilizadas como biocatalisadores enzimáticos nas reações de síntese para obtenção do biofluido isolante baseado no OCB em reator batelada.

**Palavras-chave:** Transformador de potência. Biofluido. Microfluídica. Lipase. Microcápsulas de poliglicerol hiper-ramificado.

## Abstract

One of the most challenging problems that society will face in the coming years is the impact of climate change. Due to the growing concern about the future, the continuous search for ways to overcome the global environmental crisis has become indispensable and, therefore, several actions are being carried out worldwide to reverse this situation. Because of the current scenario, there has been intense interest in ecologically friendly disruptive innovations that are particularly important in the development of electrical power machines (EPM), such as the power distribution transformer (PDT). PDTs use dielectric fluids to cool the equipment, such as insulating mineral oil (IMO). From an environmental perspective, due to the numerous disadvantages of using IMO, efforts have been made regarding the search for alternative insulating fluids. Insulating liquids from vegetable oils (VO) are considered reliable substitutes for IMO and are a relevant approach to promoting sustainability. Given this context, this work intends to perform molecular modifications in babassu coconut oil (BCO) to obtain an environmentally friendly insulating biofluid for use in PDTs. For this purpose, lipase (LIP) encapsulation was performed in hyperbranched polyglycerol (HPG) microcapsules using microfluidic technology. The HPG-LIP microcapsules were characterized by the following techniques: SEM, ATR-FTIR and TGA. The optimization of the microfluidic cell parameters for immobilization of LIP was carried out by artificial neural network (ANN). The resulting HPG-LIP microcapsules are spherical and have an average diameter of 29  $\mu\text{m}$  with monomodal size distribution. The optimum conditions determined by ANN were: HPG concentration of 10% (wt), LIP loading of 20% (wt) and total flow rate in the microfluidic cell of 1.0 mL/h. Under these conditions, the maximum capacity of the LIP that can be microencapsulated is 85%. The apparent  $K_m$  and apparent  $V_{max}$  of the HPG-LIP were 1.138,14 mM and 0.49 U/mg, respectively. The reusability of HPG-LIP showed 81.5% of the activity retained even after 10 cycles. Based on the results obtained, microfluidics guided by RNA could be useful to produce HPG-LIP microcapsules for applications in biotechnology. Thus, the prepared microcapsules were used as enzymatic biocatalysts in the synthesis reactions to obtain the BCO-based insulating biofluid in a batch reactor.

**Keywords:** Power transformer. Biofluid. Microfluidic. Lipase. Hyperbranched polyglycerol microcapsules.

## Lista de Figuras

Figura 1 – Transformador de distribuição (a) e tanque contendo núcleo ativo imerso no fluido isolante (b). . . . .	8
Figura 2 – Representação da estrutura de hidrocarbonetos parafínicos (a) e naftênicos (b). . . . .	9
Figura 3 – Representação da estrutura do éster sintético (a) e do éster natural (b). . . . .	10
Figura 4 – Transformador preenchido com óleo de coco instalado em 2001 em Wathara, Kesbewa, Sri Lanka. . . . .	20
Figura 5 – Representação do mecanismo da polimerização aniônica por abertura de anel multi-ramificado do glicidol. . . . .	28
Figura 6 – Principais métodos de imobilização de enzimas: ligação covalente (a), adsorção (b), microencapsulação (c) e aprisionamento (d). . . . .	29
Figura 7 – Ilustração da síntese química de HPG-MA a partir de carbonato de glicerol (GC) (a) e ilustração esquemática para a produção de HPG-LIP usando um dispositivo microfluídico (b). . . . .	48
Figura 8 – Espectrofotômetro Shimadzu IRTracer-100 acoplado ao acessório ATR. . . . .	50
Figura 9 – Analisador térmico Shimadzu TGA-50. . . . .	51
Figura 10 – Reator batelada utilizado neste trabalho. . . . .	56
Figura 11 – Microcápsulas de HPG-LIP sintetizadas neste trabalho. . . . .	60
Figura 12 – Imagens MEV das microcápsulas de HPG-LIP. . . . .	61
Figura 13 – Histograma de distribuição de tamanho de partículas das microcápsulas de HPG-LIP preparadas em célula microfluídica. . . . .	62
Figura 14 – Espectro de infravermelho das amostras HPG (a) e HPG-LIP (b). . . . .	63
Figura 15 – TG das amostras do HPG-LIP nas diferentes taxas de aquecimento. . . . .	64
Figura 16 – DTG das amostras do HPG-LIP nas diferentes taxas de aquecimento. . . . .	64
Figura 17 – Gráfico referente à regressão linear do método de Kissinger para determinação da energia de ativação para degradação térmica do HPG-LIP. . . . .	66
Figura 18 – Gráfico referente à regressão linear do método de Ozawa para determinação da energia de ativação para degradação térmica do HPG-LIP. . . . .	66
Figura 19 – Influência da composição de HPG e taxa de fluxo na eficiência de encapsulação de LIP. Os dados foram obtidos à temperatura ambiente (20 °C). . . . .	68

Figura 20 – Comparação entre os valores experimentais e previstos da eficiência de encapsulamento (EE) (a) e da atividade relativa (AR) (b) pela RNA-MLP. . . . .	69
Figura 21 – Gráficos Lineweaver–Burk para a LIP livre (a) e para o HPG-LIP (b). . . . .	71
Figura 22 – Efeitos da temperatura na atividade da LIP imobilizada ao longo do tempo de reação. . . . .	72
Figura 23 – Capacidade de reutilização do HPG-LIP. . . . .	73
Figura 24 – Espectro de infravermelho da amostra de óleo de coco. . . . .	74
Figura 25 – TG das amostras do óleo de coco nas diferentes taxas de aquecimento. . . . .	75
Figura 26 – DTG das amostras do óleo de coco nas diferentes taxas de aquecimento. . . . .	76
Figura 27 – Gráfico referente à regressão linear do método de Kissinger para determinação da energia de ativação para degradação térmica do óleo de coco. . . . .	77
Figura 28 – Gráfico referente à regressão linear do método de Ozawa para determinação da energia de ativação para degradação térmica do óleo de coco. . . . .	78
Figura 29 – (a) Espectros de absorção das reações de transesterificação variando a quantidade de catalisador em 2, 5, 7 e 10% (m/m) na temperatura de 40 °C durante 1 h e (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a). . . . .	79
Figura 30 – (a) Espectros de absorção da reação de transesterificação com proporção molar entre óleo e etanol de 1:5 e tempo de reação de 60 min (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a). . . . .	79
Figura 31 – (a) Espectros de absorção da reação de transesterificação com proporção molar entre óleo e etanol de 1:5 e tempo de reação de 120 min (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a). . . . .	80
Figura 32 – (a) Espectros de absorção da reação de transesterificação com proporção molar entre óleo e etanol de 1:10 e tempo de reação de 60 min (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a). . . . .	80
Figura 33 – (a) Espectros de absorção da reação de transesterificação com proporção molar entre óleo e etanol de 1:10 e tempo de reação de 120 min (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a). . . . .	81
Figura 34 – (a) Espectros de absorção da reação de transesterificação com proporção molar entre óleo e etanol de 1:15 e tempo de reação de 60 min (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a). . . . .	81

Figura 35 – (a) Espectros de absorção da reação de transesterificação com proporção molar entre óleo e etanol de 1:15 e tempo de reação de 120 min (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a). . . . .	82
--	----

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Propriedades físicas e elétricas de diferentes dielétricos. . . . .	14
Tabela 2 – Evolução da produção mundial dos principais óleos vegetais em milhões de toneladas ao longo das últimas cinco safras, da safra de 2018/19 à estimativa para a safra 2022/23. . . . .	16
Tabela 3 – Composição de ácidos graxos presentes no óleo de coco de babaçu. . . . .	19
Tabela 4 – Propriedades químicas, físicas e térmicas do óleo de coco e dos óleos vegetais.	20
Tabela 5 – Reações de transesterificação realizadas em diferentes proporções molares entre óleo e etanol e tempo de reação. . . . .	59
Tabela 6 – Temperatura de máxima degradação para cada amostra em diferentes taxas de aquecimento e energia de ativação das amostras. . . . .	65
Tabela 7 – Parâmetros cinéticos da hidrólise de pNPL usando HPG-LIP. . . . .	70
Tabela 8 – Frequências e informações do espectro FTIR do óleo de coco. . . . .	75
Tabela 9 – Temperatura de máxima degradação para cada amostra em diferentes taxas de aquecimento e energia de ativação das amostras. . . . .	77

## Lista de Abreviaturas e Siglas

MEP	Máquina Elétrica de Potência
TDP	Transformador de Distribuição de Potência
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
OMI	Óleo Mineral Isolante
OV	Óleo Vegetal
OCB	Óleo de Coco de Babaçu
LIP	Lipase
HPG	Poliglicerol Hiper-ramificado
RNA	Rede Neural Artificial
EE	Eficiência de Encapsulamento
LF	Leito Fixo
$^1\text{H}$ -RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
$^{13}\text{C}$ -RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
TGA	Análise Termogravimétrica
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
TMDSC	Calorimetria Exploratória Diferencial com Temperatura Modulada
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
FM	<i>Factory Mutual Global</i>
UL	<i>Underwriters Laboratories</i>
IEC	<i>International Electrotechnical Commission</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
RBD	Refinado, Branqueado e Desodorizado
PVA	Álcool Polivinílico
ES	Complexo Enzima-Substrato
$K_m$	Constante de Michaelis
$V_{máx}$	Velocidade máxima
MLP	<i>Perceptron</i> de Multicamada
MSE	Erro Quadrático Médio
MRE	Erro Relativo Médio
GC	Carbonato de Glicerol
HPG-MA	HPG Metacrilado
GMA	Glicidil Metacrilato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMAP	4-(N, N-dimetilamino) piridina
HCl	Ácido clorídrico
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PEG 200	Polietilenoglicol 200
UV	Ultravioleta
BSA	Albumina de Soro Bovino
AR	Atividade Relativa
$p$ NPL	$p$ -nitrofenil
$p$ NP	$p$ -nitrofenol

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ATR-FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada
$E_A$	Energia de Ativação aparente
TG	Termogravimetria
DTG	Termogravimetria Derivada



4.5.2.3	Reator de leito fixo (LF) . . . . .	42
4.6	Redes neurais artificiais (RNA) . . . . .	43
<b>5</b>	<b>– Materiais e Métodos . . . . .</b>	<b>46</b>
5.1	Síntese do HPG . . . . .	46
5.2	Síntese do HPG metacrilado (HPG-MA) . . . . .	46
5.3	Dispositivo microfluídico e encapsulamento de LIP . . . . .	47
5.4	Caracterização das microcápsulas de HPG-LIP . . . . .	49
5.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) . . . . .	49
5.4.2	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR) . . . . .	49
5.4.3	Análise termogravimétrica (TGA) . . . . .	50
5.4.3.1	Métodos Cinéticos . . . . .	51
5.4.3.1.1	Método de Kissinger . . . . .	52
5.4.3.1.2	Método de Ozawa . . . . .	53
5.4.4	Redes neurais artificiais (RNA) . . . . .	53
5.5	Ensaio de atividade da LIP . . . . .	54
5.5.1	Hidrólise de <i>p</i> -nitrofenil ( <i>p</i> NPL) . . . . .	54
5.5.2	Hidrólise do óleo de coco . . . . .	54
5.6	Reutilização de HPG-LIP . . . . .	56
5.7	Citotoxicidade - método de contato indireto . . . . .	56
5.8	Caracterização do óleo de coco de babaçu (OCB) . . . . .	57
5.9	Transesterificação do óleo de coco . . . . .	57
5.10	Reações de transesterificação . . . . .	58
<b>6</b>	<b>– Resultados e discussão . . . . .</b>	<b>60</b>
6.1	HPG-LIP . . . . .	60
6.2	Caracterização do HPG-LIP . . . . .	60
6.2.1	MEV . . . . .	60
6.2.2	ATR-FTIR . . . . .	62
6.2.3	TGA . . . . .	63
6.2.4	Eficiência do encapsulamento (EE) da LIP . . . . .	67
6.3	Determinação dos parâmetros cinéticos da LIP . . . . .	70

6.4	Determinação da atividade da LIP . . . . .	70
6.5	Reutilização de HPG-LIP . . . . .	73
6.6	Caracterização do OCB . . . . .	74
6.6.1	FTIR . . . . .	74
6.6.2	TGA . . . . .	75
6.7	Reações de transesterificação . . . . .	78
6.7.1	Estudos Preliminares . . . . .	78
6.7.2	Reações de transesterificação . . . . .	78
<b>7</b>	<b>– Conclusões . . . . .</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>– Perspectivas futuras . . . . .</b>	<b>85</b>
	<b>Referências . . . . .</b>	<b>86</b>

# 1 Introdução

A partir do século XX, a humanidade vivenciou as consequências das alterações ambientais ocorridas, principalmente, devido às atividades desenvolvidas pelo homem. A exaustão dos recursos naturais, o aumento crescente da emissão de gases poluentes na atmosfera, a escassez de água, a contaminação do solo, o aquecimento global e o acúmulo de resíduos sólidos são alguns dos principais problemas ambientais enfrentados pela sociedade mundial. Desse modo, a problemática ambiental global desperta grande preocupação em toda a população e exige imediata atenção. Diante disso, torna-se evidente o desafio da humanidade em encontrar soluções viáveis para tentar resolver ou, ao menos, minimizar os problemas ambientais. Desta forma, surge nesse contexto, uma abordagem que visa o desenvolvimento de tecnologias que apresentem a busca simultânea pela inovação e pela melhoria da sustentabilidade, chamada de inovação disruptiva [1]. De acordo com Nasiri, Tura e Ojanen (2017), as inovações disruptivas promovem o desenvolvimento econômico com equilíbrio entre as dimensões social e ambiental, possibilitando assim, a criação de negócios rentáveis que ofereçam a melhoria da qualidade de vida da população, respeitando a diversidade cultural e utilizando os recursos ambientais disponíveis de forma consciente, preservando-os para as presentes e futuras gerações [1].

Convém destacar, tendo em vista o desenvolvimento de tecnologias disruptivas ecologicamente amigáveis, a importância dessa abordagem na produção das máquinas elétricas de potência (MEPs). Há uma ampla gama de MEPs, e podem-se citar como exemplos, os reatores, os disjuntores, os capacitores e os transformadores de distribuição de potência (TDPs) [2, 3]. Dentre esses, o equipamento considerado indispensável no sistema de conversão de energia devido a sua primordial importância é o TDP [4–8]. De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 5356 (1993), o transformador é um equipamento elétrico estático capaz de converter tensão e corrente alternadas, através de indução eletromagnética, entre duas ou mais bobinas, sem interferência na frequência [9]. Desta maneira, a interligação de sistemas elétricos de diferentes níveis de tensão é permitida, tornando possível assim, a geração, transmissão e distribuição de energia elétrica [8, 10].

Como toda MEP, o TDP pode ter sua temperatura elevada durante seu funcionamento, devido à geração de calor. As principais fontes de geração de calor em um transformador são devido às perdas elétricas e magnéticas dos componentes presentes nesse equipamento [4, 7]. O aquecimento do transformador pelo aumento de temperatura pode danificar o isolamento

---

princiando a ocorrência de falhas e envelhecimento do equipamento, prejudicando assim, o tempo de vida do transformador [4, 5, 10]. Para evitar o efeito Joule, que ocasiona temperaturas excessivas no TDP, é necessária a utilização de técnicas eficientes de resfriamento, como por exemplo, o uso de óleos isolantes [4, 5, 10]. Sendo assim, os líquidos dielétricos são empregados nas MEPs, com a finalidade de proporcionar o isolamento elétrico, atuando dessa forma, como um líquido refrigerante [2].

O óleo mineral isolante (OMI) é uma mistura complexa de hidrocarbonetos (naftênicos, parafínicos e aromáticos) de origem petroquímica, amplamente usado como líquido dielétrico nos TDPs, disjuntores, reatores e capacitores isolados por grandes volumes de OMI [2, 11]. Segundo o estudo conduzido por Nunes Jr., Monteiro e Lopes (2005), os equipamentos elétricos instalados em 102 subestações de transmissão de energia operam com cerca de 3.000.000 de litros de OMI somente no estado de São Paulo [12]. Frente ao exposto, é relevante observar o elevado volume de OMI necessário para o funcionamento das diversas máquinas elétricas. Nesse contexto, é interessante destacar que de todas as MEPs que utilizam isolantes como dielétrico, o transformador é o equipamento que envolve a utilização de maior volume de OMI.

Há mais de um século, o OMI é usado como líquido dielétrico no TDP, pois apresenta propriedades físico-químicas e elétricas adequadas ao transformador [4, 5, 7, 8, 10, 13]. Em contrapartida, é importante salientar algumas características negativas inerentes à utilização do OMI, tais como, menor biodegradabilidade, toxicidade, escassez futura, etc [4, 5, 7, 8, 10]. Além disso, o OMI apresenta alto risco de incêndio, uma vez que a ocorrência de falha nos TDPs, isolados por grande volume de OMI, pode causar incêndio seguido de explosão, gerando assim, um sério problema para a segurança das instalações elétricas [8, 10, 12]. Consequentemente, há a possibilidade de ocorrer derramamento de óleo mineral residual para o meio ambiente, situação essa que merece uma maior atenção, pois pode causar sérios riscos a saúde humana e ainda gerar grande contaminação ambiental [8, 12]. Sendo assim, todas essas desvantagens apresentadas pelo OMI encorajaram o desenvolvimento de estudos com a finalidade de investigar fluidos isolantes alternativos [4, 5, 7, 8, 10].

Devido à necessidade de encontrar uma alternativa viável ao óleo de base mineral, a modificação química de óleos vegetais (OVs) com o intuito de obter fluidos isolantes de transferência térmica para as MEPs, por meio do uso de uma matéria-prima de origem renovável, é vista como uma importante abordagem para promover a sustentabilidade. Os líquidos isolantes a partir

de OV são considerados substitutos confiáveis ao OMI, uma vez que apresentam propriedades bastante atrativas: são provenientes de fonte renovável e com grande disponibilidade, apresentam baixa toxicidade, possuem alta biodegradabilidade e pequeno impacto ambiental. Portanto, além desses fluidos alternativos atenderem as características dielétricas, eles ainda possuem altos pontos de combustão, maiores do que 300°C, sendo considerados fluidos de segurança, pois inibem seu flasheamento na presença de uma chama aberta em áreas pouco ventiladas [4, 5, 8, 10].

Um OV que merece especial atenção é o óleo de coco de babaçu (OCB). O babaçu pertence à família *palmáceae* e é nativo das regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste do Brasil, predominando principalmente na região Nordeste [14, 15]. No entanto, embora não tenha sido citado anteriormente, é importante mencionar que Minas Gerais, estado da região Sudeste, merece destaque, uma vez que apresenta uma expressiva área plantada de palmeira de babaçu [15].

Diante das perspectivas apontadas sobre a obtenção de biofluidos para MEP, em particular o TDP, este trabalho consiste em desenvolver modificações moleculares assistidas por computador do OCB aos níveis de epoxidação, alcóxi-hidroxilação e amidação para utilização em TDP, levando-se em conta o desenvolvimento de reações ambientalmente amigáveis pela utilização da catálise enzimática. Apesar de alguns estudos abordarem a obtenção de biodiesel a partir do óleo de babaçu [16–18], o ineditismo deste trabalho se deve basicamente ao fato de não terem sido encontrados, até o presente momento, trabalhos publicados envolvendo modificações moleculares ecologicamente corretas do OCB para obtenção de fluidos isolantes para utilização em TDP. Além disso, não foi encontrado também nenhum estudo envolvendo biofluidos isolantes para TDP baseados no OCB molecularmente modificado por biocatalisadores enzimáticos, até o momento na literatura mundial.

No presente trabalho, primeiramente foi feita a preparação dos biocatalisadores enzimáticos através da microencapsulação da lipase (LIP) usando o poliglicerol hiper-ramificado (HPG) e técnicas microfluídicas guiadas por redes neurais artificiais (RNA). Dessa forma, a originalidade deste estudo ainda decorre da produção das microcápsulas de HPG-LIP aliada a uma RNA. A utilização de RNA consegue prever a eficiência de encapsulamento (EE) da LIP em microcápsulas de HPG. Subsequentemente, foi realizada a síntese do biofluido de OCB em reator batelada, utilizando as microcápsulas de HPG-LIP previamente preparadas.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta Tese consiste em realizar modificações moleculares no óleo de coco de babaçu (OCB), através da reação de transesterificação biocatalítica a fim de se melhorar as características de transferência térmica do OCB.

O produto obtido pode ser chamado de biofluido dielétrico, uma vez que une as características de fluido isolante e biodegradabilidade para utilização segura em transformadores de distribuição de potência (TDP).

### 2.2 Objetivos Específicos

Para atingir os objetivos gerais, os seguintes objetivos específicos são enunciados:

**a)** Desenvolver técnica de preparo de suporte sintético adequado para a imobilização da lipase, enzima cataliticamente ativa em processos de transesterificação.

**b)** Caracterizar o suporte biocatalítico através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho (ATR-FTIR) e análise termogravimétrica (TGA).

**c)** Estudar as reações de transesterificação do OCB em reator enzimático tipo batelada; avaliando o efeito das variáveis/parâmetros reacionais em escala laboratorial.

**d)** Analisar a eficiência de encapsulamento e a capacidade de reuso da enzima imobilizada.

**e)** Determinar os parâmetros cinéticos para a enzima imobilizada.

## 3 Revisão Bibliográfica

### 3.1 Transformador de distribuição de potência (TDP)

As máquinas elétricas de potência (MEPs) são dispositivos capazes de converter energia mecânica em energia elétrica ou vice-versa. O transformador de distribuição de potência (TDP) é uma MEP que realiza essa conversão através de um campo magnético [19]. O TDP é considerado extremamente importante, visto que sua utilização é indispensável no sistema de fornecimento de energia elétrica [4–8, 20, 21]. De acordo com a *International Electrotechnical Commission 60076-1* (IEC, 2011), o transformador de potência é um aparelho estático que, por meio de indução eletromagnética, consegue transformar um sistema de tensão e corrente alternadas em outro sistema com equivalente frequência, porém com valores distintos de tensão e corrente [22]. Essa conversão tem por finalidade a transmissão e distribuição de energia elétrica [22].

Fundamentalmente, o transformador é um dispositivo elétrico constituído por duas ou mais bobinas de fios enrolados ao redor de um núcleo ferromagnético [10, 19]. Esses enrolamentos são eletricamente isolados entre si e possuem diferentes números de espiras [23]. Geralmente, essas bobinas estão conectadas através de um mesmo fluxo magnético dentro do núcleo [10, 19]. Ao enrolamento de entrada, designado como primário, é aplicada uma fonte de tensão alternada, estabelecendo assim, uma corrente [19, 23, 24]. Essa corrente dá origem a um fluxo magnético variável alternado com a mesma frequência da fonte. O fluxo magnético gerado, por sua vez, induz uma nova tensão no enrolamento de saída, denominado secundário, cujo valor vai depender do número de espiras existentes nesse enrolamento, bem como, da magnitude do fluxo e da frequência [19, 23, 24]. Caso haja mais do que dois enrolamentos, o terceiro enrolamento será chamado de terciário, e assim sucessivamente [19, 24]. Em suma, pode-se dizer que o transformador consegue converter a tensão da fonte em uma tensão maior ou menor em relação à tensão primária, consoante o número de espiras presentes nos seus enrolamentos [23].

Devido a sua fundamental relevância na planta de transmissão e distribuição de energia elétrica e da sua complexidade, o TDP é considerado, claramente, o equipamento com maior valor de aquisição utilizado no fornecimento de energia elétrica [4, 6, 25]. Assim sendo, é expectável que os transformadores funcionem de forma confiável e eficiente ao longo de vários anos. À vista disso, é necessário que esse dispositivo seja mantido de maneira adequada, ou seja, em condições de trabalho que possibilitem seu desempenho satisfatório [6, 10]. No entanto, deve-se levar em

conta o fato de que os transformadores operam em situações bastante adversas, a saber: campos elétricos elevados, alta temperatura de trabalho, etc [23]. Diante do exposto, é imprescindível que o transformador apresente certa robustez para vencer os problemas mencionados. Além disso, a manutenção periódica apropriada do equipamento é, indiscutivelmente, uma prática que deve ser realizada com a finalidade de preservar e prolongar a vida útil do TDP, minimizar prejuízos financeiros e reduzir os riscos de uma falha catastrófica inesperada [26].

Como toda MEP, o TDP, em condições normais de funcionamento, pode apresentar perdas de energia elétrica. Segundo a ABNT NBR 5356-1 (2007), existem basicamente três tipos de perdas nos transformadores: perdas em carga, perdas em vazio e perdas totais, essa última refere-se à soma das anteriores [27]. As perdas em carga ou perdas no cobre são as perdas de calor no condutor, sendo causadas pela corrente de carga e correntes parasitas no condutor [28]. Elas podem ser associadas às perdas que ocorrem por Efeito Joule em virtude da resistência ôhmica dos enrolamentos [28, 29]. As perdas em carga são consideradas as mais significativas em relação às demais e dependem da carga elétrica do transformador [28, 29]. Matematicamente, a perda em carga pode ser representada na Equação 1, considerando-se que o transformador apresente os enrolamentos primário e secundário [29].

$$P_{carga} = R_p I_p^2 + R_s I_s^2 + P_{cp} + P_a \quad (1)$$

Sendo que:

$P_{carga}$  = Perdas em carga;

$R_p$  e  $R_s$  = Resistências referentes aos enrolamentos primário e secundário, respectivamente;

$I_p$  e  $I_s$  = Correntes referentes aos enrolamentos primário e secundário, respectivamente;

$P_{cp}$  = Perda por correntes parasitas;

$P_a$  = Perdas adicionais nas ferragens, bobinas, etc.

As perdas em vazio ou perdas no núcleo podem ser subdivididas em dois tipos: perdas por correntes parasitas (efeito Foucault) e perdas por histerese [29]. As perdas por correntes parasitas referem-se às perdas devido ao aquecimento resistivo do núcleo do transformador [19]. Já as perdas por histerese podem ser relacionadas ao aquecimento em virtude da alternância do domínio magnético do núcleo [19]. A Equação 2 apresenta as perdas totais do núcleo do transformador [29].

$$P_{vazio} = P_F + P_H$$

$$P_{vazio} = (2,2 \cdot f^2 \cdot B^2 \cdot d^2 \cdot 10^{-3}) + (K_S \cdot B^{1,6} \cdot f) \quad (2)$$

Sendo que:

$P_{vazio}$  = Perdas em vazio;

$P_F$  = Perda por correntes parasitas;

$P_H$  = Perdas pelo efeito histerese;

$f$  = Frequência;

$B$  = Indução máxima no núcleo;

$d$  = Espessura da chapa;

$K_S$  = Coeficiente de Steimmetz.

Finalmente, pode-se obter a Equação 3 referente às perdas totais ( $P_{total}$ ), somando os dois tipos de perdas analisados.

$$P_{total} = P_{carga} + P_{vazio} \quad (3)$$

No TDP há grande dissipação de energia elétrica e parte significativa dessa energia perdida traduz-se na geração de calor não uniforme ao longo de seus enrolamentos, o que suscita o aumento da temperatura do transformador em funcionamento [4]. O aquecimento do TDP pode gerar falhas e danificar ou até mesmo deteriorar o seu sistema de isolamento, promovendo assim, a diminuição do tempo de vida do equipamento [4, 10]. Com o propósito de controlar essas perdas de energia no TDP, recorre-se ao uso de fluidos dielétricos para a refrigeração desse dispositivo [4]. Óleos isolantes são comumente utilizados como meios de resfriamento térmico e isolamento elétrico em transformadores [4, 5, 10].

O sistema de isolamento e refrigeração é uma das partes mais importantes presentes em um transformador de potência, sendo composto essencialmente por um fluido, geralmente, o óleo mineral isolante (OMI) e por um isolante sólido [30]. A Figura 1 apresenta o transformador e o seu tanque contendo o óleo isolante. É necessário frisar a necessidade de utilizar um óleo isolante, tal como o OMI, nesse sistema devido a ele garantir o isolamento elétrico, bem como, proporcionar uma refrigeração interna eficiente [31]. Desta maneira, uma forma de evitar falhas durante o funcionamento do TDP é realizar o monitoramento e a manutenção periódica do sistema de isolamento e refrigeração. Conseqüentemente, esse procedimento contribui também para o prolongamento da vida útil deste equipamento [26, 30].



**Figura 1** – Transformador de distribuição (a) e tanque contendo núcleo ativo imerso no fluido isolante (b).

**Fonte:** adaptado OMIDO, A. R. [32].

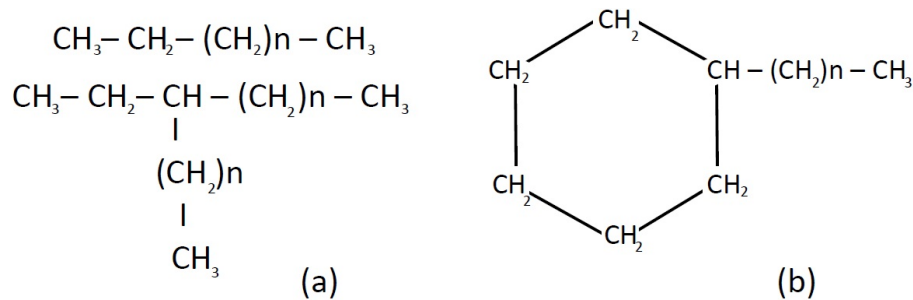
### 3.2 Óleo Mineral Isolante (OMI)

O OMI é usado a cerca de 100 anos como dielétrico líquido em TDP em virtude dele apresentar características físico-químicas e elétricas adequadas ao transformador [5, 8, 10, 33]. Além disso, ele possui a função de atuar como meio isolante e manter a temperatura de operação do transformador sem ultrapassar os limites permitidos [5, 7, 8, 13, 34]. O OMI é obtido através do refinamento de uma fração de hidrocarbonetos compreendida entre 300 °C e 400 °C durante a destilação do petróleo bruto [10,30]. As características deste óleo são determinadas pelo intervalo de ebulição da fração coletada durante o refinamento, bem como, pelo tipo e pelo grau desse processo [10].

Como o OMI é derivado do petróleo, ele é composto por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, que podem ser parafínicos, naftênicos, aromáticos e suas combinações [11, 35, 36]. Ele pode ser classificado como naftênico ou parafínico, de acordo com a ASTM D 2140 (1991), através de medidas referentes à densidade, viscosidade, índice de refração e também por meio da correlação entre estes resultados em um diagrama ternário [37]. Outra maneira de realizar essa classificação é utilizando a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com o propósito de determinar o seu conteúdo parafínico [31].

O OMI classificado como sendo parafínico apresenta em sua estrutura hidrocarbonetos saturados (alcanos) de cadeia linear com ou sem ramificação [30, 38]. Já o OMI naftênico é constituído por hidrocarbonetos saturados de cadeia cíclica com uma ou mais cadeias laterais lineares ou ramificadas [30]. As estruturas dos hidrocarbonetos parafínicos e naftênicos podem ser vistas na Figura 2. Os óleos minerais classificados como naftênicos são os mais usados em

transformadores de potência em virtude de suas propriedades, a saber: baixa viscosidade, baixo ponto de fluidez, melhor poder de solvente, boa condutividade térmica, alto ponto de fulgor, baixo custo de produção em larga escala, dentre outras [30, 38]. Em relação aos óleos minerais parafínicos, por eles apresentarem viscosidade mais elevada e resistirem melhor à oxidação do que os naftênicos, eles são usados em aplicações nas quais a temperatura alcança cerca de 140 °C em uso contínuo, por exemplo [35].



**Figura 2** – Representação da estrutura de hidrocarbonetos parafínicos (a) e naftênicos (b).

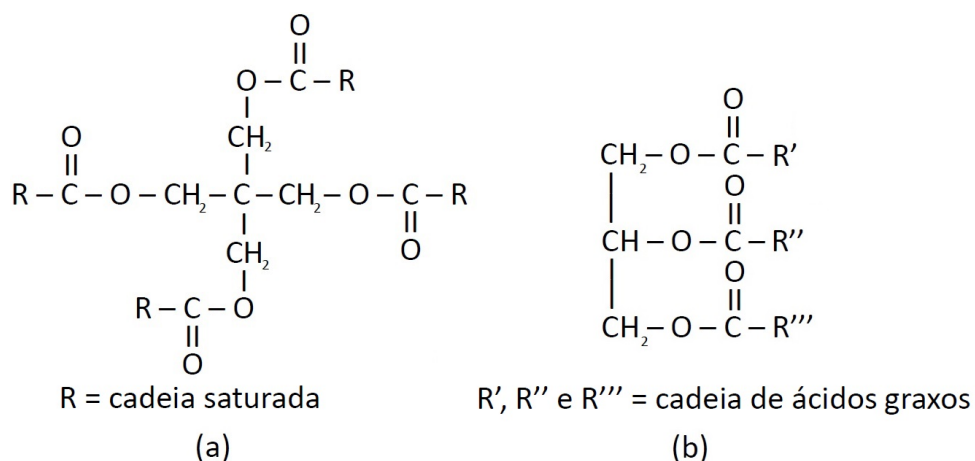
O sucesso da utilização do OMI nos TDPs se deve principalmente à sua disponibilidade e baixo custo, aliado a sua boa performance como dielétrico e seu desempenho no resfriamento [33]. Entretanto, o OMI possui algumas desvantagens, tais como: apresenta baixo ponto de fulgor e fogo e baixa rigidez dielétrica [5, 8, 10]. Além disso, outro ponto que merece destaque, por ser potencialmente negativo em relação à utilização do OMI, está relacionado às questões ambientais, pois esses fluidos dielétricos não cumprem as leis de saúde e as novas leis ambientais, já que este tipo de óleo apresenta baixa biodegradabilidade (o nível não é superior a 30%) [5, 7, 8, 10]. Outra preocupação que deve ser considerada é que o óleo mineral a base de petróleo possui recursos limitados no mundo, o que culmina na sua escassez futura [4, 7]. No contexto ambiental ainda, é importante mencionar que a ocorrência de uma grave falha nos TDPs, isolados por grande volume de OMI, pode acarretar incêndio ou explosão, e como consequência há a possibilidade de rompimento parcial ou total do tanque do transformador, permitindo assim, que o óleo mineral residual vaze para o meio ambiente [8, 12, 34]. Segundo Nunes Jr., Monteiro e Lopes (2005), essa situação é consideravelmente preocupante nas construções feitas antes de 1982, pois as subestações construídas nesse período não possuíam caixas de contenção de óleo [12]. Os problemas causados, em caso de derramamento de óleo na natureza, geram grande preocupação devido ao impacto ambiental ocasionado, o qual reflete diretamente na contaminação do solo e da água do local e nas redondezas do acidente [8, 33].

Portanto, diante das privações enfrentadas com a utilização do OMI em aplicações em

transformadores – limitações dos produtos petrolíferos, baixa biodegradabilidade, material não renovável, problemas de descarte com óleos usados, problemas em caso de derramamento e toxicidade – fica evidente a necessidade de substituir o OMI por fluidos isolantes alternativos [4, 7, 8, 34, 36]. Dentre os fluidos desenvolvidos com este intuito, uma vertente que vem sendo usada a nível mundial é o uso de ésteres naturais produzidos a partir de óleos vegetais (OVs) para dissipação de calor [4, 5, 7, 8, 10, 34, 39, 40].

### 3.3 Fluidos à base de ésteres

Os fluidos baseados em ésteres podem ser usados como dielétricos alternativos em substituição ao uso do OMI em transformadores. Esses compostos são sintetizados a partir de ácidos orgânicos e alcoois, podendo ser classificados como fluidos dielétricos de éster sintético ou de éster natural [10, 36]. Os fluidos de éster sintético são baseados em poliálcool e possuem estabilidade térmica e boas propriedades a baixa temperatura [10]. Já os fluidos isolantes dielétricos de éster natural são à base de sementes de plantas (OV), podendo também ser derivados de gorduras e óleos líquidos [10, 33]. Eles são formados pela ligação química de três ácidos graxos com uma molécula de glicerol, e são conhecidos como triglicerídeos [10, 36]. As estruturas do éster sintético e do éster natural podem ser vistas na Figura 3. Ambos os fluidos de éster possuem propriedades dielétricas apropriadas para serem usados em transformadores elétricos e são mais biodegradáveis do que o OMI [10, 33, 41].



**Figura 3** – Representação da estrutura do éster sintético (a) e do éster natural (b).

### 3.3.1 Fluidos baseados em óleo vegetal (OV)

Tendo em vista a necessidade de buscar alternativas viáveis ao OMI em aplicações em TDP, devido aos diversos problemas associados com a sua utilização, estão sendo estudados vários tipos de líquidos alternativos ao óleo mineral. Com essa perspectiva, a abordagem mais frutífera que surge nesse contexto e merece especial atenção, é o uso de fluidos isolantes dielétricos baseados em OV, uma vez que eles atendem às leis ambientais e apresentam muitos benefícios tanto à segurança quanto à saúde [10, 39, 42]. Além disso, de acordo com Raeisian et al. (2019), o crescente interesse nesses óleos se justifica no fato deles serem considerados candidatos promissores a próxima geração de óleos de isolamento em transformadores [4]. Isso porque eles são biodegradáveis, possuem baixa inflamabilidade, são recicláveis e renováveis, menos tóxicos para o humano e para o meio ambiente (solo e água), e ainda auxiliam na abertura de outro mercado de produtos agrícolas, o que contribui para geração de empregos na área rural [40, 42].

Há muitas pesquisas sendo desenvolvidas com o propósito de estudar a possibilidade de utilizar o OV como substituto do OMI, visto que o uso do OV como dielétrico em transformadores minimizaria os problemas ambientais e contribuiria para o desenvolvimento sustentável. Uma dessas pesquisas foi realizada no trabalho conduzido por Fernandez et al. (2013), no qual foi feita uma investigação à respeito das propriedades e características básicas dos seguintes óleos: girassol, coco, canola, colza, dendê, palma, soja, cártamo, semente de algodão, semente de amendoim e azeite. Os autores concluíram em seu estudo que os óleos de soja, girassol, canola e colza foram os que mostraram as melhores propriedades para produzir fluidos isolantes em aplicações em transformadores de potência [10].

Hossain e Khan (2015) pesquisaram a utilização do óleo de soja, óleo de coco, óleo de palma e do óleo de casca de arroz como alternativas ao óleo mineral em um transformador elétrico. Eles realizaram diversos testes que incluíam: ponto de fluidez, ponto de fulgor, ponto de fogo, viscosidade, tensão de ruptura dielétrica, permissividade e fator de dissipação. De acordo com os resultados encontrados nesse trabalho, foi concluído que os óleos examinados têm potencial para substituírem o óleo mineral como líquido isolante e refrigerante em transformadores, pois a partir dos dados obtidos pôde-se verificar que os OVs investigados possuem propriedades aceitáveis para utilização em equipamentos de alta tensão. No entanto, os autores advertem que os OVs podem ter suas propriedades melhoradas se forem processados e purificados. Sendo

---

assim, eles afirmaram que os OV's apresentam desempenho preferencial quanto comparado ao óleo mineral [43].

Rafiq et al. (2015) realizaram um trabalho de revisão bem abrangente sobre os OV's usados como óleo de transformador e analisaram as suas principais propriedades elétricas, físicas e ambientais. Eles ainda desenvolveram um comparativo entre o desempenho do OV e do óleo mineral, bem como destacaram as principais vantagens do uso do OV como óleo de transformador. Os autores concluíram, após a realização da pesquisa, que os fluidos baseados em OV atendem às exigências de um líquido de transformador ecologicamente correto e, dessa forma, a sua utilização auxilia na redução do impacto ambiental causado pelo uso do OMI [8].

Mariprasath e Kirubakaran (2016) estudaram a viabilidade do uso do OV *pongamia pinnata* não comestível como um dielétrico líquido alternativo em transformadores. Os autores realizaram em seu estudo uma grande revisão das propriedades dos fluidos isolantes alternativos, logo depois fizeram medidas estimativas das propriedades do óleo de *pongamia pinnata* e essas propriedades foram comparadas com as do OMI. Posteriormente, os autores ainda realizaram uma pesquisa sobre a degradação de materiais isolantes imersos no óleo estudado e no óleo mineral usando análises de DRX e MEV. Através desse estudo, a conclusão que os autores chegaram foi a de que o óleo de *pongamia pinnata* poderia ser usado como um fluido alternativo para transformadores de potência [5].

Raeisian et al. (2019) investigaram se o OV de resíduos de ésteres metílicos poderia ser usado como uma alternativa viável na substituição do OMI em transformadores de distribuição. Os autores realizaram um estudo com base em diversas características do material, incluindo: densidade, capacidade de calor, viscosidade, condutividade térmica, tensão de ruptura e ponto de fulgor. Essas características foram comparadas com as do OMI. A partir dos resultados obtidos, os autores conseguiram afirmar que o OV de resíduos de ésteres metílicos é uma alternativa adequada para substituir o uso do óleo mineral como meio de resfriamento em transformadores [4].

Madavan et al. (2022) realizaram um estudo misturando os OV's de azeite de oliva e de coco ao óleo mineral em várias proporções. Os parâmetros analisados neste artigo foram: viscosidade, ponto de fulgor, ponto de ignição, rigidez dielétrica e teor de ácido. Os resultados foram bastante satisfatórios e mostraram que o éster natural produzido apresentou melhor desempenho do que o óleo mineral. Outro ponto levantado no estudo foi que com o aumento da

proporção de mistura, o isolamento líquido do éster melhorou consideravelmente [44].

### 3.3.1.1 Principais propriedades dos fluidos baseados em óleo vegetal (OV)

Os fluidos isolantes dielétricos a base de OV apresentam propriedades excelentes, tais como: biodegradabilidade, baixa toxicidade, renovabilidade, disponibilidade, pequeno impacto ambiental e alto ponto de combustão [21, 36]. Dessa forma, pode-se perceber que os problemas, as limitações e os efeitos negativos inerentes à utilização do OMI, em aplicações no TDP, são resolvidos substituindo o óleo mineral pelo óleo vegetal. Dentre os principais OVs que têm sido utilizados na dissipação de calor nos transformadores de potência, destacam-se os seguintes óleos: soja, girassol, canola, coco, palma, milho, colza e amendoim [10, 38].

Em relação à estrutura, os OVs são triglicerídeos de banda, podendo ser classificados como saturados ou insaturados dependendo da sua composição de ácidos graxos [5]. O que define as propriedades físico-químicas e elétricas desses óleos são os ácidos graxos presentes em sua estrutura [5, 39]. Desta forma, os OVs que apresentam uma maior concentração de ácidos graxos saturados têm maiores valores de viscosidade, ponto de congelamento e ponto de fluidez [5, 10, 39]. Eles ainda apresentam uma melhor estabilidade oxidativa e um alto ponto de fusão [10, 39]. Em oposição, os óleos que possuem uma maior concentração de ácidos graxos insaturados têm menor viscosidade e propriedades melhores a baixa temperatura [5, 10]. Ademais, essa classe é instável à oxidação e possui um baixo ponto de fusão [39].

Os fluidos dielétricos de éster natural baseados em OV apresentam propriedades semelhantes e algumas diferentes em comparação ao OMI. Lewand (2004), em seu estudo, comparou as propriedades do OMI com a do fluido dielétrico de éster natural chamado fluido ECO, baseado em um óleo de canola com alto teor de ácido oleico, e com outros ésteres naturais, a saber: BIOTEMP e Envirotemp FR3 [45]. O BIOTEMP e Envirotemp FR3 são fluidos já comercializados, sendo que o primeiro é uma mistura de óleos de soja, cártamo e girassol com elevado teor oleico e o segundo é baseado no óleo de soja [42]. A Tabela 1 apresenta as principais propriedades físicas e elétricas dos fluidos mencionados presentes nesse estudo [45].

Como pode ser visto na Tabela 1, os ésteres naturais baseados em OV apresentam excelentes propriedades em relação ao óleo mineral convencional [4]. Uma grande vantagem que deve ser destacada é que os ésteres naturais apresentam pontos de fulgor e fogo acima de 300 °C, sendo assim, maiores do que o OMI. Dessa forma, eles atendem as recomendações do Código

**Tabela 1** – Propriedades físicas e elétricas de diferentes dielétricos.

Testes ASTM	OMI	BIOTEMP	Fluido ECO	Envirotemp FR3
Ponto de fulgor (°C), D 92 [46]	>145	328	321	326
Ponto de fogo (°C), D 92 [46]	180 <sup>a</sup>	358	341	362
Tensão interfacial (mN/m), D 971 [47]	>40	26	26	24
Ponto de fluidez (°C), D 97 [48]	≤(-40)	-12 <sup>a</sup>	-12	-21
Viscosidade a 40 °C, D 445 [49]	≤11,0	41,4	92 <sup>b</sup>	33,8
Ruptura do dielétrico (kV), D 877 [50]	≥ 30	38	45	51
Fator de potência a 20-25 °C (%), D 924 [51]	≤0,05	0,0093	0,09	0,061
Fator de potência a 100 °C (%), D 924 [51]	≤0,30	0,590	0,30	1,850
Constante dielétrica a 25 °C, D 924 [51]	2,2	3,1	2,86	3,1
Ruptura por impulso (kV), D 3300 [52]	≥145	134 <sup>c</sup>	148	-

<sup>a</sup> Sem depressores de ponto de fluidez adicionados;

<sup>b</sup> Realizado pelo método ASTM D 88 [53];

<sup>c</sup> Teste executado usando um ponto de polaridade negativa.

**Fonte:** adaptado Lewand, L. R. [45].

Elétrico Nacional dos EUA e podem ser considerados fluidos dielétricos menos inflamáveis, de acordo com a *Factory Mutual Global* (FM) e com o *Underwriters Laboratories* (UL) [33,45].

Conforme pode ser observado na Tabela 1, os valores referentes à constante dielétrica e ao fator de potência a 100 °C para alguns ésteres naturais são maiores do que para o OMI [45]. O aumento do fator de potência em alguns ésteres naturais pode ser justificado devido ao maior conteúdo polar presente neles em relação ao óleo mineral [45]. Podem ser vistos na referida tabela também que o ponto de fluidez e a viscosidade dos ésteres naturais são bem maiores do que para o OMI. O ponto de fluidez de um éster natural não deve ser próximo ao de um OMI, mas deve ser baixo para assegurar que o óleo consiga circular e desempenhe, assim, o seu papel de meio de isolamento e resfriamento [4,45]. Já em relação à viscosidade, um fluido dielétrico deve apresentar viscosidade baixa para que haja uma orientação apropriada do calor dentro do transformador, devido a esse parâmetro estar associado às funções de resfriamento [4,45]. Diante disso, um fluido com menor viscosidade promove uma dissipação de calor mais eficiente [45]. Dessa maneira, não é possível usar um éster natural diretamente como substituto do OMI em transformadores [45]. Para que isso seja viável é necessário que esses ésteres sejam aperfeiçoados, o que é feito, normalmente, através do processo de transesterificação [4].

Os OV's apresentam alta quantidade de ácidos graxos livres e, em virtude disso, se eles forem usados nos transformadores sem a realização de um pré-tratamento, eles poderiam provocar problemas no equipamento [4,54]. Esses ácidos graxos livres poderiam, por exemplo, reagir com as partes metálicas do transformador e formar sal, danificando, desse modo, o transformador [4]. Frente a isso, o processo de transesterificação é muito usado para evitar esse problema, pois ele

possibilita que os ácidos graxos livres presentes no OV reajam com álcool na presença de um catalisador, formando ésteres e glicerol [54]. Esse processo consegue diminuir a viscosidade do OV significativamente, permitindo assim, a circulação do óleo dentro do transformador de maneira mais rápida e eficiente [4].

### 3.3.2 Produção mundial de óleos vegetais (OVs)

Segundo o *United States Department of Agriculture* (USDA, 2023), nas safras de 2016/17 à safra 2022/23, o principal produtor mundial de OV é claramente a Indonésia com participação de 23,84% da produção global atual (2022/23), equivalente a 51,57 milhões de toneladas [55]. A China (13,09%), Malásia (9,96%), União Europeia (8,84%), Estados Unidos (6,14%), Brasil (5,41%) e outros (32,72%) também se destacam na produção de OV no mundo [55]. Em relação ao consumo doméstico, de acordo com projeções de abril 2022/23 do USDA (2023), o maior consumidor de OV global é a China que consome 39,61 milhões de toneladas (19,06%), seguido da União Europeia (12,22%), Índia (11,13%), Indonésia (11,08%), Estados Unidos (8,98%), Brasil (4,80%) e outros (32,73%) [55].

Conforme o USDA (2023), os principais OVs incluem: algodão, amendoim, coco, colza, girassol, oliva, palma, palmiste e soja [55]. O óleo de palma é atualmente o OV mais produzido (Tabela 2) e consumido no mundo, de acordo com as estatísticas do USDA (2023) [55]. A produção do óleo de palma, também conhecido no Brasil como dendê, na safra de 2022/23 do mês de abril foi de 77,56 milhões de toneladas [55]. A partir da observação da Tabela 2, é possível verificar que a participação dos óleos produzidos a partir da palma, ou seja, o óleo de palma e de palmiste, possuem um percentual atual de aproximadamente 40% da produção mundial, enquanto o óleo de soja possui apenas cerca de 30%, sendo o segundo óleo mais produzido no mundo [55].

Os maiores produtores de óleo de palma no mundo são países localizados no sudeste asiático, a Indonésia e a Malásia, responsáveis por aproximadamente 85% da produção mundial [55]. A Tailândia, Colômbia e Nigéria representam 7,9% da produção, e os 7,1% restantes são divididos entre 36 países, incluindo o Brasil [55, 56]. No Brasil, 88% da plantação de palma está no Pará, seguido dos estados da Bahia (11%) e de Roraima (1%) [57]. O óleo de palma é empregado em diversas áreas industriais, a saber: cosméticos, higiene, limpeza, alimentos, têxtil, siderurgia, biodiesel e farmácia [57]. Dentre essas utilizações, o uso para fins alimentícios merece destaque, pois é a aplicação mais expressiva, estima-se que mais de 70% do óleo de

**Tabela 2** – Evolução da produção mundial dos principais óleos vegetais em milhões de toneladas ao longo das últimas cinco safras, da safra de 2018/19 à estimativa para a safra 2022/23.

Produção/Ano	2018/19	2019/20	2020/21	2021/22	Abril 2022/23	Partic. (%) 2022/23
Palma	74,17	73,04	73,09	74,05	77,56	35,86
Soja	56,07	58,50	59,27	59,14	59,27	27,41
Canola/Colza	27,98	28,30	29,28	29,00	32,36	14,96
Girassol	19,62	21,13	19,03	19,85	20,58	9,52
Palmiste	8,58	8,52	8,43	8,47	8,85	4,09
Amendoim	5,83	6,22	6,40	6,42	6,39	2,95
Algodão	4,94	5,09	4,81	4,96	4,95	2,29
Coco	3,79	3,61	3,58	3,73	3,70	1,71
Oliva	3,16	3,15	2,93	3,27	2,61	1,21
Total	204,14	207,56	206,82	208,89	216,27	100,00

Fonte: adaptado USDA [55].

palma produzido no mundo seja destinado à alimentação [56, 57]. A palma apresenta muitas vantagens, sendo que as principais são: [56]

- A cultura da palma tem importante papel social, uma vez que consegue reduzir a pobreza das regiões produtoras e evitar o êxodo rural;
- A área necessária para o plantio da palma é bem menor do que para outras oleaginosas, sendo que algumas culturas precisam de áreas 10 vezes maiores do que é necessário para a palma;
- A palma é fonte de energia renovável e possui grande desempenho ambiental.

Apesar das inúmeras vantagens decorrentes do plantio da cultura de palma, os efeitos negativos também devem ser considerados devido aos enormes prejuízos causados ao meio ambiente. A expansão do plantio da palma, em virtude do aumento do consumo global do óleo, promove o aumento do desmatamento, o qual por consequência gera sérios problemas ambientais, como por exemplo, mudanças climáticas, perda da biodiversidade, aumento da emissão de gases de efeito estufa em razão dos incêndios realizados para limpar a área da floresta, a qual será usada para aumentar a produção do óleo de palma, dentre outros [58].

### 3.3.3 Produção de óleos vegetais (OVs) no Brasil

No Brasil, segundo projeções do USDA (2023) da safra de abril de 2022/23, foram produzidos 10,26 milhões de toneladas de OV e o consumo doméstico no país foi de 9,8 milhões de toneladas [55]. O óleo de soja é claramente o mais produzido e consumido no país, sendo que a produção estimada para a safra 2022/23 prevê o valor de 7,93 milhões de toneladas, dos quais

7,95 milhões de toneladas devem ser consumidos internamente [55].

A soja é uma oleaginosa que possui baixo rendimento na produção de óleo por tonelada de matéria-prima. A produção do óleo de soja por hectare é inferior ao do óleo de palma, uma vez que o rendimento da palma é cerca de quatro vezes o da soja. Isso pode ser justificado devido ao fato da soja não apresentar um adensamento energético bom em comparação com outras oleaginosas. Apesar disso, deve-se levar em conta que a soja apresenta várias vantagens, que incluem: baixo custo e manejo fácil durante a sua produção [59].

Embora a soja tenha origem em regiões de clima temperado, após um melhoramento genético, essa oleaginosa começou a ser cultivada em climas subtropical e tropical [60]. De acordo com a previsão da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2023), a região Centro-Oeste foi a principal produtora de soja em 2022/23, apresentando uma participação de 49,70%, em seguida, aparecem as regiões Sul, Nordeste, Sudeste e Norte, com 25,66%, 9,90%, 8,53% e 6,21% da produção nacional, respectivamente [61]. O óleo de soja extraído do grão de soja é destinado à produção de biodiesel, além de ser empregado no setor alimentício e ser usado em diversos setores industriais, tais como, farmacêutico, cosmético, adubos, veterinária, tintas e vernizes, etc [62].

Além dos óleos de soja e de palma, outros OV's também são produzidos no Brasil. Dentre esses OV's, vale destacar, o óleo de algodão e o de amendoim, com estimativa de safra para 2021 de 656 mil toneladas e 59 mil toneladas, respectivamente [63, 64]. Ademais, há no país produção de óleo de palmiste, girassol, oliva, coco, canola, dentre outros. No entanto, não estão disponíveis os dados da produção desses OV's concernentes às safras atuais na fonte especializada no setor.

No Brasil, o OV que vem ganhando destaque é o óleo de coco de babaçu (OCB). Os frutos da palmeira de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius), de onde é extraído o OCB, pertencem à família *palmáceae* [14]. O coco de babaçu possui quatro partes que podem ser aproveitadas, a saber: endocarpo (59%), mesocarpo (23%), epicarpo (11%) e amêndoa (7%) [15]. Cada amêndoa do coco pesa, aproximadamente, 3 a 4 g e é constituída por cerca de 60 a 68% de óleo, podendo atingir 72% em condições mais benéficas para plantio da palmeira [15].

O babaçu é uma planta nativa brasileira, considerada um dos principais produtos da extração vegetal do país [65]. As palmeiras de babaçu estão localizadas nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste. Dentre essas regiões, o maior produtor de babaçu do país é o Nordeste, sendo que o estado que possui mais produtividade é o Maranhão [15, 66]. Em relação à área

plantada, o Nordeste possui aproximadamente 12 milhões de hectares plantados da palmeira de babaçu [67]. O estado de Minas Gerais merece especial atenção por ser o único da região Sudeste que apresenta uma significativa área plantada pela palmeira de babaçu [15].

Em 2007, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de babaçu no Brasil chegou a 114.874 toneladas de amêndoas de babaçu [66]. No ano de 2011, a amêndoa de babaçu foi considerada o segundo maior produto florestal não madeireiro, logo depois do açaí [65], com uma produção de 102.499 toneladas de babaçu [66]. No ano de 2017, segundo o IBGE, a produção da amêndoa de babaçu decaiu consideravelmente, atingindo menos que a metade da produção de 2007, a produção anual resumiu-se a 54.330 toneladas, sendo que a região Nordeste apresentou 95% da produção desse ano [66]. No ano de 2018, a produção da amêndoa de babaçu foi de aproximadamente 50.800 toneladas [66]. A quantidade produzida de amêndoa de babaçu em 2019 foi de 48.706 toneladas [66]. A região Nordeste continuou sendo o maior produtor de amêndoa de babaçu com 98,97% da produção nacional, sendo que o Maranhão permaneceu o estado com maior produção (92,7%) [66]. As outras regiões que também produziram amêndoa de babaçu em 2019 foram a Norte (0,87%), Sudeste (0,15%) e Centro-Oeste (0,01%) [66]. Em relação à utilização do OCB, ele é usado amplamente na produção de cosméticos, produtos farmacêuticos e para fins alimentícios [15].

#### 3.3.4 Fluido dielétrico baseado no óleo de coco de babaçu (OCB)

O óleo de coco é um éster natural totalmente biodegradável, não tóxico, usado para fins alimentícios, encontrado principalmente em países tropicais [7]. A Tabela 3 apresenta a composição de ácidos graxos presentes no óleo de coco [68]. Diferentemente dos outros OV, o óleo de coco apresenta elevada porcentagem de ácido graxos saturados, sendo o ácido láurico (C12:0) o mais predominante. A maior quantidade de ácidos graxos saturados suscita no aumento do seu ponto de fusão e, dessa forma, como há uma maior estabilidade óleo-ar, a resistência à oxidação é mais fraca [7, 68, 69].

O óleo de coco pode ser classificado em três principais categorias, a saber: óleo de coco virgem, óleo de copra e óleo de coco refinado, branqueado e desodorizado (RBD) [7]. Essas classificações são feitas conforme o processo de fabricação desse óleo [7, 68, 70]. O óleo de coco virgem é produzido a partir do método úmido, no qual o óleo é extraído da amêndoa de coco fresco e maduro, sendo que o seu preparo não inclui o refino e modificações do óleo [7, 68, 70]. O óleo de copra é obtido pelo método seco, em que a amêndoa do coco fresco é aquecido e

**Tabela 3** – Composição de ácidos graxos presentes no óleo de coco de babaçu.

Ácidos graxos	Nome comum	Composição (%)
Capróico	C6:0	ND
Caprílico	C8:0	5,0
Cáprico	C10:0	6,0
Láurico	C12:0	44,0
Mirístico	C14:0	17,0
Palmítico	C16:0	8,0
Palmitoleico	C16:1	ND
Margárico	C17:0	ND
Heptadecenóico (cis-10)	C17:1	ND
Esteárico	C18:0	4,5
Oleico	C18:1	14,0
Linoleico	C18:2	2,0
Linolênico	C18:3	ND
Araquídico	C20:0	ND

ND: não detectável, definido como  $\leq 0,05\%$

**Fonte:** adaptado Lima, J. R. O. et al. [67]

seco [7, 70]. Já o óleo do tipo RBD é produzido através do refino, branqueamento e desorização do óleo extraído da copra [7, 70].

Algumas propriedades do óleo de coco e dos óleos vegetais podem ser vistas na Tabela 4. A propriedade física mais importante desse óleo é o ponto de fluidez que é relativamente alto em comparação com os demais OV's, fato esse que também está relacionado à alta quantidade de ácidos graxos saturados presentes em sua composição, sendo esse o seu principal ponto negativo [7, 68]. Apesar do óleo de coco apresentar alto ponto de fluidez, não foi informado ocorrência de problemas relacionados a essa questão nos transformadores protótipos em operação na área de Wathara em Kesbewa, Sri Lanka, desde janeiro de 2001, preenchidos com óleo de coco do tipo RBD (Figura 4) [7, 68]. Contudo, caso seja necessário, é possível reduzir o ponto de fluidez do óleo através de modificação química ou adição de aditivos adequados [7, 68].

**Tabela 4** – Propriedades químicas, físicas e térmicas do óleo de coco e dos óleos vegetais.

Propriedade	Óleo de coco refinado	Óleos vegetais
Viscosidade a 40 °C (cSt)	29	33-45
Viscosidade a 100 °C (cSt)	2,4	4-8
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	0,92	0,87-0,92
Ponto de fluidez (°C)	23	-19 a -33
Ponto de fulgor (°C)	298	315-328
Ponto de fogo (°C)	329	350-360
Rigidez dielétrica (kV)	60	74
Condutividade térmica (W/m · K)	0,321	0,16-0,17

**Fonte:** Matharage, B.S.H.M.S.Y. et al. [7]; Mahanta, D. K. et al. [21] e Kumar, A. D. et al. [68]



**Figura 4** – Transformador preenchido com óleo de coco instalado em 2001 em Wathara, Kesbewa, Sri Lanka.

**Fonte:** Matharage, B. S. H. M. S. Y. et al. [7].

Grande parte das propriedades apresentadas pelo óleo de coco (Tabela 4) está dentro dos valores estabelecidos pela IEC 60296 (2003), como é o caso do ponto de fulgor, ponto de fogo e rigidez dielétrica [71]. No entanto, a viscosidade do óleo de coco é maior do que o recomendado, porém, ainda é menor em comparação com outros OV's, de acordo com a referida tabela [7]. O óleo de coco também por possuir maior percentual de ácidos graxos livres, apresenta uma condutividade mais elevada, o que pode ser melhorada por meio da desidratação e da neutralização [7].

Muitas pesquisas sobre o potencial do óleo de coco como dielétrico alternativo ao OMI foram realizadas [7, 21, 69, 72–79]. Nos trabalhos desenvolvidos, foi possível mostrar que o óleo de coco é capaz de substituir o óleo mineral convencional nos transformadores de potência

[7, 21, 69, 72–79]. Apesar dos resultados positivos obtidos nessas pesquisas, deve-se salientar que os óleos de coco não foram utilizados diretamente nas aplicações nos TDPs, eles foram submetidos a processos adicionais antes de serem usados nesses equipamentos [72, 74, 75]. Dentre os procedimentos adicionais utilizados, pode-se citar: purificação, neutralização e tratamento térmico [72, 74, 75]. Outros métodos que podem ser usados para melhorar as propriedades dos OV's são: modificações químicas por meio da epoxidação, transesterificação e modificação estrutural [80]. Esses processos foram realizados com o propósito de adequar as propriedades do óleo de coco ao padrão e atender as especificações recomendadas, a fim de torná-lo capaz de desempenhar as funções pertinentes aos óleos de transformadores. Através da implementação desses tratamentos foi possível melhorar a rigidez dielétrica e diminuir a condutividade e acidez do óleo de coco [72, 74, 75]. Não obstante, existem vários trabalhos sobre a utilização do óleo de coco como fluido isolante em transformadores elétricos, o uso do OCB, nesse contexto de estudo, é mais recente e ainda muito incipiente [81, 82]. O desenvolvimento de fluidos isolantes para utilização em TDP baseados em OCB pode ser realizada utilizando enzimas, o que por sua vez, contribui para a produção de óleos isolantes ecologicamente corretos.

## 4 Fundamentos do cálculo de reatores

Considerando que a utilização da enzima livre encarece o processo devido ela possuir elevado preço e o Brasil ainda não tê-la em quantidade industrial suficiente, então, nesse trabalho, optou-se por utilizar o método microfluídico para encapsulação da lipase (LIP) em microcápsulas de poliglicerol hiper-ramificado (HPG) que serão utilizadas, posteriormente, como biocatalisadores enzimáticos na síntese do biofluido isolante baseado no OCB em um reator batelada. Além disso, nesse trabalho, houve a necessidade de empregar a rede neural artificial (RNA) com o propósito de otimizar os parâmetros celulares microfluídicos para imobilizar a LIP. Diante do exposto, este capítulo destaca os principais tópicos relacionados com essa pesquisa.

### 4.1 Enzimas

Desde a antiguidade, as enzimas presentes na natureza eram utilizadas nas mais diversas atividades como, por exemplo, na produção: do queijo, da massa fermentada, da cerveja, do vinho, etc [83, 84]. Um grande marco da história da enzima foi quando Eduard Buchner, em 1897, conseguiu extrair enzimas presentes na célula de levedura, responsáveis por catalisar a fermentação alcoólica, provando, dessa maneira, que essas moléculas eram capazes de fermentar o açúcar em álcool, mesmo depois de serem removidas [85]. Somente depois de anos, o termo enzima foi utilizado por Frederick W. Kühne para denominar as moléculas detectadas por Buchner [85]. Em 1926, J. B. Summer apresentou indícios da natureza proteica das enzimas, no entanto, essa ideia não foi aceita na época em questão [85]. Apenas na década de 1930 é que definitivamente foi estabelecida por J. Northrop e Moses Kunitz que as enzimas eram proteínas [85].

Com o decorrer dos anos, o progresso da biotecnologia moderna possibilitou o desenvolvimento de enzimas com propriedades mais sofisticadas e adaptáveis as novas condições dos processos industriais, o que tornou viável a introdução das enzimas em um maior número de aplicações que antes elas não poderiam ser inseridas [84, 86]. Desse modo, as enzimas são extremamente importantes e podem ser exploradas em ampla gama de aplicações nos mais diversos setores, a saber: produção de alimentos, produção de bebidas, produção têxtil, produção de papel e celulose, produção de detergente, produção de produtos farmacêuticos, produção de produtos químicos, produção de cosméticos, etc [83, 87–91].

Nesse contexto, é notável o avanço das enzimas frente aos catalisadores químicos em razão das suas excelentes propriedades que incluem: elevada atividade, seletividade e especificidade [90, 92, 93]. Ademais, essas biomoléculas ainda permitem que as reações sejam realizadas com um número menor de etapas e empregando pequenas quantidades de reagentes tóxicos e perigosos, pois as enzimas atuam como catalisadores altamente versáteis [90, 93]. As enzimas também são consideradas catalisadores sustentáveis por serem biocompatíveis, biodegradáveis e serem produzidas a partir de matérias-primas renováveis [94]. Sendo assim, os processos catalisados por enzimas, além de serem limpos, ainda conseguem sintetizar produtos com a mesma, ou melhor, qualidade do que os processos convencionais, e com economia de matéria-prima, energia, produtos químicos e água [91]. À vista disso, o uso das enzimas é muito vantajoso, uma vez que o processo enzimático é ecologicamente correto e viabiliza a redução de custos [90, 94].

## 4.2 Imobilização de enzimas

Não obstante todas as vantagens apresentadas pelas enzimas, a sua aplicação em escala industrial é ainda bastante prejudicada em razão das suas limitações, como: baixa estabilidade térmica em longo prazo, difícil recuperação, perda da sua atividade catalítica após um ciclo e estreita faixa de pH [83, 88, 92, 94, 95]. Em virtude desse cenário, uma ferramenta altamente eficaz vem sendo desenvolvida com a finalidade de melhorar significativamente as propriedades enzimáticas e superar essas deficiências, é a chamada imobilização enzimática [83, 88, 90, 92, 95, 96]. Nessa técnica, as enzimas são ligadas a um suporte sólido insolúvel no meio reacional [90].

A imobilização enzimática em aplicações industriais é demasiadamente benéfica, pois possibilita a ocorrência de processos contínuos, melhora a acessibilidade da enzima aos substratos, facilita o manuseio mais conveniente da enzima, por ela estar em uma conformação sólida, etc [83, 93, 94]. Essa técnica ainda apresenta inúmeras vantagens que incluem: a melhoria da estabilidade, atividade, especificidade e seletividade das enzimas, aumento da tolerância ao pH e à temperatura, aperfeiçoamento da capacidade de reutilização da enzima por um longo período de tempo, facilidade em separar o substrato do produto ao final do processo e obtenção de produtos com maior pureza [83, 87, 90, 92–94, 96–98]. Além disso, as enzimas imobilizadas também são termoestáveis, proporcionando, dessa forma, que elas possam ser armazenadas por um tempo maior do que as enzimas não imobilizadas [99]. Assim, as enzimas imobilizadas se mostram mais robustas e resistentes às mudanças ambientais do que as enzimas livres presentes

em solução [83]. Por estas razões, a imobilização enzimática é muito utilizada, uma vez que torna o processo menos oneroso e mais competitivo [87, 90, 97].

#### 4.2.1 Materiais de suporte para imobilização enzimática

A respeito dos materiais empregados como suportes na imobilização enzimática, uma ampla diversidade de materiais está atualmente disponível para este fim, sendo divididos como: orgânicos, inorgânicos, híbridos e compósitos [90]. Esses materiais podem ser classificados em dois grandes grupos, a saber: materiais clássicos e novos materiais. Os materiais clássicos são os mais comumente usados, enquanto os novos são aqueles materiais que são projetados com propriedades específicas para serem utilizados em uma determinada aplicação [90].

Os materiais clássicos orgânicos usados como suporte se subdividem em: materiais sintéticos e materiais renováveis de origem natural [90]. Dentre os materiais sintéticos mais empregados como suportes, encontram-se os polímeros sintéticos. Esses polímeros são desenvolvidos por meio da reação de polimerização, a qual possibilita a seleção dos monômeros desejados para satisfazer os requisitos tanto da enzima que será usada quanto do processo no qual a enzima imobilizada será aplicada [89, 90, 95]. Existe uma grande variedade de grupos funcionais presentes na estrutura dos polímeros que incluem: hidroxila, carboxila, epóxi, amina, diol, grupo carbonila, grupos alquila hidrofóbicos e grupos terciária amina [89, 90]. Esses grupos exercem uma forte interferência no tipo de imobilização que será aplicado, pois são eles que promovem uma interação mais favorável e eficaz com a enzima, além de possibilitarem a ocorrência da funcionalização da superfície do polímero [90]. Ademais, a quantidade e o tipo de grupos funcionais existentes nesses polímeros estabelecem o caráter hidrofílico/hidrofóbico do suporte, e assim, a sua capacidade de determinar interações polares ou hidrofóbicas com a superfície das enzimas [89, 90]. As enzimas são imobilizadas com polímeros sintéticos principalmente pelos métodos de adsorção e mediante ligações químicas covalentes [90]. O uso dos polímeros sintéticos como suporte contribui para a obtenção de uma enzima imobilizada com melhor estabilidade térmica e um longo tempo de uso [90]. Entretanto, apesar disso, deve-se salientar que esse tipo de suporte é considerado dispendioso e requer um maior período de preparação [90]. Os polímeros sintéticos normalmente usados são: álcool polivinílico (PVA), poli (metilacrilamida), polipropileno, resinas, etc [83, 89, 90, 95]. O HPG também pode ser empregado como suporte para imobilização de enzimas.

Uma opção atrativa ao uso de polímeros sintéticos, como suporte de imobilização de

enzimas, é a utilização de biopolímero [89, 90]. Os biopolímeros são polímeros naturais que possuem muitas vantagens, tais como, biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade, fácil obtenção e baixo custo [90]. Outra característica importante é que a estrutura dos biopolímeros é constituída por uma grande variedade de grupos funcionais reativos (grupos carbonila, hidroxila e amina), o que estabelece uma reação direta entre a enzima e o suporte [90]. Além disso, eles ainda apresentam elevada afinidade com proteínas devido à sua estrutura química, o que resulta em uma interação mais adequada com as enzimas, favorecendo uma maior atividade catalítica no processo de imobilização enzimática [83, 90]. Os biopolímeros são usados como suportes na imobilização por adsorção, ligação covalente e aprisionamento [90]. Alguns exemplos de biopolímeros são: celulose, colágeno, quitosana, queratina, proteínas, alginato, dextrano, agarose, etc [83, 89, 90, 94, 97].

Entre os materiais inorgânicos mais usados como suporte na imobilização de enzimas, pode-se citar a sílica, pois ela apresenta elevada resistência térmica e química, alta área superficial, estrutura porosa, alta disponibilidade, baixo custo, bem como ótimas propriedades mecânicas e, assim, pode ser empregada em uma ampla quantidade de aplicações [83, 90, 95]. O uso da sílica como suporte permite que os sistemas biocatalíticos desenvolvam uma maior retenção de atividade catalítica, uma melhor resistência térmica e de pH [90]. Outro ponto positivo é a possibilidade de a sílica ser usada de muitas maneiras diferentes como suporte que incluem: sílica sol-gel, nanopartículas de sílica coloidal, sílica gel, etc [90, 93].

Os minerais são também materiais inorgânicos usados como suportes no processo de imobilização enzimática. Em geral, as vantagens inerentes ao seu uso são: disponibilidade, alta biocompatibilidade, estabilidade térmica, resistência mecânica, baixo custo, etc [90, 95]. Dentre os minerais, os mais utilizados são os materiais argilosos, tais como, bentonita, caulita, montmorilonita, mica, mulita, hidroxiapatia e outros [90, 95]. Normalmente, os minerais são empregados como suportes na imobilização de enzimas com a finalidade de realizar tratamentos de resíduos e efluentes, biossensores, etc [90]. Outro material inorgânico é o material baseado em carbono que também é muito usado como suportes de enzimas imobilizadas, em razão da sua estrutura porosa, elevada área superficial, alta capacidade de adsorção e presença de vários grupos funcionais [90]. Em geral, é utilizado principalmente o carvão e o carvão ativado modificado ou não [90].

Em relação aos suportes classificados como novos materiais orgânicos, vale destacar: os

materiais eletrofiados e as membranas poliméricas. Já os suportes empregados na imobilização de enzimas pertencentes à classe dos novos materiais inorgânicos podem-se citar: as partículas magnéticas, os materiais mesoporosos, as nanopartículas, os materiais cerâmicos, os nanotubos de carbono, o grafeno e o óxido de grafeno [90]. Além desses materiais mencionados, ainda existem outros novos materiais que incluem: os materiais híbridos orgânicos-orgânicos, híbridos orgânicos-inorgânicos e híbridos inorgânicos-inorgânicos [90].

À vista da ampla quantidade de materiais de suporte existentes, deve-se selecionar o material mais adequado para desempenhar o papel de suporte de acordo com a aplicação a qual a enzima imobilizada será destinada [90]. É necessário escolher um material de suporte que apresente grupos funcionais que consigam reagir com os grupos presentes na superfície da enzima, desde que esses grupos reativos não afetem a sua estrutura [90, 92]. Além disso, é preciso que os suportes apresentem também essa série de fatores: estabilidade térmica e química, regeneração, reutilização, disponibilidade, baixo custo, insolubilidade sob condições de reação, biocompatibilidade, etc [90, 92].

Em suma, é importante enfatizar que o material de suporte usado exerce forte influência nas propriedades inerentes do sistema biocatalítico e, por isso, é imprescindível que a seleção desse material seja feita de forma minuciosa, atentando-se sempre aos requisitos requeridos para sua utilização [90]. Sendo assim, as propriedades tanto da enzima quanto do material do suporte possibilitam uma interação adequada entre ambos, o que reverbera na obtenção de uma enzima imobilizada que possua características químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas apropriadas para uma finalidade específica [83, 89, 94].

#### 4.2.1.1 Poliglicerol hiper-ramificado (HPG)

O HPG é um polímero hiper-ramificado que tem recebido grande atenção do ponto de vista científico e industrial, nos últimos anos, em uma ampla gama de aplicações tecnológicas e na medicina avançada, por ser considerado um biomaterial promissor com excelente biocompatibilidade, estabilidade química, baixa toxicidade e rota sintética simples [100–102]. Além disso, o HPG ainda possui backbone de poliéter alifático altamente flexível, vários grupos hidrofílicos, morfologia tridimensional esférica e numerosos grupos de hidroxila para posterior funcionalização [103, 104].

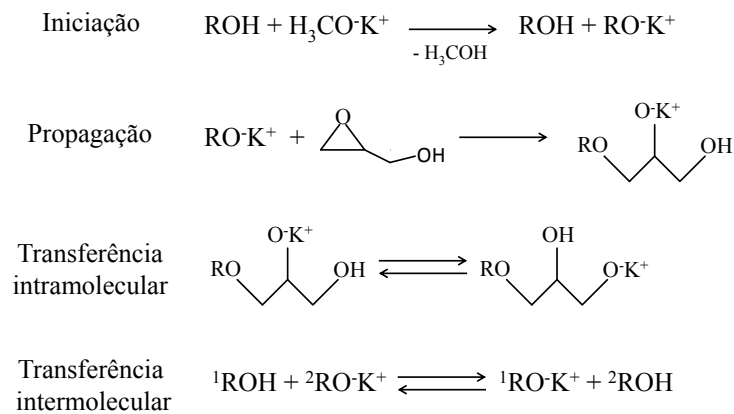
Os HPGs constituem uma classe de polióis de poliéter sintetizados por condições de

reação de esterificação com a participação de grupos hidroxila primários e secundários do glicerol [105]. Em geral, o HPG é sintetizado a partir de monômeros, sendo o glicidol o mais empregado na sua produção [106, 107]. Apesar disso, o glicidol representa uma ameaça ao meio ambiente [107]. Dessa forma, uma alternativa relativamente interessante é utilizar o carbonato de glicerol, um monômero preparado utilizando glicerol, e considerado ecologicamente correto [106, 107]. O glicerol é um subproduto formado na indústria de biodiesel, sendo um material bastante atraente para síntese de novos monômeros e polímeros devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade [106].

Uma possível maneira de sintetizar polímeros hiper-ramificados é através da polimerização por abertura de anel de monômeros do tipo AB<sub>2</sub> ou também chamada de polimerização por abertura de anel multi-ramificado [108]. Essa abordagem tem mostrado um alto potencial para síntese controlada de polímeros hiper-ramificados [108]. A polimerização por abertura de anel pode ser catiônica ou aniônica, contudo, somente pelo método aniônico são sintetizados poligliceróis com pesos moleculares e estrutura desejáveis [109].

O processo de polimerização, geralmente, acontece em três etapas, a saber: iniciação, propagação e término [110]. Na primeira etapa, é empregado um álcool, como iniciador, que será parcialmente desprotonado por uma base forte, formando assim, o alcóxido que será usado para iniciar a polimerização [108, 110]. De acordo com pesquisas realizadas, pode-se dizer que somente 10% da desprotonação do grupo hidroxila são o suficiente para começar o processo de polimerização [107, 108]. É interessante mencionar que a desprotonação parcial permite que haja controle da concentração de sítios ativos no processo de polimerização, o que resulta no crescimento de todas as extremidades da cadeia, e também é possível ter controle do peso molecular e estreitamento da polidispersidade [107, 108, 110]. Na próxima etapa da polimerização, há a adição lenta do monômero e, assim, o alcóxido reage com o anel epóxido do monômero por meio de seu grupo terminal não substituído, formando um alcóxido secundário [107, 108]. De acordo com o mecanismo representado na Figura 5, esperava-se que a polimerização progredisse através do alcóxido recém-formado no hidróxido secundário, formando, dessa maneira, polímeros lineares [110]. Entretanto, a rápida troca de prótons durante a reação de polimerização de epóxido acontece entre alcóxidos secundários e primários e as diferentes extremidades da cadeia crescem concomitantemente, gerando assim, estruturas com ramificações [103, 107, 110]. A transferência de prótons ocorre por meio intra e intermolecular e acarreta no crescimento dos grupos hidroxila existentes [107]. A adição completa do monômero viabiliza a continuação da reação até que todo

monômero seja consumido [110]. A última etapa do processo de polimerização acontece quando a reação é extinta com a adição de uma resina de troca iônica com a função de neutralizar os alcóxidos [110].



**Figura 5** – Representação do mecanismo da polimerização aniônica por abertura de anel multi-ramificado do glicidol.

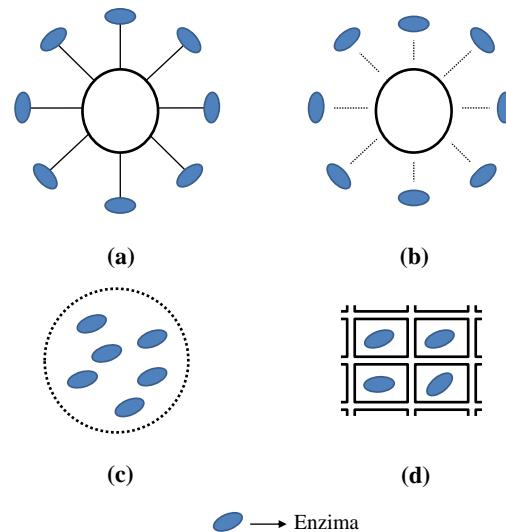
**Fonte:** adaptado Sunder, A. et al. [108].

Os HPGs, quando em solução, apresentam comportamento micelar, uma vez que são constituídos por um interior hidrofóbico rodeado por uma camada superficial hidrofílica [111]. Além disso, eles ainda possuem outras propriedades potencialmente importantes, como cavidades com grande área superficial e interações eletrostáticas. Dessa maneira, a sua montagem direcionada com moléculas biológicas como proteínas e enzimas será uma abordagem muito interessante para a imobilização de enzimas pela técnica de microencapsulação, porque esses biocatalisadores já estão carregados e suas interações eletrostáticas são uma estratégia muito conveniente para a sua produção.

#### 4.2.2 Técnicas de imobilização de enzimas

Existem diversos métodos de imobilização de enzimas que podem ser classificados em duas categorias, de acordo com a interação entre o suporte e a enzima, são eles: método físico e método químico [83, 98]. No método químico há ligações mais fortes entre o suporte e a enzima, podendo-se citar, como exemplo, a técnica de ligação covalente [83, 95, 96, 98]. Já o método físico é aquele no qual essas interações são fracas e algumas das principais técnicas são: a adsorção e o aprisionamento [83, 95, 96, 98]. Sendo que o aprisionamento abrange as técnicas de microencapsulação e aprisionamento em matriz [98]. A Figura 6 apresenta um esquema com as técnicas mais comumente usadas de imobilização da enzima. A escolha da técnica de

imobilização, bem como do material de suporte, deve ser realizada com base no tipo, tanto do processo catalítico, quanto da enzima que será utilizada, uma vez que as características de cada um irá determinar um método que melhor se adapte [90]. Há várias outras técnicas para imobilizar enzimas que são a combinação dos métodos listados anteriormente, sendo que sua elaboração foi desenvolvida para uma aplicação particular utilizando uma enzima ou suporte específico [83].



**Figura 6** – Principais métodos de imobilização de enzimas: ligação covalente (a), adsorção (b), microencapsulação (c) e aprisionamento (d).

**Fonte:** adaptado Zhang, B. et al. [98].

O método de imobilização por ligação covalente é aquele no qual os grupos funcionais não ativos da enzima são ligados covalentemente aos grupos reativos presentes na superfície do suporte [83, 88]. Como a energia de ligação é alta nesse método, a enzima é firmemente fixada e, assim, esse método é capaz de melhorar significativamente a estabilidade da enzima em um longo período [88, 89, 93, 94, 96, 98]. No entanto, essa técnica apresenta algumas desvantagens, tais como: processo de imobilização difícil, se a enzima for desativada irreversivelmente, ela e o suporte não poderão ser utilizados novamente, pois a enzima foi quimicamente modificada; alto custo do processo, etc [93, 94, 98]. Os principais materiais de suporte empregados nesse método de imobilização são: poliacrilamida, vidro poroso, sílica porosa, dentre outros [88].

Na técnica de adsorção, as enzimas são ligadas ao suporte por meio de forças fracas, como as de Van de Waals, interações iônicas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, etc [88, 95, 98]. Esse método é o mais usado devido as suas vantagens, tais como, facilidade na preparação do processo, não é necessário o uso de aditivos químicos, alta atividade, suporte pode

ser regenerado, não há modificação da estrutura da enzima, possibilitando assim, que a enzima retenha sua atividade, método mais rápido e possui baixo custo [88, 95, 98]. Por outro lado, as principais desvantagens são: enzimas imobilizadas possuem baixa estabilidade, são fortemente dependentes de fatores como, por exemplo, pH, temperatura e força iônica [95, 98]. Os materiais comumente usados como suportes são: alumina, carvão ativado, resinas de troca iônica, etc [88].

Já a técnica de aprisionamento consiste em aprisionar a enzima dentro de matrizes porosas para que assim, a sua estrutura não sofra nenhuma interferência externa [83, 88, 89, 94, 112]. As vantagens da utilização dessa técnica são: simplicidade, disponibilidade de diversas matrizes e as propriedades da enzima não sofrem alterações [112]. Ademais, a enzima aprisionada terá uma maior proteção da estrutura proteica e atividade biológica em comparação à imobilização realizada pelo método de adsorção [113]. Contudo, apesar desses pontos positivos, o desempenho da enzima pode ser prejudicado devido à restrição de transferência de massa e a possibilidade de vazamento da enzima [98, 114]. Além disso, essa técnica não é recomendada para aplicações em grande escala [112].

A microencapsulação surge, nesse contexto, como uma alternativa à técnica de aprisionamento, pois evita que as enzimas vazem e sejam contaminadas, e ainda pode ser empregada em escala industrial [114]. Essa técnica de imobilização consiste em encapsular a enzima em uma membrana fina e semipermeável que permite a passagem do substrato e produto, mas não da enzima [112, 114, 115]. Dessa maneira, a enzima encapsulada apresenta uma melhor estabilidade térmica, mecânica e catalítica em relação ao pH e a temperatura nos ambientes de lavagem [83, 98, 116]. Outros pontos positivos inerentes à utilização dessa técnica são: processo rápido, as condições de reação requeridas são moderadas, aumento da taxa de reutilização da enzima, melhoria da funcionalidade em biorreatores e aumento da lucratividade dos processos de fabricação [83, 98, 116]. As deficiências do uso dessa técnica são: risco de inativação da enzima durante a imobilização e alto custo de processamento [112].

Na maioria dos métodos de microencapsulação não há a possibilidade de monitorar as características das cápsulas fabricadas, sendo assim, elas são determinadas de forma empírica [117, 118]. Desse modo, o tamanho, as propriedades mecânicas e outras características das cápsulas produzidas, a partir desses processos, serão consideravelmente variados, até mesmo na produção de cápsulas de um mesmo lote [117, 118]. Além disso, esses métodos ainda possuem outras desvantagens, tais como: rendimento instável, procedimento tedioso, falta de repetibilidade

do processo, etc [119]. Os principais métodos de microencapsulação que apresentam essas limitações são: *spray drying*, coacervação complexa, coextrusão, dentre outros [115]. A fim de contornar esse problema, um método promissor de microencapsulação que pode ser empregado por não apresentar tais limitações, é a emulsificação microfluídica [117, 118].

#### 4.2.2.1 Emulsificação microfluídica

Uma emulsão é formada pela mistura de dois ou mais fluidos não miscíveis entre si, na qual as gotículas de um dos fluidos estão dispersas no outro [120]. Existem dois grupos de emulsões: emulsões simples e emulsões múltiplas. As emulsões simples podem ser classificadas de acordo com a distribuição espacial relativa das suas fases. Os sistemas que consistem em gotas de óleo dispersas em uma fase aquosa são denominados de emulsão óleo em água (O/A) e os sistemas formados por gotas de água dispersas em uma fase de óleo são chamados de emulsão água em óleo (A/O) [121]. Já as emulsões múltiplas, também conhecidas como emulsões duplas, são emulsões constituídas por óleo em água em óleo (O/A/O) ou água em óleo em água (A/O/A). Como exemplo, o sistema A/O/A consiste em gotas de água dispersas em gotas de óleo, nas quais essas gotas de óleos estão dispersas em uma fase aquosa externa [121].

Geralmente, nos métodos para síntese de emulsões, com o propósito de reduzir o tamanho das gotas, são empregadas tensões de cisalhamento ou impactos provocados através de agitação mecânica ou manual [120]. Porém, como essas tensões não são homogêneas e não são controladas com precisão, as gotas das emulsões formadas são altamente polidispersas [120]. O controle insuficiente da distribuição do tamanho das microcápsulas acarreta sérios problemas, o que implica na limitação das suas aplicações práticas [122]. Isso acontece, pois muitas das suas propriedades, tais como, cinética enzimática, interações interpartículas, reologia e vida útil, dependem do tamanho das cápsulas sintetizadas [122].

Diante dessas circunstâncias, torna-se imprescindível empregar uma nova estratégia para produzir emulsões monodispersas de forma simples, eficiente e com maior controle do tamanho e da estrutura das gotas, como é o caso da abordagem microfluídica [119, 120, 122]. Nos últimos anos, as tecnologias microfluídicas têm recebido muita atenção da comunidade científica devido a sua aplicabilidade em variados campos que incluem: síntese de materiais, encapsulamento de drogas, cristalização e reatores químicos [123].

A emulsificação microfluídica é uma ferramenta direta e robusta que permite a síntese de

emulsões com alta monodispersidade das dimensões geométricas, repetibilidade do processo e excelente controle de fluxo [117, 118, 123]. Além desses pontos positivos, essa estratégia ainda tem se mostrado extremamente benéfica em aplicações biotecnológicas, uma vez que com a redução para o nível em microescala há economia de volumes de reagentes, do tempo de reação e do custo do processo, bem como diminuição dos resíduos gerados, o que minimiza significativamente o impacto ambiental, cumprindo assim, um dos princípios estabelecidos pela química verde [124].

Por meio de abordagens microfluídicas pode-se produzir microcápsulas enzimáticas monodispersas para aplicações em larga escala em processos de biotecnologia [122]. As microcápsulas sintetizadas apresentam forma esférica, com tamanhos entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$  [115]. Elas apresentam uma estrutura núcleo-casca, a qual consegue separar o fluido contido no núcleo do ambiente externo, protegendo-o de contaminantes [125]. As microcápsulas podem ser produzidas quando a fase intermediária formar cascas sólidas [126]. Em alguns casos, a fase intermediária é polimerizada através da adição de um fotoiniciador que possibilita que, mediante estímulos externos como, por exemplo, pela exposição à luz ultravioleta, ela seja transformada em microcápsula sólida e, dessa forma, ela consegue ser armazenada por um longo intervalo de tempo [125, 126].

O mecanismo da produção de emulsões a partir de dispositivos microfluídicos é estabelecido por um desenho geométrico e cada configuração é definida de acordo com a necessidade pretendida no projeto [127]. Sendo assim, a estrutura da microcápsula desejada será determinada pela composição e características geométricas dos moldes dos dispositivos microfluídicos [126].

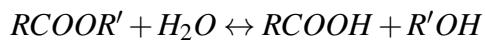
Estudos têm mostrado que as emulsões podem ter grande potencial nas aplicações para imobilização da LIP devido ao seu fácil preparo e capacidade de produção em larga escala [128]. Na abordagem microfluídica, as LIPs também estão sendo empregadas como, por exemplo, no trabalho de Xu et al. (2012), no qual os dispositivos microfluídicos foram usados na produção de LIPs imobilizadas em microesferas de quitosona monodispersas, o que resultou em um sistema promissor com melhor reprodutividade [119].

### 4.3 Lipase (LIP)

A atenção extensiva da pesquisa tem se concentrado nas enzimas em virtude da sua grande importância, sendo que o grupo das LIPs vem se destacando consideravelmente em vista do

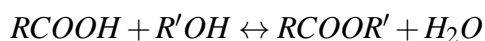
seu potencial em aplicações biotecnológicas [129]. As LIPs (triacilglicerol éster hidrolases E.C, 3.1.1.3) são biocatalisadores versáteis que podem ser encontrados em tecidos de animais, micro-organismos e vegetais [99, 130]. Elas conseguem converter os triglicerídeos em diglicerídeos ou monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol [99, 131]. A LIP é muito estável, pois mesmo em condições não favoráveis, temperaturas extremas e valores de pH do meio de reação em uma faixa relativamente grande, ela consegue se manter ativa [99, 131]. Ela é utilizada para catalisar diversas reações, sendo que segundo Gandhi (1997), ela pode ser classificada em duas principais categorias, a saber [132]:

i) Hidrólise:

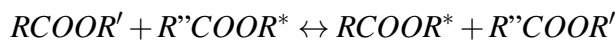


ii) Síntese:

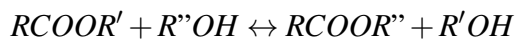
a) Esterificação:



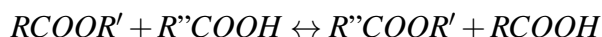
b) Interesterificação:



c) Alcoólise:



d) Acidólise:



Em que: as reações b, c e d são frequentemente agrupadas em um único termo: transesterificação [132].

Devido a essas características – maior especificidade do substrato em relação aos catalisadores químicos, versatilidade, operação em condições mais amenas, excelente atividade catalítica e estabilidade em meios não aquosos – a LIP pode ser empregada em diversas aplicações em laboratórios de pesquisa e também em indústrias, tais como, farmacêuticas, químicas, cosméticas e alimentícias [99, 113, 130, 133–135].

#### 4.3.1 Reações de esterificação catalisadas por LIP

As reações de esterificação catalisadas pela enzima LIP têm ganhado grande notoriedade nos mais diversos campos em virtude da relevante importância dos produtos derivados [99, 136]. O interesse despertado na comunidade científica por essas reações se deu, especialmente, em

razão do aumento da utilização dos ésteres orgânicos na indústria química e na biotecnologia [99, 130, 136]. Para que essas reações sejam vantajosas, é imprescindível que alcancem alto rendimento do éster, bem como menor tempo de reação [99].

Sabe-se que as reações enzimáticas são afetadas por diversos fatores experimentais, sendo assim, é fundamental encontrar as condições ótimas de reação para que, dessa forma, seja possível obter uma maior eficiência do processo em estudo [137]. Com essa finalidade, é necessário analisar alguns fatores que podem influenciar diretamente a reação de esterificação catalisada pela LIP, interferindo significativamente no rendimento do éster, são eles: concentrações dos substratos (ácido e álcool) e da LIP, razão molar do ácido usado em relação ao álcool empregado, pH e temperatura da reação, comprimento da cadeia dos substratos, meio de reação, teor de água, etc [99, 137]. Além disso, os processos catalisados pela enzima LIP devem considerar alguns parâmetros, que incluem: estabilidade e forma da LIP, transferência de massa, seletividade, dentre outros [99]. Logo, é de suma importância estudar todos esses fatores para ser possível que a reação de esterificação possua rendimento e cinética satisfatórios [133]. Entretanto, deve-se ter em mente que não é fácil obter as melhores condições para alcançar o rendimento máximo, uma vez que é preciso levar em conta os efeitos individuais e as interações de todos os fatores citados anteriormente [138].

As reações de esterificação catalisadas por LIP são fortemente afetadas pelo pH e pela temperatura da reação [99]. O valor do pH pode ser influenciado pelos substratos empregados, pela temperatura e também pelo tempo de reação, e ele pode interferir nos grupos funcionais da enzima [99]. O valor desse parâmetro dependerá do tipo de LIP utilizada, sendo que LIPs provenientes de fontes microbianas apresentam seu ótimo em pH alcalino, enquanto LIPs lisossômicas de mamíferos exibem pH ótimo ácido [99]. Já a temperatura, nessas reações, pode ser afetada pela concentração enzimática, viscosidade, teor de umidade do meio reacional, etc [138]. A temperatura influencia diretamente na taxa da reação, na estabilidade da enzima e na solubilidade do substrato [99]. Em altas temperaturas, a enzima pode se tornar inativa, e conseqüentemente, pode haver diminuição da sua atividade e da taxa de reação de esterificação [99, 138].

O rendimento do éster pode ser maior em casos nos quais são empregados alcoóis primários com um comprimento crescente da cadeia. Porém, conforme relatado por Chaibakhsh et al. (2009), o metanol pode impedir a esterificação catalisada pela LIP [137]. Esse fato pode

ser explicado devido ao metanol equivalente a cerca de 1/2 molar não ser solúvel em óleo e, por essa razão, ele permanecer disposto no mesmo na forma de gotas insolúveis e as LIPs quando entrarem em contato com essas gotas poderão ser inativadas [139]. O glicerol, subproduto da reação, também é insolúvel no óleo, e dessa maneira, ele pode ser adsorvido na superfície da LIP, com decorrente diminuição da atividade da mesma e da estabilidade operacional [139]. Para evitar as adversidades acarretadas com o uso do metanol, algumas estratégias podem ser adotadas, tais como: adicionar o metanol de forma gradual e uso de solventes orgânicos como, por exemplo, o *tert*-butanol, já que ele consegue solubilizar o excesso de metanol e, assim, elimina o problema ocasionado pela insolubilidade desse álcool e inativação da LIP [99,137,139,140]. Essa última alternativa eliminaria, além do efeito negativo do uso do metanol, ainda o do subproduto glicerol [139]. De acordo com Stergiou et al. (2013), estudos experimentais demonstraram que na esterificação catalisada pela LIP, o rendimento do éster também pode ser melhorado, aumentando a proporção álcool/ácido até que um valor crítico seja alcançado [99]. Esse valor depende tanto da enzima empregada no processo, quanto da composição e do tipo do meio reacional [99].

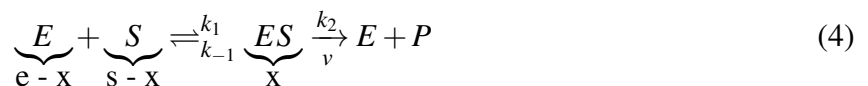
Esforços têm sido envidados para o desenvolvimento de melhorias na qualidade e no rendimento do éster catalisado pela enzima LIP imobilizada através do estudo da cinética da reação [99]. O estudo cinético é essencial para elucidar o modelo da reação, bem como obter informações a respeito da taxa de formação do produto necessária para projeto, desenvolvimento de reatores adequados e determinação das condições ideais para obtenção do produto desejado [99]. Vários trabalhos relatados na literatura mostram estudos em que as reações de esterificação catalisadas pela LIP baseiam-se no modelo cinético referente ao mecanismo de Michaelis-Menten, no mecanismo Pingue-Pongue Bi-Bi, dentre outros [99,141]. Em processos pertencentes a sistemas não multifásicos e isotrópicos, o modelo cinético pode ser descrito baseando-se nos termos do mecanismo de Michaelis-Menten [99].

As reações de esterificação são realizadas, geralmente, utilizando a LIP imobilizada, uma vez que ela proporciona diversas vantagens em comparação à utilização dessa enzima não imobilizada, como já relatado anteriormente, a saber: estabilidade da LIP, facilidade da separação dos produtos, aumento do rendimento do produto, maior atividade enzimática, etc [99,133,142]. Outro benefício que também deve ser ressaltado nesse contexto, com o uso da LIP imobilizada em veículos insolúveis em água, é a possibilidade de evitar os prejuízos causados pela ocorrência de água no meio da reação [99,143]. A água é um dos sub-produtos da reação, e à vista disso, é um parâmetro importante que deve ser cuidadosamente controlado. Não obstante, os solventes

orgânicos normalmente sejam quase completamente anidros, eles ainda podem apresentar uma pequena quantidade de água. Dessa forma, a água, produzida no decorrer dessas reações, pode afetar a atividade da LIP e também proporcionar uma redução da taxa de reação e do rendimento do éster, não favorecendo assim, a esterificação [99, 134, 143]. Portanto, é fundamental que aconteça a remoção de água no decorrer da reação a fim de obter uma reação com maior eficiência. Ademais, a atividade das LIPs imobilizadas tem evidenciado melhores capacidades de esterificação e estabilidade térmica em relação às LIPs livres, o que pode ser justificado devido a uma conformação mais adequada da enzima no meio reacional [99, 133]. Em geral, as LIPs podem ser imobilizadas empregando a maioria dos suportes (seção 4.2.1) e das técnicas de imobilização enzimática (seção 4.2.2) mencionados anteriormente [129, 135, 142].

#### 4.4 Cinética das reações catalisadas por enzimas: a equação de Michaelis-Menten

Há mais de um século a metodologia adotada por Leonor Michaelis e Maud Leonora Menten sobre o poder catalítico e a seletividade de enzimas foi proposta e, atualmente, ainda é comumente usada, sendo alvo de grande interesse em áreas de biologia de sistemas, enzimologia, medicamentos, etc [144]. Neste modelo, o substrato reage com a enzima, formando o complexo enzima-substrato (ES) que se decompõe ou reage com outra substância, e assim, a enzima é regenerada e os produtos da reação são formados [145]. O complexo ES foi proposto, em 1880, por Charles-Adolphe Wurtz, sendo muito importante, pois a partir dele é possível explicar matematicamente o comportamento cinético das reações catalisadas por enzimas e descrever teoricamente os mecanismos das enzimas [85]. Para explicar esse modelo, considera-se uma reação enzimática simples, conforme pode ser visto na Equação 4 [144, 145].



Sendo que:

$E$ = Enzima;

$S$ = Substrato;

$k_1$ = Constante de velocidade de formação do complexo;

$k_{-1}$ = Constante de velocidade de dissociação do complexo;

$k_2$ = Constante de velocidade de decomposição do complexo formando o produto;

$ES$ = Complexo enzima-substrato;

$P$ = Produto;

$v$ = Velocidade de formação do produto;

$s$ = Molaridade inicial do substrato;

$e$ = Molaridade inicial da enzima;

$x$ = Molaridade do complexo no instante  $t$ .

A partir da Equação 4, pode-se escrever a Equação 5.

$$\frac{dx}{dt} = k_1 \cdot (e - x) \cdot (s - x) - k_{-1} \cdot x - k_2 \cdot x \quad (5)$$

Supondo-se que a concentração do substrato é muito maior do que a da enzima  $e$ , dessa forma, muito maior do que a do complexo enzima-substrato ( $s \gg x$ ) e também que a hipótese de Briggs e Haldane possa ser estabelecida, ou seja, a concentração do complexo mantém-se constante após um inicial regime transiente que dura pouco tempo ( $dx/dt = 0$ ), tem-se a Equação 6. A constante de Michaelis ( $K_m$ ) é a medida da atração existente entre a enzima e o substrato e, por isso, é também conhecida como constante de afinidade [144–146].

$$x = \frac{k_1 \cdot e \cdot s}{k_1 \cdot s + k_{-1} + k_2} = \frac{e \cdot s}{K_m + s} \quad (6)$$

Em que a constante de Michaelis:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (7)$$

É possível calcular a velocidade de formação do produto (Equação 8) utilizando a Equação 6.

$$v = k_2 \cdot x = k_2 \cdot \left( \frac{e \cdot s}{K_m + s} \right) \quad (8)$$

Considerando-se que toda a enzima se transformou em complexo ( $x = e$ ), tem-se o máximo valor da velocidade ( $V_{m\acute{a}x}$ ), conforme a Equação 9.

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot s}{K_m + s} \quad (9)$$

A equação cinética de Michaelis-Menten (Equação 9) descreve como a taxa de reação catalisada por uma enzima é proporcional à concentração do substrato [144, 147, 148]. Estima-se que a constante de Michaelis seja igual à concentração do substrato  $e$ , assim, a velocidade da reação seja a metade da velocidade máxima [145, 147]. A caracterização das reações enzimáticas

descritas pela cinética de Michaelis-Menten é feita através dos parâmetros  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$ , sendo que  $V_{m\acute{a}x}$  depende da concentração total da enzima e  $K_m$  não depende desse fator [146].

A fim de facilitar a análise dos parâmetros presentes na equação de Michaelis-Menten, utiliza-se o método de Lineweaver-Burk para linearizar essa equação, conforme pode ser visto na Equação 10 [147,148]. A partir dessa equação, pode-se considerar que  $1/v$  varia linearmente com  $1/s$  e que os coeficientes linear e angular da reta são iguais a  $1/V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m/V_{m\acute{a}x}$ , respectivamente [145].

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{s} \quad (10)$$

Caso haja um inibidor da reação enzimática, a influência da sua presença deve ser considerada, uma vez que essa substância tende a diminuir a velocidade da reação. O inibidor reversível pode ser competitivo ou não competitivo. O inibidor competitivo é aquele que compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Contrariamente, o outro tipo de inibidor não ocupa o sítio ativo da enzima, sendo assim, não compete com o substrato, pois ele ocupará outro sítio da enzima [145]. As Equações 11 e 12 referem-se às velocidades de formação do produto ( $v_i$ ) para a reação enzimática reversível com inibidor competitivo e não competitivo, respectivamente.

$$v_i = V_{m\acute{a}x} \cdot \frac{s}{K_m \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) + s} \quad (11)$$

$$v_i = \frac{V_{m\acute{a}x}}{\left(1 + \frac{i}{K_i}\right)} \cdot \frac{s}{K_m + s} \quad (12)$$

As equações de Lineweaver-Burk na presença de inibidor competitivo e não competitivo podem ser vistas nas Equações 13 e 14, respectivamente [149].

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{s} \quad (13)$$

$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{s}\right) \cdot \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \quad (14)$$

Esse modelo é validado para a maioria das reações enzimáticas simples contendo um único substrato [150]. Entretanto, um sistema com dois substratos pode ser aproximado por um sistema pseudo-substrato, em casos nos quais a concentração do substrato é bem maior do que a constante de Michaelis desse componente [151]. Desta forma, esse sistema em questão

pode ser descrito por um mecanismo de um substrato, ou seja, o de Michaelis-Menten [151]. Através do uso desse modelo é possível obter, de forma rápida, os parâmetros cinéticos das reações de esterificação catalisadas pela lipase [152]. No trabalho desenvolvido por Goddard, Bosley e Al-Duri (2000), a cinética da lipase imobilizada da esterificação de ácido oleico e etanol em um reator de leito empacotado contínuo foi baseada na aplicação das premissas de Michaelis-Menten [151]. Foi constatado que houve inibição competitiva do etanol [151]. Quando é usado álcool de cadeia curta, como o etanol, é possível que haja inibição enzimática pelo substrato e, dessa forma, deve-se considerar o efeito da inibição pelo álcool [151].

## 4.5 Cálculo de reatores de leito fixo (LF) e reatores batelada

### 4.5.1 Reatores enzimáticos

A enzima imobilizada, ensejada pelo desenvolvimento de variadas técnicas e suportes de imobilização, possibilita a utilização de vários tipos de reatores, a saber: reator batelada, reator agitado contínuo, reator de leito fixo (LF) e reator de leito fluidizado [153]. Dentre os reatores supracitados, este trabalho abordará com mais detalhes o reator batelada e o reator de LF. Segundo Stergiou et al. (2013), os reatores contendo lipases imobilizadas podem ser classificados nos seguintes casos, especialmente: i) lipase confinada por uma membrana surfactante a um solvente orgânico contida em uma fase aquosa e ii) lipase imobilizada em uma matriz sólida dispersa dentro de um solvente orgânico ou dentro de uma fase aquosa [99].

Frente à diversidade de tipos de reatores, é interessante salientar que não existe um reator ideal para a enzima imobilizada, pois a seleção do tipo de reator enzimático mais apropriado para determinada aplicação dependerá de uma série de fatores, tais como, custo do reator, reutilização ou não da enzima, parâmetros referentes à temperatura, pH, concentração do substrato, etc [153].

O reator batelada é aquele no qual não há entrada e saída de reagentes ou produtos no decorrer da reação, apresenta concentração uniforme, possui altas conversões em um longo período de tempo e é flexível [146, 153, 154]. Nesse tipo de reator, a enzima imobilizada pode ser separada facilmente da mistura final da reação, através de filtração, por exemplo [153]. Esse reator, aplicado em reações enzimáticas, apresenta dificuldade de produção em escala industrial em um longo prazo, e por isso, ele é, em geral, empregado em operações em pequena escala, testes de novos processos que ainda estão sendo desenvolvidos, fabricação de produtos de alto valor agregado e em processos difíceis de serem convertidos em operações contínuas [146, 155, 156].

Além do reator batelada não poder ser usado em operações em larga escala, ele apresenta ainda outra ponto negativo, alto custo de mão de obra [154].

Em contrapartida, essas desvantagens não são encontradas no reator de LF com enzimas imobilizadas, uma vez que ele pode ser utilizado em reações enzimáticas em grande escala em longo período de tempo e apresenta baixo custo [156–158]. Ademais, o reator de LF ainda apresenta muitas outras vantagens que incluem: possibilidade de uso de modo contínuo de operação, maior controle do processo, permite a reutilização da enzima sem ser preciso realizar a separação prévia, alta produtividade, melhoria da qualidade, pureza e rendimento do produto, segurança operacional, possui fácil fabricação, manutenção e operação [155–158]. Nesse tipo de reator, após o empacotamento da enzima imobilizada, ela se manterá estacionária e será bombeada uma solução de substrato através dela [153].

#### 4.5.2 Cinética de reatores enzimáticos

O cálculo de reatores desenvolvido foi realizado considerando os seguintes fatores: reação irreversível, fluxo ideal, inexistência de efeitos inibitórios, reação catalisada por apenas uma enzima e cinética obedecendo ao mecanismo de Michelis-Menten [153].

##### 4.5.2.1 Balanço molar

Considerando-se que o balanço molar da espécie química específica de interesse ( $j$ ) em um volume envolvido pelas fronteiras do sistema, em qualquer instante de tempo ( $t$ ), pode ser observado na Equação 15 [146].

$$\begin{aligned} \text{Entrada} - \text{Saída} + \text{Geração} &= \text{Acúmulo} \\ F_{j0} - F_j + G_j &= \frac{dN_j}{dt} \end{aligned} \quad (15)$$

Sendo que:

$G_j$ = Velocidade de geração da espécie  $j$ ;

$N_j$ = Número de mols da espécie  $j$  no sistema no tempo  $t$ .

Supondo-se que todas as variáveis do sistema sejam espacialmente uniformes em todo o volume do sistema, pode-se dizer que a velocidade de geração da espécie  $j$  é igual ao volume de reação ( $V$ ) e a velocidade de formação da mesma espécie ( $r_j$ ) (Equação 16).

$$G_j = r_j \cdot V \quad (16)$$

A forma integral da Equação 15 pode ser escrita conforme a Equação 17, a qual é conhecida como Equação geral do balanço molar para uma espécie química  $j$ .

$$F_{j0} - F_j + \int_0^V r_j \cdot dV = \frac{dN_j}{dt} \quad (17)$$

#### 4.5.2.2 Reator batelada

Sabe-se que, no reator batelada, não há entrada e nem saída de reagentes ou produtos, como mencionado anteriormente, não há variação na velocidade de reação dentro do volume do reator e a reação acontece na fase líquida, sendo assim, o balanço molar para espécie  $j$  para este tipo de reator será conforme a Equação 18 [146, 153, 154].

$$-\frac{dC_j}{dt} = -r_j \quad (18)$$

Sendo que:

$C_j$ = Concentração molar da espécie  $j$ ;

$r_j$ = Velocidade de formação da espécie  $j$ .

A Equação cinética de Michaelis-Menten (Equação 9) pode ser reescrita conforme a Equação 19.

$$-r_j = \frac{V_{máx} \cdot C_j}{K_m + C_j} \quad (19)$$

Substituindo a Equação 19 na Equação 18, reorganizando os termos e integrando, tem-se que a Equação 20.

$$\int_0^t dt = -\frac{1}{V_{máx}} \int_{C_{j0}}^{C_j} \left( \frac{K_m + C_j}{C_j} \right) \cdot dC_j$$

$$t = \left( \frac{X \cdot C_{j0}}{V_{máx}} \right) + \left[ \left( \frac{K_m}{V_{máx}} \right) \cdot \ln \left( \frac{1}{1-X} \right) \right] \quad (20)$$

Sendo que:

$$X = \frac{C_{j0} - C_j}{C_{j0}} \quad (21)$$

É possível determinar  $V_{máx}$  e  $K_m$  através da Equação 22, dividindo os membros da Equação 20 por  $t \cdot K_m/V_{máx}$  e rearranjando-os. Os termos  $V_{máx}$  e  $K_m$  podem ser definidos através

da inclinação e da interseção com o eixo vertical da reta obtida pela plotagem de  $1/t \cdot \ln[1/(1 - X)]$  versus  $X/t$ .

$$\frac{1}{t} = \ln\left(\frac{1}{1-X}\right) = \frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} - \frac{X \cdot C_{j_0}}{t \cdot K_m} \quad (22)$$

A Equação cinética de Michaelis-Menten em relação à concentração do substrato ( $s$ ) pode ser reescrita conforme a Equação 23.

$$\frac{1}{t} \cdot \ln\left(\frac{s_0}{s}\right) = \frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} - \frac{(s_0 - s)}{K_m \cdot t} \quad (23)$$

#### 4.5.2.3 Reator de leito fixo (LF)

Considerando-se que o reator de LF é um reator tubular preenchido com catalisador, em que os reagentes são consumidos constantemente e que o reator opera em regime permanente, chega-se a forma diferencial do balanço molar desse reator (Equação 24) [146, 153, 154].

$$\frac{dF_j}{dW} = r_j \quad (24)$$

Sendo que:

$F_j$  = Vazão molar da espécie  $j$ ;

$W$  = Massa do catalisador.

Sabendo-se que:

$$dF_j = -F_{j_0} \cdot dX \quad (25)$$

Substituindo-se a Equação 25 na Equação 24, reorganizando os termos e integrando, tem-se a Equação 26.

$$\int_0^W \frac{dW}{F_{j_0}} = \frac{dX}{-r_j}$$

$$\frac{W}{F_{j_0}} = \frac{dX}{-r_j} \quad (26)$$

Considerando-se que:

$$F_{j_0} = C_{j_0} \cdot Q \quad (27)$$

$$t_a = \frac{V}{Q} = \frac{W}{Q \cdot \rho} \quad (28)$$

$$dX = -\frac{dC_j}{C_{j0}} \quad (29)$$

Sendo que:

$Q$ = Vazão volumétrica da alimentação;

$\rho$ = Massa específica do catalisador.

É possível obter a Equação 30, a partir da substituição das Equações 27, 28 e 29 na Equação 26, rearranjando os termos e considerando que  $\rho = 1$ .

$$t_a = -\left(\frac{dC_j}{-r_j}\right) \quad (30)$$

Substituindo-se a Equação 19 na Equação 30, reorganizando os termos e integrando, tem-se a Equação 31, considerando que  $X$  é dado pela Equação 21.

$$t_a = -\frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \int_{C_{j0}}^{C_j} \frac{(K_m + C_j)}{C_j} \cdot dC_j$$

$$t_a = \left(\frac{X \cdot C_{j0}}{V_{m\acute{a}x}}\right) + \left[\left(\frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}}\right) \cdot \ln\left(\frac{1}{1-X}\right)\right] \quad (31)$$

Para o reator de leito fixo é possível também determinar  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  através da Equação 32, dividindo os membros da Equação 31 por  $t_a \cdot K_m/V_{m\acute{a}x}$  e rearranjando-os.

$$\frac{1}{t_a} \cdot \ln\left(\frac{1}{1-x}\right) = \frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} - \frac{X \cdot C_{j0}}{K_m \cdot t_a} \quad (32)$$

A Equação 33 descreve o modelo cinético de Michaelis-Menten em relação à concentração do substrato ( $s$ ).

$$\frac{1}{t_a} \cdot \ln\left(\frac{s_0}{s}\right) = \frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} - \frac{s_0 - s}{K_m \cdot t_a} \quad (33)$$

#### 4.6 Redes neurais artificiais (RNA)

As RNAs são ferramentas de modelagem computacional que simulam a estrutura neural de organismos inteligentes, sendo assim, são altamente relevantes para resolver uma ampla variedade de problemas científicos e em campos da indústria espacial, medicina, engenharia, neurologia, etc [159–161]. As RNAs são capazes de fazer melhores previsões de forma mais rápida e prática do que outros métodos estatísticos convencionais, uma vez que as redes neurais conseguem modelar sistemas não-lineares e multidimensionais complexos [159, 160].

---

A estrutura da RNA é inspirada no cérebro humano que é composto por bilhões de neurônios interconectados em rede e, por meio de reações bioquímicas, eles têm a capacidade de receber, processar e transmitir as mais diversas informações [159, 160]. Análoga às redes neurais biológicas, a RNA é formada por neurônios ou nós artificiais dispostos em camadas densamente conectadas entre si [159, 161]. A rede é constituída por uma camada de entrada que se refere aos dados de entrada, uma ou mais camadas intermediárias ou ocultas, que são aquelas onde o processamento de fato acontece, e uma camada de saída, que é onde o processamento será concluído [160, 162]. Nessa rede neural, as informações são recebidas pelos nós de entrada que a enviam para os neurônios ocultos, os quais não tem interferência com meio externo, e eles processam a informação e mandam-na para a camada de saída [161]. A conexão entre os neurônios é realizada mediante sinapses e os valores atribuídos a essas conexões são definidos como pesos sinápticos que por sua vez são utilizados para armazenar o conhecimento [159, 160, 163].

A RNA possui dois elementos fundamentais: a arquitetura e o algoritmo de aprendizagem [164]. A escolha da arquitetura da rede deve ser feita de acordo com a aplicação pretendida com a implementação da RNA. Em relação à topologia da rede devem-se definir algumas variáveis, a saber: o número de nós da camada de entrada, o número de camadas ocultas e o número de neurônios em cada camada [165]. A escolha do número de nós da camada de entrada é considerada a variável mais importante, pois se refere aos dados de entrada que serão empregados para alimentar a rede neural [165]. A seleção desses parâmetros deve ser realizada de forma minuciosa, uma vez que elas interferem no desempenho da RNA [165].

Outros pontos que devem também ser decididos para implementar uma RNA são: a função de ativação dos neurônios das camadas oculta e de saída, o algoritmo de treinamento, o método de padronização, o conjunto de treinamento e de teste, o critério de parada do treinamento e a medida de desempenho da rede [165]. A função de ativação refere-se a uma função matemática que pela combinação linear envolvendo as variáveis de entrada e os pesos geram um valor de saída do neurônio [164, 165]. Há várias funções de ativação, sendo as mais comuns: a função tangente hiperbólica e a função logística [165].

Todas as informações que a rede precisa aprender estão disponíveis no conjunto de dados, o qual é constituído pelo conjunto de treinamento e pelo conjunto de teste [160, 162]. O conjunto de dados coletados deve ter um número grande de dados significativos e abranger o domínio

do problema, envolvendo os casos rotineiros e também as exceções, para que assim, não haja ambiguidade e erros [162, 165]. O conjunto de treinamento é um grupo que combina padrões de entrada e saída e os utiliza para realizar o treinamento da rede e ajustar os parâmetros da mesma [160, 165]. Já o conjunto de teste consegue verificar o desempenho da rede sob condições reais de uso [162, 165]. É possível também criar uma subdivisão do conjunto de treinamento que seria o conjunto de validação, o qual é muito usado para determinar a eficiência da rede em relação a sua capacidade de generalização no decorrer do treinamento e ainda pode ser usado para definir o momento de parada do treinamento da rede [162, 165].

Existem diversas arquiteturas de RNAs que serão determinadas pelo número e modo como os neurônios estão interconectados, bem como, pelo peso associado a essas conexões e pelo número de camadas que compõe a rede [162]. Uma das estruturas mais simples de RNA são as redes *feedforward* de camada única que como o nome sugere, possuem somente uma camada de neurônios, podendo ser também denominada de *perceptron* com uma única camada [163]. Quando há mais de uma camada oculta, têm-se as redes neurais *feedforward* multicamadas ou *perceptrons* de multicamadas (MLPs) [162, 163]. Através dessa estrutura de rede é possível melhorar a resolução de problemas mais complexos devido à adição de camadas ocultas na rede [159, 162, 163].

As RNAs tem capacidade de aprender a realizar tarefas específicas a partir de exemplos e, assim, elas podem ser treinadas com o intuito de encontrar soluções para problemas complexos [159, 163]. Logo após a definição da arquitetura da rede, é necessário escolher o algoritmo de aprendizagem da rede [165]. O algoritmo de aprendizagem é empregado para treinar uma rede neural [162, 163]. A partir desses algoritmos são determinados os pesos sinápticos e é feito o processo de aprendizagem [162]. Um exemplo de algoritmo de aprendizagem muito popular é o algoritmo de retropropagação (*backpropagation*) que pode ser utilizado para treinar as redes neurais *feedforward* multicamadas [159, 160, 162]. Esse algoritmo é um método de aprendizagem supervisionado usado para treinar dados somente para previsão [159, 160]. Nesse processo de aprendizagem da rede, os pesos são reajustados com a finalidade de reduzir o erro quadrático médio (MSE) ou erro relativo médio (MRE) ocasionado entre o resultado obtido nos dados de saída e o valor de saída alvo desejado, ou seja, resultados alvo [161, 165]. Esse treinamento consegue melhorar a performance da rede neural por meio da redução do erro através da modificação dos pesos [160]. Cada ciclo de todos os padrões de um conjunto de dados de um treinamento é denominada de época (*epoch*) [160, 162].

## 5 Materiais e Métodos

Neste capítulo é apresentada a metodologia utilizada para realização deste trabalho. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Alta Tensão (LAT) da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) e no Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CB-IPEN). Em relação aos reagentes utilizados, todos eram de grau analítico e foram usados sem purificação adicional.

### 5.1 Síntese do HPG

O HPG foi sintetizado através do método de polimerização por abertura de anel multi-ramificado, utilizando um procedimento adaptado descrito na literatura [105]. Inicialmente, o diglicerol (3-(2,3-dihidroxipropoxi) propano-1,2-diol, Fischer-TCI) foi usado como iniciador central por meio de sua parcial desprotonação com metóxido de potássio (Sigma-Aldrich) na razão molar de 1:3 por 3 h, a 25 °C. Logo depois, o carbonato de glicerol (GC, Sigma-Aldrich) foi lentamente adicionado, 1 mL · h<sup>-1</sup>, na razão molar de 12:1 (GC/núcleo), por 24 h, a 150 °C. Após o resfriamento, o produto foi dissolvido em metanol e neutralizado por filtração através de uma troca catiônica utilizando a resina Amberlite (Amberlit ® IRC 120H). O metanol foi destilado a 40 °C sob pressão reduzida de 0,5 mmHg.

O HPG sintetizado possuía massa molecular média de 2,51 kDa e polidispersidade média de 1,32.

Ressonância magnética nuclear de prótons (<sup>1</sup>H-RMN) (400 MHz, Varian, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm): 3,2-3,7 (m, prótons de poliglicerol), 4,4-4,8 (<sup>1</sup>H, OH).

Ressonância magnética nuclear de carbono (<sup>13</sup>C-RMN) (400 MHz, Varian, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm): 69,4, 70,3-70,5, 72,2 (CH<sub>2</sub>O) ppm; 78,2, 77,0 (CHO) ppm; 60,8-61,1 (CH<sub>2</sub>OH); 68,8, 70,5 (CHOH).

### 5.2 Síntese do HPG metacrilado (HPG-MA)

O HPG-MA foi sintetizado por funcionalização de grupos hidroxila do HPG com glicidil metacrilato (GMA, Sigma-Aldrich) conforme descrito por Oudshoorn et al. (2006) [166]. Inicialmente, 10 g de HPG foram dissolvidos em 90 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich)

à temperatura ambiente (25 °C) sob atmosfera de nitrogênio. Após dissolução de 2 g de 4-(N,N-dimetilamino) piridina (DMAP, Sigma-Aldrich), 5 g de GMA foram adicionados e a solução foi agitada a 25 °C, por 48 h. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 3,5 mL de ácido clorídrico (HCl, Synth, 37%) para neutralizar o DMAP evitando a hidrólise alcalina do éster metacrílico de HPG (HPG-MA). A mistura de reação foi dialisada (MWCO 12.400 Da) contra água deionizada a 4 °C por duas semanas. Finalmente, HPG-MA foi liofilizado e armazenado a -20 °C antes do uso. O grau de substituição (DS, a porcentagem de grupos hidroxila derivados) das amostras de HPG-MA foi de cerca de 30%, conforme confirmado a partir do espectro de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Varian, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm): 5,9-6,2 (grupo metacrilato).

### 5.3 Dispositivo microfluídico e encapsulamento de LIP

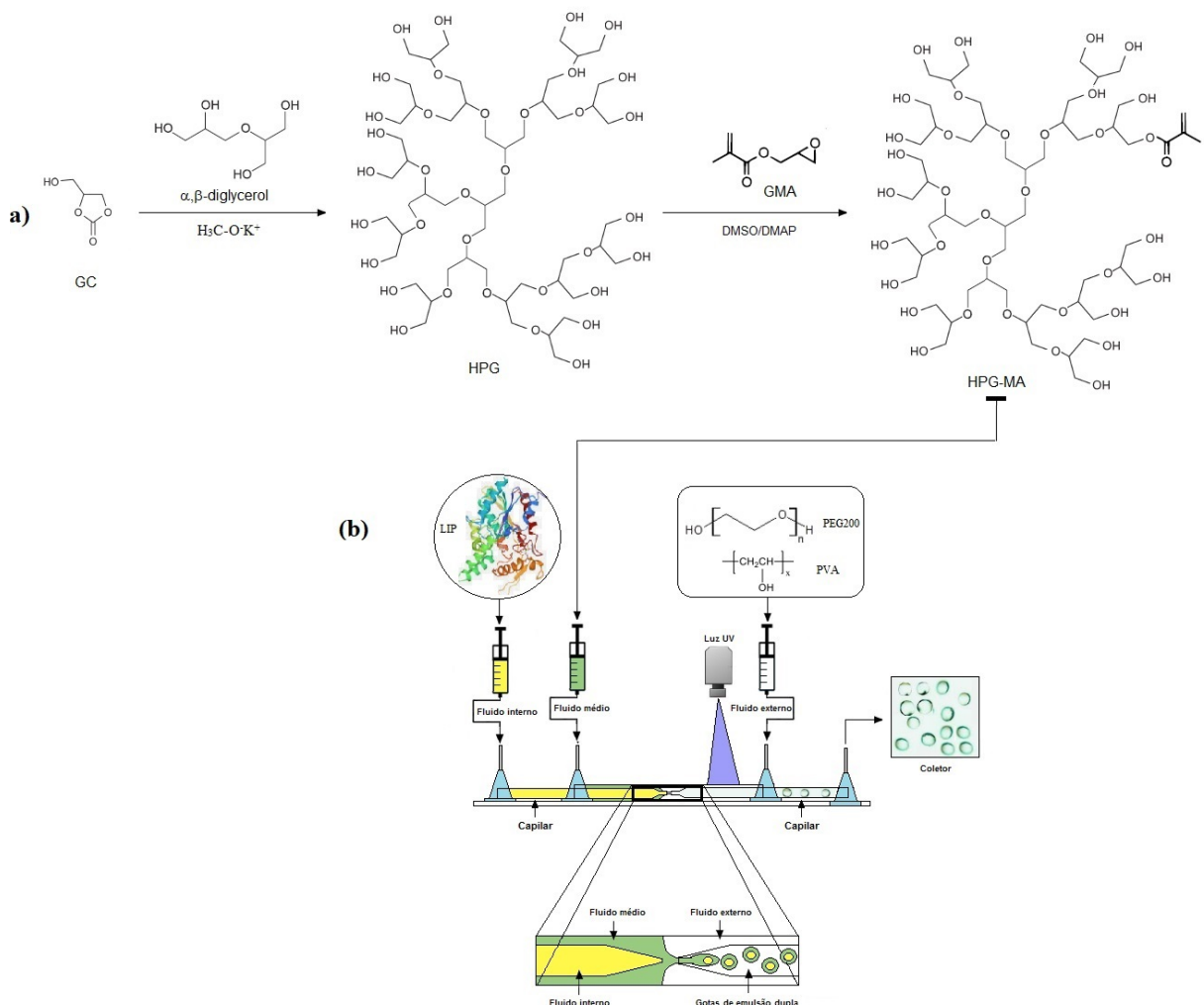
Um chip, com dimensões de canal de 300 μm de largura e 150 μm de altura, adotou uma geometria de junção Y ( $\theta = 60^\circ$ ) e foi fabricado através do processo de impressão 3D padrão (impressora B9 Creator 3D v1.1) sob o projeto AutoCAD desenvolvido pela 3-D Criar Co (CIETEC-SP, Brasil). Bombas de seringa (Injetta, SP) foram utilizadas para controlar as vazões. O chip tinha uma altura de 300 μm em toda a extensão.

As microcápsulas de HPG-LIP foram fabricadas com base no sistema de emulsão dupla água/óleo/água, que usa três fluidos diferentes. Já que um dos objetivos deste trabalho era o encapsulamento da LIP, o fluido interno era composto de solução de LIP (10 mg/mL) que foi preparado adicionando a quantidade adequada de pó de LIP à solução de tampão fosfato salino (PBS, 50 mM, pH 7,0). Sendo que a LIP utilizada foi a lipase de *Candida rugosa* (pó liofilizado,  $\geq 40.000$  unidades/mg de proteína).

O fluido externo, que serve como fase contínua, era 40% em peso de polietilenoglicol 200 (PEG 200, Sigma-Aldrich) e 1% em peso de álcool polivinílico (PVA, Sigma-Aldrich, peso molecular: 13-23 kDa, 87-89% hidrolisado) em água deionizada. O fluido médio formador de casca para microcápsulas de HPG-LIP era composto de 99% em peso de HPG-MA e 2% em peso de 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona como fotoiniciador (Sigma-Aldrich).

Foram geradas gotas monodispersas de HPG-LIP quando o fluido interno e os fluidos médios foram cisalhados hidrodinamicamente pelo fluido externo. Uma vez geradas, as gotículas de HPG-LIP foram irradiadas por exposição à radiação ultravioleta (UV) (lâmpada B-100SP Modelo LWUV, comprimento de onda de 365 nm, 30 mW/cm<sup>2</sup>, Fisher Scientific) durante 10

segundos da geração da gota para minimizar o vazamento e coalescência da mesma. À medida que as gotas da emulsão dupla de HPG-LIP viajavam pelo capilar de saída, a exposição ao UV foi aplicada com uma lâmpada UV para reticular rapidamente as cascas. As cápsulas coletadas foram pós-curadas sob exposição à UV por uma hora para garantir a reticulação completa. Depois disso, o HPG-LIP resultante foi lavado com 10 mL de PBS (50 mM, pH 7,0) por 3 vezes (cada um em um banho de água com agitação por 30 minutos, e as lavagens juntamente com a solução de reação foram coletadas para a determinação da concentração de enzima). Por fim, as microcápsulas foram liofilizadas (JJ Científica, LJJ04) por 24 h e armazenadas em frascos de vidro até sua posterior caracterização. A Figura 7 mostra uma ilustração esquemática do método de preparação de microcápsulas de HPG-LIP usando a técnica microfluídica.



**Figura 7** – Ilustração da síntese química de HPG-MA a partir de carbonato de glicerol (GC) (a) e ilustração esquemática para a produção de HPG-LIP usando um dispositivo microfluídico (b).

**Fonte:** a Autora.

As concentrações de proteína nas soluções foram determinadas com reagente azul

brilhante de *Coomassie*, seguindo o método de Bradford (1976) [167]. O reagente de Bradford foi usado conforme recebido. A quantidade de LIP na microcápsula de HPG foi determinada medindo as concentrações inicial e final de proteína nas soluções e lavagens de LIP. A albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich) foi usada como padrão para construir a curva de calibração. A capacidade de imobilização de LIP no HPG foi definida como a quantidade de proteína (mg) por grama da microcápsula. Cada valor relatado era a média de pelo menos três experimentos, e o desvio padrão estava dentro de ca.  $\pm 1\%$ .

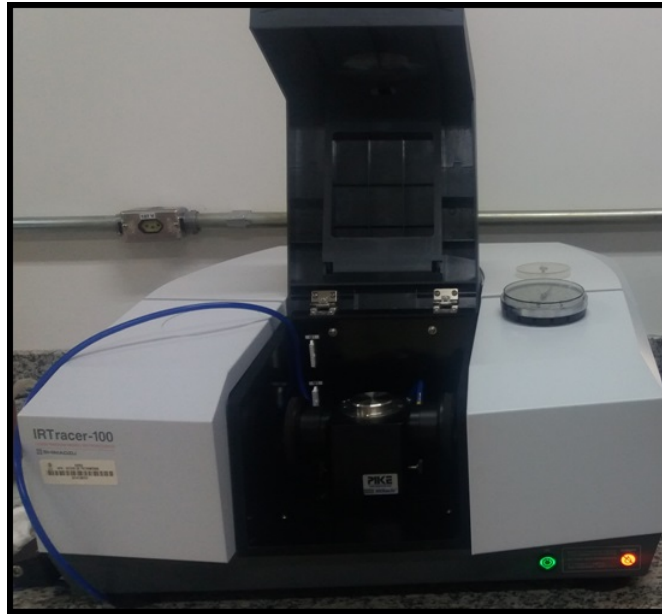
## 5.4 Caracterização das microcápsulas de HPG-LIP

### 5.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microcápsulas de HPG-LIP foram observadas usando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Inicialmente, as microcápsulas foram suspensas em n-hexano e sonicadas em temperatura ambiente (25 °C) por 30 segundos para dispersar as partículas individuais. Em seguida, uma gota da suspensão de microcápsulas resultante foi colocada em um *stub* de alumínio coberto com uma fita de carbono de dupla face e o solvente foi deixado evaporar sob vácuo em um dessecador a temperatura ambiente (25 °C). As amostras foram revestidas com uma camada de ouro usando um aplicador catódico por 10 minutos. Após a etapa de preparação das amostras, elas foram examinadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura Phillips XL30 FEGSEM (JSM-6701F). A distribuição de tamanho das partículas do HPG-LIP foi determinada usando o software ImageJ V1.50 [168]. Para a determinação do diâmetro médio, as micrografias foram analisadas com aumento de 500X considerando três campos diferentes de uma mesma amostra. Foram obtidas mais de 3 imagens (para cada medida >50 microesferas).

### 5.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR)

As amostras das microcápsulas de HPG com e sem a enzima LIP foram analisadas em um espectrofotômetro Shimadzu, modelo IRTracer-100 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer equipado com acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) do PIKE MIRacle, como pode ser visto na Figura 8. As amostras foram analisadas na faixa de número de ondas de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 600  $\text{cm}^{-1}$ , o que tornou possível observar as bandas de absorção dos grupos funcionais presentes nas amostras.



**Figura 8** – Espectrofotômetro Shimadzu IRTracer-100 acoplado ao acessório ATR.  
**Fonte:** a Autora.

#### 5.4.3 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas das amostras do HPG-LIP foram realizadas utilizando um analisador Shimadzu, modelo TGA-50 Thermogravimetric Analyzer, conforme pode ser visto na Figura 9. A análise termogravimétrica foi feita com o objetivo de investigar a estabilidade térmica das amostras, bem como calcular a sua energia de ativação. Os experimentos foram realizados de 25 °C a 800 °C sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 30 mL/min. A massa da amostra de HPG-LIP era de aproximadamente 20 mg. Para realização desta análise, as amostras foram acondicionadas em cadinhos de platina.

Há vários métodos para determinação dos parâmetros cinéticos, sendo que a ASTM E 1641-18 (2018) recomenda o cálculo desses parâmetros através da utilização dos métodos de Ozawa e Kissinger [169]. Sendo assim, neste estudo foram empregados os métodos supracitados a fim de obter a energia de ativação das amostras estudadas. A análise cinética de TGA através desses métodos foi realizada em várias taxas de aquecimento, ou seja, 5, 10, 20 e 30 °C/min.



**Figura 9** – Analisador térmico Shimadzu TGA-50.

**Fonte:** a Autora.

#### 5.4.3.1 Métodos Cinéticos

Os métodos desenvolvidos para o cálculo de parâmetros cinéticos de decomposição térmica de materiais empregam dados obtidos da análise térmica diferencial. Nesses modelos, a taxa de conversão da massa inicial da amostra ( $d\alpha/dt$ ) é uma função linear de uma constante de taxa que depende da temperatura  $k(T)$  e uma função de conversão que independe da temperatura  $f(\alpha)$ , conforme a Equação 34 [170–173].

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T) \cdot f(\alpha) \quad (34)$$

A taxa,  $k(T)$ , é determinada pela temperatura dada pela equação de Arrhenius como pode ser visto na Equação 35 [170–173].

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad (35)$$

Sendo que:

$k$ = Constante de velocidade da reação na temperatura  $T$  ( $s^{-1}$ );

$A$ = Fator pré-exponencial ou de frequência ( $s^{-1}$ );

$E_A$ = Energia de ativação ( $J/mol$ );

$R$ = Constante universal dos gases ( $8,314 J/K \cdot mol$ );

$T$ = Temperatura absoluta ( $K$ ).

Combinando-se as Equações 34 e 35, tem-se que:

$$\frac{d\alpha}{dt} = A \cdot f(\alpha) \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad (36)$$

Se a temperatura da amostra for modificada quando é aplicada uma taxa de aquecimento, definida como  $\phi = dT/dt$ , então, a variação do grau de conversão pode ser analisada em função da temperatura, tendo em vista que essa temperatura depende da taxa  $\phi$  [170, 171]. Rearranjando a Equação 36, tem-se a Equação 37.

$$\frac{d\alpha}{dt} = \left(\frac{A}{\phi}\right) \cdot f(\alpha) \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad (37)$$

A Equação 37 pode ser expressa de acordo com a Equação 38, sendo que  $g(\alpha)$  é a forma integrada da função de dependência de conversão [170].

$$g(\alpha) = \int_0^\alpha \frac{d\alpha}{f(\alpha)} = \frac{A}{\phi} \int_0^T e^{\left(\frac{-E_A}{RT}\right)} \cdot dT \quad (38)$$

A partir dessas equações citadas, é possível desenvolver vários modelos para cálculos cinéticos de decomposição térmica de materiais. Nesse trabalho, foram utilizados os métodos de Ozawa e Kissinger devido a eles serem considerados métodos simples e precisos para obtenção da energia de ativação [174].

#### 5.4.3.1.1 Método de Kissinger

Em 1956, Homer E. Kissinger desenvolveu um método cinético para decomposição térmica com o intuito de determinar os parâmetros cinéticos de um determinado material, baseando-se na análise das mudanças nos dados termogravimétricos ocasionadas pela variação da taxa de aquecimento [170, 171, 175]. De acordo com Kissinger, o cálculo dos parâmetros cinéticos pode ser feito através da Equação 39 [170, 171, 173].

$$\ln\left(\frac{\phi}{T_{máx}^2}\right) = \left\{ \ln\left(\frac{AR}{E_A}\right) + \ln[n(1 - \alpha_{máx})^{n-1}] \right\} - \frac{1}{T_{máx}} \cdot \left(\frac{E_A}{R}\right) \quad (39)$$

Sendo que:

$T_{máx}$  = Temperatura máxima;

$\alpha_{máx}$  = Taxa máxima de reação;

$n$  = Ordem da reação.

Através do gráfico de  $\ln(\phi/T_{máx}^2)$  versus  $1/T_{máx}$ , o valor da energia de ativação pode ser determinado por meio do coeficiente angular da reta,  $-E_A/R$ , obtido mediante regressão linear [170, 171, 173, 175].

#### 5.4.3.1.2 Método de Ozawa

Outra maneira de obter os parâmetros cinéticos do material é empregando o método de Ozawa. O método proposto por Takeo Ozawa, em 1965, foi desenvolvido para determinar a energia de ativação diretamente dos dados de perda de peso e temperatura provenientes de diferentes taxas de aquecimento [175, 176]. A partir da Equação 38 com resolução da integral, na forma de logaritmo, é possível obter a Equação 40 [170, 172, 173, 175, 176].

$$\log \phi = \log \left( \frac{AE_A}{R} \right) - \log(g(\alpha)) - 0,4567 \cdot \frac{1}{T} \cdot \left( \frac{E_A}{R} \right) - 2,315 \quad (40)$$

Plotando o gráfico  $\log(\phi)$  versus  $1/T$  é possível obter a energia de ativação através do coeficiente angular da reta ( $-0,4567 \cdot E_A/R$ ), como no método anterior [176].

#### 5.4.4 Redes neurais artificiais (RNA)

A fim de prever a eficiência de encapsulamento (EE) e a atividade relativa (AR) no processo microfluídico, o uso de RNA torna-se importante para o projeto de microcápsulas de HPG-LIP. Neste trabalho, uma RNA com arquitetura *feedforward* do tipo *perceptron* multicamadas (MLP), treinada com o algoritmo *backpropagation* com função de custo de entropia cruzada (*cross-entropy cost function*) com três camadas de nós de processamento e 32 neurônios foi usada como ferramenta de classificação. Foram usadas como variáveis de entrada uma camada de entrada que aceita a composição de HPG, taxa de fluxo e carregamento de LIP.

A RNA foi programada em Python (versão 2.7.12) com as bibliotecas Tensor Flow e Keras [177]. A arquitetura RNA-MLP usou uma camada oculta feita de 64 neurônios e a função de ativação utilizada foi a tangente hiperbólica. Conjuntos de dados (216 conjuntos experimentais) foram obtidos do estudo e foram divididos em matriz de entrada e matriz de destino. As variáveis de entrada foram taxa de fluxo, composição de HPG e carregamento de LIP. As EE e AR correspondentes foram usados como alvo. Os conjuntos de dados foram divididos em subconjuntos de treinamento (metade), validação (um quarto) e teste (um quarto), cada um contendo 108, 54 e 54 amostras, respectivamente. A otimização foi alcançada quando a rede atinge o valor mínimo de erro quadrático médio (MSE) ou erro relativo médio (MRE). O treinamento da rede foi realizado em 600 épocas e meta de erro igual a 0,000001.

## Estatísticas

Os testes de atividade do HPG-LIP foram realizados em triplicata e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey no software GraphPad Prism 4. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 5.5 Ensaios de atividade da LIP

### 5.5.1 Hidrólise de *p*-nitrofenil (*p*NPL)

A atividade relativa (AR) para o HPG-LIP foi determinada de acordo com o método relatado na literatura [178]. Foi pesado 0,1 g de HPG-LIP em tubos de centrífuga de polipropileno misturados com 5 mL de tampão PBS (100 mM, pH 7,0). Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L de laurato de *p*-nitrofenil (*p*NPL) (100 mM) diluído em 2-propanol. Os conteúdos foram misturados e os tubos incubados em banho-maria a 60 °C por 10 minutos. Para a mensuração do *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado do substrato, foi preparado um controle (triplicata) sem HPG-LIP. A reação enzimática foi encerrada com a adição de 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,5 M) seguida de centrifugação por 10 minutos (10.000 rpm). O sobrenadante de 0,5 mL foi diluído 10 vezes com água deionizada e a absorbância medida a 410 nm em um espectrofotômetro UV-VIS (Cary 50, Shimadzu) contra um branco sem HPG-LIP e tratado em paralelo. A taxa de reação foi calculada a partir da inclinação da curva de absorbância em função do tempo. Foi utilizado um coeficiente de extinção molar de  $14,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para *p*NP, que foi determinado a partir da absorbância da solução padrão de *p*NP no meio de reação. Um miligrama de LIP gerando 1 mmol de *p*NP por minuto é definido como uma unidade de enzima. A atividade enzimática relativa foi definida como a razão entre a atividade da enzima imobilizada e a atividade da enzima livre. A atividade específica foi definida como unidades de enzima por miligrama de proteína. A retenção da atividade foi determinada como a razão entre a atividade da quantidade de enzima acoplada no HPG-LIP pela atividade da mesma quantidade de enzima livre.

### 5.5.2 Hidrólise do óleo de coco

As atividades da LIP imobilizada foram realizadas empregando o óleo de coco como substrato. A mistura de reação para determinação da atividade da enzima imobilizada foi constituída por 2,50 mL de tampão fosfato, pH 6,0 (atividade  $8,7 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 70 mg de biocatalisador (peso seco) e 0,50 mL de óleo de coco (volume final 3,00 mL). As misturas de

reação foram agitadas e incubadas por 20, 45, 90 e 200 min em banho maria nas seguintes temperaturas: 25, 40 e 60°C. Em seguida, a hidrólise enzimática foi interrompida adicionando 1,5 mL de metanol. Os ácidos graxos formados foram quantificados por titulação com hidróxido de potássio (0,05 mol/L), utilizando a fenolftaleína como indicador.

As atividades da LIP são expressas em unidades internacionais (UI), em que 1 UI é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de ácidos graxos livres por minuto, nas condições de ensaio (30°C, pH 7) e, portanto, foram determinadas de acordo com a Equação 41.

$$A = \frac{(V_{KOH} - V_0) \cdot N_{KOH} \cdot 1000 \cdot 2}{m_b \cdot t} \quad (41)$$

Sendo que:

$A$  = Atividade da LIP ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g}$ );

$V_{KOH}$  = Volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

$V_0$  = Volume de KOH gasto na titulação do controle (mL);

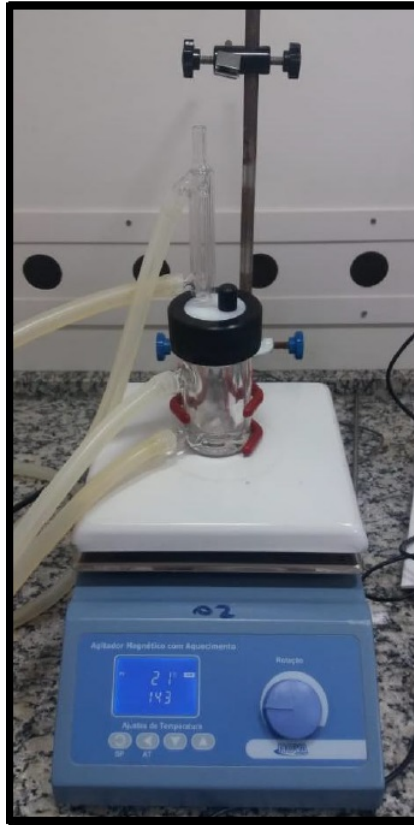
$N_{KOH}$  = Normalidade da solução de KOH (mol/L);

2 é um fator de correção;

$m_b$  = Massa da enzima (g);

$t$  = Tempo de reação (min).

Os ensaios foram realizados no reator batelada (Figura 10).



**Figura 10** – Reator batelada utilizado neste trabalho.  
**Fonte:** a Autora.

## 5.6 Reutilização de HPG-LIP

A reutilização da LIP imobilizada foi verificada conforme descrito na seção 5.5.1 e as condições experimentais foram as mesmas. Após cada ciclo de reação, as enzimas imobilizadas foram retiradas do meio de reação e lavadas três vezes com o tampão fosfato (10 mM, pH 7,0). Posteriormente, as enzimas imobilizadas foram colocadas em meio fresco e ao final de cada ciclo as atividades enzimáticas foram determinadas.

## 5.7 Citotoxicidade - método de contato indireto

O teste das microesferas de HPG-LIP em termos de citotoxicidade foi realizado de acordo com o ensaio de [3 – 4,5 – dimetiltiazol – 2 – il – 2,5 – brometodifeniltetrazlio] (MTT) para quantificar a biocompatibilidade [32]. As microesferas de HPG-LIP foram mantidas por 30 min sob luz ultravioleta para evitar contaminação bacteriana. Os extratos das microesferas de HPG-LIP foram preparados seguindo as recomendações da ISO 10993-12 na proporção de 0,2 g/mL de meio de cultura celular a 37 °C e 5% de ( $CO_2$ ) por um período de extração de

24, 48 h e 96 h. Fibroblastos de tecido conjuntivo de camundongo L929 obtidos da American Type Culture Collection (ATCC) foram usados para testes de cultura de células. As células L929 foram rotineiramente cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS; Sigma-Aldrich), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 0,25 µg/ml de anfotericina B (Sigma-Aldrich). As células L929 foram incubadas a 37 °C e atmosfera umidificada com 5% de (CO<sub>2</sub>). Em cada poço de uma placa de cultura de 96 poços, 3 · (10<sup>5</sup>) células foram semeadas e incubadas e em seguida colocados em contato com extratos de HPG-LIP por 24, 48 e 96 h em DMEM (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e 1% de gentamicina. O meio sem microcápsulas de HPG-LIP também foi incubado e diluído como acima para servir como controle negativo. A razão de viabilidade da célula L929 foi analisada por espectrofotometria UV-Vis (Varian, Cary 50) com base na densidade óptica (OD) em valores de 570 nm. A viabilidade celular foi estimada de acordo com:

$$x = ViabilidadeCelular(\%) = \frac{OD_{570,T}}{OD_{570,(-)}} \quad (42)$$

Sendo que:

$OD_{570,T}$  = Densidade óptica média medida em 100% das amostras testadas;

$OD_{570,(-)}$  = Média dos valores de densidade óptica medidos no controle negativo.

## 5.8 Caracterização do óleo de coco de babaçu (OCB)

O óleo de coco extravirgem (COPRA) foi caracterizado pelas técnicas ATR-FTIR e TGA. Os equipamentos empregados para a realização dessas análises foram os mesmos utilizados nas investigações realizadas com as microcápsulas de HPG-LIP. Foram usadas também as mesmas condições da análise termogravimétrica, ou seja, as amostras de óleo de coco foram aquecidas a partir de 25 °C a 800 °C nas seguintes taxas de aquecimento: 5, 10, 20 e 30 °C/min. Os testes foram realizados em atmosfera de N<sub>2</sub> com fluxo de 30 mL/min e a massa da amostra foi de cerca de 20 mg. Foram usados também os métodos de Ozawa e Kissinger para obter a energia de ativação da amostra de óleo de coco.

## 5.9 Transesterificação do óleo de coco

A reação de transesterificação do óleo de coco utilizando etanol, empregando a microcápsula de HPG-LIP como catalisador, foi realizada com o intuito de modificar esse óleo, reduzindo assim, a sua viscosidade.

Os ensaios de transesterificação foram conduzidos em reator batelada com capacidade de 25 mL. O reator possui um revestimento duplo, no qual flui água de um banho com temperatura controlada para manter a temperatura desejada do reator. O reator foi acoplado a um condensador, com a finalidade de evitar a perda de etanol por evaporação.

Inicialmente, o óleo de coco virgem foi adicionado no reator sob agitação magnética constante de 300 rpm. O óleo de coco foi aquecido até a condição de temperatura experimental ser atingida. Neste momento, o álcool e o catalisador foram adicionados ao óleo e foi iniciada a contagem do tempo de reação. Com a finalidade de monitorar a reação de transesterificação, alíquotas de cerca de 300  $\mu\text{L}$  da mistura reacional foram coletadas em intervalos periódicos. Sequencialmente, as amostras foram lavadas com água destilada e centrifugadas, com o propósito de separar a fase orgânica do glicerol.

Neste trabalho, optou-se por realizar o monitoramento da reação de transesterificação empregando o método FTIR, considerado uma abordagem fácil, precisa, confiável, barata e rápida. A banda de carbonila (C=O) de ésteres alifáticos está localizado entre 1750 e 1735  $\text{cm}^{-1}$  e, desta forma, essa região foi escolhido como marcador de transesterificação [179–181].

Com a finalidade de isolar a contribuição dos ésteres etílicos da contribuição dos ácidos graxos livres, foi realizada a segunda derivada dos espectros de absorção [179]. Sabe-se que na segunda derivada, a intensidade dos picos negativos é proporcional à intensidade original, mas é inversamente proporcional ao quadrado da meia largura no espectro medido [179, 182]. Sendo assim, é esperado que a segunda derivada de FTIR melhore a precisão de componentes nítidos, como a de ésteres etílicos, e reduza a contribuição de bandas largas, como nesse caso, dos triglicerídeos e ácidos graxos livres [179, 182].

Os espectros de absorção FTIR foram obtidos utilizando o mesmo equipamento usado na seção 5.4.2. Os espectros da derivada segunda foram obtidos após a utilização do método de suavilização de *Savitsky-Golay* (polinômio de segunda ordem e 11 pontos de janela) dos espectros de absorção utilizando o software *Origin*.

## 5.10 Reações de transesterificação

As condições operacionais adotadas foram baseadas em trabalhos dispostos na literatura e nos testes iniciais realizados, sendo eles: proporção molar entre óleo e etanol de 1:5, 1:10 e 1:15, tempo de reação de 60 min a 120 min, 2% (m/m) de catalisador e temperatura de reação de

40 °C. As reações foram monitoradas usando o FTIR. As reações de transesterificação realizadas nas diferentes condições podem ser vistas na Tabela 5.

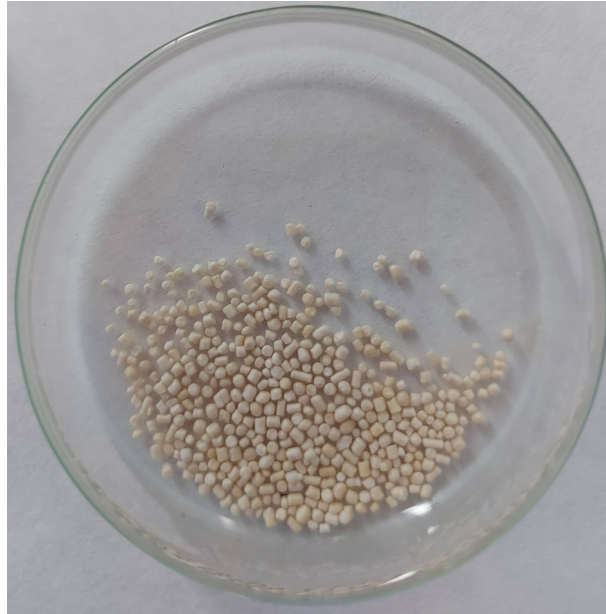
**Tabela 5** – Reações de transesterificação realizadas em diferentes proporções molares entre óleo e etanol e tempo de reação.

<b>Reação</b>	<b>Óleo:Etanol</b>	<b>Tempo (h)</b>
R1	1:5	1
R2	1:5	2
R3	1:10	1
R4	1:10	2
R5	1:15	1
R6	1:15	2

## 6 Resultados e discussão

### 6.1 HPG-LIP

As microcápsulas de HPG-LIP sintetizadas, neste trabalho, por meio da técnica microfluídica, podem ser observadas na Figura 11.

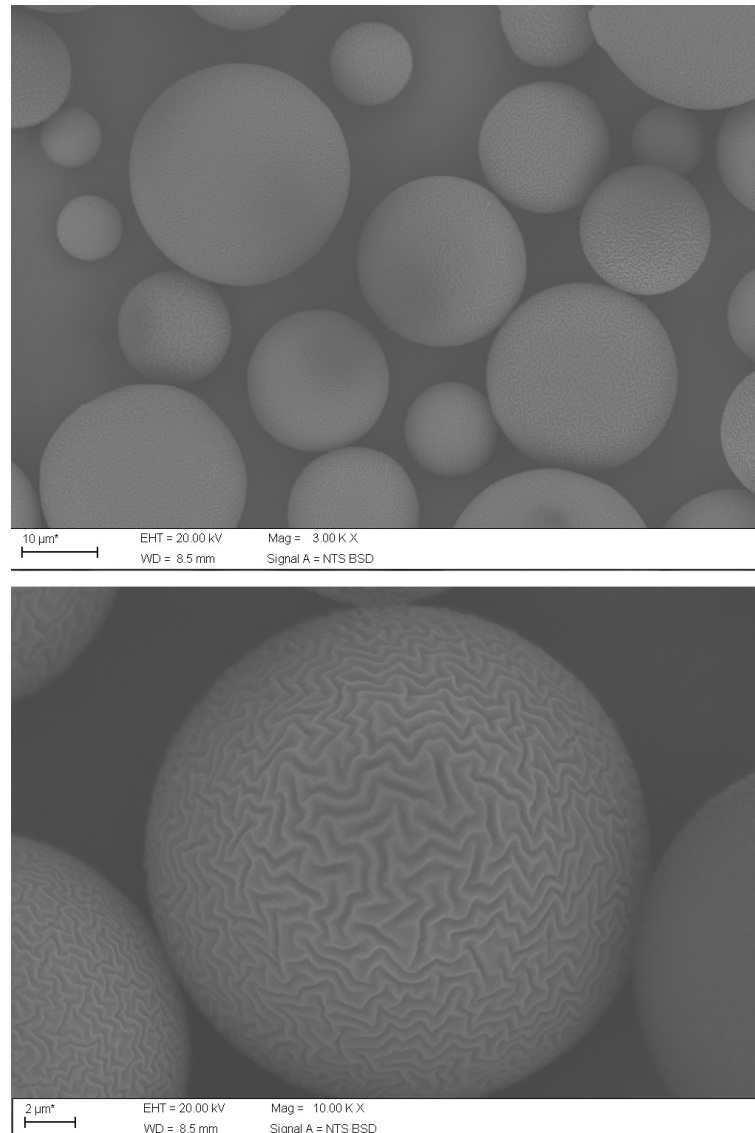


**Figura 11** – Microcápsulas de HPG-LIP sintetizadas neste trabalho.  
**Fonte:** a Autora.

### 6.2 Caracterização do HPG-LIP

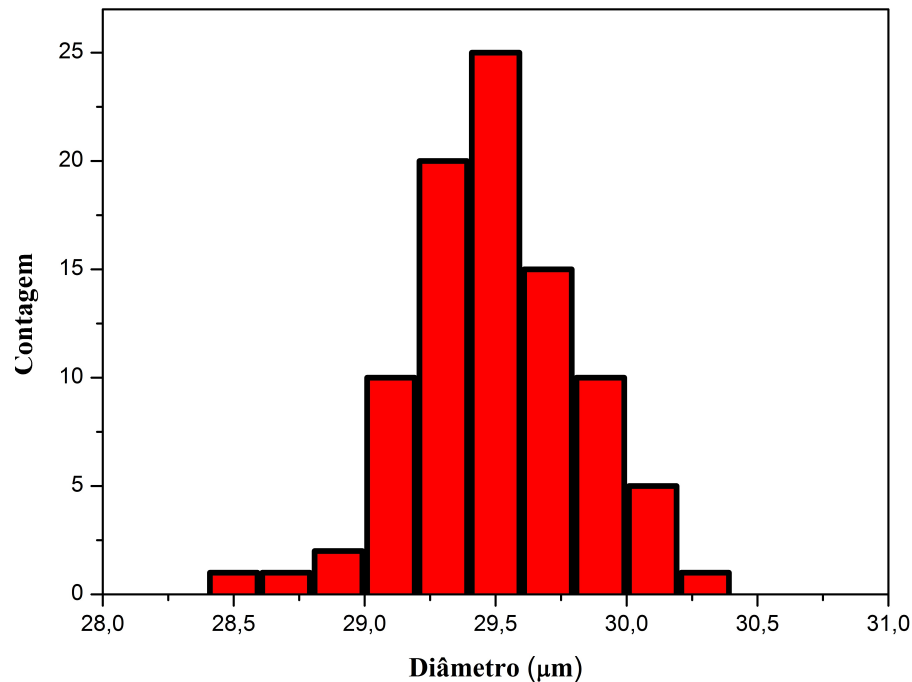
#### 6.2.1 MEV

A ideia principal da abordagem proposta para o encapsulamento de LIP em microcápsulas de HPG é a exploração de peculiaridades estruturais do polímero hiper-ramificado, como espaço vazio de tamanho molecular, que são adequados para o aprisionamento de enzimas. As análises de MEV das microcápsulas de HPG-LIP obtidas podem ser vistas na Figura 12. Vários aspectos característicos dessas partículas devem ser observados: (i) uma morfologia próxima ao esférico, (ii) tamanho consistente, com um diâmetro médio em torno de  $29 \mu\text{m}$ , e (iii) rugosidade pronunciada de sua superfície externa. Essas características estruturais e morfológicas das microcápsulas de HPG-LIP parecem estar diretamente relacionadas ao aumento espontâneo da área interfacial durante a exposição aos raios UV, levando à formação de microcápsulas uniformes com superfícies texturizadas [183].



**Figura 12** – Imagens MEV das microcápsulas de HPG-LIP.  
**Fonte:** a Autora.

Usando o MEV foram analisados o diâmetro médio e a distribuição de tamanho das microcápsulas de HPG-LIP sintetizadas, conforme mostrado na Figura 13. As microcápsulas de HPG-LIP apresentaram uma distribuição monomodal com aproximadamente  $29 \mu\text{m}$ . Na verdade, em reações heterogêneas catalisadas por enzimas, o tamanho da partícula e a uniformidade das microcápsulas têm um efeito importante na taxa de reação, devido à uniformidade do fluxo de difusão para todas as partículas em reação [184].



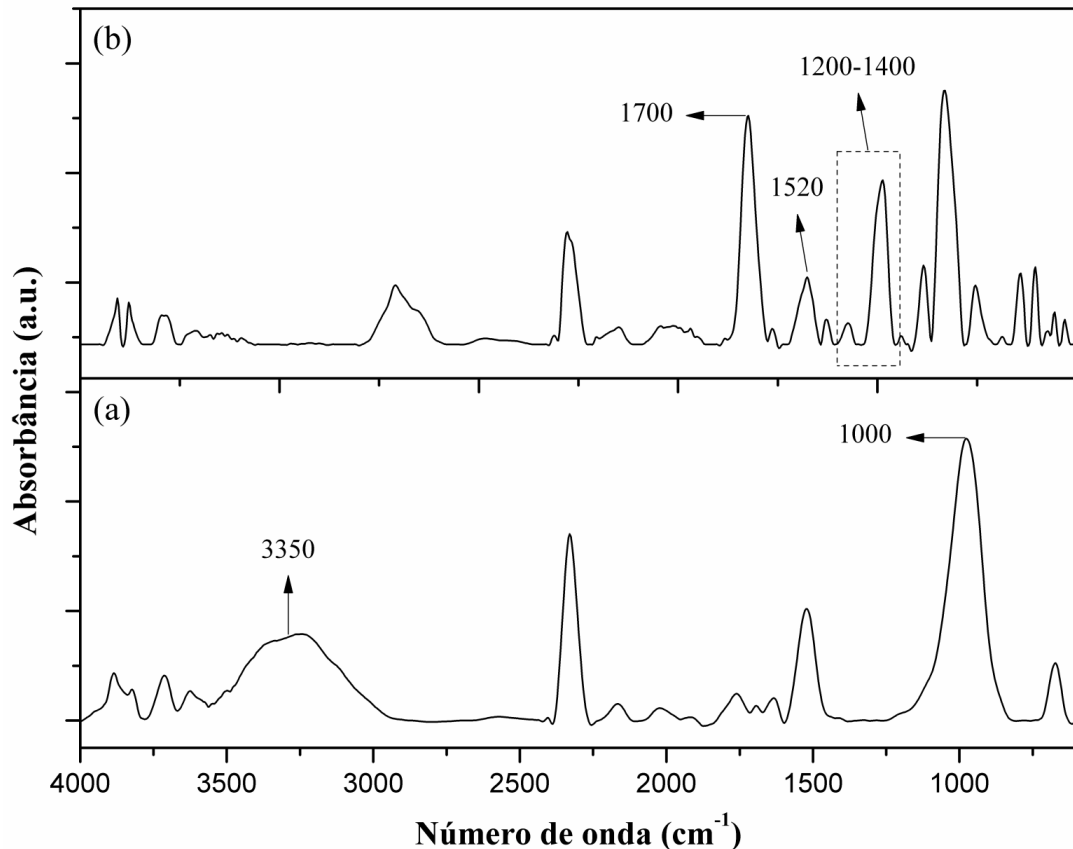
**Figura 13** – Histograma de distribuição de tamanho de partículas das microcápsulas de HPG-LIP preparadas em célula microfluídica.

**Fonte:** a Autora.

### 6.2.2 ATR-FTIR

A espectroscopia ATR-FTIR foi aplicada para verificar o encapsulamento de LIP pelo HPG, conforme mostrado na Figura 14. No espectro de FTIR referente ao HPG é possível observar que ele foi dominado pela vibração de alongamento de grupos éter alifático (C-O-C) a  $1000\text{ cm}^{-1}$  e a vibração característica de alongamento OH em torno de  $3350\text{ cm}^{-1}$  [185–189]. As bandas em torno de  $2300\text{ cm}^{-1}$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  são correspondentes ao modo de vibração alifática C-H em  $\text{CH}_2$  e grupos hidroxila presentes na estrutura do HPG. É importante evidenciar que os picos presentes nas regiões espectrais supracitadas são os principais picos atribuídos à estrutura do poliglicerol hiper-ramificado [187, 189].

De acordo com a figura 14, o espectro das microcápsulas HPG-LIP apresenta uma banda de absorção forte em torno de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída ao alongamento C=O da amida I, e a banda de absorção na região próxima a  $1520\text{ cm}^{-1}$  que pode ser associada ao grupo de amida II relacionada às ligações N-H e C-N [190]. A esse respeito, alguns pesquisadores afirmam que a absorção nessas regiões representa a estrutura secundária da lipase nativa, a mais importante das quais são as estruturas  $\beta$ -sheet e  $\alpha$ -helix [191]. Bandas de absorção fracas e médias são observadas em  $1200 - 1400\text{ cm}^{-1}$  que podem ser atribuídas à ligação amida III [190].



**Figura 14** – Espectro de infravermelho das amostras HPG (a) e HPG-LIP (b).

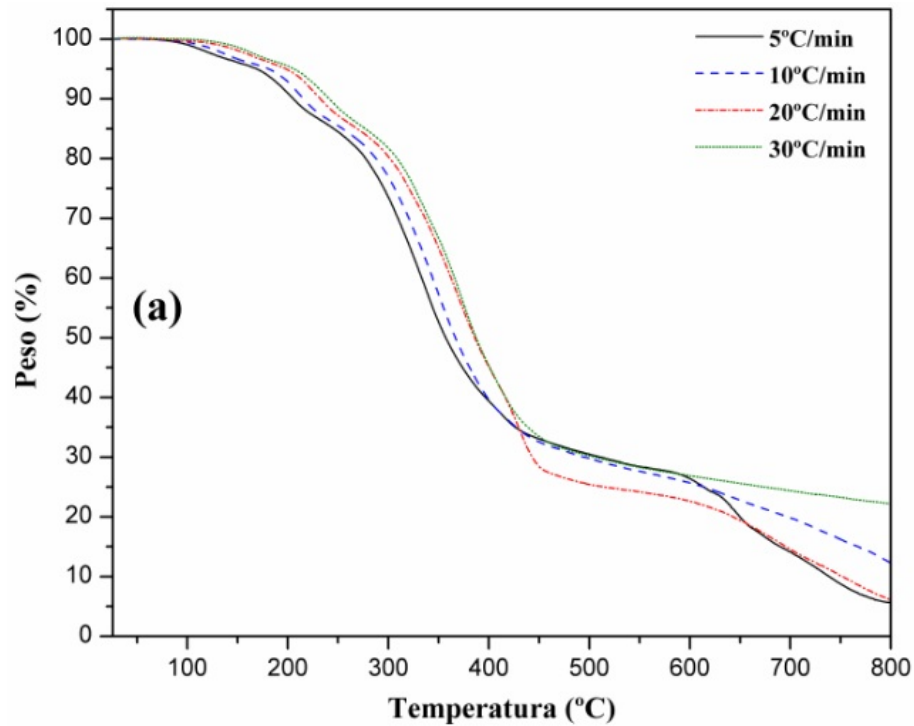
**Fonte:** a Autora.

De modo geral, os resultados obtidos a partir da análise de FTIR indicam que o encapsulamento da LIP pelo HPG foi bem sucedido. A presença das bandas amida I e amida II também podem ser prova de que a LIP encapsulada pode ter preservada sua atividade [191–193]. Os resultados apresentados estão de acordo com investigações anteriores relatadas na literatura [194–201].

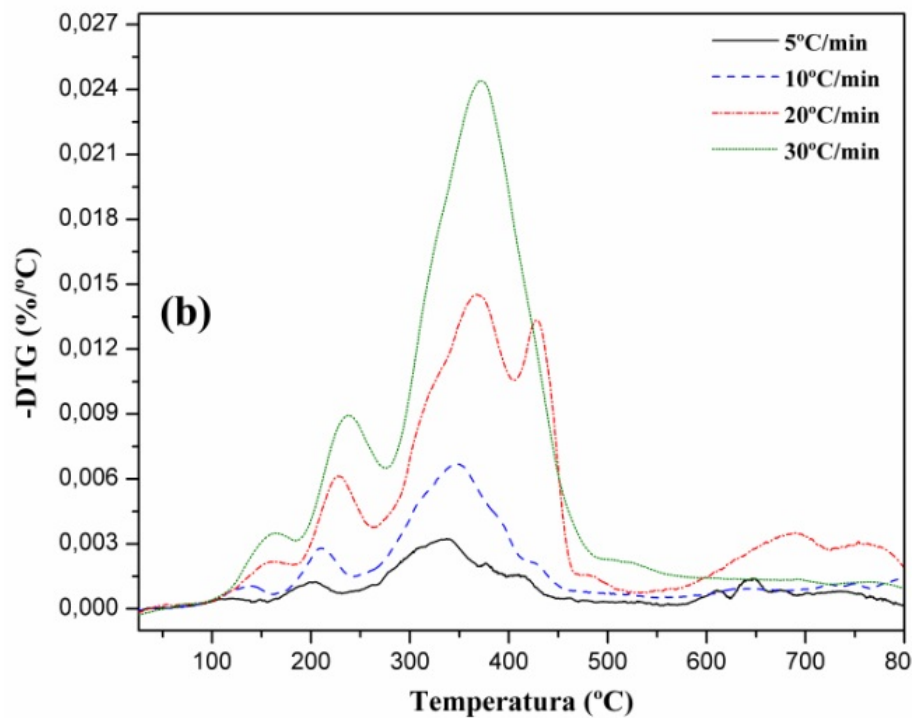
### 6.2.3 TGA

Medidas de TGA foram realizadas para obter informações sobre a estabilidade térmica das microcápsulas de HPG-LIP. As curvas termogravimétrica (TG) e termogravimétrica derivada (DTG) para HPG-LIP obtidas neste estudo são mostradas na Figura 15 e 16, respectivamente.

Pode-se perceber nas curvas TG e DTG que os perfis de perda de peso exibiram essencialmente três eventos principais de decomposição em quatro taxas de aquecimento 5, 10, 20 e 30 °C sob atmosfera de nitrogênio. As curvas de perda de peso foram divididas em três regiões (Figura 15): região I (25–200 °C), região II (200–450 °C) e região III (600–800 °C). A Figura 15 mostra que, na região I, o HPG-LIP perde massa, a temperaturas abaixo de 100 °C, relacionada



**Figura 15** – TG das amostras do HPG-LIP nas diferentes taxas de aquecimento.  
**Fonte:** a Autora.



**Figura 16** – DTG das amostras do HPG-LIP nas diferentes taxas de aquecimento.  
**Fonte:** a Autora.

à evaporação da água adsorvida e ligada nas microcápsulas e representa aproximadamente 5% da perda de massa total em média das amostras. A região II mostra alta perda de massa com o

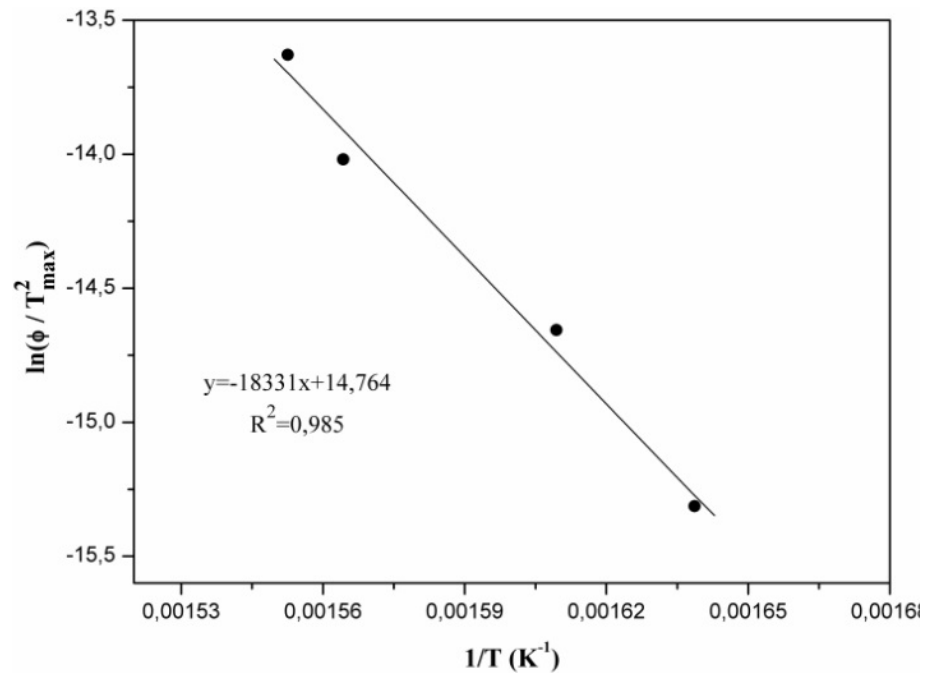
aumento da temperatura para HPG-LIP e representa aproximadamente 65% da perda de massa total na média das amostras. O evento da região II corresponde à degradação do HPG-LIP, que consistiu em vários processos simultâneos, como despolimerização, desidratação e decomposição das unidades de HPG e LIP. Na região III, uma ligeira variação na massa foi observada após a degradação térmica do suporte (HPG) e do biocatalisador encapsulado (LIP).

Nas curvas TG e DTG obtidas é possível observar o ponto no qual houve a maior perda de material das amostras em diferentes razões de aquecimento. Este ponto corresponde à temperatura de máxima degradação e foi encontrado para cada amostra conforme pode ser visto na Tabela 6. A partir das análises termogravimétricas, foi verificado que a temperatura de máxima degradação varia em função das taxas de aquecimento em cada amostra, sendo que há um aumento dessa temperatura com o aumento da razão de aquecimento. De acordo com Conceição et al. (2007), uma explicação plausível para este comportamento é que a distribuição de calor na amostra se torna menor com o aumento da taxa de aquecimento [202]. Logo, são necessárias temperaturas mais elevadas para conseguir distribuir uniformemente o calor na amostra e alcançar a sua temperatura de degradação [202]. Assim, as curvas TG são deslocadas para valores mais altos de temperatura devido à transferência de calor [175, 202].

**Tabela 6** – Temperatura de máxima degradação para cada amostra em diferentes taxas de aquecimento e energia de ativação das amostras.

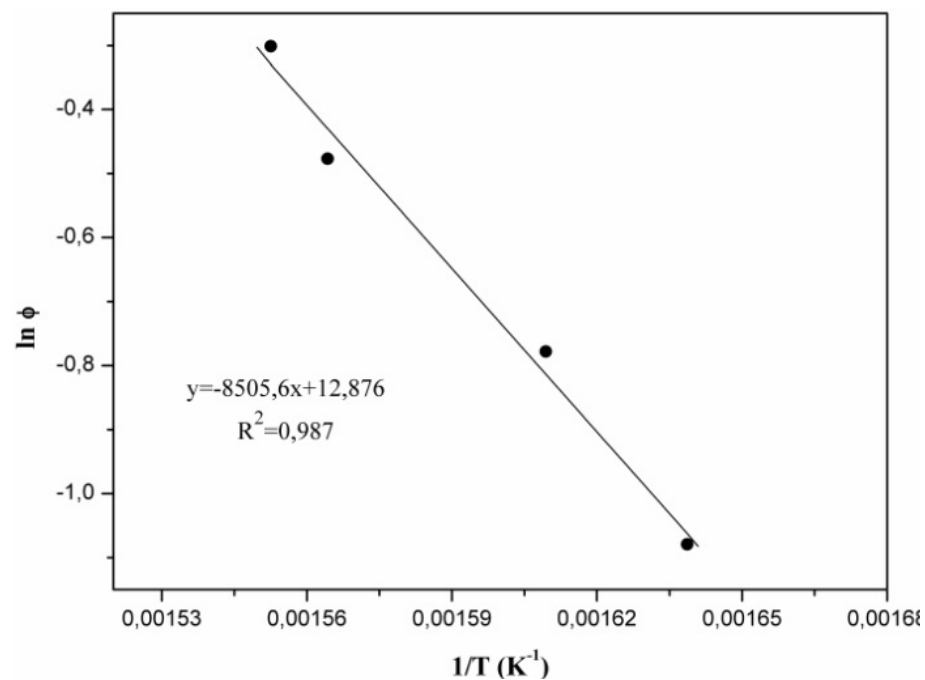
Amostras/ taxas de aquecimento ( $\phi$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )				$E_A$ (kJ/mol)	
	5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Kissinger	Ozawa
HPG-LIP	337,1	348,2	366,1	370,9	152,4	154,8

Com o propósito de determinar a energia de ativação aparente ( $E_A$ ) que representa a energia necessária para iniciar a quebra da espinha dorsal das cadeias de HPG-LIP, foram empregados o método de Kissinger e o método de Ozawa. Os gráficos presentes nas Figuras 17 e 18 foram construídos com base nos dados experimentais adequadamente aplicados às Equações 39 e 40, respectivamente. Com os parâmetros descritos nos gráficos dispostos nas Figuras 17 e 18 foram obtidas as  $E_A$  através dos dois métodos. A Tabela 6 apresenta as energias de ativação das amostras calculadas pelos diferentes métodos.



**Figura 17** – Gráfico referente à regressão linear do método de Kissinger para determinação da energia de ativação para degradação térmica do HPG-LIP.

**Fonte:** a Autora.



**Figura 18** – Gráfico referente à regressão linear do método de Ozawa para determinação da energia de ativação para degradação térmica do HPG-LIP.

**Fonte:** a Autora.

Comparativamente, pode-se verificar que os valores da  $E_A$  obtidos pelos métodos de Kissinger e de Ozawa são muito próximos. Esse resultado sugere que independentemente da metodologia usada nesse trabalho para a definição da energia de ativação, cada amostra apresenta

praticamente a mesma estabilidade térmica.

Para este estudo, ambos os métodos escolhidos mostraram ótima concordância quando empregados para determinar as energias de ativação das amostras. De maneira geral, é possível observar também que os coeficientes de correlação obtidos são de boa qualidade e indicam que os modelos cinéticos empregados neste trabalho se aproximam bem dos processos reais.

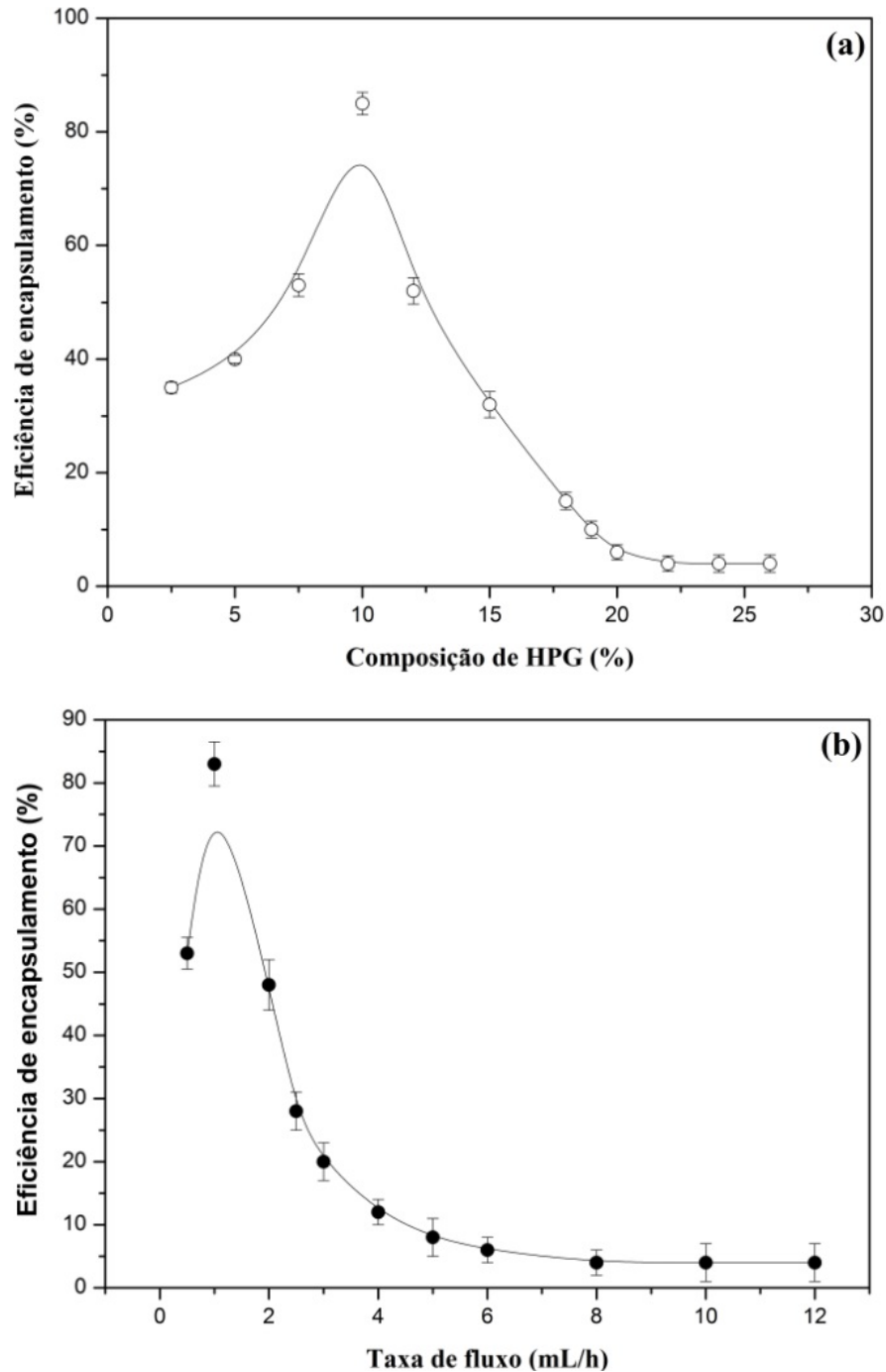
Uma vez que as microcápsulas de HPG propostas se destinam ao uso em processos de biotecnologia, o HPG-LIP é totalmente estável em torno da temperatura de atividade ideal para LIP imobilizada em reator de leito fixo, que normalmente varia entre 52 °C e 68 °C [203].

#### 6.2.4 Eficiência do encapsulamento (EE) da LIP

Na produção de microcápsulas por meio da técnica microfluídica, a EE é frequentemente dependente da taxa de fluxo e da composição do polímero. Foram investigados a influência das condições de taxa de fluxo, bem como, das composições de HPG nos resultados da eficiência de encapsulamento da LIP, a fim de compreender de forma abrangente as capacidades do dispositivo microfluídico para esta aplicação.

Conforme pode ser observado na Figura 19, a EE da LIP em torno de 85% foi significativamente afetada pela composição de HPG e pela taxa de fluxo da célula microfluídica. A razão para isso é a capacidade limitada de interação entre a LIP hidrofóbica e o HPG em altas concentrações de polímero e taxas de fluxo, respectivamente. De acordo com a Figura 19, a capacidade máxima de LIP que pode ser encapsulada é de aproximadamente 85% em relação à concentração de HPG de 10% em peso e taxa de fluxo total de 1,0 mL/h. Após o encapsulamento, a atividade específica da LIP pode ser completamente recuperada ( $100 \pm 2\%$ ) para as microcápsulas de HPG-LIP. A explicação mais provável para isso é um encapsulamento mais completo e rápido da LIP nas microcápsulas de HPG, minimizando as interações prejudiciais entre a proteína e a água no processo.

As condições de operação adequadas da célula microfluídica para obter a eficiência máxima de encapsulamento foram alcançadas pelo uso de redes neurais artificiais (RNAs). Em particular, as RNAs foram usadas para otimizar os parâmetros apropriados da célula microfluídica com o propósito de aumentar o rendimento da produção de microcápsulas de HPG-LIP. Em seguida, o efeito de variáveis independentes, como concentração de HPG (% em peso), taxa de fluxo microfluídico (mL/h) e carga de LIP (% em peso) na EE e na atividade de encapsulamento da



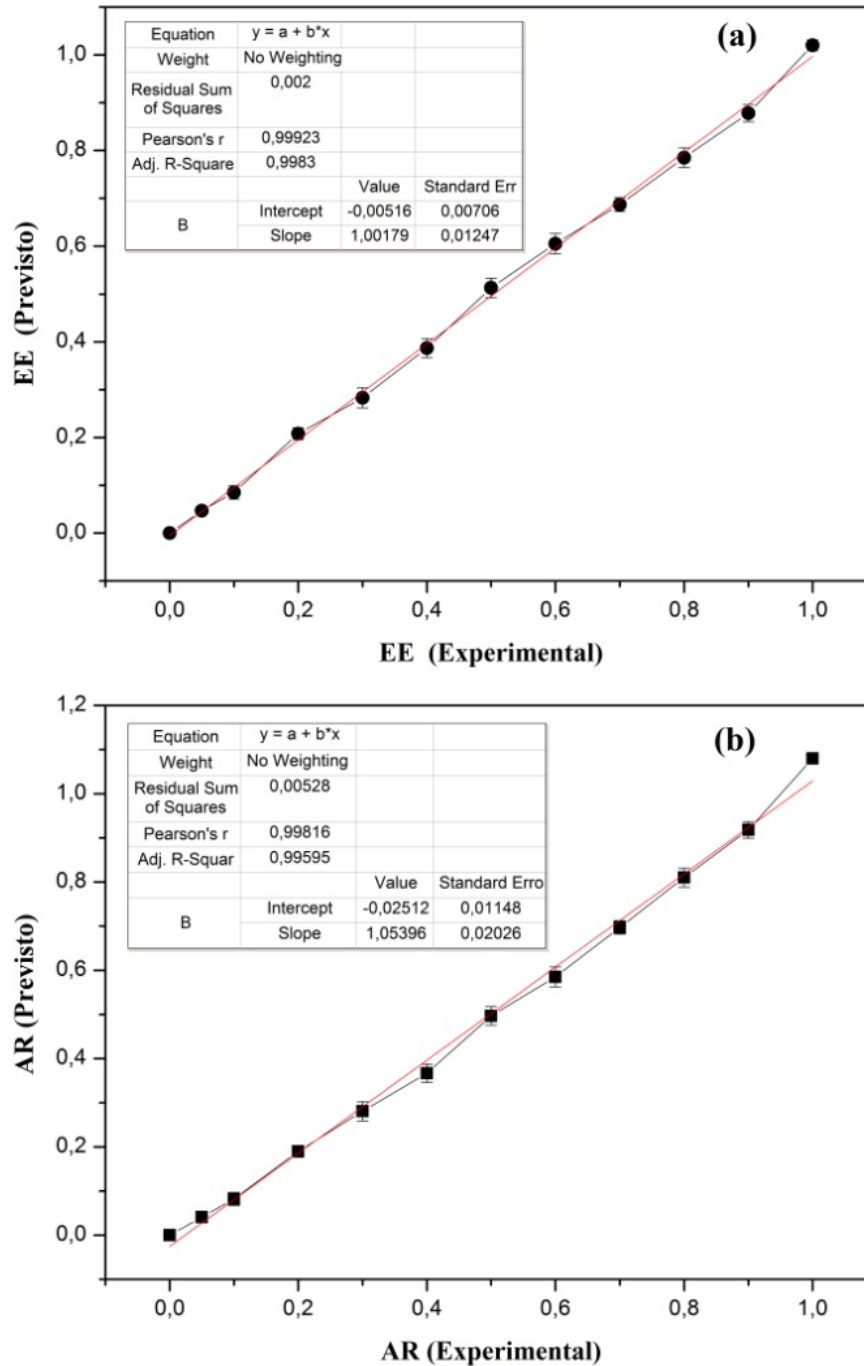
**Figura 19** – Influência da composição de HPG e taxa de fluxo na eficiência de encapsulação de LIP. Os dados foram obtidos à temperatura ambiente (20 °C).

**Fonte:** a Autora.

LIP foram investigados. Conforme os resultados obtidos, os parâmetros celulares microfluídicos para imobilização da LIP otimizados pela RNA foram: concentração de HPG de 10% em peso, carga de LIP de 20% em peso e taxa de fluxo total na célula microfluídica de 1,0 mL/h.

A Figura 20 apresenta a análise de regressão obtida com a finalidade de determinar a relação entre os alvos (dados experimentais) com a rede de saída (valores de previsão) sob uma

condição otimizada. O gráfico da figura mostra que a rede é capaz de prever eficientemente a EE e AR no processo microfluídico, devido a um alto coeficiente de correlação ( $R_{EE}^2 = 0,9983/R_{AR}^2 = 0,99595$ ) entre os valores experimentais e previstos pela rede.



**Figura 20** – Comparação entre os valores experimentais e previstos da eficiência de encapsulamento (EE) (a) e da atividade relativa (AR) (b) pela RNA-MLP.

**Fonte:** a Autora.

### 6.3 Determinação dos parâmetros cinéticos da LIP

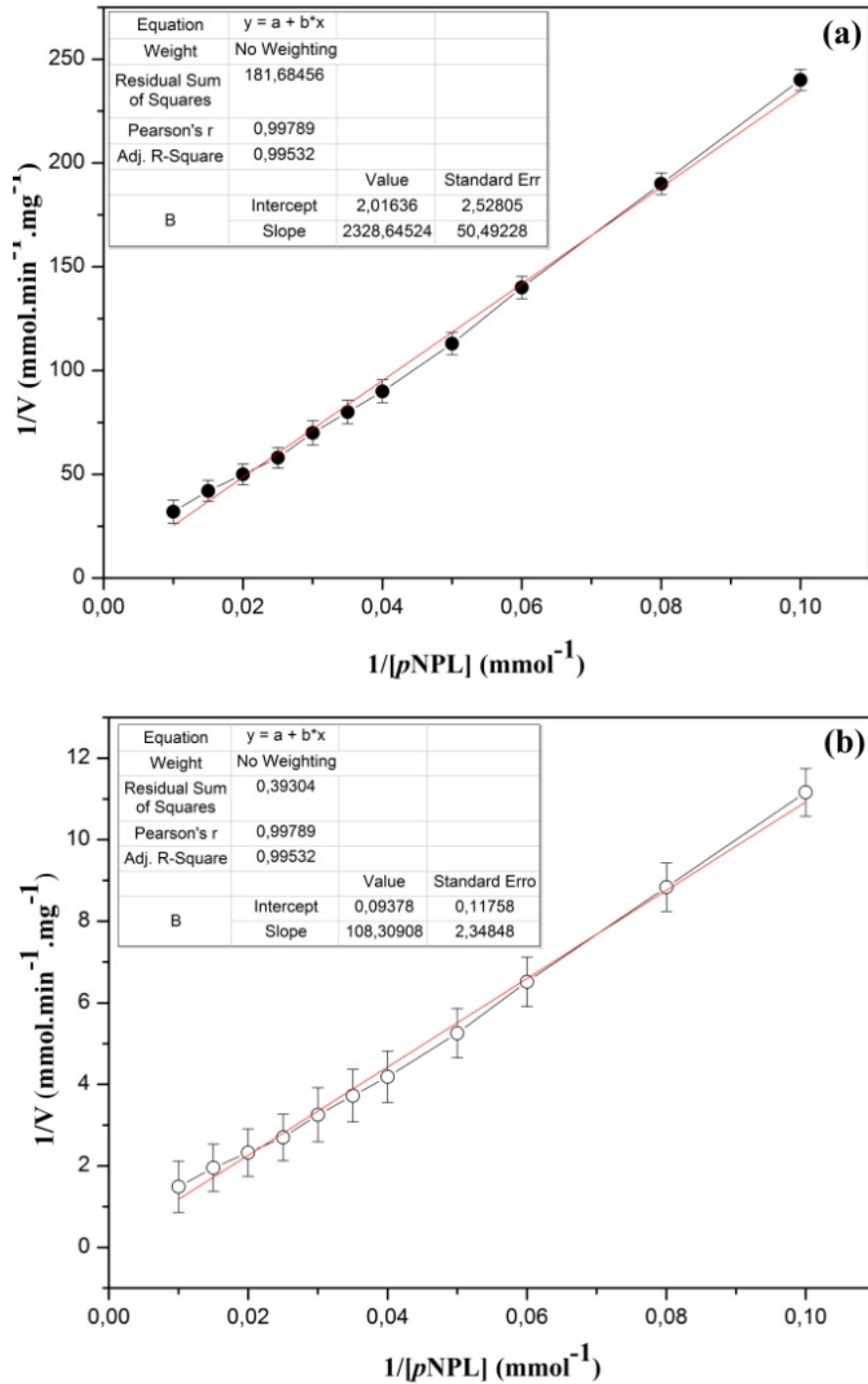
Assumindo que a reação de hidrólise de *p*NPL pela LIP encapsulada obedeceu à cinética de Michaelis-Menten, a constante de Michaelis aparente ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{máx}$ ) foram calculadas por regressão linear. A linha reta da Figura 21 mostra os gráficos de Lineweaver-Burk da LIP livre e do HPG-LIP. O parâmetro cinético de acordo com a Figura 21 foi tabulado na Tabela 7 com o coeficiente de correlação de Pearson ( $R^2$ ) da reação de 0,995. Após a imobilização, o valor de  $K_m$  diminuiu ligeiramente (Tabela 7), indicando uma boa preservação da afinidade entre HPG-LIP para o substrato *p*NPL. Além disso, a taxa de reação máxima ( $V_{máx}$ ) e o número de *turnover* ( $K_{cat}$ ) do HPG-LIP foram significativamente maiores do que o para a LIP livre (Tabela 7). A eficiência catalítica ( $K_{cat}/K_m$ ) do HPG-LIP aumentou mais de 20 vezes, em comparação com a da enzima livre (LIP). A maior eficiência catalítica observada de HPG-LIP pode ser atribuída ao confinamento molecular da LIP dentro das microcápsulas HPG, que é um efeito combinado de altas frequências de colisão entre as moléculas de substrato e uma interação significativa entre a LIP e a parede da microcápsula [204]. Vale ressaltar que as constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{máx}$  para LIP livre e HPG-LIP foram determinadas testando-as em várias concentrações de substrato *p*NPL, conforme descrito na seção de materiais e métodos (seção 5.5.1).

**Tabela 7** – Parâmetros cinéticos da hidrólise de *p*NPL usando HPG-LIP.

Parâmetros cinéticos	HPG-LIP	LIP
$V_{máx}$ ( $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ )	10,66	0,50
$K_m$ (mM)	1154,94	1164,32
$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	2282,65	107,07
$K_{cat}/K_m$	1,98	0,09

### 6.4 Determinação da atividade da LIP

Foi verificada a influência da temperatura e do tempo na atividade da LIP imobilizada. Após o ensaio da atividade da LIP imobilizada ser realizado no reator batelada foi possível calcular os valores da atividade da enzima de acordo com a Equação 41, sabendo-se que o volume de KOH gasto na titulação de controle foi igual a 3,1 mL. Os resultados das atividades hidrolíticas da LIP medidas em várias temperaturas, variando de 25 °C a 60 °C, e em diferentes tempos de reação, entre 20 min e 200 min, são mostrados na Figura 22.

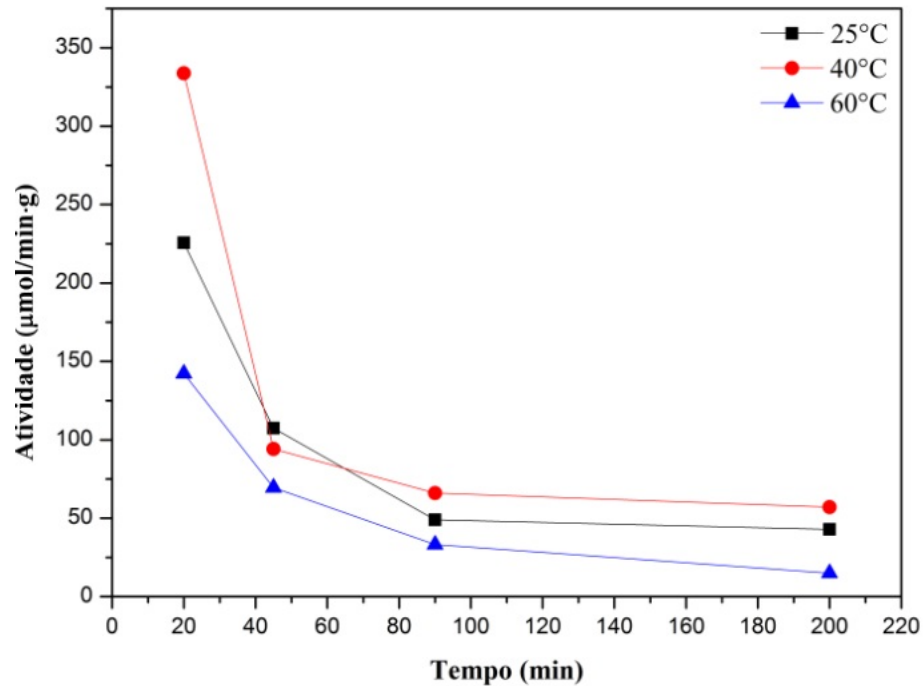


**Figura 21** – Gráficos Lineweaver–Burk para a LIP livre (a) e para o HPG-LIP (b).

**Fonte:** a Autora.

A partir da observação da Figura 22, é possível constatar que a temperatura e o tempo de reação têm efeitos bastante significativos na ação da LIP. Pode-se observar que, de maneira geral, em todas as condições experimentais houve uma diminuição contínua da atividade da LIP em função do tempo. Este efeito é mais pronunciado em condições de alta temperatura.

Com base nos resultados obtidos, pode-se notar que, quando a temperatura de reação foi



**Figura 22** – Efeitos da temperatura na atividade da LIP imobilizada ao longo do tempo de reação.

**Fonte:** a Autora.

de 25 °C a 40 °C, no tempo de 20 min, houve um aumento considerável na atividade da LIP imobilizada em cerca de 50%. Assim, 40 °C e 20 min correspondem à temperatura e tempo ótimos para atividade da LIP imobilizada nas condições estabelecidas no ensaio. Resultados semelhantes foram relatados por Ting et al. (2006), uma vez que eles encontraram 40°C como a temperatura ótima para a LIP de *Candida rugosa* imobilizada em quitosana [205]. Nos estudos de Nie et al. (2006) utilizando LIP de *Candida sp.* imobilizada em uma membrana têxtil e de Kabbashi et al. (2015) empregando a LIP de *Candida cylindracea* imobilizada em suporte de carvão ativado, a temperatura ótima obtida também situava-se em torno de 40°C [206, 207]. No trabalho de Yong et al. (2008), a lipase de *Candida rugosa*, imobilizada em microesferas magnéticas hidrofílicas, apresentou a temperatura ideal na faixa de 35 – 40 °C [208].

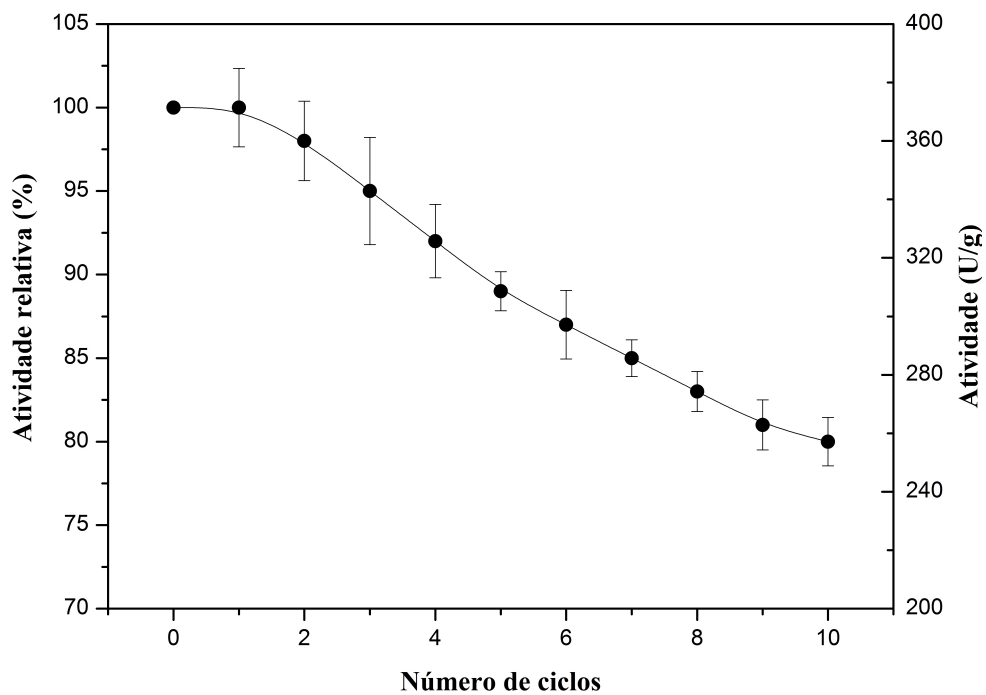
Em relação à LIP de *Candida rugosa* livre, de acordo com Ting et al. (2006), a temperatura ótima é de 35 °C [205]. Comparando as temperaturas ótimas da enzima imobilizada e livre, pode-se observar que a enzima imobilizada apresentou aumento de 5 °C na temperatura ótima, o que sugere que a LIP apresentou melhor resistência à inativação quando imobilizada no suporte de HPG [205]. Esse resultado foi causado por alterações nas propriedades da LIP devido ao método de imobilização empregado.

É perceptível ainda, nesse estudo, que a atividade da LIP imobilizada não foi muito

afetada em temperaturas abaixo de 40 °C. Por outro lado, a atividade da enzima foi claramente modificada na temperatura de 60 °C, apresentando valores baixos, especialmente em tempos maiores que 45 min. Esse fato pode ser explicado devido às altas temperaturas de reação ocasionarem a desativação térmica da LIP [209–211].

## 6.5 Reutilização de HPG-LIP

A vantagem mais óbvia das microcápsulas de HPG-LIP sobre a LIP livre é que elas podem ser reutilizadas, resultando em custos de produção mais baixos. A capacidade de reutilização foi investigada conduzindo os experimentos de acordo com o protocolo de ensaio de atividade. Os dados de reutilização de HPG-LIP são mostrados na Figura 23. Pode-se verificar na figura que a atividade diminui gradualmente após 12 ciclos de hidrólise de *p*NPL. Após 10 ciclos de hidrólise repetida de *p*NPL, a atividade de HPG-LIP ainda permanece em 81,5%. O tamanho dos poros torna-se gradualmente maior após o uso repetido, resultando no aumento do vazamento da LIP e redução da atividade do HPG-LIP [114]. Presume-se neste trabalho que a estrutura das microcápsulas de HPG-LIP é altamente estável e, portanto, parece minimizar o vazamento de LIP, levando a um maior rendimento após vários ciclos.

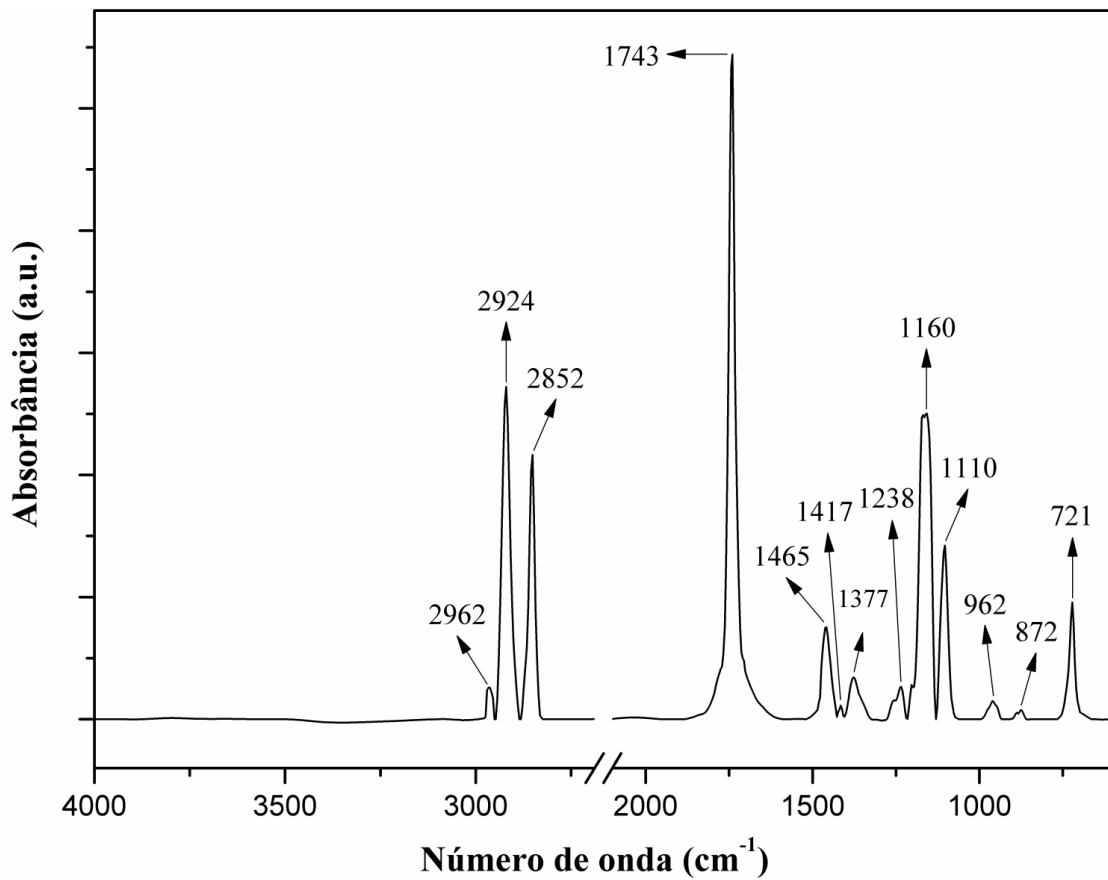


**Figura 23** – Capacidade de reutilização do HPG-LIP.  
**Fonte:** a Autora.

## 6.6 Caracterização do OCB

### 6.6.1 FTIR

A Figura 24 mostra o espectro de infravermelho da amostra de OCB. As bandas de absorção presentes nesse material são claramente identificadas e podem ser vistas na Tabela 8. Face aos resultados encontrados, pode-se salientar que o espectro do óleo de coco apresenta bandas características de absorção para triglicerídeos comuns, conforme o esperado e relatado nos trabalhos científicos dispostos na literatura [212–215].



**Figura 24** – Espectro de infravermelho da amostra de óleo de coco.

**Fonte:** a Autora.

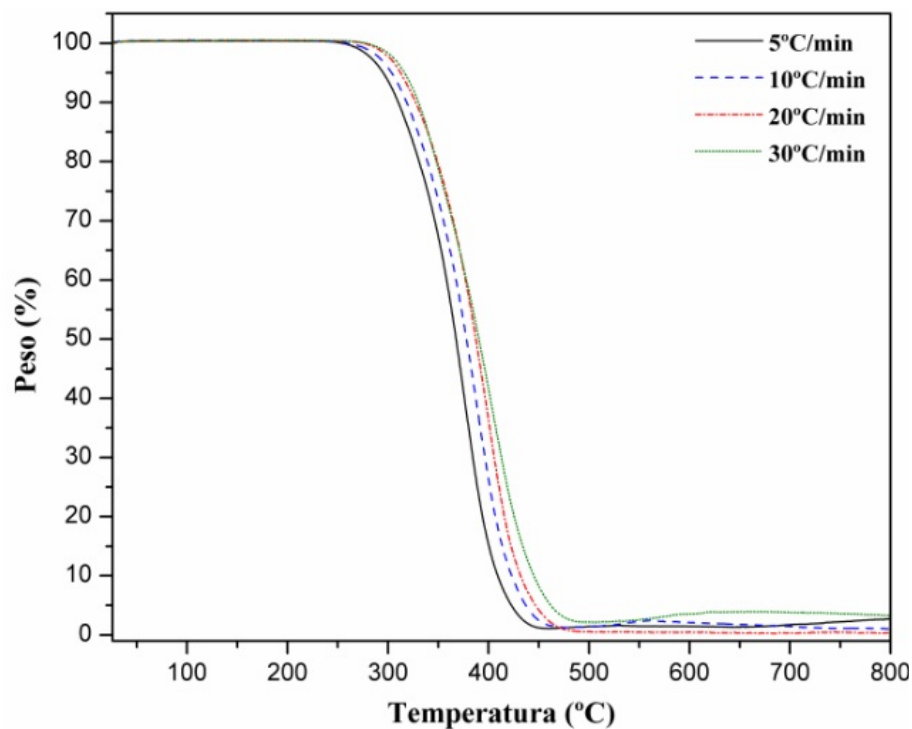
**Tabela 8** – Frequências e informações do espectro FTIR do óleo de coco.

Frequência ( $cm^{-1}$ )	Grupo funcional/Modos de vibração
2962	Vibração de alongamento do grupo $CH_3$ alifático
2924	Vibração de alongamento assimétrico do grupo $CH_2$ alifático
2852	Vibração de alongamento simétrico do grupo $CH_2$ alifático
1743	Vibração de alongamento do grupo de éster de carbonila $C = O$
1465	Vibrações de flexão do grupo alifático $CH_2$
1417	Vibrações oscilantes de ligações $=CH$ de olefinas <i>cis</i> -dissubstituídas
1377	Vibrações de flexão do grupo $CH_3$
1238	Vibração de alongamento do grupo $C - O$ em éster
1160	Vibração de alongamento do grupo $C - O$ e vibração de flexão do grupo $CH_2$
1110	Vibração de alongamento do grupo $C - O$
962	Vibração de flexão fora do plano de olefinas <i>trans</i> $HC = CH$
872	Vibração do grupo $=CH_2$
721	Sobreposição da vibração oscilante $CH_2$ e vibração fora do plano de olefinas <i>cis</i> $HC = CH$

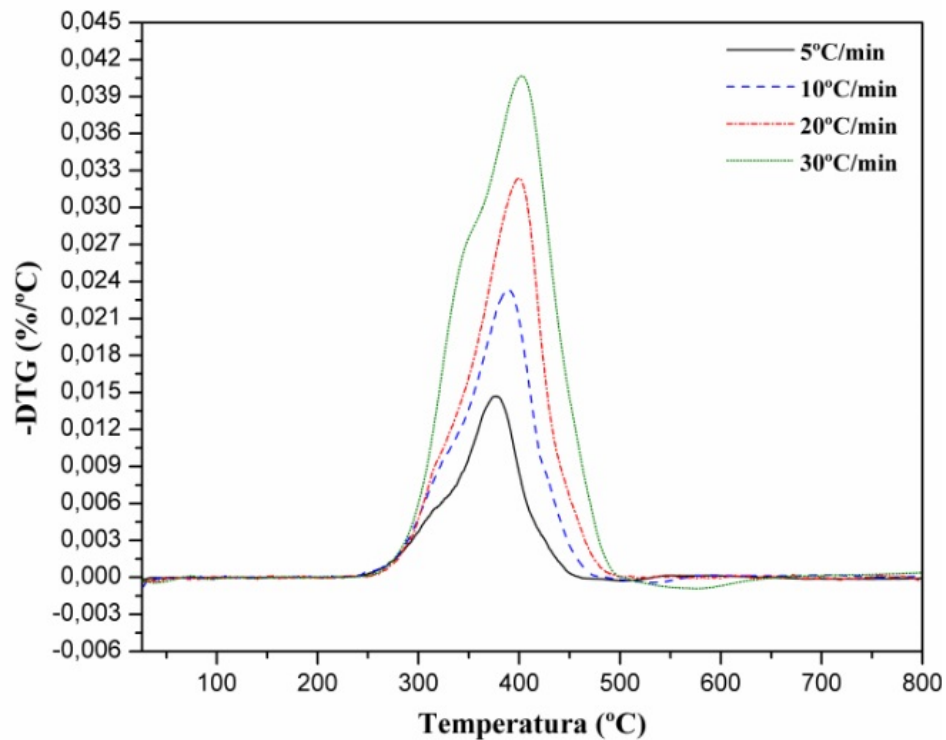
Fonte: ROHMAN, A. et al. [212], GUILLÉN, M. D.; CABO, N. [213, 215], VLACHOS, N. et al. [214].

### 6.6.2 TGA

O processo de decomposição térmica do OCB foi investigado no intervalo de temperatura de 25 °C a 800 °C em quatro taxas de aquecimento. As Figuras 25 e 26 apresentam as curvas TG e DTG, respectivamente, obtidas sob atmosfera de nitrogênio nas diferentes razões de aquecimento para as amostras de OCB.

**Figura 25** – TG das amostras do óleo de coco nas diferentes taxas de aquecimento.

Fonte: a Autora.



**Figura 26** – DTG das amostras do óleo de coco nas diferentes taxas de aquecimento.

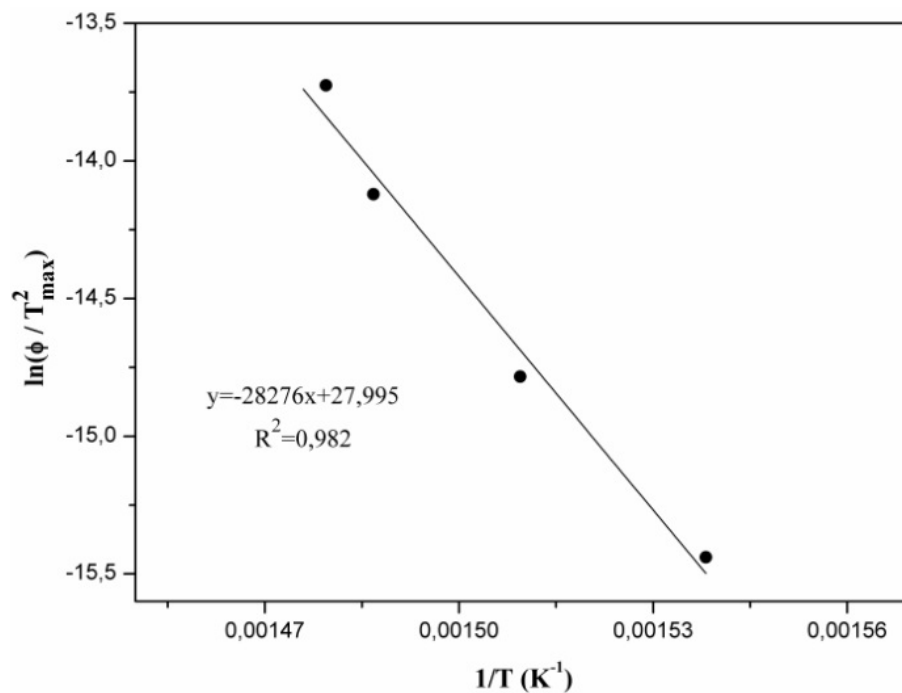
**Fonte:** a Autora.

Como pode ser observada nas Figuras 25 e 26, a decomposição térmica das amostras de óleo de coco nas diferentes taxas de aquecimento mostrou um padrão de degradação análogo. Pode-se verificar que houve um deslocamento do perfil da curva (Figura 25) com o aumento da taxa de aquecimento. Para essa amostra a degradação térmica ocorreu, claramente, em um único estágio na região de temperatura entre 250 °C e 500 °C. Na temperatura de aproximadamente 257 °C ocorre o início da degradação térmica no óleo de coco [68, 216]. A partir dessa temperatura, o hidrocarboneto oxigenado começa a se decompor lentamente em hidrocarbonetos voláteis de baixo peso molecular, monóxido de carbono e dióxido de carbono [68, 216, 217]. De acordo com Kumar, Shill e Chatterjee (2020), a degradação térmica do óleo de coco acontece em uma temperatura bem superior às temperaturas de ponto quente previstas para o transformador, sendo assim, é possível utilizar o óleo de coco no transformador em aumentos de temperatura similares aos aumentos dos fluidos baseados em éster natural [68].

A fim de determinar a  $E_A$  do OCB foram utilizados o método de Kissinger e o método de Ozawa. As Figuras 27 e 28 apresentam os gráficos construídos para uma série de experimentos em diferentes taxas de aquecimento, utilizando às Equações 39 e 40, respectivamente. A partir dos parâmetros dispostos nos gráficos, foi possível obter a  $E_A$  através dos dois métodos. A Tabela

9 apresenta as energias de ativação das amostras calculadas pelos diferentes métodos para o OCB.

Pode-se constatar que os valores da  $E_A$  obtidos pelos métodos de Kissinger e de Ozawa são bem parecidos. Além disso, os valores de correlação de ajuste de curva são de qualidade, indicando assim, que os métodos usados neste estudo apresentam boa concordância com os valores reais. Os resultados encontrados para o óleo de coco, neste trabalho, estão dentro da faixa de energia de ativação obtidos no estudo de degradação térmica de óleos vegetais relatados na literatura [217,218].

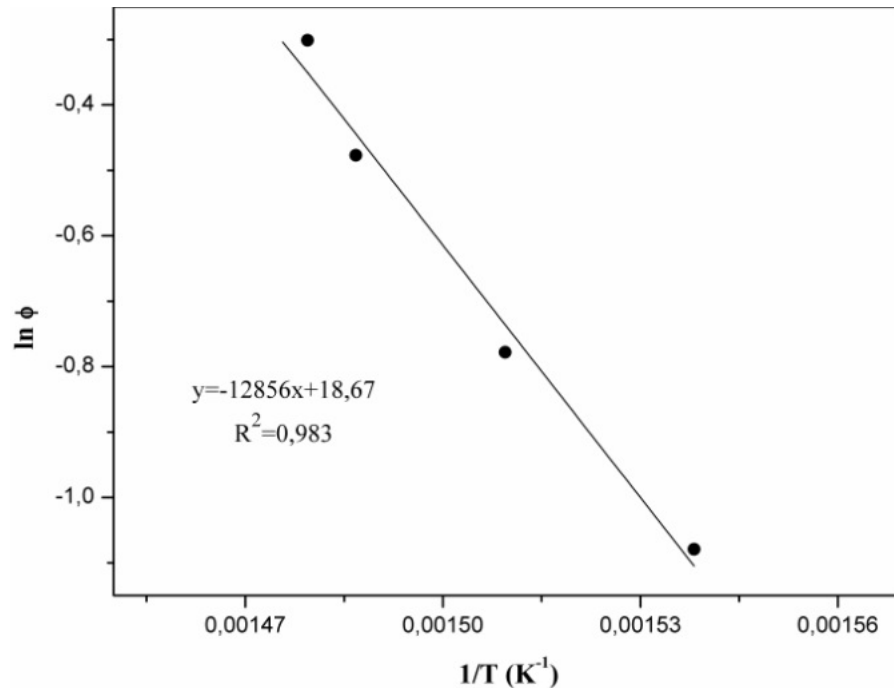


**Figura 27** – Gráfico referente à regressão linear do método de Kissinger para determinação da energia de ativação para degradação térmica do óleo de coco.

**Fonte:** a Autora.

**Tabela 9** – Temperatura de máxima degradação para cada amostra em diferentes taxas de aquecimento e energia de ativação das amostras.

Amostras/ taxas de aquecimento ( $\phi$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )				$E_A$ ( $\text{kJ/mol}$ )	
	5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Kissinger	Ozawa
Óleo de Coco	377,0	389,3	399,4	402,8	235,1	234,0



**Figura 28** – Gráfico referente à regressão linear do método de Ozawa para determinação da energia de ativação para degradação térmica do óleo de coco.

**Fonte:** a Autora.

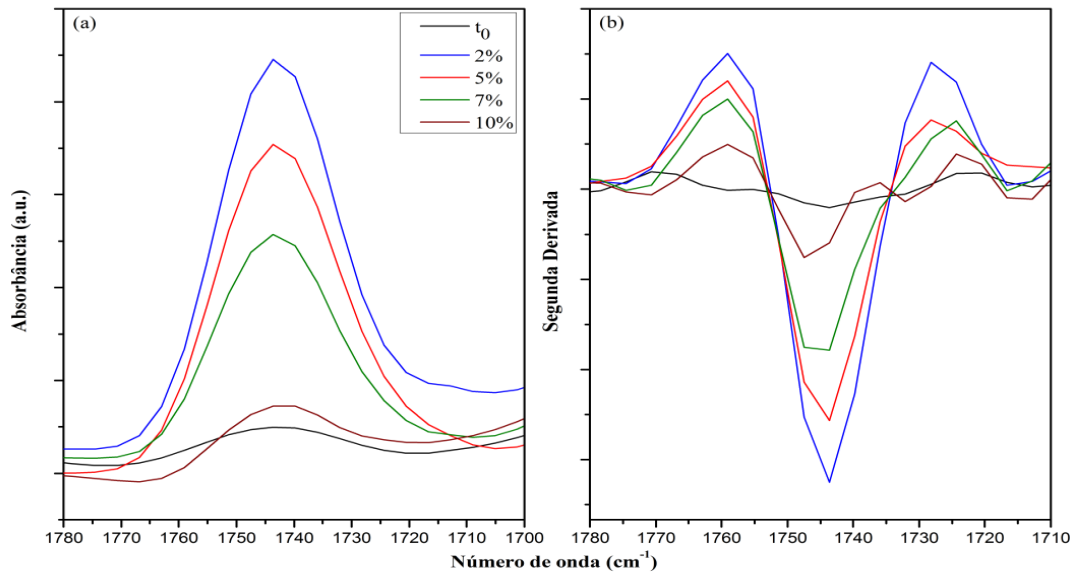
## 6.7 Reações de transesterificação

### 6.7.1 Estudos Preliminares

A fim de determinar a quantidade de catalisador a ser utilizada no experimento foi realizado um estudo inicial. Para isso, as quantidades de óleo e etanol foram mantidas fixas, na proporção estequiométrica da reação (relação óleo: etanol igual a 1:3) e variando a quantidade de catalisador entre 2 a 10% (m/m), na temperatura de 40 °C durante 60 min. A Figura 29 apresenta a segunda derivada dos espectros FTIR nas diferentes condições mencionadas. Foi considerado que o aumento da concentração resulta em um aumento na intensidade da banda negativa referente ao pico próximo a  $1740\text{ cm}^{-1}$ . A partir da observação desses gráficos, é possível notar que houve uma maior intensidade no pico do espectro relativo a 2% (m/m) de catalisador, sendo assim, foi utilizada essa quantidade de catalisador nas próximas etapas do trabalho.

### 6.7.2 Reações de transesterificação

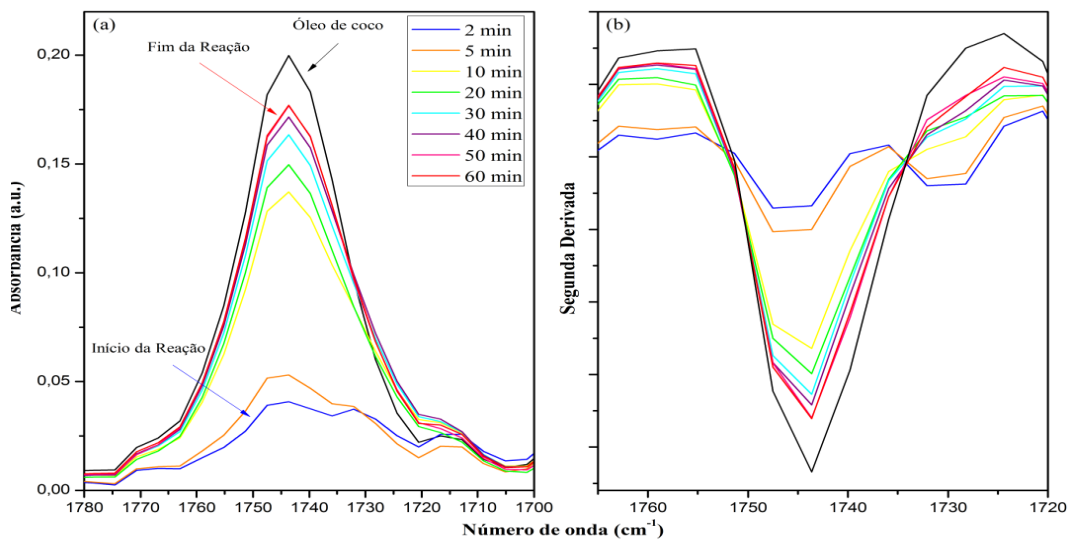
A transesterificação de óleos vegetais utilizando alcoóis possibilita a ocorrência de mudanças nas características da mistura, como por exemplo, a redução da viscosidade. Conforme



**Figura 29** – (a) Espectros de absorção das reações de transesterificação variando a quantidade de catalisador em 2, 5, 7 e 10% (m/m) na temperatura de 40 °C durante 1 h e (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a).

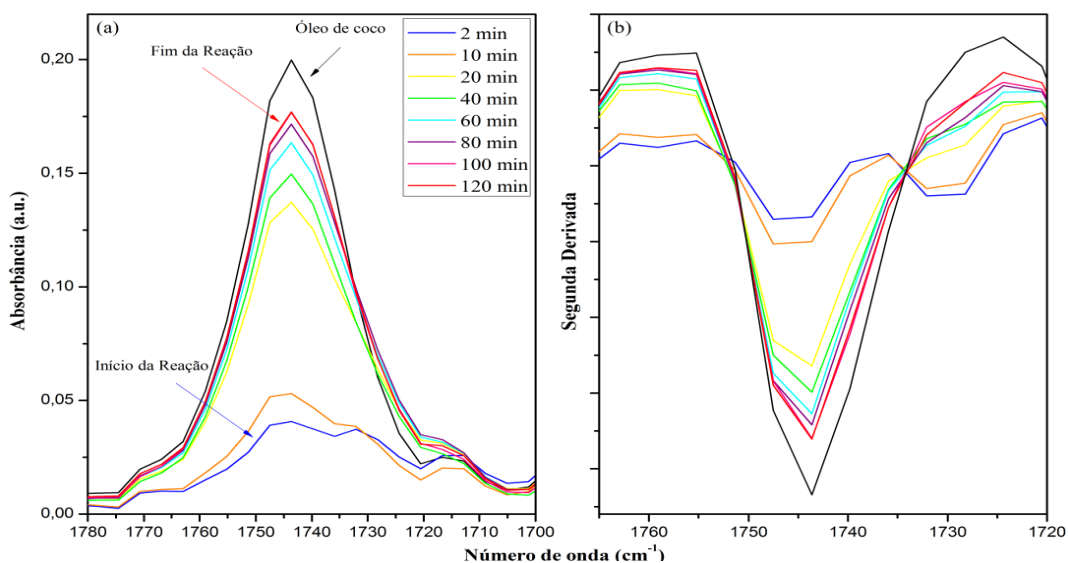
**Fonte:** a Autora.

descrito anteriormente (6.7.1), o pico de absorção utilizado para monitorar as reações foi o próximo a  $1745\text{ cm}^{-1}$ . As Figuras 30 a 35 apresentam os espectros de infravermelho obtidos durante as reações de transesterificação. Como pode ser visto, os espectros foram obtidos usando a segunda derivada com filtro *Savitzky-Golay*.



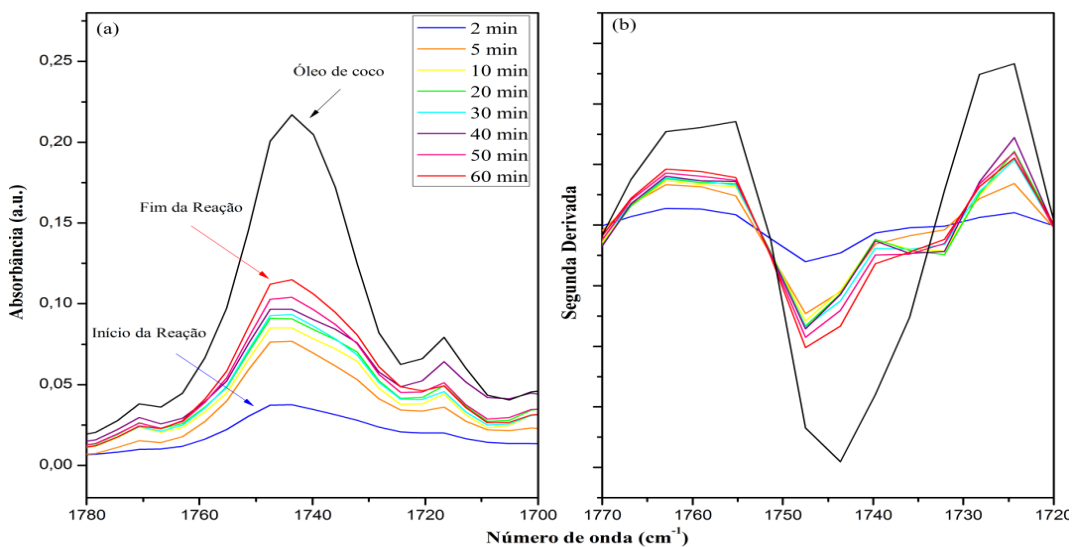
**Figura 30** – (a) Espectros de absorção da reação de transesterificação com proporção molar entre óleo e etanol de 1:5 e tempo de reação de 60 min (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a).

**Fonte:** a Autora.



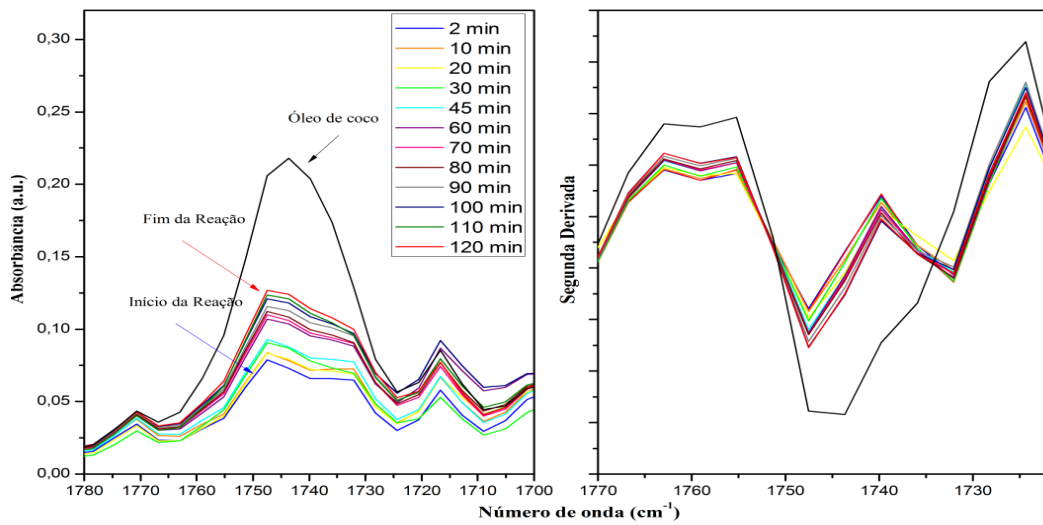
**Figura 31** – (a) Espectros de absorção da reação de transesterificação com proporção molar entre óleo e etanol de 1:5 e tempo de reação de 120 min (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a).

**Fonte:** a Autora.



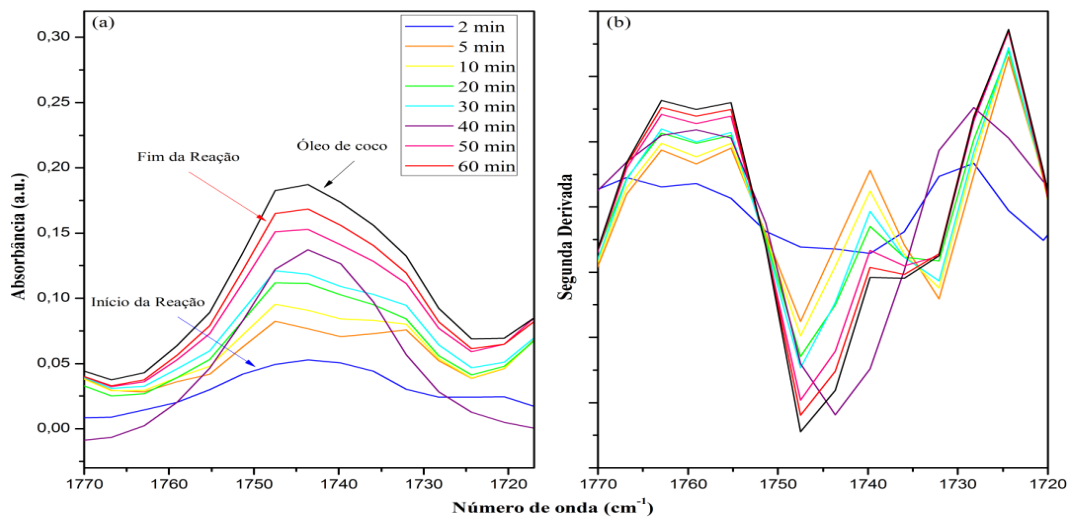
**Figura 32** – (a) Espectros de absorção da reação de transesterificação com proporção molar entre óleo e etanol de 1:10 e tempo de reação de 60 min (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a).

**Fonte:** a Autora.



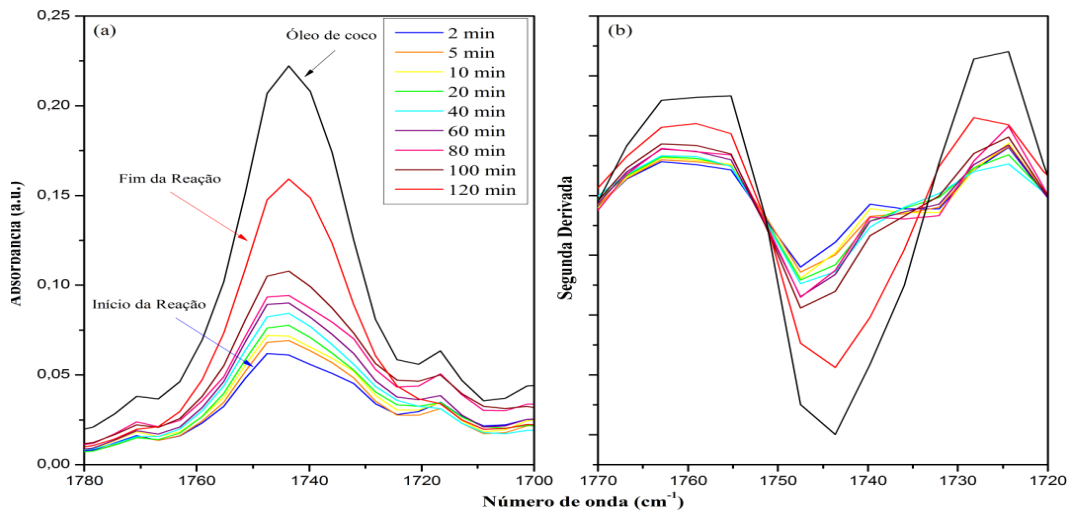
**Figura 33** – (a) Espectros de absorção da reação de transesterificação com proporção molar entre óleo e etanol de 1:10 e tempo de reação de 120 min (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a).

**Fonte:** a Autora.



**Figura 34** – (a) Espectros de absorção da reação de transesterificação com proporção molar entre óleo e etanol de 1:15 e tempo de reação de 60 min (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a).

**Fonte:** a Autora.



**Figura 35** – (a) Espectros de absorção da reação de transesterificação com proporção molar entre óleo e etanol de 1:15 e tempo de reação de 120 min (b) a segunda derivada dos espectros de absorção reportados em (a).

**Fonte:** a Autora.

Os espectros apresentados nas Figuras mostram as bandas de absorção referentes a carbonila em torno de  $1740\text{ cm}^{-1}$ . Como podem ser observados nas Figuras, as concentrações do produto aumentaram à medida que a reação progredia. A reação que apresentou maior conversão foi a presente na Figura 30 com proporção molar entre óleo e etanol de 1:5 e tempo de reação de 60 min.

## 7 Conclusões

Este estudo teve como finalidade melhorar as características de transferência térmica do OCB, levando em conta o desenvolvimento de reações ambientalmente amigáveis pela utilização da catálise enzimática, para a obtenção de fluidos isolantes utilizados em MEP, em particular TDP. Desta forma, para atingir os objetivos desta Tese, primeiramente, foi empregado o método microfluídico para encapsular a LIP em microcápsulas de HPG e foi realizada a caracterização desse material e também do óleo de coco.

Neste trabalho, foi possível demonstrar com sucesso o potencial da tecnologia baseada na microfluídica para produzir microcápsulas de HPG-LIP. A abordagem microfluídica permitiu projetar microcápsulas de HPG com propriedades direcionadas aprimoradas, incluindo alta eficiência de encapsulação da LIP, monodispersidade, baixa porosidade e alta estabilidade.

Uma RNA-MLP foi utilizada para modelar e prever o processo de microencapsulação da LIP. O modelo RNA-MLP mostrou boa concordância com os dados experimentais. Os parâmetros celulares microfluídicos para imobilização da LIP otimizados pela RNA foram os seguintes: concentração de HPG de 10% em peso, carga de LIP de 20% em peso e taxa de fluxo total na célula microfluídica de 1,0 mL/h. Sob essas condições de operação foi possível obter uma EE de 85% e AR de 100%, sendo essas as características mais importantes das microcápsulas sintetizadas. O alto valor do coeficiente de correlação ( $R_{EE}^2 = 0,9983/R_{AR}^2 = 0,99595$ ) entre os valores experimentais de EE/AR e os resultados do modelo provaram que a RNA criou uma previsão razoável.

As microcápsulas de HPG-LIP sintetizadas apresentaram forma esférica, superfície rugosa e possuíam diâmetro médio de 29  $\mu\text{m}$  com distribuição de tamanho monomodal. O  $K_m$  aparente e o  $V_{m\acute{a}x}$  aparente do HPG-LIP foram 1,13814 mM e 0,49 U/mg, respectivamente. A atividade catalítica das microcápsulas de HPG-LIP foi analisada e verificou-se que elas apresentaram melhor estabilidade térmica do que a LIP livre. Os estudos de reutilização mostraram que a LIP imobilizada perdeu pouca atividade quando submetida a usos repetidos e, mesmo após 10 ciclos de hidrólise do *p*NPL, a atividade permaneceu em 81,5%. Este resultado confirmou que as microcápsulas HPG-LIP apresentaram boa durabilidade em uso repetido.

De maneira geral, esta pesquisa mostra que o HPG tem um grande potencial para produzir microcápsulas de HPG-LIP por meio da técnica microfluídica para processos de biotecnologia.

Tendo em vista os resultados obtidos, as microcápsulas de HPG-LIP desenvolvidas foram utilizadas como catalisadores enzimáticos nas reações de síntese para obtenção do biofluido do OCB em reator batelada. O biofluido do OCB é um material ambientalmente seguro para os seres humanos e para o meio ambiente e pode ser usado em aplicações que envolva a refrigeração de TDP. O biofluido se constitui uma alternativa promissora para produção de fluidos com propriedades isolantes elétricas com potenciais aplicações na elétrica de potência. Portanto, espera-se que o desenvolvimento de biofluidos de OCB possibilite a geração de um material inovador, competitivo e que, possivelmente, superem os óleos isolantes de origem petroquímica em termos de suas propriedades físico-químicas e sustentabilidade ambiental.

## 8 Perspectivas futuras

1) Estudo das propriedades físico-químicas do biofluido produzido, tais como, a viscosidade cinemática (ASTM D 445), massa específica a 20°C (ASTM D 4052), ponto de fulgor vaso fechado (ASTM D 93) e teor de ésteres por cromatografia gasosa.

2) Avaliar a qualidade do biofluido isolante de OCB quanto às suas características elétricas, segundo os parâmetros contidos nas normas *American Society for Testing and Materials* (ASTM) da Engenharia Elétrica de Potência.

3) Empregar as condições reacionais investigadas para a produção enzimática de ésteres metílicos em escala piloto.

4) Utilizar as condições reacionais investigadas em laboratório e em escala piloto para a produção enzimática do biofluido em escala industrial.

5) Realizar uma análise econômica da produção de biofluido comparando o processo de esterificação de *Fischer* (catálise química convencional) e o processo enzimático adotado nesse trabalho.

6) Estudar a produção do biofluido em reator contínuo de fluxo pistonado.

## Referências

- 1 NASIRI, M.; TURA, N.; OJANEN, V. Developing disruptive innovations for sustainability: a review on impact of internet of things (IOT). **PICMET 2017 - Portland International Conference on Management of Engineering & Technology, Technology Management for Interconnected World**, p. 1–10, 2017.
- 2 FOFANA, I.; RAO, U. M. Engineering dielectric liquid applications. **Energies**, v. 11, p. 1–4, 2018.
- 3 FOFANA, I. 50 years in the development of insulating liquids. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, v. 29, n. 5, p. 13–25, 2013.
- 4 RAEISIAN, L. et al. Feasibility study of waste vegetable oil as an alternative cooling medium in transformers. **Applied Thermal Engineering**, v. 151, p. 308–317, 2019.
- 5 MARIPRASATH, T.; KIRUBAKARAN, V. A critical review on the characteristics of alternating liquid dielectrics and feasibility study on pongamia pinnata oil as liquid dielectrics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 65, p. 784–799, 2016.
- 6 PEIMANKAR, A. et al. Multi-objective ensemble forecasting with an application to power transformers. **Applied Soft Computing**, v. 68, p. 233–248, 2018.
- 7 MATHARAGE, B. S. H. M. S. Y. et al. Performance of coconut oil as an alternative transformer liquid insulation. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 20, n. 3, p. 887–898, 2013.
- 8 RAFIQ, M. et al. Use of vegetable oils as transformer oils-a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 308–324, 2015.
- 9 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT NBR 5356. **Transformadores de potência**. 1993. 59 p.
- 10 FERNÁNDEZ, I. et al. Comparative evaluation of alternative fluids for power transformers. **Electric Power Systems Research**, v. 98, p. 58–69, 2013.
- 11 KAPLAN, I. R.; RASCO, J.; LU, S. T. Chemical characterization of transformer mineral-insulating oils. **Environmental Forensics**, v. 11, p. 117–145, 2010.
- 12 NUNESJR, J. L.; MONTEIRO, M. J.; LOPES, A. C. **Recuperação ambiental de área afetada por vazamento de óleo em acidente em subestação da transmissão paulista**. In: XVIII Seminário Nacional de Produção e Transmissão de Energia Elétrica - SNPTEE.: Curitiba, Paraná, 2005. 8 p.
- 13 ORTIZ, A. et al. The aging impact on the cooling capacity of a natural ester used in power transformers. **Applied Thermal Engineering**, v. 144, p. 797–803, 2018.
- 14 CARRAZZA, L. R.; ÁVILA, J. C. C.; SILVA, M. L. **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto do Babaçu**. 2. ed. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2012.
- 15 SOLER, M. P.; VITALI, A. A.; MUTO, E. F. Tecnologia de quebra do coco babaçu (*orbignya speciosa*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 717–722, 2007.

- 
- 16 BOUAID, A. et al. Biodiesel production from babassu oil: a statistical approach. **Journal of Chemical Engineering & Process Technology**, v. 6, n. 3, p. 1–4, 2015.
- 17 CARVALHO, L. M. G. et al. Heterogeneous catalysis afford biodiesel of babassu, castor oil and blends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 4, p. 550–557, 2013.
- 18 RÓS, P. C. M. et al. Biodiesel from babassu oil: Characterization of the product obtained by enzymatic route accelerated by microwave irradiation. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 313–320, 2014.
- 19 CHAPMAN, S. J. **Fundamentos de máquinas elétricas**. 5. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2013. 684 p.
- 20 ADLY, A. A. A specifications-oriented initial design methodology for power transformers. **Energy Systems**, v. 8, p. 285–296, 2017.
- 21 MAHANTA, D. K.; LASKAR, S. Electrical insulating liquid: a review. **Journal of Advanced Dielectrics**, v. 7, n. 4, p. 1–9, 2017.
- 22 INTERNATIONAL ELETROTECHNICAL COMMISSION - IEC 60076-1. **Power transformers**. 2011. 17 p.
- 23 AGUIAR, E. R. **Análise de resposta em frequência aplicada em transformadores de potência**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 96 p.
- 24 FITZGERALD, A. E.; JR, C. K.; UMANS, S. D. **Máquinas elétricas: com introdução à eletrônica de potência**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.
- 25 PENA, M. C. M. **Falhas em transformadores de potência: uma contribuição para análise, definições, causas e soluções**. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2003. 134 p.
- 26 SUÑÉ, J.; HEREDIA, L. A. **Guia de manutenção para transformadores de potência**. Brasil: Cigré Brasil, 2013.
- 27 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT NBR 5356-1. **Transformadores de potência**. 2007. 95 p.
- 28 GEORGILAKIS, P. S. Environmental cost of distribution transformer losses. **Applied Energy**, v. 88, p. 3146–3155, 2011.
- 29 OLIVEIRA, J. C.; COGO, J. R.; ABREU, J. P. G. **Transformadores: teoria e ensaios**. 1. ed. São Paulo: Blucher, 1984.
- 30 SOUZA, L. **Análise de fingerprint em óleo mineral isolante**. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2018. 89 p.
- 31 STOCCO, M. F. C. **Avaliação do potencial de aplicação de óleos vegetais como fluidos isolantes em transformadores de distribuição da rede elétrica**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009. 108 p.
- 32 OMIDO, A. R. **Monitoramento da degradação térmica de óleo mineral isolante de transformador utilizando espectroscopia de absorção e fluorescência UV-Vis**. Ilha Solteira-SP: Universidade Estadual Paulista - Unesp, 2014. 165 p.

- 
- 33 ASANO, R.; PAGE, S. A. Reducing environmental impact and improving safety and performance of power transformers with natural ester dielectric insulating fluids. **IEEE Transactions on Industry Applications**, v. 50, n. 1, p. 134–141, 2014.
- 34 MARTINS, M. A. G. Vegetable oils, an alternative to mineral oil for power transformers - experimental study of paper aging in vegetable oil versus mineral oil. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, v. 26, n. 6, p. 7–13, 2010.
- 35 ANDERSON, J. E. et al. Composition and analysis of mineral oils and other organic compounds in metalworking and hydraulic fluids. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 73–109, 2003.
- 36 ULRYCH, M. S. J.; POLANSKÝ, J. P. R. **Dielectric analysis of vegetable and mineral oils**. In: IEEE International Conference on Liquid Dielectrics: Slovenia, 2014. 4 p.
- 37 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM D 2140. **Standard practice for calculating carbon-type composition of insulating oils of petroleum origin. Standard test method for carbon-type composition of insulating oils petroleum origin**. 1991.
- 38 FRIEDENBERG, L. E.; SANTANA, R. M. C. **Propriedades de óleos isolantes de transformadores e a proteção do meio ambiente**. In: IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental: Porto Alegre, 2014. 12 p.
- 39 ABDELMALIK, A. A. Chemically modified palm kernel oil ester: a possible sustainable alternative insulating fluid. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 1–2, p. 42–51, 2014.
- 40 DANIKAS, M. G.; SARATHI, R. Alternative fluids – with a particular emphasis on vegetable oils – as replacements of transformer oil: a concise review. **Engineering, Technology & Applied Science Research**, v. 10, n. 6, p. 6570–6577, 2020.
- 41 AL-AMIN, H.; O'BRIEN, J.; LASHBROOK, M. Synthetic ester transformer fluid: A total solution to windpark transformer technology. **Renewable Energy**, v. 49, p. 33–38, 2013.
- 42 CHRONIS, I.; KALOGEROPOULOU, S.; PSOMOPOULOS, C. S. A review on the requirements for environmentally friendly insulating oils used in high-voltage equipment under the eco design framework. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–9, 2020.
- 43 HOSSAIN, M. K.; KHAN, M. A. G. **An auspicious dielectric in high voltage engineering: vegetable oil**. In: 1 st International Conference on Electrical & Electronic Engineering (ICEE): Rajshani-Bangladesh, 2015. 153–156 p.
- 44 MADAVAN, R. et al. Performance analysis of mixed vegetable oil as an alternative for transformer insulation oil. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2022.
- 45 LEWAND, L. R. Laboratory testing of natural ester dielectric liquids. **Neta World. Winter**, p. 1–4, 2004.
- 46 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM D 92. **Standard test method for flash and fire points by cleveland open cup tester**. 2013.
- 47 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM D 971. **Standard test method for interfacial tension of oil against water by the ring method**. 1999.

- 
- 48 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM D 97. **Standard test method for pour point of petroleum products.** 2017.
- 49 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM D 445. **Standard test method for kinematic viscosity of transparent and opaque liquids (and calculation of dynamic viscosity).** 2018.
- 50 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM D 877. **Standard test method for dielectric breakdown voltage of insulating liquids using disk electrodes.** 2002.
- 51 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM D 924. **Standard test method for dissipation factor (or power factor) and relative permittivity (dielectric constant) of electrical insulating liquids.** 2015.
- 52 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM 3300. **Standard test method for dielectric breakdown voltage of insulating oils of petroleum origin under impulse Conditions.** 2012.
- 53 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM D 88. **Standard test method for saybolt viscosity.** 2013.
- 54 LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, p. 1083–1095, 2010.
- 55 UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Oilseeds: world markets and trade. Foreign Agricultural Service.** 2023.
- 56 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTOS DE ÓLEO DE PALMA - ABRAPALMA. **Retrospecto e projeções da palma de óleo no Brasil.** 2018.
- 57 DIAGNÓSTICO DA PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DA PALMA DE ÓLEO. 1. ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018.
- 58 WANTUIL, S. **Óleo de palma: os impactos provocados no meio ambiente e os desafios de uma produção sustentável.** Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2016. 120 p.
- 59 BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO - BNDES. **Potencial de diversificação da indústria química brasileira.** 1. ed. Rio de Janeiro: Bain & Company, Gás Energy, 2014.
- 60 AGNOL, A. A. D. **A Embrapa Soja no contexto do desenvolvimento da soja no Brasil: histórico e contribuições.** Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Embrapa, 2016.
- 61 COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Séries históricas: Brasil - por produtos - Grãos.** 2023.
- 62 LEMOS, M. L. F. et al. Agregação de valor na cadeia da soja. **Agroindústria BNDES Setorial**, v. 46, p. 167–217, 2017.
- 63 UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Brazil: oilseeds and products annual.** Foreign Agricultural Service, 2020.

- 
- 64 UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **World agricultural production. WAP 3-21: Foreign Agricultural Service.** 2021.
- 65 PORRO, R. A economia invisível do babaçu e sua importância para meios de vida em comunidades agroextrativistas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas. Belém**, v. 14, n. 1, p. 169–188, 2019.
- 66 IBGE, BANCO DE TABELAS ESTATÍSTICAS. **Produção da extração vegetal e da silvicultura.** 2020.
- 67 LIMA, J. R. O. et al. Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 600–603, 2007.
- 68 KUMAR, A. D.; SHILL, D. C.; CHATTERJEE, S. Potential of coconut oil as a dielectric liquid in distribution transformers. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, v. 36, n. 6, p. 36–46, 2020.
- 69 SINAN, S. S. et al. **Assessment on the AC breakdown voltages of liquid insulation system.** In: IEEE International Circuits and Systems Symposium - ICSyS: Langkawi, Malaysia, 2015. 155–158 p.
- 70 NARAYANANKUTTY, A.; ILLAM, S. P.; RAGHAVAMENON, A. C. Health impacts of different edible oils prepared from coconut (*cocos nucifera*): a comprehensive review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 80, p. 1–7, 2018.
- 71 INTERNATIONAL ELETROTECHNICAL COMMISSION - IEC 60296. **Fluids for electro-technical applications – unused mineral insulating oils for transformers and switchgear.** 2003. 22 p.
- 72 RANAWANA, S. et al. **Analysis of insulation characteristics of coconut oil as an alternative to the liquid insulation of power transformers.** In: IEEE Region 10 Colloquium and 3rd International Conference on Industrial and Information Systems - ICIIS: Kharagpur, India, 2008. 5 p.
- 73 ZAIDI, A. A. H.; HUSSIN, N.; JAMIL, M. K. M. **Experimental study on vegetable oils properties for power transformer.** In: IEEE Conference on Energy Conversion - CENCON: Johor Bahru, Malaysia, 2015. 349–353 p.
- 74 HINDUJA, D. et al. **Laboratory investigation of treated coconut oil as transformer liquid insulation.** In: 6th International Conference on Industrial and Information Systems - ICIIS: Kandy, Sri Lanka, 2011. 108–113 p.
- 75 MATHARAGE, B. S. H. M. S. Y. et al. **Aging effect of coconut oil as transformer liquid insulation - Comparison with mineral oil.** In: IEEE 7th International Conference on Industrial and Information Systems - ICIIS: Chennai, India, 2012. 6 p.
- 76 JAMAIL, N. A. M.; ISHAK, M. H.; MUHAMAD, N. A. Insulation characteristic analysis of coconut oil and palm oil as liquid insulating material. **International Journal of Simulation: Systems, Science and Technology**, v. 17, n. 41, p. 49.1–49.6, 2017.
- 77 SAUKI, S. S. M.; MUHAMAD, N. A.; RASID, Z. A. Virgin coconut oil dielectrical properties as electrical insulation material. **Bulletin of Electrical Engineering and Informatics**, v. 8, n. 3, p. 1154–11561, 2019.

- 78 ANSYORI; NAWAWI, Z.; SIDDIK, M. A. Analysis of dielectric strength of virgin coconut oil as an alternative transformer liquid insulation. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1198, p. 1–9, 2019.
- 79 DAS, A. K.; SHILL, D. C.; CHATTERJEE, S. Coconut oil for utility transformers - environmental safety and sustainability perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2022.
- 80 OWUNA, F. J. et al. Chemical modification of vegetable oils for the production of biolubricants using trimethylolpropane: a review. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 29, p. 75–82, 2020.
- 81 SILVA, C. R. et al. Caracterização físico-química e dielétrica de óleos biodegradáveis para transformadores elétricos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 2, p. 229–234, 2012.
- 82 MELO, S. M. et al. **Transformador de distribuição utilizando óleo vegetal extraído da amêndoa do coco de babaçu**. In: XX Seminário Nacional de Distribuição de Energia Elétrica SENDI: Rio de Janeiro, 2012. 11 p.
- 83 HOMAELI, A. A. et al. Enzyme immobilization: An update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, p. 185–205, 2013.
- 84 KIRK, O.; BORCHERT, T.; FUGLSANG, C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345–351, 2002.
- 85 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1220 p.
- 86 BEILEN, J. B. V.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 338–344, 2002.
- 87 ZHANG, Y.; GE, J.; LIU, Z. Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes. **ACS Catalysis**, v. 5, p. 4503–4513, 2015.
- 88 NISHA, S.; KARTHICK, S. A.; GOBI, N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. **Chemical Science Review and Letters**, v. 1, n. 3, p. 148–155, 2012.
- 89 CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: Criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6262–6276, 2013.
- 90 ZDARTA, J. et al. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, p. 92, 2018.
- 91 JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production - a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228–240, 2013.
- 92 MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451–1463, 2007.
- 93 HANEFELD, U.; GARDOSSEI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453–468, 2009.

- 94 SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6223–6235, 2013.
- 95 JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, p. 801–821, 2014.
- 96 RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, p. 2216–2238, 2011.
- 97 GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; WOJCIESZYNSKA, D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties- application to oxidoreductases. **Molecules**, v. 19, p. 8995–9018, 2014.
- 98 ZHANG, B. et al. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 61–70, 2012.
- 99 STERGIOU, P. Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1846–1859, 2013.
- 100 HAO, M. et al. Hyperbranched polyglycerols as robust up-conversion nanoparticle coating layer for feasible cell imaging. **Polymers**, v. 12, n. 2592, p. 1–10, 2020.
- 101 JAFARI, M. et al. Hyperbranched polyglycerol nanostructures for anti-biofouling, multifunctional drug delivery, bioimaging and theranostic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 576, p. 1–16, 2020.
- 102 ABBINA, S. et al. Hyperbranched polyglycerols: recent advances in synthesis, biocompatibility and biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, p. 9249–9277, 2017.
- 103 WILMS, D.; STIRIBA, S.; FREY, H. Hyperbranched polyglycerols: from the controlled synthesis of biocompatible polyether polyols to multipurpose applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, n. 1, p. 129–141, 2010.
- 104 LI, M. et al. Mussel-inspired multifunctional coating for bacterial infection prevention and osteogenic induction. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 68, p. 160–171, 2021.
- 105 ROKICKI, G. et al. Hyperbranched aliphatic polyethers obtained from environmentally benign monomer: glycerol carbonate. **Green Chemistry**, v. 7, p. 529–539, 2005.
- 106 PARZUCHOWSKI, P. G. et al. Synthesis of new glycerol-based hyperbranched polycarbonates. **Macromolecules**, v. 41, n. 11, p. 3859–3865, 2008.
- 107 LEITE, D. B. C.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R. Application of glycerol in the synthesis of hyperbranched and highly branched polyethers: characterization, morphology and mechanism proposal. **Materials Research**, v. 22, p. 1–10, 2019.
- 108 SUNDER, A. et al. Controlled synthesis of hyperbranched polyglycerols by ring-opening multibranching polymerization. **Macromolecules**, v. 32, n. 13, p. 4240–4246, 1999.
- 109 MOHAMMADIFAR, E. et al. Green synthesis of hyperbranched polyglycerol at room temperature. **ACS Macro Letters**, v. 6, p. 35–40, 2017.

- 
- 110 MOORE, E.; THISSEN, H.; VOELCKER, N. H. Hyperbranched polyglycerols at the biointerface. **Progress in Surface Science**, v. 88, p. 213–36, 2013.
- 111 SON, S.; SHIN, E.; KIM, B. S. Light-responsive micelles of spiropyran initiated hyperbranched polyglycerol for smart drug delivery. **Biomacromolecules**, v. 15, p. 628–634, 2014.
- 112 DWEVEDI, A. **Enzyme immobilization: advances in industry, agriculture, medicine, and the environment**. New Delhi-India: Springer, 2016. 132 p.
- 113 COSTAS, L. et al. Effects of organic solvents on immobilized lipase in pectin microspheres. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 578–586, 2008.
- 114 SU, F. et al. Enhanced performance of lipase via microcapsulation and its application in biodiesel preparation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–12, 2016.
- 115 RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 369–381, 2013.
- 116 ANDREA, T. et al. Microencapsulation of lipase and savinase enzymes by spray drying using arabic gum as wall material. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 6, p. 161–173, 2016.
- 117 ZHAO, Y. et al. Enhanced encapsulation of actives in self-sealing microcapsules by precipitation in capsule shells. **Langmuir**, v. 27, p. 13988–13991, 2011.
- 118 HENNEQUIN, Y. et al. Synthesizing microcapsules with controlled geometrical and mechanical properties with microfluidic double emulsion technology. **Langmuir**, v. 25, n. 14, p. 7857–7861, 2009.
- 119 XU, J. H. et al. A novel microfluidic approach for monodispersed chitosan microspheres with controllable structures. **Advanced Healthcare Materials**, v. 1, p. 106–111, 2012.
- 120 SHAH, R. K. et al. Designer emulsions using microfluidics. **Materials Today**, v. 11, n. 4, p. 18–27, 2008.
- 121 BOUYER, E. et al. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, p. 359–378, 2012.
- 122 VARSHNEY, R. et al. One-step fabrication of enzyme-immobilized reusable polymerized microcapsules from microfluidic droplets. **ACS Omega**, v. 4, p. 13790–13794, 2019.
- 123 PAN, D. et al. Droplets containing large solid particle inside formation and breakup dynamics in a flow-focusing microfluidic device. **Experimental Thermal and Fluid Science**, v. 115, p. 1–11, 2020.
- 124 MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 714, p. 8–19, 2012.
- 125 HOU, L. et al. A simple microfluidic method for one-step encapsulation of reagents with varying concentrations in double emulsion drops for nanoliter-scale reactions and analyses. **Analytical Methods**, v. 9, p. 2511–2516, 2017.

- 
- 126 DATTA, S. S. et al. 25th anniversary article: double emulsion templated solid microcapsules: mechanics and controlled release. **Advanced Materials**, v. 26, p. 2205–2218, 2014.
- 127 STEEGMANS, M. L. J.; SCHROËN, K. G. P. H.; BOOM, R. M. Characterization of emulsification at flat microchannel y junctions. **Langmuir**, v. 25, p. 3396–33401, 2009.
- 128 WANG, L. et al. Biocatalytic pickering emulsions stabilized by lipase-immobilized carbon nanotubes for biodiesel production. **Catalysts**, v. 8, p. 1–12, 2018.
- 129 SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.
- 130 PANDEY, A. et al. Review-the realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119–131, 1999.
- 131 KOKKINO, M.; THEODOROU, L. G.; PAPAMICHAEL, E. M. Aspects on the catalysis of lipase from porcine pancreas (type VI-s) in aqueous media: Development of ion-pairs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 2, p. 231–236, 2012.
- 132 GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 6, p. 621–634, 1997.
- 133 VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 515–536, 2007.
- 134 RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from rhizomucor miehei as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1–2, p. 15–32, 2010.
- 135 TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628–634, 2010.
- 136 KULA, C.; SAYAR, N. A. Lipase catalyzed esterification reactions – a kinetic model. **New Biotechnology**, v. 31, p. S91, 2014.
- 137 CHAIBAKHSH, N. et al. Effect of alcohol chain length on the optimum conditions for lipase-catalyzed synthesis of adipate esters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 27, n. 5-6, p. 303–308, 2009.
- 138 FACIOLI, N. L.; BARRERA-ARELLANO, D. Optimisation of enzymatic esterification of soybean oil deodoriser distillate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 12, p. 1193–1198, 2001.
- 139 WANG, L. et al. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 29–32, 2006.
- 140 LIU, Y. et al. Biodiesel synthesis catalyzed by burkholderia cenocepacia lipase supported on macroporous resin NKA in solvent-free and isooctane systems. **Energy & Fuels**, v. 25, n. 3, p. 1206–1212, 2011.
- 141 ZHANG, X.; YU J. ZENG, A. Optimization and modeling for the synthesis of sterol esters from deodorizer distillate by lipase-catalyzed esterification. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 270–278, 2016.

- 142 ALNOCH, R. C. et al. Recent trends in biomaterials for immobilization of lipases for application in non-conventional media. **Catalysts**, v. 10, n. 697, p. 1–29, 2020.
- 143 GANDHI, N. N. et al. Lipase-catalyzed esterification. **Catalysis Reviews - Science and Engineering**, v. 42, n. 4, p. 439–480, 2000.
- 144 PINTO, M. F. et al. Enzyme kinetics: the whole picture reveals hidden meanings. **FEBS Journal**, v. 282, p. 2309–2316, 2015.
- 145 BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. vol. 1. São Paulo: Blucher, 2001.
- 146 FOGLER, H. S. **Elements of chemical reaction engineering**. 3. ed. New Delhi: Prentice-H., 2004.
- 147 JOHNSON, K. A. A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. **FEBS Letters**, v. 587, p. 2753–2766, 2013.
- 148 JOHNSON, K. A.; GOODY, R. S. The original michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. **Biochemistry**, v. 50, p. 8264–8269, 2011.
- 149 PALMER, T.; BONNER, P. L. **Enzymes: biochemistry, biotechnology and clinical chemistry**. 2. ed. New Delhi: Woodhead, 2007.
- 150 VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- 151 GODDARD, R.; BOSLEY, J.; AL-DURI, B. Lipase-catalysed esterification of oleic acid and ethanol in a continuous packed bed reactor, using supercritical CO<sub>2</sub> as solvent: Approximation of system kinetics. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 75, p. 715–721, 2000.
- 152 SÁNCHEZ, A. et al. Continuous enantioselective esterification of trans-2-phenyl-1-cyclohexanol using a new *Candida rugosa* lipase in a packed bed bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 1–12, 2000.
- 153 SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**. vol. 2. São Paulo: Blucher, 2001.
- 154 DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. 2. ed.: Academic P., 2013.
- 155 KAMBLE, M. P.; YADAV, G. D. Kinetic resolution of (R,S)- $\alpha$ -tetralol by immobilized *candida antarctica* lipase B: comparison of packed-bed over stirred-tank batch bioreactor. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, p. 1750–1757, 2017.
- 156 VADGAMA, R. N.; ODANETH, A. A.; LALI, A. M. Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium part II: Packed bed reactor (PBR) studies. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 105–109, 2015.
- 157 MANOEL, E. A. et al. Kinetic resolution of a precursor for myo-inositol phosphates under continuous flow conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, p. 139–143, 2013.
- 158 OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5146–5154, 2009.

- 159 ZHANG, Z.; FRIEDRICH, K. Artificial neural networks applied to polymer composites: a review. **Composites Science and Technology**, v. 63, p. 2029–2044, 2003.
- 160 KUMAR, R.; AGGARWAL, R. K.; SHARMA, J. D. Energy analysis of a building using artificial neural network: a review. **Energy and Buildings**, v. 65, p. 352–358, 2013.
- 161 BASHEER, I. A.; HAJMEER, M. Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. **Journal of Microbiological Methods**, v. 43, p. 3–31, 2000.
- 162 FURTADO, M. I. V. **Redes neurais artificiais: uma abordagem para sala de aula**. Ponta Grossa-PR: Atena Editora, 2019. 99 p.
- 163 KARABACAK, K.; CETIN, N. Artificial neural networks for controlling wind-pv power systems: a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 804–827, 2014.
- 164 RAUBER, T. W. **Redes neurais artificiais**. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2008. 28 p.
- 165 SANTOS, A. M. et al. Using artificial neural networks and logistic regression in the prediction of hepatitis a. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 8, n. 2, p. 117–126, 2005.
- 166 OUDSHOORN, M. H. M. et al. Synthesis and characterization of hyperbranched polyglycerol hydrogels. **Biomaterials**, v. 27, p. 5471–5479, 2006.
- 167 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- 168 SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. Nih image to imagej: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.
- 169 AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM E 1641-18. **Standard test method for decomposition kinetics by thermogravimetry using the Ozawa/Flynn/Wall method**. West Conshohocken, PA, 2018.
- 170 BEHERA, D.; BANTHIA, A. K. Synthesis, characterization, and kinetics study of thermal decomposition of epoxidized soybean oil acrylate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, p. 2583–2590, 2008.
- 171 KISSINGER, H. E. Variation of peak temperature with heating rate in differential thermal analysis. **Journal of Applied Polymer Science (1934)**, v. 57, n. 4, p. 217–221, 1956.
- 172 BADÍA, J. D. et al. Thermal analysis applied to the characterization of degradation in soil of polylactide: II. On the thermal stability and thermal decomposition kinetics. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 2192–2199, 2010.
- 173 YANG, K. K. et al. Kinetics of thermal degradation and thermal oxidative degradation of poly(p-dioxanone). **European Polymer Journal**, v. 39, p. 1567–1574, 2003.
- 174 WIACEK, M. et al. Polystyrene with trifluoromethyl units: monomer reactivity ratios, thermal behavior, flammability, and thermal degradation kinetics. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 47, p. 1–13, 2015.

- 175 KIM, H. T.; OH, S. C. Kinetics of thermal degradation of waste polypropylene and high-density polyethylene. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 648–656, 2005.
- 176 OZAWA, T. A new method of analyzing thermogravimetric data. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 38, n. 11, p. 1881–1886, 1965.
- 177 GULLI, A.; KAPOOR, A.; PAL, S. **Deep learning with TensorFlow 2 and Keras**. Birmingham-UK: Packt Publishing, 2019.
- 178 MARGESIN, R. et al. A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 27–33, 2002.
- 179 NATALELLO, A.; SASSO, F.; SECUNDO, F. Enzymatic transesterification monitored by an easy-to-use fourier transform infrared spectroscopy method. **Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 133–138, 2013.
- 180 ASTM INTERNATIONAL - E2412-04. **Standard practice for condition monitoring of used lubricants by trend analysis using Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrometry**. 2005. 22 p.
- 181 SILVERSTEIN, G. C.; BASSLER, R. M.; MORRILL, T. C. Spectrometric identification of organic compounds. **New York**, v. 5, 1991.
- 182 OWEN, A. J. Uses of derivative spectroscopy. **Agilent Technologies**, 1995.
- 183 HUSSAIN, M. et al. Regulation of drug release by tuning surface textures of biodegradable polymer microparticles. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, p. 14391–14400, 2017.
- 184 SUN, H. et al. Monodisperse alginate microcapsules with spatially confined bioactive molecules via microfluid-generated w/w/o emulsions. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, p. 37313–37321, 2019.
- 185 ZHAO, Y. H. et al. Porous membranes modified by hyperbranched polymers. I. Preparation and characterization of PVDF membrane using hyperbranched polyglycerol as additive. **Journal of Membrane Science**, v. 290, p. 222–229, 2007.
- 186 WANG, S. et al. Growing hyperbranched polyglycerols on magnetic nanoparticles to resist nonspecific adsorption of proteins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 67, p. 122–126, 2008.
- 187 SALEHPOUR, S.; ZULIANI, C. J.; DUBÉ, M. A. Synthesis of novel stimuli-responsive polyglycerol-based hydrogels. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, p. 92–99, 2012.
- 188 LIU, C. et al. Preparation of star polymers of hyperbranched polyglycerol core with multi-arms of PS-b-PtBA and PS-b-PAA. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, p. 777–784, 2008.
- 189 PHILIP, S.; KURIAKOSE, S. Aggregation enhanced excimer emission supported, monomeric fluorescence quenching of dendritic hyperbranched polyglycerol coupled 1-pyrene butyric acid lumophore as a sensing probe for Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. **Journal of Fluorescence**, v. 29, p. 387–398, 2019.

- 190 BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1767, p. 1073–1101, 2007.
- 191 LAU, R. M. et al. Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: effects on structure and activity. **Green Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 483–487, 2004.
- 192 DADKHAH, M. et al. Synthesis of hyperbranched polyglycerols using ascorbic acid as an activator. **RSC Advances**, v. 8, p. 217–221, 2018.
- 193 HE, X. et al. Lipase-immobilized cellulosic capsules with water absorbency for enhanced pickering interfacial biocatalysis. **Langmuir**, v. 37, n. 2, p. 810–819, 2021.
- 194 KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)**, v. 39, n. 8, p. 549–559, 2007.
- 195 XIE, W.; MA, N. Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. **Biomass & Bioenergy**, v. 34, p. 890–896, 2010.
- 196 SOARES, C. M. F. et al. Studies on immobilized lipase in hydrophobic sol-gel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113–116, p. 307–319, 2004.
- 197 YUCE-DURSUN, B. et al. Preparation and characterization of sol-gel hybrid coating films for covalent immobilization of lipase enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 18–25, 2016.
- 198 COLLINS, S. E.; LASSALLE, V.; FERREIRA, M. L. FTIR-ATR characterization of free rhizomucor meihei lipase (RML), lipozyme RM im and chitosan-immobilized RML. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 220–228, 2011.
- 199 BASTÜRK, E. et al. Covalent immobilization of  $\alpha$ -amylase onto thermally crosslinked electrospun PVA/PAA nanofibrous hybrid membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, p. 349–355, 2013.
- 200 KIM, T. G.; PARK, T. G. Surface functionalized electrospun biodegradable nanofibers for immobilization of bioactive molecules. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 1108–1113, 2006.
- 201 ZDARTA, J. et al. Immobilization of amano lipase a onto stöber silica surface: process characterization and kinetic studies. **Open Chemistry**, v. 13, p. 138–148, 2015.
- 202 CONCEIÇÃO, M. M. et al. Thermoanalytical characterization of castor oil biodiesel. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 964–975, 2007.
- 203 BUSSAMARA, R. et al. Optimal conditions for continuous immobilization of pseudozyma hubeiensis (strain hb85a) lipase by adsorption in a packed-bed reactor by response surface methodology. **Enzyme Research**, v. 2012, p. 1–12, 2012.
- 204 KÜCHLER, A. et al. Enzymatic reactions in confined environments. **Nature Nanotechnology**, v. 11, n. 5, p. 409–420, 2016.
- 205 TING, W. J. et al. Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 32–38, 2006.
- 206 NIE, K. et al. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 142–147, 2006.

- 
- 207 KABBASHI, N. A. et al. Hydrolysis of jatropha curcas oil for biodiesel synthesis using immobilized *Candida cylindracea* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 95–100, 2015.
- 208 YONG, Y. et al. Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1179–1185, 2008.
- 209 CHUA, L. S. et al. Hydrolysis of virgin coconut oil using immobilized lipase in a batch reactor. **Enzyme Research**, p. 1–5, 2012.
- 210 NGUYEN, T. A. V. et al. Hydrolysis activity of virgin coconut oil using lipase from different sources. **Scientifica (Cairo)**, p. 1–7, 2018.
- 211 ZENG, H. Y. et al. Characterization of the lipase immobilized on Mg-Al hydrotalcite for biodiesel. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 791–798, 2009.
- 212 ROHMAN, A. et al. Application of FTIR spectroscopy for the determination of virgin coconut oil in binary mixtures with olive oil and palm oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, p. 601–606, 2010.
- 213 GUILLÉN, M. D.; CABO, N. Characterization of edible oils and lard by fourier transform infrared spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 10, p. 1281–1286, 1997.
- 214 VLACHOS, N. et al. Applications of fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. **Analytica Chimica Acta**, v. 573–574, p. 459–465, 2006.
- 215 GUILLÉN, M. D.; CABO, N. Usefulness of the frequency data of the fourier transform infrared spectra to evaluate the degree of oxidation of edible oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 709–719, 1999.
- 216 JAYADAS, N. H.; NAIR, K. P. Coconut oil as base oil for industrial lubricants-evaluation and modification of thermal, oxidative and low temperature properties. **Tribology International**, v. 39, p. 873–878, 2006.
- 217 TUDORACHI, N.; MUSTATA, F. Thermal degradation and evolved gas analysis of some vegetable oils using TG/FT-IR/MS technique. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 119, p. 1703–1711, 2015.
- 218 WAKO, F. M.; RESHAD, A.; GOUD, V. V. Thermal degradation kinetics study and thermal cracking of waste cooking oil for biofuel production. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, p. 2157–2165, 2018.