

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

EMANUELLE LIMA PACHE DE FARIA

Síntese enzimática de monoésteres de etila catalisada  
por células íntegras imobilizadas com elevada atividade  
lipolítica em reator de leito fixo operando em fluxo contínuo

São Paulo

2014

**EMANUELLE LIMA PACHE DE FARIA**

**Síntese enzimática de monoésteres de etila catalisada por células íntegras  
imobilizadas com elevada atividade lipolítica em reator de leito fixo operando  
em fluxo contínuo**

Dissertação de Mestrado 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 Processos  
Catalíticos e Biocatalíticos

Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

**Versão Corrigida**

**Lorena**

**2014**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO 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)

de Faria, Emanuelle Lima Pache

Síntese enzimática de monoésteres de etila catalisada por células íntegras imobilizadas com elevada atividade lipolítica em reator de leito fixo operando em fluxo contínuo / Emanuelle Lima Pache de Faria; orientadora Heizir Ferreira de Castro - ed. reimp., corr. - Lorena, 2014.  
80 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2014  
Orientadora: Heizir Ferreira de Castro

1. Células íntegras. 2. Espuma de poliuretano. 3. Reator de leito fixo. 4. Solvente. 5. Biodiesel. I. Título. II. de Castro, Heizir Ferreira, orient.

*“É justamente a possibilidade de realizar um  
sonho que torna a vida mais interessante”!*

*(O Alquimista)*

**Paulo Coelho**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar e guiar meu caminho e minha vida, tornando possível a realização deste conquista. Obrigada Senhor, por me dar força, sabedoria e capacidade para superar os momentos difíceis.

Aos meus pais, que sempre foram, pra mim, um exemplo de inteligência, competência e honestidade. Em especial minha mãe, pelo amor dedicado, pelas vibrações nos momentos importantes e pelo colo quando necessário. Por ter me ensinado desde sempre a ter bom senso nas minhas decisões e por tê-las apoiado.

As minhas irmãs, Raquel e Kamille, pela companhia mesmo a distância, dedicação e incentivos constantes durante toda minha trajetória. Pelo carinho e olhar especial nos momentos difíceis e pelo sorriso e brilho no olhar nas minhas vitórias.

À Prof<sup>a</sup> Heizir, pelos ensinamentos, pela experiência transmitida e pela orientação sempre essencial. Agradeço também pelo carinho e paciência de sentar e discutir ponto a ponto cada resultado, o que foi indispensável para o andamento do trabalho. Obrigada pela preocupação e pela confiança.

À Prof<sup>a</sup> Cleide pelo seu incentivo e apoio à minha carreira e pelo exemplo de busca ao crescimento profissional.

À Prof<sup>a</sup> Larissa por todos os ensinamentos e por está sempre disposta a me ajudar.

Aos meus familiares, pelo apoio, estímulo e carinho que deram à minha formação e educação.

Aos meus queridos amigos presentes e distantes Kalianny, Nayara, Matheus, Tassia, Juliana, Karen, Ana, Cristiano, Guilherme, Rafael por todos os momentos que compartilhamos juntos e por estarem sempre ao meu lado sempre que precisei, me ajudando a superar todos os momentos difíceis.

Aos meus queridos amigos presentes e aos que já fizeram parte do laboratório de Biocatálise Ana Karine, Larissa, Patrícia, Juan, Weriton, William, Daniel, Lucas R., Lucas M., Eduardo, Tomás, Kevin, Heitor, Layne, Bruno. Agradeço todos os conselhos, ajudas, apoio, alto astral de todos os dias e por contribuírem na realização deste trabalho.

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

Agradeço o apoio financeiro da CAPES.

## RESUMO

FARIA, E. L. P. **Síntese enzimática de monoésteres de etila catalisada por células íntegras imobilizadas com elevada atividade lipolítica em reator de leito fixo operando em fluxo contínuo**, 2014, 80 p, Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

Visando ampliar as rotas de produção de biodiesel, o objetivo deste trabalho foi utilizar uma tecnologia alternativa para a produção de biodiesel por via enzimática. Neste processo, células do fungo *Mucor circinelloides* URM 4182 foram cultivadas em meio apropriado, imobilizadas *in situ* em espuma de poliuretano e utilizadas diretamente como biocatalisador na síntese de ésteres de ácidos graxos em reações de transesterificação do óleo de coco usando etanol como agente acilante. O trabalho experimental foi desenvolvido em 4 etapas. Inicialmente, as propriedades bioquímicas do biocatalisador foram determinadas, incluindo valores ótimos de pH (7,3) e temperatura (40° C) e constantes cinéticas ( $V_{max}= 610$  U/g e  $K_m= 263$  mM). Na segunda etapa foram realizados testes utilizando reatores de tanque agitados operados em regime descontínuo confirmando a eficiência do *M. circinelloides* UMR 4182 para converter os ácidos graxos presentes no óleo de coco em ésteres correspondentes (rendimento de transesterificação da ordem de 96% em 144 horas). Com objetivo de aumentar a produtividade do sistema, na terceira etapa, estudos foram conduzidos em reator de leito fixo operando em fluxo contínuo empregando dois reatores (A e B) com diferentes relações geométricas altura/diâmetro ( $l/d=4,2$  e  $l/d=14$ ). Avaliou-se inicialmente no reator A o comportamento do sistema para substratos preparados em diferentes razões molares (1:6, 1:8 e 1:10 óleo/álcool). Comparativamente os rendimentos mais elevados (da ordem de 62%) foram obtidos para substratos preparados na razão molar de 1:8 (óleo/álcool), indicando a necessidade de investigar outros parâmetros do processo. A presença de caminhos preferenciais detectada visualmente no reator A pela injeção do corante lipossolúvel indicou limitações de transferência de massa, justificando a baixa conversão em ésteres de etila. Em seguida, mediante a avaliação da geometria dos reatores, foi selecionado o reator B (volume útil - 286 mL) para determinar a influencia do tempo espacial (60, 70 e 80 horas) no desempenho do processo utilizando a condição pré-estabelecida, etanol em excesso na razão molar 1:8 (óleo/etanol). O melhor desempenho do reator foi constatado para tempo espacial de 80h (vazão volumétrica =  $0,06$  mL.min<sup>-1</sup>). Nessa condição,  $92,7 \pm 1,5\%$  dos ácidos graxos presentes no óleo de coco foram convertidos nos ésteres de etila correspondentes, alcançando uma produtividade média de  $51,0 \pm 1,4$  mg<sub>éster</sub>.g<sup>-1</sup><sub>meio</sub>.h<sup>-1</sup> e fornecendo uma operação estável do sistema por 25 dias. As amostras purificadas apresentaram valores de viscosidade  $5,14$  mm<sup>2</sup>/s e teores residuais de monoglicerídeos (3,2 m/m%) e diglicerídeos (3,4 m/m%). Na quarta etapa foram realizados testes em reatores agitados operados em regime descontínuo na presença de solvente (terc-butanol e/ou líquido iônico), em diferentes proporções (10 – 50%). Os resultados foram comparados com a reação conduzida na ausência de solvente que apresentou baixa velocidade de reação e rendimento reduzido (44,5% em 6 dias de reação). Ambos os solventes aumentaram as conversões e velocidades de reação; no entanto, terc-butanol apresentou melhor desempenho em menor proporção (15%). Nessa condição, rendimentos da ordem de 96% foram alcançados em 96 horas, provavelmente devido à polaridade moderada e baixa viscosidade deste solvente que dilui o glicerol acumulado no suporte e melhora a transferência do substrato para o interior das células imobilizadas, impedindo a inibição da enzima por limitação da transferência de massa. De forma geral, os resultados foram promissores e demonstraram a potencialidade das células íntegras de *M. circinelloides* URM 4182 imobilizada em poliuretano para mediar a síntese de biodiesel em um reator de leito fixo em fluxo contínuo.

**Palavras chaves:** Células íntegras, Espuma de poliuretano, Reator de leito fixo, Biodiesel.

## ABSTRACT

FARIA, E. L. P. **Enzymatic synthesis of ethyl monoesters catalyzed by immobilized whole-cells with high lipase activity in a packed bed reactor running in a continuous flow**, 2014, 80 p, Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

Aiming at expanding routes for biodiesel production, the goal of this work was to use an alternative technology for the production of biodiesel by enzymatic route. In this case, whole-cells from filamentous fungus *Mucor circinelloides* URM 4182 were grown in appropriate medium, simultaneously immobilized on low-cost support and used directly as a biocatalyst in the transesterification reactions of coconut oil using ethanol as the acylating agent. The experimental work was carried out in four steps. Initially, the biochemical properties of the immobilized biocatalyst were determined, including values for optimum pH (7.3) and temperature (40 °C) and kinetics parameters ( $V_{max} = 610$  U/g and  $K_m = 263$  mM). Following this, tests were carried out in stirred batch reactors confirming the efficiency of *M. circinelloides* URM 4182 to produce biodiesel from coconut oil (96% in 144 hours). However, the low productivity attained motivated the replacement of the batch system for packed bed reactor operating under continuous flow using two reactor (A and B) having different geometric relations height/diameter ( $l/d = 4.2$  and  $l/d = 14$ ). Initially, the performance of the reactor A was assessed for substrates at different molar ratios (1:6, 1:8 and 1:10 oil/alcohol). Comparatively the best conversion (62%) was achieved for substrate at molar ratio of 1:8 (oil/alcohol); suggesting the need to investigate other process parameters to overcome such limitations. The presence of preferential paths visual detected for Reactor A by tracer assay indicated severe mass transfer limitations, justifying the low conversion attained in ethyl esters. Following this, Reactor B was selected to run the continuous experiments using substrate at pre-established condition (molar ratio oil/ethanol 1: 8) under different space times (60, 70, and 80 hours). Better reactor performance was found for space time of 80 h (volumetric flow =  $0.06$  mL min<sup>-1</sup>). In this condition,  $92.7 \pm 1.5\%$  of the fatty acids present in the coconut oil have been converted into the corresponding ethyl esters, reaching an average volumetric productivity of  $51.0 \pm 1.4$  mg<sub>ester</sub>·g<sup>-1</sup><sub>medium</sub>·h<sup>-1</sup> with no significant reduction in the efficiency during 25 days. The purified samples presented viscosity values of  $5.14$  mm<sup>2</sup>/s and residual levels of monoglycerides (3.2 wt %) and diglycerides (3.4 wt%). In the fourth step, transesterification reactions were performed in stirred tank reactors in the presence of solvent (tert-butanol and/or Ionic Liquid) at different proportions (10-50%) in relation to the total weight oil and ethanol. The results were compared with the reaction carried out in the absence of solvent which has low reaction rate and reduced yield (44.5% in 6 days of reaction). Both solvents enhanced the transesterification yields and reaction rates; however tert-butanol showed better performance at lower proportion (15%). Under this condition, yields in the order of 96% were attained in 96 hours, probably due to the moderate polarity and lower viscosity of this solvent which dilutes the glycerol accumulated in support and improved the substrate transfer into the interior of the immobilized cells by preventing the enzyme inhibition by limitation of the mass transfer. Overall, the results were promising and showed the potential of whole-cells from *M. circinelloides* URM 4182 immobilized in polyurethane to mediate the synthesis of biodiesel in a continuous packed bed reactor.

**Keywords:** Whole cells, Polyurethane matrix, Packed bed reactor, Biodiesel.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> Processos de obtenção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando células íntegras imobilizadas (continua).....	26
<b>Tabela 3.1.</b> Processos de obtenção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando células íntegras imobilizadas (conclusão).....	27
<b>Tabela 3.2.</b> Processo de obtenção de biodiesel em biorreatores de leito fixo operando em regime de fluxo contínuo utilizando células íntegras imobilizadas.....	33
<b>Tabela 3.3.</b> Processos de obtenção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando líquido iônico no meio reacional.....	35
<b>Tabela 4.1.</b> Matriz experimental das variáveis de influência (pH e temperatura) e a faixa experimental de acordo com o planejamento fatorial para analisar o efeito sobre a atividade hidrolítica da lipase imobilizada em poliuretano.....	38
<b>Tabela 5.1.</b> Dados referentes à imobilização in situ do fungo <i>M. circinelloides</i> URM 4182 em meio contendo diferentes massas de suporte.....	47
<b>Tabela 5.2.</b> Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial utilizado para avaliar a influência das variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da lipase imobilizada em poliuretano.....	49
<b>Tabela 5.3.</b> Estimativa do efeito das variáveis, erro padrão e valores de <i>p</i> para atividade hidrolítica da lipase imobilizada em poliuretano, obtido nos ensaios do planejamento experimental.....	49
<b>Tabela 5.4.</b> Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a atividade hidrolítica da lipase imobilizada em poliuretano do pH (X1) e temperatura (X2). .....	50
<b>Tabela 5.5.</b> Propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase imobilizada.....	52
<b>Tabela 5.6.</b> Propriedades da amostra de biodiesel de óleo de coco purificada.....	54
<b>Tabela 5.7.</b> Desempenho do reator de leito fixo na etanólise do óleo de coco catalisada por lipase intracelular.....	56
<b>Tabela 5.8.</b> Desempenho do reator de leito fixo na etanólise contínua do óleo de coco mediada pela lipase de <i>M. circinelloides</i> URM 4182 imobilizada em poliuretano com diferentes tempos espaciais.....	64
<b>Tabela 5.9.</b> Valores de absorvância das amostras (reator B) previamente diluídas em terc-butanol.....	80



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Esquema de representação da transesterificação do triglicerídeo com álcool de cadeia curta. ....	21
<b>Figura 3.2.</b> Comparação das etapas envolvidas no processo de obtenção de biodiesel por via enzimática empregando lipase extracelular (a) e lipase intracelular (b):.....	24
<b>Figura 3.3.</b> (a) As três fases que compõem muitos sistemas de células: células imobilizadas, suporte celular, líquido intersticial. (b) Uma representação de engenharia de um sistema de célula imobilizada. ....	30
<b>Figura 3.4.</b> Considerações importantes para seleção do biorreator. ....	31
<b>Figura 4.1.</b> Esquema simplificado do reator de leito fixo: 1- Tanque de alimentação com agitação magnética, 2- Bomba peristáltica, 3- Banho termostático, 4- Circulação de água, 5- Coluna, 6- Saída de produto. ....	40
<b>Figura 5.1.</b> Superfície de resposta descrita pelo modelo matemático que representa a atividade hidrolítica das células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 em função do pH (X1) e temperatura (X2). ....	50
<b>Figura 5.2.</b> Estudo cinético da influência da concentração de substrato na atividade da lipase imobilizada.....	51
<b>Figura 5.3.</b> Perfil de formação de ésteres de etila na síntese de biodiesel a partir do óleo de coco catalisada pela lipase intracelular imobilizada em poliuretano. ....	53
<b>Figura 5.4.</b> Influência da concentração molar dos componentes da mistura reacional na síntese de biodiesel em reator de leito fixo em fluxo contínuo (Reator A). ....	55
<b>Figura 5.5.</b> Concentração total em ésteres obtida na etanólise enzimática do óleo de coco em reator de leito fixo operando em modo contínuo (temperatura 35 °C, razão molar 1:8 (óleo de coco/etanol), tempo espacial de 70 horas. ....	56
<b>Figura 5.6.</b> Análise visual da formação de caminhos preferenciais com a injeção de corante lipossolúvel no reator A. ....	57
<b>Figura 5.7.</b> Absorbância em função da concentração do traçador em meio reacional (óleo de coco e etanol). ....	58
<b>Figura 5.8.</b> Espalhamento do corante no interior do reator B durante a realização do teste traçador (fotografia referente ao primeiro tempo espacial, 4 horas).....	60
<b>Figura 5.9.</b> Concentrações reais do traçador na saída do reator em função do tempo.....	61
<b>Figura 5.10.</b> Concentração total em ésteres de etila obtida na etanólise enzimática do óleo de coco em reator de leito fixo operando em modo contínuo (temperatura 35 °C, razão molar 1:8 (óleo/etanol), tempo espacial de 60h (A) – 70h (B) – 80h (C). ....	62
<b>Figura 5.11.</b> Influência de diferentes tipos (líquido iônico – a, terc-butanol – b) e proporções de solvente na produção de ésteres de etila. ....	66
<b>Figura 5.12.</b> Perfil de formação dos ésteres na etanólise enzimática do óleo de coco em meio contendo proporção otimizada de terc-butanol (15% de solvente).....	67

## LISTA DE SIGLAS

<b>AG</b>	Ácidos graxos
<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo
<b>[BMIM][NTf2]</b>	1-Butil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfonil)imida
<b>[BMIM][BF4]</b>	1-Butil-3- metilimidazólio tetrafluoroborato
<b>[BMIM][PF6]</b>	1-Butil-3-metilimidazólio hexafluorofosfato
<b>[OmPy][BF4]</b>	1 – octil –3- metilpiridina
<b>[C16MIM][NTf2]</b>	1- hexadecil-3-metilimidazólio bis(trifluorometilsulfonil)imida
<b>[C10MIM]</b>	1-decil-2-metilimidazólio
<b>PU</b>	Espuma de poliuretano
<b>BIO+PU</b>	Biomassa imobilizada em suporte de poliuretano

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>17</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
3.1. Biocombustíveis como fonte renovável de energia .....	18
3.2. Matérias-primas para produção de biodiesel .....	19
3.2.1. Óleo de coco .....	19
3.3. Processos de obtenção do biodiesel .....	20
3.4. Catálise enzimática .....	22
3.5. <i>Mucor</i> .....	28
3.6. Imobilização de células íntegras .....	29
3.7. Emprego de células imobilizadas em biorreatores .....	31
3.8. Líquidos Iônicos .....	34
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
4.1. Materiais .....	36
4.1.1. Microrganismo.....	36
4.1.2. Suporte de Imobilização .....	36
4.1.3. Matéria-prima .....	36
4.1.4. Outros reagentes .....	37
4.2. Metodologia Experimental .....	37
4.2.1. Esterilização dos meios e equipamentos.....	37
4.2.2. Preparo do meio de cultura .....	37
4.2.3. Preparo das células íntegras.....	37
4.2.4. Influência da quantidade de espumas de poliuretano na imobilização da biomassa celular.....	38
4.2.5. Determinação das propriedades bioquímicas e cinéticas.....	38
4.2.6. Produção de biodiesel .....	39
4.2.6.1. Sistema descontínuo .....	39
4.2.6.2. Sistema contínuo.....	39
4.2.7. Cálculo da distribuição do tempo de residência .....	40
4.2.8. Purificação do biodiesel.....	41
4.3. Metodologia analítica .....	42
4.3.1. Atividade hidrolítica .....	42
4.3.2. Teor de umidade .....	42

4.3.3. Determinação dos ésteres de etila por cromatográfica gasosa.....	42
4.3.4. Ésteres purificados.....	43
4.3.4.1. Determinação da viscosidade absoluta.....	43
4.3.4.2 Densidade do biodiesel.....	43
4.3.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	44
4.4. Cálculos.....	44
4.4.1. Rendimentos de transesterificação.....	44
4.4.2. Tempo espacial ( $\tau$ ).....	45
4.4.3. Tempo de meia-vida do biocatalisador.....	45
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
5.1. Determinação da massa de suporte para imobilização <i>in situ</i> das células de <i>Mucor circinelloides</i> .....	46
5.2. Propriedades bioquímicas e cinéticas do biocatalisador imobilizado.....	48
5.2.1. Propriedades bioquímicas.....	48
5.2.2. Parâmetros cinéticos.....	51
5.3. Etanólise do óleo de coco catalisada pelo fungo <i>Mucor circinelloides</i> URM 4182 em sistema descontínuo.....	52
5.4. Etanólise em sistema contínuo.....	54
5.4.1. Influência da razão molar óleo/etanol no desempenho do processo.....	54
5.4.2. Caracterização hidrodinâmica do Reator B.....	58
5.4.2.1. Curva de calibração.....	58
5.4.2.2 Cálculo da Distribuição do Tempo de Residência.....	59
5.4.3. Desempenho do reator B em fluxo contínuo com diferentes tempos espaciais.....	61
5.5. Influência do tipo e proporção de solvente na síntese de ésteres de etila em sistema descontínuo.....	65
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O potencial do uso do biodiesel como fonte energética renovável é um dos temas mais discutidos no âmbito industrial e acadêmico, embora esse combustível já seja utilizado em um grande número de países, mesmo enfrentando sérias dificuldades para competir com o diesel de petróleo (BASHA; GOPAL; 2012).

Embora a tecnologia estabelecida para a produção industrial de biodiesel seja baseada na transformação química (alcoólise) de óleos vegetais com metanol, na última década a produção por rotas biotecnológicas tem recebido considerável atenção devido às diversas vantagens que exhibe sobre a rota química, visto que o metanol constitui um produto também fóssil (obtido do petróleo) e a utilização de catalisadores químicos homogêneos gera problemas ao meio ambiente, pois requer inúmeras etapas de recuperação e purificação do produto final (KNOTHE *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2011).

O uso de processos enzimáticos em substituição à catálise química tradicional desponta como uma alternativa adequada para que sejam desenvolvidos processos eficientes de obtenção de produtos de interesse não agressivos do ponto de vista ecológico. O emprego de enzimas como biocatalisadores em processos industriais inclui benefícios como o uso de condições amenas de pressão e temperatura e a não geração de resíduos tóxicos (ANTCZAK *et al.*, 2009; BAJAJ *et al.*, 2010). Entretanto, muitas aplicações industriais desses biocatalisadores são ainda limitadas pelo seu alto custo de produção e baixa produtividade, pois sendo em sua maioria enzimas extracelulares requer etapas posteriores de separação purificação e imobilização em suporte, por processos complexos para uso prático o que pode acarretar perda da atividade original (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009).

Como forma de reduzir estes custos, diversos estudos estão sendo direcionados na utilização de células íntegras de microrganismos com elevada atividade lipolítica. Grande parte desses estudos reporta a utilização das células íntegras na forma imobilizada, baseado na técnica de imobilização espontânea das células em suporte adequado ao longo do cultivo (SUBHASH; MOHAN, 2011; YOSHIDA *et al.*, 2012). A biomassa celular imobilizada obtida pode ser utilizada diretamente na reação de interesse e reutilizada diversas vezes. Esta estratégia tem apresentado resultados promissores empregando diferentes microrganismos produtores de lipase intracelular para mediar reações de hidrólise, esterificação e principalmente transesterificação de óleos vegetais visando à obtenção do biodiesel (SUBHASH; MOHAN, 2011). No entanto, são escassos os trabalhos que descrevem a utilização desse sistema imobilizado em biorreatores operando em regime de fluxo contínuo, principalmente adotando a rota etílica nas reações de transesterificação de óleos vegetais.

Sob esse aspecto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema de produção de biodiesel em fluxo contínuo a partir de óleo vegetal láurico, particularmente óleo de coco, pela rota etílica. Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizadas células íntegras do fungo *Mucor circinelloides* URM 4182 imobilizadas *in situ* em espumas de poliuretano. Cabe ressaltar que esta particular linhagem de fungo foi selecionada anteriormente tendo demonstrado elevada eficiência na produção de biodiesel usando óleos vegetais não comestíveis como os óleos de babaçu, macaúba, palma e pinhão manso (SILVA; BRUNO; DE CASTRO, 2009; SILVA; FREITAS; DE CASTRO, 2010; SILVA *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012; ANDRADE, 2012; ANDRADE *et al.*, 2014).

Utilizando os dados gerados em reatores descontínuos (STR), estudos foram desenvolvidos em regime de fluxo contínuo em reator de leito fixo. Em termos práticos, a utilização de biorreatores operando em sistema de fluxo contínuo oferece inúmeras vantagens quando comparado com o processo em batelada, principalmente por possibilitar o controle automático, ser mais fácil de operar e favorecer o controle de qualidade do produto (ANDRADE *et al.*, 2014). Além disso, a configuração do reator de leito fixo minimiza os possíveis efeitos danosos às células imobilizadas devido ao stress físico causado pela agitação mecânica.

O presente trabalho é, portanto, uma continuação lógica dos trabalhos anteriormente desenvolvidos que alia a utilização de um biocatalisador de baixo custo e o emprego de um sistema simples e de fácil manuseio para produção contínua de biodiesel, permitindo assim a redução do custo de obtenção, devido à redução do número de operações básicas envolvidas.

## 2. OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi o estabelecimento de um sistema de produção contínua de biodiesel a partir do óleo de coco e etanol, empregando células íntegras de *Mucor circinelloides* URM 4182 imobilizadas em espumas de poliuretano. Levando em consideração este aspecto, o objetivo global do trabalho foi alcançado mediante a execução das seguintes etapas, que podem ser visualizadas como objetivos específicos:

- Avaliação do desempenho das células íntegras de *M. circinelloides* imobilizadas em espumas de poliuretano em regime descontínuo na síntese de biodiesel a partir do óleo de coco e etanol, em meio contendo terc-butanol como solvente;
- Estabelecimento de condições adequadas de operação do reator de leito fixo com relação aos parâmetros reacionais e hidrodinâmicos;
- Otimização das condições reacionais do reator de leito fixo, avaliando o empacotamento catalítico e a influência do fluxo de alimentação no rendimento de transesterificação e estabilidade do sistema imobilizado;
- Verificar a influência da redução gradativa do solvente no meio reacional e a utilização de agente estabilizante (líquido iônico) no desempenho processo em reator de tanque agitado.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Biocombustíveis como fonte renovável de energia

O século XX pode ser entendido, no que diz respeito à matriz energética utilizada, como o século do petróleo. A sociedade moderna habituou-se a desfrutar do conforto oferecido pelos derivados desta matéria-prima de origem fóssil, na forma de combustíveis e produtos químicos de uso diário, como por exemplo, os plásticos. Entretanto, o aumento constante da demanda por fontes de energia, o esgotamento progressivo das reservas de petróleo de fácil extração somado a um desenvolvimento sócio econômico mais intenso, sobretudo nos países em desenvolvimento, tem impulsionado a busca pela utilização de insumos de natureza renovável que possam substituir o uso dos combustíveis fósseis e implementar o conceito de sustentabilidade nos processos que envolvem a queima de combustíveis (ATABANI *et al.*, 2012).

Neste cenário surgem os biocombustíveis como uma das alternativas mais satisfatórias para resolver a problemática do uso dos combustíveis de origem não renovável. Por terem origem vegetal, os biocombustíveis contribuem para o ciclo do carbono na atmosfera e, por isto, são considerados de natureza renovável, já que o CO<sub>2</sub> emitido durante a sua queima é reabsorvido, entre outras, pelas plantas que irão produzi-lo.

Cabe salientar que o Brasil é um dos pioneiros no uso deste tipo de combustível já utilizando o etanol oriundo da cana-de-açúcar desde a década de 70. Outra vantagem na utilização dos biocombustíveis reside no fato destes não apresentarem enxofre e nitrogênio (NOX) em sua composição e, portanto, durante a sua queima não emitirem óxidos de enxofre (SO<sub>2</sub> e SO<sub>3</sub>) poluentes extremamente danosos para a qualidade do ar e responsáveis pelo fenômeno da chuva ácida e smog (BASHA; GOPAL, 2012).

Tecnicamente, o biodiesel é composto por ésteres alquílicos de ácidos graxos, produzido por transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com alcoóis de cadeia curta, gerando glicerol como subproduto (LI *et al.*, 2012). O biodiesel oferece inúmeros benefícios técnicos e ambientais sobre os combustíveis fósseis convencionais, visto que além de ser renovável, é biodegradável e tem ainda a vantagem de redução das emissões reguladas. Economicamente, para que o biodiesel tenha um papel ativo no mercado de energia, sendo mais do que um aditivo, o mesmo precisa ser produzido a um custo bem mais baixo e atender às especificações globais (QUINTELLA *et al.*, 2009). Nesse contexto, alguns aspectos tornam-se essenciais na produção como: o uso de matérias-primas de custo reduzido, produção de um catalisador de economicamente viável e a utilização sustentável



das terras na agricultura e principalmente o aumento da eficiência do processo de produção (LIN *et al.*, 2011). Atualmente há um lógico debate referente à seleção da matriz lipídica mais adequada para produção de biodiesel (óleo vegetal reciclado, óleos de baixa qualidade alimentar, óleos de origem em espécies oleaginosas não comerciais etc), mas o mercado atual estabelece o domínio do óleo de soja na produção de biodiesel (70% do óleo usado na síntese de biodiesel no Brasil é de soja) (ANP, 2014).

### **3.2. Matérias-primas para produção de biodiesel**

As principais matérias-primas para produção de biodiesel são os óleos vegetais (soja, colza e girassol) e gorduras residuais. Para melhor utilizar os recursos regionais brasileiros, culturas alternativas de oleaginosas estão sendo também consideradas. Estas incluem os cultivares de palma, pinhão manso, coco, babaçu, mamona, amendoim e algodão. A maioria destas vem sendo cultivada no Brasil para fins não relacionados ao biodiesel e foram mencionados no Plano Nacional de Agroenergia como potenciais culturas para exploração no país. Há também espécies menos conhecidas que estão sendo consideradas para a produção de biodiesel, incluindo as palmeiras de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), inajá (*Attalea maripa*), macaúba (*Acrocomia aculeata*), buriti (*Mauritia flexuosa*) e licuri (*Syagrus coronata*) (MAPA, 2005).

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água, de origem animal ou vegetal, formados predominantemente por ésteres de triacilgliceróis, produtos resultantes da esterificação entre o glicerol e ácidos graxos. Os ácidos graxos mais comuns encontrados naturalmente nos óleos e gorduras são: láurico (C12), mirístico (C14), palmítico (C16), esteárico (C18), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) (REDA; CARNEIRO, 2007).

#### **3.2.1. Óleo de coco**

A longa história de uso e os diversos estudos realizados para caracterizar e definir a composição dos vários componentes do coqueiro, seus frutos e os produtos dele derivados, estabeleceu a unicidade do coco e superioridade entre culturas agrícolas. Desta forma, o coco é normalmente referido como a árvore da vida, árvore mais útil do homem, rei da flora tropical, árvore da abundância (BAWALAN; CHAPMAN, 2006).

O coco (*Cocos nucifera*) é uma espécie perene da família *Arecaceae* amplamente distribuída nos trópicos, originário do Sudeste asiático, foi introduzido no Brasil em 1553. A introdução dessa palmeira no Brasil ocorreu antes da colonização do Brasil pelos

portugueses. Atualmente o coco é encontrado em toda a costa do Brasil, entre os estados do Rio Grande do Norte e Bahia (MACEDO; NOGUEIRA, 2005).

O fruto é uma drupa fibrosa que, quando em processo de formação, começa a produzir a copra, uma camada resistente com apenas 7% de água e 34% de composição lipídica passível de extração (GOPALAKRISHNA *et al.*, 2010). O óleo de coco é comercialmente derivado do óleo de copra, originado da amêndoa seca ou "carne" do coco. Sua coloração varia do incolor ao amarelo acastanhado. Suas propriedades garantem elevada massa molecular de ácidos graxos saturados, sabor e odor agradáveis, elevada resistência à oxidação, uma larga faixa de temperatura de fusão, digestibilidade, absorção fácil e uma vasta gama de fins comestíveis e não comestíveis (MARINA *et al.*, 2009).

O óleo de coco extraído é de composição 42% a 46% láurica (C12) e 90% saturada (BOUAID; MARTÍNEZ; ARACIL, 2010). A ausência de ligações pi é uma vantagem considerável, visto que o processo de oxidação é de velocidade menor em comparação aos óleos de ácidos graxos insaturados, fato esse que favorece a sua utilização para a produção de biocombustível. A oxidação acelerada do biodiesel compromete tanto a sua qualidade como combustível quanto a integridade do motor (FERRARI; SOUZA, 2009). Além disso, a principal razão do coco ter se tornado uma fonte promissora para a produção de biodiesel é o seu elevado teor de óleo que varia em torno de 65-72% em coqueiro gigante e 65-66% no híbrido, além de ser uma matéria-prima com valor de mercado acessível, sem real importância no âmbito industrial (GUARTE; MUHLBAUER; KELLERT, 1996; KHANG *et al.*, 2014).

Em 2011, o Brasil produziu  $1,99 \times 10^6$  toneladas de coco em 261.824 ha e importou 264.934 kg (MAPA, 2012). Considerando que o maior produtor de coco no mundo (Indonésia) produziu  $1,95 \times 10^9$  toneladas de coco em  $2,95 \times 10^6$  ha, o país necessita reforçar o seu investimento para aumentar a produção de óleo de coco, se o interesse for sua utilização na indústria de biodiesel.

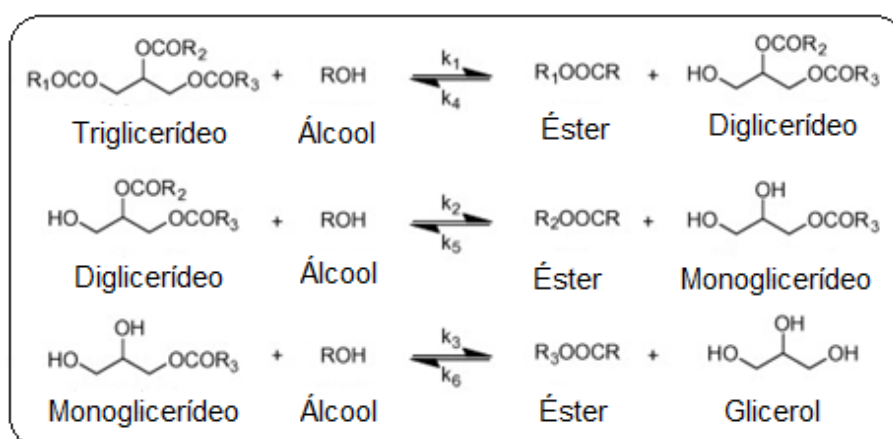
### **3.3. Processos de obtenção do biodiesel**

A produção de biodiesel mais amplamente empregada na indústria se baseia na reação de alcoólise, também denominada transesterificação, de triglicerídeos com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol). A alcoólise utiliza catalisadores homogêneos ou heterogêneos para a cisão de moléculas de triglicerídeos, produzindo três moléculas de

monoésteres alquílicos de ácidos graxos e uma molécula de glicerol a cada triglicerídeo consumido (KNOTHE *et al.*, 2006) (Figura 3.1).

Dependendo do catalisador escolhido existem certas peculiaridades associadas a esta transformação. Os catalisadores heterogêneos atuam em forma sólida, sem se misturar com o meio reacional, ao passo que os homogêneos se solubilizam durante a reação, a exemplo dos álcalis hidróxido de sódio e de potássio. Tais bases são utilizadas frequentemente em processos industriais de biodiesel e possuem como vantagens a rápida velocidade de reação, rendimentos muito elevados e condições brandas de pressão, temperatura e razão molar álcool/óleo. Entretanto, a purificação do biodiesel produzido é dispendiosa, requerendo diversas séries de lavagem, o que consome muita água e gera efluentes corrosivos (BORGES; DÍAZ, 2012).

**Figura 3.1.** Esquema de representação da transesterificação do triglicerídeo com álcool de cadeia curta.



Fonte: CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014.

Por outro lado, os catalisadores homogêneos ácidos são especialmente interessantes quando a matéria-prima contém elevada concentração de ácidos graxos livres, sendo catalisadores mais comuns desta classe os ácidos sulfúrico e sulfônico (DUPONT *et al.*, 2009). Como desvantagens, a catálise ácida requer a utilização de grandes quantidades de álcool, aplicam-se razões molares álcool/ óleo da ordem (30-150):1 para obtenção de biodiesel com rendimentos satisfatórios. Adicionalmente, os catalisadores ácidos catalisam a transesterificação de triglicerídeos lentamente mesmo sob refluxo com metanol, o que conduz a reações de longa duração (48 à 96 horas) (LIANG *et al.*, 2009). Outra limitação é

referente ao risco de corrosão do equipamento utilizado devido à elevada acidez dos catalisadores.

Para minimizar os problemas associados aos catalisadores homogêneos químicos, o uso de catalisadores heterogêneos, tem sido preconizado, incluindo nesta classe catalisadores de caráter alcalino, ácido ou bioquímico, entre os quais os catalisadores enzimáticos têm demonstrado crescente interesse (RIBEIRO *et al.*, 2011; BAJAJ *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2013).

### 3.4. Catálise enzimática

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) e atuam catalisando a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol em meio aquoso ou a reação inversa em meio orgânico (DE CASTRO *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2011). Estas enzimas pertencem a um grupo de biocatalisadores interessantes não apenas pela capacidade de atuarem sobre substratos insolúveis em água, mas também pela capacidade de catalisarem diferentes reações, tais como esterificação e transesterificação (alcoólise, acidólise e interesterificação) (DE CASTRO *et al.*, 2004).

No processo de transesterificação enzimática, a fase pesada (glicerol) é simplesmente separada da fase leve (biodiesel) e não há necessidade de desodorização nem neutralização do produto final, o que reduz a duração do processo. Um excesso de álcool promove elevados rendimentos na síntese do biodiesel e o biocatalisador imobilizado pode ser utilizado diversas vezes (ANTCZAK *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2011). A síntese enzimática do biodiesel também pode ser otimizada pela utilização de solventes no meio reacional, como terc-butanol. A primeira planta em escala industrial do mundo está operando na China e utiliza a tecnologia enzimática e o terc-butanol como co-solvente com a capacidade de 20 milhões de toneladas por ano. O processo além de estabilizar a enzima, proporciona alta produtividade (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2009).

As vantagens do processo enzimático de síntese de biodiesel incluem: (1) processo de produção simplificado; (2) menor consumo de energia; (3) pureza mais elevada do glicerol subproduto; (4) evita a formação de sabão no sistema; (5) fácil separação e reutilização de enzimas imobilizadas. Embora a catálise enzimática tenha algumas limitações, principalmente associadas a velocidades reduzidas de reação, custos mais elevados e perda de atividade ou inibição enzimática, a rota enzimática para a produção de biodiesel é atualmente considerada como uma alternativa sustentável e em crescente

ascensão com mais enzimas eficientes e menor custo de produção (BRUN *et al.*, 2011; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Para minimizar os custos da enzima, o catalisador enzimático deve ser imobilizado em suporte adequado, fornecendo adicionalmente maior eficiência de purificação do biodiesel (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014). Os processos de separação, purificação e imobilização da lipase correspondem a mais de 70% do custo final da lipase (FUKUDA *et al.*, 2008).

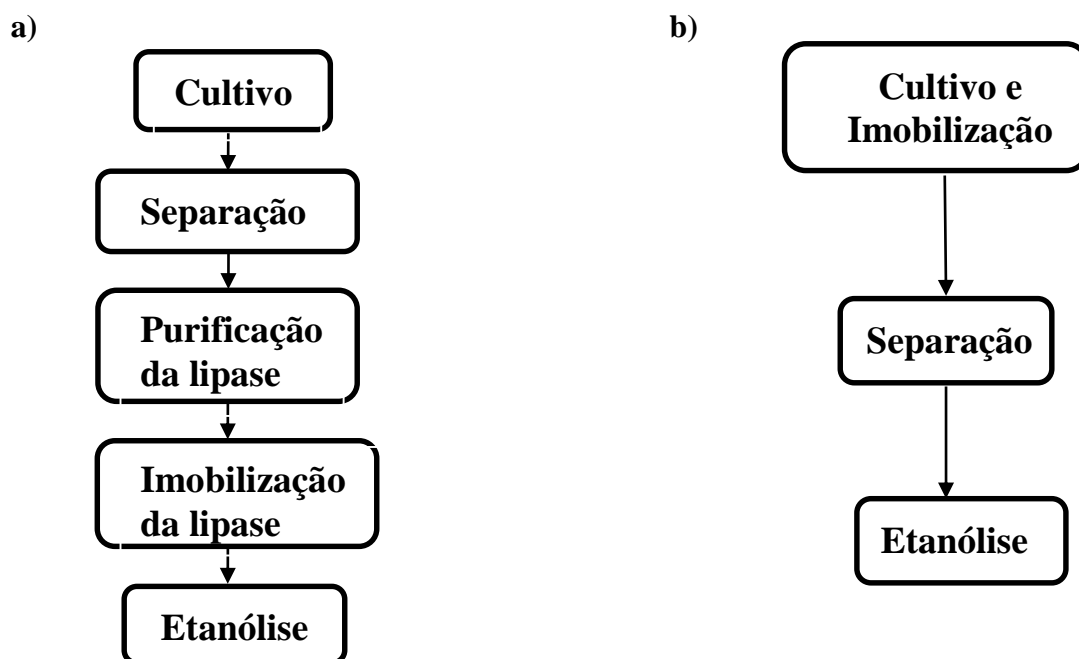
Esse fato tem motivado pesquisas visando identificar o potencial de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, para utilização como biocatalisadores (células íntegras) baseados na sua habilidade de imobilização e de exposição das proteínas funcionais de interesse na superfície de sua célula. Nesse aspecto, lipases intracelulares (lipases ligadas ao micélio) têm recebido atenção especial para utilização na síntese de biodiesel (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009; YOSHIDA *et al.*, 2012; KYEONG; YEOM, 2014).

Muitas lipases intracelulares com elevada atividade lipolítica provenientes de fungos filamentosos tem sido relatadas, com especial destaque para os gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor* (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009; XIAO; MATHEW; OBBARD, 2010; YOSHIDA *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2012; ARUMUGAM; PONNUSAMI, 2014).

As células íntegras são preparadas de maneira simples, por meio de cultivo em meio apropriado e as enzimas permanecem aderidas no interior das células. A estrutura celular age como uma matriz natural capaz de proteger as enzimas da ação de possíveis efeitos negativos de agentes externos, promovendo um efeito análogo ao empregado por matrizes comuns utilizadas na imobilização de enzimas (KANDYLIS *et al.*, 2012). Quando necessário à imobilização em suporte sólido ocorre como consequência natural do seu crescimento e podem ser facilmente separadas do meio de cultivo (PARAWIRA *et al.*, 2009).

A simplicidade da técnica de imobilização e a relativa facilidade no processo de aumento de escala utilizando fungos filamentosos conferem as células íntegras um biocatalisador com diversas vantagens comerciais (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). Uma comparação do processo de obtenção de biodiesel usando derivados imobilizados de lipase extracelular e intracelular é apresentado na Figura 3.2 (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; DU *et al.*, 2008), na qual pode ser claramente observada a redução das etapas quando lipase intracelular é usada.

**Figura 3.2.** Comparação das etapas envolvidas no processo de obtenção de biodiesel por via enzimática empregando lipase extracelular (a) e lipase intracelular (b):



Fonte: DU *et al.*, 2008.

Neste contexto, é crescente o número de trabalhos publicados tendo como enfoque a utilização desses biocatalisadores imobilizados na produção de biodiesel. Os artigos relatados na Tabela 3.1 descrevem exemplos de síntese de biodiesel a partir de óleos vegetais catalisados por células íntegras de diferentes fungos.

O trabalho pioneiro nesta área de atuação foi reportado por Ban *et al.* (2001), empregando células de *Rhizopus oryzae* imobilizadas em partículas de suporte de biomassa feitas de espumas de poliuretano na metanólise do óleo de soja. Nesse trabalho foi ainda verificado que a adição gradual de metanol (batelada alimentada) resultou em conversão similar daquela alcançada com lipases extracelulares imobilizadas. Nos anos subsequentes, esta espécie foi estudada extensivamente como principal fungo filamentosos produtor de lipase intracelular e empregado como eficiente biocatalisador na produção de biodiesel.

Recentemente, entretanto, verifica-se uma ampliação de gêneros e espécies de fungos filamentosos pesquisados como produtores de lipase intracelular, entre os quais podem ser citados *Aspergillus niger*, *Penicillium* e particularmente *Mucor circinelloides* que apresenta potencial destacado como microrganismo produtor de diversas enzimas, como lipases, proteases e amilases (XIAO; QI; OBBARD, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012, 2014) As lipases intracelulares de *M. circinelloides* podem ser aplicadas em diversos processos, como

hidrólise de triglicerídeos, síntese de ésteres e transesterificação de óleos vegetais (ANTCZAK *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2012).

Verifica-se ainda que na maioria dos trabalhos publicados a seleção do suporte tem sido direcionada para o uso de partículas de poliuretano. Entretanto, já existem relatos de utilização de outros tipos de suportes, como o tecido não tecido, alginato de cálcio e quitosana (CHEN; LIN, 2010; GANESAN *et al.*, 2012; ANTCZAK *et al.*, 2004).

Apesar da utilização das células íntegras reduzirem o número de etapas na produção de biodiesel, acarretando uma redução do custo final do processo, algumas limitações podem ser observadas. A utilização de células íntegras imobilizadas como biocatalisadores torna a síntese do biodiesel mais lenta em relação ao processo convencional catalisado por lipase extracelular (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009). Além disso, as células íntegras possuem baixa estabilidade operacional em sistemas isento de solvente (LI *et al.*, 2008).

Para contornar esses problemas, as pesquisas estão sendo direcionadas para aumentar a estabilidade operacional do biocatalisador, mediante utilização de solventes (terc-butanol), agentes de ativação (glutaraldeído) ou estabilizantes (líquidos iônicos).

**Tabela 3.1.** Processos de obtenção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando células íntegras imobilizadas (continua)

<b>Micro-organismo</b>	<b>Suporte de Imobilização</b>	<b>Matérias-primas</b>	<b>Solvente</b>	<b>Rendimento em ésteres (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>Rhizopus oryzae</i>	Esponjas de poliuretano	Metanol e óleo de soja	Isento	90	BAN <i>et al.</i> , 2001
<i>R. oryzae</i>	Esponjas de poliuretano	Metanol e óleo de soja	Isento	80	HAMA <i>et al.</i> , 2004
<i>R. oryzae</i>	Esponjas de poliuretano	Metanol e óleo de soja	Terc-butanol	70	LI; DU; LIU, 2007a
<i>R. oryzae</i>	Esponjas de poliuretano	Metanol e óleo de colza	Terc-butanol	72	LI; DU; LIU, 2007b
<i>R. oryzae</i>	Esponjas de poliuretano	Metanol e ácido oleico	Terc-butanol	90	LI <i>et al.</i> , 2008
<i>R. oryzae</i>	Esponjas de poliuretano	Metanol e óleo de pinhão manso	Isento	89	TAMALAMPUDI <i>et al.</i> , 2008
<i>R. oryzae</i>	Tecido não tecido	Metanol e óleo de soja	Isento	73	CHEN; LIN, 2010
<i>R. oryzae</i>	Alginato de cálcio	Metanol e óleo de Karanja	n-hexano	76	GANESAN <i>et al.</i> , 2012



**Tabela 3.1.** Processos de obtenção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando células íntegras imobilizadas (conclusão)

<b>Microrganismo</b>	<b>Suporte de Imobilização</b>	<b>Matérias-primas</b>	<b>Solvente</b>	<b>Rendimento de ésteres (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>R. oryzae</i>	Esponjas de poliuretano + glutaraldeído	Metanol e Óleo de soja	Isento	91,0	SUN <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus niger</i>	Esponjas de poliuretano	Metanol e Óleo de palma	Isento	87,0	XIAO; MATHEW; OBBARD, 2010
<i>R. oryzae</i>	Esponjas de poliuretano	Metanol e Óleo de soja	Isento	82,0	SUN; DU; LIU, 2011
<i>Pseudomonas sp.</i>	Alginato de Cálcio	Metanol e Óleo de algodão	Isento	70,0	ALI; KAUR; MEHRA, 2011
<i>A.niger</i>	Esponjas de poliuretano + glutaraldeído	Metanol e Óleo de palma	Isento	69,0	XIAO; QI; OBBARD, 2011
<i>Mucor circinelloides</i>	Esponjas de poliuretano	Etanol e Óleo de babaçu	Terc-butanol	90,0	ANDRADE <i>et al.</i> , 2014
<i>R. oryzae</i>	Esponjas de poliuretano	Metanol e Óleo de algodão	Isento	27,9	ATHALYE <i>et al.</i> , 2013
<i>Thermomucor indiciae seudatical</i>	Bucha vegetal ( <i>Luffa cylindrica</i> )	Etanol e Óleo de soja	Hexano	13,2	FERRAREZI <i>et al.</i> , 2014
<i>Penicillium expansum</i>	Alginato de cálcio	Metanol e Óleo de <i>Millettia pinnata</i>	Terc-butanol	68,0	HUANG <i>et al.</i> , 2014

### 3.5. *Mucor*

Espécies do gênero *Mucor* são saprófitos onipresentes na natureza pertencentes à ordem Mucorales e são encontrados em diversos *habitats*, tais como solo e ar. *Mucor* são geralmente isolados a partir tanto de matérias-primas quanto de produtos processados. Dentre os gêneros produtores de lipases podem ser citados o *Mucor hiemallis*, *Mucor miehei*, *Mucor lipolyticus*, *Mucor pusillus* e *Mucor circinelloides* (ANTCZAK *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2012; GARCIA - GALAN *et al.*, 2013).

A espécie *Mucor circinelloides* é formada por fungos fitopatogênicos (patógenos de plantas e frutos), compostas por colônias baixas e esparsas semelhantes ao algodão, podendo atingir até 60 mm de diâmetro. Possuem coloração marrom-amarelada e apresentam crescimento rápido numa temperatura máxima de 37 °C (20 mm ou mais em 7 dias). Seus esporangiósporos são formados a partir de hifas aéreas de esporângia e columelas esféricas que variam de 25 a 50 µm. São transparentes, eretos e ramificados. Com o tempo, a colônia adquire coloração marrom escuro, devido à formação de esporangiósporos escuros. Apesar de possuir características semelhantes ao gênero *Rhizopus*, o gênero *Mucor* se diferencia pela ausência de rizoídes (PITT; HOCKING, 2009).

A lipase de *Mucor circinelloides* (denominada anteriormente de *Mucor janicius*) não é excessivamente utilizada em biocatálise quando comparada as outras lipases como aquelas produzidas por *Termomyces lanuginosus*, *Mucor miehei*, *Riziphous miehei* e do gênero *Candida* (GARCIA - GALAN *et al.*, 2013), provavelmente em função de sua insuficiente disponibilidade comercial. O fornecimento da lipase de *Mucor janicius* só ocorre na forma livre, produzida pela empresa Amano Farmacêuticas (Lipase M). Alguns trabalhos são reportados na literatura que tratam da imobilização e utilização desta lipase em meio aquoso e orgânico (GARCIA – GALAN *et al.*, 2013), entre os quais destacam-se os resultados descritos por Paula *et al.* (2010), que observaram elevada atividade hidrolítica dessa lipase quando imobilizada em suporte híbrido sílica-PVA.

A utilização desta lipase ligada ao micélio do fungo *Mucor circinelloides* (células integras) tem permitido ampliar a aplicação deste biocatalisador em reações em meio orgânico, incluindo ésteres aromáticos, ésteres de açúcar e ésteres de etila a partir de óleos de baixo custo (ANTCZAK *et al.*; 2000; GARCIA – GALAN *et al.*, 2013; ANDRADE *et al.*, 2012).

O grupo polonês liderado pelo pesquisador Tadeusz Anctzak e colaboradores (2000, 2002, 2004) pode ser considerado precursor na utilização de lipase ligada ao micélio de *M. circinelloides* para mediar reações de esterificação de álcoois primários e secundários em

meio orgânico, relatando atividade moderada de células de *M. circinelloides* aprisionada em matriz sílica pelo método sol-gel (ANTCZAK *et al.*, 2000). Em seguida, vários outros artigos foram publicados usando a mesma linhagem do fungo imobilizado em diferentes matrizes, sendo observada maior estabilidade térmica e operacional em ciclos quando o micélio foi imobilizado em esferas de criogel obtidas a partir do álcool polivinílico por congelação-descongelação do sistema (ANTCZAK *et al.*, 2002). O aprisionamento do micélio em polivinil pirrolidona contendo grânulos de quitosana foi considerado uma forma eficiente de imobilizar e estabilizar a enzima para posterior aplicação em meio orgânico (ANTCZAK *et al.*, 2004). No entanto, a literatura é ainda escassa sobre o uso de células integras do fungo *Mucor circinelloides* para mediar a síntese de biodiesel (GARCIA-GALAN *et al.*, 2013), e provavelmente por esta razão os trabalhos desenvolvidos na Escola de Engenharia de Lorena tenham direcionado esforços para estabelecer um sistema imobilizado eficiente do fungo *M. circinelloides* para catalisar reações de etanólise de óleos vegetais de baixo custo (ANDRADE, 2012; ANDRADE *et al.*, 2012; 2014).

Andrade *et al.* (2012, 2014), verificaram que células integras de *Mucor circinelloides* URM 4182 imobilizada em poliuretano forneceram elevada atividade de transesterificação a partir de óleos vegetais láuricos. As condições reacionais da etanólise do óleo de babaçu foram determinadas por planejamento fatorial avaliando a influência das variáveis: razão molar (óleo/etanol) e temperatura. A análise estatística mostrou que *M. circinelloides* foi capaz de produzir ésteres de etila em todas as condições testadas, com o rendimento máximo (98,1%) à 35° C, razão molar 1:6 (óleo: etanol). Os resultados indicaram o potencial deste biocatalisador como uma alternativa de baixo custo para mediar reações de interesse industrial.

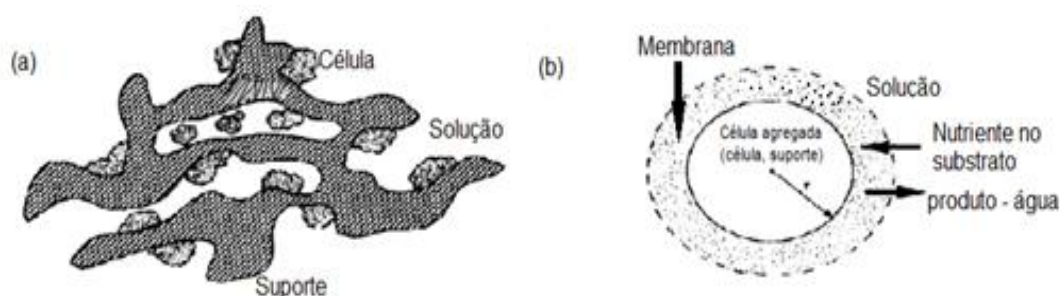
### 3.6. Imobilização de células íntegras

A imobilização de células íntegras pode ser definida como o confinamento de localização física das células numa determinada região de espaço definido, com a preservação da atividade catalítica desejada. Três questões estão implícitas nesta definição: a extensão da região de confinamento, a atividade catalítica e o tempo de meia-vida do biocatalisador (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009).

A extensão da região de confinamento refere-se diretamente ao espaço em que as células estão imobilizadas e a forma como estão dispostas neste espaço. Esta estrutura é composta por três “agregados” que se distinguem como mostrado na Figura 3.3, sendo elas:

as células, o suporte (que pode ser um sólido ou gel) e a solução que preenche o restante do espaço (seio da reação) (Figura 3.3.(a)). Este fenômeno tem sido referido na literatura como o estabelecimento do "microambiente". Apesar desta estrutura possuir caráter complexo, para fins de engenharia a agregação é geralmente considerada como uma fase homogênea em uma geometria simples (por exemplo, uma esfera ou película fina) (Figura 3.3. (b)). A segunda questão é referente à capacidade de retenção da atividade catalítica, no qual a perda de viabilidade pode acompanhar a imobilização e as células devem, pelo menos, dificultar essa perda de atividade enzimática, protegendo a enzima de ações externas. A última questão diz respeito à estabilidade do catalisador. Para ser reutilizável, uma preparação de células imobilizadas deve apresentar elevado tempo de meia-vida (NILSSON *et al.*, 1983).

**Figura 3.3.** (a) As três fases que compõem muitos sistemas de células: células imobilizadas, suporte celular, líquido intersticial. (b) Uma representação de engenharia de um sistema de célula imobilizada.



Fonte: NILSSON *et al.*, 1983.

As vantagens tecnológicas e econômicas de células imobilizadas quando referente a enzimas são bem conhecidas: maior estabilidade operacional, rendimentos mais elevados de atividade enzimática após imobilização, maior resistência às perturbações ambientais, maior potencial de processamento em várias etapas e menor custo nos processo de obtenção da enzima devido à purificação e extração não serem necessários (ANDRADE *et al.*, 2014). Apesar destes benefícios, poucas investigações são relatadas sobre o uso de células imobilizadas na síntese de biodiesel (LI; DU; LIU, 2007 a,b; TAMALAMPUDI *et al.*, 2008; FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009; ANDRADE *et al.*, 2012; KYEONG, YEOM, 2014).

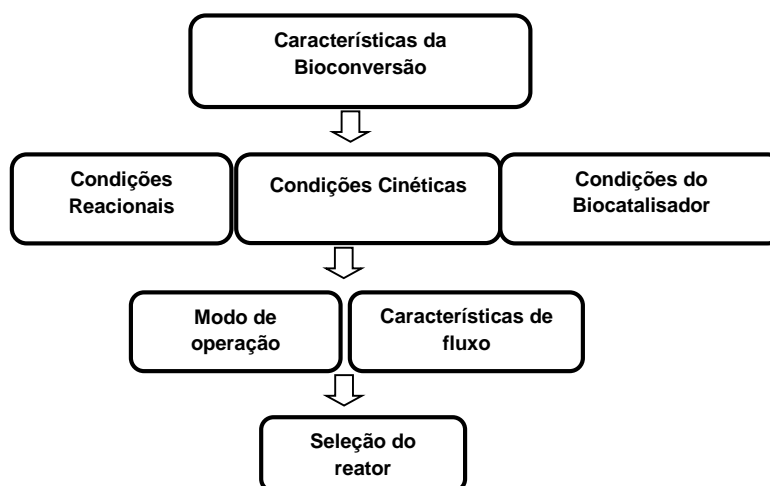
Os esforços de pesquisa se concentraram na imobilização, principalmente, utilizando o fungo *R. oryzae* em partículas de suportes porosos. Tal fixação é conseguida espontaneamente durante o cultivo em lotes. Tem sido demonstrado que células da biomassa

de *R. oryzae* imobilizada nas partículas de poliuretano podem ser utilizadas como catalisador de baixo custo para a produção de biodiesel (SUN *et al.*, 2010).

### 3.7. Emprego de células imobilizadas em biorreatores

Entre todas as possíveis aplicações para as células imobilizadas, sua utilização em escala industrial é a mais importante. O emprego desses biocatalisadores em processos industriais tem sido realizado em diferentes configurações de reatores, sendo que cada um deles apresenta vantagens e desvantagens, não havendo um método teórico capaz de prever qual o melhor biorreator para um dado processo. A seleção do reator mais apropriado para um determinado bioprocessamento depende das características da bioconversão e de condições reacionais, cinéticas e ligadas ao biocatalisador, que vão determinar o modo de operação e as características do fluxo (Figura 3.4) (AIRES-BARROS, 2002).

**Figura 3.4.** Considerações importantes para seleção do biorreator.



Fonte: AIRES-BARROS, 2002.

As características de um biorreator devem compreender simplicidade de concepção, flexibilidade, segurança de operação e possibilidade de monitoramento e controle de parâmetros operacionais. A concepção do biorreator requer um conhecimento adequado da cinética reacional, da hidrodinâmica do sistema e dos mecanismos de transferência de massa. No caso de bioconversões em sistemas multifásicos devem ser ainda considerados os fenômenos interfaciais, a partição do substrato e do produto entre as duas fases e a facilidade de separação das duas fases, com vista a uma integração eficaz das etapas de bioconversão e de recuperação do produto (FERNANDES, 2010).

Os biorreatores podem ser classificados em reatores para sistemas particulados, reatores tipo placas e reatores lineares, podendo operar em modo batelada ou contínuo. Compreendem os tipos: tanque agitado em batelada (STR), tanque agitado contínuo (CSTR), leito fixo (PBR) e leito fluidizado (FBR) (ZANIN; MORAES, 2004; FERNANDES, 2010).

Biorreatores de tanque agitado têm sido os mais comumente apresentados na literatura para estudos com lipases. Estes sistemas apresentam, entretanto, algumas desvantagens para uso em escala industrial, uma vez que os sistemas imobilizados não podem ser carregados em grande quantidade no reator e são susceptíveis à quebra devido às altas tensões de cisalhamento impostas pela agitação mecânica (BREGUET; VOJINOVIC; MARISON, 2009). Entretanto, a sua concepção tem a vantagem de permitir um maior contato entre reagentes e biocatalisador, que por sua vez aumenta a velocidade de reação e a eficiência biocatalítica (FERNANDES, 2010).

O leito fixo ou empacotado tem sido tradicionalmente usado para a maioria dos reatores catalíticos em larga escala, devido à sua alta eficiência, baixo custo e facilidade de construção e operação. Ele requer um mínimo de equipamentos auxiliares e é muito eficiente. Esse tipo de reator usualmente proporciona uma maior área superficial para a reação, por unidade de volume, no entanto existem dois obstáculos que devem ser considerados quando se opera com reatores de leito fixo: limitações difusionais intraparticulares que afetam a velocidade global de reação e alta queda de pressão no escoamento do fluido do leito (ZANIN; MORAES, 2004).

No que se refere ao estado da arte, são escassos os trabalhos que descrevem a aplicação de células íntegras imobilizadas na síntese de biodiesel operando de modo contínuo. Exemplos são apresentados na (Tabela 3.2). Tomando por base essas considerações, e visando preservar ao máximo a perda de massa proveniente do desprendimento de células das esponjas de imobilização, neste estudo optou-se por utilizar as configurações de reatores do tipo leito fixo.

**Tabela 3.2.** Processo de obtenção de biodiesel em biorreatores de leito fixo operando em regime de fluxo contínuo utilizando células íntegras imobilizadas.

Microorganismo	Matérias-primas	Condições	Rendimento ésteres (%)	Referência
<i>R. oryzae</i>	Óleo de soja/metanol/água	1: 4 (óleo/ álcool), 150 rpm, 30°C	90,0	HAMA <i>et al.</i> , 2007
<i>R. oryzae</i>	Óleo de colza e soja/ metanol	1: 4,25 (óleo/ álcool), 96h	96,1	YOSHIDA <i>et al.</i> , 2012
<i>M. circinelloides</i>	Óleo de babaçu/ etanol/ terc-butanol	1:6 (óleo: álcool), 35°C, 336h	56,0	ANDRADE <i>et al.</i> , 2012
<i>R. oryzae</i>	Óleo de soja/ metanol	1:4,5 (óleo/ álcool), 30°C, 80h	90,0	KYEONG; YEOM, 2014
<i>R. oryzae</i>	Óleo de calophyllum inophyllum/ metanol	1:12 (óleo: álcool), 35°C, 72h	87,0	ARUMUGAM, PONNUSAMI, 2014

### 3.8. Líquidos Iônicos

Os líquidos iônicos (LIs) são sais constituídos por cátions orgânicos e por ânions que podem ser orgânicos ou inorgânicos (EARLE *et al.*, 2006). A característica mais interessante é a possibilidade de desenhar uma molécula visando uma aplicação específica ou a fim de obter um determinado conjunto de propriedades (ROOSEN; MULLER; GREINER, 2008; WELTON, 1999). Estes sais têm sido utilizados em vários campos tais como síntese orgânica (FORBES; LAW; MORRISON, 2006), catálise enzimática (RANTWIJK; SHELDON, 2007), alquilações e acilações de Friedel-Crafts (BOON *et al.*, 1986), cicloadição de Diels-Alder (FISCHER *et al.*, 1999) e substituições nucleófilas aromáticas (D'ANNA *et al.*, 2006).

Mais recentemente, existe uma tendência crescente de utilização dos Lis como agentes estabilizantes de catalisadores para mediar a síntese de biodiesel a partir de óleos vegetais e gorduras animais (GHIACI *et al.*, 2011). Suas versáteis propriedades elucidam as vantagens em relação a solventes orgânicos e inorgânicos convencionais, motivando estudos visando a substituição de solventes convencionais por Lis, em particular nas reações catalisadas por enzimas. A Tabela 3.3 descreve a aplicação de diferentes Lis na síntese enzimática de biodiesel.

Nos estudos reportados por Gamba e colaboradores (2008), foi utilizado lipase na presença do LI (1-n-butil-3-metilimidazólio (bis(trifluorometil) sulfonil) imida ([BMIM][NTf<sub>2</sub>])) para a produção de biodiesel por metanólise do óleo de soja. O rendimento mais elevado (96%) foi obtido a 30 °C em 48 horas de reação. Os autores atribuíram o resultado alcançado devido à extração do glicerol formado na transesterificação da mistura constituída de líquido iônico e álcool, deslocamento o equilíbrio da reação no sentido do produto formado. Desta forma o glicerol foi facilmente recuperado por decantação e o biocatalisador pode ser reutilizado pelo menos 4 vezes sem perda de atividade e seletividade catalítica. Ruzich e Bassi (2010), utilizaram líquido iônico (1-Butil-3- metilimidazólio hexafluorofosfato) ([BMIM] [PF<sub>6</sub>])) como agente estabilizante da enzima, na produção de biodiesel utilizando acetato de metilla como receptor de acila. Enquanto o líquido iônico foi usado para melhorar a atividade e estabilidade da lipase, o acetato de metila evitou a desativação da enzima, uma vez que, a reação de transesterificação forma triacetilglicerol, que não inibe ou desnatura a lipase.



**Tabela 3.3.** Processos de obtenção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando líquido iônico no meio reacional.

<b>Microorganismo</b>	<b>Matéria prima</b>	<b>Líquido iônico</b>	<b>Condições</b>	<b>Rendimento ésteres (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo de soja/metanol	[BMIM][NTf <sub>2</sub> ]	1:5 (óleo/álcool), 30°C, 200 rpm, 48h	96,0	GAMBA; LAPIS; DUPONT, 2008
<i>R. oryzae/</i> <i>A. oryzae</i>	Óleo de soja/etanol/água	[BMIM][BF <sub>4</sub> ]	1:8 (óleo/álcool), 30°C, 150 rpm, 72h	99,0	ARAI <i>et al.</i> , 2010
Novozym 435	Óleo de canola/metanol	[BMIM][PF <sub>6</sub> ]	1:14 (óleo/álcool), 48°C, 24h	72,0	RUZICH; BASSI, 2010
<i>Penicillium expansum</i>	Óleo de milho/metanol	[BMIM][PF <sub>6</sub> ]	1:2 (óleo/álcool), 40°C, 200 rpm, 24h	86,0	ZHANG <i>et al.</i> , 2011
<i>Burkholderia cepacia</i>	Óleo de soja/metanol	[OmPy][BF <sub>4</sub> ]	40°C, 200 rpm, 12h	82,2	LIU <i>et al.</i> , 2011
Novozym 435	Trioleína/metanol	[C <sub>16</sub> MIM][NTf <sub>2</sub> ]	1:6 (óleo/álcool), 60°C, 1000 rpm, 3h	90,3	DIEGO <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium expansum</i>	Óleo de microalga/metanol	[BMIM][PF <sub>6</sub> ]	1:3 (óleo/álcool), 40°C, 220 rpm, 48h	90,7	LAI <i>et al.</i> , 2012
<i>Candida antarctica</i>	Trioleína/metanol	[C <sub>10</sub> MIM]	1:7 (óleo/álcool), 45°C, 1000 rpm, 30min	95,0	LOZANO <i>et al.</i> , 2012
<i>Penicillium expansum</i>	Óleo de semente de <i>Millettia pinnata</i> /metanol	[BMIM][PF <sub>6</sub> ]	1:3 (óleo/álcool), 40°C, 220 rpm, 48h	93,5	HUANG <i>et al.</i> , 2014

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Microrganismo

A linhagem do fungo filamentosso *Mucor circinelloides* f. *griseo-cyanus* URM 4182 foi adquirida da coleção de cultura da Micoteca URM do Departamento de Micologia (CCB/UFPE) e conservado sob refrigeração a 4 °C em meio BDA (Batata Dextrose Agar–Difco), conforme recomendações do banco de culturas, sendo repicado a cada dois meses. O repique foi feito em tubos de ensaio contendo o meio BDA inclinado, com a ajuda de uma alça metálica. Após o repique, os tubos de ensaio contendo os esporos foram incubados em estufa a 30 °C durante 7 dias e em seguida estocados em posição vertical sob-refrigeração à 4 °C.

#### 4.1.2. Suporte de Imobilização

Como suporte foi utilizado espuma de poliuretano comercial (Scotch Brite®) cortado em cubos (6 mm<sup>3</sup>) com densidade aparente de 0,02 ± 0,01 g/cm<sup>3</sup> e diâmetro médio de poros de 0,36 ± 0,14 mm (ANDRADE *et al.*, 2012). Para eliminação de agentes bactericidas presentes nas espumas, os cubos cortados foram imersos em solução aquosa de ácido nítrico 0,1M por um período de 24 horas, lavados em água corrente até atingirem pH 7,0 e em seguida levados à secagem a temperatura ambiente.

#### 4.1.3. Matéria-prima

Como matéria-prima lipídica foi utilizada o óleo de coco adquirido da FRESCOCO (São Paulo-SP), tendo uma composição aproximada em ácidos graxos de: 8,9% Caprílico, 6,2% Cáprico, 47,1% Láurico, 18,8% Mirístico, 7,9% Palmítico, 2,6% Esteárico, 6,1% Oleico e 1,6% Linoleico. Outras características da amostra do óleo de coco incluem: massa molecular (682 gmol<sup>-1</sup>), índice de acidez (0,4 mg KOH g<sup>-1</sup>), índice de saponificação (247 mg KOHg<sup>-1</sup>), índice de iodo (11 g I<sub>2</sub>g<sup>-1</sup>), índice de peróxido (0,4 mEqkg<sup>-1</sup>) e viscosidade (26,75 mm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>).

#### **4.1.4. Outros reagentes**

Os demais reagentes utilizados foram: Solvente terc-butanol (Cromoline), agente acilante etanol anidro (99,8%, Cromoline), agente estabilizante líquido iônico (1-butil-3-metilimidazolio bis (trifluorometilsulfonilo) imida), acetona (Cromoline), óleo de oliva virgem com acidez baixa (Carbonell) e goma em pó pura (Synth). Os padrões cromatográficos foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

## **4.2. Metodologia Experimental**

### **4.2.1. Esterilização dos meios e equipamentos**

Para garantir condições estéreis de crescimento do fungo, os meios de cultura bem como todos os materiais foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Os materiais residuais foram esterilizados 121 °C por 30 min, antes do descarte.

### **4.2.2. Preparo do meio de cultura**

O fungo foi cultivado em meio de cultura líquido composto por óleo de oliva 30g/L, peptona (Himedia) 70g/L, NaNO<sub>3</sub> (Vetec) 1g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth) 1g/L e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Vetec) 0,5g/L). Em Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 100 mL de meio de cultura e posteriormente esterilizados em autoclave (121°C/15 min).

### **4.2.3. Preparo das células íntegras**

As células íntegras foram preparadas utilizando a técnica de fermentação submersa, realizada em Erlenmeyers de 250 mL, contendo os 100 mL de meio de cultura, preparado conforme item 4.2.2., juntamente com os cubos de poliuretano. Para preparo do inóculo, os esporos foram raspados do tubo de ensaio, suspensos em água estéril e submetidos à agitação até obtenção de uma suspensão. A concentração de esporos na suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Um volume contendo 1x10<sup>6</sup> esporos do fungo foi inoculado em Erlenmeyers, os quais foram incubados por 72h a 30 °C sob agitação orbital em shaker (170 rpm). A biomassa imobilizada foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, lavada com acetona e levada a secagem em dessecador sob alto vácuo. Da biomassa imobilizada foram quantificados a atividade lipolítica e teor umidade.

#### 4.2.4. Influência da quantidade de espumas de poliuretano na imobilização da biomassa celular

As espumas de poliuretano foram adicionadas em diferentes quantidades (25, 50, 75 e 100 cubos) em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura e após esterilização procedeu-se a inoculação conforme descrito no item 4.2.3. A biomassa imobilizada foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, lavada com acetona e seca em dessecador sob vácuo. Nesta série de ensaios foi determinada a concentração de biomassa livre e imobilizada e a atividade lipolítica do sistema imobilizado.

#### 4.2.5. Determinação das propriedades bioquímicas e cinéticas

A influência das variáveis (pH e temperatura) na atividade hidrolítica (U/g) do biocatalisador imobilizado foi investigada empregando o planejamento fatorial completo  $2^2$  face centrada (Tabela 4.1.). Os ensaios foram conduzidos de forma randômica, sendo realizadas três triplicatas no ponto central, para estimar o erro experimental. Os resultados foram analisados empregando o programa Statistica versão 8.0. A significância estatística da regressão individual dos coeficientes e o modelo matemático foram determinados por tabelas de análise de variância (ANOVA), graus de liberdade (GL), soma de quadrática dos fatores (SQF), soma média quadrática (SMQF), teste F e nível de significância ( $p$ ).

**Tabela 4.1.** Matriz experimental das variáveis de influência (pH e temperatura) e a faixa experimental de acordo com o planejamento fatorial para analisar o efeito sobre a atividade hidrolítica da lipase imobilizada em poliuretano.

Variável	Faixa experimental		
	-1	0	1
pH	6	7	8
Temperatura (°C)	30	37	44

Para o cálculo da constante de Michaelis-Menten foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variáveis obtidos a partir de emulsões preparadas com azeite de oliva (10 a 60%) e solução aquosa de goma arábica (7% m/v). As velocidades iniciais das reação de hidrólise catalisada pela preparação de lipase foram determinadas de acordo com item 4.3.1. As constantes cinéticas  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram calculadas pelo Programa Origin 8.0.

## 4.2.6. Produção de biodiesel

### 4.2.6.1. Sistema descontínuo

A síntese de biodiesel foi realizada em frascos Erlenmeyer de capacidade de 250 mL contendo 30 g de meio reacional composto por óleo de coco e etanol na razão molar 1:8 (óleo/álcool) e o mesmo volume do meio reacional de terc-butanol empregado como solvente da reação. O meio reacional foi incubado com 20% de biocatalisador em relação à massa total de reagentes de partida. As reações foram conduzidas a 35 °C sob agitação orbital de 170 rpm em shaker por 144h. Amostras foram retiradas a cada 24h para posterior dosagem dos ésteres de etila formados, conforme metodologia estabelecida por Urioste *et al.* (2008).

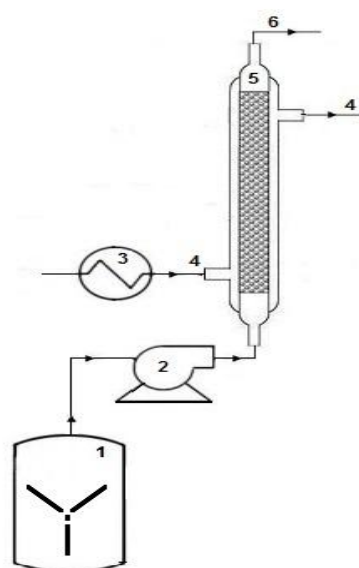
Numa segunda etapa foram realizados testes visando reduzir a proporção do solvente terc-*butanol* em relação ao meio reacional (50-15%) ou substituir a atuação de terc-butanol por líquido iônico em diferentes proporções (10-50% m.m). O meio reacional era composto de óleo de coco e etanol na razão molar 1:8. O meio foi incubado com 10% de biocatalisador em relação à massa total de reagentes de partida. As reações foram conduzidas à temperatura de 35 °C sob agitação orbital de 170 rpm em shaker por 144h. Amostras foram retiradas em tempos pré-determinados para posterior análise dos produtos formados.

### 4.2.6.2. Sistema contínuo

As sínteses de biodiesel em fluxo contínuo foram realizadas em reatores de leito fixo com colunas de vidro de dimensões diferentes: Reator A (diâmetro interno= 45 mm, comprimento = 190 mm); Reator B (diâmetro interno= 30 mm, comprimento = 420 mm) encamisadas com capacidade nominal de 310 e 300 cm<sup>3</sup> respectivamente. A temperatura do sistema foi mantida constante (35°C) e controlada por banho termostático (Figura 4.1). O meio reacional composto por óleo de coco e etanol (razão molar 1:8 óleo/etanol) e terc-butanol como solvente (razão volumétrica 1:1 (óleo/terc-butanol), foi mantido em um frasco de alimentação sob agitação magnética a 35°C. A coluna foi empacotada com 18g (Reator A) e 15g (Reator B) de células imobilizadas (densidade cristalina de 1,08 ± 0,01 g/cm<sup>3</sup>) (FARIA *et al.*, 2014), correspondendo a um volume útil de 293 mL e 286 mL respectivamente. A alimentação do reator foi efetuada por meio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-Atto), em fluxo ascendente com variadas vazões correspondendo a diferentes tempos espaciais de 60, 70 e 80 horas. A duração global do experimento foi no máximo de 30 dias. Amostras na saída do reator foram coletadas em intervalos de 24h para a quantificação de ésteres etílicos formados e viscosidade dos ésteres purificados.

Ao final do experimento as células imobilizadas foram removidas do reator e lavadas com terc-butanol, a fim de remover substrato e produto remanescente na matriz. A atividade hidrolítica das células recuperadas foi medida pelo método de hidrólise do óleo de oliva (ANDRADE *et al.*, 2012).

**Figura 4.1.** Esquema simplificado do reator de leito fixo: 1- Tanque de alimentação com agitação magnética, 2- Bomba peristáltica, 3- Banho termostático, 4- Circulação de água, 5- Coluna, 6- Saída de produto.



Configuração dos reatores:

1 - Reator A (relação  $l/d$ )=  $190/45=4,2$

2- Reator B (relação  $l/d$ )=  $420/30=14$

Fonte: Própria.

#### 4.2.7. Cálculo da distribuição do tempo de residência

Para o cálculo da Distribuição do Tempo de Residência no reator de leito fixo, foi realizado um teste de traçador (corante lipossolúvel CI 61554) tipo pulso. Inicialmente, foi efetuada uma varredura de frequências em espectrofotômetro na faixa da luz visível (UV-Visível Varian modelo Cary 50), empregando-se uma concentração de traçador (15%) diluída no meio reacional óleo de coco e etanol (razão molar óleo: etanol de 1:8), visando determinar o comprimento de onda no qual a absorbância era máxima. Em seguida, empregando-se o comprimento de onda determinado (646 nm), foi construída a curva de calibração correlacionando a leitura da absorbância em função da concentração de traçador.

Para a realização do ensaio de Distribuição do Tempo de Residência utilizou-se o reator de coluna de capacidade de  $300 \text{ cm}^3$  (Reator B) empacotado com 15 gramas de biocatalisador imobilizada. O traçador (corante lipossolúvel CI 61554) na concentração de

15% em meio reacional foi injetado com o auxílio de uma bomba peristáltica, tendo sido injetado 0,7615g da mistura. O reator foi alimentado com meio reacional numa vazão fixa de 0,4 mL.min<sup>-1</sup>, sendo retiradas amostras na saída a cada 30 minutos por um período total de 13h, considerando-se como tempo inicial do ensaio o momento da injeção do traçador.

Os valores de concentração do corante na saída do reator foram calculados segundo equação obtida na curva de calibração. Por meio dos valores determinados, foi plotado um gráfico de concentração do corante (mg.mL<sup>-1</sup>) em função do tempo e um modelo matemático exponencial foi ajustado aos pontos obtidos. A função da distribuição do tempo de residência, E(t) foi calculada pela equação 4.1, considerando a constante vazão volumétrica utilizada.

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (4.1)$$

Em que:

C(t) = a concentração do corante no tempo t (g.mL<sup>-1</sup>) e t = tempo (h).

Para determinar o valor do denominador da equação 4.1, foi construído um gráfico de C(t) versus t e com o auxílio do software OriginPro versão 8.0, na função da distribuição do tempo de residência, E(t), foi determinada e o tempo médio de residência (t<sub>m</sub>), que corresponde ao tempo espacial (τ), foi calculado pela equação 4.2.

$$\tau = t_m = \int_0^{\infty} t.E(t)dt \quad (4.2)$$

#### 4.2.8. Purificação do biodiesel

As amostras obtidas nos testes conduzidos em regime descontínuo ou contínuo foram purificadas, por meio de lavagem com água para remoção do glicerol, conforme metodologia descrita por Carvalho, 2011. A fase composta pelos ésteres de etila foi submetida à centrifugação e à evaporação em rota-evaporador para remoção do solvente e do etanol, sendo a água residual retirada pela adição de sulfato de sódio anidro.

### 4.3. Metodologia analítica

#### 4.3.1. Atividade hidrolítica

A atividade enzimática das células imobilizadas foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Andrade *et al.* (2012). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 mL de azeite de oliva e 90 mL de goma arábica a 3% (m/v). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 0,1 a 0,3 g de células imobilizadas (massa seca). Os frascos foram incubados a 37°C por 10 - 30 min, em banho termostatizado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona, etanol e água destilada (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,025 M, utilizando fenolftaleína com indicador. Os cálculos foram realizados pela equação 4.3 e 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 expressas em μmoles/g.min (U/g).

$$Atividade \left( \frac{\mu mol}{g} \cdot min \right) = \frac{(V_A - V_B) \times M \times 1000}{t \times m} \quad (4.3)$$

Em que:  $V_A$  = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL),  $V_B$  = volume do KOH gasto na titulação do branco (mL),  $M$  = molaridade da solução de KOH (mol. L<sup>-1</sup>),  $t$  = tempo de reação em min,  $m$  = massa em gramas.

#### 4.3.2. Teor de umidade

A umidade do suporte (espumas de poliuretano) bem dos sistemas imobilizados foi aferida diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (Marte ID 50).

#### 4.3.3. Determinação dos ésteres de etila por cromatográfica gasosa

Os ésteres de etila formados foram quantificados antes da purificação, empregando cromatógrafo à 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). Nitrogênio foi o 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. Utilizou-se o programa Galaxie Chromatography Data System version 1.9. O volume de injeção foi de 1 µL em hexano e padrão interno (hexanol) e a quantificação foi realizada pela calibração interna apresentada na Tabela 4.2, conforme estabelecido por Urioste *et al.* (2008).

**Tabela 4.2.** Condições de operação para a determinação dos ésteres etílicos purificados.

<b>Gás de arraste</b>	Nitrogênio	
<b>Atenuação do cromatógrafo</b>	A, B, C = 16	
<b>Preparo da amostra</b>	0,1g de amostra em 0,3g de hexano	
<b>Amostra para injeção</b>	1:1 (amostra: padrão interno)	
	<b>Minutos</b>	
<b>Tempos de retenção dos Monoésteres de etila</b>	C8 EtOH	3,28
	C10 EtOH	5,26
	C12 EtOH	8,56
	C14 EtOH	12,06
	C16 EtOH	13,96
	C18 EtOH	17,10
	C 18:1 EtOH	17,81
	C 18:2 EtOH	19,26

#### 4.3.4. Ésteres purificados

##### 4.3.4.1. Determinação da viscosidade absoluta

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram realizadas a 40 °C, empregando aproximadamente 0,5 mL de amostra.

##### 4.3.4.2 Densidade do biodiesel

Os valores de densidade foram determinados utilizando um densímetro digital Modelo DMA 35n EX (Anton Paar). As medidas foram realizadas a 20°C, empregando-se 2,0 mL da amostra purificada.

#### 4.3.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

As amostras purificadas de biodiesel foram submetidas análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinar os teores de monoglicerídeos e diglicerídeos. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo Agilent modelo 1260 Infinity ELSD, com detector evaporativo de espalhamento de luz e coluna de aço inoxidável Phenomenex Gemini 5  $\mu\text{m}$  C18 11HPLC (JT Baker, Avantor Performance Materials). A fase móvel constituiu de acetonitrila (A) e metanol (B), com uma proporção de solventes de 80% de A e 20% de B, por 35 minutos. Uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min foi mantida por 6 min, seguida de 1,5 mL/minuto por 24 minutos e 3,0 mL/min por 5 min.

As amostras de biodiesel foram dissolvidas em acetato de etila/hexano (1:1, v/v), sendo injetadas em volumes de 10  $\mu\text{L}$ . Os padrões utilizados de monoglicerídeos e diglicerídeos 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. Cálculos

#### 4.4.1. Rendimentos de transesterificação

O rendimento ( $R$ ) das sínteses de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila ( $M_t$ ) em relação à massa total teórica esperada de ésteres de etila ( $\sum M_e$ ).  $M_e$  é determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial do óleo vegetal ( $M_o$ ), da massa molecular correspondente a cada ácido ( $MM_a$ ) e do éster correspondente ( $MM_e$ ). Este cálculo é representado pela equação (4.4a) em que  $M_o$  corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo ( $C_a$ ), com a massa inicial de óleo utilizada ( $M_i$ ) (equação 4.4b). O rendimento foi calculado utilizando a massa total de ésteres obtida pela análise por cromatografia gasosa ( $M_t$ ) pela massa total teórica de ésteres de etila ( $\sum M_e$ ), conforme mostrado na equação (4.4c).

$$M_e = \frac{(M_o \cdot MM_e)}{MM_a}$$

(4.4a)

$$M_o = C_a \cdot M_i$$

(4.4b)

$$R = \frac{M_t}{\sum M_e} \cdot 100$$

(4.4c)

Em que:  $M_t$  = massa total de ésteres de etila produzidos (g);  $M_e$  = massa teórica máxima de ésteres de etila (g);  $M_o$  = massa de ácidos graxos presentes na massa inicial do óleo de coco; (g)  $MM_a$  = massa molecular do ácido graxo ( $\text{g}\cdot\text{gmol}^{-1}$ );  $MM_e$  = massa molecular do éster de etila ( $\text{g}\cdot\text{gmol}^{-1}$ );  $C_a$  = concentração mássica do ácido graxo no óleo vegetal testado ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ );  $M_i$  = massa inicial de óleo vegetal (g);  $R$  = rendimento (%).

#### 4.4.2. Tempo espacial ( $\tau$ )

O tempo espacial foi calculado de acordo com Levenspiel (2000), conforme as equações 4.5 (a), (b) e(c):

$$\tau = \frac{V}{v_0}$$

(4.5a)

$$V = V_{\text{reator}} - V_{\text{catalisador}}$$

(4.5b)

$$V_{\text{catalisador}} = \frac{w}{\rho}$$

(4.5c)

Em que:  $\tau$  = é o tempo espacial (min),  $V$  = volume útil do reator (mL),  $v_0$  = vazão volumétrica sobre a seção da coluna ( $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ ),  $V_{\text{reator}}$  = volume total do reator,  $V_{\text{catalisador}}$  = volume ocupado pelo catalisador no interior do reator,  $w$  = massa do catalisador seco (g),  $\rho$  = densidade do biocatalisador seco ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

#### 4.4.3. Tempo de meia-vida do biocatalisador

A constante de desativação do biocatalisador ( $k_d$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foram determinados por meio das equações 4.6 e 4.7, respectivamente.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-k_d \cdot t} \quad (4.6)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (4.7)$$

Em que:  $A_0$  e  $A$  referem-se, respectivamente, as atividades hidrolíticas inicial e residual do biocatalisador.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos anteriores desenvolvidos na EEL-USP (ANDRADE *et al.*, 2012; 2014) indicaram que mediante a utilização de um biocatalisador de baixo custo (células integras de *Mucor circinelloides* URM 41 imobilizadas em poliuretano) e o emprego de um sistema simples, foi possível sintetizar biodiesel em regime descontínuo e contínuo a partir da etanólise do óleo de babaçu. Apesar do elevado tempo de meia-vida do biocatalisador (40 dias) a conversão obtida em fluxo contínuo foi 40% menor em relação a obtida em regime descontínuo. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer condições reacionais adequadas da etanólise do óleo de coco em reator de leito fixo avaliando variáveis importantes do processo, tais como: atividade catalítica do biocatalisador, razão molar entre os componentes do meio reacional, dimensões do reator e fluxo de alimentação do meio reacional.

### 5.1. Determinação da massa de suporte para imobilização *in situ* das células de *Mucor circinelloides*

Para estabelecer a quantidade ótima de massa de suporte (unidades cubos de poliuretano) para imobilização das células de *Mucor circinelloides* durante o cultivo, foi efetuado um teste no qual o número de cubos de poliuretano foi variado entre 25 a 100 unidades. Um cultivo na ausência de suporte foi também efetuado. Após o cultivo de 72h sob agitação de 170 rpm e 30 °C, foram avaliados os parâmetros como a quantidade de biomassa imobilizada e não imobilizada, atividade hidrolítica do derivado imobilizado, bem como a eficiência de imobilização, conforme mostrado na Tabela 5.1.

Andrade *et al.* (2012), pesquisaram a imobilização da biomassa de diferentes fungos com alta atividade lipolítica em suportes de poliuretano e constataram que as alterações morfológicas das células livres e imobilizadas em poliuretano afetam diretamente na atividade catalítica das enzimas intracelulares. Resultados similares foram obtidos por Antczak *et al.* (2007), que elucidaram as diferenças nas atividades da lipase intracelular entre as células cultivadas livremente e as imobilizadas em poliuretano comprovando também que alterações nos valores de atividade podem ser em virtude das alterações morfológicas causadas pela diferença das condições de cultivo.

**Tabela 5.1.** Dados referentes à imobilização in situ do fungo *M. circinelloides* URM 4182 em meio contendo diferentes massas de suporte.

<b>Unidade de PU</b>	<b>Massa PU (g)</b>	<b>Massa (BIO+PU)</b>	<b>Biomassa Imobilizada (g)</b>	<b>Biomassa não imobilizada (g)</b>	<b>Total de biomassa (g)</b>	<b>Eficiência de imobilização (%)</b>	<b>Atividade biomassa (U/g)</b>	<b>Biomassa por cubo (g)</b>
0	-	-	-	-	4,2670	-	62,75	-
25	0,1574	1,7047	1,3700	0,6052	1,9752	69,36	60,23	0,055
50	0,3083	2,4156	1,9268	0,3269	2,2537	85,49	52,35	0,038
75	0,4796	3,1099	2,6400	0,2233	2,8633	92,20	49,37	0,035
100	0,6357	3,7632	3,1275	0,1619	3,2894	95,08	48,44	0,031

Verificou-se a partir dos resultados tabelados (Tabela 5.1) que quanto maior o número de unidades de cubos de poliuretano no meio de cultivo maior massa de biomassa fica retida nos poros do suporte. No caso de quantidades menores que 100 unidades de cubos no cultivo/imobilização constatou-se que grande parte da biomassa produzida não aderiu ao suporte, ficando dispersa no meio de cultivo, provavelmente devido a quantidade insuficiente de suporte utilizado. A eficiência de imobilização mais elevada registrada para o cultivo contendo 100 cubos de poliuretano indica que o aumento da área superficial disponível de cubos de poliuretano conduziu a maior retenção de biomassa no interior das células e aderência ao suporte, permitindo assim a atuação da lipase retida na membrana na catálise da reação de hidrólise.

Desta forma foi possível validar as condições estabelecidas anteriormente por Andrade *et al.* (2012), que determinou uma quantidade de 100 unidades de cubo por cultivo.

## **5.2. Propriedades bioquímicas e cinéticas do biocatalisador imobilizado**

### **5.2.1. Propriedades bioquímicas**

O delineamento experimental foi utilizado como ferramenta para estudar o efeito combinado das variáveis: pH ( $X_1$ ) e temperatura ( $X_2$ ) na atividade da biomassa imobilizada. Para tanto, utilizou-se um planejamento fatorial completo  $2^2$  face centrada com três replicatas no ponto central, considerando como variável resposta a atividade hidrolítica (U/g) obtida no biocatalisador imobilizado. A faixa de pH foi de 6,0 a 8,0 e a faixa de temperatura foi de 30 °C a 44 °C. A matriz experimental e os resultados obtidos em cada ensaio estão descritos na Tabela 5.2

As atividades hidrolíticas variaram entre 173 a 202 U/g e as atividades mais elevadas foram obtidas para os níveis de temperatura (37 °C) e pH (7,0).

Os resultados da Tabela 5.2 foram usados para estimar os efeitos das variáveis principais e suas interações (Tabela 5.3). A análise estatística dos resultados mostrou o efeito linear e quadrático significativo e positivo para a variável pH, em 90% do nível de confiança. Para variável temperatura, por outro lado, não foi obtido efeito significativo neste nível de confiança.

**Tabela 5.2.** Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento fatorial utilizado para avaliar a influência das variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da lipase imobilizada em poliuretano.

Ensaio	pH (X <sub>1</sub> ) codificadas (reais)	T (°C) (X <sub>2</sub> ) codificadas (reais)	Atividade hidrolítica (U/g)
1	-1 (6,0)	-1 (30)	173,79
2	-1 (6,0)	+1 (44)	180,60
3	+1 (8,0)	-1 (30)	187,93
4	+1 (8,0)	+1 (44)	196,96
5	-1 (6,0)	0 (37)	173,77
6	0 (7,0)	-1 (30)	190,23
7	+1 (8,0)	0 (37)	192,42
8	0 (7,0)	+1 (44)	200,14
9	0 (7,0)	0 (37)	201,89
10	0 (7,0)	0 (37)	192,34
11	0 (7,0)	0 (37)	200,28

**Tabela 5.3.** Estimativa do efeito das variáveis, erro padrão e valores de *p* para atividade hidrolítica da lipase imobilizada em poliuretano, obtido nos ensaios do planejamento experimental.

Variáveis	Efeito	Erro padrão	<i>p</i>
Media	197,18	2,62	0,0001
X <sub>1</sub> – Linear	16,38	4,17	0,0592
X <sub>1</sub> – Quadrático	-25,19	6,42	0,0593
X <sub>2</sub> – Linear	8,58	4,17	0,1761
X <sub>2</sub> – Quadrático	-1,01	6,42	0,8893
X <sub>1</sub> – X <sub>2</sub>	1,11	5,11	0,8482

A partir desses resultados, o modelo estatístico foi composto com os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos. Os coeficientes relativos aos efeitos não significativos foram excluídos do modelo, exceto quando eram necessários para manter a hierarquia (MYERS; MONTGOMERY, 1996). A equação resultante é mostrada na equação 5.1:

$$A = -493,65 + 181,60 \cdot X_1 - 12,59 \cdot X_1^2 + 82,23 \cdot X_2 - 1,03 \cdot X_2^2 + 7,93 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (5.1)$$

Em que: atividade da lipase (A, U/g) como função dos valores codificados do pH (X<sub>1</sub>) e temperatura (X<sub>2</sub>).

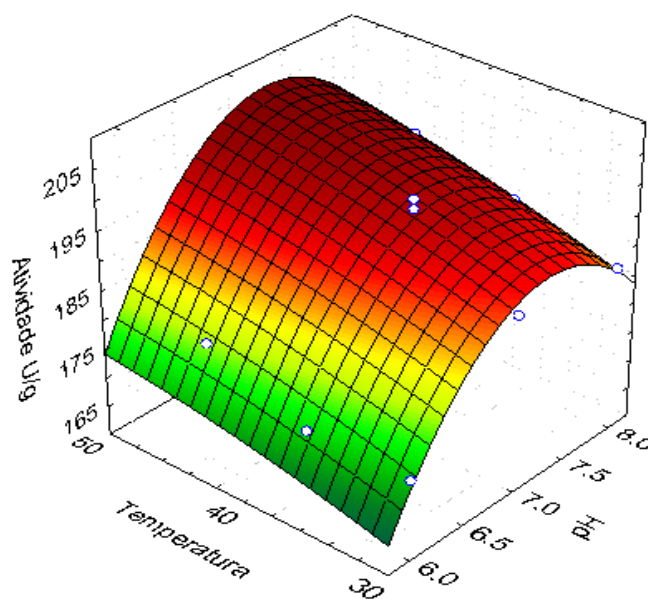
A análise de variância dos modelos (Tabela 5.4) indicou que a falta de ajuste não foi significativa ao nível de 90% de confiança, e o valor do  $R^2$  (93,05) indicou que o modelo pode explicar a maior parte da variabilidade experimental. Assim, a equação foi considerada adequada para descrever a atividade em função das variáveis estudadas. Para confirmar este modelo, os ensaios foram realizados sob as condições estabelecidas e as diferenças experimentais e teóricas foram de percentual reduzido.

**Tabela 5.4.** Análise de variância (ANOVA) para o modelo que representa a atividade hidrolítica da lipase imobilizada em poliuretano do pH (X1) e temperatura (X2).

Variáveis	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	p
X <sub>1</sub>	402,62	1	402,62	15,4026	0,0592
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	401,94	1	401,94	15,3766	0,0593
X <sub>2</sub>	110,51	1	110,51	4,2277	0,1761
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0,65	1	0,65	0,0248	0,8893
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1,23	1	1,23	0,0471	0,8483
Falta de ajuste	19,18	3	6,39	0,2446	0,8609
Erro Puro	52,28	2	26,14	-	-
Cor Total	1028,51	10	-	-	-

\*significativo ao nível de 90% de confiança: X<sub>1</sub> e X<sub>2</sub> representam as variáveis pH e temperatura, respectivamente.

**Figura 5.1.** Superfície de resposta descrita pelo modelo matemático que representa a atividade hidrolítica das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 em função do pH (X1) e temperatura (X2).



Fonte: Própria.

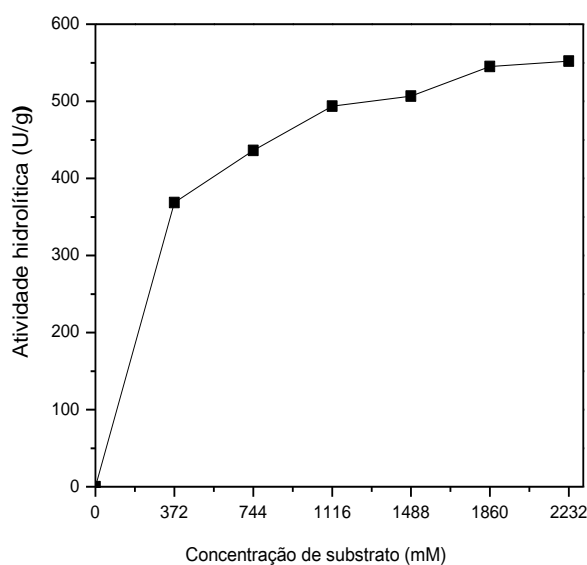


Desta forma considerou-se que o modelo estatístico obtido foi adequado para descrever a atividade catalítica em função das variáveis (pH e temperatura), o qual foi utilizada para gerar a superfície de resposta apresentada na Figura 5.1 Os valores preditos pelo modelo representado para o sistema enzimático avaliado na superfície de resposta indicam que a atividade catalítica é maximizada na temperatura de 40 °C e pH 7,3.

### 5.2.2. Parâmetros cinéticos

O efeito da concentração do substrato sobre a atividade da lipase imobilizada foi investigado, empregando emulsões de azeite de oliva em diferentes proporções (10-60% m/v), correspondendo a concentrações em ácidos graxos variando entre 372 a 2232 mM. O perfil da curva de velocidade de reação em função da concentração de ácido graxo é apresentado na Figura 5.2. Verifica-se que o aumento na concentração do substrato de 372 para 1116 mM resultou em um incremento significativo da velocidade de reação de hidrólise. Para concentrações de substrato superiores a 1488 mM, a atividade enzimática da lipase tornou-se essencialmente independente da concentração do substrato.

**Figura 5.2.** Estudo cinético da influência da concentração de substrato na atividade da lipase imobilizada.



Fonte: Própria.

Os parâmetros cinéticos foram determinados a partir desses resultados, considerando a cinética de Michaelis-Menten e empregando-se o Programa Origin 8.0 para ajuste dos

dados experimentais. Os resultados obtidos  $K_m = 263$  mM e  $V_{max} = 610$  U/g sugerem que a atividade da lipase imobilizada em função da concentração do substrato segue a cinética do tipo Michaelis-Menten, indicando que na faixa de concentração estudada não se detectou uma possível inibição enzimática pelo produto formado.

As propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase do fungo *M. circinelloides* estão sumarizadas na Tabela 5.5.

**Tabela 5.5.** Propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase imobilizada.

<b>Propriedades da Lipase Imobilizada</b>	
Temperatura ótima (°C)	40
pH ótimo	7,3
$K_m$ (mM)	263
$V_{m\acute{a}x}$ (U/g)	610

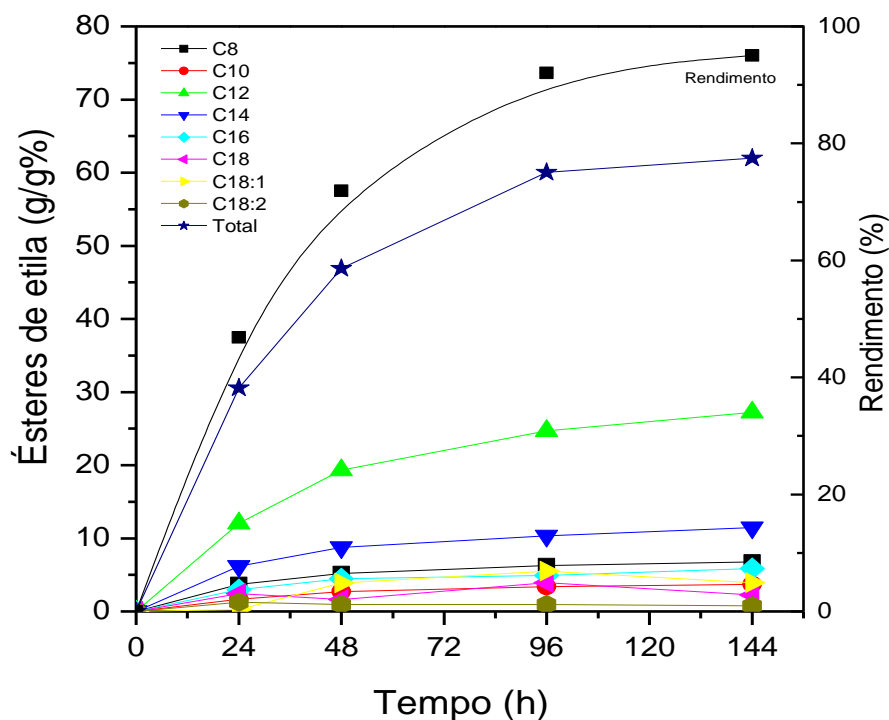
### **5.3. Etanólise do óleo de coco catalisada pelo fungo *Mucor circinelloides* URM 4182 em sistema descontínuo**

O desempenho do biocatalisador (*M. circinelloides* URM 4182) foi determinado na etanólise do óleo de coco em meio contendo terc-butanol como solvente. Os resultados obtidos em concentração mássica de ésteres de etila em função do tempo de reação são apresentados na Figura 5.3. As reações foram conduzidas, utilizando uma quantidade de 20% em massa de biocatalisador, em relação a massa total dos materiais de partida (óleo e etanol).

Os resultados da Figura 5.3 indicam que o biocatalisador foi capaz de converter os ácidos graxos presentes no óleo de coco nos ésteres de etila correspondentes. O progresso da reação obedeceu a uma cinética típica de catálise enzimática, sendo verificado um aumento gradativo da conversão dos triglicerídeos em ésteres em função do tempo, alcançando a conversão máxima (96,0%) em 144h de reação. O principal éster produzido foi o laurato de etila (C12), seguido do miristato de etila (C14), sendo os outros ésteres produzidos em menor quantidade. Esse perfil encontra-se dentro do esperado, tendo em vista que a composição do óleo de coco é predominantemente láurica (47.1%) característica importante, uma vez que os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que podem interagir mais facilmente com o agente acilante e com o catalisador provendo a reação de transesterificação. Além disso, a amostra do óleo de coco utilizada para a síntese do biodiesel

estava em excelentes condições de conservação e propriedades químicas o que garante a confiabilidade dos resultados sem influência das propriedades da matéria-prima.

**Figura 5.3.** Perfil de formação de ésteres de etila na síntese de biodiesel a partir do óleo de coco catalisada pela lipase intracelular imobilizada em poliuretano.



Fonte: Própria.

O produto final foi purificado conforme procedimento descrito no item 4.2.8 e os resultados referentes à quantificação da composição de ésteres purificados, monoglicerídeos, diglicerídeos, viscosidade e densidade são apresentados na Tabela 5.6.

Os dados obtidos demonstram que, embora a conversão tenha sido elevada, os teores de monoglicerídeos e diglicerídeos presentes na amostra de biodiesel foram superiores em relação à norma estabelecida pela ANP, que exige um limite de porcentagem em massa de 0,80% para MAG e 0,20% para DAG. Porém, não foi detectada a presença de triglicerídeos, o que obedece ao limite estipulado de 0,20% em massa do biodiesel. Por outro lado, a viscosidade cinemática obtida ( $5,90 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ ) se enquadra na faixa de valores estabelecida pela ANP ( $3,0 - 6,0 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ ).

**Tabela 5.6.** Propriedades da amostra de biodiesel de óleo de coco purificada.

Análise	Valores
Octanato de etila	8,69
Decanoato de etila	6,07
Laurato de etila	47,10
Miristato de etila	17,90
Palmitato de etila	7,37
Estearato de etila	2,41
Linoleato de etila	5,68
Linolenato de etila	1,60
Concentração em ésteres (%)	96,14
Viscosidade (mm <sup>2</sup> /s)	5,90
Densidade (kg/m <sup>3</sup> )	878
Monoglicérides (%)	3,50
Diglicérides (%)	0,36

O perfil de formação de ésteres de etila e do rendimento de transesterificação obtidos neste trabalho foram semelhantes aos resultados descritos por Andrade *et al.* (2014), nos testes de etanólise do óleo de babaçu utilizando o *M. circinelloides* URM 4182, no qual o maior rendimento alcançado (98,1%) em 35° C utilizou uma relação molar de 1:6 (óleo/etanol). Isto possivelmente ocorreu devido à similaridade na composição de ácidos graxos entre o óleo de babaçu e o óleo de coco, usado neste trabalho.

Entretanto, o regime operacional utilizado provocou transtornos ao sistema que podem ser melhorados a partir da alteração do tipo de reator e do regime de operação, fornecendo facilidade de operação e favorecendo o controle da qualidade do produto. Como alternativa aos reatores operados em sistema batelada, surgem os reatores do tipo leito fixo operando em regime contínuo que minimizam possíveis efeitos danosos às células imobilizadas causadas devido ao stress físico da agitação mecânica.

## 5.4. Etanólise em sistema contínuo

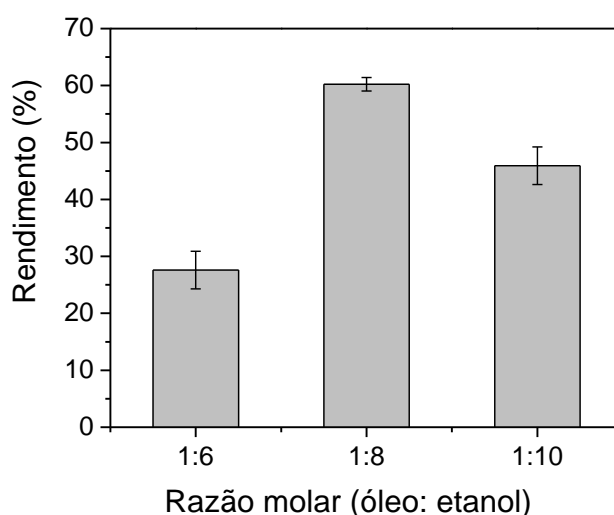
### 5.4.1. Influência da razão molar óleo/etanol no desempenho do processo

A influência da concentração molar dos componentes da mistura reacional na síntese de biodiesel em fluxo contínuo utilizando células íntegras imobilizadas em poliuretano foi verificada para diferentes razões molares de óleo para etanol (1:6, 1:8 e 1:10). Nesta série de experimentos foi utilizado o Reator A (volume útil de 293 mL) durante um período de 16

dias. A formação dos ésteres na etanolise do óleo de coco em fluxo contínuo em diferentes condições operacionais, mostrado na Figura 5.4, indicou diferentes desempenhos em função da razão molar do substrato.

Os testes foram realizados pelo empacotamento de 18,0 gramas (atividade = 53,8 U/g) formando uma coluna empacotada uniforme com carregamento catalítico total de 967 unidades de atividade. A alimentação do substrato nas diferentes razões molares (1:6, 1:8 e 1:10, óleo de coco/etanol) foi efetuada em fluxo ascendente na vazão de  $0,07 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , correspondendo ao tempo espacial de 70 horas.

**Figura 5.4.** Influência da concentração molar dos componentes da mistura reacional na síntese de biodiesel em reator de leito fixo em fluxo contínuo (Reator A).

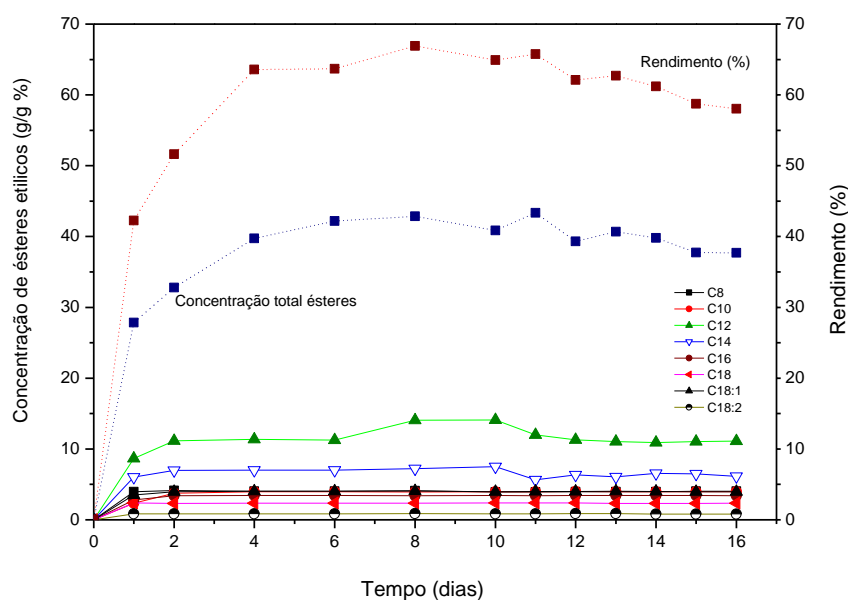


Fonte: Própria.

Comparando-se os resultados obtidos verifica-se que o menor rendimento ( $< 30\%$ ), foi obtido no processo que utilizou o meio de alimentação na razão molar igual a 1:6. É provável que a viscosidade mais elevada deste substrato tenha limitado a dispersão homogênea do meio no reator. Entretanto a condição operacional que proporcionou maior excesso de etanol, razão molar (1:10), provocou também um declínio no rendimento das reações, pois, embora um excesso de álcool em relação à quantidade estequiométrica é normalmente requerido para deslocar o equilíbrio da reação em direção à formação de ésteres, um grande excesso de etanol pode inibir a atividade de algumas lipases (STAMENKOVIC; VELICKOVIC; VELJKOVIC, 2011). A conversão média mais elevada (da ordem de 62%) foi alcançada empregando a razão molar 1:8.

A Figura 5.5 apresenta o comportamento dinâmico da concentração total em ésteres de etila (35,8 a 59,1 % (m.m<sup>-1</sup>)), produto da reação enzimática na condição ótima da razão molar do substrato (1:8 óleo/álcool). Todo o sistema mostrou-se estável, não sendo constatado decaimento na conversão em ésteres etílicos em função do tempo reacional, exceto às oscilações inerentes ao sistema. Na Tabela 5.7 são apresentados os parâmetros de interesse do processo.

**Figura 5.5.** Concentração total em ésteres obtida na etanólise enzimática do óleo de coco em reator de leito fixo operando em modo contínuo (temperatura 35 °C, razão molar 1:8 (óleo de coco/etanol), tempo espacial de 70 horas.



Fonte: Própria.

**Tabela 5.7.** Desempenho do reator de leito fixo na etanólise do óleo de coco catalisada por lipase intracelular.

<b>Condições operacionais</b>	
Vazão de alimentação (mL/min)	0,07
Tempo espacial (h)	70
Duração do experimento (dias)	16
<b>Resultados</b>	
Concentração de ésteres de etila (g.g <sup>-1</sup> )	47,4 ±2,9
Viscosidade a 40°C (mm <sup>2</sup> /s)	8,30
Rendimento de transesterificação (%)	62,8 ±4,3

A atividade do derivado imobilizado recuperado foi determinada ao final do experimento, não sendo constatada redução significativa da atividade catalítica do biocatalisador (51 U/g). Entretanto, o pobre desempenho do reator sugere a existência de caminhos preferenciais ocasionando limitações de transferência de massa dentro da coluna. Esta hipótese foi confirmada por meio da execução de um teste simples de visualização do caminho percorrido a partir de um corante injetado na base da coluna, como mostrado na Figura 5.6. É visualmente perceptível que no reator A houve formação de caminhos preferenciais e zonas mortas.

**Figura 5.6.** Análise visual da formação de caminhos preferenciais com a injeção de corante lipossolúvel no reator A.



Fonte: Própria.

Estudos de reações catalisadas por lipases imobilizadas em reator de leito fixo têm mostrado que a taxa de reação é afetada pela variação de fluxo linear do fluido. Assim, limitações de transferência de massa, seja entre os reagentes do meio reacional para o sítio ativo da lipase ou do transporte ineficiente do produto para a mistura, são fatores plausíveis de investigação nesta configuração de reator (XU; FOMUSO; AKOH, 2000). Trabalhos descritos na literatura indicam menor limitação à transferência de massa em colunas que apresentam maior relação altura/diâmetro ( $l/d$ ) (DAMSTRUP *et al.*, 2007).

Considerando que o Reator A possui relação altura /diâmetro ( $l/d = 4,2$ ) e visando superar as limitações anteriormente relatadas foi construído um reator em dimensões adequadas ( $l = 420$  mm e  $d = 30$  mm) que permitiram aumentar a relação geométrica  $l/d$  para

14. Entretanto, antes do início dos testes de etanólise em fluxo contínuo foi efetuado a caracterização do reator B quanto ao tempo de residência.

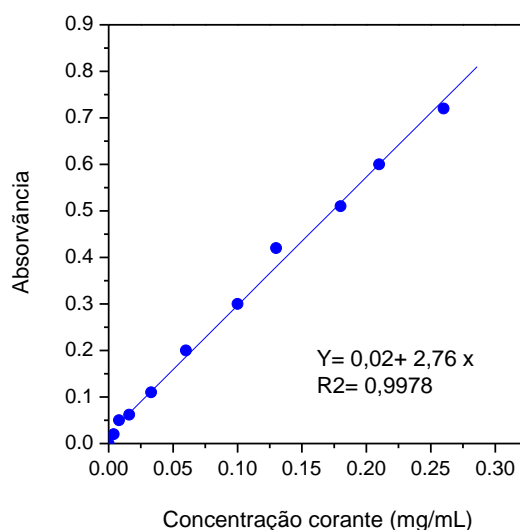
## 5.4.2. Caracterização hidrodinâmica do Reator B

### 5.4.2.1. Curva de calibração

A construção da curva de calibração “absorbância X concentração de traçador”, para determinação da concentração de traçador na saída do reator foi realizada com o corante lipossolúvel CI 61554 na concentração de 15% em meio reacional óleo de coco e etanol na razão molar 1:8, adotando a metodologia descrita em 4.2.7. A varredura inicial feita no espectrofotômetro na faixa da luz visível mostrou que a maior absorbância para esse corante foi observada no comprimento de onda de 646 nm. Desta forma, neste comprimento de onda, foram feitas as leituras subsequentes para diferentes concentrações de solução de traçador em meio reacional empregando como solvente terc-butanol.

Na Figura 5.7 é mostrado o comportamento da absorbância em função da concentração do traçador. A reta que ajusta os dados experimentais é apresentada na Equação 5.1.

**Figura 5.7.** Absorbância em função da concentração do traçador em meio reacional (óleo de coco e etanol).



Fonte: Própria.

$$\text{Equação da reta: } y = 0,02 + 2,76 x \quad (5.1)$$

Coeficiente de correlação = 0,9978



A densidade cristalina do suporte de poliuretano foi de  $1,08 \text{ g.mL}^{-1}$ . Este valor corresponde à densidade do sólido, desconsiderando-se os espaços intra-particulares. Deve-se observar que, após o carregamento do reator com o suporte sólido, o mesmo foi preenchido com meio reacional. Assim, o valor da densidade do sólido foi considerado adequado para a determinação do volume de líquido no reator e, conseqüentemente, do tempo espacial.

#### 5.4.2.2 Cálculo da Distribuição do Tempo de Residência

A Distribuição do Tempo de Residência (DTR) é uma informação importante na operação de reatores que permite diagnosticar problemas de escoamento, entre os quais se destacam: i) existência de zonas de estagnação do fluido ou zonas mortas; ii) curto-circuitagem extrema e subpassagem do fluido; iii) existência de canalização, especialmente em operações em contracorrente; iv) dispersão axial em reatores tubulares e v) segregação, resultante das condições de mistura no reator (FOGLER, 2002).

DTR é determinada experimentalmente injetando no reator uma concentração conhecida de um traçador no tempo zero e medindo a concentração do mesmo no efluente do reator em função do tempo. Os dois métodos mais utilizados para injeção são o de entrada do tipo degrau e do tipo pulso, sendo que neste trabalho, empregou-se o tipo pulso. Em reatores tubulares ideais todos os componentes que saem do reator permanecem exatamente o mesmo tempo em seu interior e, neste caso a DTR é um pico de altura infinita e largura zero, cuja área é igual a 1 (FOGLER, 2002).

Em reatores ideais, sem caminhos preferenciais ou zonas mortas, o tempo médio de residência ( $t_m$ ), calculado em função da distribuição de tempo de residência, deve coincidir com o tempo espacial ( $\tau$  - tempo necessário para se processar um volume de reator), calculado conforme equação 4.2. Quanto maior for o número de caminhos preferenciais e de zonas mortas no empacotamento maior será a diferença entre os valores de tempo médio de residência ( $t_m$ ) e o tempo espacial ( $\tau$ ).

No presente trabalho, a função de Distribuição do Tempo de Residência (DTR) foi determinada experimentalmente injetando-se 0,7615g da solução de corante lipossolúvel azul (15%) em meio reacional (óleo de coco/etanol na proporção molar de 1:8) no tempo  $t = 0$  e, medindo-se a concentração,  $C$ , do traçador na saída do reator em função do tempo. O teste foi realizado por 13 h, efetuando amostragens a cada 30 min. A Figura 5.8 ilustra o espalhamento do corante no interior do reator durante o primeiro tempo espacial (4 horas).

Os valores de absorvância das amostras (reator B) previamente diluídas em terc-butanol apresentados no Apêndice A, serviram de base para calcular a concentração do corante na saída do reator por meio da equação obtida na curva de calibração (Figura 5.7). As concentrações do traçador na saída do reator foram plotados em função do tempo (Figura 5.9) e para cada valor de tempo, a função da DTR,  $E(t)$  foi determinada, conforme dados coletados resultando no tempo de residência real do experimento.

Conhecendo-se o volume de líquido do reator, obtido por meio da diferença entre o volume total e o ocupado pelo suporte no empacotamento, e a vazão volumétrica empregada ( $1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ), obteve-se tempo espacial de 4 h. Comparando-se este tempo com o correspondente tempo de residência (4,59 h), tem-se uma diferença de 0,59 h (35,4 min), considerada aceitável neste tipo de ensaio em função dos erros experimentais envolvidos.

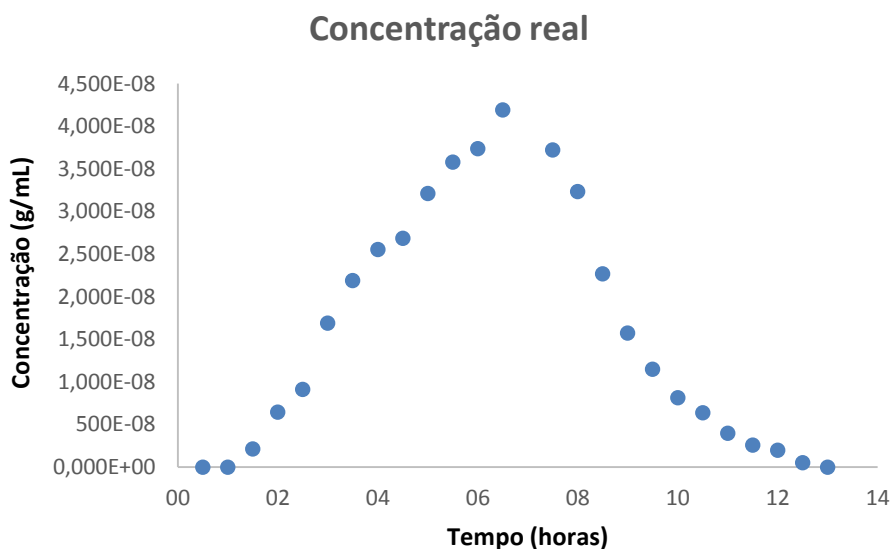
**Figura 5.8.** Espalhamento do corante no interior do reator B durante a realização do teste traçador (fotografia referente ao primeiro tempo espacial, 4 horas).



Fonte: Própria.

O espalhamento da curva de DTR apresentado na Figura 5.9 mostra o comportamento do reator tubular ideal, no qual as características da relação enzima/substrato são as mesmas em qualquer ponto do reator. Portanto, a relativa similaridade entre os tempos espaciais pode ser considerada um indicativo da inexistência de caminhos preferenciais ou zonas mortas no leito, demonstrando boa qualidade da disposição do biocatalisador imobilizado no reator e a transferência de massa do substrato.

**Figura 5.9.** Concentrações reais do traçador na saída do reator em função do tempo.

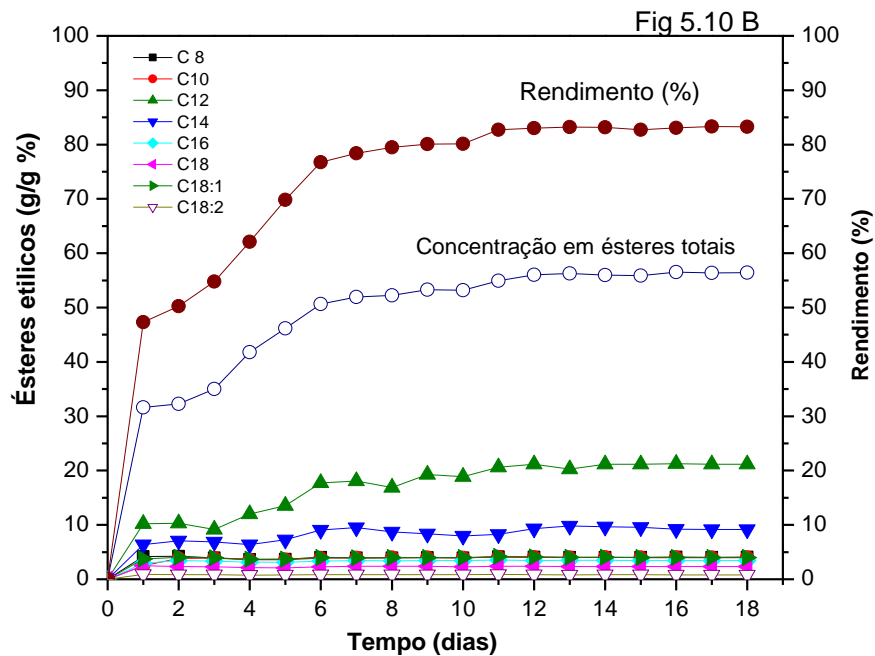
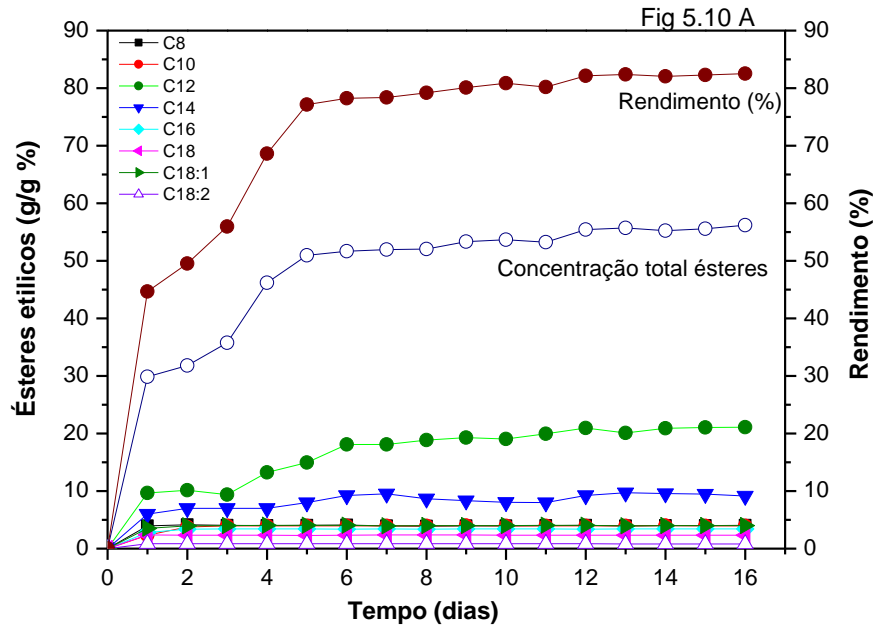


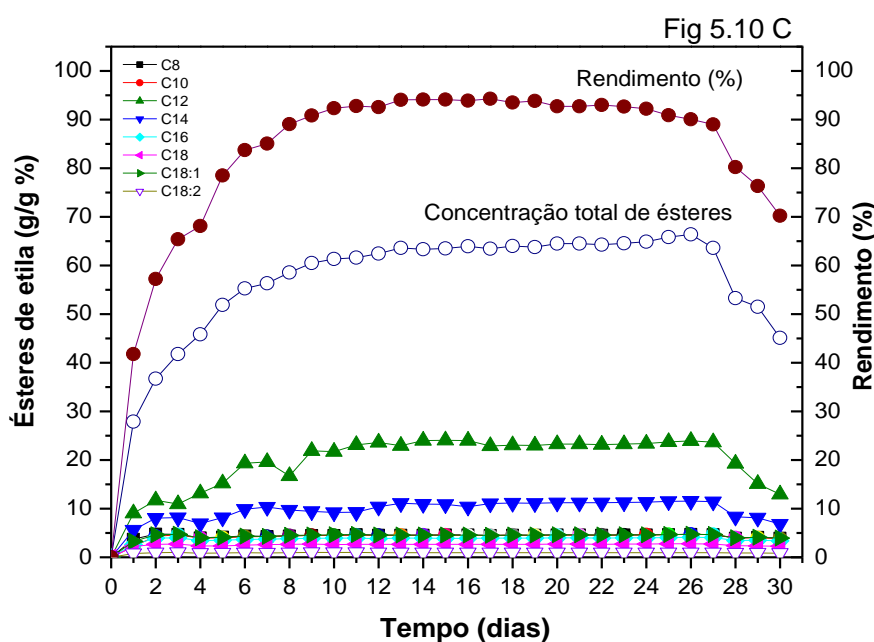
Fonte: Própria.

#### 5.4.3. Desempenho do reator B em fluxo contínuo com diferentes tempos espaciais

Visando aumentar a conversão em ésteres de etila, o desempenho do processo foi avaliado empregando reator de leito fixo com relação geométrica ( $l/d=14$ ) (Reator B). O experimento foi iniciado pelo empacotamento de 15,0 gramas (atividade inicial = 58,39 U/g) formando uma coluna empacotada com carregamento catalítico total de 876 unidades de atividade. A alimentação do substrato na razão molar 1:8 (óleo de coco/etanol) foi efetuada em fluxo ascendente com correspondentes variações de tempo espacial em 60, 70 e 80 horas. A Figura 5.10 apresenta o comportamento dinâmico da concentração total em ésteres de etila dos diferentes tempos espaciais (60, 70 e 80 horas), produto da reação enzimática, com oscilações inerentes a este tipo de sistema, obtendo-se concentração média de ésteres de etila e o rendimento total (%).

**Figura 5.10.** Concentração em ésteres de etila obtida na etanolise enzimática do óleo de coco em reator de leito fixo operando em modo contínuo (temperatura 35 °C, razão molar 1:8 (óleo/etanol), tempo espacial de 60h (A) – 70h (B) – 80h (C).





Fonte: Própria.

Na Tabela 5.8 são apresentados os parâmetros obtidos nos experimentos efetuados no reator B para diferentes tempos espaciais (60, 70 e 80 horas). Na faixa de variação do fluxo de alimentação estudada, verifica-se que o melhor desempenho do reator foi constatado para tempo espacial de 80h (vazão volumétrica =  $0,06 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Nessa condição,  $92,7 \pm 1,5\%$  dos ácidos graxos presentes no óleo de coco foram convertidos nos ésteres de etila correspondentes, alcançando uma produtividade média de  $51,0 \pm 1,4 \text{ mg}_{\text{éster}}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{meio}}\cdot\text{h}^{-1}$ . Esses resultados se comparam favoravelmente aos dados descritos na literatura, para sistemas operando com células íntegras imobilizadas (ANDRADE *et al.*, 2014).

Os teores de monoglicerídeos e diglicerídeos determinados por cromatográfica líquida confirmam a eficiência na síntese enzimática de monoésteres de etila. Entretanto, os resultados encontrados demonstram que o biodiesel obtido não atende os padrões estabelecidos pela legislação da ANP e sugerem a necessidade de estudos complementares do desempenho do processo em fluxo contínuo.

Em se tratando de rendimento médio de transesterificação, o reator B ainda forneceu níveis inferiores aos obtidos no sistema descontínuo (conforme descrito no item 5.3), entretanto constata-se um aumento marcante na concentração de ésteres de etila em relação aos dados obtidos no reator A. Na condição ótima do reator B (80 horas - tempo espacial) o sistema operou de maneira estável em vazão de  $0,06 \text{ (mL/min)}$  por 25 dias, sendo verificada,

após esse período, uma pequena perda de desempenho do reator em função da atividade catalítica do leito.

**Tabela 5.8.** Desempenho do reator de leito fixo na etanólise contínua do óleo de coco mediada pela lipase de *M. circinelloides* URM 4182 imobilizada em poliuretano com diferentes tempos espaciais.

Parâmetro	60 horas	70 horas	80 horas
Concentração de ésteres de etila (g.g <sup>-1</sup> )	53,8±1,8	58,4±3,1	65,7±1,5
Viscosidade a 40°C (mm <sup>2</sup> /s)	7,21	6,96	5,14
Rendimento de transesterificação (%)	79,8±1,9	82,7%±1,9	92,7±1,2
Produtividade (mg <sub>éster</sub> g <sub>meio</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	32,2	40,4	51,0
Monoglicerídeo (m/m%)	9,2	*	3,2
Diglicerídeo (m/m%)	3,5	*	3,4

\* Análise não realizada

A eficiência na utilização de sistemas contínuos foi também alcançada por Yoshida *et al.* (2012), que utilizaram células íntegras na produção de biodiesel em fluxo contínuo com uma mistura de óleo de colza e soja, razão molar 1:4,25 (óleo: álcool), alcançando 96,1% de rendimento de ésteres metílicos. Resultados satisfatórios também foram descritos por Hama *et al.* (2007), utilizando óleo de soja na razão molar 1:4 (óleo: metanol) com rendimentos de até 90% na produção de biodiesel em fluxo contínuo. Arumugam e Ponnusami (2014), utilizaram o óleo de *Callophyllum inophyllum* originado da árvore *Magnoliophyta* juntamente com metanol (razão molar 1:12 óleo: álcool) e células íntegras imobilizadas (*R. oryzae*) em espumas de poliuretano na síntese de biodiesel em sistema contínuo, alcançando 92% de conversão em ésteres metílicos à 35°C. Jin *et al.* (2008), empregaram células íntegras imobilizadas de *R. oryzae* em sistema contínuo para avaliar a eficiência de reações de transesterificação de óleo de canola utilizando etanol. Os autores reportaram rendimentos de 66,1% em ésteres de etila, resultado inferior ao alcançado neste trabalho que também utiliza o etanol como agente acilante diferentemente dos demais estudos citados.

### 5.5. Influência do tipo e proporção de solvente na síntese de ésteres de etila em sistema descontínuo

Silva *et al.* (2011), determinaram o desempenho de células íntegras de *Mucor circinelloides* URM 4182 imobilizadas na síntese do biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol em meio isento na presença de solventes. A utilização do terc-butanol forneceu a condição mais adequada para obtenção de elevadas conversões do óleo em ésteres etílicos da ordem de 82,54 %, enquanto que a menor velocidade foi verificada para reação conduzida em meio isento de solvente (25,46%). Entretanto, os autores não verificaram a influência da proporção de terc-butanol. Desta forma, nessa série de experimentos foi proposto verificar a influência da proporção do terc-butanol no rendimento de transesterificação, bem como avaliar a possibilidade de substituir o solvente terc-butanol por líquido iônico em função das suas versáteis propriedades em relação a solventes orgânicos e inorgânicos convencionais. Muito embora os solventes convencionais geralmente sejam mais utilizados devido à sua ampla disponibilidade e baixo custo, estes tipos de solventes podem representar ameaças no ambiente, especialmente em relação à sua toxicidade e inflamabilidade. Os experimentos foram realizados conforme descrito em 4.2.6.1 e os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 5.11 (a,b) e 5.12.

Operando sob as mesmas condições reacionais do regime descontínuo com um tempo reacional máximo de 144 horas, o desempenho do biocatalisador em meio reacional isento de solventes foi considerado tecnicamente inviável (Figura 5.11 a,b). A reação conduzida na ausência de solventes apresentou baixa velocidade de reação e conversão reduzida do óleo em ésteres (46,4% em 6 dias de reação).

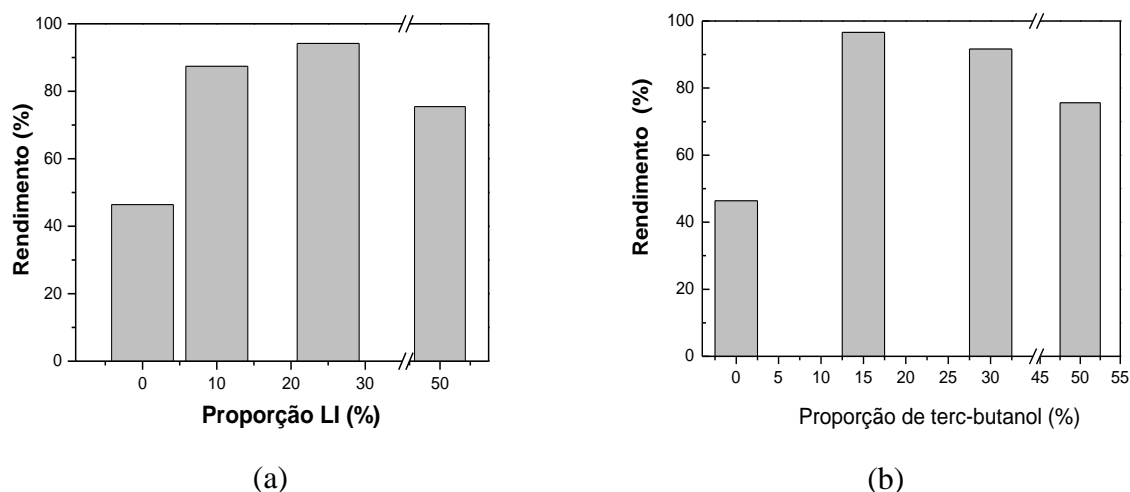
O poder catalítico das células imobilizadas foi potencializado pela utilização de ambos os solventes testados, devido à capacidade desses solventes de diminuir o acúmulo do glicerol, facilitando a transferência do substrato para o interior das células, entretanto o efeito do terc-butanol foi superior ao constatado na presença do líquido iônico.

Os resultados satisfatórios alcançados com a utilização do solvente terc-butanol (Figura 5.11 b) ocorreram possivelmente devido às bioconversões em sistemas multifásicos dependerem diretamente da escolha do solvente mais adequado para o biocatalisador. Dentre os principais critérios considerados, a polaridade do solvente é o que se apresenta mais restritivo devido sua interferência na atividade, estabilidade e especificidade da enzima (FU; VASUDEVAN, 2010). A polaridade moderada ( $\log P = 0,87$ ) do solvente terc-butanol e menor viscosidade favoreceram a diluição do glicerol acumulado no suporte, melhorando a

transferência do substrato para o interior das células imobilizadas e impediu a inibição enzimática pela limitação da transferência de massa.

Entretanto, na presença do líquido iônico (1-butil-3-metilimidazólio bis (trifluorometilsulfonilo) imida) ([BMIM] TFSI) os resultados alcançados não foram satisfatórios nas condições testadas, o qual pode ser atribuído ao acúmulo do glicerol no meio reacional por causa da sua afinidade com o líquido iônico, sendo assim facilmente adsorvido pelos poros das esponjas ao longo da reação, prejudicando a transferência do substrato para o interior das células imobilizadas (LI *et al.*, 2008), ou devido ao fato do líquido iônico possuir carácter hidrofílico retirando a água mínima essencial da enzima, resultando na sua inativação (Figura 5.11).

**Figura 5.11.** Influência de diferentes tipos (líquido iônico – a, terc-butanol – b) e proporções de solvente na produção de ésteres de etila.

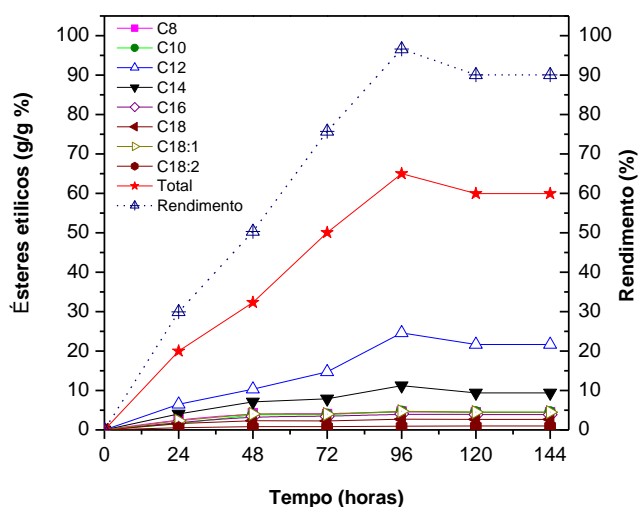


Fonte: Própria.

Nas condições testadas, o melhor desempenho foi obtido utilizando terc-butanol como solvente na proporção de 15% em relação à massa total do substrato, o que favoreceu a partição dos materiais de partida e produtos aumentando a concentração em ésteres etílicos para valores superiores a 96% em 96 h de reação, conforme Figura 5.12.



**Figura 5.12.** Perfil de formação dos ésteres na etanólise enzimática do óleo de coco em meio contendo proporção otimizada de terc-butanol (15% de solvente).



Fonte: Própria.

Estudos comparativos quanto a eficiência na produção de biodiesel utilizando terc-butanol e líquido iônico também foram realizadas por Huang *et al.* (2014). A reação utilizando o óleo de *Millettia pinnata*, metanol e a lipase Novozym 435 forneceu rendimentos mais elevados utilizando terc-butanol (81,9%) ao invés do líquido iônico (48,4%). Essa redução na conversão ocorreu devido à diferença na relação substrato/especificidade da enzima. Quando este mesmo estudo foi conduzido utilizando a lipase *Penicillium expansum* foi possível observar que a variação na concentração do solvente no meio reacional não provocou efeitos na velocidade de reação, alcançando resultados de conversões de ésteres similares em ambas as condições (proporção substrato: solvente). O mesmo ocorreu nos estudos reportados por Zhang *et al.* (2011), na produção de biodiesel a partir de óleo de milho utilizando a lipase *Penicillium expansum* na presença de terc-butanol. A variação na proporção do terc-butanol no meio reacional (0,5-3,0%), não provocou alterações na velocidade de reação e na conversão de ésteres metílicos. Rios *et al.* (2011), estudaram o efeito de solventes quanto a conversão do óleo de girassol catalisada por Novozym 435 na síntese do biodiesel, rendimentos insatisfatórios foram encontrados para todos os 10 líquidos iônicos quando comparados com solvente convencional, no caso deste estudo o iso-propanol. Li *et al.* (2008), relataram um estudo comparativo da síntese de ésteres de metila catalisada por *R. oryzae* na presença e ausência do solvente terc-butanol. Na condição ótima determinada: substratos na razão molar 1:1,75 (óleo:álcool), 35 °C e 40 horas de reação foram alcançados conversões de 86,4% (ausência de solvente) e 90% (na

preseça de terc-butanol) do óleo em ésteres metílicos. Tais resultados quando comparados com estudos na ausência de solventes, demonstraram em sua grande maioria a obtenção de melhores conversões com uso de terc-butanol. A utilização de terc-butanol no meio reacional favoreceu a manutenção da atividade do biocatalisador por meio da remoção do glicerol absorvido no sistema imobilizado, facilitando a transferência de massa entre o substrato e a lipase contida nas células íntegras.

De forma geral, os resultados obtidos foram promissores e demonstraram a necessidade de estudos mais aprofundados em relação à potencialidade de células íntegras de fungos filamentosos imobilizadas na síntese de ésteres de etila, com destaque para o desempenho do fungo *Mucor circinelloides* URM 4182 na presença de terc-butanol como solvente.

## 6. CONCLUSÕES

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de transesterificação do óleo de coco e etanol, visando à obtenção do biodiesel em reator de leito fixo operando em fluxo contínuo, mediada pela lipase de *Mucor circinelloides* URM 4182 imobilizada em partículas de poliuretano. O conjunto de experimentos realizado no âmbito deste trabalho permitiu definir os limites de operação do reator e identificar problemas e insuficiências ligadas a eficiência do processo. Os resultados alcançados demonstraram que:

- Os testes de etanólise do óleo de coco utilizando terc-butanol como solvente em reatores agitados operados em regime descontínuo forneceram resultados promissores utilizando o *M. circinelloides* URM 4182 imobilizado em espumas de poliuretano, com rendimentos de transesterificação de 96% em 144 horas;
- É possível operar um sistema contínuo para obtenção de biodiesel por via enzimática empregando células íntegras imobilizadas em reator de leito fixo com substratos contendo óleo de coco e etanol na presença de solvente, entretanto foi necessário determinar parâmetros reacionais e hidrodinâmicos;
- A razão molar entre óleo de coco e etanol foi um parâmetro crítico para obtenção de rendimentos satisfatórios, sendo o desempenho mais elevado (62%) constatado para substratos contendo etanol na razão molar de 1:8 (óleo/etanol);
- A baixa conversão do sistema na síntese de ésteres (62%) utilizando razão molar 1:8 (óleo/álcool), foi justificada pelo estudo da geometria do reator A ( $l/d = 4,2$ ) a partir da detecção visual de caminhos preferenciais e zonas mortas no leito do reator pela injeção de um corante lipossolúvel. O desempenho da nova configuração utilizada, reator B ( $l/d = 14$ ) foi avaliado para diferentes tempos espaciais (60, 70 e 80 horas);
- O funcionamento do sistema foi comprovado quantitativamente para tempos espaciais no reator iguais ou superiores a 80h, resultando em produtividades da ordem de  $51,0 \pm 1,4 \text{ mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  e rendimento =  $92,7 \pm 1,5\%$ ;

- A lipase de *Mucor circinelloides* imobilizada em poliuretano foi estável quanto a suas características morfológicas e catalíticas apresentando tempo de meia-vida médio da ordem de 36 dias na condição ótima de operação do reator B (80 horas);
- Nas condições estabelecidas, as amostras de biodiesel purificadas (viscosidade média de 5,14 mm<sup>2</sup>/s) se enquadram na norma ASTM 6751-02, que requer viscosidade cinemática do B100 na faixa de 1,0-6,0 mm<sup>2</sup>/s. Entretanto os elevados teores de monoglicerídeos (3,2%) e diglicerídeos (3,4%) necessitam ser reduzidos para total adequação dessas amostras para uso como combustível;
- Os estudos visando aumentar o poder catalítico das células imobilizadas por meio da redução gradativa do solvente no meio reacional e a utilização de agente estabilizante (líquido iônico) em reações conduzidas em regime descontínuo indicaram que o melhor desempenho do biocatalisador foi obtido utilizando 15% de terc-butanol no meio reacional, o que proporcionou aumento da velocidade de reação fornecendo em 96 h conversão de 96,6% do óleo de coco em ésteres de etila correspondentes.

## RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com o intuito de complementar e dar continuidade aos promissores resultados obtida na síntese de biodiesel catalisado por células íntegras de fungos filamentosos imobilizadas recomenda-se:

- Empregar a condição ótima de proporção de solvente (15% de terc-butanol) na reação de etanólise em sistema contínuo catalisada por células íntegras imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 em reator de leito fixo.
- Testar novas configurações de suporte no processo de cultivo e imobilização da cepa de *Mucor circinelloides* URM 4182, para aplicação em síntese de biodiesel.

## REFERÊNCIAS

- ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U. T.; BEDNARSKI, W., The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 808–813, 2009.
- AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em solventes orgânicos. **Boletim de Biotecnologia**, n. 72, p. 2-12, 2002.
- ALI, M.; KAUR, M.; MEHRA, U., Use of immobilized *Pseudomonas* sp. as whole cell catalyst for the transesterification of used cotton seed oil. **Journal of Oleo Science**, v. 60, p. 7–10, 2011.
- ANDRADE, G. S. S. **Produção de biodiesel a partir de óleos vegetais usando células íntegras imobilizadas de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica (glicerol éster hidrolase – E.C.3.1.1.3)**. 2012. 149f. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2012.
- ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO H. F. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 183-188, 2012.
- ANDRADE, G. S. S.; CARVALHO, A. K. F.; ROMERO, C. M.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F., *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 2539–2548 2014.
- ANP, **Agência Nacional do petróleo, gás natural e biocombustíveis**, Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?id=472>. Acessado em 08 de dezembro de 2014.
- ANTCZAK, T.; SZCZESNA-ANTCZAK, M.; KUBIAK, A.; STRUSZCZYK, K.; BIELECKI, S., Intracellular lipases stabilized through in situ immobilization in mucor mycelium and their numerous applications. In: SEVENTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON PROTEIN STABILIZATION, 2007, UK - **Book of Abstracts**. University of Exeter, 2007. v. 11, p. 96, 2007.
- ANTCZAK, M. S. A.; ANTCZAK, T. A., RZYSKA, M. A.; MODRZEJEWSKAB, Z.; PATURA, J. A.; KALINOWSKAA, H.; BIELECKI, S. Stabilization of an intracellular *Mucor circinelloides* lipase for application in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, p. 163–171, 2004.
- ANTCZAK, M. S.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; BIELECKI, S. Catalytic properties of Review: Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.
- ANTCZAK, T.; HILER, D.; KRYSZYNOWICZ, A.; SZCZESNA, M.; BIELECKI, S.; GALAS, E., Activity of immobilized in situ intracellular lipases from *Mucor circinelloides* and *Mucor racemosus* in the synthesis of sucrose esters. **Progress in Biotechnology**, v. 17, p. 221-2227, 2000.
- ANTCZAK T, SZCZESNA-ANTCZAK M, GRACZYK J, BIELECKI S. Activation of *Mucor circinelloides* lipase in organic medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19–20, p. 287–94, 2002.

ARAI, S.; NAKASHIMA, K.; TANINO, T.; OGINO, C.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 51–55, 2010.

ARUMUGAM, A.; PONNUSAMI, V. Biodiesel production from *Calophyllum inophyllum* oil using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within reticulated foams, **Renewable Energy**, v. 64, p. 276 – 282, 2014.

ATABANI, A.E.; SILITONGAA, A. S.; BADRUDDINA, I. A.; MAHLIAA, 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, p. 2070–2093, 2012.

ATHALYE, S., SHARMA-SHIVAPPA, R., PERETTI, S., KOLAR, P., & DAVIS, J. P., Producing biodiesel from cottonseed oil using *Rhizopus oryzae* ATCC #34612 whole cell biocatalysts: Culture media and cultivation period optimization. **Energy for Sustainable Development**, v. 17, n. 4, p. 331-336, 2013.

BAJAJ, A.; LOHAN, P. N. J.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 9-14, 2010.

BAN, K.; HAMA, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 39-43, 2001.

BASHA S. A.; GOPAL K. R., A review of the effects of catalyst and additive on biodiesel production, performance, combustion and emission characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 711-717, 2012.

BAWALAN, D. D.; CHAPMAN, K. R., **Virgin coconut oil** – production manual for micro-and village-scale processing. Bangkok: National Library, 2006.

BOON, J. A., LEVISKY, J. A., PFLUG, J. L., WILKES, J. S. Friedel - crafts reactions in ambient-temperature molten salts. **Journal of Organic Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 480-483, 1986.

BOUAID, A.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Biorefinery approach for coconut oil valorisation: A statistical study. **Journal of Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4006- 4012, 2010.

BORGES, M. E.; DÍAZ, L., Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2839-2849, 2012.

BREGUET, V.; VOJINOVIC, V.; MARISON, I. W. Encapsulates for food bioconversions and metabolite production. In: ZUIDAM, N., J.; NEDOVIC, V., A. **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. New York: Springer, 2009, p. 367.

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

CARVALHO, A. K. F. **Síntese de biodiesel por transesterificação pela rota etílica: comparação do desempenho de catalisadores heterogêneos**. 2011. 105p. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 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. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 485–493, 2013.

CHEN, J-P.; LIN, G-H. Optimization of biodiesel production catalyzed by fungus cells immobilized in fibrous supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 181-194, 2010.

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P., Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, n. 15, p. 497–520, 2014.

DAMSTRUP, M. L; KIIL, S; JENSEN, A. D; SPARSO, F. V; XU, X. Process development of continuous glycerolysis in an immobilized enzyme-packed reactor for industrial monoacylglycerol production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p 7786-7792, 2007.

D'ANNA, F.; FRENNA, V.; NOTO, R.; PACE, V.; SPINELLI, D., Study of aromatic nucleophilic substitution with amines on nitriophenes in room-temperature ionic liquids: Are the different effects on the behavior of para-like and ortho-like isomers on going from conventional solvents to room temperature ionic liquids related to solvation effects ?. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, p. 5144-5150, 2006.

DE 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.

DE DIEGO, T.; MANJÓN, A.; LOZANO, P.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L., An efficient activity ionic liquid-enzyme system for biodiesel production. **Green Chemistry**, v. 13, p. 444-451, 2011.

DE PAULA, A. V.; NUNES, G. F.; SILVA, J. L.; DE CASTRO, H. F.; DOS SANTOS, J. C. Screening of food grade lipases to be used in esterification and interesterification reactions of industrial interest. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 4, p. 1146-56, 2010.

DU, W.; LI, W.; SUN, T.; CHEN, X.; LIU, D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 331-337, 2008.

DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, M. R.; MENEGHETTI, S. M. P. Catalytic production of biodiesel and diesel-like hydrocarbons from triglycerides. **Energy & Environmental Science**, v. 2, p. 1258-1265, 2009.

EARLE, M. J.; ESPERANCUA, J.M.S.S.; GILEA, M.A.; LOPES, J.N.C; REBELO, L. P. N.; MAGEE, J.W.; SEDDON, K.R.; WIDEGREN, J. The distillation and volatility of ionic liquids, **Nature**, v. 439, p. 831, 2006.

FARIA, E. L. P., RIVALDI, J. D.; CARVALHO, A. K. F.; De CASTRO, H. F. Síntese enzimática de monoésteres de etila catalisada por células íntegras de fungo filamentoso em reator de leito fixo. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA**, 2014, Florianópolis – SC.



FERNANDES P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2, p. 19, 2010.

FERRAREZI, A. L.; OHE, T. H. K.; BORGES, J. P.; BRITO, R. R.; SIQUEIRA, M. R.; VENDRAMINI, P. H.; JR., J. C. Q.; NUNES, C. C. C.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; BOSCOLO, M.; SILVA, R.; GOMES, E. Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae seudaticae* N31 for transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic**, v. 107, p. 106-113, 2014.

FERRARI, R. A.; SOUZA, W. L. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p.106-111, 2009.

FISCHER, T.; SETHI, A.; WELTON, T.; WOOLF, J., Diels - alder reactions in room-temperature ionic liquids. **Tetrahedron Letters**, v. 40, n. 4, p. 793-796, 1999.

FOGLER, H. S. **Elementos de engenharia das reações químicas**, 3. ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2002:

FORBES, D. C.; LAW, A. M.; MORRISON, D. W. The Knoevenagel reaction: analysis and recycling of the ionic liquid medium. **Tetrahedron Letters**, v. 47, p. 1699, 2006.

FU, B.; VASUDEVAN, P. T., Effect of solvent-co-solvent mixtures on lipase-catalyzed transesterification of canola oil. **Energy & Fuels**, v. 24, p. 4646–4651, 2010.

FUKUDA, H.; HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; NODA, H. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 669-673, 2008.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 405-416, 2001.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 2-12, 2009.

GAMBA, M.; LAPIS, A. A. M.; DUPONT, J., Supported ionic liquid enzymatic catalysis for the production of biodiesel. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 350, n. 1, p. 160-164, 2008.

GANESAN, D.; RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V., Response surface optimization for the transesterification of karanja oil using immobilized whole cells of *Rhizopus oryzae* in n-hexane system. **Biomass Conversion Biorefinery**, v. 2, p. 11–20, 2012.

GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; ORTIZC, C.; TORRESB, R.; RODRIGUESD, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R., Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 93, p. 34– 43, 2013.

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R.C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GHIACI, M.; AGHABARARI, B.; HABIBOLLAHI, S.; GIL, A. Highly efficient Brønsted acidic ionic liquid-based catalysts for biodiesel synthesis from vegetable oils. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1200–1204, 2011.

GOPALAKRISHNA, A. G.; GAURAV, R.; AJIT SINGH, B.; PRASANTH KUMAR, P. K. Coconut oil: chemistry, production and its applications - A review. **Indian Coconut Journal**, v.73, n. 3, p. 15-27, 2010.

GUARTE, R.C.; MÜHLBAUER, W.; KELLERT, M. Drying characteristics of copra and quality of copra and coconut oil. **Postharvest Biology and Technology**, v. 9 (3), p. 361-372, 1996.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 273-278, 2007.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; KAIEDA, M.; ODA, M.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of fatty acid membrane composition on whole cell biocatalysts for biodiesel-fuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 155-160, 2004.

HUANG, Z. L.; YANG, T. X.; HUANG, J. Z.; YANG, Z., Enzymatic production of biodiesel from *Millettia pinnata* seed oil in Ionic Liquids. **Bioenergy Research**, 2014. doi 10.1007/s12155-014-9489-6.

JIN, G.; BIERMA, T. J.; HAMAKER, C. G.; RHYKERD, R.; LOFTUS, L. A. Producing biodiesel using whole-cell biocatalysts in separate hydrolysis and methanolysis reactions. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 43, p. 589-595, 2008.

KANDYLIS, P. Starchy Supports: Immobilization and wine making. **Fermentation Technology** v. 1, n. 2, 2012 (doi:10.4172/2167-7972.1000e107).

KHANG, D. S.; RAZON, L. F.; MADRAZO, C. F.; TAN, R. R., *In situ* transesterification of coconut oil using mixtures of methanol and tetrahydrofuran. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 1461, p. 1-7, 2014.

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

KYEONG, J. S.; YEOM, S. H. Preparation of immobilized whole cell biocatalyst and biodiesel production using a packed-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2014. doi: 10.1007/s00449-014-1196-3.

LAI, J.Q.; HU, Z.L.; WANG, P.W.; YANG, Z. Enzymatic production of microalgal biodiesel in ionic liquid [BMIm] [PF6]. **Fuel**, v. 95, p. 329-333, 2012.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2000.

LI, J.; LI L.; TONG, J., WANG, Y.; CHEN, S. Research development on lipase-catalyzed biodiesel. **Energy Procedia**, v. 16, p. 1014–1021, 2012.

LI, W.; DU, W.; LIU, D. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 122- 127, 2007a.

LI, W.; DU, W.; LIU, D. *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell catalyzed methanolysis of crude and acidified rapeseed oils for biodiesel production in tert-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1481-1485, 2007b.

- LI, W.; DU, W.; LIU, D.; YAO, Y. Study on factors influencing stability of whole cell during biodiesel production in solvent-free and tert-butanol system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 111–115, 2008.
- LIANG, X.; GAO, S.; WU, W.; YANG, J. Highly efficient procedure for the synthesis of biodiesel from soybean oil. **Fuel Processing Technology**, v. 90, p. 701- 704, 2009.
- LIN, L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. **Applied Energy**, v. 88, p. 1020–1031, 2011.
- LIU, Y.; CHEN, D Y. Y.; PENG, C; XU, L. Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents. **Bioresource Technology**. v. 102, n. 22, p. 10414-8, 2011.
- LOZANO, P.; VERDUGO, E. G.; BERNAL, J. M.; IZQUIERDO, D. F.; BURGUETE, M. I.; GAMEZ, G. S.; LUIS, S.V. Immobilized lipase on structured supports containing covalently attached ionic liquids for the continuous synthesis of biodiesel in scCO<sub>2</sub>, **ChemSusChem**, v. 5, p. 790 – 798, 2012.
- MACEDO, I.C.; NOGUEIRA, L. A. H. **Biocombustíveis**. Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, 2005. Disponível em: /<http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/bc18.pdf>S. Acessado em 24 de setembro de 2014.
- MAPA. Agrostat. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**, BRASIL; 2012. /<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/AGROSTAT.html>S. Acessado em 20 de setembro de 2014
- MAPA. **Plano Nacional de Agroenergia 2006–2011**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2005.
- MARINA, A. M.; CHE MAN, Y. B.; NAZIMAH, S. A. H.; AMIN, I., Chemical properties of virgin coconut oil. **Journal of American Oil Chemist`Society**, v. 86, p. 301–307, 2009.
- MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. **Technometrics Journal**, New York: Wiley, v. 38, n. 3, p. 284-286, 1996.
- NILSSON, K.; BIRNBAUM, S.; FLYGARE, S.; LINSE, L.; MOSBACH, K.; BRODELIUS, P. A general method for the immobilization of cells with preserved viability. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 319-327, 1983.
- PARAWIRA, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, p. 82–93, 2009.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. In: *Fungi and Food Spoilage*. 3. ed. New York: Springer, 2009, p. 145- 263.
- QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; COSTA NETO, P. R.; TORRES, E. A.; CASTRO, M. P.; JESUS, C. A. C.; Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Química Nova**, v. 32, p. 793-808, 2009.

RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Biocatalysis in ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2757-2785, 2007.

RIBEIRO, B. D.; DE CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-17, 2011.

RIOS, A. P. L.; FERNÁNDEZ, F. J. H.; GÓMEZ, D.; RUBIO, M.; VÍLLORA, G., Biocatalytic transesterification of sunflower and waste cooking oils in ionic liquid media. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1475–1480, 2011.

ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 398-408, 2009.

ROOSEN, C.; MULLER, P.; GREINER, L., Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 607-614, 2008.

RUZICH, N. I.; BASSI, A. S., Investigation of lipase-catalized biodiesel production using ionic liquid [BMIM][PF<sub>6</sub>] as a co-solvent in 500 mL jacketed conical and shake flask reactors using triolein or waste canola oil as substrates, **Energy & Fuels**, v. 24, n. 5, p. 3214–3222, 2010.

SILVA, G. S.; BRUNO, L. M.; DE CASTRO, H. F. Seleção e imobilização de fungos filamentosos produtores de lipase intracelular. In: **SINAFERM, 2009 e XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**, 2009, Natal – RN.

SILVA, G. S.; FREITAS, L.; DE CASTRO, H. F. Etanolise do óleo de babaçu empregando células íntegras de fungos filamentosos imobilizadas em esponjas de poliuretano. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA**, 2010 (a), v. 1, p. 9595-9601. Foz do Iguaçu.

SILVA, G. S.; SOARES, M. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Influência do solvente na síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu catalisado por células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**, 2011, Caxias do Sul.

STAMENKOVIC, O. S.; VELICKOVIC, A.V.; VELJKOVIC, V. B., The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, p. 3141–3155, 2011.

SUBHASH, G. V.; MOHAN, S. V. Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus* sp. using corncob waste liquor as a substrate. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9286–9290, 2011.

SUN, T.; DU, W.; ZENG, J.; DAI, L.; LIU, D., Exploring the effects of oil inducer on whole cell-mediated methanolysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 514–518, 2010.

SUN, T.; DU, W.; LIU, D., Comparative study on stability of whole cells during biodiesel production in solvent-free system **Process Biochemistry**, v. 46, p. 661–664, 2011.

TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H., Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 185–189, 2008.

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, p. 407-412, 2008.

WELTON, T., Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2071-2083, 1999.

XIAO, M.; MATHEW, S.; OBBARD, P. A newly isolated fungal strain used as whole cell biocatalyst for biodiesel production from palm oil. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 2, p. 45-51, 2010.

XIAO, M.; QI, C.; OBBARD, J. P., Biodiesel production using *Aspergillus niger* as a whole cell biocatalyst in a packed bed reactor. **GCB Bioenergy**, v. 3, p. 293–298, 2011.

XU, X.; FOMUSO, L. B.; AKOH, C. C., Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 48, p. 287–303, 2000.

YOSHIDA, A.; HAMA, S.; TAMADANI, N.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Improved performance of a packed-bed reactor for biodiesel production through whole-cell biocatalysis employing a high-lipase-expression system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 63, p. 76–80, 2012.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas como Agentes Biotecnológicos. In: SAIAD, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 4, p. 35-85.

ZHANG, K. P.; LAI, J. Q.; HUANG, Z. L.; YANG, Z., *Penicillium expansum* lipase-catalyzed production of biodiesel in ionic liquids, **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2767–2772, 2011.

## APÊNDICE A

**Tabela 5.9.** Valores de absorvância das amostras (reator B) previamente diluídas em terc-butanol.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (g/mL)</b>	<b>Absorvância</b>
1	0,00000000	0,0007
2	0,00000000	0,0006
3	0,00000213	0,0228
4	0,00000645	0,0346
5	0,00000912	0,0419
6	0,00001692	0,0401
7	0,00002189	0,0469
8	0,00002555	0,0519
9	0,00002687	0,0537
10	0,00003214	0,0609
11	0,00003579	0,0659
12	0,00003740	0,0681
13	0,00004194	0,0743
14	0,00003726	0,0679
15	0,00003237	0,0391
16	0,00002271	0,0325
17	0,00001575	0,0385
18	0,00001150	0,0327
19	0,00000814	0,0281
20	0,00000638	0,0257
21	0,00000397	0,0224
22	0,00000260	0,0241
23	0,00000198	0,0224
24	0,00000052	0,0184
25	0,00000000	0,0124
26	0,00000000	0,0007
27	0,00000000	0,0006