

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

RODNEY HELDER MIOTTI JUNIOR

Produção de biodiesel a partir do óleo de palmiste: aplicação de combi-lipases
como biocatalisadores em reatores descontínuo e contínuo

Lorena
2018

RODNEY HELDER MIOTTI JUNIOR

Produção de biodiesel a partir do óleo de palmiste: aplicação de combi-lipases
como biocatalisadores em reatores descontínuo e contínuo

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências do Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química na
área de desenvolvimento de produtos e
processos

Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de
Castro

Versão Original

Lorena
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Miotti Junior, Rodney H.

Produção de biodiesel a partir do óleo de palmiste:
aplicação de combi-lipases como biocatalisadores em
reatores descontínuo e contínuo / Rodney H. Miotti
Junior; orientadora Heizir Ferreira de Castro -
Versão Original. - Lorena, 2018.
97 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química na Área de
Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.
2018

1. Biodiesel. 2. Óleo de palmiste. 3.
Transesterificação enzimática. 4. Combi-lipases. 5.
Produção em regime contínuo. I. Título. II. de Castro,
Heizir Ferreira, orient.

*Este trabalho é dedicado aos meus
pais e ao meu irmão que sempre
estiveram ao meu lado me apoiando.*

Agradecimentos

A Deus, por iluminar e defender meu caminho nos momentos de fracasso e alegria. Obrigado Senhor, por ter me concedido fé, força, alegria e capacidade em todos os momentos difíceis.

Aos meus pais, Inês e Rodney, que sempre me ajudaram e me estimularam na busca dos meus objetivos. Obrigado por todo o amor, apoio, incentivo, preocupação, valores e princípios. Agradeço ao meu irmão Lucas por sempre estar disposto a me ajudar com palavras de motivação.

À Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro, pela excelente orientação e pela oportunidade concedida de desenvolver este trabalho. Agradeço pela dedicação, conselhos, sugestões e principalmente os puxões de orelha.

À UNIFAL-MG, em especial o Dr. Adriano Aguiar Mendes e a Dra. Daniela Battaglia Hirata, vocês são espelhos que refletem o perfil de pesquisador que busco me tornar.

Aos meus amigos que estiveram presentes nestes dois anos de trabalho no Laboratório de Biocatálise: Dani, Carol, Cíntia, Matheus, Heitor, Annie, Renata, Ana K, Saviene e Cristiano, obrigado pelas risadas e experiências compartilhadas com todos vocês.

À minha família de Lorena (República Covil): Braz, Caio, Orerves, Juan e Rafael, vocês deixaram e deixarão boas lembranças vividas no Vale do Paraíba, muito obrigado por fazerem parte da minha vida.

À Bruna, muito obrigado pelos momentos de alegria, carinho e pela paciência em aguentar minhas ansiedades e “neuras” ao longo do mestrado.

Ao Rafael Campos, obrigado pela ajuda com as ilustrações deste trabalho.

Ao Dr. Luís Córdoba (Colômbia) e minha prima Renata Arantes, obrigado pelas dicas e pelos momentos que passamos discutindo sobre ciência nos bares em Porto.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) agradeço pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

A todos os professores e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena, que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

RESUMO

MIOTTI JUNIOR, R.H., **Produção de biodiesel a partir do óleo de palmiste: aplicação de combi-lipases como biocatalisadores em reatores descontínuo e contínuo.** 2018. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

O presente trabalho teve como objetivo o aprimoramento da transesterificação do óleo de palmiste por rota etílica, por meio da atuação simultânea de lipases de diferentes fontes microbianas, visando a produção de biodiesel com teores residuais de monoacilglicerol (MAG) e diacilglicerol (DAG) dentro dos limites exigidos pela legislação ANP nº 45/2014 para biocombustíveis. Para tal propósito, as lipases foram imobilizadas em suporte híbrido sílica-hidroxiethylcelulose (SiO₂-HEC) e os ensaios foram iniciados em regime descontínuo em reator de tanque agitado, temperatura fixa de 45 °C e razão molar óleo:álcool de 1:8. As lipases de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* e *Thermomyces lanuginosus*, foram utilizadas de maneira isolada e em associação, com base no conhecimento prévio do bom desempenho destas enzimas para a produção de biodiesel. Conforme a capacidade de atuar em diferentes posições da molécula de triacilglicerol, as associações formaram combi-lipases de mesma especificidade (*B. cepacia* e *P. fluorescens*) e de diferente especificidade (*B. cepacia* e *T. lanuginosus*), com proporções de cada lipase variando de 75, 50 e 25% em relação ao seu par enzimático. Os melhores resultados foram observados quando utilizadas ambas as combinações em proporções equivalentes. Nestas condições, foram obtidas conversões similares (≈98%) e ausência de DAG, com redução da viscosidade cinemática do óleo de palmiste de 30,35 para aproximadamente 4,00 mm²/s. Embora as conversões tenham sido próximas, a combi-lipase de diferente especificidade apresentou menor teor de MAG (1,68%, m/m), sendo escolhida como biocatalisador para o estudo em reatores de leito fixo em regime contínuo. Nesta etapa, foram realizados ensaios para testar os efeitos da razão molar óleo:álcool (1:12, 1:10 e 1:8) e do tempo espacial (16 e 14 h) na conversão, qualidade e produtividade do biodiesel. O melhor desempenho foi apresentado pela razão molar de 1:8 com tempo espacial de 16 h, proporcionando teor em MAG residual de 0,62% (m/m), conversão de 98% e produtividade de 30,9 mmol_{ésteres}·g_{catalisador}⁻¹·h⁻¹. Com relação à qualidade do biodiesel formado em termos de viscosidade cinemática (4,22 mm²/s), massa específica (870 kg/m³) e teor residual de MAG (0,62%, m/m), foi verificada adequação aos parâmetros exigidos pela ANP (3-6 mm²/s, 850-900 kg/m³ e ≤ 0,7%, m/m, respectivamente).

Palavras-chave: Biodiesel. Óleo de palmiste. Transesterificação enzimática. Combi-lipases. Produção em regime descontínuo. Produção em regime contínuo.

ABSTRACT

MIOTTI JUNIOR, RH, **Production of biodiesel from palm kernel oil: application of combi-lipases as biocatalysts in batch and continuous reactors.** 2018. 97 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

The objective of the present work was to improve the transesterification of palm kernel oil by ethanolic route through simultaneous action of lipases from different microbial sources, aiming to produce biodiesel with residual levels of monoacylglycerol (MAG) and diacylglycerol (DAG) within the limits required by ANP regulation 45/2014 for biofuels. For this purpose, lipases were immobilized on silica-hydroxyethylcellulose hybrid support (SiO₂-HEC) and the assays were first carried out in a stirred tank batch reactor, at fixed temperature of 45 °C and oil-to-alcohol molar ratio of 1:8. The lipases from *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Thermomyces lanuginosus* isolated and in association were used, based on the previous knowledge of the good performance of these enzymes for the biodiesel production. According to the ability to act at different positions of the triacylglycerol molecule, the associations formed combi-lipases of the same specificity (*B. cepacia* and *P. fluorescens*) and different specificities (*B. cepacia* and *T. lanuginosus*) at proportion of each lipase ranging from 75, 50 and 25% relative to their enzymatic pair. The best results were attained when both combinations were used at equivalent proportions. Under these conditions, similar conversions (≈98%) and absence of DAG were obtained, which was consistent with the kinematic viscosity reduction of the palm kernel oil from 30.35 to 4.00 mm²/s, approximately. Although similar conversions were attained, the combi-lipase of different specificities provided lower MAG contents (1.68 wt%), being chosen as a biocatalyst for performing continuous runs in packed-bed reactor. In this step, the effects of the molar ratios oil-to-alcohol (1:12, 1:10 and 1:8) and space-times (16 and 14 h) on biodiesel production, quality and productivity were evaluated. The best performance was achieved by using molar ratio of 1:8 and space-time of 16 h, yielding residual MAG contents of 0.62 wt%, conversion of 98% and productivity of 30.9 mmol_{ester}·g_{catalyst}⁻¹·h⁻¹. The quality of biodiesel produced in terms of kinematic viscosity (4.22 mm²/s), specific mass (870 kg/m³) and residual MAG content (0.62 wt%) was found in accordance of ANP resolution (3-6 mm²/s, 850-900 kg/m³ and ≤ 0.7 wt%, respectively).

Keywords: Biodiesel. Palm kernel oil. Enzymatic transesterification. Combi-lipases. Discontinuous production. Continuous production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Esquema geral da reação de transesterificação	24
Figura 3.2 - Representação da estrutura cristalina da lipase de <i>P. fluorescens</i> ...	27
Figura 3.3 - Representação das técnicas de imobilização	31
Figura 3.4 - Exemplos das principais configurações de biorreatores na produção de biodiesel por catálise enzimática.....	37
Figura 4.1 - Sistema reacional do processo descontínuo.....	42
Figura 4.2 - Sistema reacional do processo contínuo de duplo estágio	43
Figura 4.3 - Sistema de metilação do óleo de palmiste	47
Figura 5.1 - Esquema das etapas experimentais realizadas	54
Figura 5.2 - Cromatograma: Ésteres metílicos obtidos do óleo de palmiste	55
Figura 5.3 - Desempenho de lipases imobilizadas em SiO ₂ -HEC na transesterificação do óleo de palmiste com etanol (48 h de reação; razão molar 1: 8; 45°C).....	57
Figura 5.4 - Perfil dos ésteres de etila nas amostras de biodiesel obtidas nas reações catalisadas por lipases diferentes fontes imobilizadas (48 h de reação; razão molar 1: 8; 45°C)	58
Figura 5.5 - Perfil do progresso de formação dos ésteres de etila a partir da transesterificação do óleo de palmiste em função do tempo catalisada pelas lipases PS(a), AK (b) e TL (c) imobilizadas em SiO ₂ -HEC.....	59
Figura 5.6 - Perfil da composição equivalente do biodiesel purificado obtido nas reações catalisadas pelas lipases selecionadas	61
Figura 5.7 - Correlação da conversão obtida nas reações catalisadas lipases de <i>B. cepacia</i> , <i>P. fluorescens</i> e <i>T. lanuginosus</i> imobilizadas em SiO ₂ -HEC e viscosidade das amostras purificadas.....	62
Figura 5.8 - Perfil do progresso de formação dos ésteres de etila a partir da transesterificação do óleo de palmiste com etanol em função do tempo, catalisada pelo par Lipase PS / Lipase AK imobilizadas em SiO ₂ -HEC em diferentes proporções	65
Figura 5.9 - Perfil dos componentes dos produtos obtidos nas reações catalisadas pelas lipases especificidades análogas em diferentes proporções	66

Figura 5.10 – Comparação das conversões obtidas nas reações catalisadas pelo par enzimático de mesma especificidade e viscosidade das amostras purificadas	67
Figura 5.11 - Perfil do progresso de formação dos ésteres de etila a partir da transesterificação do óleo de palmiste com etanol em função do tempo, catalisada pela combinação Lipase PS/ Lipase TL imobilizadas em SiO ₂ -HEC em diferentes proporções	70
Figura 5.12 - Composição percentual das amostras de biodiesel obtidas nas reações mediadas pela associação de lipases de diferentes especificidades	71
Figura 5.13 - Comparação das conversões obtidas nas reações catalisadas pelo par enzimático de diferentes especificidades e viscosidade das amostras purificadas.....	72
Figura 5.14 - Sistema reacional de duplo estágio utilizado nas reações de transesterificação do óleo de palmiste em regime contínuo	74
Figura 5.16 - Influência do tempo espacial no teor de MAG residual na reação de transesterificação do óleo de palmiste conduzida em diferentes razões molares. 78	
Figura 5.18 - Correlação das conversões e produtividades em função das razões molares em diferentes tempos espaciais na transesterificação do óleo de palmiste com etanol em reator duplo estágio operando em fluxo contínuo.....	81
Figura 5.19 – Infravermelho dos biocatalisadores original e recuperados da transesterificação do óleo de palmiste com etanol em processos conduzidos em sistema descontínuo e contínuo.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Principais produtores de biodiesel no ano de 2017	19
Tabela 3.2 - Especificações do biodiesel estabelecidas pela Resolução 45/2014 (ANP)	21
Tabela 3.3 - Características das principais culturas oleaginosas no país.....	22
Tabela 3.4 - Exemplos de lipases de acordo com sua regioespecificidade.....	28
Tabela 3.5 - Exemplos de produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos e gorduras.	35
Tabela 4.1 - Composição em ácidos graxos presentes no óleo de palmiste.	40
Tabela 4.2 - Equipamentos utilizados no desenvolvimento experimental.....	41
Tabela 5.1 - Propriedades físicas do óleo de palmiste	55
Tabela 5.2 - Teor em ácidos graxos presentes no óleo de palmiste.....	56
Tabela 5.3 - Atividade hidrolítica e teor de umidade dos derivados imobilizados em SiO ₂ -HEC.	57
Tabela 5.4 - Teor de éter e quantidade de biocatalisador utilizado na transesterificação do óleo de palmiste em relação à atividade hidrolítica dos derivados imobilizados	60
Tabela 5.5 - Desempenho das lipases de <i>B. cepacia</i> , <i>P. fluorescens</i> e <i>T. lanuginosus</i> imobilizadas em SiO ₂ -HEC na síntese de biodiesel a partir do óleo de palmiste e etanol em reatores de tanque agitado	63
Tabela 5.6 - Atividade hidrolítica e umidade das enzimas imobilizadas de mesma especificidade	65
Tabela 5.7 - Desempenho da combinação em diferentes proporções das lipases de <i>B. cepacia</i> e <i>P. fluorescens</i> imobilizadas em SiO ₂ -HEC na síntese de biodiesel a partir do óleo de palmiste e etanol em regime descontínuo.....	68
Tabela 5.8 - Proporções das lipases PS e TL na associação das enzimas de diferentes especificidades, atividade hidrolítica e umidade dos derivados imobilizados	69
Tabela 5.9 - Desempenho da combinação das lipases de <i>B. cepacia</i> e <i>T. lanuginosus</i> imobilizadas em SiO ₂ -HEC aplicada na síntese de biodiesel a partir do óleo de palmiste e etanol em regime descontínuo.	73
Tabela 5.10 – Ajuste da vazão da bomba peristáltica	75

Tabela 5.11 - Influência da razão molar no desempenho do primeiro estágio do sistema contínuo na transesterificação do óleo de palmiste em ésteres de etila para tempo espacial de 16 horas, utilizando lipase PS imobilizada.	79
Tabela 5.12 - Desempenho da associação das lipases de <i>B. cepacia</i> e <i>T. lanuginosus</i> imobilizadas em SiO ₂ -HEC na transesterificação do óleo de palmiste com etanol em reator de leito fixo duplo estágio em fluxo contínuo utilizando substrato em diferentes razões molares (1: 12 ; 1: 10 e 1: 8) para tempos espaciais de 16 e 14 horas.	83
Tabela 5.13 – Tempo de meia-vida dos biocatalisadores em diferentes razões molares utilizadas na transesterificação do óleo de palmiste com etanol em fluxo contínuo	84

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Biodiesel	18
3.2	Matéria-prima para produção de biodiesel	22
3.3	Óleo de palmiste	23
3.4	Produção de biodiesel	23
3.4.1	Transesterificação	24
3.5	Lipases	26
3.5.1	Uso da combinação de lipases (combi-lipase) para produção de biodiesel por transesterificação	29
3.6	Imobilização da lipase	31
3.7	Biorreatores utilizados na produção de biodiesel	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Materiais	40
4.1.1	Lipases	40
4.1.2	Suporte de imobilização	40
4.1.3	Materiais de Partida	40
4.1.4	Outros reagentes	41
4.2	Equipamentos	41
4.2.1	Montagem dos sistemas reacionais	42
4.3	Metodologia Experimental	43
4.3.1	Síntese do suporte híbrido SiO₂- HEC	43
4.3.2	Ativação do suporte	44
4.3.3	Imobilização das lipases microbianas de diferentes fontes em SiO₂- HEC	44
4.3.4	Produção de biodiesel em regime descontínuo utilizando lipases isoladas e combinadas imobilizadas em SiO₂-HEC	45
4.3.5	Produção de biodiesel em regime contínuo utilizando combinação de lipases imobilizadas em SiO₂-HEC	45
4.3.6	Purificação do biodiesel	45
4.4	Métodos de análise	46
4.4.1	Determinação da composição e teor de ácidos graxos no óleo de palmiste	46
4.4.2	Determinação da atividade hidrolítica das lipases imobilizadas	47
4.4.3	Teor de umidade dos derivados imobilizados	48
4.4.4	Densidade do biocatalisador	48
4.4.5	Viscosidade cinemática	48
4.4.6	Massa específica	49

4.4.7	Concentração dos ésteres de etila.....	49
4.4.8	Determinação dos acilgliceróis residuais	49
4.4.9	Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	50
4.5	Cálculos	50
4.5.1	Conversões	50
4.5.2	Tempo espacial.....	52
4.5.3	Produtividade.....	52
4.5.4	Tempo de meia-vida do biocatalisador	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
5.1	Análises do óleo de palmiste	55
5.2	Seleção das fontes microbianas de lipase.....	56
5.3	Desempenho da síntese de ésteres catalisada por associação de lipases	64
5.3.1	Catálise via par enzimático de mesma especificidade	64
5.3.2	Catálise via par enzimático de diferente especificidade	69
5.4	Desempenho da síntese de ésteres catalisada por associação de lipases em regime contínuo	74
5.4.1	Determinação da densidade dos biocatalisadores.....	75
5.4.2	Calibração da bomba peristáltica.....	75
5.4.3	Influência da razão molar e tempo espacial na síntese de ésteres de etila em sistema contínuo de duplo estágio.....	76
5.5	Estabilidade operacional das lipases	84
5.6	Afinidade do sistema imobilizado na adsorção do glicerol formado como subproduto	85
6	CONCLUSÕES.....	87
	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

Combustíveis fósseis representam a maior parte da fonte energética do mundo, sendo responsáveis por 98% das emissões do gás carbono na atmosfera e também relacionados ao aumento do efeito estufa. Além disto, incide sobre o uso de combustíveis fósseis a preocupação com a escassez do petróleo. Desta forma, várias são as iniciativas para a busca por novas matrizes energéticas. Estudos se concentram no desenvolvimento de fontes renováveis utilizando biomassa como potencial fornecedor em energia com baixa emissão de dióxido de carbono, convertendo-os em combustível como, por exemplo, a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais (ARAUJO et al., 2017; ATABANI et al., 2012).

Atualmente, o biodiesel tem se demonstrado promissor como substituinte ao diesel de petróleo, além de ser biodegradável contém baixa toxicidade (AMINI et al., 2017). Sua produção em escala industrial baseia-se na tecnologia de catálise química de óleos vegetais com metanol, o que promove a clivagem dos triacilgliceróis gerando ésteres metílicos de cadeias longas (ARAÚJO et al., 2017; HASAN; RAHMAM, 2017). Apesar das elevadas conversões, este método clássico requer controle rigoroso da matéria-prima, apresentando baixo teor de água e de ácidos graxos livres. Além disso, o uso de catalisador químico causa problemas ao meio ambiente devido sua complexa etapa a jusante, envolvendo remoção de sais inorgânicos do produto, dificuldade de purificação do glicerol e tratamento de águas alcalinas residuais (HAMA; NODA; KONDO et al., 2018; KNOTHE et al., 2006).

Deste modo, a busca por catalisadores que proporcionam etapas menos onerosas de purificação e que sejam mais seletivos ao substrato tem se demonstrado de grande interesse para a produção de biodiesel. Entre os catalisadores, a enzima lipase surge como opção promissora para mediar as transformações de óleos vegetais, pois apresenta alta seletividade ao substrato, facilidade de recuperação do glicerol e baixo consumo de energia, atuando em condições brandas de temperatura e pressão (MEUNIER et al., 2017; CHRISTOPHER; HUMAR; ZAMBARE, 2014; TAN et al., 2010).

Apesar das vantagens destacadas pelo uso das lipases, alguns obstáculos como o elevado custo de sua produção, cinética relativamente lenta e problemas

relacionados aos elevados teores residuais de monoacilglicerol (MAG) e diacilglicerol (DAG) presentes no biodiesel formado tem dificultado sua atuação em um cenário industrial. No entanto, o uso das enzimas imobilizadas em suportes sólidos promove maior estabilidade física e térmica, facilita sua remoção do meio reacional e permite serem reutilizadas em um novo ciclo, favorecendo redução nos custos global do processo. Além disso, o uso de combinações enzimáticas possibilita cinética reacional mais rápida e a redução do teor de MAG e DAG do produto formado (POPPE et al., 2013; ARAKI et al., 2018; POPPE et al., 2015).

A produção de biodiesel via rota enzimática vem sendo estudada pelo Grupo de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), dando ênfase ao desenvolvimento do processo empregando de lipases imobilizadas em suportes não comerciais (CARVALHO et al, 2013; DA RÓS et al., 2010; FREITAS et al., 2009; MOREIRA et al., 2007; PAULA et al., 2007; MARTIN et al, 2018) a partir de diferentes matérias-primas lipídicas (óleos de babaçu, coco, palma, macaúba, palmiste, entre outras). Os resultados obtidos são altamente promissores, pois os ésteres etílicos obtidos atendem as especificações exigidas pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) para uso como biocombustível em termos de concentração de ésteres ($\geq 96\%$) e viscosidade cinemática ($3-6 \text{ mm}^2/\text{s}$). No entanto, os produtos purificados têm apresentado teores residuais de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) que não atendem os limites máximos permitidos na legislação brasileira (MAG+DAG = 0,9% m/m) (MOREIRA et al., 2007; CARVALHO et al., 2013; FIDALGO et al., 2016; RAMOS L et al., 2017).

Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo o uso associado de lipases de diferentes fontes microbianas imobilizadas para produção do biodiesel com o intuito de promover a redução dos teores residuais de MAG e DAG. A utilização do óleo de palmiste foi proposta como fonte lipídica por apresentar elevado teor em ácidos graxos saturados, demonstrando potencialidade em formar biocombustível com alta estabilidade oxidativa. Adicionalmente, metanol foi substituído por etanol, pois apresenta grande disponibilidade no país visando uma produção independente de recursos fósseis.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo o aprimoramento da tecnologia enzimática de transesterificação do óleo de palmiste pela rota etílica, buscando reduzir os teores residuais de monoacilgliceróis e diacilgliceróis no produto purificado. Para alcançar esse objetivo as seguintes etapas foram realizadas:

- a) Triagem de lipases de diferentes fontes para mediar à reação de transesterificação do óleo de palmiste utilizando etanol como acceptor do grupo acila;
- b) Avaliação do desempenho das lipases selecionadas de modo isolado e combinado aplicado em regime descontínuo na produção de biodiesel;
- c) Uso da combinação de lipases mais efetiva em ensaios em regime contínuo na produção de biodiesel;
- d) Estabelecimento das condições operacionais para desenvolvimento do processo operando em regime contínuo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliográfica será dado um enfoque aos principais temas relacionados com o trabalho em fase de desenvolvimento, iniciando-se pela importância das fontes renováveis de energia para o meio ambiente, seguido de biodiesel, óleos vegetais usados como matéria-prima na produção de biodiesel e transesterificação química e enzimática. Particular ênfase será dada aos processos enzimáticos de síntese de biodiesel.

3.1 Biodiesel

A necessidade em inovar a produção de energia e a busca de fontes energéticas alternativas, têm se tornado cruciais para manter o crescimento econômico e o padrão de vida elevado (ARAÚJO et al., 2017; ATABANI et al., 2012).

Devido à instabilidade do valor do petróleo bruto entre os anos de 2009 a 2013, a produção global de biodiesel aumentou em 23% (NAYLOR; HIGGINS, 2017). Atualmente, os incentivos políticos para a produção de energias visam a busca de baixo impacto ambiental, estímulo da agricultura e minimização do efeito estufa.

O biodiesel é definido como “Combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil” (ANP, 2014), sendo quimicamente ésteres, sua queima e o calor formado se assemelham ao diesel (hidrocarbonetos), além de prolongar a vida útil do motor, reduzindo a necessidade de manutenção, o que torna a sua produção apropriada (ARAÚJO et al., 2017; HASAN; RAHMAM, 2017).

Ressaltando ainda mais suas vantagens, o biodiesel é uma fonte energética renovável, de baixa toxicidade, baixa emissão de gases poluentes, de material particulado e de hidrocarbonetos. Seu elevado teor de cetano contribui para uma ignição rápida (MAHMUDUL et al., 2017; JAYED et al., 2009).

A Tabela 3.1 destaca os principais produtores de biodiesel em bilhões de litros por ano, segundo Renewables Global Status Repor do ano de 2018.

Tabela 3.1 - Principais produtores de biodiesel no ano de 2017

Colocação	País	Produção de biodiesel (10⁶ L)
1	Estados Unidos	6,0
2	Brasil	4,3
3	Alemanha	3,5
4	Argentina	3,3
5	Indonésia	2,5
6	França	2,3
7	Tailândia	1,4
8	Espanha	1,3
9	Polônia	1,0
10	Colômbia	0,6
11	Demais países	5,4

Fonte: Adaptado (REN 21, 2018).

Ainda assim, o biodiesel aplicado de maneira pura (B100), apresenta algumas desvantagens com relação ao diesel mineral, tais como, aumento nas emissões de óxidos de nitrogênio (NO_x) formados após a combustão, problemas mecânicos relacionados à viscosidade elevada, deposição de goma na parede do pistão (MAHMUDUL et al., 2017).

No Brasil, o biodiesel começou a ganhar destaque em sua produção por meio do programa PROBIODIESEL no ano 2000, com uma visão inicial de estimular o desenvolvimento agrícola de matérias-primas oleaginosas perenes por pequenos produtores (NAYLOR, et al., 2017).

Em dezembro de 2004 o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) foi criado, reportando a adição facultativa de 2% de biodiesel ao diesel fóssil, tornando-se obrigatória a mistura no mesmo percentual no ano de 2008, conforme o artigo 2º da Lei nº 11.097/2005 (ANP, 2014). Devido ao amadurecimento do mercado nacional, incrementos no percentual da mistura de

biodiesel no diesel foram recorrentes. Atualmente a porcentagem de biodiesel na mistura é de 10% (ANP, 2014).

O Brasil, conforme apresentado na Tabela 3.1 permanece em segundo lugar como maior produtor mundial de biodiesel, sendo as principais regiões produtoras o sul e centro-oeste, correspondendo a 30 e 40% dos valores arrematados em leilão, respectivamente (AMARAL; ABREU, 2016).

A produção de biodiesel no Brasil proporciona desenvolvimento de uma fonte energética alternativa, além de diminuir a dependência do uso do óleo diesel importado. Devido à diversidade de matérias-primas disponíveis no Brasil, o biodiesel produzido em território nacional deve atender especificações químicas e físicas para ser comercializado.

A Resolução nº 45/2014 da ANP é responsável por indicar as metodologias e procedimentos experimentais para os testes químicos e físicos do biodiesel, bem como estipular valores máximos e mínimos das características do biodiesel para uso como combustível (Tabela 3.2), entre os quais as mais importantes para serem verificadas em escala de laboratório são: teor mínimo de éster 96,5%, viscosidade 3,0 – 6,0 mm²/s, teor máximo de monoacilgliceróis 0,7% e teor máximo de diacilgliceróis 0,2%.

Tabela 3.2 - Especificações do biodiesel estabelecidas pela Resolução 45/2014 (ANP)

Característica	Unidade	Limite	Método		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISSO
Aspecto	-	LII	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m ³	850- 900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 EN ISO 12185 EN ISO 3104
Viscosidade cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0-6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água, máx.	mg/kg	350	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação total, máx.	mg/kg	24	-	-	EN ISO 12662
Ponto de fulgor, mín.	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín.	% massa	96,5	15342	-	EN 14103
Resíduo de carbono	% massa	0,050	-	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	-	5453	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Cálcio + magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número de cetano	-	Anotar	-	613 6890	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	5-19	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	EN 14104
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341	6584	EN 14105 EN 14106
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344	6584	EN 14105
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,70	15342 15344 15908	6584	EN 14105
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 15344 15908	6584	EN 14105
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342 15344 15908	6584	EN 14105
Metanol e/ou etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de iodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.	H	6	-	-	EN 14112 EN 15751

Fonte: ANP (2014).

3.2 Matéria-prima para produção de biodiesel

A seleção da matéria-prima para a produção de biodiesel deve levar em consideração aspectos econômicos, desenvolvimento social de uma região e o grau de refinamento do material lipídico (NIELSEN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2017). As fontes para produção dos ésteres de interesse (biodiesel) são categorizadas em óleos vegetais comestíveis e não comestíveis, gordura animal, óleo residual e óleo de microrganismos oleaginosos (AMINI et al., 2017; PINZI et al., 2013).

Dentre as possibilidades de matérias-primas, as mais utilizadas são os óleos vegetais, responsáveis por mais de 95% do material lipídico para produção mundial de biodiesel, como óleo de colza (84%), óleo de girassol (13%) e óleo de soja (2%). Os óleos utilizados são compostos, em sua maioria, por ácidos graxos do tipo láurico (C12:0), palmítico (C16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3) (KNOTHE; RAZON, 2017; ATABANI et al., 2012).

O Brasil, devido à sua grandeza territorial, proporciona ampla diversidade de matérias-primas vegetais (Tabela 3.3) para a produção de biodiesel, como a soja, o girassol e a canola (RAMOS LP et al., 2017), sendo cerca de 75% da produção nacional de biodiesel realizada pela conversão do óleo de soja.

Tabela 3.3 - Características das principais culturas oleaginosas no país

Espécie	Origem do óleo	Teor de óleo (%)	Meses de colheita por ano	Rendimento (t de óleo/ ha)
Dendê	Amêndoa	22	12	3-6
Coco	Fruto	55-60	12	1,3-1,9
Babaçu	Amêndoa	66	12	0,1-0,3
Girassol	Grão	38-48	3	0,5-0,9
Canola	Grão	40-48	3	0,5-0,9
Amendoim	Grão	40-43	3	0,6-0,8
Soja	Grão	18	3	0,2-0,4
Algodão	Grão	15	3	0,1-0,2

Fonte: Adaptado (SILVA; FREITAS, 2008).

Entretanto, o óleo de soja não atende exclusivamente a demanda para a produção de biocombustível, a soja é também empregada em setores alimentícios, o que leva a busca de fontes alternativas, como óleos vegetais de andiroba, babaçu, pinhão-manso e palma (OLIVEIRA et al., 2017). Dando

destaque para o material lipídico empregado no presente trabalho, oriundo do cerne da palma, o óleo de palmiste.

3.3 Óleo de palmiste

A palmeira é uma oleaginosa da espécie *Elaeis guineensis* da qual se extraem dois tipos de óleos com características diferentes. O óleo de palma, obtido por prensagem é extraído da polpa dos frutos, apresenta elevado teor de ácidos insaturados (C 18:1 e C 18:2) e pode ser utilizado na indústria de alimentos como em composições de biscoitos, cremes, margarinas, recheios e chocolates. Enquanto, o óleo de palmiste, obtido da semente da fruta por extração mecânica dos grãos secos, apresenta características similares à composição do óleo de coco (ABRAPALMA, 2015). Por possuir elevado teor em ácidos graxos de cadeias curtas, como o ácido láurico (C12:0) e o ácido mirístico (C14:0), além de baixo teor em ácidos insaturados, o óleo de palmiste demonstra elevada estabilidade oxidativa, revelando, desta forma, bom potencial como insumo para produção de biodiesel.

O óleo de palmiste apresenta como outra vantagem, o fato de seu fruto apresentar uma cultura perene com colheita contínua durante todo o ano, minimizando gastos energéticos e financeiros para sua produção, o que o torna uma potencial matéria-prima para futura aplicação em larga escala na síntese de biodiesel (SILVA; FREITAS, 2008).

3.4 Produção de biodiesel

De acordo com a literatura, o uso direto de óleos e gordura na queima em motores apresenta limitações, devido sua elevada viscosidade que ocasiona diversos problemas, tais como, depósito de carbono em componentes do motor, entupimento de injetores, pouca pulverização de bico e formação de gomas em deposição no pistão (LIAQUAT et al., 2013; JAYED et al., 2011; RAMADHAS et al., 2005; KNOTHE et al., 2006).

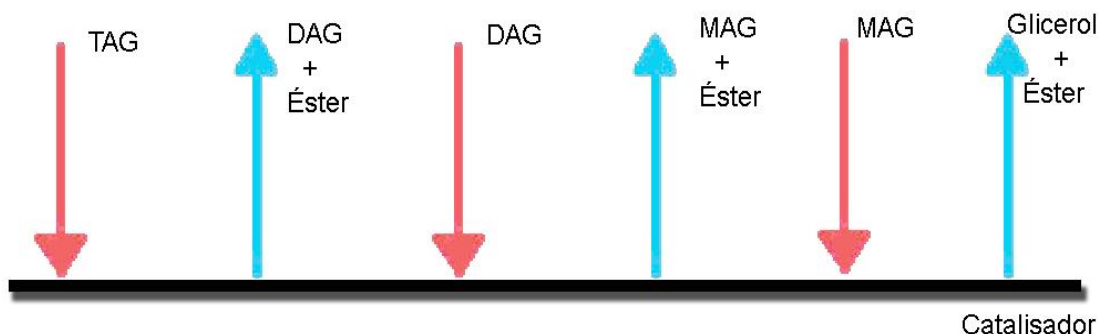
Para superar essas limitações, a redução da viscosidade do material lipídico por diferentes estratégias tem sido testada, entretanto a reação de transesterificação é considerada a melhor opção, devido ao processo ser relativamente simples, gerando biocombustível com propriedades semelhantes ao

óleo diesel (LEUNG; WU; LEUNG, 2010). Além disso, o biodiesel, comparado ao biogás, é a fonte energética alternativa mais atrativa como biocombustível em território nacional, seu uso direto em motores do ciclo diesel, torna-o um substituinte capaz de ser aplicado sem necessidade de alterações no motor ou nos automóveis (PINTO et al., 2005).

3.4.1 Transesterificação

O procedimento de transesterificação na produção de biodiesel envolve o uso de óleo vegetal ou gordura animal com álcool de cadeia curta na presença de catalisador. A reação ocorre de maneira sequencial e reversível, sendo constituída de três etapas (Figura 3.1), a saber: clivagem do triacilglicerol (TAG), seguida do diacilglicerol (DAG) finalizando com a do monoacilglicerol (MAG) que resulta na liberação do glicerol e um mol de éster em cada etapa da reação (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; ARAUJO et al., 2017).

Figura 3.1 - Esquema geral da reação de transesterificação



Fonte: Adaptado (CHEIRSILP; KITTIKUN; LIMKATANYU, 2008).

A estequiometria do sistema de produção de biodiesel indica a utilização mínima de três mols de álcool para cada mol de triacilglicerol (Figura 3.2), normalmente é utilizado excesso de álcool para favorecer o direcionamento da reação para os produtos, auxiliando também na transferência de massa entre o meio e o catalisador (TARIQ; ALI; KHALID, 2012; VERMA; SHARMA, 2016).

Os catalisadores, por sua vez, podem ser de caráter básico, ácido ou enzimático. Para material lipídico com elevado teor em ácidos graxos livres, os catalisadores ácidos são os mais indicados, como o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido clorídrico (HCl), entretanto, a transesterificação ocorre em razões molares

altas (30:1 álcool/óleo), com tempo reacional longo e elevada temperatura (100 °C) (FAROBIE; MATSUMURA, 2017; TARIQ; ALI; KHALID, 2012; TAN et al., 2010; BRASKAR; AISWARYA, 2016).

A produção industrial de biodiesel utiliza predominantemente os catalisadores alcalinos, tais como o hidróxido de potássio (KOH) e o hidróxido de sódio (NaOH) pois, apresentam elevadas conversões e maior velocidade de reação. Entretanto, problemas relacionados a reação de saponificação dos ácidos graxos livres e reações de hidrólise causadas pelo teor de água no meio reacional, consomem parte da matéria-prima, reduzindo o rendimento da reação. Além disso, a complexidade no tratamento de água residual formada na etapa de purificação e a dificuldade de recuperação do glicerol são as principais desvantagens, apresentando custos adicionais ao processo (FAROBIE; MATSUMURA, 2017; BRASKAR; AISWARYA, 2016).

Como subproduto da reação, o glicerol formado representa cerca de 10% do processo. Quando removido e purificado, é utilizado no setor industrial de produtos para cuidados pessoais, como, sabonetes, cremes e produtos para o cabelo. O glicerol pode ser também utilizado na composição de medicamentos e adoçantes (KOTHE, 2010). No entanto, o uso dominante de catalisador alcalino no processo de transesterificação produz glicerol impuro, sendo utilizadas colunas cromatográficas de troca iônica para purificá-los. Esse método de purificação apresenta custo operacional elevado e baixa eficiência na recuperação do álcool (LOPES et al., 2014).

Desta forma, as buscas por novas rotas na produção de biodiesel com maior facilidade de purificação dos produtos, como as que utilizam catalisadores enzimáticos, surgem como método alternativo à produção convencional, apresentando diversos trabalhos na literatura, nos quais evidenciam a utilização de enzimas como biocatalisadores promissores para uma aplicação industrial (ZENEVICZ et al., 2017; TAN et al., 2010; CHRISTOPHER; HUMAR; ZAMBARE, 2014; POPPE et al., 2015; WANG et al., 2015).

3.5 Lipases

Lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que apresentam capacidade de clivar triacilgliceróis, liberando ácidos graxos livres, glicerol, mono e diacilgliceróis, na presença de água. São também, capazes de catalisar reações de esterificação e transesterificação em meio reacional restrito de água (CASTRO et al., 2004; BON et al., 2008). A versatilidade em conduzir reações em sentidos diferentes, dependendo do substrato inicial, é a característica mais importante que permite sua ampla aplicação industrial (CASTRO et al., 2004; BON et al., 2008; AMINI et al., 2017).

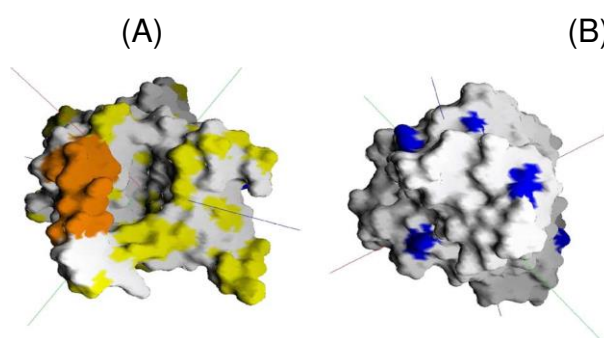
As lipases são comumente encontradas na natureza, tendo como fontes células animais, vegetais e microbianas. Com novas tecnologias e avanços nos estudos de modificação do DNA é possível produzir lipases com atividade mais elevada a custos de produção mais baixos. Atualmente, os microrganismos são as principais fontes produtoras de lipases como catalisadores devido à sua facilidade de manipulação genética, rápido crescimento e maior estabilidade (HASAN et al., 2006; CASTRO et al., 2004; CASTRO et al., 2010), podendo apresentar massa molecular entre 20 a 75 KDa, pH ótimo próximo ao neutro (4 à 9) e temperatura de atuação desde a temperatura ambiente até 70 °C (DE CASTRO et al., 2004).

A região catalítica das lipases é complexa e a formação estrutural da enzima ao redor do seu sítio ativo varia entre as lipases de fontes produtoras diferentes, apresentando uma tríade catalítica em um dobramento estrutural de entrelaçamento α/β hidrolase (JAEGER et al., 1994).

A partir das estruturas tridimensionais nota-se que a tríade de aminoácidos é normalmente protegida por uma superfície polipeptídica hidrofóbica em forma de α -hélice chamada de tampa ou lide. Em meio aquoso, na ausência de seu substrato natural, a lipase apresenta uma conformação fechada e inativa, na qual o sítio ativo está isolado do meio reacional e recoberto pela cadeia polipeptídica. A conformação fechada da enzima existe em equilíbrio parcial com a conformação denominada aberta e ativa. Na presença de substrato hidrofóbico, a superfície denominada tampa é deslocada, promovendo mudança na estrutura da enzima e expondo uma zona hidrofóbica que interage com a parte lipídica, alterando-a para uma conformação mais ativa denominada de conformação

aberta (PALOMO et al., 2004; CASTRO et al., 2004; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A estrutura da lipase de *Pseudomonas fluorescens* apresentada na literatura por Palomo et al., (2004) ilustrada na Figura 3.2 apresenta a configuração aberta, indicando na superfície (A) o sítio ativo com a tampa polipeptídica em laranja e os resíduos hidrofóbicos em amarelo e na (B) apresenta o lado oposto ao sítio ativo indicando em azul as lisinas presentes na superfície da enzima.

Figura 3.2 - Representação da estrutura cristalina da lipase de *P. fluorescens*



Fonte: (PALOMO et al., 2004).

Distinguindo-se de um catalisador químico, não apenas por atuar em condições mais brandas de reação, a lipase apresenta uma característica diferenciada que é especificidade ao substrato. Essa característica é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e as iterações que afetam a ligação enzima-substrato. As principais características podem ser classificadas em enantiosseletivas, tipo-seletivas e regiosseletivas (PAQUES et al., 2006).

As lipases ácido graxo específica ou tipo-seletiva tem preferência por cadeias carbônicas e/ou um número de insaturações específicas. As lipases enantiosseletivas, apresentam a capacidade de diferenciar enantiômeros em uma mistura racêmica de substrato. Por fim, as lipases com características regiosseletivas possuem a capacidade de catalisar diferentes posições do grupo funcional da molécula de substrato, sendo subdivididas em:

- a) Lipase 1,3 específicas: possuem a característica de catalisar especificamente ligações ésteres no posicionamento *sn-1* e *sn-3* das moléculas do acilglicerol;

- b) Lipase 1,2 específicas: possuem a característica de catalisar especificamente ligações ésteres na posição *sn-2* do acilglicerol;
- c) Lipase ácido graxo específica: possuem a característica de catalisar tipos específicos de grupamento acila nos triacilgliceróis;
- d) Lipases não específicas: catalisam acil gliceróis e ácidos graxos livres de modo aleatório, não apresentando especificidade com relação aos grupos acila ou o posicionamento onde ele se encontra.

A Tabela 3.4 apresenta alguns exemplos de lipases que possuem regioesletividade distintas.

Tabela 3.4 - Exemplos de lipases de acordo com sua regioespecificidade

Lipase	Atuação	Exemplos
Não específicas	Catalisam a hidrólise do TAG gerando ácidos graxos livres e glicerol, de modo aleatório.	<i>Candida rugosa</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Corynebacterium acnes</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
2-Específicas	Catalisam a hidrólise do TAG gerando ácidos graxos livres provenientes especificamente das posições <i>sn-2</i> .	<i>Candida antarctica A</i>
1,3-específicas	Catalisam a hidrólise do TAG gerando ácidos graxos livres provenientes especificamente das posições <i>sn-1</i> e <i>sn-3</i> .	<i>Mucor miehei</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , Lipase pancreática, <i>Penicillium roquefortii</i>
Ácido graxo específicas	Catalisam a hidrólise de tipos específicos de ácidos graxos nas moléculas do TAG.	<i>Geotrichum candidum</i>

Fonte: (CASTRO et al, 2010; TACIAS-PASCACIO et al., 2017; MARÍA et al., 2005).

As lipases estão entre as enzimas mais atrativas e promissoras para aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e oleoquímicas. No entanto, sua aplicação industrial é limitada pelo alto custo, perda de estabilidade nas condições reacionais e dificuldade na reutilização em novos ciclos. Uma estratégia utilizada com a finalidade de minimizar esses inconvenientes e

aumentar a vida útil do biocatalisador é a técnica de imobilização, em que a forma imobilizada, auxilia em maior estabilidade, aumento de vida útil do biocatalisador e facilidade de recuperação do meio reacional (AMINI et al., 2017).

3.5.1 Uso da combinação de lipases (combi-lipase) para produção de biodiesel por transesterificação

A produção de biodiesel por via enzimática mesmo não sendo ainda totalmente desenvolvida, em escala industrial, a utilização de lipases como catalisadores tem apresentado resultados promissores para uma futura implementação (HALIM et al., 2009; DA RÓS et al., 2010, POPPE et al., 2015; SIMÕES et al., 2015; CARVALHO et al., 2013; DANTAS et al., 2013).

A lipase, como biocatalisador, apresenta vantagens em relação aos catalisadores químicos convencionais devido a sua especificidade, regiosseletividade e enantiosseletividade ao substrato, promovendo catálises mais efetivas sem a formação de subprodutos e menor geração de efluentes. Além disso, não apresenta toxicidade, é biodegradável e atua em condições brandas de temperatura e pressão, minimizando os custos globais do processo (CHRISTOPHER; HUMAR; ZAMBARE, 2014).

Teoricamente, o mecanismo mais aceito para a transesterificação enzimática do triacilglicerol (TAG) é o “Ping-Pong Bi Bi”. Desenvolvido para esclarecer a entrada do TAG e do álcool no sítio ativo da enzima, resultando na formação do produto (éster) e na posterior recuperação conformacional do biocatalisador. O processo enzimático não apresenta restrições quanto a qualidade da matéria-prima, podendo ser utilizado óleos vegetais refinados, óleo bruto com elevado teor em ácidos graxos livres (AGL), resíduos de fritura e gorduras (AMINI et al., 2017).

Ainda que os catalisadores enzimáticos apresentem limitações quanto a velocidade de reação, perda de atividade por inativação e valor comercial elevado, a rota enzimática é considerada uma alternativa sustentável para a produção de biodiesel (BRUN et al., 2011).

Na tentativa de contornar as limitações e trazer maior competitividade ao bioprocessos, a combinação de lipases tem proporcionado maior velocidade de reação e rendimento na produção de biodiesel em relação aos processos que

utilizam uma única enzima (BABAKI et al., 2017; POPPE et al., 2015; BAKKIYARAJ et al., 2016; SU et al., 2015).

Tongboriboon e colaboradores (2010) avaliaram o desempenho de cinco lipases imobilizadas, incluindo lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*), lipase PS (*Pseudomonas cepacia*), lipase AY (*Candida rugosa*), Lipozyme TL-IM (*Thermomyces lanuginosa*) e Novozym 435 (*Candida antarctica*) na síntese de biodiesel a partir do óleo de palma com etanol em sistema isento de solventes. Dentre as preparações testadas, a associação das lipases AY e AK na proporção de 50% cada, obteve conversão mais elevada quando comparada aos valores obtidos utilizando apenas uma enzima.

Poppe e colaboradores (2015) estudaram a síntese de biodiesel catalisada pela combinação de três lipases comerciais na forma imobilizada com diferentes especificidades: Novozym 435 (CALB), Lipozyme TL-IM (TLL) e Lipozyme RM-IM (RML), empregando os óleos de oliva e palma, como materiais lipídicos. Empregando o óleo de oliva foi reportada conversão de 95% em ésteres em 18 horas de reação empregando a combinação enzimática de 50% CALB e 50% TLL, enquanto, para o óleo de palma a associação das lipases TLL e RML foi mais efetiva fornecendo 80% de conversão em 18 horas de reação.

A atuação sinérgica de enzimas com diferentes especificidades na produção de ésteres etílicos também foi relatada por Araki et al. (2018). As lipases imobilizadas de *Burkholderia cepacia* e *Thermomyces lanuginosus* combinadas na proporção de 50% cada, proporcionou conversão de 77% do óleo de macaúba em 48 h de reação, enquanto as reações utilizando isoladamente as lipases de *B. cepacia* e *T. lanuginosus*, forneceram conversões de 40 e 53%, respectivamente.

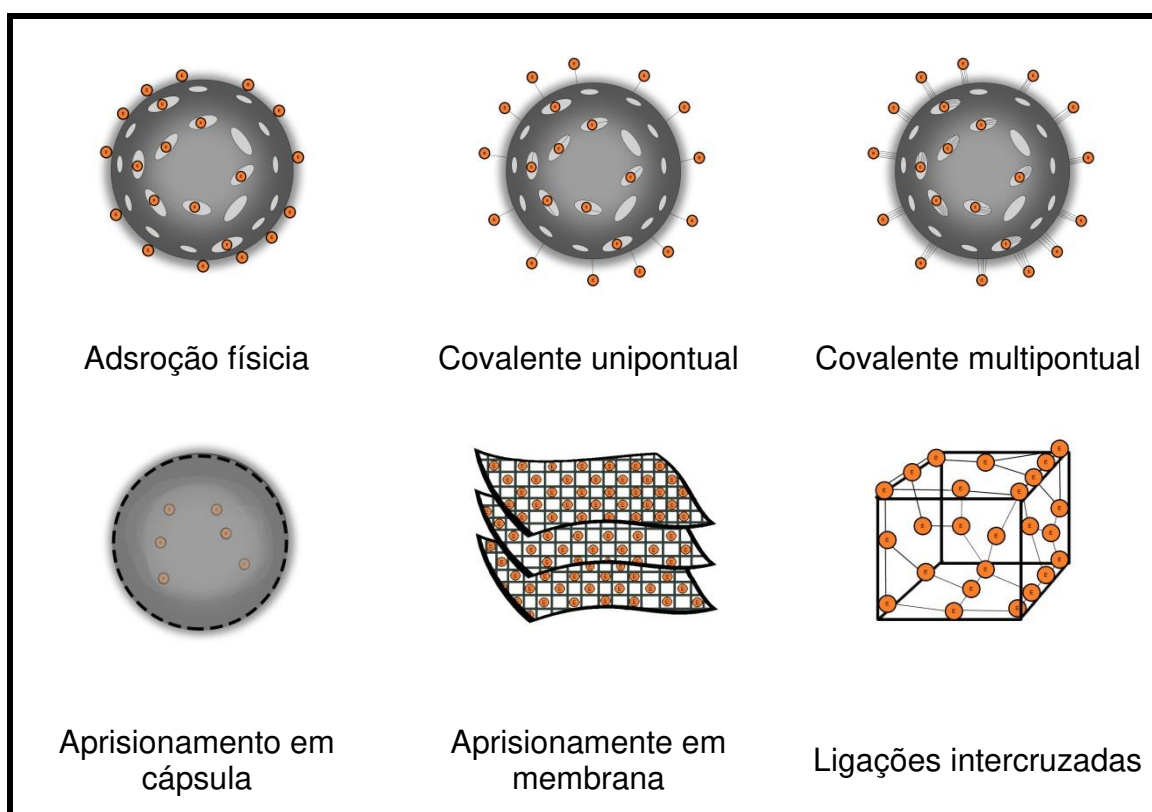
A utilização da lipase atuando de maneira sinérgica tem demonstrado bom desempenho para a obtenção de ésteres de etila. Embora a produção de biodiesel por transesterificação enzimática ainda seja um procedimento oneroso, este tipo de estratégia poderá auxiliar sua implementação em escala industrial com potencial para competir com o biodiesel produzido por catalisadores químicos.

3.6 Imobilização da lipase

A imobilização das lipases aplicadas ao processo de produção de biodiesel tem como uma das finalidades torná-las insolúveis ao meio reacional, facilitando sua remoção e permitindo reutilização. Além disso, a técnica de imobilização, muitas vezes, adiciona vantagens ao imobilizado, como aumento na estabilidade térmica e no tempo de meia-vida e tolerância a solventes orgânicos, proporcionando melhor aproveitamento da atividade catalítica (AMINI et al., 2017; ZHAO et al., 2015).

Os protocolos de imobilização comumente empregados podem ser classificados em adsorção física, ligação covalente, aprisionamento e ligações intercruzadas, ilustrados na Figura 3.3.

Figura 3.3 - Representação das técnicas de imobilização



Fonte: Adaptada de Poppe et al., (2015).

A adsorção física, entre todas as técnicas, é a mais simples, amplamente usada e de menor custo. Este método pode ser preparado em condições brandas, consistindo na transferência da enzima livre para a superfície do suporte, sendo

estabilizadas por forças de van der Waal, ligações de hidrogênio e por interações hidrofóbicas. Entretanto, a facilidade de dessorção da enzima do suporte limita possíveis reutilizações (GULDHE et al., 2015; TAN et al., 2010; ZHAO et al., 2015). No entanto, cabe destacar que não são requeridas fortes interações entre a enzima e o suporte em reações conduzidas em meio orgânico. Nessas condições, a enzima é insolúvel no meio apolar e a adsorção física pode ser um método bastante vantajoso (SOUZA et al., 2016).

Na imobilização por ligação covalente, as lipases se ligam de maneira mais forte com o suporte. Isso ocorre, pois as aminas primárias presentes em grupamentos não funcionais da enzima se ligam aos grupos reativos do suporte, apresentando boa estabilidade e restringindo a dessorção. De maneira análoga, a imobilização covalente multipontual se baseia em ligar os aminoácidos residuais presentes na parte posterior do sítio ativo da enzima em múltiplos grupamentos ativos do suporte, adicionando maior estabilidade ao derivado imobilizado (SOUZA et al., 2016; MENDES et al., 2011; MATEO et al., 2007). Contudo, as condições de preparo para realizar a imobilização covalente utilizam reagente químicos tóxicos, podendo ocasionar perda de atividade enzimática (ZHANG et al., 2012).

O método por aprisionamento consiste em prender a enzima dentro de uma membrana polimérica ou encapsulando-a no processo de polimerização de um material insolúvel ao seu redor. Após o aprisionamento, a lipase não está ligada à membrana ou cápsula, apresentando baixa deformidade do seu estado original e maior estabilidade quando comparada ao método por adsorção, entretanto, apresenta dificuldade na difusão do substrato através dos poros não sendo efetivo para substratos com alta massa molar (ZHAO et al., 2015; NUNE et al., 2006).

Quanto à técnica de imobilização por ligações intercruzadas, as moléculas de enzima se atrelam entre si por ação de reagentes químicos na ausência de suporte sólido. O reagente químico comumente utilizado é o glutaraldeído, que forma agregados com elevada capacidade de transesterificação. Isto ocorre devido à alta concentração de lipase por unidade de volume, apresentando maior estabilidade quando comparada à enzima livre. No entanto, há desvantagens na purificação do produto devido ao pequeno tamanho da partícula e por apresentar baixa resistência mecânica (SOUZA et al., 2016; GULDHE et al., 2015; CASTRO et al., 2010).

Devido à grande especificidade das reações catalisadas por enzimas, não é possível estabelecer uma técnica de imobilização ou suporte ideal para todos os processos enzimáticos (COELHO et al., 2008). A seleção de um método de imobilização e o suporte deve ser baseada na atividade máxima da enzima imobilizada, estabilidade operacional, os custos de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e as condições de uso da enzima imobilizada (CASTRO et al., 2008).

Vários são os trabalhos da literatura que tratam das diferentes técnicas de imobilização de lipases, caracterização dos complexos ativados e aplicações em reações que se processam em meio aquoso ou não aquoso (CASTRO et al., 2008; CASTRO et al., 2010; SOUZA et al., 2016). Entretanto, as tecnologias mais recentes de imobilização de enzimas requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas nos materiais convencionais.

Materiais híbridos orgânico-inorgânico constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações. Neste caso, diferentes compostos orgânicos têm sido empregados na síntese destas matrizes, porém os biopolímeros mostram-se promissores devido ao seu baixo custo, baixa toxicidade, biocompatibilidade e propriedades multifuncionais (PINGAN et al, 2017). A biocompatibilidade de precursores silanos como o tetraetilortossilicato (TEOS), com diferentes biopolímeros, incluindo álcool polivinílico (PINGAN et al, 2017; CARVALHO et al, 2013; RAMOS L et al., 2017), quitosana (PANDEY, MISHRA, 2011); celulose e derivados (XIE et al., 2009; PANDEY, MISHRA, 2011, MARTIN et al., 2018) e outros compostos (PANDEY, MISHRA, 2011) é reportada na literatura. Entre as quais, a matriz híbrida constituída de polissiloxano-hidroxietilcelulose (SiO_2 -HEC) tem sido testada com sucesso para imobilização de diferentes fontes de lipase, apresentando desempenho superior nas reações de transesterificação de óleos vegetais com álcoois de cadeia curta e média, em função da pouca afinidade do suporte (SiO_2 -HEC) em adsorver glicerol formado como subproduto nesta reação (MARTIN et al., 2018; CERON et al., 2018).

Alguns exemplos de produção de biodiesel catalisada por lipase imobilizada estão apresentados na Tabela 3.5. Os resultados do processo dependem do sistema reacional (tipo de óleo e álcool), origem da preparação

enzimática, tipo de suporte de imobilização, entre outros. Em alguns casos, o processo de obtenção do biodiesel apresenta potencial, mas o produto nem sempre atende as especificações estabelecidas pelas normas ASTM D6751 e ANP nº 45/2014. Entretanto, na maioria dos casos, os suportes mantiveram retenção de atividade satisfatória, permitindo várias etapas de reciclo do biocatalisador.

A maioria dos trabalhos ainda utiliza metanol. Devido à elevada hidrofobicidade deste álcool, as reações normalmente são realizadas em meio contendo solvente orgânico, como clorofórmio, 1-4-dioxano, benzeno, hexano e *tert*-butanol, em proporções geralmente elevadas (da ordem de 50-90% em relação à massa total de reagentes envolvidos). Com a substituição do metanol por outros álcoois como, por exemplo, etanol, propanol e butanol, a adição de solventes orgânicos no meio reacional torna-se dispensável, o que viabiliza o processo de obtenção de biodiesel com redução de custos com o solvente (normalmente tóxicos, de alta inflamabilidade e alto custo) e etapas de destilação, o que reduz o consumo de energia (ISO et al., 2001). Entretanto, neste caso, o rendimento em biodiesel pode ser menor e o tempo de reação ser maior (MITTLEBACH, 1990). Um novo enfoque para reduzir o efeito negativo do metanol na atividade da enzima foi estudado por Du et al. (2004). Os autores substituíram o álcool por acetato de metila e observaram que a principal vantagem desse processo foi a não formação do glicerol como subproduto. Óleos residuais também têm sido empregados com relativo sucesso como matéria-prima na síntese de biodiesel (HALIM et al.; 2009; WANG et al., 2008).

Nos trabalhos desenvolvidos no Brasil, as reações de transesterificação têm sido conduzidas preferencialmente com etanol por ser proveniente de biomassa, o que torna o processo totalmente independente do petróleo. A substituição da rota metílica pela etílica no Brasil é bastante atrativa devido à grande capacidade agrícola e a já consolidada indústria do etanol no país.

Tabela 3.5 - Exemplos de produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleos e gorduras.

Lipase	Suporte	Método de Imobilização	Óleo	Álcool	Solvente	Conversão (%)	Referência
Pâncreas de porco	SiO ₂ -PVA ativado com glutaraldeído	Covalente	Babaçu	Etanol Propanol Butanol	Isento	75,0 80,0 95,0	Paula et al. (2007)
<i>Burkholderia cepacia</i> (Lipase PS)	SiO ₂ -PVA ativado com epicloridrina	Covalente	Babaçu	Etanol	Isento	98,4	Freitas et al. (2009)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Lipase AK)	SiO ₂ -PVA ativado com epicloridrina	Covalente	Palma	Etanol	Isento	98,0	Moreira et al. (2007)
	Caolinita (Toyonite 200-M)	Adsorção física	Trioleína e açafrão	Propanol Butanol	Isento	100	Iso et al. (2001)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Polipropileno macroporoso	Adsorção física	Soja	Metanol	Isento	98,0	Salis et al. (2008)
	Celite-545	Adsorção física	Pinhão manso	Etanol	Isento	92,0	Shah et al. (2004)
<i>Candida rugosa</i>	Quitosana ativada com glutaraldeído	Covalente	Colza	Metanol	Isento	63,3	Shao et al. (2008)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipolase 100 L)	Poliuretano ativada com glutaraldeído	Covalente	Canola	Metanol	Isento	90,0	Dizge, N.; Keskinler, B (2008)
<i>Rhizomucor miehei</i> (Palatase)	Si-MCM-41 (TMOS)	Encapsulação	Trioleína	Metanol	Isento	77,0	Macario et al. (2009)

Fonte: Adaptado (CASTRO et al., 2010)
 Nota: SiO₂-PVA: Sílica-álcool polivinílico;
 TMOS: Tetrametilortossilicato.

Mesmo considerando algumas desvantagens técnicas existentes na produção do biodiesel pela rota etílica (velocidade mais lenta, maior consumo de álcool e maior dificuldade na etapa de purificação), a viscosidade ligeiramente superior em relação ao biodiesel metílico promove maior lubrificidade. O biodiesel obtido pela rota etílica gera menor opacidade na fumaça que o biodiesel metílico, sua temperatura de combustão é menor, o que reduz as emissões de NOx (KNOTHE, 2006). Deste modo, é válido e estratégico qualquer esforço para aperfeiçoar a rota etílica para produção de biodiesel por catálise enzimática.

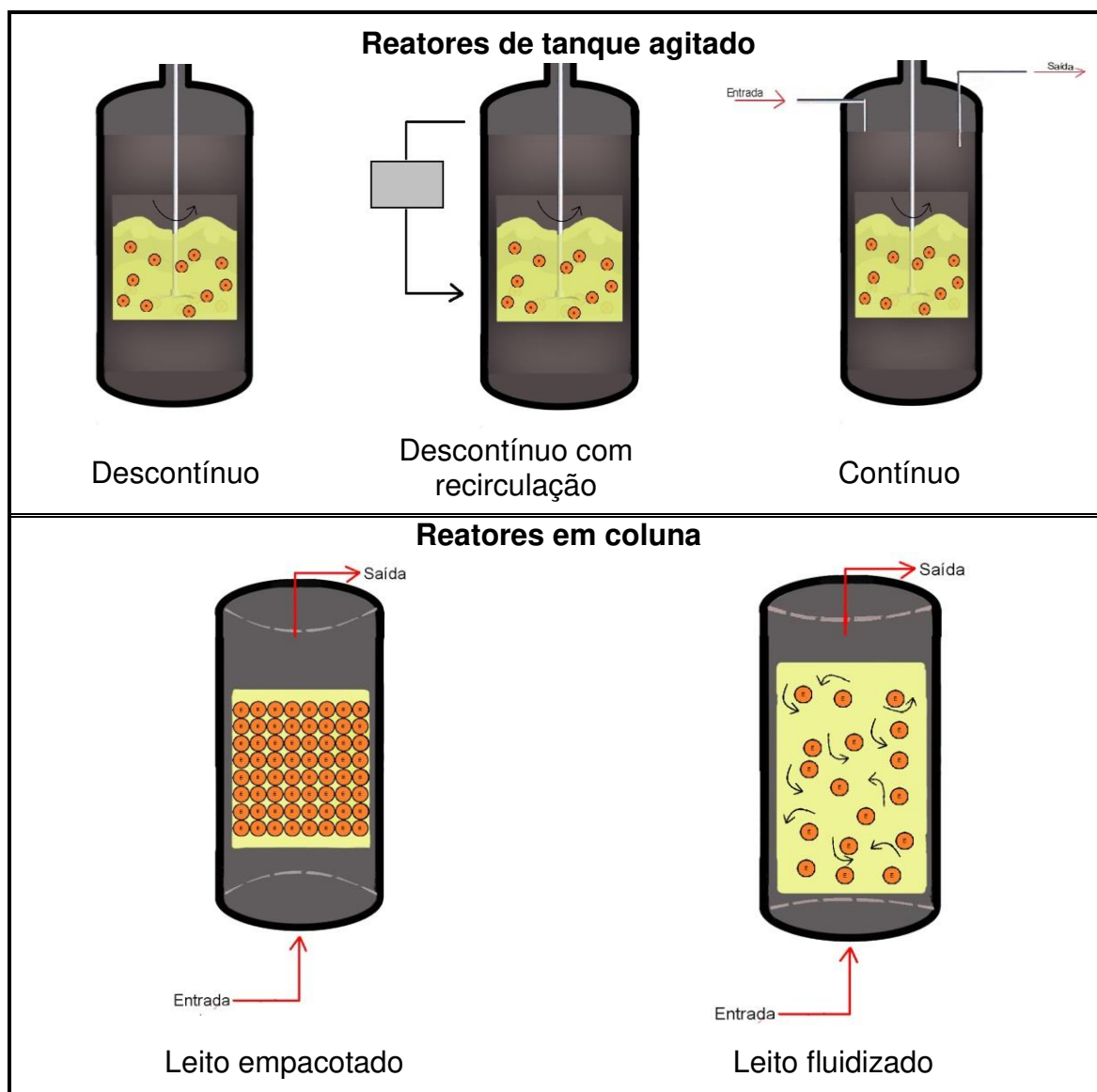
3.7 Biorreatores utilizados na produção de biodiesel

A escolha da configuração do biorreator adequado é dependente dos parâmetros do bioprocessamento, tais como a transferência de massa, a cinética de conversão enzimática, condições reacionais e forma como o biocatalisador é aplicado. Outros fatores que influenciam na escolha são os custos para a construção do biorreator, envolvendo sua forma geométrica, características hidrodinâmicas e as condições operacionais, além dos gastos com energia elétrica, manutenção do equipamento e o modo de operação (descontínuo ou contínuo) (POPPE et al., 2015).

Os principais biorreatores utilizados são os de tanque agitado (STR), reator de leito fixo (PBR) e o reator de leito fluidizado (FBR), sendo apresentados como eficientes para a produção de biodiesel por transesterificação enzimática (AMINI et al., 2017). A Figura 3.4 ilustra uma representação dos principais biorreatores.

O reator de tanque agitado (STR) é comumente empregado em bioprocessos utilizando tanto enzimas livres quanto imobilizadas, priorizando o uso com enzimas imobilizadas pela facilidade em removê-las ao final da reação. O funcionamento desse tipo de reator oferece vantagens operacionais tais como, elevado grau de dispersão do biocatalisador no meio reacional, sendo agitado mecanicamente por hélice ou pá, podendo ser operado em regime descontínuo (BSTR), descontínuo com recirculação, e contínuo (CSTR) com a adição de todos os componentes no início da reação ou em alguns casos, recomenda-se a adição do substrato por etapas (DA RÓS et al., 2010; DANTAS et al., 2013).

Figura 3.4 - Exemplos das principais configurações de biorreatores na produção de biodiesel por catálise enzimática



Fonte: Adaptado (POPPE et al., 2015).

O STR é indicado para meios reacionais que possuam viscosidade mais elevada e enzimas imobilizadas que sejam mais resistentes aos efeitos de cisalhamento e desativação por agitação física (CHRISTOPHER; HUMAR; ZAMBARE, 2014). A etapa envolvida para separar as fases sólida e líquida após o término da reação ocorre por filtração, centrifugação ou decantação para obtenção dos produtos e recuperação das enzimas imobilizadas. Contudo, o reator STR em sistema descontínuo apresenta elevado tempo de volume morto devido à necessidade de descarregar o produto, manutenção para nova carga e recarga, para assim dar início ao novo ciclo, o que desfavorece sua

implementação em um cenário industrial (CHRISTOPHER; HUMAR; ZAMBARE, 2014; TAN et al., 2010).

Uma alternativa para aplicação em larga escala seria a utilização de biorreatores tubulares em regime contínuo. O reator de leito empacotado (PBR) é usualmente empregado em regime contínuo para a produção de biodiesel com fluxo ascendente, evitando assim a compressão do leito catalítico e sua obstrução (ZHAO et al., 2015; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014), apresentando vantagens diretas e indiretas quando comparado com o sistema descontínuo, tais como: alta eficiência, baixo custo, facilidade de construção e operação, menor tensão de cisalhamento nas enzimas imobilizadas, além de poder obter uma área superficial de reação maior por unidade de volume (POPPE et al., 2015; ZHAO et al., 2015; AMINI et al., 2017). O sistema é composto basicamente por uma coluna cilíndrica empacotada pelo conjunto de partículas de biocatalisadores retidos, formando o leito fixo. O meio reacional é bombeado através da coluna por uma vazão específica e conforme o substrato passa pelo leito o material é convertido em produto. Esse reator, no entanto, apresenta algumas desvantagens como a ineficiência na transferência de massa e calor, obstrução do leito catalítico, surgimento de caminhos preferenciais e a dificuldade de manter o sistema operando por um longo período de tempo (FOGLER, 2009).

Em estudo apresentado por Tran et al (2017) foi utilizado reator de leito fixo em único estágio e três reatores de leito fixo em série com remoção do glicerol para produção de biodiesel. Lipase de *Burkholderia* sp. imobilizada em Celite foram usadas na transesterificação do óleo de girassol com metanol. Os resultados obtidos pelo sistema de único estágio apresentou conversão de 67%, devido ao acúmulo de glicerol formado, causando queda de pressão e resistência na transferência de massa. Por outro lado, o experimento envolvendo as colunas em série com a remoção do glicerol apresentou conversão de 85%, demonstrando que a estratégia utilizada proporcionou aumento na produção de biodiesel.

No trabalho de Ramos L et al. (2017), a interferência negativa do glicerol e a relação altura: diâmetro dos reatores tubulares na capacidade de produção de biodiesel foram reportados. Os autores utilizaram dois reatores de leito fixo em série de modo contínuo com coluna extratora de glicerol entre os reatores. Lipase

de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA foi usada na transesterificação do óleo de macaúba com etanol. Nas condições otimizadas, a conversão do óleo em ésteres na saída da primeira coluna foi de 91%, enquanto o valor na saída da segunda coluna, após remoção do glicerol, foi da ordem de 96% ou seja, a remoção do glicerol permitiu um aumento de 5% em relação ao teor de ésteres do produto obtido na primeira coluna. Além disso, a enzima imobilizada demonstrou elevada estabilidade e tempo de meia-vida de 1512 h.

Outra opção aos reatores agitados é o reator de leito fluidizado (FBR), sendo basicamente uma variação do reator de leito fixo. No entanto, para o FBR, a alimentação é realizada somente com fluxo ascendente, em que a vazão de alimentação seja suficientemente alta, fornecendo movimento livre para as partículas de enzima imobilizadas dentro do reator. A fluidização pode ser realizada pelo substrato ou por ar, proporciona melhor transferência de calor e de massa causada pela homogeneização do meio e pela movimentação dos biocatalisadores. Além disso, não apresenta queda de pressão e caminhos preferenciais. No entanto, para ocorrer a fluidização de forma eficiente, são utilizadas quantidades menores de enzima imobilizada por unidade de volume, reduzindo a eficiência global do reator (POPPE et al., 2015; MEUNIER; KARIMINIA; LEGGE, 2017).

A atuação do reator de leito fluidizado aplicado na produção de biodiesel foi reportado por Fidalgo et al., (2016). Os autores utilizaram lipase imobilizada comercial (Novozym® 435) na transesterificação do óleo do babaçu com álcool etílico. O carregamento enzimático da ordem de 12% em relação ao volume do reator foi suficiente para alcançar 98% de conversão do óleo nos ésteres correspondentes, utilizando substrato na razão molar 1:12 e tempo espacial de 8h. Nessas condições, a operação do reator foi mantida em estado estacionário por 15 dias em função da elevada estabilidade operacional do biocatalisador. No entanto, o biodiesel formado ultrapassou os teores de monoacilgliceróis e diacilgliceróis permitidos pela ANP n°452014.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Lipases

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizadas lipases microbianas comerciais de *Burkholderia cepacia* (lipase PS), *Pseudomonas fluorescens* (lipase AK), *Candida rugosa* (lipase CR), *Thermomyces lanuginosus* (lipase TL), *Penicillium camemberti* (lipase G), *Mucor javanicus* (lipase M) e lipase pancreática (lipase PP) obtidas da empresa Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA) e *Rhizopus oryzae* (Lipase-L036P) manufaturada pela Biocatalysts (Cardiff, País de Gales, Reino Unido). Todas as enzimas foram utilizadas sem tratamento adicional.

4.1.2 Suporte de imobilização

Como suporte foi utilizada uma matriz híbrida constituída de polissiloxano hidroxietilcelulose (SiO₂-HEC) preparada pela técnica sol-gel, empregando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) e hidroxietilcelulose (HEC), adquirido da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA), álcool etílico (95%, Cromoline) e ácido clorídrico (mín. 36%, Isofar).

4.1.3 Materiais de Partida

No processo de transesterificação foram utilizados: Álcool etílico anidro (99%, Cromoline) e óleo de palmiste (doado pela Agropalma, Belém-PA), sendo apresentada a composição de ácidos graxos, conforme fabricante, na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Composição em ácidos graxos presentes no óleo de palmiste.

Ácidos Graxos	Sigla	(%)	Ácido Graxo	Sigla	(%)
Caprílico	C 8:0	2,4 – 6,2	Palmítico	C 16:0	6,5 – 10
Cáprico	C 10:0	2,6 – 5	Estearico	C 18:0	1,3 – 3
Láurico	C 12:0	48 ± 7	Oleico	C 18:1	12 – 19
Mirístico	C 14:0	16 ± 2	Linoleico	C 18:2	1 – 3,5

Fonte: (AGROPALMA, 2014).

4.1.4 Outros reagentes

Os outros reagentes utilizados foram: hexano (Cromoline), polietilenoglicol (MM 1500, Synth), goma arábica em pó pura (Synth), epicloridrina (99%, Sigma-Aldrich), fosfato de sódio bibásico (mín. 99%, Montedison Farm, fosfato de sódio monobásico anidro (mín. 99%, Synth), hidróxido de sódio (mín. 97%, Isofar), hidróxido de potássio (mín. 85%, Cromoline), acetona (mín. 99,5%, Cinética) e iso-octano (99,0%, Synth). Azeite de oliva com baixa acidez (Carbonell, adquirido em mercado local). Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

4.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Equipamentos utilizados no desenvolvimento experimental

Equipamento	Modelo/Fabricante
Agitador mecânico	Modelo RW20-Digital, IKA, (IKA Laboratory Equipment)
Balança analítica	Modelo SHIMADZU
Balança de umidade	Modelo ID 50, Marte®
Banho termostatizado	Banho Ultratermostato Criostato
Bomba de vácuo	Modelo RV3, BOC Edwards
Centrífuga	Modelo 206-BL, Excelsa II (Fanem)
Moinho	MA048 Marconi
Placa de agitação	Modelo 752 Fisatom
Rotaevaporador	Modelo 801, Fisatom

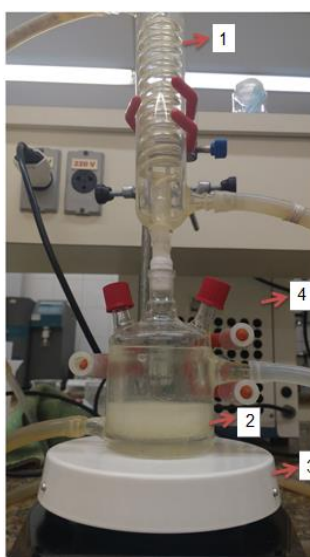
Fonte: Próprio autor.

4.2.1 Montagem dos sistemas reacionais

4.2.1.1 Biorreator de tanque agitado

As reações de transesterificação foram realizadas em regime descontínuo utilizando reator de vidro encamisado de 70 mL, com condensador de refluxo em espiral, a temperatura constante de 45 °C, agitado magneticamente. O sistema operacional é representado pela Figura 4.1.

Figura 4.1 - Sistema reacional do processo descontínuo



Fonte: Próprio autor.

Nota : 1 - Condensador;
2 - Reator de tanque agitado;
3 - Placa de agitação magnética;
4 - Banho termostático.

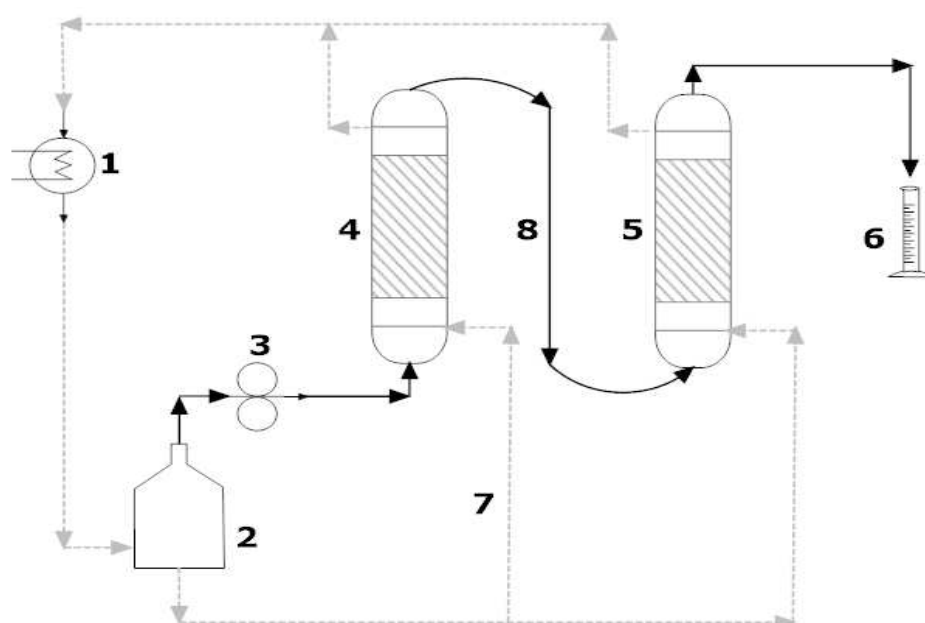
4.2.1.2 Biorreator de leito fixo de duplo estágio

O esquema usado na produção dos ésteres de etila em regime contínuo é apresentado na Figura 4.2, composto por um tanque de alimentação encamisado (2) de 400 mL, mantido a uma temperatura de 45 °C usando banho termostático (2) e agitação, contendo o meio reacional (óleo de palmiste e etanol na razão molar testada). A alimentação do meio reacional foi efetuada por meio de uma bomba peristáltica (3) em diferentes vazões em fluxo ascendente, através das colunas empacotadas dispostas em série (4 e 5). As colunas encamisadas de dimensões iguais (14 mm de diâmetro interno, 210 mm de altura e 32 mL volume)

foram empacotadas com as lipases selecionadas e imobilizadas em SiO₂-HEC. Para evitar perda do biocatalisador, no fundo da coluna foi colocada uma tela metálica.

O sistema foi operado em fluxo contínuo ascendente por aproximadamente 30 dias com reposição diária de meio reacional no tanque de alimentação, os produtos coletados foram analisados quanto ao teor de ésteres, viscosidade e glicerídeos residuais.

Figura 4.2 - Sistema reacional do processo contínuo de duplo estágio



Fonte: Próprio autor.

Nota: 1 - Banho termostático;
2 - Tanque de alimentação;
3 - Bomba peristáltica;
4 e 5 - Reatores de leito fixo;
6 - Coletor de biodiesel;
7 - Mangueira de aquecimento;
8 - Mangueira de alimentação.

4.3 Metodologia Experimental

4.3.1 Síntese do suporte híbrido SiO₂- HEC

O composto híbrido constituído de polissiloxano-hidroxietilcelulose (SiO₂-HEC) foi sintetizado pela mistura de 50 mL tetraetilortosilicato (TEOS), 50 mL etanol 95% e 60 mL de solução de hidroxietilcelulose 2% (m/v). A mistura foi

aquecida a 60 °C, sob agitação magnética constante, com adição 1 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e incubado por 40 min (MARTIN et al., 2018). Após o período de incubação, a mistura foi transferida para moldes de plástico e mantida a temperatura ambiente até a completa solidificação. O suporte sólido, retirado das formas plásticas, foi triturado e classificado com auxílio de peneiras de análise granulométrica (Bronzinox) com 42 e 60 mesh, utilizando as partículas retidas na malha de 60 mesh, para a etapa de ativação e imobilização das enzimas. O suporte obtido tinha as seguintes características: diâmetro médio dos poros (32,10 Å); área superficial (450,5 m²/ g) e volume de poros (0,36 cm³/ g) (CERON, 2017). Outras propriedades do suporte podem ser obtidas na literatura (MARTIN et al., 2018).

4.3.2 Ativação do suporte

A matriz polimérica retida na malha de 60 mesh foi ativada com solução de epicloridrina 2,5% (v/v) em tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L e pH 7,5), sendo homogeneizada por 30 minutos. Para cada 1 g de suporte foi utilizado 10 mL da solução, a ativação ocorreu em Erlenmeyer de 125 mL, mantidos em agitação por 1 hora à temperatura ambiente. Após a ativação, o suporte foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada, em seguida levado a estufa a 60 °C, por 24 horas.

4.3.3 Imobilização das lipases microbianas de diferentes fontes em SiO₂-HEC

O suporte ativado foi embebido em hexano numa relação sólido: líquido de 1:10 e mantido sob agitação branda por 2 h. Após este período, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 350 mg de lipase na sua forma livre, empregando como agente estabilizante da enzima 100 µL de solução aquosa contendo 5 mg/mL de polietilenoglicol (massa molecular 1500). As suspensões contendo enzima e suporte foram mantidas sob agitação a 30 °C por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a 4 °C. A recuperação dos derivados imobilizados foi efetuada por filtração a vácuo, com lavagens sucessivas com hexano para remoção do excesso de umidade. Em seguida, os derivados foram acondicionados em dessecador sob vácuo para redução da umidade em valores inferiores a 10%.

4.3.4 Produção de biodiesel em regime descontínuo utilizando lipases isoladas e combinadas imobilizadas em SiO₂-HEC

As reações foram efetuadas em reatores de vidro cilíndrico contendo 20 gramas de meio reacional na razão molar óleo/ etanol de 1:8 inoculado com lipase imobilizada em SiO₂-HEC em quantidade suficiente para satisfazer 600 unidades de atividade por cada grama de óleo (MARTIN et al., 2018). Todas as reações foram realizadas a 45 °C com agitação magnética de 150 rpm por um período máximo de 72 h. As lipases mais efetivas foram selecionadas e utilizadas de maneira combinada em diferentes proporções mantendo o mesmo carregamento enzimático e demais condições. O monitoramento do processo foi efetuado por retiradas de amostragens periódicas a cada 24 horas para quantificação dos ésteres formados por cromatografia em fase gasosa. As conversões foram calculadas de acordo com metodologia descrita por Urioste e colaboradores (2008).

4.3.5 Produção de biodiesel em regime contínuo utilizando combinação de lipases imobilizadas em SiO₂-HEC

Os reatores de leito fixo dispostos em série foram empacotados com 20 g das lipases selecionadas e a alimentação do meio reacional foi efetuada por meio de bomba peristáltica usando tubo Marprene #12, ajustando previamente os fluxos ascendentes para tempos espaciais de 14 e 16h. O substrato composto de óleo de palmiste e álcool etílico anidro nas razões molares de 1:12, 1:10 e 1:8 foi mantido em frasco de alimentação em agitação magnética a 45 °C. Amostras diárias foram recolhidas na saída de cada estágio e analisadas por cromatografia em fase gasosa acompanhando o progresso da formação dos ésteres etílicos ao longo dos dias. Ao final dos ensaios, o derivado imobilizado foi lavado com terc-butanol para remoção de produtos e substrato retidos eventualmente na matriz de imobilização e a atividade hidrolítica residual determinada.

4.3.6 Purificação do biodiesel

A purificação das amostras recolhidas nos processos descontínuo e contínuo foi efetuada por método tradicional por lavagens sucessivas com água em funil de decantação. Em cada lavagem foi utilizado aproximadamente o

mesmo volume de água em relação ao volume da amostra, agitando o funil e deixando-o em repouso por 2 horas para a separação das fases. A fase inferior composta por glicerol e água de lavagem foi descartada e a fase superior composta pelos ésteres de etila (biodiesel) foi submetida à centrifugação (3200 rpm por 15 min) e em seguida à evaporação em rota-evaporador (90°C por 30 min) para remoção de etanol e água remanescentes. Pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro foram adicionadas ao produto purificado para finalizar a etapa de secagem. Ao final do procedimento, o biodiesel foi submetido à análise de viscosidade cinemática, massa específica e quantificação do teor de MAG e DAG residuais.

4.4 Métodos de análise

4.4.1 Determinação da composição e teor de ácidos graxos no óleo de palmiste

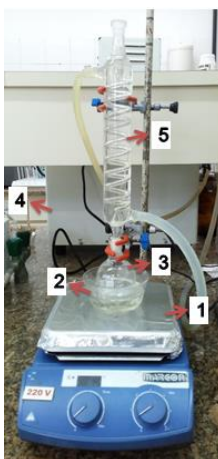
A determinação da composição e teor de ácido graxo do óleo de palmiste foi realizada seguindo o método oficial de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos Ce 2-66 (AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY, 2004), posteriormente analisados por cromatografia em fase gasosa.

O procedimento consistiu na pesagem de aproximadamente 0,2 gramas de óleo em balão de fundo redondo de 100 mL, em seguida, adicionado 5 mL de solução de hidróxido de sódio (0,5 mol/L) preparada com álcool metílico. Após a adição da base, o balão foi aquecido a 60 °C em agitação constante por 10 min, um condensador for conectado ao balão para evitar perda de álcool. Passado os 10 minutos, foram adicionados 5 mL de catalisador (trifluoreto de boro em álcool metílico 10%) e o sistema mantido em ebulição por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 5 mL de hexano pelo condensador conectado ao balão, o aquecimento foi desligado e após 1 minuto foi adicionado volume suficiente de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) para o sobrenadante alcançar o gargalo do balão. Aproximadamente 1 mL do sobrenadante foi recolhido e transferido para um vial cromatográfico contendo uma pequena quantidade de sulfato de sódio (Na₂SO₄) para retirada da umidade da amostra. Após a amostra atingir temperatura ambiente, foi adicionado heptano suficiente até completar o

volume do vial cromatográfico e a amostra foi injetada diretamente no cromatógrafo a gás.

A Figura 4.3 ilustra o sistema utilizado no procedimento de metilação do óleo de palmiste.

Figura 4.3 - Sistema de metilação do óleo de palmiste



Fonte: Próprio autor.

Nota: 1 - Placa de agitação magnética com aquecimento;
2 - Banho de glicerina;
3 - Balão de fundo redondo;
4 - Banho termostático;
5 - Condensador

4.4.2 Determinação da atividade hidrolítica das lipases imobilizadas

A atividade enzimática da lipase imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita por Soares et al., (1999). Foram misturados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva (50% azeite: água) e 4 mL de tampão fosfato (pH 7,0; 0,1 M). Em seguida, adicionou-se 0,05 g de imobilizado mantendo o sistema reacional sob agitação a 37 °C, por 5 min. Após o período de incubação, foram adicionados 10 mL de mistura etanol: acetona (1: 1) para interromper a reação. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH previamente padronizada (0,02 mol/L) utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram calculadas segundo a Equação 4.1 e expressas em μmol/g.min (U/g).

$$\text{Atividade hidrolítica} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{g} \cdot \text{min}} \right) = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot m} \quad (4.1)$$

Em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra, V_B = volume do KOH gasto na titulação do branco, M = molaridade da solução de KOH, t = tempo de reação em min, m = massa em gramas.

4.4.3 Teor de umidade dos derivados imobilizados

A determinação do teor de umidade dos derivados imobilizados foi realizada medindo-se a perda de massa do material após secagem de uma quantidade conhecida (cerca de 0,1g) em balança analítica acoplada a lâmpada de infravermelho durante 15 min a 100 °C.

4.4.4 Densidade do biocatalisador

A densidade do imobilizado utilizado no empacotamento dos reatores de leito fixo foi realizado em balão volumétrico aferidos com água á temperatura ambiente. Para tanto, foi colocada no balão volumétrico de 10 mL uma massa conhecida da enzima imobilizada e completado o volume com água. Foi utilizada bomba a vácuo para retirada das bolhas de ar, eventualmente presentes no balão, após a retirada das bolhas, completou-se novamente o volume com água. A densidade foi calculada pela relação entre a massa e o volume ocupado pelo biocatalisador segundo a Equação 4.2 (SIMÕES et al., 2015).

$$\rho = \frac{\text{massa de enzima imobilizada}}{\text{volume do balão} - \text{volume de água}} \quad (4.2)$$

4.4.5 Viscosidade cinemática

Os valores da viscosidade absoluta (cP) foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) utilizando cone cP 42 a 40 °C com aproximadamente 1 mL de amostra. Para determinar o valor

da viscosidade cinemática (mm^2/s), os valores de viscosidade absoluta (cP) foram divididos pela massa específica do biodiesel (g/mL).

4.4.6 Massa específica

Os valores de massa específica das amostras foram determinados utilizando densímetro digital Modelo DMA 35n EX (Anton Paar). As medições foram realizadas em temperatura de 20 °C, com volume de amostra de aproximadamente 2 mL.

4.4.7 Concentração dos ésteres de etila

Ao decorrer das reações de transesterificação, alíquotas eram retiradas do meio reacional e os ésteres de etila quantificados antes da purificação. O equipamento empregado nesta análise foi o cromatógrafo a gás (Modelo Varian CG 3800, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de chama ionizante e coluna empacotada de aço inoxidável do tipo 5% DEGS CHR-WHP 80-100 mesh 6ft 2.0mm ID e 1/8"OD (Restek, Frankel Commerce of Analytic Instruments Ltda, SP, Brasil), utilizando nitrogênio como gás de arraste com fluxo de 25 mL/min. A coluna foi submetida a uma rampa de temperatura de 90 °C (3 min), 120 °C (10 min) e 170 °C (15 min), numa taxa de aquecimento de 25°C/min. O software Galaxie Chromatography Data System version 1.9 foi utilizado para as leituras cromatográficas e a coleta dos dados. O volume injetado da amostra foi de 1 μL em hexano e padrão interno (hexanol) e a quantificação foi realizada pela calibração interna, conforme estabelecido por Urioste et al. (2008).

4.4.8 Determinação dos acilgliceróis residuais

Os teores de monoacilgliceróis e diacilgliceróis foram determinados em amostras purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O equipamento utilizado para esta análise foi o cromatógrafo Agilent modelo 1200 Series (Agilent Technologies, Inc. SP, Brasil), com detector evaporativo de espalhamento de luz e coluna de aço inoxidável Phenomenex Gemini C18 110 A (150 por 4,6 mm) (Allcrom, Ltd., SP, Brasil), operando com temperatura da coluna a 40 °C e detector a 70 °C.

Acetonitrila e metanol foram usados como fase móvel numa proporção de 80: 20% de cada um respectivamente, por 35 min. O fluxo foi mantido numa taxa inicial de 1,0 mL/min durante 6 min, seguido por 1,5 mL/min por 24 min e 3,0 mL/min por 5 min.

As amostras de biodiesel purificadas foram diluídas em acetato de etila/hexano na proporção de 1: 1 (v/v), sendo injetadas em volumes de 10 μ L. Os padrões utilizados de monoacilgliceróis e diacilgliceróis foram: monolaurina (C12:0), monomiristina (C14:0), monopalmitina (C16:0), monoestearina (C18:0), monooleína (C18:1), dilaurina (C12:0), dimiristina (C14:0), dipalmitina (C16:0), diestearina (C18:0) e dioleína (C18:1).

4.4.9 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Amostras da lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-HEC antes e após utilização em reatores operando em regime descontínuo e contínuo foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), conduzida na faixa de números de onda entre 4000 a 600 cm⁻¹ usando cristais de KBr, realizados no espectrômetro Spectrum GX, PErkin Elmer. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas e secas a 105°C, sendo medidos os valores de absorbância das amostras consideradas e comparados com o perfil do espectro de glicerol.

4.5 Cálculos

Os cálculos realizados para determinação de conversão do biodiesel e dos parâmetros reacionais são apresentados na presente seção.

4.5.1 Conversões

As conversões (R) das reações de síntese de biodiesel por via enzimática foi definida como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (Mt) em relação à massa total teórica esperada de ésteres de etila (Σ Me). M_e foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial da matéria-prima lipídica (M₀), da massa molecular correspondente a cada ácido (MM_a) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela Equação 4.3, em que M₀ corresponde ao produto da concentração mássica de

cada ácido graxo (Ca), com a massa inicial de óleo utilizada (Mi) Equação 4.4. A conversão foi calculada dividindo a massa total de ésteres determinada pela análise de cromatografia gasosa (Mt) pela massa total teórica de ésteres de etila (Me), conforme mostrado na Equação 4.5.

$$Me = \frac{(Mo \cdot MMe)}{MMa} \quad (4.3)$$

$$Mo = Ca \cdot Mi \quad (4.4)$$

$$R = \frac{Mt}{\Sigma Me} \cdot 100 \quad (4.5)$$

Quanto aos teores totais de monoacilgliceróis (Ttm) e aos de diacilgliceróis (Ttd) nas amostras de biodiesel purificadas foram estabelecidos pelo somatório dos valores obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), (Σm), juntamente com os diacilgliceróis (Σd), sendo multiplicados pela diluição da amostra e divididos pela massa específica (Kg/m^3), como descrita nas equações 4.6 e 4.7.

$$Ttm = \Sigma m * \frac{\text{diluição}}{\text{massa específica}} * 100 \quad (4.6)$$

$$Ttd = \Sigma d * \frac{\text{diluição}}{\text{densidade}} * 100 \quad (4.7)$$

4.5.2 Tempo espacial

O tempo espacial foi calculado de acordo com Levenspiel (2000), conforme as Equações 4.8, 4.9 e 4.10.

$$\tau = \frac{V}{v_o} \quad (4.8)$$

$$V = V_{\text{reator}} - V_{\text{biocatalisador}} \quad (4.9)$$

$$V_{\text{biocatalisador}} = \frac{w}{\rho} \quad (4.10)$$

Em que: τ é o tempo espacial (horas), V o volume útil do reator (mL), v_o a vazão volumétrica nas colunas, V_{reator} o volume total do reator, $V_{\text{biocatalisador}}$ é o volume ocupado pelo biocatalisador no reator, w a massa do biocatalisador e ρw a densidade do biocatalisador.

4.5.3 Produtividade

A produtividade do processo em regime descontínuo foi calculada de acordo com a Equação 4.11.

$$P' = \frac{C}{mm_{\text{éster}} \cdot t \cdot C_{\text{biocat}}} \quad (4.11)$$

Em que: P' é a produtividade do processo descontínuo ($\text{mol de éster} \cdot \text{g biocatalisador}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), C é a concentração de ésteres na saída do reator ($\text{g}_{\text{éster}}/\text{g}_{\text{meio}}$), $mm_{\text{éster}}$ é a massa molar média dos ésteres ($\text{g}_{\text{éster}}/\text{mol}$), t é o tempo reacional (horas) e C_{biocat} é a concentração de biocatalisador no meio reacional ($\text{g}_{\text{biocat}}/\text{g}_{\text{meio}}$).

Para o sistema contínuo, o valor de produtividade foi calculado pela Equação 4.12.

$$P'' = \frac{C \cdot Q \cdot \rho}{mm_{éster} \cdot m_{biocat}} \quad (4.12)$$

Em que: P'' é a produtividade do processo contínuo (mol de éster. g biocatalisador⁻¹. h⁻¹), C é a concentração de ésteres na saída da coluna (g_{éster}/g_{meio}), Q é a vazão (mL/h), ρ é a densidade (g_{meio}/mL), $mm_{éster}$ é a massa molar média dos ésters (g_{éster}/mol) e m_{biocat} é a massa de biocatalisador usada no sistema reacional (g_{biocat}).

4.5.4 Tempo de meia-vida do biocatalisador

Tomando por base as atividades hidrolíticas do biocatalisador antes e após uso em reator operando em regime contínuo, a constante de desativação (K_d) foi calculada pela Equação 4.13 e o valor obtido utilizado para determinar o tempo de meia-vida do biocatalisador, conforme Equação 4.14.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-k_d \cdot t} \quad (4.13)$$

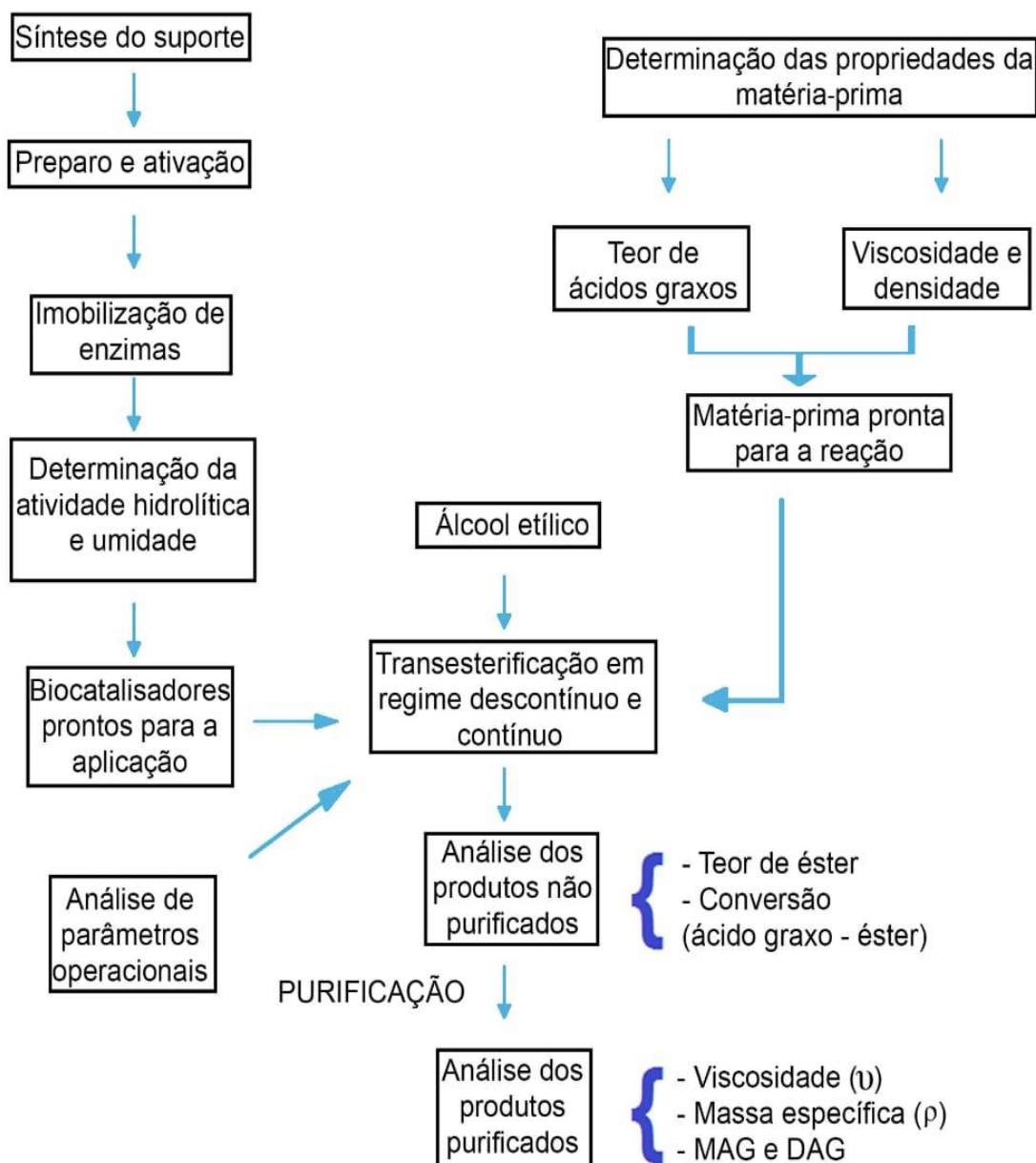
$$\frac{t_{1/2}}{2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (4.14)$$

Em que: A é a atividade hidrolítica residual da enzima imobilizada, A_0 é a atividade hidrolítica inicial e t é o tempo reacional, $t_{1/2}$ é o valor de tempo de meia-vida do biocatalisador e k_d é a constante de desativação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o foco na produção de biodiesel com baixo percentual de monoacilgliceróis e diacilgliceróis, são apresentados e discutidos neste tópico os resultados obtidos. A sequência do desenvolvimento das etapas envolvidas no presente trabalho está representada pela Figura 5.1.

Figura 5.1 - Esquema das etapas experimentais realizadas



Fonte: Próprio autor.

5.1 Análises do óleo de palmiste

Inicialmente, as principais características físicas do óleo de palmiste foram determinadas e os valores obtidos são apresentados na Tabela 5.1.

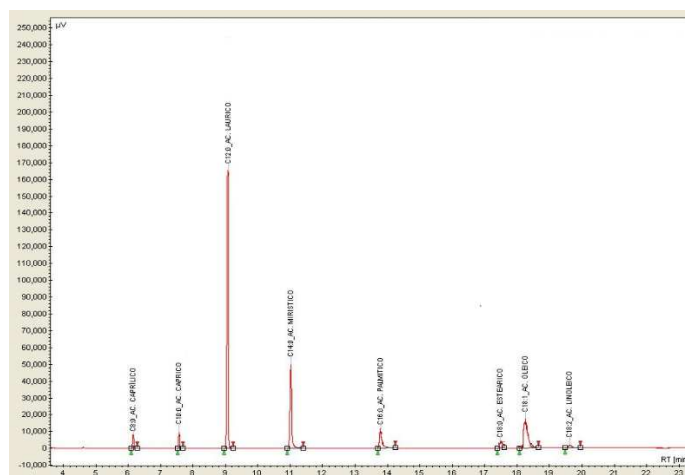
Tabela 5.1 - Propriedades físicas do óleo de palmiste

Propriedades	Valor
Viscosidade cinemática a 40° C	30,35 mm ² /s
Viscosidade dinâmica a 40° C	27,39 cP
Densidade a 40° C	902 Kg/m ³

Fonte: Próprio autor.

Em seguida, o teor em ácido graxo foi analisado por cromatografia gasosa (Figura 5.2) a partir do método de metilação descrito na metodologia.

Figura 5.2 - Cromatograma: Ésteres metílicos obtidos do óleo de palmiste



Fonte: Próprio autor.

Os resultados estão dispostos na forma dos ácidos graxos correspondentes na Tabela 5.2, apresentando maior proporção do ácido láurico (C 12:0), seguido dos ácidos mirístico (C 14:0) e oleico (C 18:1).

Tabela 5.2 - Teor em ácidos graxos presentes no óleo de palmiste

Ácido graxo	Estrutura	(m/m%)
Caprílico	C 8:0	4,84
Cáprico	C 10:0	4,80
Láurico	C 12:0	42,73
Mirístico	C 14:0	18,06
Palmítico	C 16:0	8,49
Esteárico	C 18:0	3,02
Oleico	C 18:1	15,51
Linoleico	C 18:2	2,55

Fonte: Próprio autor.

Os valores obtidos estão dentro das faixas informadas pelo fabricante e confirmam dados descritos na literatura (CERON, 2017), entretanto o resultado pontual das proporções de cada ácido graxo no óleo de palmiste é importante para verificar a conversão de cada ácido graxo em éster.

5.2 Seleção das fontes microbianas de lipase

A imobilização das oito fontes de lipase no suporte híbrido SiO₂-HEC forneceu elevada eficiência (> 60%), demonstrando que o procedimento de imobilização foi efetuado com sucesso, resultando em derivados imobilizados com elevadas atividades hidrolíticas variando na faixa de 750 U/g a 1900 U/g, dependendo da fonte de lipase (Tabela 5.3). Cabe destacar que atividade da lipase G foi medida em meio não aquoso seguindo a esterificação do ácido oleico com etanol (VILAS BÔAS et al., 2018). O teor de umidade dos derivados imobilizados foi inferior a 10% visando reduzir a influência da água no meio reacional.

Para selecionar o derivado imobilizado mais adequado na formação de ésteres a partir da reação de transesterificação óleo de palmiste com álcool etílico, as condições reacionais foram mantidas fixas, incluindo o carregamento catalítico (600 unidades de atividade por grama de meio reacional), razão molar

óleo para álcool de 1: 8 e temperatura (45°C) por 48 h, tomando por base os resultados descritos por Cerón (2017).

As conversões do óleo de palmiste, ao final de 48 horas de reação, foram analisadas por cromatografia em fase gasosa e os resultados são apresentados na Figura 5.3. Observa-se que a transesterificação do material lipídico foi dependente das fontes de lipases testadas, variando entre 5 a 97%.

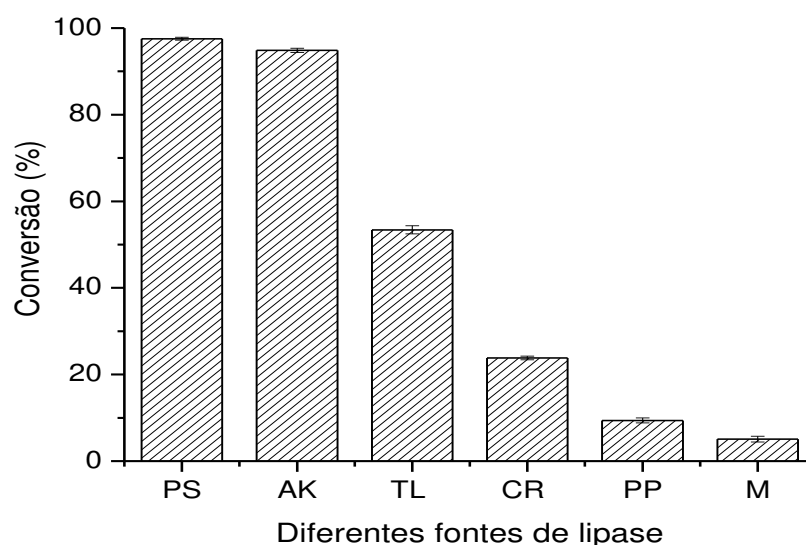
Tabela 5.3 - Atividade hidrolítica e teor de umidade dos derivados imobilizados em SiO₂-HEC.

Fonte de lipases	Sigla	Umidade (%)	Atividade hidrolítica (U/g)
<i>B. cepacia</i>	PS	9,80	1943 ± 46,12
<i>P. fluorescens</i>	AK	4,27	1892 ± 32,71
<i>R. oryzae</i>	L036P	8,41	1801 ± 76,24
<i>P. camembertii</i> *	G	7,40	106 ± 15,58
<i>C. rugosa</i>	CR	4,03	1895 ± 63,98
Pancreática de porco	PP	3,98	924 ± 84,12
<i>M. javanicus</i>	M	4,70	755 ± 50,33
<i>T. lanuginosus</i>	TL	7,90	1505 ± 51,30

Fonte: Próprio autor.

Nota: *atividade de esterificação

Figura 5.3 - Desempenho de lipases imobilizadas em SiO₂-HEC na transesterificação do óleo de palmiste com etanol (48 h de reação; razão molar 1: 8; 45°C)



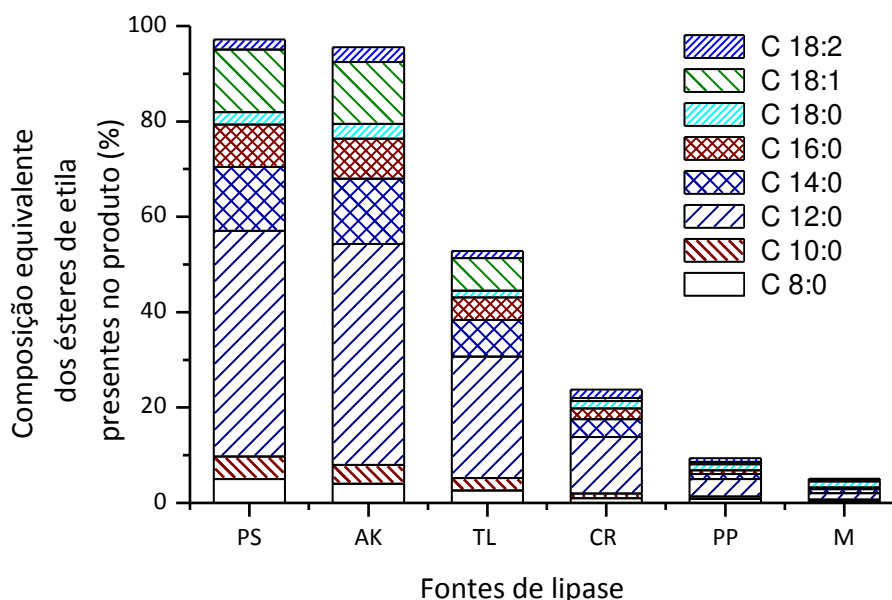
Fonte: Próprio autor

Entre os derivados imobilizados testados, as lipases de *Rhizopus oryzae* (Lipase L036P) e de *Penicillium camembertii* (Lipase G) não demonstraram conversões nas condições reacionais testadas.

As lipases de *Candida rugosa* (lipase CR), pancreática de porco (lipase PP) e *Mucor javanicus* (lipase M) forneceram baixas conversões na transesterificação do óleo de palmiste, sendo $23,8 \pm 0,42\%$, $9,4 \pm 0,55\%$ e $5,1 \pm 0,67\%$, respectivamente. Por outro lado, as lipases PS, AK e TL demonstraram conversões superiores a 50%, correspondendo, respectivamente, em $97,55 \pm 0,33\%$, $94,84 \pm 0,48\%$ e $52,43 \pm 0,95\%$.

Com relação a especificidade de cada lipase para os ácidos graxos presentes no óleo de palmiste, a Figura 5.4 ilustra a composição equivalente dos ésteres de etila formados em cada reação. Os valores obtidos demonstraram correspondência da proporção de ácidos graxos presentes no óleo de palmiste, apresentando maior teor em ésteres láuricos (C 12: 0), seguido por mirístico (C 14:0) e oleico (C 18:1).

Figura 5.4 - Perfil dos ésteres de etila nas amostras de biodiesel obtidas nas reações catalisadas por lipases diferentes fontes imobilizadas (48 h de reação; razão molar 1: 8; 45°C)

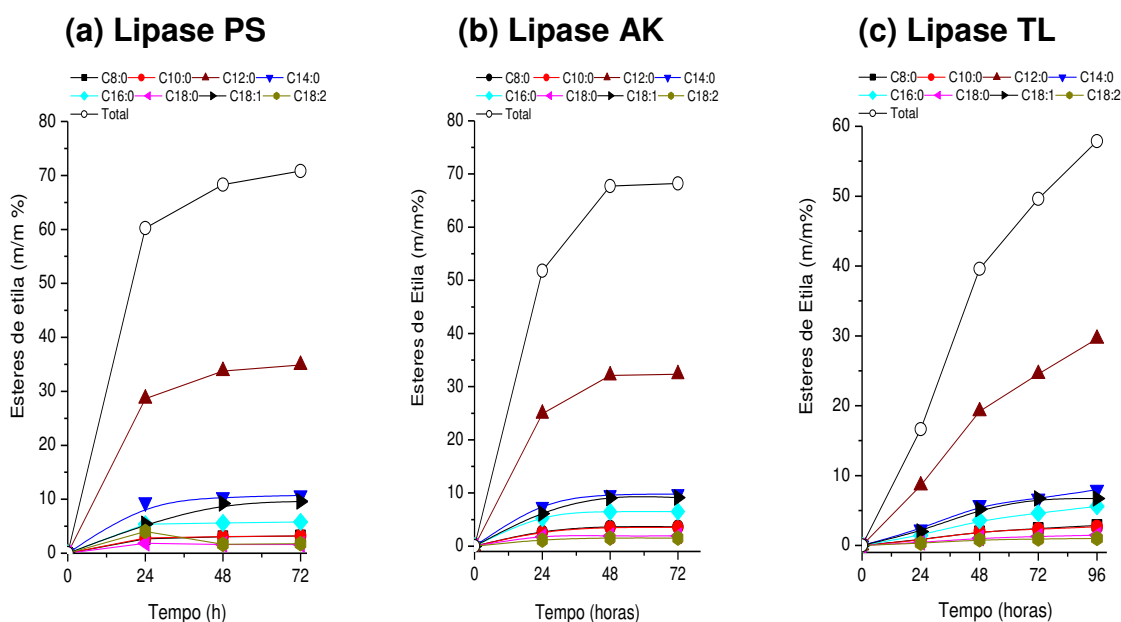


Fonte: Próprio autor.

A partir dos valores das conversões obtidas (Figuras 5.3 e 5.4) foram selecionadas as lipases não específicas de *Burkholderia cepacia* (lipase PS), *Pseudomonas fluorescens* (lipase AK) e lipase 1-3 específica de *Thermomyces lanuginosus* (lipase TL), como potenciais biocatalisadores para produção de biodiesel de maneira isolada e/ou combinada.

Deste modo, as lipases selecionadas foram utilizadas isoladamente ou associadas em ensaios de transesterificação do óleo de palmiste. Para estes testes, o tempo reacional foi prolongado, a fim de atingir conversões próximas a 100%. Como mostra a Figura 5.5, o progresso da formação dos ésteres de etila foi monitorado em intervalos de 24 horas, apresentando o perfil cinético das três enzimas isoladamente, destacando o elevado teor em ésteres obtido nas reações catalisadas para a lipases PS (70,81 m/m%) e AK (68,23 m/m%) em 72 h.

Figura 5.5 - Perfil do progresso de formação dos ésteres de etila a partir da transesterificação do óleo de palmiste em função do tempo catalisada pelas lipases PS(a), AK (b) e TL (c) imobilizadas em SiO₂-HEC.



Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 5.5, verifica-se que os perfis de formação dos ésteres são similares para as três lipases, destacando maior velocidade inicial de reação para as lipases PS e AK, fornecendo conversões do óleo de palmiste nos ésteres correspondentes superiores a 94%. O desempenho diferenciado da lipase TL verificado na formação de ésteres de etila da ordem de $56,83 \pm 0,72$ (m/m%)

correspondendo a conversão de $77,76 \pm 0,87\%$ pode ser atribuído a regioseletividade desta lipase, bem como sua diferente preferência na conversão dos ácidos graxos presentes no óleo de palmiste.

Outro fator que pode ter influenciado no alcance de menor concentração em ésteres, nas reações catalisadas por lipase TL, foi a maior massa de biocatalisador empregada para satisfazer a relação de 600 unidades de atividade. A Tabela 5.4 apresenta as quantidades de cada biocatalisador usado, suas respectivas atividades hidrolíticas e teor em ésteres alcançados após o tempo reacional.

Tabela 5.4 - Teor de éter e quantidade de biocatalisador utilizado na transesterificação do óleo de palmiste em relação à atividade hidrolítica dos derivados imobilizados

Biocatalisadores	Atividade hidrolítica (U/g)	Massa de biocatalisador (g)	Teor de éster (m/m%)
PS*	$1943 \pm 46,12$	4,01	$70,81 \pm 0,68$
AK*	$1892 \pm 32,71$	4,12	$68,23 \pm 0,53$
TL**	$1505 \pm 51,30$	5,18	$56,83 \pm 0,72$

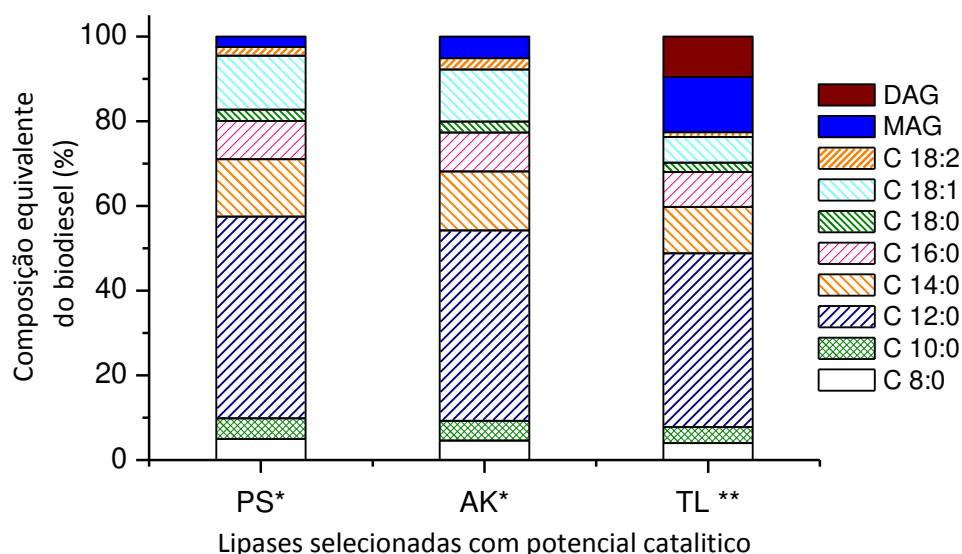
Fonte: Próprio autor.

Nota: *72 horas de tempo reacional;
**96 horas de tempo reacional.

Conforme descrito na metodologia, foram utilizadas quantidades de biocatalisador necessárias para atingir 600 unidades de atividade por grama de óleo, logo, quanto menor a atividade do biocatalisador, maior quantidade em massa deverá ser usada. Ramos et al (2015) descreveram que excesso de biocatalisador na síntese de linoleato de etila reduziu o rendimento da reação, devido a distribuição ineficiente do catalisador no meio reacional, limitando a transferência de massa.

Quanto à qualidade do biodiesel formado, os teores de MAG e DAG foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência e são apresentados na Figura 5.6 na forma de composição equivalente em ésteres juntamente com o teor de acilgliceróis residuais. Entre as três lipases testadas, a lipase PS foi a mais efetiva na produção de biodiesel, apresentando elevado teor em éster, menor teor de MAG (2,34 m/m%) e ausência de DAG.

Figura 5.6 - Perfil da composição equivalente do biodiesel purificado obtido nas reações catalisadas pelas lipases selecionadas



Fonte: Próprio autor.

Nota: *72 horas de tempo reacional;

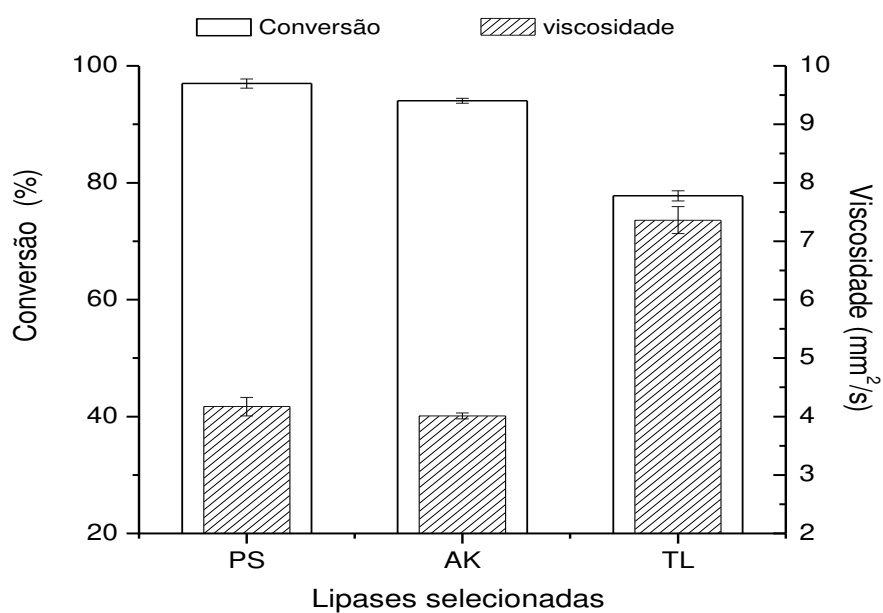
**96 horas de tempo reacional.

Observando a Figura 5.6, pode-se notar que todas as lipases apresentaram formação de ésteres semelhantes, com destaque para a predominância dos ésteres láurico, mirístico e oleico. Entretanto, a lipase TL foi menos efetiva na formação do oleato de etila e linoleato de etila quando comparado aos valores obtidos nas reações catalisadas pelas lipase PS e lipase AK. Os valores mais baixos para estes ésteres sugerem menor afinidade da lipase TL para ácidos graxos de cadeias carbônicas insaturadas (18:1 e 18:2), contribuindo para redução no valor total da conversão. No que diz respeito aos teores residuais de monoacilgliceróis e diacilgliceróis, nenhuma das amostras se enquadraram dentro dos limites estabelecidos pela ANP ($\%MAG < 0,7$ e $\%DAG < 0,2$).

Os valores da viscosidade e conversão são apresentados na Figura 5.7. O conjunto de dados permite avaliar o processo de transesterificação do óleo de palmiste, correlacionando os menores valores de viscosidade para as amostras obtidas com elevadas conversões. Desta forma, confirma-se o bom desempenho alcançado nas reações catalisadas pelas lipases PS e AK, fornecendo valores de viscosidade de 4,17 e 4,01 mm²/s, respectivamente. No entanto, a viscosidade da

amostra obtida na reação catalisada pela lipase TL ($7,36\text{mm}^2/\text{s}$), ultrapassou o valor máximo permitido pela ANP.

Figura 5.7 - Correlação da conversão obtida nas reações catalisadas lipases de *B. cepacia*, *P. fluorescens* e *T. lanuginosus* imobilizadas em $\text{SiO}_2\text{-HEC}$ e viscosidade das amostras purificadas



Fonte: Próprio autor.

Com relação à massa específica, todas as amostras forneceram resultados dentro da especificação ($850\text{-}900\text{ kg/m}^3$). A Tabela 5.5 apresenta o conjunto dos valores apresentados anteriormente.

Tabela 5.5 - Desempenho das lipases de *B. cepacia*, *P. fluorescens* e *T. lanuginosus* imobilizadas em SiO₂-HEC na síntese de biodiesel a partir do óleo de palmiste e etanol em reatores de tanque agitado

Ensaio	Conversão (%)	Teor em éster (m/m%)*	MAG (m/m%)	DAG (m/m%)	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	Massa específica (Kg/m ³)	Produtividade (mmol éster. g biocat/h)
Lipase PS	96,98 ± 0,77	70,81 ± 0,68	2,34 ± 0,12	0	4,17 ± 0,16	871 ± 2	3,91 ± 0,03
Lipase AK	94,03 ± 0,41	68,23 ± 0,53	5,41 ± 0,28	0	4,01 ± 0,05	867 ± 2	3,77 ± 0,02
Lipase TL	77,76 ± 0,87	56,83 ± 0,72	12,63 ± 0,40	9,02 ± 0,34	7,36 ± 0,23	888 ± 5	1,88 ± 0,02

Fonte: Próprio autor.

Nota: *teor de éster analisado das amostras sem purificação % (massa de éster/ massa de meio reacional, valor máximo esperado 74,00 m/m%).

Os resultados obtidos nesta série de experimentos se comparam favoravelmente aos descritos na literatura apresentado por Salis e colaboradores (2007). Oito fontes de lipases imobilizadas em polipropileno macroporoso foram testadas na síntese de biodiesel a partir de óleo de soja e metanol na razão molar de 1:8 (óleo/álcool). Seis das fontes de lipases estudadas (*M. javanicus*, *P. camembertii*, *R. oryzae*, *C. rugosa*, *P. roquefortii* e *A. niger*) não mostraram atividade de transesterificação. Somente as lipases de *P. fluorescens* (Lipase AK) e de *B. cepacia* (Lipase PS) foram capazes de formar ésteres metílicos alcançando teores máximos da ordem de 58% (em 22 h) e 37% (em 48 h), respectivamente.

Desta forma, o conjunto de dados evidencia as lipases PS e AK como as mais efetivas. Mesmo considerando o desempenho inferior alcançado pela lipase TL, esta enzima foi também selecionada para testes posteriores com combinações entre lipases de especificidades diferentes.

5.3 Desempenho da síntese de ésteres catalisada por associação de lipases

No presente tópico, foram realizados os testes para determinar a proporção adequada da lipase PS quando usada em associação com lipases de especificidade igual (lipase AK) e especificidade diferente (lipase TL).

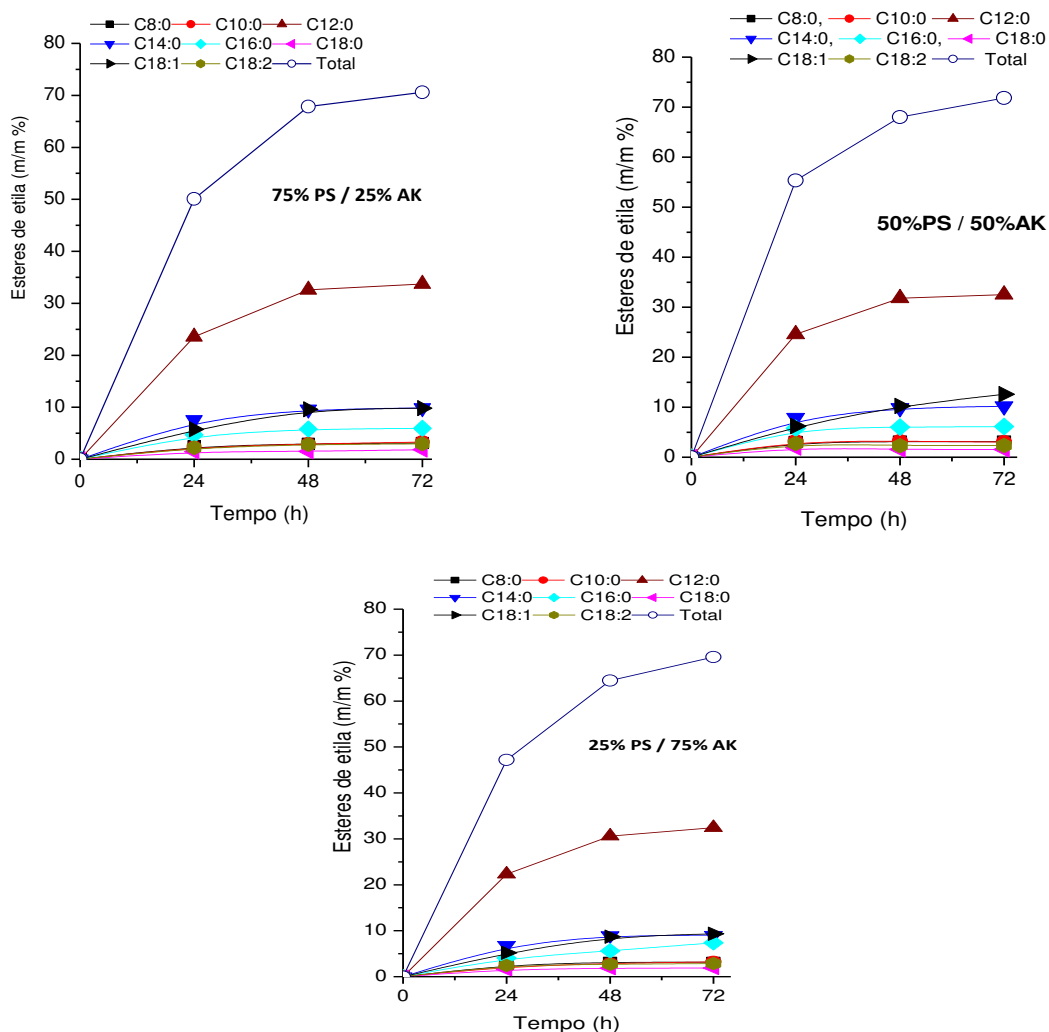
5.3.1 Catálise via par enzimático de mesma especificidade

Conforme observado na Figura 5.5 o perfil de formação dos ésteres para a lipase PS e lipase AK apresenta comportamentos semelhantes, além de serem os dois biocatalisadores que atuando isoladamente forneceram valores de conversão superiores a 94%. Com base nessas informações, foram testadas diferentes proporções das lipases PS e AK para conduzir reações de transesterificação, conforme formulações apresentadas na Tabela 5.6. As reações foram realizadas nas condições anteriormente descritas e o monitoramento do processo efetuado por retiradas amostras em intervalos de 24 horas para quantificação do teor de ésteres formados, conforme ilustrado na Figura 5.5.

Tabela 5.6 - Atividade hidrolítica e umidade das enzimas imobilizadas de mesma especificidade

Proporção entre lipases %PS / % AK	Umidade (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)
75% PS 25% AK	8,40 8,26	1779 ± 32 1350 ± 68
50% PS 50% AK	8,40 8,26	1779 ± 32 1350 ± 68
25% PS 75% AK	8,59 8,19	1671 ± 74 1370 ± 63

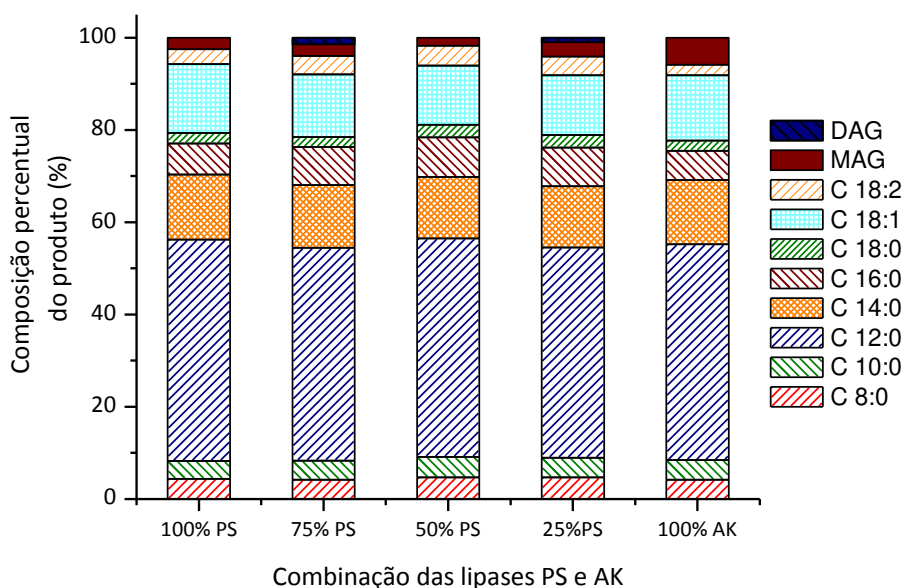
Fonte: Próprio autor.

Figura 5.8 - Perfil do progresso de formação dos ésteres de etila a partir da transesterificação do óleo de palmiste com etanol em função do tempo, catalisada pelo par Lipase PS / Lipase AK imobilizadas em SiO₂-HEC em diferentes proporções

Fonte: Próprio autor.

Os perfis de formação dos ésteres nas reações catalisadas pelo par enzimático PS/ AK apresentaram similaridade com o desempenho isolado das lipases. Quanto à qualidade do biodiesel formado, os teores de MAG e DAG são apresentados na Figura 5.9 juntamente com as concentrações de ésteres de etila. Com baixo teor de MAG (1,74 m/m%) e ausência de DAG, a reação catalisada pela combinação de 50% lipase PS 50% lipase AK foi a mais efetiva na adequação da qualidade do biodiesel formado.

Figura 5.9 - Perfil dos componentes dos produtos obtidos nas reações catalisadas pelas lipases especificidades análogas em diferentes proporções



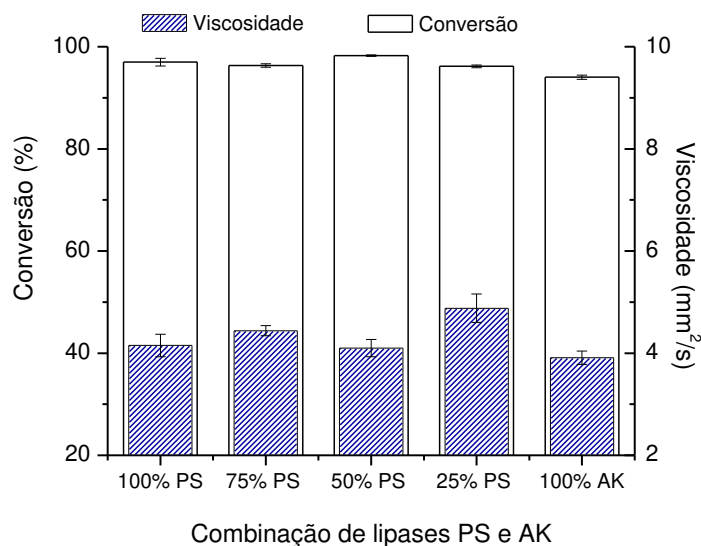
Fonte: Próprio autor.

Verifica-se pela Figura 5.9 que a composição percentual do biodiesel foi dependente da proporção das lipases PS e AK utilizadas nas reações, variando entre 94,03% e 98,26% de ésteres. Quando as lipases foram associadas na menor proporção de PS (25%), o biodiesel formado apresentou 96,17% de conversão; na situação inversa (75% PS), a conversão foi ligeiramente maior (96,32%).

Com relação à comparação da viscosidade e conversão (Figura 5.10) verifica-se que todos os valores das amostras geradas nas reações encontraram-se dentro da faixa limite especificada pela ANP (viscosidade 3,0-6,0 mm²/s) e são consistentes com os valores de conversão obtidos > 96 %. A Tabela 5.7

apresenta o conjunto de valores obtidos nos ensaios efetuados com o par enzimático da mesma especificidade.

Figura 5.10 – Comparação das conversões obtidas nas reações catalisadas pelo par enzimático de mesma especificidade e viscosidade das amostras purificadas



Fonte: Próprio autor.

Para a combinação das lipases na mesma proporção, foi possível evidenciar um aumento discreto na conversão do óleo em ésteres quando comparado aos valores obtidos com as lipases atuando de forma isolada ou combinadas em outras proporções, sugerindo sinergismo favorável quando combinadas em proporções iguais. Além disso, somente a utilização desta proporção das lipases permitiu a obtenção de produto mais puro, i.e.; ausência de DAG e menor teor de MAG (1,74 m/m%).

Tabela 5.7 - Desempenho da combinação em diferentes proporções das lipases de *B. cepacia* e *P. fluorescens* imobilizadas em SiO₂-HEC na síntese de biodiesel a partir do óleo de palmiste e etanol em regime descontínuo

Ensaio	Conversão (%)	Teor em éster (m/m%)*	MAG (m/m%)	DAG (m/m%)	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	Massa específica (Kg/m ³)	Produtividade (mmol éster. g biocat ⁻¹ . h ⁻¹)
75%PS 25%AK	96,32 ± 0,35	70,60 ± 0,44	2,51 ± 0,20	1,13 ± 0,24	4,44 ± 0,10	874 ± 2	3,90 ± 0,23
50%PS 50%AK	98,26 ± 0,16	71,84 ± 0,21	1,74 ± 0,11	0	4,10 ± 0,17	872 ± 2	3,97 ± 0,19
25%PS 75%AK	96,17 ± 0,27	69,58 ± 0,36	3,11 ± 0,32	0,97 ± 0,13	4,88 ± 0,28	875 ± 3	3,85 ± 0,16

Fonte: Próprio autor.

Nota: *teor de éster analisado das amostras sem purificação % (massa de éster/ massa de meio reacional, valor máximo esperado 74,00 m/m%).

5.3.2 Catálise via par enzimático de diferente especificidade

Nesta série de ensaios foi investigado o desempenho da associação de lipases de diferentes especificidades PS e TL, nas combinações descritas na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Proporções das lipases PS e TL na associação das enzimas de diferentes especificidades, atividade hidrolítica e umidade dos derivados imobilizados

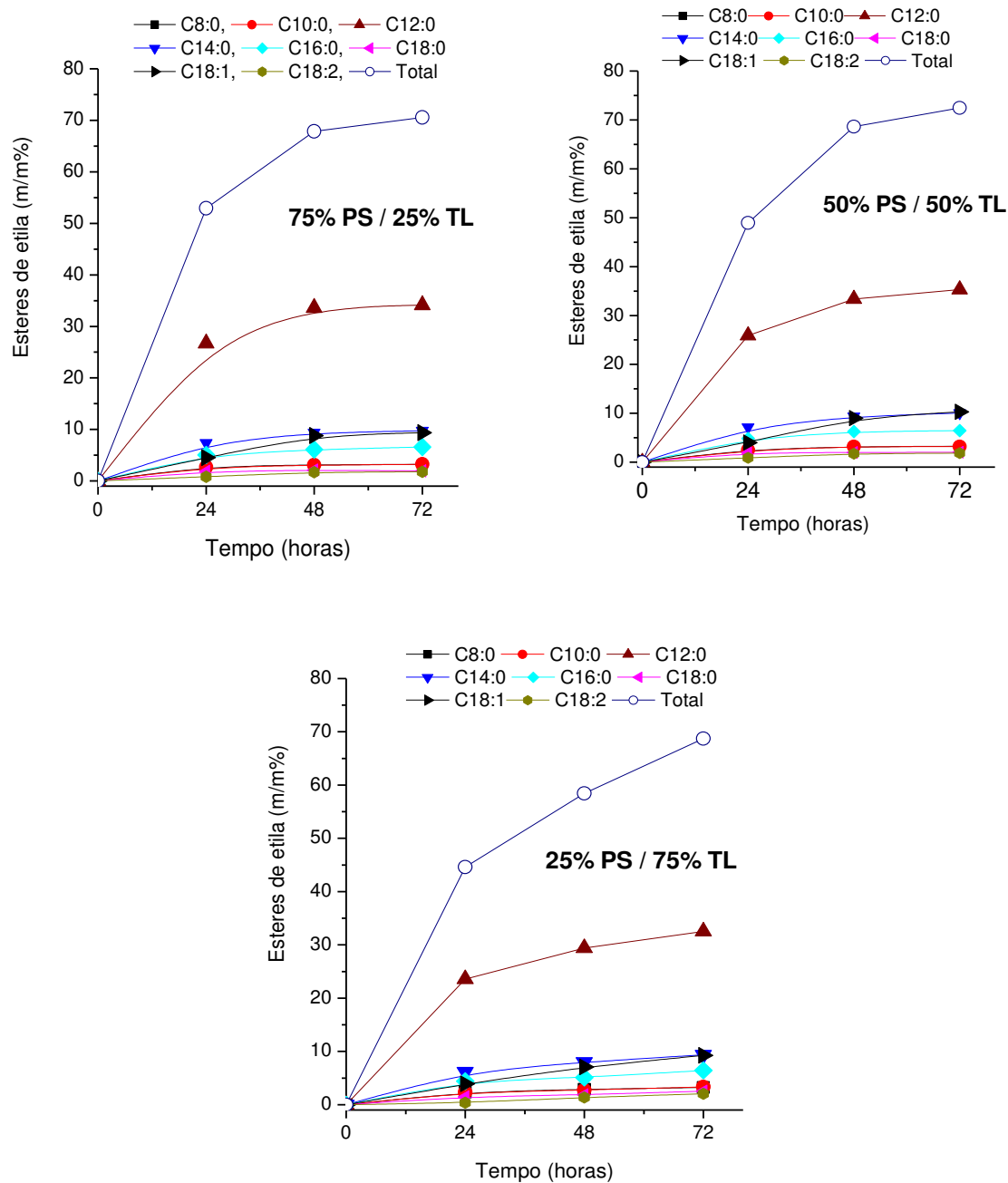
Proporção entre lipases %PS / % TL	Umidade (%)	Atividade Hidrolítica (U/g)
75% PS	7,2	1901 ± 53
25% TL	8,0	1504 ± 34
50% PS	5,3	1773 ± 27
50% TL	7,5	1692 ± 11
25% PS	5,3	1773 ± 27
75% TL	7,5	1692 ± 11

Fonte: Próprio autor.

A partir das formulações apresentadas na Tabela 5.8, as reações de transesterificação foram efetuadas nas mesmas condições operacionais e monitoradas pela retirada de amostras em intervalos de 24 horas para quantificação do teor de ésteres formados, conforme ilustrado na Figura 5.11.

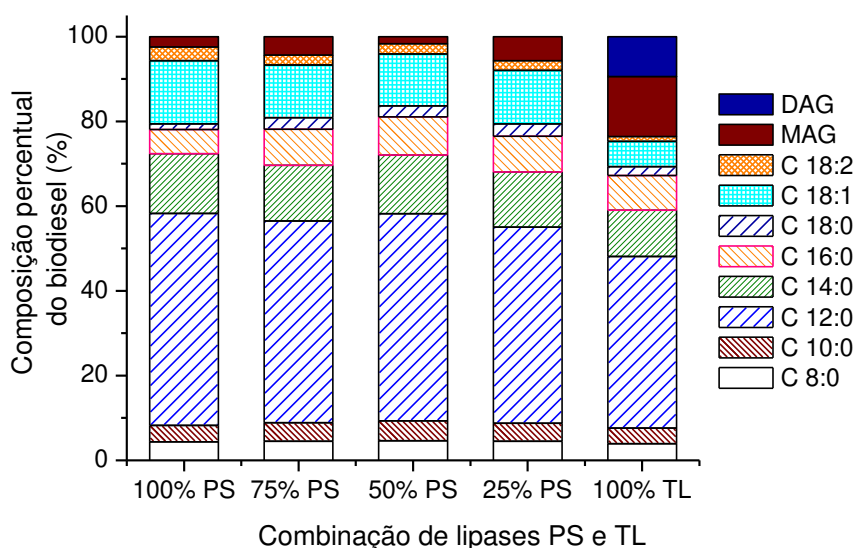
Os perfis de formação dos ésteres de etila foram similares para todas as associações testadas com as lipases PS e lipase TL. Quanto à qualidade do biodiesel formado, os teores de MAG e DAG são apresentados na Figura 5.12 na forma de composição equivalente em ésteres juntamente ao teor de acilgliceróis residuais. Com baixo teor de MAG (1,68 m/m%) e ausência de DAG, a reação catalisada pela combinação de 50% lipase PS 50% lipase TL foi a mais efetiva na adequação da qualidade do biodiesel formado.

Figura 5.11 - Perfil do progresso de formação dos ésteres de etila a partir da transesterificação do óleo de palmiste com etanol em função do tempo, catalisada pela combinação Lipase PS/ Lipase TL imobilizadas em SiO_2 -HEC em diferentes proporções



Fonte: Próprio autor.

Figura 5.12 - Composição percentual das amostras de biodiesel obtidas nas reações mediadas pela associação de lipases de diferentes especificidades



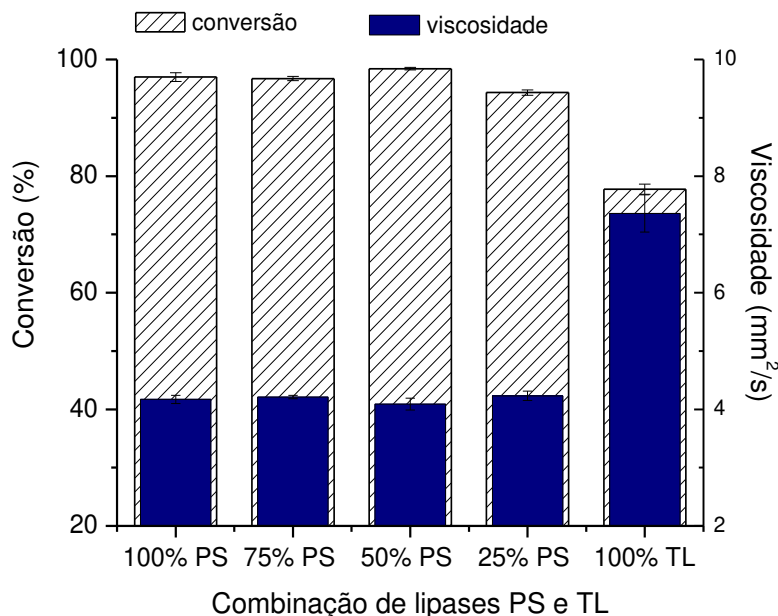
Fonte: Próprio autor.

Verifica-se na Figura 5.12 que a composição percentual do biodiesel foi também dependente da proporção das lipases, variando entre 76,46% a 98,42% de conversão. A atuação das lipases associadas na menor proporção de PS (25%) produziu um biodiesel composto por 94,33% em ésteres; enquanto a situação inversa (75% PS) favoreceu a obtenção de ésteres mais concentrados (96,73%).

Para a combinação de lipases de mesma proporção, foi verificado sinergismo da atuação das lipases revelando incremento no teor de éster quando comparado aos valores obtidos isoladamente. Entretanto, os teores residuais de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) nas amostras de biodiesel ainda ultrapassam os limites máximos permitidos na legislação brasileira (MAG + DAG \leq 0,9%).

Os valores de viscosidade e conversão são apresentados na Figura 5.13. Verifica-se que todos os valores das amostras geradas nas reações encontraram-se dentro da faixa limite especificada pela ANP (viscosidade 3,0-6,0 mm²/s).

Figura 5.13 - Comparação das conversões obtidas nas reações catalisadas pelo par enzimático de diferente especificidade e viscosidade das amostras purificadas



Fonte: Próprio autor.

A Tabela 5.9 apresenta o conjunto de valores obtidos nesta série de experimentos, destacando o baixo valor de MAG (1,68%) no produto purificado das reações conduzidas pela associação das lipases PS e TL em iguais proporções. Este valor apesar de estar acima do limite requerido pela ANP foi o menor valor obtido quando comparado aos resultados obtidos em todos os ensaios conduzidos em sistema descontínuo, independente da proporção das lipases testadas, tanto em combinações de lipases de especificidades análogas ou diferentes especificidades. Em função do elevado teor em ésteres, esta particular combinação de lipases 50% PS/ 50% TL, proporcionou também o maior valor em produtividade volumétrica ($4,00 \pm 0,11 \text{ mmol ésteres} \cdot \text{g}_{\text{biocat}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Com base nestes resultados, a combinação das lipases PS e TL, na proporção de 50% cada, foi selecionada como biocatalisador para desenvolver os ensaios de produção de biodiesel em sistema contínuo.

Tabela 5.9 - Desempenho da combinação das lipases de *B. cepacia* e *T. lanuginosus* imobilizadas em SiO₂-HEC aplicada na síntese de biodiesel a partir do óleo de palmiste e etanol em regime descontínuo.

Ensaio	Conversão (%)	Teor em éster (m/m%)*	MAG (m/m%)	DAG (m/m%)	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	Massa específica (Kg/m ³)	Produtividade (mmol de éster. g biocatalisador ⁻¹ . h ⁻¹)
75%PS 25%TL	96,73 ± 0,38	70,57 ± 0,42	4,32 ± 0,10	0	4,21 ± 0,03	872 ± 2	3,90 ± 0,18
50%PS 50%TL	98,42 ± 0,22	72,45 ± 0,20	1,68 ± 0,14	0	4,09 ± 0,1	869 ± 2	4,00 ± 0,11
25%PS 75%TL	94,33 ± 0,46	68,72 ± 0,39	5,67 ± 0,33	0	4,23 ± 0,08	870 ± 2	3,80 ± 0,17

Fonte: Próprio autor.

Nota: *teor de éster analisado das amostras sem purificação % (massa de éster/ massa de meio reacional, valor máximo esperado 74,00 m/m%).

5.4 Desempenho da síntese de ésteres catalisada por associação de lipases em regime contínuo

Nesta etapa, foram utilizadas as lipases de *B. cepacia* e de *T. lanuginosus* imobilizadas em SiO₂-HEC. A montagem experimental foi baseada nos trabalhos publicados por Ramos L. et al (2017) e Wang et al (2011) referentes ao uso de reatores de leito fixo em série visando melhorar a qualidade do produto formado. Deste modo, a montagem do sistema reacional foi efetuada com duas colunas em série, sendo a primeira empacotada com 20 g de lipase de *B. cepacia*, e a segunda empacotada com 20 g de lipase de *T. lanuginosus*. A estratégia proposta visou reduzir ao máximo o teor de TAG, convertendo em MAG, DAG e ésteres na primeira coluna pela atuação da lipase PS e dar prosseguimento a etapa de conversão dos acilgliceróis residuais em ésteres de etila, no segundo estágio pela atuação da lipase TL. A Figura 5.14 ilustra o sistema reacional proposto em fase de operação.

Figura 5.14 - Sistema reacional de duplo estágio utilizado nas reações de transesterificação do óleo de palmiste em regime contínuo



Fonte: Próprio autor.

Como parâmetros auxiliares para análise dos resultados, foram determinadas as densidades dos biocatalisadores, bem como efetuada a calibração da bomba peristáltica utilizada na alimentação do biorreator. O

bombeamento do meio reacional foi mantido em fluxo ascendente, à temperatura constante de 45 °C.

5.4.1 Determinação da densidade dos biocatalisadores

A densidade dos biocatalisadores foi determinada, conforme descrita na metodologia. O derivado imobilizado da lipase *B. cepacia* obteve valor de $1,802 \pm 0,004 \text{ g.cm}^3$, enquanto o derivado imobilizado da lipase *T. lanuginosus* obteve valor de $1,806 \pm 0,002 \text{ g.cm}^3$. Os valores de densidade mostraram-se de acordo com os resultados obtidos anteriormente (RAMOS L et al., 2017; SIMÕES et al. 2015).

5.4.2 Calibração da bomba peristáltica

Para verificar a influência do tempo espacial em relação à conversão do óleo de palmiste em ésteres de etila foram testados dois tempos espaciais 14 e 16 h. O monitoramento do processo foi realizado diariamente por um período de 21 a 29 dias, sendo aferida e ajustada a vazão para garantir a estabilidade do processo.

A calibração da bomba peristáltica foi ajustada utilizando a rotação do motor da bomba até atingir as vazões (v_0) correspondentes aos tempos espaciais. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.10, sendo calculado o tempo espacial de acordo com a metodologia descrita no item 4.5.2.

Tabela 5.10 – Ajuste da vazão da bomba peristáltica

Volume do conjunto de reatores (mL)	Massa de biocatalisador (g)	Volume do biocatalisador (mL)	Volume útil do conjunto de reatores (mL)
64	40	22,16	41,84
	τ (h)		v_0 (mL.h ⁻¹)
	16		2,62
	14		3,0

Fonte: Próprio autor.

5.4.3 Influencia da razão molar e tempo espacial na síntese de ésteres de etila em sistema contínuo de duplo estágio

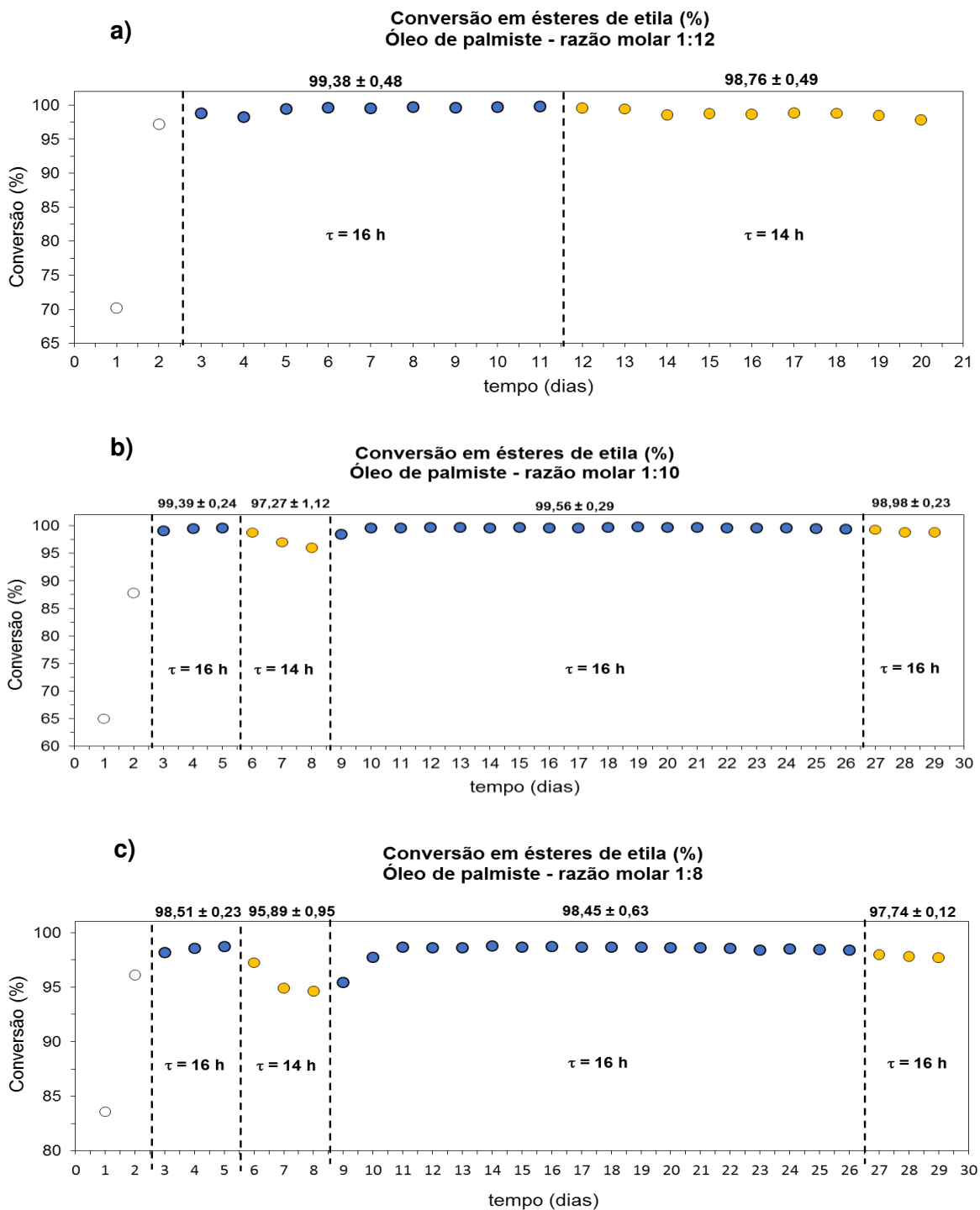
Tomando por base os resultados satisfatórios obtidos anteriormente (RAMOS L et al., 2017; CERON, 2017) utilizando a lipase PS imobilizada em suporte híbrido, foram selecionadas razões molares de óleo: álcool etílico nas proporções de 1:12, 1:10 e 1:8 para alimentação do reator em dois estágios em fluxos de 3,0 e 2,62 mL/h correspondendo a tempos espaciais de 14 e 16 h, respectivamente. Os resultados são apresentados na Figura 5.15 a-c, correlacionando a influencia do tempo espacial na conversão global obtida na saída do segundo reator, para cada substrato testado.

Analisando inicialmente os resultados obtidos utilizando meio reacional na razão molar de 1:12 (Figura 5.15a) e tempo espacial de 16h, verifica-se que o estado estacionário foi alcançado em 3 tempos espaciais (48h), sendo possível manter conversões elevadas da ordem de $99,38 \pm 0,48\%$ por 11 dias consecutivos. Ajustando o fluxo para 14 h de tempo espacial, foi constatada pequena redução na conversão para valores médios de $98,76 \pm 0,49\%$, com manutenção estável da formação de ésteres por 10 dias adicionais de operação do reator.

Para razões molares de 1:10 e 1:8 (Figuras 5.15 b, c), em fluxo correspondente a 16 h de tempo espacial, as conversões alcançadas foram também elevadas, respectivamente de $99,56 \pm 0,29\%$ e $98,45 \pm 0,63\%$, com manutenção de estabilidade operacional ao longo de 21 dias consecutivos. O período em que o biorreator foi operado em fluxo mais elevado (3 mL/h), as conversões diminuíram tanto para meio na razão molar de 1:10 ($97,27 \pm 1,12\%$) quanto para a razão molar de 1: 8 ($95,89 \pm 0,95\%$).

Desta forma, verifica-se que em todas as condições testadas (substratos preparados em três razões molares e alimentados em dois tempos espaciais), as concentrações dos ésteres formados alcançaram valores superiores ao mínimo exigido pela ANP (96,5%) para uso como combustível.

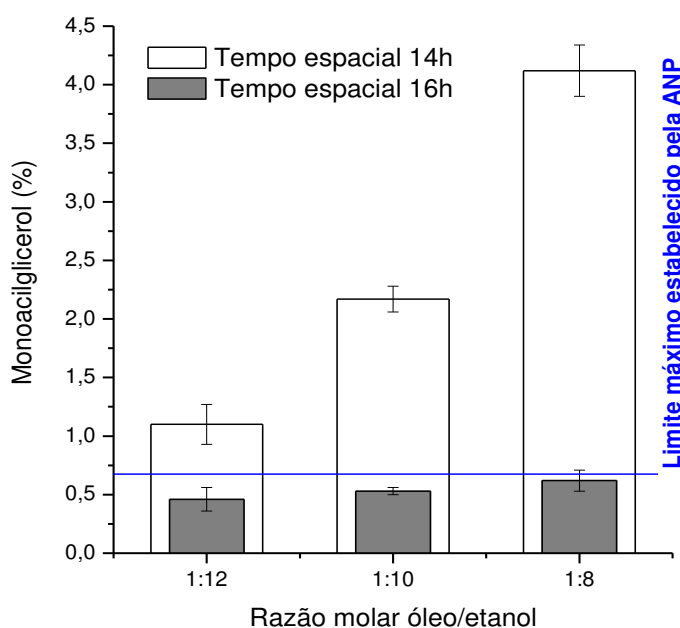
Figura 5.15 - Transesterificação do óleo de palmiste em regime contínuo de duplo estágio com álcool etílico em diferentes tempos espaciais (●16h e ●14h) e razões molares (1: 12, 1:10 e 1:8) catalisadas pela lipase de *B. cepacia* e *T. lanuginosus* imobilizadas em SiO₂-HEC.



Fonte: Próprio autor.

Entretanto, apesar da similaridade nas concentrações de ésteres obtidas nos tempos espaciais de 16 e 14 horas, a utilização de fluxo mais elevado (3,0 mL/h; 14 h tempo espacial) afetou a qualidade do produto em termos de teores residuais de acilgliceróis, conforme verificado pela quantificação de monoacilgliceróis e diacilgliceróis nas amostras purificadas. A Figura 5.16 exibe o teor residual de monoacilgliceróis de acordo com o tempo espacial para as três razões molares estudadas. É importante destacar que embora os valores de MAG tenham sofrido alterações em função da razão molar e tempo espacial, os teores de DAG foram nulos em todas as condições ensaiadas.

Figura 5.16 - Influência do tempo espacial no teor de MAG residual na reação de transesterificação do óleo de palmiste conduzida em diferentes razões molares.



Fonte: Próprio autor.

Independente da razão molar, os valores de MAG que atendem ao limite máximo estabelecido pela ANP (0,7%) foram obtidos para o tempo espacial de 16 h. A composição de MAG era formada aproximadamente de monopalmitina (82%) e de monomiristina (18%) para todas as razões molares testadas. No entanto, para o tempo espacial de 14 horas, o teor de MAG variou tanto na composição percentual quanto em concentração. Quanto relação a composição, além de monopalmitina com contribuição média de 72% e monomiristina com

25%, ainda foram detectadas a presença de 3 % de monolaurina. Com relação a concentração total de MAG, em todas as razões molares foram quantificados teores superiores ao limite máximo estabelecido pela ANP. O menor valor de MAG foi obtido no ensaio conduzido com substrato na razão molar 1:12 ($1,07 \pm 0,20\%$), sendo observado aumento do teor de MAG a medida que o excesso de álcool era reduzido no substrato, ou seja para razão molar 1:10 (MGA= $2,21 \pm 0,11\%$) e para razão molar 1:8 (MGA= $4,14 \pm 0,12\%$).

A influência do teor de álcool na atuação da lipase de *B. cepacia* (primeira coluna) para o tempo espacial de 16 horas foi também avaliada. Conforme dados apresentados na Tabela 5.11, o maior valor de conversão na saída da primeira coluna foi obtido para a razão molar de 1:8, com valores de $89,01 \pm 0,71\%$ de conversão, além de apresentar o maior teor de éster ($65,60 \pm 0,31$ m/m%), baixo teor de DAG ($0,83 \pm 0,45$ m/m%) e o menor teor de MAG ($9,84 \pm 0,42$ m/m%).

Tabela 5.11 - Influência da razão molar no desempenho do primeiro estágio do sistema contínuo na transesterificação do óleo de palmiste em ésteres de etila para tempo espacial de 16 horas, utilizando lipase PS imobilizada.

Razão Molar	Conversão (%)	Teor de éster (m/m%) *	MAG (m/m%)	DAG (m/m%)	Viscosidade cinemática (mm ² /s)
1: 12	$81,27 \pm 0,61$	$50,50 \pm 0,24$	$15,66 \pm 0,43$	$3,07 \pm 0,27$	$5,61 \pm 0,11$
1: 10	$84,55 \pm 0,52$	$56,75 \pm 0,28$	$13,69 \pm 0,37$	$1,76 \pm 0,65$	$5,48 \pm 0,08$
1: 8	$89,01 \pm 0,74$	$65,60 \pm 0,31$	$9,84 \pm 0,42$	$0,83 \pm 0,45$	$4,76 \pm 0,03$

Fonte: Próprio autor.

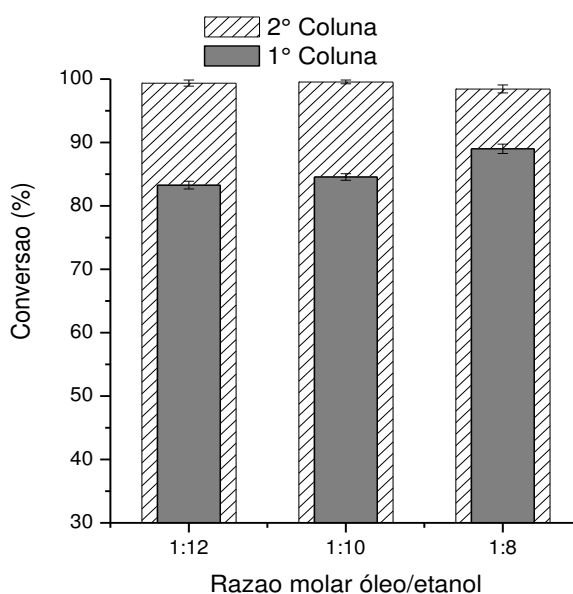
Nota: * teor de éster analisado das amostras sem purificação % (massa de éster/ massa de meio reacional, valor máximo esperado de 63,10% para razão molar de 1:12, 68,11% para razão molar de 1: 10 e 74,00 m/m% para razão molar de 1: 8).

De acordo com Salis et al (2005), elevado excesso de álcool no substrato pode inibir e/ou diminuir a atividade catalítica das lipases, devido ao aumento da polaridade do meio, possibilitando a remoção da camada de água essencial ao sítio ativo das enzimas, provocando a inativação. Este efeito inibitório do álcool pode ser visualizado na Figura 5.17, destacando o crescente aumento da

conversão óleo em ésteres à medida que a proporção molar de etanol foi reduzida no meio de alimentação.

A Figura 5.17 ilustra ainda elevadas conversões na saída do produto da segunda coluna para as razões molares de 1:12 e 1:10 e menor conversão para meio reacional na razão molar de 1:8. Esse comportamento distinto pode ser relacionado em parte pela diferente ação catalítica das lipases PS e TL. Enquanto a lipase de *B. cepacia* apresentou melhor eficiência na conversão do óleo de palmiste em meio reacional com baixo excesso de álcool, a lipase de *T. lanuginosus* demonstrou melhor eficiência na conversão dos acilgliceróis residuais quando o nível de álcool foi mais elevado. Esses resultados são similares aos descritos por Dantas et al. (2013), que reportaram conversões dos triacilgliceróis mais elevadas para substratos contendo menor excesso de álcool utilizando a lipase de *B. cepacia*.

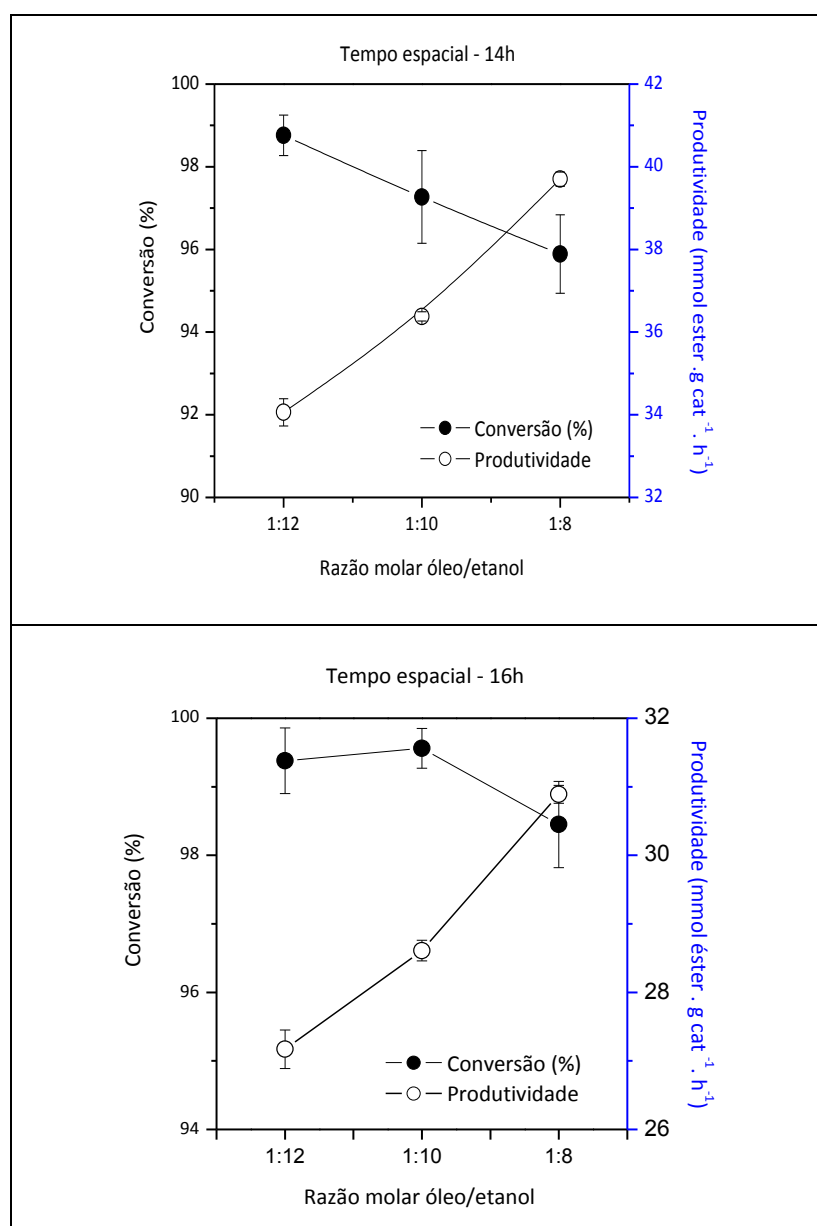
Figura 5.17 - Influência do excesso de álcool na atuação das lipases imobilizadas de *B. cepacia* e *T. lanuginosus* em 16h na conversão do óleo de palmiste em ésteres de etila



Fonte: Próprio autor.

Considerando os parâmetros produtividade e conversão (Figura 5.18), verifica-se que produtividades mais elevadas foram obtidas para tempo espacial de 14 h, entretanto nesta condição menores conversões dos triacilgliceróis foram alcançadas, independente da razão molar.

Figura 5.18 - Correlação das conversões e produtividades em função das razões molares em diferentes tempos espaciais na transesterificação do óleo de palmiste com etanol em reator duplo estágio operando em fluxo contínuo



Fonte: Próprio autor.

Analisando os critérios de qualidade do biodiesel formado e valores de produtividade, a melhor condição de transesterificação do óleo de palmiste (Figura 5.18 b) foi obtida para substratos na razão molar de 1:8 operando num tempo espacial de 16 horas, proporcionando $98,45 \pm 0,63\%$ de conversão, $0,62 \pm 0,07\%$ de MAG, ausência de DAG; densidade de $870 \pm 2 \text{ kg/m}^3$; viscosidade cinemática de $4,22 \pm 0,03 \text{ mm}^2/\text{s}$ e produtividade de $30,90 \pm 0,13 \text{ mmol ésteres. g catalisador}^{-1}.\text{h}^{-1}$, (Tabela 5.12).

A análise comparativa entre os sistemas de produção de biodiesel em condições equivalentes de razão molar (1:8) forneceram produtos contendo $1,68 \pm 0,14$ e $0,62 \pm 0,07\%$ em MAG para o sistema descontínuo (Tabela 5.9) e contínuo (Tabela 5.12) respectivamente. Desta forma, verifica-se que o biorreator em dois estágios proporcionou melhor sinergismo das lipases PS e TL, fornecendo produto que atende os limites requeridos pela ANP para uso como combustível. Além disso, destaca-se a vantagem na produtividade para o sistema de duplo estágio, sendo aproximadamente 7 vezes superior ($30,90 \pm 0,13 \text{ mmol ésteres. g catalisador}^{-1}.\text{h}^{-1}$) aos valores obtidos em regime descontínuo ($4,00 \pm 0,11 \text{ mmol ésteres. g biocatalisador}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Tabela 5.12 - Desempenho da associação das lipases de *B. cepacia* e *T. lanuginosus* imobilizadas em SiO₂-HEC na transesterificação do óleo de palmiste com etanol em reator de leito fixo duplo estágio em fluxo contínuo utilizando substrato em diferentes razões molares (1: 12 ; 1: 10 e 1: 8) para tempos espaciais de 16 e 14 horas.

Razão Molar	Tempo espacial (horas)	Conversão (%)	Teor de éteres (m/m%)*	MAG (m/m%)	Viscosidade cinemática (mm ² /s)	Massa específica (kg/m ³)	Produtividade (mmol éster/ g biocat/ h)
1: 12	16	99,38 ± 0,48	63,55 ± 0,32	0,47 ± 0,06	3,99 ± 0,02	869 ± 5	27,17 ± 0,28
	14	98,76 ± 0,49	60,62 ± 0,21	1,07 ± 0,20	4,10 ± 0,05	871 ± 3	34,06 ± 0,33
1: 10	16	99,56 ± 0,29	66,84 ± 0,43	0,53 ± 0,03	4,01 ± 0,01	870 ± 1	28,61 ± 0,15
	14	97,27 ± 1,12	64,50 ± 0,24	2,21 ± 0,11	4,31 ± 0,04	874 ± 2	36,38 ± 0,11
1: 8	16	98,45 ± 0,63	72,17 ± 0,29	0,62 ± 0,07	4,22 ± 0,03	870 ± 2	30,90 ± 0,13
	14	95,89 ± 0,95	70,26 ± 0,37	4,14 ± 0,12	4,47 ± 0,05	876 ± 4	39,70 ± 0,17

Fonte: Próprio autor.

Nota: * teor de éster analisado das amostras sem purificação % (massa de éster/ massa de meio reacional, valor máximo esperado de 63,10% para razão molar de 1:12; 68,11% para razão molar de 1: 10 e 74,00 m/m% para razão molar de 1: 8).

5.5 Estabilidade operacional das lipases

Os valores da atividade inicial e final dos biocatalisadores empregados em reator de duplo estágio operando em fluxo contínuo alimentado com substratos contendo diferentes razões molares foram utilizados para calcular o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) das lipases PS e TL imobilizadas em SiO_2 -HEC. É importante destacar que a lipase PS foi usada no empacotamento do primeiro estágio e a lipase TL no empacotamento da coluna no segundo estágio. Para a realização dos cálculos, as equações apresentadas na metodologia foram utilizadas e os resultados são apresentados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Tempo de meia-vida dos biocatalisadores em diferentes razões molares utilizadas na transesterificação do óleo de palmiste com etanol em fluxo contínuo

Razão Molar	Lipase PS		Lipase TL	
	Kd (dias ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dias)	Kd (dias ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dias)
1: 12	$0,0403 \pm 0,24 \cdot 10^{-3}$	$17,18 \pm 0,95$	$0,0267 \pm 0,75 \cdot 10^{-3}$	$25,95 \pm 0,32$
1: 10	$0,0258 \pm 0,75 \cdot 10^{-3}$	$26,78 \pm 0,83$	$0,0276 \pm 0,88 \cdot 10^{-3}$	$27,24 \pm 0,68$
1: 8	$0,0214 \pm 0,81 \cdot 10^{-3}$	$32,26 \pm 0,76$	$0,0254 \pm 0,20 \cdot 10^{-3}$	$26,30 \pm 0,30$

Fonte: Próprio autor.

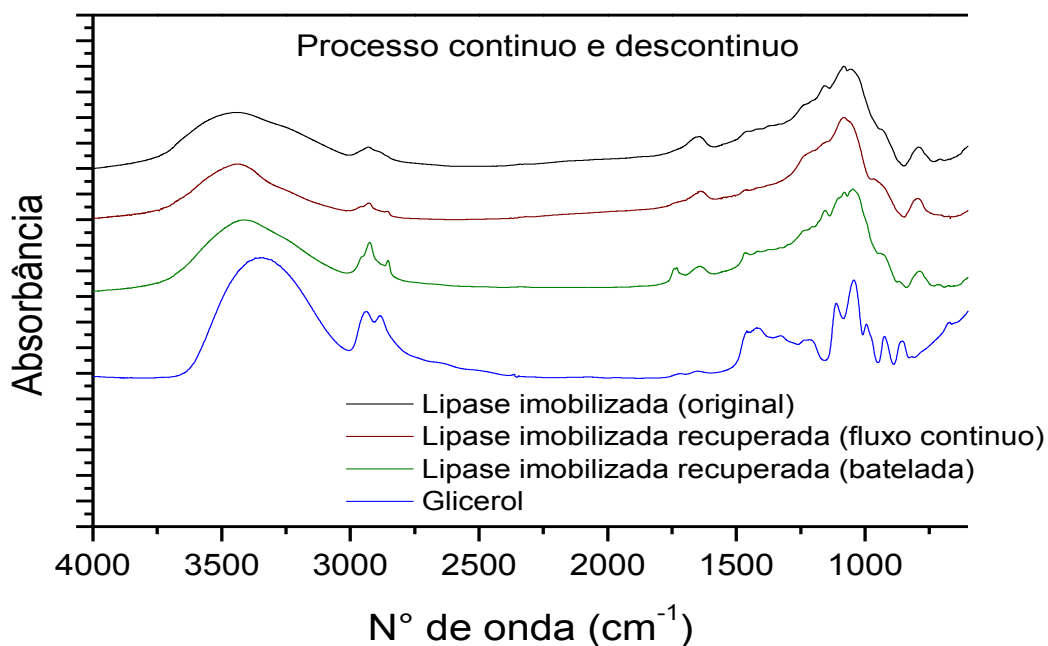
O teor de álcool apresentou maior efeito sobre a constante de desativação e o tempo de meia-vida da lipase PS, sendo possível correlacionar que menor excesso de etanol favorece a estabilidade operacional desta lipase. Os resultados obtidos são similares aos valores obtidos por Ramos L et al. (2017) e Costa-Silva et al. (2014).

A lipase de *T. lanuginosus*, nas mesmas condições de razões molares, não apresentou diferenças marcantes entre as constantes de desativação e os tempos de meia-vida. Esses resultados demonstram pouca sensibilidade à desativação da atividade catalítica pelo efeito do álcool etílico. Entretanto, a lipase TL revelou menor tempo de meia-vida em relação a lipase PS. Os resultados obtidos são similares aos descritos por Dantas et al (2013), que reportaram que variações da proporção de álcool na transesterificação do óleo de canola não apresentaram diferenças na atuação catalítica da lipase TL.

5.6 Afinidade do sistema imobilizado na adsorção do glicerol formado como subproduto

O derivado imobilizado de *B. cepacia* utilizado nos ensaios em sistema descontínuo e contínuo foi analisado por espectroscopia na região do infravermelho, visando verificar a afinidade do sistema imobilizado em SiO₂-HEC. Os espectros obtidos da amostra original da lipase imobilizada e das lipases recuperadas são apresentados na Figura 5.19, juntamente com o espectro de glicerol.

Figura 5.19 – Infravermelho dos biocatalisadores (original e recuperados) da transesterificação do óleo de palmiste com etanol em processos conduzidos em sistema descontínuo e contínuo



Fonte: Próprio autor.

Os grupamentos amino primários, característicos das lipases, são ilustrados na Figura 5.19 com o pico na região de 1640 cm⁻¹, presentes no derivado imobilizado original e nos derivados imobilizados recuperados tanto do sistema descontínuo quanto contínuo, confirmando a eficiência da imobilização em reter a enzima no suporte.

Todos os espectros apresentaram banda na região de 3400 cm⁻¹. Essas bandas são atribuídas ao grupo hidroxila (-OH) presente na composição do

suporte e na estrutura química do glicerol. Além disso, picos na região de 2980 cm^{-1} evidenciam as deformações de grupos simétricos de $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ (MARTIN et al., 2018).

O espectro referente ao biocatalisador original apresenta somente um pico na região de 2980 cm^{-1} , causado pela deformação do grupo simétrico de $-\text{CH}_3$. No entanto, o aumento na intensidade e o surgimento do segundo pico nos espectros dos biocatalisadores recuperados são causados pela deformação simétrica do grupamento $-\text{CH}_2$, pertencente ao glicerol formado e adsorvido no suporte.

A adsorção do glicerol na superfície do biocatalisador limita a atuação das enzimas para transesterificar o óleo vegetal, afetando a qualidade do biodiesel formado. Como anteriormente reportado no presente trabalho, o biodiesel formado pelo sistema contínuo apresentou elevado teor em ésteres e baixo teor em acilgliceróis residuais, enquanto no sistema descontínuo, os teores de MAG ultrapassaram o limite máximo permitido pela ANP. Esse comportamento pode ser correlacionado com a adsorção do glicerol na superfície da enzima imobilizada reduzindo a atuação da lipase que foi mais intensa nas reações conduzidas em regime descontínuo.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema eficiente para a produção enzimática de biodiesel pela rota etílica, apresentado como proposta a transesterificação do óleo palmiste com etanol mediante atuação de combi-lipases. Testes de seleção das lipases mais efetivas foram efetuados com lipases de diferentes fontes (*Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Thermomyces lanuginosus*, *Candida rugosa*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Penicillium camembert* e pâncreas de porco) imobilizadas em SiO₂-HEC em reações conduzidas em reator de tanque agitado. O conjunto de experimentos realizados permitiu selecionar lipases não específicas e específicas para compor a formulação de biocatalisador com propriedades aprimoradas para efetuar as reações de transesterificação do óleo de palmiste com etanol em reatores operando em regime descontínuo e contínuo. Os resultados alcançados demonstraram que:

- a) As lipases de *Candida rugosa*, *Mucor javanicus* e lipase pancreática forneceram baixas conversões (<24%), enquanto as lipases G e L036P, não apresentaram atividade de transesterificação nas condições testadas, somente as lipases de *B. cepacia*, *P. fluorescens* e *T. lanuginosus* apresentaram maior afinidade pelo substrato resultando em elevadas conversões do óleo em ésteres.
- b) As lipases de *B. cepacia*, *P. fluorescens* e *T. lanuginosus* foram combinadas em diferentes proporções formando pares enzimáticos de especificidades análogas e diferentes especificidades.
- c) A combinação das lipases *B. cepacia* e *P. fluorescens* como par enzimático de especificidades análogas, em proporções iguais, forneceu teores de ésteres superiores a 98% e baixos teores residuais de glicerídeos (MAG+DAG=1,74%). Quando comparado aos valores obtidos isoladamente de cada lipase, a associação revelou ser mais efetiva para redução dos teores residuais de MAG+DAG.

- d) A combinação enzimática de lipases *B. cepacia* e *T. lanuginosus* como par enzimático de especificidades diferentes, em sua melhor efetividade (50% PS/ 50% TL), forneceu elevados teores em ésteres (98,42%) e baixo teor de MAG+DAG (1,68%). Quando comparado aos valores obtidos isoladamente, a combinação demonstrou ser mais efetiva, além de apresentar maior sinergismo entre as lipases quando comparado à combinação enzimática de especificidade análoga (50% PS / 50% AK),
- e) O sistema contínuo de duplo estágio, nas condições testadas, revelou que o tempo espacial mínimo de 16 horas é requerido para obter amostras de biodiesel com elevado teor em ésteres e teor de MAG inferior a 0,7 m/m%.
- f) A razão molar de 1:8 (óleo/álcool), apesar de fornecer produto com teor de MAG mais elevado (0,62 m/m%) foi selecionada como mais eficiente para condução do processo em regime contínuo por apresentar produtividade mais elevada quando comparado aos desempenhos alcançados em substratos contendo elevado excesso de etanol, razões molares de 1:12 e 1:10.
- g) A estabilidade dos derivados imobilizados foi elevada (25 a 36 dias) em todas as condições testadas devido a baixa afinidade do suporte de imobilização em adsorver glicerol formado como subproduto, conforme comprovado por FT-IR. A estabilidade da lipase PS foi mais elevada que a estabilidade da TL, provavelmente em função da elevada tolerância desta lipase a alcoóis de cadeia curta, como etanol.
- h) Os resultados obtidos são altamente promissores e sugerem possibilidade de aperfeiçoamento do processo a partir da montagem proposta variando a relação de dimensão dos reatores em duplo estágio de 1:1 para 1:0,5 ou 1:0,25, tendo em vista que no primeiro estágio conversões mínimas de 85% podem ser alcançadas, sendo o segundo estágio responsável pela etapa de refinamento do processo. Esta estratégia também poderá incrementar a produtividade volumétrica do processo.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Dispõe sobre o regulamento técnico da certificação e comercialização do biodiesel. **Resolução ANP nº45/2014**. Disponível em: www.anp.gov.br. Acesso em: 05 ago. 2018.
- AGROPALMA. **Óleo de palmiste refinado**: Ficha técnica de especificação do produto. Belém/PA: AGROPALMA, 2014.
- ALVES, J.S.; VIEIRA, N.S.; CUNHA, A.S.; SILVA, A.M.; ZACHIA AYUB, M.A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts, **R.S.C. Advances**, v. 4, n. 14, p. 6863-6868, 2014.
- AMARAL, L.C.G.S.; ABREU, Y.V. Evolução do mercado brasileiro de biodiesel sob a ótica dos leilões promovidos pela ANP: 2005 a 2014. **Revista de economia e sociologia rural**, v. 54, n. 4, p. 729-750, 2016.
- AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the Association of Official Analytical Chemist**. 5a ed. Washington.2004. _____Ce 2-66: Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids.
- AMINI, Z.; ILHAM, Z.; ONG, H. C.; MAZAHERI, H.; CHEN, W. H. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v 141, p 339-353, 2017.
- ARAKI, C.A.; MARUCCI, S. M. P.; SILVA, L.S.; MAEDA, C. H.; ARROYO, P. A.; ZANIN, G. M. Effects of a combination of lipases immobilised on desilicated and thiolmodified ZSM-5 for the synthesis of ethyl esters from macauba pulp oil in asolvent-free system. **Applied Catalysis A: General**, v. 562, p. 241-249, 2018.
- ARAUJO, K.; MAHAJAN, D.; KERR, R.; DA SILVA, M. Global biofuels at the crossroads: an overview of technical, policy, and investment complexities in the sustainability of biofuel **Development Agriculture**, v. 7, n. 4, p. 32, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE ÓLEO DE PALMA (ABRAPALMA). **Óleo de palma no dia a dia (2015)**. Dispõe a respeito do uso de óleos como combustíveis. Disponível em: www.abrapalma.org. Acesso em: 23 jun. 2018.
- ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; BADRUDDIN, I. A.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; MEKHILEF, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070-2093, 2012.
- BABAKI, M.; YOUSEFI, M.; HABIBI, Z.; MOHAMMADI, M. Process optimization for biodiesel production from waste cooking oil using multi-enzyme systems through response surface methodology. **Renewable Energy**, v. 105, n. 42, p. 465-472, 2017.

BAKKIYARAJ, S.; SYED, M. B.; DEVANESAN, M. G.; THANGAVELU, V. Production and optimization of biodiesel using mixed immobilized biocatalysts in packed bed reactor. **Pollution Control Technologies and Alternate Energy Options**, v. 23, n. 10, p. 9276–9283, 2016.

BON, E. P.S, PEREIRA JR. N., GOTTSCHALK L. M. F., SÁ-PEREIRA P., ROSEIRO J.C., FERRARA M. A., Bioprocessos para a produção de enzimas. In BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Interciência, v.1, p. 95-116, 2008.

BRASKAR, G.; AISWARYA, R. Trends in catalytic production of biodiesel from various feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, n. 12, p. 495-504, 2016.

BRUN, N.; BABEAU-GARCIA, A.; ACHARD, M-F.; SANCHEZ, C.; DURAND, F.; LAURENT, G., BIROT, M., DELEUZE, H.; BACKOV, R. Enzyme-based biohybrid foams designed for continuous flow heterogeneous catalysis and biodiesel production. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 8, p. 2840-2844, 2011.

CARVALHO, A. K. F.; DA RÓS, P. C. M.; TEIXEIRA, L. F.; ANDRADE, G. S. S.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. **Industrial Crops and Products**, v. 50, n. 7, p. 485-493, 2013.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C. Modificação enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício. In: MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A. L. M. (Org.). **Biocatálise e Biotransformação: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Schoba, 2010. v. 1, p. 275-337.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CASTRO, H.F.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F.; PEREIRA, P.S. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 6, p. 123-147.

CERON, A. A. **Produção de ésteres alquílicos com potencial lubrificante por transesterificação enzimática do óleo de palmiste e álcoois superiores**. 2017. 152 p. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2017.

CERON, A. A.; VILAS BÔAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; CASTRO, H. F. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass and Bioenergy**, 2018. No prelo. Disponível em: www.elsevier.com. Acesso em: 22 ago. 2018. DOI:10.1016/j.biombioe.2018.09.013.

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: FAPERJ; Petrópolis, RJ. EPUB, 2008.

COSTA-SILVA, W. C. E et al. Influence of feedstock source on the biocatalyst stability and reactor performance in continuous biodiesel production. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 881–886, 2014.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5508–5516, 2010.

DANTAS, J. H.; PARIS, L. D.; BARÃO, C. E.; ARROYO, P. A.; SOARES, C. M. F.; VISENTAINER, J. V.; FARIA, F.; ZANIN, G. M. Influence of alcohol: oil molar ratio on the production of ethyl esters by enzymatic transesterification of canola oil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 50, p. 6968-6979, 2013.

DIZGE, N.; KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1274-1278, 2008.

DU, W., XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 3-4, p. 125-129, 2004.

FAROBIE, O.; MATSUMURA, Y. State of the art of biodiesel production under supercritical conditions. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 63, p. 173-203, 2017.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197-212, 2010.

FIDALGO, W. R. R.; CERON, A.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. A fluidized bed reactor as an approach to enzymatic biodiesel production in a process with simultaneous glycerol removal. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 38, n. 5, p. 217-223, 2016.

FIRDAUS, M.; YUSOFF, M.; XU, X.; GUO, Z. Comparison of fatty methyl and ethyl esters as biodiesel base stock: a review on processing and production requirements. **Journal of American Oil Chemical Society** v. 91, n. 4 p. 525-531, 2014.

FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 4 ed. Rio de Janeiro: LTC, p. 853. 2009.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interesterification of babassu oil (*Orbinya* sp). **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1068-1074, 2009.

GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p.1447-1464, 2015.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H.; FERNANDO, W. J. N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 710-716, 2009.

HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: an overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386-395, 2013.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p 235-251, 2006.

HASAN, M. M.; RAHMAM, M. M. Performance and emission characteristics of biodiesel–diesel blend and environmental and economic impacts of biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, n. 3, p. 938–948, 2017.

HERMANSYAH, H.; ARBIANTI, R.; PRAMESHWARI, D. A. Non-alcohol route of biodiesel synthesis from used cooking oil using immobilized biocatalyst in packed bed reactor. **Journal of Sustainable Energy & Environment**.v. 2, p. 1-5, 2011.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, T. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.

JAEGER, K.-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

JAYED, M. H.; MASJUK, H. H.; SAIDUR, R.; KALAM, M. A.; JAHIRUL, M. I. Environmental aspects and challenges of oilseed produced biodiesel in Southeast Asia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2452–2462, 2009.

JAYED, M. H.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; MAHILA, T. M. I.; HUSNAWAN, M.; LIAQUAT, A. M. Prospects of dedicated biodiesel engine vehicles in Malaysia and Indonesia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 1 p. 220-235, 2011.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: a comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 36, p. 364-373, 2010.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do biodiesel**. São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KNOTHE, G.; RAZON, L. F.; Biodiesel fuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 58, n. 8, p. 36-59, 2017.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083-1095, 2010.

LIAQUAT, A. M.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; FAZAL, M. A.; KHAN, A. F.; FAYAZ, H.; VARMAN, M. Impact of palm biodiesel blend on injector deposit formation. **Applied Energy**, v. 111, p. 882-893, 2013.

LOPES, A. P.; CANESIN, E. A.; SUZUKI, R. M.; TONIN, L. T. D.; PALIOTO, G. F.; SEIXAS, F. L. Purificação de glicerina residual obtida na produção de biodiesel a partir de óleos residuais. **Revista Virtual de química**, v. 6, n. 6, p. 1564-1582, 2014.

MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 188, n. 1-3, p. 334-340, 2009.

MAHMUDUL, H. M.; HAGOS, F. Y.; MAMAT, R.; ADAM, A. A.; ISHAK, W. F. W.; ALENEZI, R. Production, characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v 72, p 497–509, 2017.

MARÍA, P. D.; CARBONI-OERLEMANS, C.; TUIN, B.; BARGEMAN, G.; MEER, A.; GERMRT, R. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1-6, p. 36-46, 2005.

MARTIN, L. S. **Triagem de compostos orgânicos para incorporar matrizes híbridas baseadas em sílica pela técnica sol-gel**. 2015. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2015.

MARTIN, L. S.; CERON, A.; OLIVEIRA, P. C.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Different organic components on silica hybrid matrices modulate the lipase inhibition by the glycerol formed in continuous transesterification reactions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 62, n. 1, p.462-470, 2018.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microbiology Technology**, v.40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248- 268, 2006.

MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. D. L. C.; DE CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109-115, 2011.

MEUNIER, S.M.; KARIMINIA, H-R.; LEGGE, R. L.(Comp.). **Advances in biofeedstocks and biofuels: Production technologies for biofuels**. New Jersey: John Wiley & Sons, p. 67-106, 2017.

MITTELBACH, M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 67, n. 3, p. 168-170, 1990.

MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V.H.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy and Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3689-3694, 2007.

NAYLOR, R. L.; HIGGINS, M. M. The political economy of biodiesel in an era of low oil prices. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, n. 11, p. 695-705, 2017.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 2, p. 692-700, 2008.

OLIVEIRA, F. C.; COELHO, S. T. History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, n. 10, p. 168-179, 2017.

PALOMO, J.M.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTES, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **Journal of Chromatographic A**, v. 1038, n. 1-2, p. 267-273, 2004.

PANDEY, S.; MISHRA, S. B. Sol-gel derived organic-inorganic hybrid materials: synthesis, characterizations and applications. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 59, p. 73-94, 2011.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J.C.; DE CASTRO, H.F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 281-288, 2007.

PINGAN, H.; MENGJUN, H.; YANYAN, Z.; LING, H. A sílica/PVA adhesive hybrid material with high transparency, thermostability and mechanical strength. **RSC Advances**, v. 7, p. 2450-2459, 2017.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; MICHELLE, J. C. R.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, B. A. Biodiesel: An overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6b, p.1313-1330, 2005.

PINZI, S.; LEIVA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; REDEL-MACÍAS, M. D. Latest trends in feedstocks for biodiesel production. **Biofuel, Bioproducts & Biorefining**, v. 8, n. 1, p 126-143, 2013.

POPPE, J. K.; GARCIA-GALAN, C.; MATTE, C. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme**, v. 94, p. 51-56, 2013.

POPPE, J. K.; MATTE, C. R.; PERALBA, M. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 490, n. 10, p. 50-56, 2015.

RAMADHAS, A. S.; JAYARAJ, S.; MURALEEDHARAN, C. Characterization and effect of using rubber seed oil as fuel in the compression ignition engines. **Renewable Energy**, v. 30, n. 5, p. 795-803, 2005.

RAMOS, E.Z.; MIOTTI JUNIOR, R.H.; CASTRO, P.F.; TARDIOLI, P.W.; MENDES, A.A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D.B. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43-51, 2015.

RAMOS, L. P.; KOTHE, V.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; MUNIZ-WYPYCH, A. S.; NAKAGAKI, S.; KRIEGER, N.; WYPYCH, F.; CORDEIRO, C. S. Biodiesel: Matérias-primas, tecnologias de produção e propriedades combustíveis. **Revista Virtual Química**, v. 9, n.1, p. 317-369, 2017.

RAMOS, L.; MARTIN, L.S.; SANTOS, J.C.; CASTRO, H.F. Combined use of a two-stage packed bed reactor with a glycerol extraction column for enzymatic biodiesel synthesis from macaw palm oil. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, p. 1-7, 2017.

RENEWABLE ENERGY POLICY AGENCY 21 (REN 21). Dispõe sobre uma visão geral anual abrangente do estado das energias renováveis. **Renewables 2018 Global status report**. Disponível em: www.ren21.net/. Acesso em: 20 ago. 2018.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 1-2, p. 19-26, 2008.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of Jatropha oil. **Energy & Fuels**, v. 18, n. 1, p. 154-159, 2004.

SHAO, P.; MENG, X.; HE, J; SUN, P. Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock. **Food and Bioproducts Processing**, v. 86, p. 283-289, 2008.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: O ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 843-851, 2008.

SIMÕES, A. S.; RAMOS, L.; FREITAS, L. T.; SANTOS, J. C.; ZANIM, G. M., DE CASTRO, H. F. Performance of an enzymatic packed bed reactor running on babassu oil to yield fatty ethyl esters (FAEE) in a solvent-free system. **Biofuel Research Journal**, v. 6, n. 2, p. 242-247, 2015.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-9, n. 1-3, p. 745-757, 1999.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R.; FRANÇA, L. R. **Biotecnologia aplicada à agro & indústria**, v. 4, p 529-568, 2016.

SU, F.; LI, G. L.; FAN, Y. L.; YAN, Y. J.; Enhancing biodiesel production via a synergic effect between immobilized *Rhizopus oryzae* lipase and Novozym 435. **Fuel Processing Technology**, v. 137, p. 298-304, 2015.

TACIAS-PASCACIO, V. G. et al. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. **Fuel**, v. 200, p. 1–10, 2017.

TACIAS-PASCACIO, V. G.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; JIMÉNEZ-PÉREZ, M.; YATES, M.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; ROSALES-QUINTERO, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. **Fuel**, v. 200, p. 1-10, 2017.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 628-634, 2010.

- TARIQ, M.; ALI, S.; KHALID, N. Activity of homogeneous and heterogeneous catalysts, spectroscopic and chromatographic characterization of biodiesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 6303–6316, 2012.
- TONGBORIBOON, K.; CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A. Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 1-2, p. 52-59, 2010.
- TRAN, D. T.; CHANG, J. S.; LEE, D. J. Recent insights into continuous-flow biodiesel production via catalytic and non-catalytic transesterification processes. **Applied Energy**, v. 185, p. 376–409, 2017.
- URIOSTE, D.; CASTRO, M. A. B.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de métodos para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 407-412, 2008.
- VERMA, P.; SHARMA, M. P. Review of process parameters for biodiesel production from different feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 62, p. 1063-1071, 2016.
- VILAS BÔAS, R. N.; CERON, A. A.; BENTO, H. B. S.; CASTRO, H. F. Application of an immobilized *Rhizopus oryzae* lipase to batch and continuous ester synthesis with a mixture of a lauric acid and fusel oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 61-68, 2018.
- WANG, M.; NIE, K.; YUN, F.; CAO, H.; DENG, L.; WANG, F.; TAN, T. Biodiesel with low temperature properties: Enzymatic synthesis of fusel alcohol fatty acid ester in a solvent free system. **Renewable Energy**, v. 83, n. 5, p. 1020-1025, 2015.
- WANG, X; LIU, X; ZHAO, CM; DING, Y; XU, P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase–nanoparticle biocomposite. **Bioresource Technology**, v. 102, p.6352-6355, 2011.
- XIE, K.; YU, Y.; SHI, Y. Synthesis and characterization of cellulose/silica hybrid materials with chemical crosslinking. **Carbohydrate Polymer**, v. 78, p. 799-805, 2009.
- ZENEVICZ, M. C. P.; JACQUES, A.; DE OLIVEIRA, D.; FURIGO JR, A. A two-step enzymatic strategy to produce ethyl esters using frying oil as substrate. **Industrial Crops & Products**, v. 108, p. 53-55, 2017.
- ZHANG, B; WENG, Y; XU, H; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 61-70, 2012.
- ZHAO, X.; QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalized process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182-197, 2015.