

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

MÁRCIO STEINMETZ SOARES

**Síntese e caracterização de espumas de poliuretano
para imobilização de células íntegras e aplicação na
síntese de biodiesel**

Lorena
2012

MÁRCIO STEINMETZ SOARES

Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira

Lorena

2012

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

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Especializada em Engenharia de Materiais
USP/EEL

Soares, Márcio Steinmetz

Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para
imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de
biodiesel / Márcio Steinmetz Soares; orientador Pedro
Carlos de Oliveira.-- Lorena, 2012.

117f.: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química . Área de Concentração:
Processos Catalíticos e Biocatalíticos. – Escola de
Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo.

1. Espumas de Poliuretano 2. Imobilização de Células
3. Biodiesel I. Título.

CDU 662.756

Dedicatória

Aos meus pais: João Juares e Vanilda,
por me terem dado a vida,
por serem exemplos de vida, sabedoria, honestidade e bondade
por cada palavra dita, cada ensinamento, cada carinho retribuído,
por me possibilitarem a realização deste sonho,
pelo incentivo, paciência, compreensão,
e pelo privilégio de ser seu filho.

À minha amada Andrea,
por ser minha companheira e amiga,
por estar ao meu lado nos momentos da dificuldade

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de tudo.

Ao Prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira pela orientação e aprendizado que este período me proporcionou;

À Prof. Dr^a. Heizir Ferreira de Castro, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho no Laboratório de Biocatálise e pelas contribuições para o seu desenvolvimento. Agradeço o incentivo, os conselhos e os ensinamentos;

A Andréa por ter se mantido presente em toda essa caminhada, por me ouvir, aconselhar, incentivar, estar presente nos momentos de fracasso e de felicidade. Muito obrigado pelo carinho e companheirismo;

À minha família, João Juares, Vanilda, Marcelo e Tiago pelo amor e incentivo;

À minha família de Lorena, Dona Auxiliadora e Rodrigo, pela acolhida, apoio, confiança e amizade sempre;

A todos meus colegas de trabalho do Laboratório de Biocatálise pela amizade e convivência, pelos momentos de descontração, ajuda e união;

Aos amigos de república de Lorena por tornarem os finais de semana mais divertidos;

Aos meus amigos de São Carlos, que apesar da distância, estiveram sempre presentes;

A todos que, por um lapso de memória não foram mencionados de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se concretizasse;

À EVONIK, nas pessoas do Celso, Agesislau e Clodoaldo, pelo aprendizado e pela ajuda com os aditivos para síntese das espumas;

A DOW e a BASF pela doação dos polois e do isocianato;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

SOARES, M. S. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel**. 2012. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

O presente trabalho teve por objetivo sintetizar espumas flexíveis de poliuretano e estudar seu desempenho como matriz para imobilização de células íntegras de micro-organismo com elevada atividade lipolítica (glicerol éster hidrolase – E.C. 3.1.1.3). A biomassa imobilizada foi empregada como catalisador na síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol. Na primeira etapa do trabalho, foram avaliadas as condições de síntese das espumas de poliuretano e verificado a necessidade do uso dos catalisadores e surfactantes na formulação para se obter espumas com resistência a solventes e com poros bem distribuídos. Com o objetivo de controlar o diâmetro dos poros das espumas, foram sintetizadas sete espumas. Em três formulações foram utilizados poliois poliéter de diferentes massas moleculares, 1100g/mol, 3000g/mol e 6000g/mol com mesma agitação (2500RPM) e os produtos apresentaram poros de menores dimensões. Em outras três, duas utilizando o polioliol com massa molecular de 3000g/mol e agitações de 500 RPM e 1500RPM, foram obtidas espumas com tamanho de poros diferentes e maiores que as anteriores; em outra formulação foi utilizado polioliol de menor massa molecular (1100g/mol) e agitação de 500RPM, quando foi obtida espuma com tamanhos de poros diferentes das três primeiras formulações. Na última formulação foi utilizado um polioliol poliéster e agitação de 2500RPM na qual o diâmetro de poros foi semelhante ao das três primeiras formulações. Todas as espumas foram caracterizadas quanto à densidade aparente, tamanho de poros, permeabilidade ao ar, grau de inchamento, quantidade de solvente absorvida pelo polímero e sorção de água. Nesta etapa foi verificada a eficiência da agitação para o controle da dimensão dos poros. Na etapa seguinte, as espumas sintetizadas e uma espuma comercial pré-selecionada e utilizada como controle, foram empregadas nas imobilizações das células íntegras de *Mucor circinelloides*. Foram avaliadas as atividades de hidrólise das biomassas imobilizadas e a quantidade de micélio adsorvido nas espumas. Na seqüência as células foram empregadas na etanolise de óleo de babaçu em meio contendo terc-butanol como solvente. Os resultados obtidos indicaram uma influência do tamanho de poros e do tipo de polioliol no rendimento da bioconversão. Elevados rendimentos foram obtidos com as espumas com poros de menores dimensões, sendo estas utilizadas em bateladas consecutivas com o objetivo de comparar as respectivas estabilidades operacionais. Ao se utilizar espuma com diâmetros de poros maiores, houve um aumento das conversões nas primeiras 24 horas, porém um comprometimento dos rendimentos finais na transesterificação. As espumas com polioliol poliéter apresentaram boa biocompatibilidade com o fungo, destacando as espumas sintetizada com os poliois de massa molecular de 1100g/mol, por apresentar boa estabilidade operacional e a espuma com polioliol de massa molecular de 6000g/mol, por apresentar o maior rendimento, cerca de 87%. Entre as espumas testadas aquela sintetizada a partir de poliéster não apresentou uma boa biocompatibilidade devido à inibição da produção da lipase intracelular na biomassa imobilizada. Os resultados obtidos indicaram que as espumas de poliuretano apresentaram boas características para a imobilização de células de *M. circinelloides* e que as biomassas imobilizadas nestas matrizes apresentaram boas propriedades catalíticas.

Palavras-chaves: Espumas de poliuretano. Imobilização de células. Biodiesel

ABSTRACT

SOARES, M., S. **Synthesis and characterization of polyurethane foams for immobilization of whole cell and application in the synthesis of biodiesel**. 2012. 117p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012

This study aimed to synthesize flexible polyurethane foams and to study their performance as matrix for immobilization of whole cell micro-organism with high lipolytic activity (glycerol ester hydrolase - EC 3.1.1.3). Each system consisted of polyurethane matrix and whole cell, called immobilized biomass, was used as catalyst in the synthesis of biodiesel from babassu oil and ethanol. In the first stage of the research were evaluated the conditions of synthesis of polyurethane foams and verified the utilization of catalysts and surfactants in the formulation to obtain foams with resistance to solvents and well-distributed pores. In order to control the pore diameter of the foams, seven foams were synthesized. In three formulations were used polyether polyols with different molecular weight, 1100g/mol, 3000g/mol and 6000g/mol with same agitation (2500rpm) and the foams exhibited pores of small dimensions. In other three synthesis, two of them using the polyols with molecular weight of 3000g/mol and agitations of 500 rpm, 1500 rpm, the foams showed the different and bigger pore dimensions when compared with the first three formulations; in other using polyol with lower molecular weight on agitation (1100g/mol) and 500rpm, resulting in foams with different pore sizes. The last foam with polyester polyol and agitation of 2500rpm showed the same pores sizes of the first three formulations. All foams were characterized in terms of apparent density, pore size, air permeability, degree of swelling, amount of absorbed solvent by the polymer and water sorption. This step was verified the influence of the agitation speed in the control of pore size. In the next step, the synthesized foams and a pre-selected foam used as control, were used in immobilization of whole cells of *Mucor circinelloides*. The hydrolytic activity of immobilized biomass and the amount of adsorbed mycelium foams were evaluated. In the following step, the whole cells immobilized in the matrixes of polyurethane were employed in the ethanolysis of babassu oil using tert-butanol as solvent. The results indicated the influence of pore size and the type of polyol in the bioconversion yield. High yields were obtained with foams with smaller pores sizes, which were used in consecutive batches in order to evaluate the operational stability. When using foam with larger pore diameters, there was an increase in conversions in the first 24 hours, but a commitment of final earnings in the transesterification. Although the polyether polyol foams showed good biocompatibility with the fungus, highlighting the foam polyols synthesized with a molecular mass of 1100g/mol by presenting good operational stability and foam polyol with a molecular mass of 6000g/mol by presenting the highest yield (87%). Between the tested foams the one synthesized with polyester did not show good biocompatibility due to inhibition of intracellular production of biomass immobilized lipase. The results indicated that the polyurethane foams had good characteristics for immobilization of whole cells of *M. circinelloides* as well as the immobilized biomass showed good catalytic properties.

Key words: Polyurethane foams, Whole cell immobilization; Biodiesel

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura geral de um poliuretano.....	18
Figura 2.2. Esquema da síntese convencional de um poliuretano.....	19
Figura 2.3. Esquema da reação de expansão e de formação da poliuréia.	19
Figura 2.4. Esquema das reações de formação dos alofanatos e biuretos.	20
Figura 2.5. Representação da interação entre os grupos uretânicos e poliuréias (VILAR, 2002)....	21
Figura 2.6 Microscopia de força atômica de uma EPU onde as regiões escuras representam segmentos flexíveis e as regiões amarelas os segmentos rígidos; figura A com dimensões de 5 μ m x 5 μ m e figura B com 500nm x 500nm (fonte: LAN; HAUGSTAD, 2011).	21
Figura 2.7. Estruturas de ressonância do grupo isocianato	22
Figura 2.8. Formação de um derivado do ácido carbâmico.....	23
Figura 2.9. Dimerização e trimerização dos isocianatos.....	23
Figura 2.10. Formação de uma carbodiimida	24
Figura 2.11. Esquema de reação de catalise dos organometálicos (I e II)	27
Figura 2.12. Esquema da reação de catálise das aminas terciárias.....	27
Figura 2.13. Etapas da síntese de EPU pelo método “One Shot”	29
Figura 2.14. Representação da síntese de espuma de PU – etapa de dosagem e mistura.....	31
Figura 2.15. Estrutura típica de uma espuma: uma célula encontrada numa espuma flexível de poliuretano, as bordas de Plateau e as respectivas áreas transversais (FONTE: JANG; KRAYNIK; KYRIAKIDES, 2008).	32
Figura 2.16. Esquema do ciclo de crescimento de fungo (Fonte: ROSCHE <i>et al.</i> , 2009)	34
Figura 2.17. Modelo hipotético da lipase e da interação da enzima na interface água-óleo (Fonte: PALOMO <i>et al.</i> , 2005)	39
Figura 2.18. Comparação das etapas envolvidas no processo de obtenção	41
de biodiesel por via enzimática empregando lipase purificada ou células íntegras imobilizadas: (a) lipase extracelular e (b) lipase intracelular (DU <i>et al.</i> , 2008).....	41
Figura 3.1. Calibragem da micrografia no programa <i>ImageJ</i>	53
Figura 3.2 – Seqüência de tratamento das micrografias das espumas realizado pelo software <i>ImageJ</i> para o levantamento do diâmetro de poros	54
Figura 3.3. Gráfico do parâmetro de solubilidade (δ_1) x coeficiente de inchamento (Q) com a linha de tendência gaussiana traçada.....	56
Figura 4.1. Micrografias, gráfico da distribuição dos tamanhos de poros e o valor do diâmetro médio de poro das espumas sintetizadas.	67
Figura 4.2. Gráficos do coeficiente de inchamento (Q) pelo parâmetro de solubilidade	73
Figura 4.3. Gráfico de massa absorvida de solvente por massa espuma	75

Figura 4.4. Gráfico de sorção de água pelas espumas PL1100, PL3000, PL6000, Comercial e a Poliester	76
Figura 4.5. Gráfico de sorção de água pelas espumas PL1100, PL1101, PL3000, PL3001 e a PL3002	77
Figura 4.6. Micrografias das biomassas imobilizadas nas espumas sintetizadas (20x): a) PL1100; b) PL1101; c) PL3000; d)PL3001; e)PL3002; f) PL6000; g) Poliester; h) Comercial.....	79
Figura 4.7. Razão de imobilização e atividade hidrolítica média das biomassas imobilizadas.....	81
Figura 4.8. Comparação dos perfis de formação dos ésteres de etila totais em função do tempo para as biomassas imobilizadas nas espumas PL1100, PL3000, PL6000 e Comercial.....	83
Figura 4.9. Comparação dos perfis de formação dos ésteres de etila totais em função do tempo para as biomassas imobilizadas nas espumas PL3000, PL3001, PL3002.....	85
Figura 4.10. Comparação dos perfis de formação dos ésteres de etila totais em função do tempo para as biomassas imobilizadas nas espumas PL1100 e PL1101.....	86
Figura 4.11. Comparação dos perfis de formação dos ésteres de etila totais em função do tempo para as biomassas imobilizadas nas espumas Poliester e Comercial.....	87
Figura 4.12. Gráfico dos rendimentos e das atividades residual em cada reciclo, para a biomassa imobilizada na espuma PL1100.....	88
Figura 4.13. Gráfico dos rendimentos e das atividades hidrolítica em cada reciclo, para a biomassa imobilizada na espuma PL3000.....	89
Figura 4.14. Gráfico dos rendimentos e das atividades hidrolítica em cada reciclo, para a biomassa imobilizada na espuma PL6000.....	90
Figura 4.15 – Gráfico dos rendimentos e das atividades hidrolítica em cada reciclo, para a biomassa imobilizada na espuma Comercial.....	91
Figura 4.16. Atividade hidrolítica residual das espumas PL1100, PL3000, PL6000 e Comercial...	92
Figura 4.17. Atividade de transesterificação residual das espumas PL1100, PL3000, PL6000 e Comercial.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Velocidade relativa de reações típicas dos isocianatos	24
Tabela 2.2. Aplicações de microrganismos imobilizados e suportes utilizados em processos biotecnológicos.	37
Tabela 2.3. Processos de obtenção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando células íntegras.	43
Tabela 3.1- Reagentes utilizados na preparação das EPU's estudadas neste trabalho	46
Tabela 3.2. Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.	47
Tabela 3.3 - Variação dos reagentes em 100 partes de poliol (VILAR, 2002)	49
Tabela 3.4 - Formulações sem catalisadores e surfatantes, com um índice de isocianato igual a 100	49
Tabela 3.5 – Formulações proposta pela EVONIK.....	49
Tabela 3.6 - Condições operacionais para determinação dos ésteres de etila por CG.	60
Tabela 4.1 - Formulações sem catalisadores e surfatantes, com um índice de isocianato igual a 100	62
Tabela 4.2. Fotos das espumas formuladas para análise comparativa dos poros e os valores das respectivas densidades.	63
Tabela 4.3. Resultados das análise de permeabilidade ao ar.....	71
Tabela 4.4 Valores dos coeficientes de intumescimento no cloroformio (Q) e parâmetro de solubilidade das espumas.	72
Tabela 4.5. Valores das razões entre a massa seca de micélio adsorvida pela massa de espuma utilizada e a atividade hidrolítica da biomassa imobilizada	78
Tabela 4.6. Valores de rendimento médio de transesterificação do óleo de babaçu, e as viscosidade dinâmica, densidade e viscosidade cinemática dos biodiesel catalisados pelas biomassas imobilizadas nas espumas PL1100, PL3000, PL6000 e Comercial.	84
Tabela 4.7. Valores de rendimento médio de transesterificação do óleo de babaçu, e as viscosidade dinâmica, densidade e viscosidade cinemática dos biodieseis catalisados pelas biomassas imobilizadas nas espumas PL3000, PL3001, PL3002.	85
Tabela 4.8. Valores de rendimento médio de transesterificação do óleo de babaçu, e as viscosidade dinâmica, densidade e viscosidade cinemática dos biodiesel catalisados pelas biomassas imobilizadas nas espumas PL1100 e PL1101.	86
Tabela 4.9. Valores de rendimento médio de transesterificação do óleo de babaçu, e as viscosidade dinâmica, densidade e viscosidade cinemática dos biodiesel catalisados pelas biomassas imobilizadas nas espumas Poliester e Comercial.	87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Histórico dos Poliuretanos	16
2.2. Os aspectos químicos da síntese das EPU's	18
2.3. Reagentes para a síntese de PU's	22
2.3.1 <i>Isocianatos</i>	22
2.3.2 <i>Poliois</i>	25
2.3.3 <i>Catalisadores</i>	26
2.3.4 <i>Surfatantes</i>	28
2.3.5 <i>Agente de expansão</i>	28
2.4. Etapas de síntese da EPU	29
2.5. Fungo filamentoso	33
2.6. Espumas de poliuretano como matriz de imobilização de biocatalisadores	35
2.7. Lipases	38
2.8. Lipase intracelular	40
2.9. Síntese de biodiesel	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1. Materiais	46
3.1.1 <i>Reagentes de síntese das EPU's</i>	46
3.1.2 <i>Micro-organismo</i>	47
3.1.3 <i>Outros Reagentes</i>	47
3.1.4 <i>Equipamentos</i>	47
3.2. Metodologia	48
3.2.1 <i>Síntese de espuma de poliuretano</i>	48

3.2.2. Imobilização das células fúngicas.	51
3.2.3. Preparação do biocatalisador.	52
3.2.4. Síntese de biodiesel.	52
3.2.5. Reutilização do biocatalisador em bateladas consecutivas.	52
3.3. Métodos de Análise	52
3.3.1. Cálculo do diâmetro médio de poros.	52
3.3.2. Permeabilização ao ar.	55
3.3.3. Densidade aparente das EPU's.	55
3.3.4. Grau de inchamento das EPU's e parâmetro de solubilidade.	55
3.3.5. Sorção de água e solventes.	57
3.3.6. Absorção dos solventes pela matriz.	57
3.3.7. Determinação da atividade lipolítica do biocatalisador.	57
3.3.8. Determinação das quantidades de células adsorvidas.	58
3.3.9. Separação dos produtos formados na síntese de biodiesel.	58
3.3.10. Análise de viscosidade do óleo vegetal e dos ésteres de etila.	59
3.3.11. Determinação da densidade.	59
3.3.12. Determinação dos ésteres de etila.	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 Sínteses das espumas de PU	61
4.2. Caracterizações das espumas de PU	65
4.2. 1. Cálculo do diâmetro médio de poros	65
4.2.2. Permeabilização ao ar	69
4.2.3. Grau de inchamento das EPU's e parâmetro de solubilidade (δ)	71
4.2.4. Absorção dos solventes pela matriz	74
4.2.5. Sorção de água e solventes	75
4.3. Imobilização de células fúngicas nas EPU's	77

4.4. Etanolise do óleo de babaçu	82
4.5. Reações de bateladas consecutivas	88
5. CONCLUSÕES	93
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	95
REFERÊNCIAS	96
APÊNDICES.....	105
ANEXO	113

1. INTRODUÇÃO

Na última década devido ao esgotamento das reservas de combustíveis fósseis, o aumento no preço do barril de petróleo, a poluição gerada pelos combustíveis convencionais e a normas mais rigorosas de emissão de poluentes gasosos, os biocombustíveis têm atraído atenção mundial levando-o a uma posição de destaque no cenário energético. Entre os tipos de combustíveis renováveis, o biodiesel se destaca por ser uma excelente alternativa em substituição ao diesel de petróleo e ainda por apresentar as vantagens de ser biodegradável, não tóxico, apresentar baixa emissão de particulados e monóxido de carbono, ser isento de enxofre e apresentar um alto número de cetano (BALAT, 2011; FAZAL; HASEEB; MASJUKI, 2011; MANIQUE *et al.*, 2012; DO CARMO *et al.*, 2012).

O biodiesel é definido como um monoalquil éster de ácidos graxos de cadeia longa e derivados de fontes renováveis como óleos vegetais e gorduras animais, que pode ser usado em motores de ignição por compressão. O método mais usual de obtenção é o da transesterificação, na qual ocorre a transformação de triglicerídeos em moléculas de ésteres de ácidos graxos, que é intermediado por diferentes sistemas catalíticos (FERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009; GOG *et al.*, 2012).

Os vários tipos de catalisadores usados para a reação de obtenção do biodiesel podem ser agrupados em quatro categorias: alcalinos, ácidos, enzimáticos e heterogênicos inorgânicos. A rota que utiliza os catalisadores enzimáticos, portanto a rota enzimática, vem sendo muito pesquisada por causa da alta pureza dos produtos obtidos em condições brandas de reação. Embora atualmente, a transesterificação enzimática não possa competir com a rota química, poderia gradativamente substituí-la devido ao crescente interesse pela utilização desse bicomcombustível (MACEDO; MACEDO, 2004; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; GOG *et al.*, 2012).

Dentro da tecnologia da catálise enzimática, as lipases intracelulares vêm despertando grande interesse de investigação pelo seu potencial uso nos processos biotecnológicos, pois sua aplicação pode reduzir consideravelmente os custos de um processo enzimático. Diversos estudos estão sendo direcionados para utilização de células íntegras de fungos filamentosos como biocatalisadores, ainda baseados em sua habilidade de imobilização e na evidência de conterem proteínas funcionais de interesse na superfície celular, como as lipases intracelulares que se encontram ligadas à membrana celular. Além

disso, técnicas simples de imobilização e a relativa facilidade de ampliação de escala ao se utilizar fungos filamentosos tornam as células íntegras um biocatalisador com vantagens comerciais (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2009).

Entretanto, para se utilizar células íntegras lipolíticas como biocatalisadores de uma forma conveniente, as células devem ser imobilizadas de tal maneira que se assemelhem a catalisadores sólidos utilizados convencionalmente em reações químicas. Entre os diversos métodos de imobilização disponíveis, a técnica que utiliza partículas de suporte de biomassa, também conhecidas por BSP's (Biomass Support Particles), tem muitas vantagens sobre outros métodos para aplicações industriais, dentre as quais se destacam a simplicidade de imobilização da biomassa, o crescimento natural do microorganismo e o baixo custo de produção das BSP's (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001; YOSHIDA, *et al.*, 2012).

Recentemente, a literatura relatou diversos trabalhos destacando o emprego de células íntegras imobilizadas para mediar reações de hidrólise, esterificação e principalmente transesterificação de óleos vegetais, visando à obtenção do biodiesel. Na maioria deles, quando reações de metanólise foram conduzidas por células íntegras imobilizadas, o rendimento de produção de ésteres metílicos foi praticamente igual ao obtido com lipases extracelulares, porém com uma redução substancial no custo da preparação do biocatalisador imobilizado. Este fato sugere que o uso das células íntegras imobilizadas, em uma matriz adequada, pode oferecer um meio promissor para produção de biodiesel em escala industrial (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; CHEN; LIN, 2010).

Entre os suportes adequados para a imobilização de biocatalisadores, os poliuretanos (PU's) vêm se destacando como uma matriz promissora para imobilizar não somente enzimas, mas também biomassa microbiana (células íntegras). Apesar dessa tendência, a maioria das pesquisas utiliza as espumas disponíveis comercialmente como suporte e não reporta a razão da escolha de uma determinada formulação de espuma, bem como a relação entre os reagentes usados na preparação da espuma e a retenção da biomassa microbiana (DE ORY *et al.*, 2004; DIAS *et al.*, 2001).

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo geral sintetizar espumas de poliuretano destinadas a suportar células íntegras de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica para ser utilizado como biocatalisador na rota etílica do óleo de babaçu visando à produção de biodiesel. Levando em consideração este aspecto, o objetivo proposto neste projeto será alcançado mediante a execução das seguintes etapas, que podem ser visualizadas como objetivos específicos:

- Controlar a síntese da espuma de poliuretano visando determinar as condições de polimerização levando em consideração os principais fatores que influenciam na formulação da espuma e na biocompatibilidade, incluindo tamanho e quantidades de poros da espuma, quantidade de poros abertos e fechados, densidade, permeabilidade e sorção;
- Selecionar formulações mais biocompatíveis, avaliando a colonização do micro-organismo selecionado, a sua retenção no polímero e produção das lipases intracelulares.
- Testar a eficiência do sistema imobilizado na síntese de biodiesel utilizando como matéria-prima lipídica o óleo de babaçu e como agente acilante o etanol.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico serão abordados temas referentes aos poliuretanos, incluindo o seu histórico, com foco nas espumas flexíveis e a sua versatilidade, as reações envolvidas nas suas sínteses, os fatores que favorecem uma boa espumação e a sua aplicação como suporte para imobilização de biomassa. Em seguida serão abordados temas sobre os fungos, o emprego de espuma para a imobilização de células, a utilização de lipases como biocatalisadores e por fim o emprego de células, produtoras de lipase intracelular, e imobilizadas em espumas de poliuretano, para atuarem como biocatalisador na produção de biodiesel.

2.1. Histórico dos Poliuretanos

O conhecimento da reação de produção de ligações uretânicas data de 1849, quando Wurts e Hofmann relataram pela primeira vez a reação entre um isocianato e um composto contendo grupo hidroxila (SERVES, 2007). Em seguida, Otto Bayer et al., em 1937, utilizaram essa reação para o desenvolvimento dos PU's, reagindo um di-isocianato com glicóis, resultando em uma reação de poli-adição (VILAR, 2002). Também é possível sintetizar ligações uretânicas sem a utilização dos isocianatos. Neste caso deve-se utilizar oligômeros que possuem grupos carbonatos cíclicos que devem reagir com diaminas, ou ainda reações envolvendo vinil carbonatos com aminas (ROKICK; PIOTROWSKA, 2002; MATSUMURA; SOEDA; TOSHIMA, 2006).

As primeiras produções de espumas poliuretânicas ou de poliuretano (EPU's) foram realizadas por Leverkusen entre 1952 e 1954, utilizando poliésteres como poliois, dando origem às primeiras espumas e assim desenvolvendo a base para a tecnologia comercial de espumas. Foi então que em 1957 iniciou-se a utilização de poliois poliésteres e por causa de suas vantagens técnicas e comerciais, estes novos poliois ganharam rapidamente espaço no mercado das EPU's (SERVE, 2007).

Os PU's são polímeros versáteis devido à variedade dos grupos constitutivos e da possibilidade de polimerização controlada, o que permite a adaptação do processo e da composição para a obtenção de materiais para as mais variadas exigências, desde a sola de calçados a implantes cirúrgicos, pois um PU pode conter grupamentos: a) aromáticos, b) alifáticos, c) cíclicos, d) amidas, e) uréia, f) ésteres, g) éteres, entre outros (ZECK, 2004). Além dos grupamentos encontrados no monômero utilizado, as diferentes características

químicas e físicas dos poliuretanos também são obtidas pela adição de outros compostos químicos que atuam como catalisadores, agentes de expansão, agentes de reticulação, agentes de extensão de cadeia, surfatantes e aditivos, permitindo que o polímeros assumam estruturas celulares (espumas flexíveis e rígidas, elastômeros micro-celulares e membranas) ou uma forma sólida (elastômeros, revestimentos, selantes, adesivos, etc) (DE ORY *et al.*, 2004).

Portanto a escolha dos reagentes para a síntese de um PU, bem como, a proporção entre eles é responsável pela alta flexibilidade, fazendo com que esses polímeros ocupem posição importante no mercado mundial de polímeros sintéticos de alto desempenho (VILAR, 2002; OCHIAI; INQUE; ENDO, 2005; THOMSON, 2005; MATSUMURA; SOEDA; TOSHIMA, 2006).

A classificação das espumas como flexíveis ou rígidas, depende principalmente da escolha do polioli. As flexíveis são preparadas a partir de polióis de massa molecular moderadamente elevada, variando de 1000 a 6000 e baixo grau de funcionalidade, variando de 1,8 a 3, ao contrário das espumas rígidas, que na qual o polioli apresenta massa molecular entre 250 e 1000 e alta funcionalidade, de 3 a 12. (HERRINGTON; HOCK, 1997; VILAR, 2002).

As EPU's podem possuir células abertas ou fechadas tornando-as permeáveis ou impermeáveis ao ar e podem ser produzidas objetivando uma gama de propriedades que incluem maciez, resistência mecânica e resiliência, entre outras. Devido à variação de suas propriedades, essas espumas vêm sendo estudadas há anos, com destaque para a cinética das reações de síntese, sua morfologia, a disposição dos segmentos rígidos e flexíveis e o as propriedades de aplicação (KAUSHIVA *et al.*, 2000; SONNENSCHNEIN *et al.*, 2008; CORCUERA *et al.*, 2010; LAN; HAUGSTAD, 2011).

Nos últimos anos foram encontradas novas aplicações para os PU's nos campos da medicina, na área sanitária, no campo da separação química, bioquímica e na biotecnologia.

Na área de separação, as EPU's apresentam-se com boa versatilidade. Segundo Bowen (1970), as EPU's podem ser aplicadas para a extração em fase sólida de diferentes matérias por causa da presença de grupos não-polares e polares em suas estruturas, resultando em grande afinidade por diversos tipos de substâncias químicas. Outros autores descrevem o uso de EPU's para o tratamento de água, onde as espumas são usadas para a adsorção de substâncias hidrofóbicas (ROBAINA; SORIANO; CASSELLA, 2009), ions

metálicos (EL-SHAHAWI *et al.*, 2011) ou até corantes de águas residuais (KAMPRAD; GOSS, 2007). Portanto, as EPU's vêm sendo consideradas excelentes matrizes para separação química.

Na bioquímica e biotecnologia, os cientistas têm atribuído às espumas de PU características de suporte para imobilização de células e enzimas devido a sua resistência e durabilidade, sua estrutura de poros, a facilidade de controle de poros durante a síntese, sua área superficial, permeabilidade, facilidade do transporte de massa, espaço para o crescimento de biomassa, baixa toxicidade e baixo preço (DE ORY *et al.*, 2006). Portanto, por se tratar de um material versátil, de fácil preparação, por possuírem células abertas, permeáveis a gás e líquido, pelo poder de sorção e pela possibilidade de se produzir materiais com uma grande faixa de propriedades, as espumas flexíveis de poliuretano são o alvo principal deste trabalho.

2.2. Os aspectos químicos da síntese das EPU's

Ao contrário da maioria dos polímeros, cujas unidades monoméricas são bem definidas, o poliuretano é um polímero que não apresenta unidades repetitivas (uretano) de forma regular, não possuindo assim, uma fórmula empírica representativa da macromolécula. Usualmente, representa-se o poliuretano por suas unidades monoméricas principais, o di-isocianato e o polioliol, não sendo representados todos os tipos de ligação que efetivamente podem fazer parte da estrutura do polímero formado. A estrutura geral que constitui a base da química desses polímeros é a ligação uretânica mostrada na Figura 2.1.

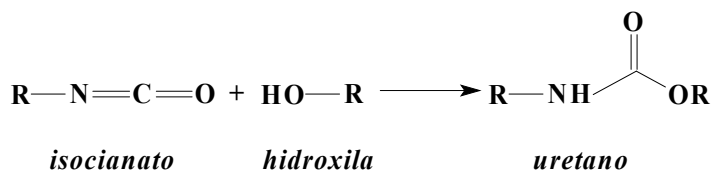


Figura 2.1. Estrutura geral de um poliuretano.

As principais reações de síntese dos PU's envolvem a reação de adição entre um isocianato e um composto que possui hidrogênio ativo, normalmente um polioliol, responsável pela formação de ésteres de ácido carbâmico (ligações uretano) e pode ser considerada como a reação de propagação da cadeia poliuretânica, conforme esquema da Figura 2.2.

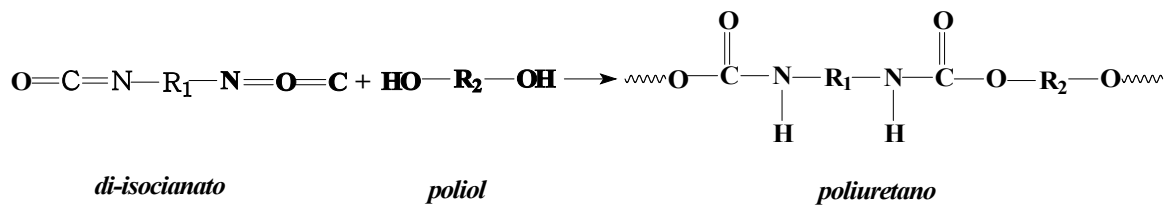


Figura 2.2. Esquema da síntese convencional de um poliuretano.

Já as EPU's podem ser definidas como uma classe de polímeros que durante a reação de polimerização, apresentam dispersão de gás dando origem à formação de pequenos bulbos ou células, interligadas em uma estrutura tridimensional. Então paralelamente a reação de polimerização entre o isocianato e o poliol, ocorre a reação entre o isocianato e a água tendo como produto o ácido carbâmico, um composto de baixa estabilidade que se decompõe em amina e dióxido de carbono. Esse dióxido atua como agente de expansão durante a reação de polimerização, sendo responsável pelo crescimento da massa polimérica e a formação das células ou poros, nas espumas de poliuretano. Alternativamente, a amina reage com outra molécula de isocianato, para produzir uréia disubstituída responsável pela formação de segmentos rígidos de poliuréia por meio de ponte de hidrogênio. e gás carbônico, conforme mostrado no esquema da Figura 2.3.

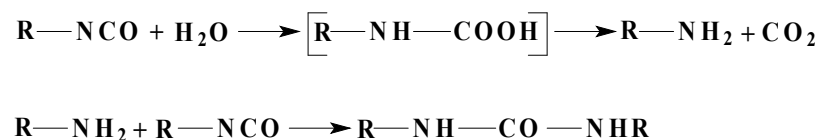


Figura 2.3. Esquema da reação de expansão e de formação da poliuréia.

Durante a síntese, devido a reação de polimerização ser exotérmica, ocorrem reações secundárias, nas quais as ligações uretânicas reagem com os isocianatos, formando as ligações alofanatos, que se formam em temperaturas entre 120°C e 150°C, e ligações de biuretos, formados entre 100°C e 150°C, aumentando as ramificações e as reticulações da matriz polimérica. Por serem menos estáveis que as ligações uretânicas, acima de 150°C essas ligações são degradadas nos compostos iniciais. Normalmente é utilizado excesso de isocianato para a formação dessas ligações e garantir maior grau de reticulação nas EPU's.

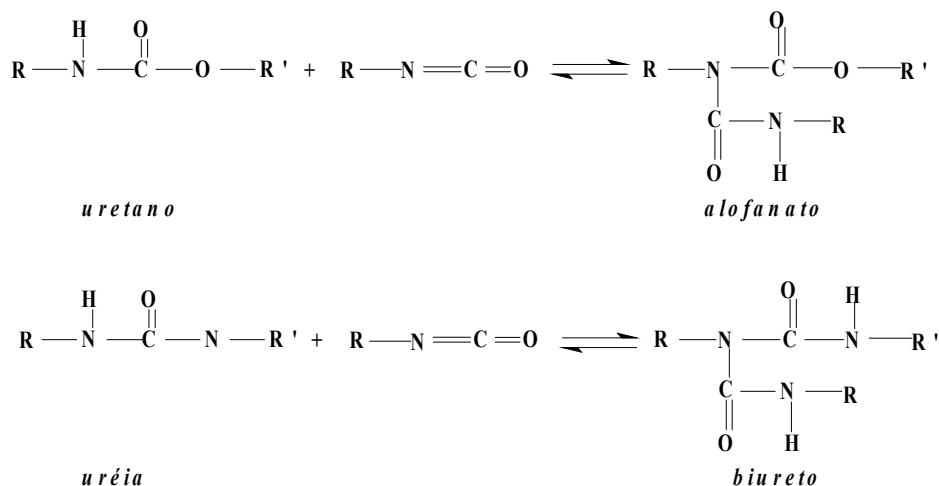


Figura 2.4. Esquema das reações de formação dos alofanatos e biuretos.

As propriedades dos PU's estão intimamente ligadas à morfologia apresentada pelo polímero, no qual devido às fortes interações entre as ligações uretânicas (Figura 2.5), segmentos rígidos de caráter polar são formados dentro de uma matriz flexível de caráter apolar, formada pela cadeia principal do poliálcool utilizado, denominado de segmento flexível. Dessa forma, os constituintes da matriz tornam termodinamicamente incompatíveis, com conseqüente aparecimento de domínios distintos, resultando numa separação de fases (Figura 2.6). (YILGOR, *et al.*, 2006; VILAR, 2002; HOOD *et al.*, 2010).

Por outro lado, na tecnologia de espumas, a formação da poliuréia, devido à reação da água com o isocianato, desempenha um papel importante na formação da estrutura de células abertas e na separação das macro/microfases na matriz. Devido às fortes interações entre as ligações da uréia, promovidas pelas pontes de hidrogênio, formam-se facilmente agregados de vários tamanhos, denominados de esferas de poliuréias, que interagem com os segmentos rígidos da matriz, contribuindo para o aumento do grau de reticulação e da segregação das fases do polímero, induzindo à abertura das células da espuma (LAN; HAUGSTAD, 2011).

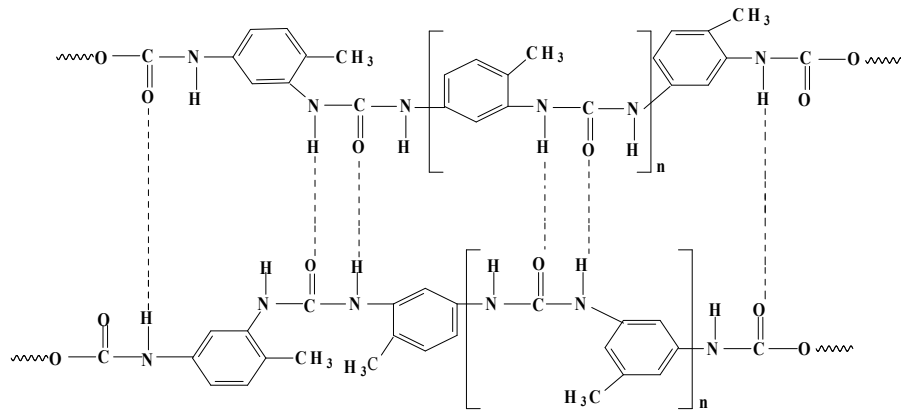


Figura 2.5. Representação da interação entre os grupos uretânicos e poliurêias (VILAR, 2002)

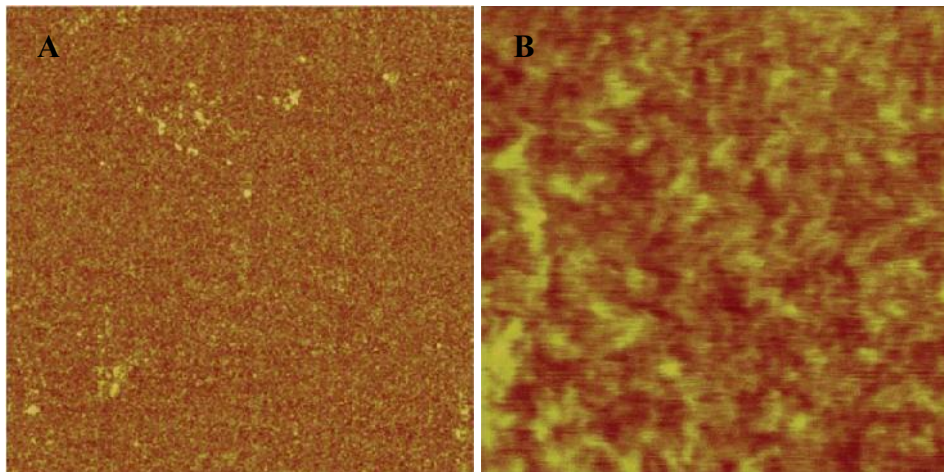


Figura 2.6 Microscopia de força atômica de uma EPU onde as regiões escuras representam segmentos flexíveis e as regiões amarelas os segmentos rígidos; figura A com dimensões de 5µm x 5µm e figura B com 500nm x 500nm (fonte: LAN; HAUGSTAD, 2011).

Além das esferas de poliuréia, pesquisas têm demonstrado que vários outros fatores influenciam na distribuição dessas fases, como a estrutura química e a massa molecular média dos poliois, a estrutura química e a simetria dos isocianatos, a cristalinidade e as interações entre os segmentos, o método e as condições de polimerização e a natureza da interface entre os segmentos dentro da matriz (YILGOR, *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; LAN; HAUGSTAD, 2011).

Corcuera *et al.* (2010) analisaram a influência do aumento dos segmentos rígidos nas propriedades dos PU's, nos quais foi possível observar um aumento da dureza, no módulo de elasticidade e na resistência à tração e por consequência uma diminuição na

elasticidade do polímero. Porém, devido à boa compatibilidade entre os segmentos rígidos e os flexíveis, não ocorreu modificação significativa na Tg do polímero.

Segundo Aneja, Wilkes e Rightor (2003) a separação entre os segmentos rígidos e os flexíveis está intimamente ligada ao isocianato. Os pesquisadores verificaram que, ao utilizarem uma mistura de isômeros de tolueno diisocianato (TDI), quanto maior a concentração do isômero TDI-2,4 melhor estava distribuída a uréia no polímero e menor a quantidade de segmentos rígidos na espuma.

2.3. Reagentes para a síntese de PU's

2.3.1 Isocianatos

A química envolvida na síntese de um poliuretano está baseada nas reações do grupo isocianato, altamente reativo, podendo formar dímeros, trímeros ou até carbodiimidas. Os isocianatos podem ser representados pela fórmula geral $R(N=C=O)_n$ onde R poderá ser grupos aromáticos, alifáticos ou cíclicos e “n” representa a funcionalidade do isocianato, podendo variar de 2 (diisocianato) até 4 (poliisocianatos).

A alta reatividade do grupo isocianato ($-N=C=O$) deve-se à carga positiva do átomo de carbono provocada pela seqüência em ressonância das duplas ligações entre o nitrogênio, o carbono e o oxigênio (Figura 2.7).



Figura 2.7. Estruturas de ressonância do grupo isocianato

Observando as estruturas de ressonância acima, a carga positiva no átomo de carbono é bastante evidente. Por outro lado, a carga negativa pode ser localizada no oxigênio, no nitrogênio ou no grupamento R, quando este é aromático. Por isso, os isocianatos aromáticos são mais reativos do que os alifáticos e, além disso, os substituintes no anel aromático também podem influenciar o caráter positivo do grupamento NCO (KLOSS, 2007; SERVE, 2007).

A reação mais importante do isocianato é a de formação dos derivados do ácido carbâmico, pela abertura da dupla ligação entre o carbono e o nitrogênio, por meio da

aproximação de um centro nucleofílico contendo átomos de hidrogênio ativos com ataque ao carbono eletrofílico. O átomo de hidrogênio é então adicionado ao nitrogênio, conforme apresentado na Figura 2.8. Com o aumento do caráter nucleofílico do H-Nu, a reação ocorre mais facilmente em temperaturas menores. Para altas temperaturas, a reação pode ser revertida, indicando que esta é uma reação de equilíbrio.

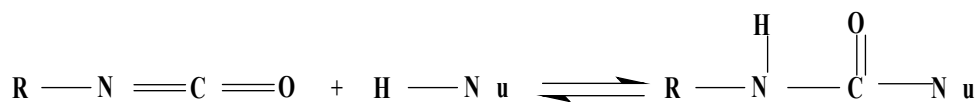


Figura 2.8. Formação de um derivado do ácido carbâmico

Esta reação é muito influenciada pelo catalisador. Por exemplo, compostos ácidos, tais como ácidos minerais e haletos de ácido, reduzem a velocidade, enquanto compostos básicos (aminas terciárias) e compostos metálicos como os de Sn e Zn e sais de Fe, provocam um aumento na velocidade (VILAR, 2002; ZECK, 2004; SERVE, 2007).

Os isocianatos também podem reagir entre si, especialmente na presença de catalisadores básicos, dimerizando ou trimerizando, para formar uretidinadionas ou isocianuretos, respectivamente, como ilustrado na Figura 2.9. A dimerização é reversível acima de 150 °C, porém, os isocianuretos, que se formam pela trimerização ao ser aquecido, são muito estáveis e a reação não pode ser revertida facilmente (WOODS, 1982; VILAR, 2004).

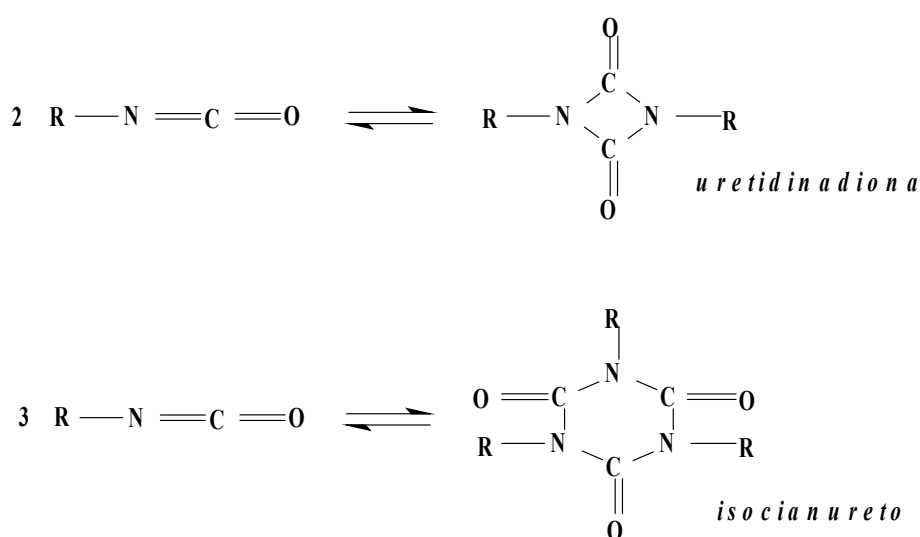


Figura 2.9. Dimerização e trimerização dos isocianatos

Outra importante reação entre isocianatos é a formação das carbodiimidas. Essa é uma reação de condensação, entre isocianatos que ocorre somente em altas temperaturas, na ausência de catalisador. Com a utilização de catalisadores, tais como óxido de 1-etil-3-metil-3-fosfolina, esta reação pode ocorrer à temperatura ambiente, conforme a Figura 2.10 (WOODS, 1982).



Figura 2.10. Formação de uma carbodiimida

Os grupos NCO reagem a velocidades diferentes com os diversos compostos contendo átomos de hidrogênio ativo. As velocidades relativas das principais reações dos isocianatos são mostradas na Tabela 2.1, na qual podem ser destacadas as velocidades com as amins e as hidroxilas (VILAR, 2002; ANEJA; WILKES; RIGHTOR, 2003; THOMSON, 2005).

Tabela 2.1. Velocidade relativa de reações típicas dos isocianatos
(Fonte: VILAR, 2002)

Composto com Hidrogênio Ativo	Estrutura Típica	Velocidade Relativa*
Amina alifática primária	R-NH ₂	100.000
Amina alifática secundária	RR'NH	20.000 – 50.000
Amina aromática primária	Ar-NH ₂	200 – 300
Hidroxila primária	RCH ₂ -OH	100
Água	HOH	100
Ácido carboxílico	RCOOH	40
Hidroxila secundária	RR'CH-OH	30
Uréia	R-NH-CO-NH-R	15
Hidroxila terciária	RR'R''C-OH	0,5
Uretano	R-NH-CO-O-R	0,3
Amida	RCO-NH ₂	0,1

* reação não catalisada a 25°C

A seleção do isocianato, de um modo geral, baseia-se nos seguintes fatores: funcionalidade da molécula, estrutura química, massa molar, reatividade e a disponibilidade no mercado. Os isocianatos mais utilizados na síntese de espumas flexíveis é o di-isocianato de tolueno (TDI), portanto escolhido para a utilização neste trabalho.

2.3.2. Poliois

Os poliois são uns dos grandes responsáveis pelas diversas propriedades dos poliuretanos e a sua versatilidade como polímeros em diversas áreas de ciência. O termo polioliol abrange uma grande variedade de compostos contendo grupos hidroxilas, capazes de reagir com os isocianatos para formar os PU's. Os poliois mais simples encontrados para as sínteses de poliuretanos são os glicóis como 1,4-butanodiol e 1,6-hexanodiol, que por possuírem baixa massa molar resultam em segmentos poliméricos rígidos por causa da alta concentração de grupos uretânicos por unidade de cadeia do polímero (VILAR, 2002; SERVE, 2007).

Os polióis poliéteres são os mais utilizados na síntese de espumas flexíveis e normalmente são derivados do poli(óxido de propileno)glicol e copolímeros de poli(óxidos de propileno/etileno) glicóis (PPG's), no qual a quantidade de oxido de etileno na cadeia do polioliol tem grande influencia nas propriedades do PU, sendo que um aumento da quantidade de oxido de etileno no polioliol, acarretará em um aumento do caráter hidrofílico do PU final. Outros polióis poliéteres são o poli(óxido de tetrametileno) glicol (PTMEG ou PTHF) utilizados em fibras e elastômeros de PU de alto desempenho e os polióis poliméricos usados em espumas flexíveis de alta resiliência (THOMSON, 2005).

Além dos polióis poliéteres, temos os polióis poliésteres alifáticos utilizados em aplicações de alto desempenho, os polióis poliésteres aromáticos usados em espumas rígidas e os polióis obtidos de óleos naturais, substituindo os poliois poliésteres nas sínteses de PU's (ANEJA; WILKES; RIGHTOR, 2003; THOMSON, 2005; SERVE, 2007).

Os polióis poliéteres usados na síntese de EPU's normalmente são trifuncionais, obtidos a partir de glicerina e oxido de propileno, possuindo hidroxilas secundárias e número de hidroxila entre 40 e 56 mg de KOH/g, reatividade média e massas moleculares entre 3000 e 4000. Estes polióis têm como vantagem proporcionar uma maior solubilidade da água usada como agente de expansão, acarretando em menor concentração de micelas

de água na massa reagente, minimizando a formação de esferas de poliuréia que enrijecem a espuma. Há também poliéteres trióis reativos, feitos com óxidos de propileno/etileno, de massa molecular entre 4500 e 6000, com alto teor de hidroxilas primárias, e número de OH entre 28 e 38 mg de KOH/g e alta reatividade. Neste caso não são necessários a adição de estabilizadores de espuma, do tipo poliéter polisiloxanos e catalisadores organo metálicos para a catálise da reação de reticulação (VILAR, 2002; THOMSON, 2005).

Existem também polióis poliésteres destinados a produção de espumas poliuretânicas, dos quais os mais utilizados são os poliadipatos glicóis, normalmente a base de dietileno glicol (DEG) e trimetilol propano (TMP), com massa molecular de 1.500 a 3.000, funcionalidade entre 2 e 2,05 e número de OH entre 58-62 mg KOH/g. As propriedades das espumas dependem da estrutura do poliálcool poliéster usado e a adição de poliálcool poliéster altamente ramificado leva à obtenção de espumas rígidas (VILAR, 2002; THOMSON, 2005).

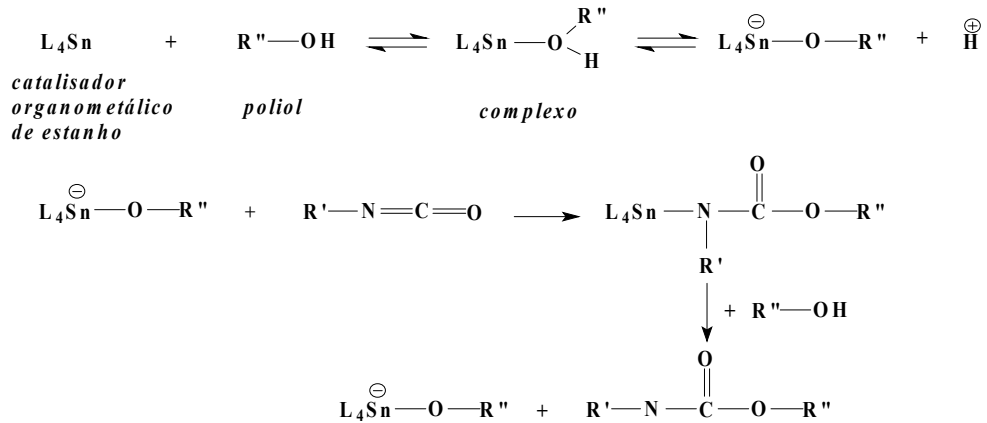
Os polióis poliéteres apresentam maior estabilidade à hidrólise e à atividade microbiana e os poliésteres apresentam maior estabilidade a solventes, porém são sensíveis as hidrólises.

2.3.3. Catalisadores

Além dos polióis e isocianatos, são usados catalisadores para o controle das reações de síntese de EPU's, e assim estabelecer um balanço apropriado entre a extensão da cadeia e a reação de formação de espuma. Os catalisadores mais usados são do tipo aminas terciárias e compostos organometálicos, principalmente à base de estanho (dioctoato de estanho II). Os catalisadores de estanho atuam diretamente sobre a reação de polimerização, enquanto que as aminas terciárias catalisam a reação entre o isocianato e a água, regulando a formação da espuma (VILAR, 2002).

Os catalisadores organometálicos promovem a reação do isocianato com os polióis, atuando como ácidos de Lewis, em duas rotas preferenciais, conforme Figura 2.11 (SATO, 2002):

I) Interação com os sítios básicos dos polióis:



II) Interagindo com os sítios básicos dos isocianatos:

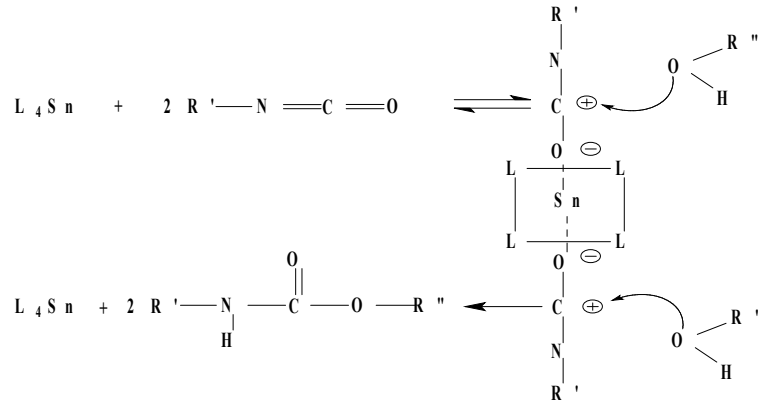


Figura 2.11. Esquema de reação de catalise dos organometálicos (I e II)

Já os catalisadores de aminas terciárias atuam no direcionamento da reação do isocianato com a água conforme mostrado na Figura 2.12 (SATO, 2002).

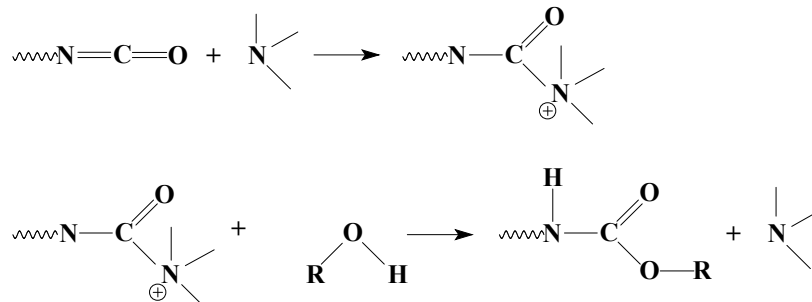


Figura 2.12. Esquema da reação de catálise das aminas terciárias

Portanto, um equilíbrio entre as quantidades de catalisadores de gelificação (octanoato de estanho) e de expansão (amina terciária) é extremamente importante para

definir as propriedades de certa EPU. Quando se usa baixa concentração de catalisador de estanho na produção de espumas flexíveis, o polímero demora muito a gelificar, escoando quando expandido, ocasionando trincas no bloco de espuma. Por outro lado, um excesso desse catalisador torna o meio reacional viscoso, resistente a pressão interna dos gases de expansão, não ocorrendo dessa forma o rompimento das paredes das células, formando uma espuma não permeável ao ar, podendo encolher após a cura.

Um excesso de catalisador de expansão pode ocasionar o colapso da formação, devido à rápida expansão da espuma. Pode ainda, devido à alta exotermia da reação entre o isocianato e a água e a capacidade de isolamento térmico das espumas, ocorrer a carbonização no interior da espuma (SATO, 2002; VILAR, 2002).

2.3.4. Surfatantes

É essencial utilizar um agente tensoativo para controlar o processo de formação da espuma. Os surfatantes de silicone exercem uma função chave como emulsificantes e estabilizadores da espuma, sendo os poliéter polisiloxanos os mais usados. Esses surfatantes abaixam a tensão superficial permitindo a introdução na mistura, do ar responsável pela formação dos núcleos das células da espuma. O aumento da quantidade de surfatante de silicone resulta na diminuição do tamanho das células e no aumento do seu número. Embora concentrações adequadas de surfatante de silicone promovam a estabilidade do sistema tornando mais difícil a coalescência das bolhas, seu excesso estabiliza excessivamente o sistema e pode evitar a abertura das células (KAUSHIVA et al., 2000; SATO, 2002; VILAR, 2002; KLOSS, 2007)

2.3.5. Agente de expansão

Um agente de expansão é o aditivo responsável pela formação das células nas espumas. Os mais usados atualmente são os hidroclorofluorocarbonos (HCFCs), os hidrofluorocarbonos (HFCs), o dióxido de carbono líquido (CO₂), a acetona e a água (que reage com o diisocianato para formar CO₂).

À medida que a reação exotérmica de polimerização ocorre, a temperatura aumenta rapidamente e a mistura vai ficando cada vez mais viscosa e rígida, devido à formação do polímero. Os agentes de expansão, no início da reação, escapam da mistura

com o aumento da temperatura. Porém, a partir de certa viscosidade, os gases misturados ou formados na reação não conseguem mais escapar da mistura reagente, formando, então, as cavidades (JANG; KRAYNIK; KYRIAKIDES, 2008).

O tipo de agente de expansão utilizado influencia no tamanho e na quantidade das células da espuma. Esses são fatores determinantes para a condutividade térmica e acústica do material, além das propriedades mecânicas. Em geral, constituem de 0 até 50% em massa do sistema (VILAR, 2002).

2.4. Etapas de síntese da EPU

Em escala laboratorial a síntese de espuma de poliuretano pode ser realizada por dois processos, o primeiro deles envolve duas etapas e é o mais indicado para fabricação de elastômeros e adesivos. A primeira etapa da síntese envolve uma mistura de polioliol com excesso de isocianato em atmosfera inerte levando à formação de um pré-polímero de alto peso molecular com grupos isocianatos nas extremidades, para na segunda etapa, quando é adicionada uma mistura de polioliol de baixo peso molecular (extensor de cadeia), surfatante, catalisadores, entre outros, finalizando a formação do poliuretano. O segundo processo chamado de “One Shot” é o mais indicado para síntese de espuma, nesse processo são desenvolvidas as seguintes etapas (Figura 2.13):

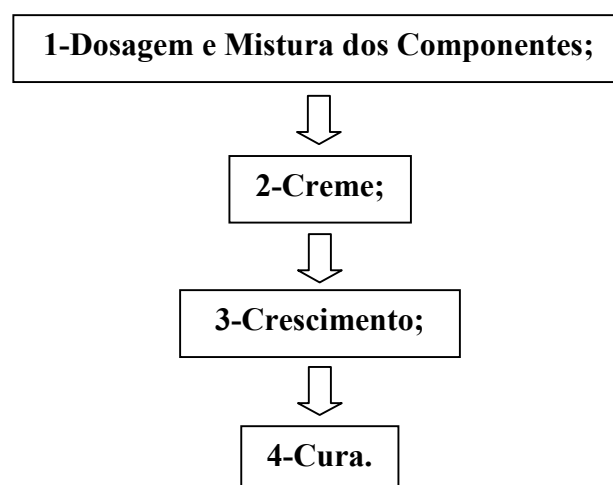


Figura 2.13. Etapas da síntese de EPU pelo método “One Shot”

A etapa de mistura e dosagem esta representado na figura 2.14. Em um recipiente é feito uma mistura do polioliol e do catalisador organometálico, com auxilio de misturador mecânico, normalmente com hélices do tipo centrifuga; então uma mistura contendo a amina terciária, surfatante e água, normalmente denominada de ASA, é adicionada ao polioliol/catalisador organometálico, e assim segue a primeira agitação responsável pela formação de microbolhas de ar dentro da massa polimérica que são estabilizadas pelo surfactante. Em seguida adiciona-se o isocianato e uma segunda agitação promove uma homogeneização do meio e uma maior nucleação. Esta segunda agitação se dá em torno de 1 a 20 segundos dependendo da reatividade do polioliol e da quantidade empregada de catalisador. Finalmente, após essa agitação, a mistura é transferida para um molde (THOMSON, 2005; SERVE, 2007).

Após a etapa de dosagem e mistura, a massa polimérica, já no molde, fica saturada com o dióxido de carbono, dando ao líquido uma aparência cremosa, sendo esta etapa de “creme”. Este fenômeno ocorre entre 6 e 20 segundos após a mistura dos componentes. Tempos de “creme” muito baixos indicam alta reatividade do polioliol ou uma quantidade excessiva de catalisador principalmente o catalisador amínico, que atua no processo de formação de CO₂ (THOMSON, 2005; SERVE, 2007).

Quase juntamente com a etapa de “creme” ocorre a etapa de crescimento, na qual ocorre formação contínua de dióxido de carbono e difusão desse gás para as microbolhas, fazendo com que a massa em polimerização se expanda até atingir o seu crescimento total. Nesta fase avalia-se a estabilidade das células e a formação da espuma. Este processo se completa entre 60 e 120 segundos após a mistura dos componentes (THOMSON, 2005; SERVE, 2007).

Finalmente, na etapa de cura, a matriz polimérica, já estruturada, é retirada do molde e transferida para uma área de cura, permanecendo por um período mínimo de 24 horas antes de ser manuseada. Esta fase compreende o tempo no qual a espuma não apresenta mais a pegajosidade (“tack”) exterior ao toque. Utiliza-se estufas a temperaturas de 70°C a 100°C para acelerar a cura e aumentar a sua reticulação (THOMSON, 2005; SERVE, 2007).

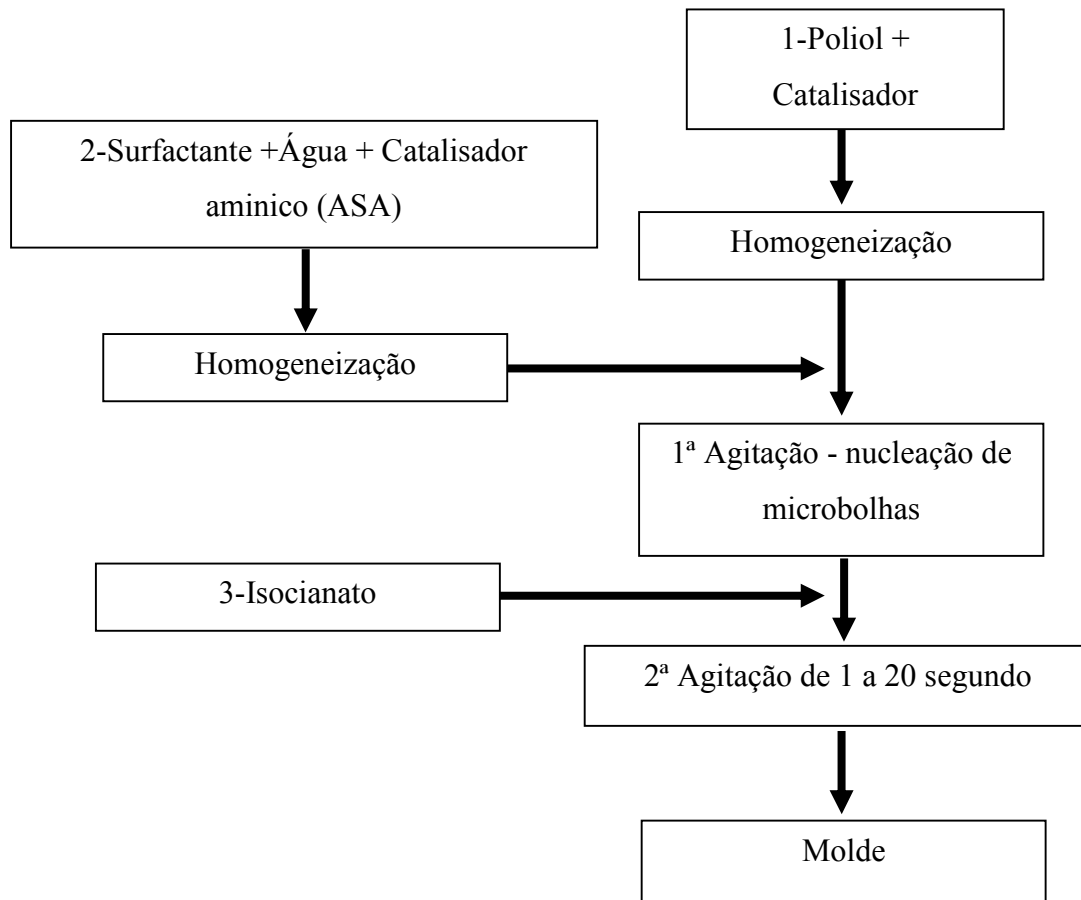


Figura 2.14. Representação da síntese de espuma de PU – etapa de dosagem e mistura.

Na fase inicial da formação de uma espuma flexível, há um pequeno crescimento das cadeias e não há formação detectável de biureto e alofanato, grupos relacionados à formação de nós em uma rede poliuretânica. Simultaneamente, a concentração do gás carbônico aumenta no interior das microbolhas formadas durante a etapa de homogeneização (nucleação) e a massa da espuma começa a expandir em volume. O gás difunde das bolhas menores, de maior pressão interna, para as bolhas maiores de menor pressão, causando um crescimento das bolhas maiores e um consumo das bolhas menores. As bolhas formadas na etapa de nucleação são muito pequenas e quase esféricas, mas conforme elas expandem, tendem a se alongar na direção das paredes da espuma (VILAR, 2002; JANG; KRAYNIK; KYRIAKIDES, 2008).

Quando volume da mistura reativa torna-se pequeno em comparação ao volume das bolhas em expansão, a área de contato entre as bolhas adjacentes torna-se uma estrutura triangular chamada tecnicamente de bordas de Plateau (Figura 2.15). O líquido é

transferido das membranas para as bordas de Plateau por fluxo capilar, levando a formação das células poliédricas irregulares, que se aproximam da forma de um octaedro truncado. A pressão total do sistema e a pressão nas células começa a cair devido ao aumento de viscosidade, porém o grau de reticulação do sistema ainda é baixo até que o sistema alcance temperaturas entre 80 e 90°C. A pressão da espuma tende a aumentar novamente com a reticulação até que a parede das células se rompa e a pressão do gás diminua juntamente com a pressão total da espuma (WOODS, 1982; VILAR, 2002; JANG; KRAYNIK; KYRIAKIDES, 2008).

Pode-se concluir que as características físico-químicas da espuma são influenciadas pela morfologia macroscópica da espuma (células) e pela morfologia microscópica do polímero (estrutura flexíveis e rígidas), sendo muito difícil separar o efeito de cada um desses grupos morfológicos nas características finais do produto.

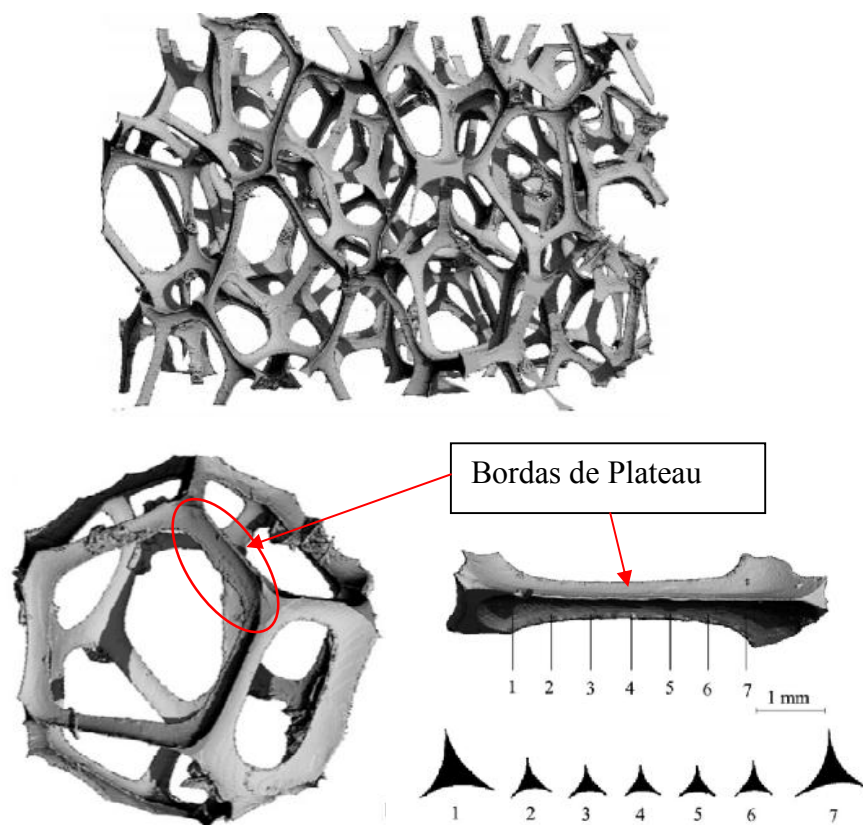


Figura 2.15. Estrutura típica de uma espuma: uma célula encontrada numa espuma flexível de poliuretano, as bordas de Plateau e as respectivas áreas transversais (FONTE: JANG; KRAYNIK; KYRIAKIDES, 2008).

2.5. Fungo filamentoso

Os fungos filamentosos são organismos microscópios que apresentam um papel importante na decomposição de matéria orgânica. Além do papel ecológico apresentam um interesse industrial na produção de alimentos, fármacos, intermediários químicos, enzimas e materiais agroindustriais (PAPAGIANNI, 2004).

Esses micro-organismos são formados basicamente por hifas, que se apresentam sob a forma de um cilindro com raio entre 1 a 10 μm (TINDEMANS; KERN; MULDER, 2006). Esses “tubos” emergem do crescimento de um único esporo, que se estende e forma ramificações, constituindo novas hifas. O conjunto de hifas entrelaçadas é denominado de micélio. Quando em condições adequadas os micélios assumem a forma reprodutiva, onde são formados os esporos ou células reprodutoras, sendo as informações acerca do tipo de esporulação e a morfologia dos esporos utilizados na identificação dos fungos (PAPAGIANNI, 2004).

Quando o crescimento ocorre em culturas submersas, muito utilizado na produção de enzimas extracelulares, os fungos podem apresentar-se não somente sob a forma de micélios filamentosos, mas também na forma de “pellets”, grandes agregados de micélios de forma compacta e esférica. Em ambas essas estruturas físicas, ocorre um conjunto de processos fisiológicos que contribuem para a adsorção, armazenamento, distribuição de nutrientes e produção de metabolitos através da rede de hifas (CAIRNEY, 2005).

Os “pellets” são formados devido à habilidade dos fungos de se auto-imobilizarem, sendo esta induzida pelas condições de cultivo, como forças cisalhantes, temperatura e pH, e conseqüentemente o fungo crescerá de forma diferente para um determinado produto alvo. O fungo *Aspergillus niger* quando em cultivo submerso, cresce preferencialmente na forma de micélio filamentosos quando destinado a produzir enzimas, porém assume preferencialmente a forma de “pellet” para a produção de ácido cítrico (PAPAGIANNI, 2004; VILENA *et al.*, 2010, PRIEGNITZ *et al.*, 2011).

Além da auto-imobilização, a imobilização natural é a forma usual dos fungos se fixarem em uma superfície. Alguns autores, mesmo que de maneira não totalmente clara, descrevem o mecanismo de adsorção de fungos em superfície. Segundo esses autores, a adsorção inicia com a aderência dos esporos na superfície e esses esporos por apresentarem um caráter hidrofóbico e um potencial de superfície negativo, acabam por interagir com a

superfície através de forças eletrostáticas (KOURKOUTAS *et al.*, 2004; ROSCHE *et al.*, 2009; PRIEGNITZ *et al.*, 2011).

Depois da fixação dos esporos sobre a superfície, ocorre a etapa de germinação dos esporos, que consiste na excreção de substâncias poliméricas e no alongamento do tubo germinativo iniciando a formação do biofilme. Então se inicia o crescimento das hifas que logo se estende para a etapa de ramificação das hifas. É nesta etapa que o micro-organismo se propaga por toda superfície. Após o tempo de completo crescimento, o biofilme já com uma complexa mistura de células de diferentes fisiologias entra na fase de dispersão, na qual ocorre o crescimento de hifas especializadas em reprodução, onde se dá a formação e a dispersão dos esporos (PAPAGIANNA, 2004; KOURKOUTAS *et al.*, 2004; ROSCHE *et al.*, 2009; PRIEGNITZ *et al.*, 2011). A figura 2.16 apresenta um esquema do ciclo de crescimento do fungo.

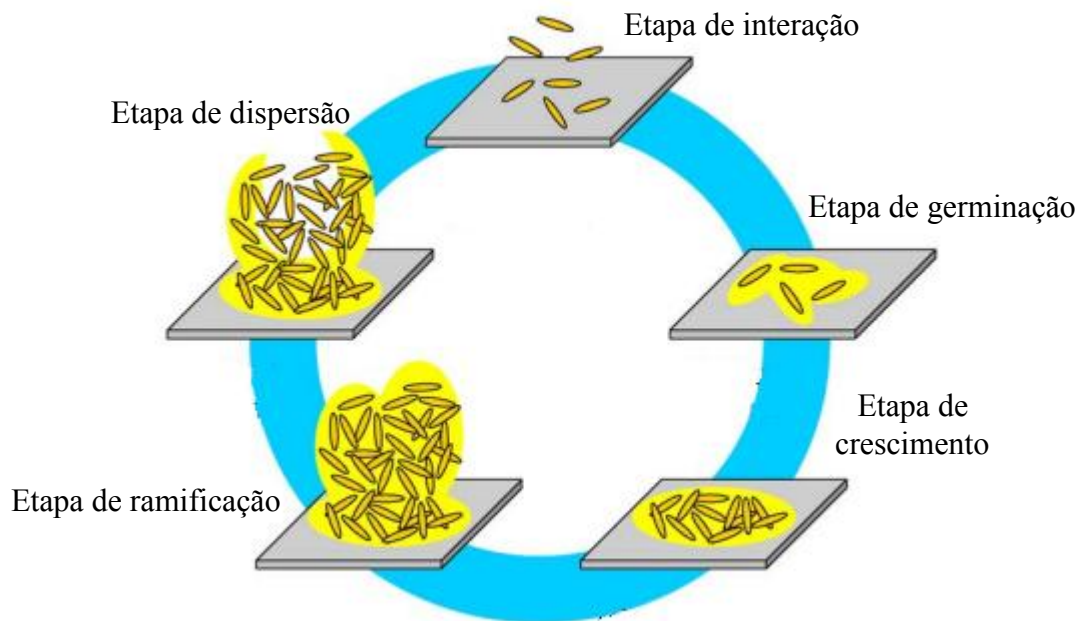


Figura 2.16. Esquema do ciclo de crescimento de fungo
(Fonte: ROSCHE *et al.*, 2009)

2.6. Espumas de poliuretano como matriz de imobilização de biocatalisadores.

Biocatalisadores, enzimas ou células, têm sido amplamente utilizadas em diversos processos, seja em escala laboratorial ou industrial. Com o intuito de viabilizar o emprego de enzimas e células como biocatalisadores, sua imobilização é uma estratégia que pode ser utilizada para a condução de bioprocessos em situações variadas, buscando propiciar o uso de enzimas ou células por períodos prolongados através de processos contínuos ou semi-contínuos. Além disso, o processo de imobilização apresenta a vantagem de dar mais estabilidade ao biocatalisador, facilitando sua separação do meio reacional, acarretando economias operacionais (CARVALHO; CANILHA; DA SILVA, 2006; DE CASTRO *et al.* 2008).

Há muitos anos, esforços intensivos têm sido concentrados não somente no desenvolvimento de biocatalisadores com propriedades superiores, mas também na elucidação de técnicas que permitam o seu uso repetido ou em processos contínuos. Apesar destes esforços intensivos amplamente documentados na forma de publicações técnicas e registros de patentes, poucos processos baseados em técnicas de imobilização, seja de enzimas ou de células, foram implementados em escala industrial (CARVALHO; CANILHA; DA SILVA, 2006).

Imobilização é o termo geral que descreve as muitas formas das células e enzimas serem fixadas, encapsuladas ou aprisionadas em um suporte sólido. O conceito de biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, referem-se a catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000). As principais técnicas de imobilização normalmente aplicadas em processos de biotransformação são baseadas na adsorção em suportes inertes, na encapsulação e aprisionamento em matrizes poliméricas ou ligação covalente, cruzada e iônica em suportes previamente ativados (DA RÓS, 2009).

Especificamente, a imobilização de células por adsorção representa uma forma particular de adesão celular baseada na habilidade de certos micro-organismos se fixarem naturalmente em suportes sólidos. Apesar do contato direto das células com o meio de cultura que este tipo de imobilização permite, favorecendo o crescimento celular, uma alta densidade de células no suporte aumenta a resistência à transferência de nutrientes, acarretando numa carência de nutrientes das células menos expostas afetando assim a

fisiologia e a atividade metabólicas, na qual se destaca a formação das enzimas (LIN; SCHOLZ; KRULL, 2010; KILONZO; MARGARITIS; BERGOUGBOU, 2011).

De maneira geral, todos os métodos de imobilização induzem a alterações no crescimento, na fisiologia e na atividade metabólica de bactérias, leveduras e fungos (COVIZZI *et al.*, 2007; ROSCHE *et al.*, 2009).

A escolha da matriz para imobilização é um dos pontos chave na aplicação de biomassa imobilizada. Para que um material possa ser usado como suporte, deve-se levar em consideração, entre outros fatores, a resistência no meio que este interage, isto é, o suporte deve ser pouco ou muito pouco solúvel no meio, principalmente nas condições de operação. Já a estrutura do suporte é extremamente importante, principalmente a superfície de contato, quando este é destinado para a imobilização por adsorção. Entre muitos suportes disponíveis para imobilização de células microbianas, a técnica usando partículas porosas para suporte de biomassa (BSP's), apresenta vantagens sobre outros métodos em termos de aplicação industrial, tais como ausência de aditivos químicos, de assepsia, sendo que as partículas podem ser reutilizadas e são resistentes a cisalhamento (DIAS *et al.*, 2001; DE ORY *et al.*, 2004).

Entre as matrizes utilizadas como BSP's, as espumas de poliuretanos tem se destacado devido às seguintes características: grande área superficial com interstícios para o crescimento celular, porosidade uniforme garantindo a troca gasosa, fluxo de substrato e produtos metabólicos, boa estabilidade mecânica, química, térmica e biológica, resistência à degradação enzimática além de proporcionarem imobilização fácil e viável para uso em escala industrial.

Muitos trabalhos têm ressaltado a utilização de espuma de poliuretano como excelentes matrizes para imobilização de microrganismos (Tabela 2.2).

Além dessas características a espuma de poliuretano se revela como suporte promissor devido a sua flexibilidade de síntese, sendo possível obter espumas hidrofílicas e hidrofóbicas, o que facilita sua utilização em processos biocatalíticos conduzidos em meio orgânico ou aquoso. Dependendo do sistema reacional é possível aproveitar a característica de sorção das espumas flexíveis a fim de promover a transferência de massa dos substratos até o micro-organismo, conforme foi relatado por Oh, Maeng e Kim (2000). Nesse trabalho foi utilizada uma espuma flexível, com boa qualidade de sorção de petróleo (espuma do tipo poliéter), na qual foram imobilizadas células de *Yarrowia lipolytica*. A biomassa imobilizada foi utilizada no tratamento de água, degradando cerca de 60% do petróleo após 5 dias.

Tabela 2.2. Aplicações de microrganismos imobilizados e suportes utilizados em processos biotecnológicos.

Microrganismo	Suporte de mobilização	Aplicação	Referência
<i>Trichoderma reesei</i>	EPU	Produção de celulase pelo fungo <i>Trichoderma reesei</i> .	QIN ZHANG et al, 2009.
<i>Aspergillus niger</i>	EPU	Estudo comparativo da produção de ácido glucônico pelo fungo <i>Aspergillus niger</i> livre e imobilizada.	MUKHOPADHYA Y et al, 2005.
<i>Acetobacter aceti</i>	EPU, madeiras e Siran	Otimização das condições de imobilização para a produção de vinagre.	DE ORY et al, 2004.
<i>Aspergillus terreus</i>	EPU	Remoção de metais pesados de efluentes de indústrias metalúrgicas.	DIAS et al., 2001
<i>Pseudomonas sp.</i>	EPU	Estudo comparativo das células livre e imobilizadas para a degradação do naftaleno.	MANOHAR; KIM; KAREGOUDAR, 2001
<i>Yarrowia lipolytica</i>	EPU	Utiliza-se a espuma de PU para a absorção do óleo contido na superfície da água e a <i>Yarrowia lipolytica</i> imobilizada na espuma, para a degradação do óleo.	OH; MAENG; KIM, 2000.
<i>Nematoloma frowardli</i>	EPU	Estudo comparativo entre células livres e imobilizadas para a produção de enzimas ligninolítica extracelular.	ROGALSKI; SZCZODRAK; JANUSZ, 2006
Consortio de micro-organismos	EPU e polipropileno reforçado com fibras de agave	Produção de biofiltros para degradação de compostos orgânicos voláteis.	ACOSTA et al., 2012

Silva et al. (2009 a) realizaram um estudo visando selecionar uma biomassa imobilizada com uma alta atividade lipolítica. Foram avaliadas as imobilizações de

diversas cepas de fungos produtores de lipase intracelular em suportes como espuma de poliuretano, celitas e polihidroxibutirato (PHB). O melhor resultado foi observado para a biomassa de *R.oryzae* imobilizado em EPU's, apresentando uma melhor atividade lipolítica entre as biomassas imobilizadas, e ainda entre as cepas selecionadas a EPU se mostrou a mais adequada para a imobilização.

Assim segundo a literatura, a escolha do suporte para a imobilização torna-se um fator importante, sendo a natureza hidrofílico-hidrofóbica do suporte relevante, pois há uma necessidade de que o suporte apresente uma afinidade com o meio reacional, promovendo a transferência de massa. Adicionalmente, a hidrofobicidade do suporte faz com que a matriz não retire a água do biocatalisador, não afetando o seu microambiente extremamente necessário a catalise enzimática (LEÓN *et al.*, 1998).

2.7. Lipases

As lipases (glicerol éster hidrolases E.C.3.1.1.3) fazem parte da família das hidrolases que atuam na cadeia éster carboxílico e não requerem nenhum cofator. A função biológica primordial das lipases é catalisar a hidrólise de triglicerídeos, entretanto, em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida, a maioria das lipases é capaz de catalisar reações reversas como esterificação e transesterificação (interesterificação, alcóólises e acidólises) (FABER, 1997; HASAN; SHAH; HAMEED, 2009). Essa versatilidade faz das lipases a enzima preferencial para aplicações em indústrias de alimentos, detergentes, farmacêutica, couro, têxtil, cosméticos e de papel (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A régio-seletividade das lipases impõe parte da sua importância na indústria química. As lipases podem ser do tipo 1,3 específicas, liberando apenas os ácidos graxos nas posições 1 e 3 do triglicerídeo, já as lipases não-específicas liberam ácidos graxos independente da posição no triglicerídeo (DE CASTRO *et al.*, 2004; ANTCZAK *et al.*, 2009).

O modo de ação das lipases é bastante complexo, os sítios ativos são cobertos por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa ou "lid". Quando há ligação do substrato na superfície, a tampa é movida, expondo os sítios ativos e ao mesmo tempo uma superfície hidrofóbica, aumentando a afinidade da enzima pelo substrato, facilitando a ligação da lipase à interface (Figura 2.17). Porém, nem sempre essa ativação interfacial

ocorre para todas as enzimas, como é o caso das enzimas pancreáticas não específicas (DE CASTRO et al., 2004)

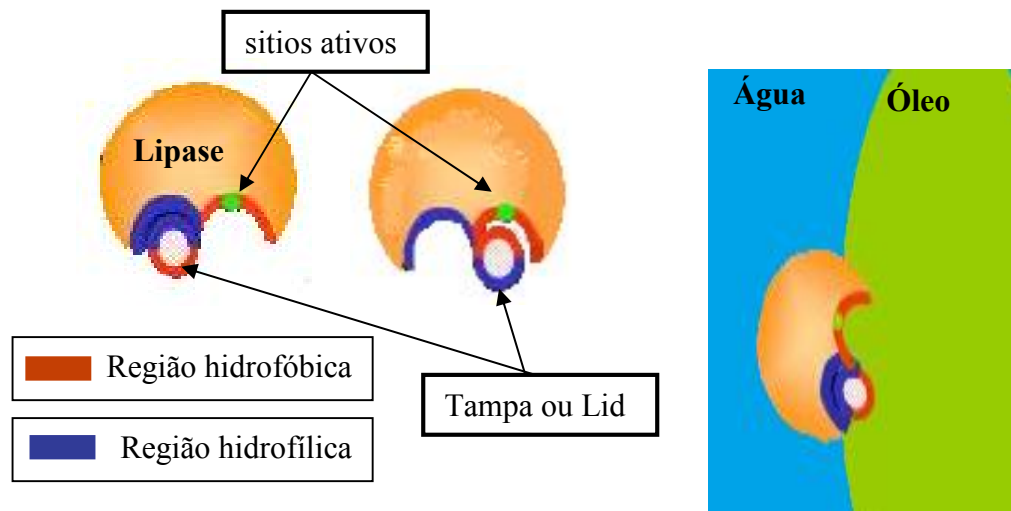


Figura 2.17. Modelo hipotético da lipase e da interação da enzima na interface água-óleo (Fonte: PALOMO *et al.*, 2005)

As lipases são encontradas na natureza em tecidos animais e vegetais e em micro-organismos. As lipases provenientes de micro-organismos são as mais utilizadas industrialmente, porque além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento a partir do caldo fermentativo são, geralmente, mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes (PAPAGIANNA, 2004).

O processo enzimático é uma alternativa biotecnologicamente sustentável em comparação à catálise química, e apropriada para a produção de biodiesel a partir de matérias-primas que contem alto teor de ácidos graxos livres e água, como óleos e gorduras residuais, pois esses ácidos graxos livres são completamente convertidos a biodiesel (PARAWIRA, 2009).

A maior dificuldade para comercialização deste processo ainda é o custo da produção de lipases, incluindo as etapas de recuperação e purificação altamente onerosas. O custo de produção das lipases pode ser reduzido por aplicação de genética molecular produzindo lipases de alta produtividade, seletividade e estabilidade, imobilizações em suportes sólidos visando à reutilização em bateladas subseqüentes ou ainda pela utilização de células íntegras de microrganismos produtores de lipase. Esta última alternativa evita gastos advindos das etapas de purificação, entretanto requer a utilização de células produtoras de lipase intracelular.

2.8. Lipase intracelular

As lipases intracelulares têm recebido atenção especial por seu potencial uso em biotecnologia. Muitas lipases intracelulares com elevada atividade lipolítica provenientes de fungos filamentosos tem sido relatadas. Os gêneros *Mucor* e *Rhizopus* têm sido citados como produtores de lipases, com destaque para as linhagens de *M. circinelloides* e *R. oryzae*, pelo fato de crescerem relativamente bem em meios de cultura contendo triglicerídeos e peptona como fonte de nitrogênio. As lipases intracelulares de *M. circinelloides* podem ser aplicadas em diversos processos, como hidrólise de triglicerídeos e síntese de ésteres, por possuírem alta atividade catalítica e alta estabilidade em solventes orgânicos apolares (ANTCZAK et al., 2004). No caso das lipases intracelulares de *R. oryzae*, devido à sua regioespecificidade pela posição 1,3, são mais utilizadas para síntese de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais ou esterificação de ácidos graxos livres (LI; DU; LIU, 2008).

Uma comparação do processo de obtenção de biodiesel usando derivados imobilizados de lipase extracelular e intracelular é apresentado no esquema da Figura 2.18 (DU et al., 2008), na qual pode ser claramente observada a redução das etapas quando são utilizadas lipases intracelulares.

Hama et al. (2006) imobilizaram as células de *R. oryzae* em partículas de poliuretano com o intuito de investigar os fatores que levavam a produção da lipase intracelular. Os autores verificaram que a imobilização contribuiu para a produção da enzima intracelular e que a adição de óleo de oliva auxiliou na retenção da lipase nas células. Esse fenômeno foi confirmado por imunofluorescência das hifas celulares. Embora a relação entre a morfologia celular e a secreção enzimática dependa da cepa fúngica e do tipo de enzima, a imobilização celular se revelou como um fator importante na indução do micro-organismo a produzir as lipases intracelulares para o meio de cultura na cepa testada.

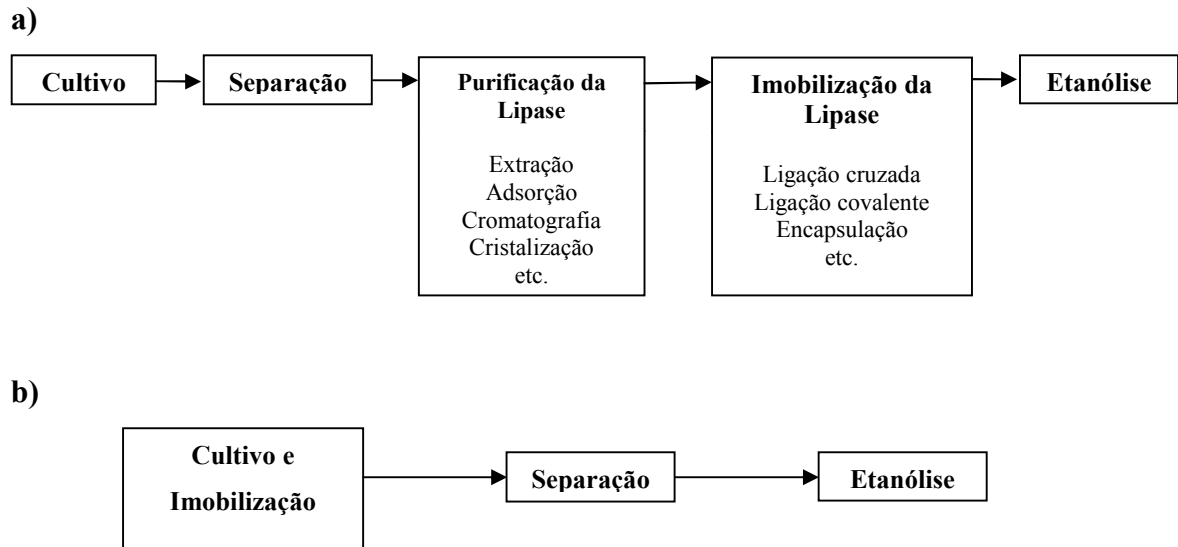


Figura 2.18. Comparação das etapas envolvidas no processo de obtenção de biodiesel por via enzimática empregando lipase purificada ou células íntegras imobilizadas: (a) lipase extracelular e (b) lipase intracelular (DU et al., 2008).

Antczak et al. (2004) investigaram a lipase produzida pelo fungo *Mucor circinelloides*. Os autores revelaram que os micélios de *M. circinelloides* (as lipases intracelulares) apresentaram uma atividade catalítica superior à das lipases extraídas das células, mesmo que essa enzima extraída fosse imobilizada. Assim os autores concluem que a alta atividade das células do fungo se deve ao fato que a membrana celular favorece o arranjo espacial das lipases, facilitando a ligação do substrato ao sitio catalítico da lipase. Após o estudo dos biocatalisadores, os micélios foram tratados e imobilizados em quitosana solidificada e utilizados na síntese de ésteres de sucrose, com conversão de 70% em 10 horas.

As cepas de *Mucor circinelloides* são também bons produtores de lipídios, apresentando em sua parede celular cerca de 40-60% de triglicerídeos, nos quais o ácido linoléico é mais abundante, sendo estes uns dos fatores para sua alta produção de lipases ligadas a membrana celular. Todavia esta síntese de enzima pode ser otimizada. Segundo Antczak et al. (2006), ao ser utilizado o óleo de oliva como fonte de carbono, ocorre um aumento considerável na atividade catalítica e uma minimização na produção de lipídios, mas que ao ser acrescentado glicose no meio reacional, a produção de lipase intracelular é diminuída.

2.9. Síntese de biodiesel

Os artigos relatados a seguir, descrevem processos de obtenção de biodiesel por catálise enzimática empregando células íntegras imobilizadas, sendo na maioria dos trabalhos publicados as linhagens do fungo *R. oryzae* foram preferencialmente utilizadas e como suporte de imobilização, geralmente, partículas de poliuretano. Entretanto, já existem relatos de utilização de outros suportes fibrosos, como o tecido-não-tecido (TNT), utilizados em reatores de coluna. A síntese dos principais processos de obtenção de biodiesel por células íntegras estão descritos na Tabela 2.3.

Assim é possível observar que a utilização de células fúngicas imobilizadas e meio de cultura específicos, apresentam uma atividade catalítica promissora para a catalise da transesterificação e como o intuito de fazer um levantamento dos parâmetros que influenciam no rendimento final de transesterificação, muitos autores fixam a espécie de fungo a ser imobilizada e variam os parâmetros de cultivo e reacionais, buscando uma biomassa imobilizada que possa competir com as enzimas imobilizadas nas reações de transesterificação.

Ban et al. (2001) utilizaram células de *R. oryzae* para a transesterificação de óleos vegetais e investigaram as condições de cultura, efeitos de pré-tratamentos da biomassa celular e efeito da quantidade de água no processo de produção. Para aumentar a atividade das células imobilizadas na metanólise, foi verificada a influência de diferentes compostos relacionados ao substrato no meio de cultura, entre os quais o azeite de oliva e o ácido oléico foram os mais eficientes. Foi também reportada que a adição gradativa de metanol contendo 15% de água forneceu uma elevada conversão, da ordem de 90%, similar a obtida no processo enzimático com lipase extracelular.

Hama et al. (2004) estudaram o aumento na estabilidade da atividade com a variação da composição de ácidos graxos na membrana celular, por meio da adição de diferentes ácidos graxos no meio de cultura. Os resultados indicaram que células enriquecidas com ácidos oléico e linoléico, mostraram maior atividade lipolítica do que as células enriquecidas com ácidos graxos saturados. Por outro lado, células enriquecidas com ácido palmítico mostraram maior estabilidade do que células enriquecidas com ácidos graxos insaturados. Esses dados forneceram base para determinação da quantidade ótima de ácidos graxos insaturados em relação ao total de ácidos graxos para fornecer um equilíbrio no sistema para obter biomassa celular com atividade e estabilidade elevadas,

sendo encontrado um valor da ordem de 0,67. Nessas condições, foi possível manter uma conversão elevada e estável, mesmo após 10 ciclos de bateladas consecutivas.

Tabela 2.3. Processos de obtenção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando células íntegras.

Micro-organismo	Suporte de Imobilização	Matéria-prima	Solvente	ME (%)	Referências
<i>R. oryzae</i>	BSP's (espuma de poliuretano)	Metanol e óleo de soja	Isento	80/90 90 90	BAN <i>et al.</i> , 2001; BAN <i>et al.</i> , 2002; HAMA <i>et al.</i> , 2007
<i>R. oryzae</i>	BSP's (espuma de poliuretano)	Metanol e óleo de soja	Isento	80	HAMA <i>et al.</i> , 2004
<i>R. oryzae</i>	BSP's (espuma de poliuretano)	Diferentes álcoois e óleo de pinhão manso	Isento	89	TAMALAMPUDI <i>et al.</i> , 2007
<i>A. niger</i>	BSP's (espuma de poliuretano)	Metanol e óleo de soja	Isento	96,5	ADACHI <i>et al.</i> , 2011
<i>Pichia pastoris</i>	-	Metanol e óleo de soja	isooctano	83,14%	HUANG <i>et al.</i> , 2011
<i>R. oryzae</i>	BSP's (espuma de poliuretano)	Metanol e óleo de soja	Terc-butanol	60/70	LI; DU; LIU, 2007 a
<i>R. oryzae</i>	BSPs (espuma de poliuretano)	Metanol e óleo de colza	Terc-butanol	72	LI; DU; LIU, 2007b
<i>R. oryzae</i>	BSPs (espuma de poliuretano)	Metanol e ácido oleico	Terc-butanol	90	LI <i>et al.</i> , 2008
<i>R. oryzae</i>	Tecido-não tecido	Metanol e óleo de soja	Isento	73	CHEN; LIN, 2010
<i>R. chinensis</i>	-	Metanol e óleo de soja	Isento	86	HE <i>et al.</i> , 2008
<i>M. circinelloides</i>	Espuma de poliuretano	Etanol e óleo de babaçu	Terc-butanol	70 68	SILVA <i>et al.</i> , 2009b

ME = ésteres metílicos

Hama et al. (2007) estudaram a produção de biodiesel em reator de leito fixo usando biomassa celular de *R. oryzae* na metanólise de óleos vegetais. Os autores observaram que o reator de leito fixo aumentou o número de bateladas repetidas de metanólise protegendo a biomassa celular de stress físico (agitação mecânica) e de inibição devido ao excesso de metanol. Neste trabalho, a biomassa celular de *R. oryzae* foi imobilizada em partículas cúbicas (6mmx 6mm x 3mm) de poliuretano expandido (BSP's) durante o cultivo em batelada em um biorreator de 20 L. Os autores também reportam que a emulsificação da mistura reacional resultou em incremento na produção (75,5%) devido ao aumento na área de superfície interfacial, enquanto que em meio não emulsificado a conversão máxima obtida foi de 63%. Nesse estudo, a vazão do meio reacional variou de 5 a 55 L/h e as vazões mais elevadas causaram esfoliação da biomassa imobilizada, enquanto que vazões mais baixas resultaram em decréscimo da atividade lipolítica devido a uma ineficiente mistura no reator. Um fluxo ótimo de 25 L/h foi sugerido para alcançar uma conversão máxima de 90%.

Por se tratar de um meio não convencional onde o metanol apresenta um alto caráter hidrofílico e alta polaridade e o óleo vegetal um alto caráter hidrofóbico, a dificuldade de homogeneização e a remoção da camada hidratante do biocatalisador pelo metanol e a inativação do biocatalisador promovida pelo acúmulo de glicerina no biocatalisador, leva a seleção de solventes que promovam a solubilidade completa entre o substrato e os produtos e que limite o contato do etanol com o biocatalisador (LEÓN *et al.*, 1998; LI; DU; LIU, 2007; SUN; DU; LIU, 2011).

Li et al. (2008) utilizaram células íntegras de *Rhizopus oryzae* imobilizadas em partículas de poliuretano (BSP's) para obtenção de biodiesel a partir da reação de esterificação do ácido oléico e metanol. Terc-butanol foi utilizado como solvente orgânico e promoveu maior estabilidade às células quando comparado ao sistema livre de solvente. Para remoção da água produzida ao longo da reação, peneiras moleculares foram utilizadas favorecendo um rendimento de 90% em 48h.

Li, Du e Liu (2007a) demonstraram o efeito benéfico da adição do solvente terc-butanol na metanólise de diferentes óleos vegetais, utilizando células imobilizadas de *R. oryzae* como biocatalisador. A partir desse trabalho, foi estudado por Li, Du e Liu (2007 b) o efeito das quantidades de terc-butanol, metanol, água e biomassa seca da célula imobilizada por meio de um planejamento composto central, tendo como variável resposta o rendimento da transesterificação (biodiesel). Cada fator foi estudado em cinco níveis. A partir da superfície de resposta, uma equação quadrática polinomial foi obtida,

demonstrando que sob ótimas condições, pode-se alcançar 72% de rendimento do biodiesel.

Silva et al. (2009 b) realizaram um estudo comparativo do desempenho de dois tipos de células integras de fungos filamentosos de alta atividade lipolítica, *Rhizopus oryzae* 4692 e *Mucor circinelloides* 4182. A biomassa foi imobilizada em espumas de poliuretano para catalisar a etanólise de óleo de babaçu em meio com solvente (terc-butanol). Após 120 horas de reação, os micélios de *M. circinelloide* 4182 forneceram um rendimento de 70,5% contra 68,63% *R. oryzae* 4692.

Devido ao exposto o presente trabalho pretende utilizar a versatilidade das EPU's e direcionar suas qualidades na síntese para prover uma matriz polimérica viável para suportar células de alta atividade lipolítica. Foram os escolhidos os micélios de *M. circinelloide* 4182, por ser esse fungo, pouco explorado para esse fim e a biomassa imobilizada foi utilizada como catalisador da etanólise do óleo de babaçu.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes de síntese das EPU's

Foram utilizados na síntese das EPU's reagentes encontrados comercialmente na área de espumação e listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Reagentes utilizados na preparação das EPU's estudadas neste trabalho

Reagente	Nome Comercial	Composição	Fornecedor
Isocianato*	TDI 80/20	Tolueno diisocinato, 80% de isômero 2,4 e 20% de isômero 2,6	DOW Química e BASF
Poliol Poliéter*	Lupranol 1100	Massa molecular (PM) = 1100 Índice de Hidroxila = 104 mg KOH/ g	BASF
Poliol Poliéter*	Balancer B50	Massa molecular (PM) = 3000 Índice de Hidroxila = 50 mg KOH/ g	BASF
Poliol Poliéter*	Lupranol 2090	Massa molecular (PM) = 6000 Índice de Hidroxila = 28 mg KOH/ g	BASF
Poliol Poliéster*	Lupraphen 8107	Massa molecular (PM) = 2400 Índice de Hidroxila = 61 mg KOH/ g	BASF
Poliol Poliamida	Voranol RA 640	Peso molecular (PM) = 6000 Índice de Hidroxila = 665 mg KOH/ g	DOW
Catalisador	Kosmo 29	Octanoato de estanho	EVONIK
Catalisador	Tegoamin 33 Tegoamin E 12 Tegostab B	Amina Terciária, composição não informada pelo fabricante	EVONIK
Surfatante	8228 Tegostab B 8300	Copolimero em bloco de polisiloxano e poliaquilenos	EVONIK

*Dados técnicos no anexo A

Todos os reagentes foram gentilmente cedidos pelos respectivos fabricantes e utilizados conforme recebido. Foi utilizado como agente de expansão água destilada, e álcool comercial como solvente de limpeza.

3.1.2. *Micro-organismo*

Na biocatálise foi utilizada a linhagem de fungo *Mucor circinelloides* 4182 adquirido da coleção de cultura da Micoteca URM do Departamento de Micologia (CCB/UFPE).

3.1.3. *Outros Reagentes.*

Acetona (Cromoline), Clorofórmio (Cromoline), Acetato de etila (Cromoline), hexano (Cromoline), goma arábica em pó pura (Synth), óleo de oliva comercial de baixo teor de acidez (Carbonell), Etanol anidro (99,8%, Cromoline), Terc-butanol (Cromoline), óleo de babaçu gentilmente cedido pela COGNIS (Jacareí – São Paulo).

3.1.4. *Equipamentos.*

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão apresentados na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.

Tipo de análise e/ou ensaio	Equipamento	Modelo/ Fabricante
Atividade Hidrolítica	Bureta Digital	Modelo Burette, Hirschmann Techcolor ID 50, Marte (Marte
Teor de umidade	Balança analítica	Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda)
Dosagem de ésteres etílicos	Cromatógrafo a gás	Modelo GC-3800, Varian (Varian Inc. Corporate Headquarters)
Agitação	Agitador mecânico	Modelo RW20-digital, IKA, (IKA Laboratory Equipment, Marconi)
Densidade	Densímetro	Modelo DMA 35N EX (Anton Paar
Viscosidade	Viscosímetro	Modelo LVDVIIIICP-CP 520, Brookfield
Pesagem	Balança analítica	Modelo UX4200H, Shimadzu (UniBloc)
Micrografia	Microscópio eletrônico de varredura	LEO1450VP (Schott Zeiss do Brasil Ltda)
Agitação do meio de cultura e meio reacional	Incubadora	Modelo MA830 (Marconi)

3.2. Metodologia

3.2.1. Síntese de espuma de poliuretano

As espumas foram preparadas por processo chamado de “one-shot” (figura 2.14), no qual dois componentes da mistura, polioliol (com catalisadores, surfactantes e aditivos) e isocianato são misturados mecanicamente e a reação de expansão da espuma se dá quase que instantaneamente.

Os cálculos da massa de isocianato necessária para a síntese foram calculados pelas seguintes equações:

$$\text{Massa de isocianato} = \frac{\text{índice de isocianato}}{100} \times \text{Pei} \times \left(\frac{\text{Polioliol} \times \text{I.OH}}{56100} + \frac{\text{Água}}{\text{Pea}} \right) \quad (3.1)$$

onde: Polioliol = Massa de polioliol (g)

Água = Massa de água (g)

Índice de Isocianato = % sobre o Isocianato estequiométrico

(Ex.: Índice 120 = 20% de excesso de TDI)

I.OH = Índice de hidroxilas

Pei = Peso equivalente do isocianato

$$\text{Pei} = \frac{\text{massa molar do isocianato}}{\text{número de funções do isocianato}} \quad (3.2)$$

Pea = Peso equivalente da água

$$\text{Pea} = \frac{\text{massa molar da água}}{\text{número de funções da água}} \quad (3.3)$$

Segundo a literatura (VILAR, 2004), as quantidades de reagentes para uma massa inicial de 100 partes de polioliol, podem variar de acordo com os dados apresentados na Tabela 3.3. Primeiramente foram realizadas sínteses de espumas variando os poliois, sem adição de surfatantes e catalisadores conforme Tabela 3.4, com o objetivo de obter uma formulação sem qualquer influência do surfactante e catalisadores, que poderiam comprometer a adsorção de células fúngicas na espuma. Todas as formulações foram realizadas em copos de polipropileno de 300 ml. Após a expansão, a espuma foi deixada à temperatura ambiente para a cura completa.

Tabela 3.3 - Variação dos reagentes em 100 partes de polioliol (VILAR, 2002)

Reagentes	Partes/ 100 partes de polioliol
Cargas Inorgânicas	0 - 150
Água	1,5 - 5,5
Silicone	0,5 - 2,5
Catalisador Amínico	0,1 - 1,0
Catalisador de Estanho	0,05 - 0,5
Índice de Isocianato	80 – 125

Tabela 3.4 - Formulações sem catalisadores e surfatantes, com um índice de isocianato igual a 100

Formulação 1		Formulação 2	
TDI	4,65g	TDI	5,5 g
Lupranol B.50	10g	Lupranol 1100	10g
Água	0,4g	Água	0,4g

Formulação 3		Formulação 4	
TDI	4,31g	TDI	14,2g
Lupranol 2090	10g	Voranol RA640	10g
Água	0,4g	Água	0,4g

Com o propósito de obter espumas com melhores propriedades, foram utilizadas formulações propostas pela EVONIK, com índice de isocianato igual 110 (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Formulações proposta pela EVONIK

Formulação PL1100		Formulação PL1101	
Poliol Lupranol 1100	200,00g	Poliol Lupranol 1100	200,00g
TDI	120,69 g	TDI	120,69 g
Tegostab 8228	1,60 g	Tegostab 8228	1,60 g
Tegoamin 33	0,52g	Tegoamin 33	0,52g
Kosmos 29	0,30g	Kosmos 29	0,30g
Água	8,00g	Água	8,00g
Primeira agitação	1000rpm	Primeira agitação	1000rpm
Segunda agitação	2500rpm	Segunda agitação	500rpm

Tabela 3.5 – Formulações proposta pela EVONIK (cont.)

Formulação PL3000		Formulação PL3001	
Poliol Lupranol B. 50	200,00g	Poliol Lupranol B. 50	200,00g
TDI	104,30g	TDI	104,30g
Tegostab 8228	1,60g	Tegostab 8228	1,60g
Tegoamin 33	0,52g	Tegoamin 33	0,52g
Kosmos 29	0,30g	Kosmos 29	0,30g
Água	8,00g	Água	8,00g
Primeira agitação	1000rpm	Primeira agitação	1000rpm
Segunda agitação	2500rpm	Segunda agitação	500rpm

Formulação PL3002	
Poliol Lupranol B. 50	200,00g
TDI	104,30g
Tegostab 8228	1,60g
Tegoamin 33	0,52g
Kosmos 29	0,30g
Água	8,00g
Primeira agitação	1000rpm
Segunda agitação	1500rpm

Formulação PL6000		Formulação Poliester	
Poliol Lupranol 2090	200,00g	Poliol Luprahen 8107	200,00g
TDI	94,80g	TDI	115,63g
Tegostab 8228	1,60g	Tegostab 8300	1,60g
Tegoamin 33	0,52g	Tegoamin E 12	0,52g
Kosmos 29	0,30g	Kosmos 29	0,30g
Água	8,00g	Água	8,00g
Primeira agitação	1000rpm	Primeira agitação	1000rpm
Segunda agitação	2500rpm	Segunda agitação	2500rpm

Para cada bloco de espuma foram utilizados aproximadamente 315g de formulação de composto. Primeiramente, cada polioli e o catalisador de estanho foram misturados em misturador mecânico com uma rotação 1000 rpm por 20 segundos, com agitador do tipo “centrífugo” (misturador dentado muito utilizado em misturas de pós e líquidos) em copo de polipropileno de 1 litro de capacidade.

Após o período de homogeneização adicionou-se ao polioli com catalisador de estanho a mistura de catalisador de amina, surfatante e água, conhecida como ASA

(Amina, Silicone e Água). A pré-mistura de água com silicone melhora a mistura posterior da água ao poliál, e o catalisador de estanho é sensível a água e não pode ser adicionada a ASA. A mistura ASA com o poliál e catalisador de estanho foi homogeneizada com a rotação da primeira agitação conforme Tabela 3.5 por 15 segundos.

Após o tempo de mistura da ASA com o poliál, foi adicionado o tolueno, o diisocianato e o meio reacional foi misturado com a rotação da segunda agitação da Tabela 3.5, por 15 segundos e então transferido para um recipiente retangular de 250mm de largura, 200mm de comprimento e 250mm de altura, previamente forrado com papel “Kraft”. O creme formou-se em aproximadamente 10 segundos e então, a mistura levada a estufa a 70°C por 30 minutos para acelerar a cura do polímero. Em seguida, no bloco de espuma já pré-curada, foram realizados cortes com auxílio de uma serra, para a obtenção de laminas de espuma com 50mm de espessura.

As espumas foram avaliadas visualmente, perante a uniformidade das células e ainda foi realizado um teste de resistência ao etanol anidro.

3.2.2. *Imobilização das células fúngicas.*

Para efeito de comparação, as espumas sintetizadas foram utilizadas juntamente com a espuma comercial adotada por SILVA et al (2009 a, b).

Foi adotada metodologia descrita por SILVA et al (2009 a, b). A linhagem do fungo selecionado foi cultivada em meio de cultura sintético e líquido composto por 30g de óleo de oliva, 70g de peptona, 1g de NaNO₃, 1g de KH₂PO₄ e 0,5g de MgSO₄.7H₂O em 1L de água destilada. O crescimento microbiano foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultura, para os quais foram transferidos assepticamente 10⁶ esporos de cada fungo (raspados e suspensos com água destilada) e incubados por 72 h a 30°C com agitação (170 RPM) juntamente a EPU cortada em cubos de 6mm de aresta, de modo a promover a imobilização das células nestes materiais. A biomassa imobilizada foi recuperada do meio de cultura usando um funil de Buchner e lavada com água destilada e acetona para a limpeza e redução do teor de umidade na biomassa celular. A atividade lipolítica do sistema imobilizado foi quantificada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al, 1999).

3.2.3. *Preparação do biocatalisador.*

Os cubos contendo a biomassa imobilizada, após separação do meio de cultura, foram lavados com água destilada e acetona, enxugados com papel toalha para retirar o excesso de água, e colocados em um dessecador até a umidade máxima de atingisse 15%. A umidade foi determinada em balança de secagem acoplada a uma lâmpada de infravermelho (Marte, Modelo ID 50).

3.2.4. *Síntese de biodiesel.*

As reações de síntese do biodiesel foram realizadas em frascos Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, hermeticamente fechados, sob agitação orbital de 170 rpm. Os experimentos foram realizados em meio reacional composto de óleo de babaçu, etanol e terc-butanol como solvente, numa razão molar 1:6 óleo/álcool e uma relação de 1:1,5 v/v óleo/terc-butanol. Os meios foram incubados com 20% em massa da biomassa imobilizada (massa seca) em relação à massa total dos reagentes de partida numa temperatura de 35°C. As reações foram conduzidas por um período máximo de 120h e monitoradas pela retirada de alíquotas do meio reacional a cada 24h para dosagem dos ésteres etílicos formados, conforme metodologia estabelecida por Urioste et al. (2008).

3.2.5. *Reutilização do biocatalisador em bateladas consecutivas.*

A biomassa foi recuperada do meio reacional com auxílio de uma tela de aço e lavada com terc-butanol sob filtração a vácuo. A umidade da biomassa foi mantida entre 5 – 10%. As bateladas consecutivas foram realizadas conforme a metodologia anterior (seção 3.2.4), fixando a proporção de 20% de biomassa imobilizada no meio reacional.

3.3. Métodos de Análise

3.3.1. *Calculo do diâmetro médio de poros.*

Para determinar o tamanho de poros, avaliar a morfologia das espumas e analisar as células adsorvidas nas espumas foram utilizadas micrografias obtidas do microscópio eletrônico de varredura LEO1450VP (Schott Zeiss do Brasil Ltda)(MEV). As amostras das

espumas de PU fixadas um suporte adequado, foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro, e as imagens foram obtidas com aumento de 20 e 100 vezes.

Com auxílio do software *ImageJ*, as micrografias foram tratadas para que fossem realizadas as análises dos diâmetros médio de poros e levantado a distribuição dos diâmetros ao longo da seção transversal de crescimento da espuma.

Primeiramente foi calibrado a imagem no programa *ImageJ*. A imagem é aberta no programa, neste caso uma micrografia com 20 vezes de aumento, para então realizar a calibragem da imagem no programa. Com a utilização da ferramenta *Straight* é feito uma linha do tamanho da barra de metragem da imagem (Figura 3.1) e então com a ferramenta *Set Scale* na opção *Analyze* da barra de ferramentas, é colocado a distancia conhecida e a unidade utilizada na micrografia, neste caso 200 μm equivalem a 36 pixels, obtendo assim a calibragem para a imagem de 0,18 pixel/ μm .

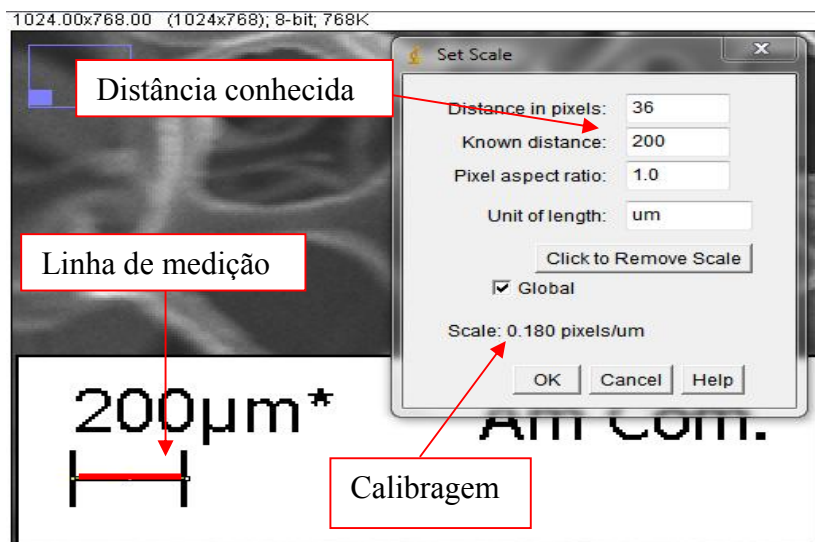


Figura 3.1. Calibragem da micrografia no programa *ImageJ*

As seqüências de tratamento das imagens estão mostradas nas Figuras 3.2 A - F. Primeiramente é recortada a área de interesse (Figura 3.2A) e aberta em outra janela (Figura 3.2B) onde é feito o primeiro tratamento. Nesta etapa todas as bordas são realçadas com a utilização da ferramenta *Find Edges* que se encontra na opção *Process* da barra de ferramentas (Figura 3.2C). Em seguida ocorre o preenchimento dos poros contornados (Figura 3.2D). Após o preenchimento dos poros é realizado um tratamento da imagem utilizando *Binary* que se encontra na opção *Process*, transformando a imagem em preto e branco (Figura 3.2E).

Com esse tratamento os poros ficaram na cor preta e a espuma na cor branca, sendo possível então realizar as medições dos diâmetros dos poros e a sua distribuição. Em *Set Measurement* é selecionado *Feret's diameter*, conhecido também como máximo de paquímetro, para calcular o diâmetro dos poros e então utilizado a ferramenta *Analyze Particles*, ambas se encontram na opção *Analyze* da barra de ferramentas, para efetuar a medição (Figura 3.2F)

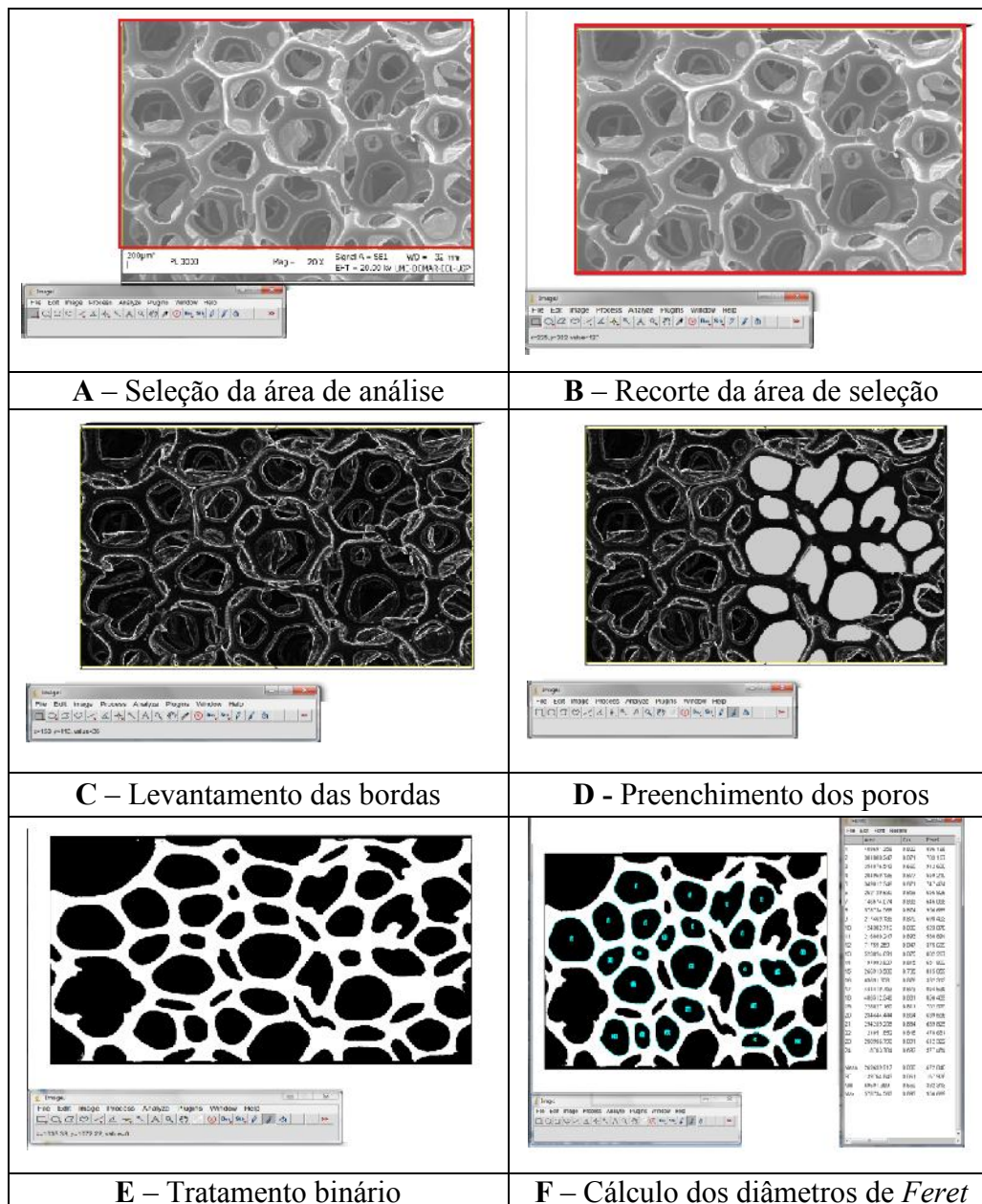


Figura 3.2 – Sequência de tratamento das micrografias das espumas realizado pelo software *ImageJ* para o levantamento do diâmetro de poros

Com os resultados do levantamento dos diâmetros de *Feret* para cada poro, é calculado o diâmetro médio de poros e realizado o gráfico de distribuição dos diâmetros de *Feret*.

3.3.2. *Permeabilização ao ar.*

O teste de permeabilidade ao ar foi realizado no laboratório da EVONIK, de acordo com a norma ASTM D3574-02. As análises foram realizadas em duplicatas para cada espuma.

As espumas eram submetidas a um fluxo de ar, com uma vazão de 14 L/min, e a resistência a passagem do fluxo é expressa com base no ganho de pressão da linha. Quanto maior for o ganho da pressão, maior será a quantidade de poros fechados na espuma.

3.3.3. *Densidade aparente das EPU's.*

A densidade aparente foi calculada de acordo com a ASTM D3574-02. As amostras foram cortadas com dimensões de 40x40x10 mm, medidas com um paquímetro, sendo depois medidas as massas de cada uma das amostras, em uma balança eletrônica com precisão de 0,0001g. O valor é reportado com massa total (Kg) de amostra de espuma por unidade de volume (m³). Todas as determinações foram feitas em triplicata.

3.3.4. *Grau de inchamento das EPU's e parâmetro de solubilidade.*

Para determinar o grau de inchamento e o parâmetro de solubilidade das espumas, 15 amostras de cada uma das espumas foram cortadas com dimensões aproximadas de 30x30x10mm, medidas com paquímetro digital. Para cada tipo de espuma as amostras foram pesadas em uma balança eletrônica com precisão de 0,001g. Após pesagem foram imersas em solventes pré-selecionados: hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e terc-butanol, e de acordo com a norma ASTM 471 o inchamento foi feito em temperatura ambiente e na ausência de luz por 15 dias.

O grau de inchamento no equilíbrio expresso pelo parâmetro Q é também chamado de coeficiente de inchamento no equilíbrio e é determinado experimentalmente pela relação:

$$Q = \frac{(V_f - V_i)}{V_i} \quad (3.4)$$

No qual;

V_i = Volume inicial do polímero

V_f = Volume final no equilíbrio do polímero

Para o levantamento do parâmetro de solubilidade do polímero (δ_2), vários solventes foram selecionados com o intuito de cobrir uma faixa de valores de parâmetros de solubilidade. Com um gráfico de parâmetro de solubilidade do solvente (δ_1) por Q (Figura 3.3) é utilizado uma curva de tendência gaussiana, e assim tomando como parâmetro de solubilidade do polímero o ponto máximo da curva.

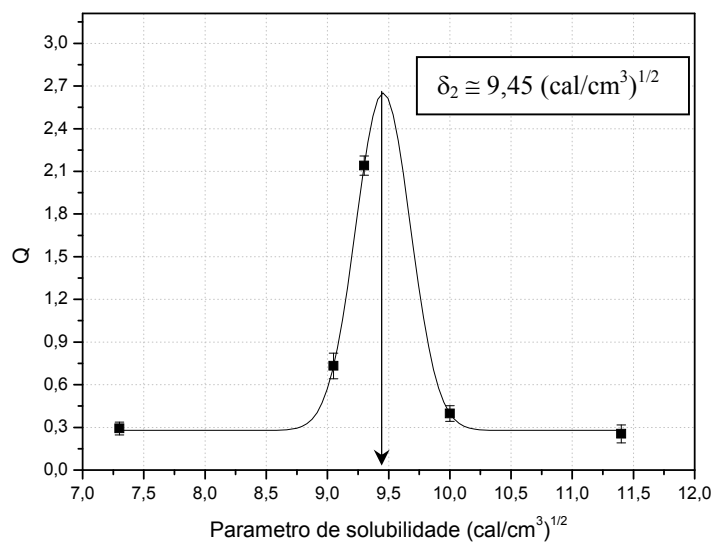


Figura 3.3. Gráfico do parâmetro de solubilidade (δ_1) x coeficiente de inchamento (Q) com a linha de tendência gaussiana traçada

Os parâmetros de solubilidade dos solventes são:

Hexano = 7,29 (cal/cm^3)^{1/2}

Acetato de Etila = 9,05 (cal/cm^3)^{1/2}

Clorofórmio = 9,30 (cal/cm^3)^{1/2}

Etanol = 10,00 (cal/cm^3)^{1/2}

Terc-Butanol = 11,40 (cal/cm^3)^{1/2}

3.3.5. Sorção de água e solventes.

A metodologia proposta é uma modificação da ASTM F 716/726. A avaliação da sorção estática da água destilada e dos solventes, neste caso o etanol e terc-butanol, consistiu de um sistema de frascos com tampas, nos quais as amostras das espumas, com dimensões 30x30x10 mm, previamente pesados foram completamente imersas nos líquidos contidos nos frascos fechados para evitar a evaporação. Em tempos pré-determinados (1, 5, 10, 30 minutos e em 1, 2, 24, 48, 72 horas) eram retirados as amostras dos fracos com auxílio de uma tela de aço e medido o peso molhado da amostra. Com o cálculo das massas dos líquidos penetrados nas amostras, os resultados foram dispostos em um gráfico de tempo de sorção versus a massa penetrada.

3.3.6. Absorção dos solventes pela matriz.

Foi determinada a quantidade de solvente retida na matriz de cada EPU. As amostras das espumas com as mesmas dimensões utilizadas para o levantamento do grau de inchamento foram imersas em etanol e terc-butanol em frascos fechados. Após 72 horas as amostras foram retiradas com auxílio de uma tela de aço e o excesso de solvente dos poros foi retirado pela compressão das amostras. Em seguida as amostras foram pesadas. Pela diferença de massa foi calculada a massa de solvente absorvida por massa de espuma utilizada. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente e em triplicata.

3.3.7. Determinação da atividade lipolítica do biocatalisador.

Foram realizadas as atividades enzimáticas das células imobilizadas e do caldo fermentativo, utilizando-se o método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). 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 ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0) e 1,0 g células imobilizadas (massa seca) ou 1,0 mL do caldo fermentado. Os frascos foram incubados a 37°C por 30 min, em banho termostaticado 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

0,02mol.L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela Equação 3.5 sendo que uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em µmoles/g.min (U/g).

$$\text{Atividade } (\mu\text{mol/g.min}) = \frac{(V_A - V_B) \times M \times 10^3}{t \times m} \quad (3.5)$$

No qual:

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⁻¹); t = tempo de reação (min); m = massa seca (g).

3.3.8. Determinação das quantidades de células adsorvidas.

Para determinar o peso de células fúngicas adsorvidas nas espumas, as espumas foram pesados após 1 dia na estufa da 60°C, e após a preparação do biocatalisador, as biomassas imobilizadas foram pesadas e os cálculos foram realizados pela Equação 3.6

$$\text{Massa micélio} = M_f \times \frac{100 - \text{umidade}}{100} - M_{esp} \quad (3.6)$$

No qual:

M_f = massa final do biocatalisador preparado; *Umidade* = umidade final do biocatalisador preparado, determinada em balança de secagem acoplada a lâmpada de infravermelho, M_{esp} = massa inicial das espumas

3.3.9. Separação dos produtos formados na síntese de biodiesel.

Para a separação da glicerina liberada na reação de transesterificação, o meio reacional foi submetido a uma etapa de purificação, constituída basicamente de uma lavagem com água destilada. O volume do meio reacional separado do biocatalisador foi recolhido, medido e transferido para um funil de separação. Em seguida foi adicionado o mesmo volume de água destilada aquecida, efetuando-se uma agitação e deixando a mistura em repouso por 30 minutos para a separação das fases. A fase superior foi

composta pelos ésteres de etila e a fase inferior por glicerol e água de lavagem. A fase inferior foi descartada e a fase superior submetida à evaporação em rota-evaporador. A amostra purificada foi submetida a análise de viscosidade e densidade.

3.3.10. Análise de viscosidade do óleo vegetal e dos ésteres de etila

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas em duplicata a 40°C para o óleo vegetal e para os ésteres de etila, empregando 0,5 mL de fluido.

3.3.11. Determinação da densidade.

A densidade dos ésteres de etila foi determinada em decímetro digital. As medidas foram realizadas em triplicatas a 15°C para o óleo vegetal e os ésteres de etila, utilizando 5 mL de amostra.

3.3.12. Determinação dos ésteres de etila.

As concentrações dos ésteres de etila foram determinadas por cromatografia de fase gasosa, utilizando-se uma coluna empacotada (6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh, HP), operando nas condições estabelecidas por Urioste et al., 2008 e descritas na Tabela 4.5.

Os padrões cromatográficos foram sintetizados por via química de acordo com metodologia previamente descrita por Urioste et al. (2008).

O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (M_t) em relação a massa teórica esperada de ésteres de etila (M_e). M_e foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial do óleo de babaçu (M_0), da massa molecular correspondente a cada ácido (MM_a) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela Equação 3.7 (a), em que M_0 corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (C_a), com a massa inicial de óleo utilizada (M_i) Equação 4.6 (b). O rendimento foi calculado utilizando a massa total de ésteres obtida pela análise por cromatografia

gasosa (Mt) pela massa teórica de ésteres de etila (Me), conforme mostrado na Equação 4.6 (c).

$$Me = \frac{(M_o \times MM\grave{e})}{MMa} \quad (a) \quad Mo = Ca \times Mi \quad (b) \quad R = \frac{Mt}{Me} \times 100 \quad (c) \quad (3.6)$$

Tabela 3.6 - Condições operacionais para determinação dos ésteres de etila por CG.

Padrão interno	Hexanol (18,0 g/L)
Programa de temperaturas	90°C (3min), 120°C (10 min) e 170°C (15 min)
Taxa de variação	25°C/ min
Preparação da amostra	1:1 (amostra - hexano)
Preparação para injeção	1:1 (amostra - padrão interno)

Tempos de retenção dos Monoésteres de etila (min)	C8 EtOH =	3,28
	C10 EtOH =	5,26
	C12 EtOH =	8,56
	C14 EtOH =	12,06
	C16 EtOH =	13,96
	C18 EtOH =	17,10
	C18:1 EtOH =	17,81
	C18:2 EtOH =	19,26

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sínteses das espumas de PU





Com o estudo das primeiras formulações propostas na metodologia (Tabela 3.4), as sínteses utilizando apenas os reagentes principais (poliois, TDI e água) confirmaram a dependência dos outros reagentes para a obtenção de espumas com bom crescimento, com uma boa homogeneidade das células (poros) e com resistência a solvente. As primeiras formulações, apesar de um bom crescimento e boa abertura de poros (Tabela 4.1), ao entrar em contato com álcool de limpeza, não apresentaram resistência, ocorrendo uma ruptura da espuma quando aplicado qualquer esforço sobre ela e ainda devido à alta reatividade do Voranol RA64 utilizado na formulação 4, foi obtido uma espuma muito rígida e sem células abertas. Assim este poliols e essas formulações foram descartadas.

A resistência ao solvente pode ser explicada pela baixa reticulação da espuma, que devido a ausência dos catalisadores do tipo organometálicos, a reação do isocianato com as hidroxilas secundárias e terciárias não ocorre, obtendo assim polímeros pouco reticulados e sem resistência a solvente.

Portanto, a fim sintetizar espumas mais específicas para a imobilização da biomassa, foram utilizadas as formulações propostas pela EVONIK (Tabela 3.4). Assim foi possível obter em todas as formulações características necessária para a imobilização tais como, espumas com boa uniformidade de células, boa abertura de poros e resistência a solvente. Essas espumas apresentaram propriedades superiores por conta dos catalisadores que promoveram uma boa reticulação da matriz, e ao surfatante que estabilizou e homogenizou as microbolhas nucleadas com a agitação, na massa polimérica.

Na tabela 4.2 foi possível observar que a velocidade de agitação proporcionou modificações visíveis na morfologia das espumas sintetizadas com os pólios Lupranol B.50 e Lupranol 1100 (Tabela 4.2). Para formulações com agitação de alta rotação, ocorreu uma diminuição dos tamanhos de poros, enquanto que nas espumas obtidas com rotação mais baixa, poros de dimensões maiores foram obtidas.

Tabela 4.1 - Formulações sem catalisadores e surfatantes, com um índice de isocianato igual a 100

Formulação 1		Formulação 2	
TDI	4,65g	TDI	5,5 g
Lupranol B.50	10g	Lupranol 1100	10g
Água	0,4g	Água	0,4g
	Espuma flexível com bom crescimento, sem uniformidade das células e nenhuma resistência a solvente		Formulação sem crescimento
Formulação 3		Formulação 4	
TDI	4,31g	TDI	14,2g
Lupranol 2090	10,0g	Voranol RA640	10,0g
Água	0,4g	Água	0,4g
	Formulação sem crescimento		Espuma rígida com alta reatividade, bom crescimento e sem células abertas

Este fenômeno é explicado pelo fato de que para uma agitação com alta rotação, a nucleação de microbolhas de ar dentro da massa de polímero é maior, ao contrário do que ocorre em uma agitação mais lenta, onde a nucleação é menor. Dever ser considerado ainda que o volume de gás carbônico formado é o mesmo para as formulações que apresentam o mesmo polioliol, portanto a massa polimérica que tiver maior número de microbolhas nucleadas, o volume de gás direcionado para cada bolha será menor, ocasionando a formação células pequenas, porém com maior quantidade de poros por área (KAUSHIVA *et al*, 2000).

Tabela 4.2. Fotos das espumas formuladas para análise comparativa dos poros e os valores das respectivas densidades.


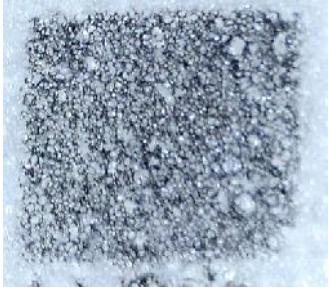

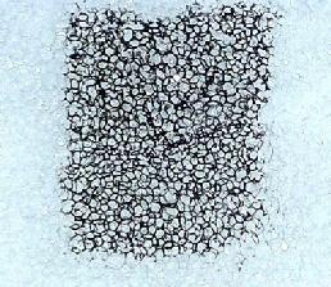





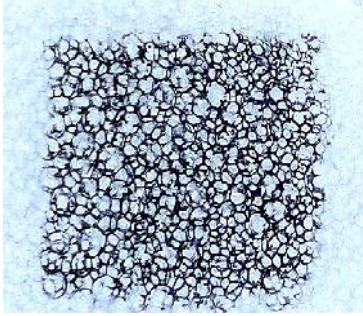

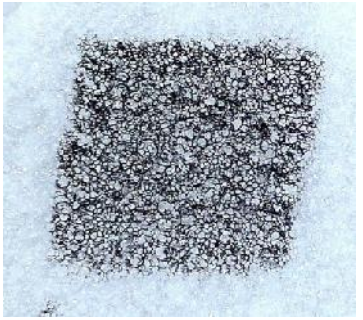

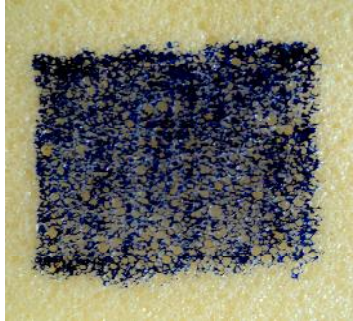
Espuma	Fotografia	
	Espumas	Poros
Formulação: PL1100 Agitação: 2500RPM Densidade: 22 kg/m ³		
Formulação: PL1101 Agitação: 500RPM Densidade: 24 kg/m ³		
Formulação: PL3000 Agitação: 2500RPM Densidade: 33 kg/m ³		
Formulação: PL3001 Agitação: 500RPM Densidade: 25 kg/m ³		

Tabela 4.2. Fotos das espumas formuladas para análise comparativa dos poros e os valores das respectivas densidades (cont.)

Amostra	Fotografia	
	Espumas	Poros
Formulação: PL3002 Agitação: 1500RPM Densidade: 27 kg/m ³		
Formulação: PL6000 Agitação: 2500RPM Densidade: 23 kg/m ³		
Formulação: Poliester Agitação: 2500RPM Densidade: 23 kg/m ³		

Então com as formulações propostas pela EVONIK, foi possível verificar que se pode variar o diâmetro médio de poros das espumas apenas mudando a velocidade de agitação do meio, contrariando os dados da literatura, nos quais os pesquisadores descrevem a necessidade de, ao mesmo tempo em que se varia a velocidade de agitação, faz-se necessário alterar as concentrações do surfatante e do agente de expansão na formulação, o que acarreta em modificações físico-químicas (KAUSHIVA *et al*, 2000; ANEJA; WILK; RIGHTOR, 2003). Dessa forma foi possível então, realizar um estudo comparativo entre espumas com dimensões diferentes no diâmetro de poros utilizando a mesma razão entre os reagentes de síntese.

As densidades aparentes das espumas apresentaram-se bem diferentes, mesmo para um mesmo poliols. A densidade para a espuma comercial foi de 19 kg/m^3 . Segundo a literatura, a densidade aparente está intimamente ligada às propriedades físicas dos materiais, porém não apresenta linearidade com o tamanho dos poros e nem com a formação dos segmentos rígidos e flexíveis. Espumas com diâmetro de poros diferentes podem apresentar mesma densidade. Neste caso as bordas de Plateau que governariam esta propriedade, podem apresentar-se mais grossas ou mais finas, acarretando numa diferença do volume de vazios nas espumas (THOMSON, 2005; PACHECO, 2006).

Para efeito de comparação, as espumas propostas pela EVONIK foram caracterizadas quanto ao grau de inchamento, permeabilidade ao ar, sorção de líquidos, absorção dos solventes utilizados na transesterificação e ao diâmetro de poros.

4.2. Caracterizações das espumas de PU

Foram realizadas as caracterizações das espumas sintetizadas e da espuma de referência, a comercial adotada por SILVA et al. (2009 a, b).

4.2. 1. Cálculo do diâmetro médio de poros

A caracterização de espumas por imagens digitalizadas sejam elas por microscopia de varredura ou por outros métodos, é uma ferramenta muito utilizada para o cálculo de diâmetros de poros e de células e ainda para o cálculo da porosidade das espumas e membranas (TAN; OBENDORF, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; WANG; MIN, 2008; JOSSET *et al.*, 2010; HAKIM *et al.*, 2011;).

Jang, Kraynik e Kyriakides (2008) utilizaram a análise de topografia micro-computadorizada por raios-X. Essa técnica é usada para desenvolver imagens 3D da morfologia da espuma de poliuretano com diferentes tamanhos de poros. As imagens são utilizadas para levantamento estatístico dos tamanhos das células e análise da anisotropia das células, com a finalidade de obter condições de contorno para a elaboração da modelagem matemática do crescimento da espuma, para assim estimar os módulos elásticos da espuma.

Micrografias de espumas comerciais de poliuretanos são utilizadas por Calvert et al. (2010) para o cálculo do diâmetro médio de células, da distribuição dos diâmetros e o

número de poros por polegada, para que fossem estudadas quais as melhores espumas para utilização como implante para ossos.

Tan e Obendorf (2006) utilizaram o software *ImageJ* para analisar a modificação da distribuição dos diâmetros de poros das membranas de poliuretanos antes e após da graftização da superfície das membranas. Com a utilização das micrografias das superfícies das membranas e com o auxílio do software, foi possível analisar a diferença do diâmetro e da distribuição dos poros da membrana. Tan et al. (2011) também utilizaram a mesma técnica para analisar a distribuição dos poros de espumas rígidas de poliuretano sintetizadas com polioli a base de óleo de soja.

De acordo com Cruz et al. (2010) o software *ImageJ* demonstrou ser uma ferramenta apropriada para a análise de micrografias de fosfato de nióbio empregado no branqueamento da celulose. Foi sendo possível investigar a composição dos depósitos e a morfologias dos fosfatos. Para esse caso a análise estatística mostrou-se eficaz.

Com auxílio do software *ImageJ*, as micrografias das espumas foram tratadas conforme a metodologia adotada na seção 3.3.1, para que fossem realizadas as análises dos diâmetros médio de poros e levantando os dados referentes à distribuição dos diâmetros ao longo da seção transversal de crescimento da espuma.

Nesta análise é utilizada como o diâmetro de poros, o parâmetro de tamanho definido no software de diâmetro de *Feret*: distância mais longa entre dois pontos ao longo do limite de seleção, também conhecido como máximo paquímetro. A calibração da imagem ficou em 0,18 pixel/ μm .

Após o levantamento dos diâmetros de *Feret* para cada poro, foi calculado o diâmetro médio de poros e realizado o gráfico de distribuição dos diâmetros de *Feret*. (Figura 4.1).

Pelos resultados obtidos na tabela 4.1 foi possível verificar que o software se mostrou uma ferramenta promissora para este tipo de análise, pois ao se utilizar o diâmetro de *Feret* é fixada a distância entre os pontos de medida, eliminando variações de medição para um mesmo poro, e ainda a possibilidade de se obter a distribuição dos tamanhos dos poros nas espumas, possibilitando analisar a homogeneização das dimensões dos poros em cada espuma. Nos gráficos da tabela 4.1 foi possível verificar que apesar da variação das dimensões dos poros, o valor do diâmetro médio calculado ficou dentro da região de maior porcentagem, podendo assim ser considerado um valor de comparação entre as espumas.

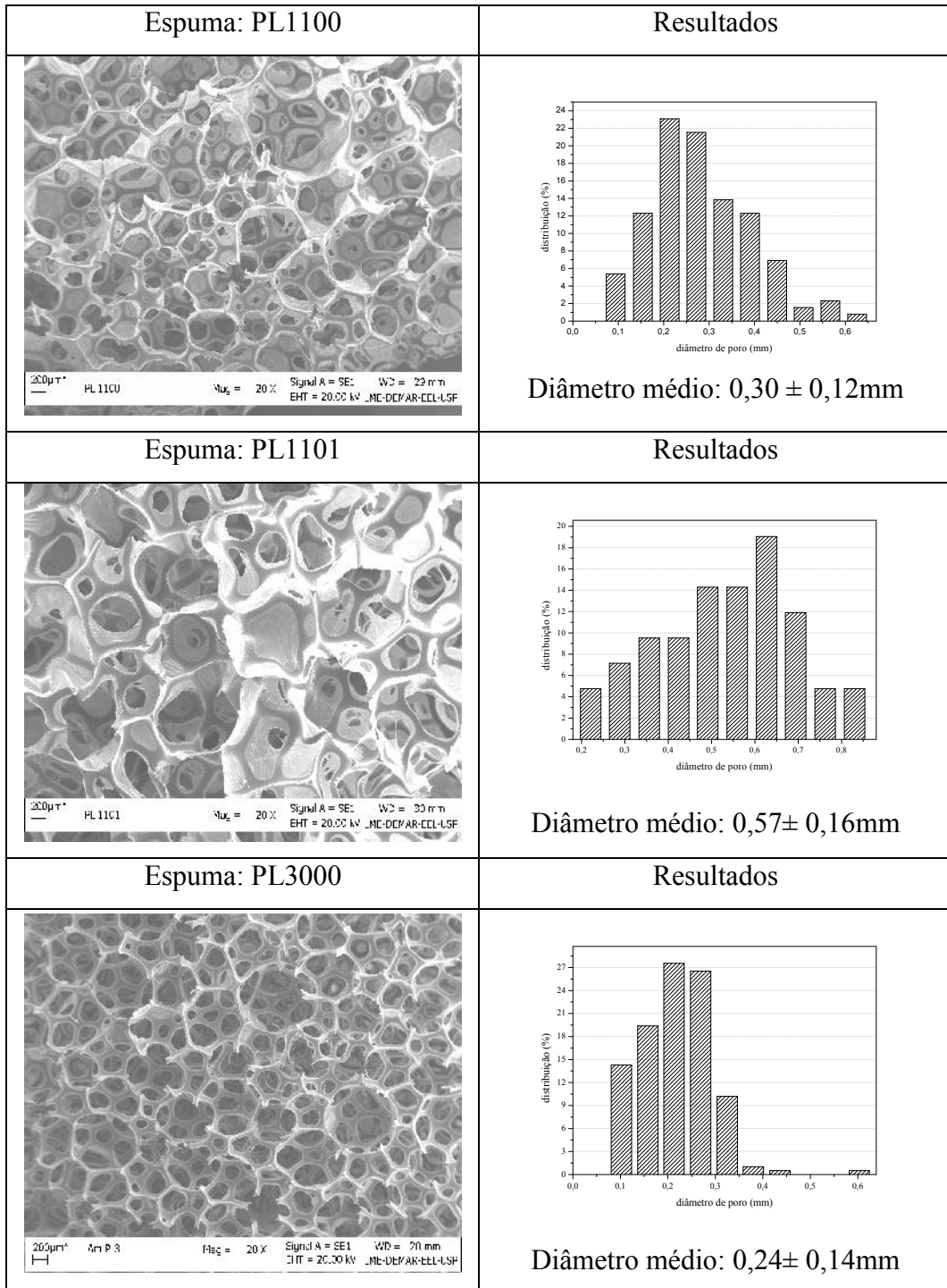


Figura 4.1. Micrografias, gráfico da distribuição dos tamanhos de poros e o valor do diâmetro médio de poro das espumas sintetizadas.

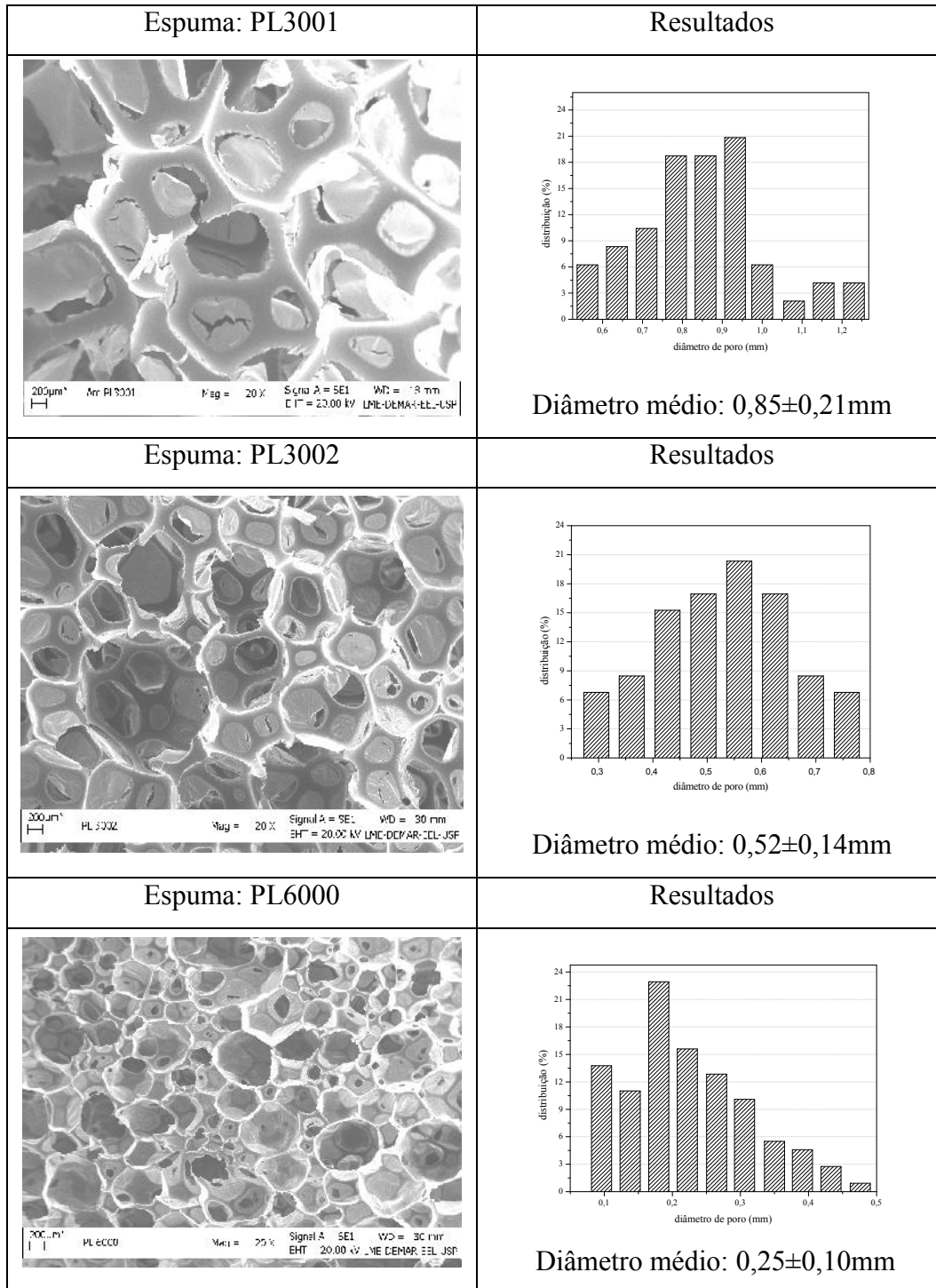


Figura 4.1. Micrografias, gráfico da distribuição dos tamanhos de poros e o valor do diâmetro médio de poro das espumas sintetizadas (cont.).

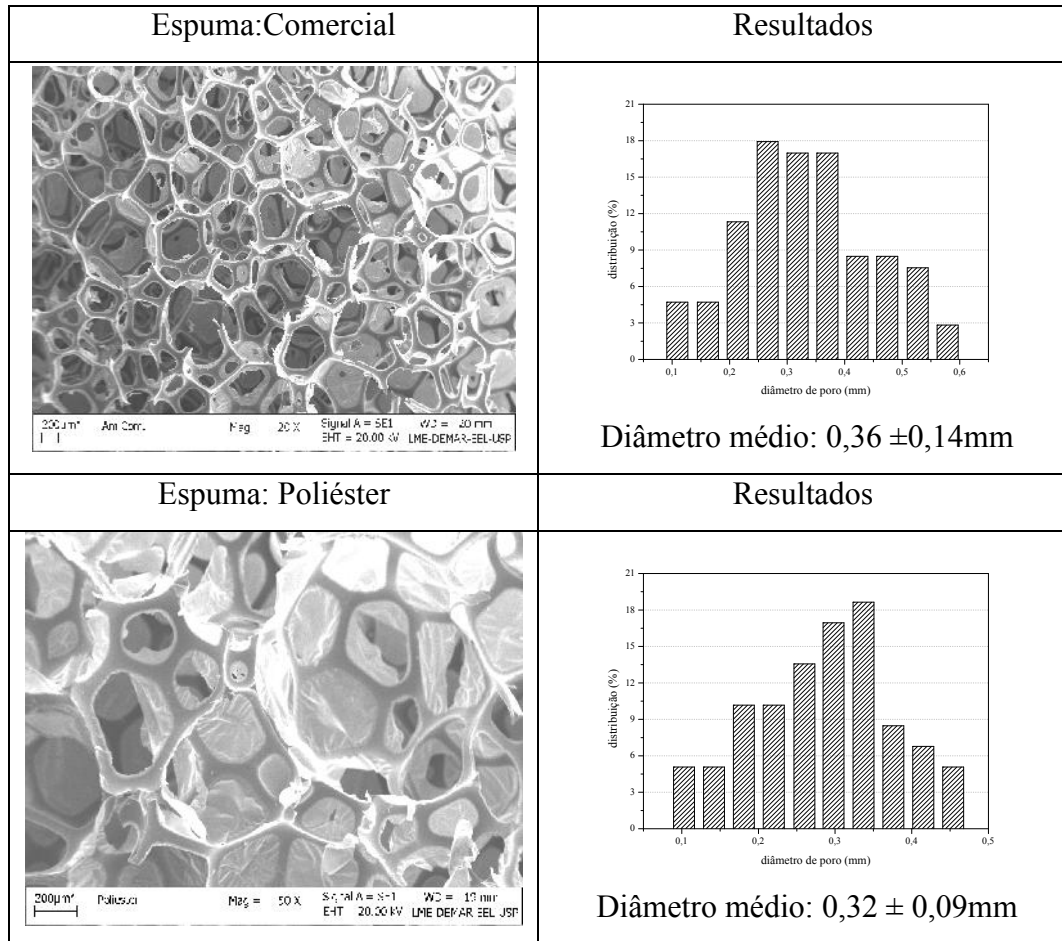


Figura 4.1. Micrografias, gráfico da distribuição dos tamanhos de poros e o valor do diâmetro médio de poro das espumas sintetizadas (cont.).

Com isso foi possível observar que o método utilizado para o controle do diâmetro de poros nas espumas mostrou-se eficaz. Após a variação da agitação, diâmetros de poros variados foram obtidos, como é o caso das formulações PL3000, com diâmetro médio de poros de 0,24 mm utilizando uma agitação de 2500 RPM, PL3001 com 0,82mm e agitação de 500RPM e por fim a PL3002 com diâmetro médio de poros de 0,52mm e agitação de 1500 RPM. O mesmo comportamento foi verificado para as formulações com o polioli Lupranol 1100. Para a formulação PL1100 o diâmetro médio de poros foi de 0,30 mm com a agitação de 2500RPM e para a PL1101 foram detectados diâmetros médios de poros de 0,52 mm, utilizando agitação de 500RPM.

4.2.2. Permeabilização ao ar

Permeabilidade ao ar é a resistência que a espuma apresenta ao fluxo de ar que atravessa a matriz porosa, sendo expressa em milímetro de coluna de água. Intuitivamente podemos esperar que a espuma que apresentar uma maior perda de carga apresentará uma quantidade de poros fechado maior, e ainda, a que apresentar diâmetro médio de poros maior apresentará uma menor resistência ao fluxo. Com essa análise é possível ter um bom indicativo de porosidade entre as espumas. Thomson (2005) utiliza-se dessa técnica para selecionar espumas poliuretânicas com perda de carga máxima de 127 mm H₂O para serem utilizadas como bio-filtro.

Com o intuito de comparar quais as espumas que apresentam maior quantidade de poros fechados, foi realizado o teste de permeabilidade ao ar, com uma vazão de 14L.min⁻¹ de ar. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.3.

Pelos resultados foi possível observar que a resistência a passagem de fluxo na espuma esta diretamente relacionada com a quantidade de poros fechados e abertos apresentada pela espuma e não sofre influencia significativa da variação do diâmetro de poros.

Foi verificado que a espuma de poliéster apresentou uma maior quantidade de poros fechados entre as espumas sintetizadas por conta da maior perda de carga. Já as sintetizadas como os polioli Lupranol B50 apresentaram boas permeabilidades ao ar, podendo ser considerado que todos os poros estavam abertos. Nas demais matrizes foram consideradas que a maioria dos poros encontrava-se abertos.

Este pode ser um fator importante a ser observado na síntese de espuma para imobilização de microorganismo, uma vez que se a permeabilidade ao ar for muito alta provavelmente esta matriz apresentará: uma maior resistência à transferência de nutriente até as células que se encontrem mais no interior da matriz, uma adsorção do microorganismo apenas na superfície da espuma e uma biomassa menos dispersa na matriz.

Adicionalmente observa-se que conforme ocorre o crescimento do microorganismo, a resistência à transferência tende a aumentar devido ao preenchimento dos espaços vazios da espuma pelas células. Ryo, Cho e Chung (2010) relatam que após 27 dias de utilização de espuma de poliuretano com diâmetro de poros de 0,8mm e com porosidade de 98,8% como biofiltro para o controle de orgânicos voláteis, a resistência aumentou de 100 mm H₂O m⁻¹ devido ao crescimento do microorganismo, diminuindo a eficiência do filtro.

Tabela 4.3. Resultados das análise de permeabilidade ao ar

Espuma	Perda de Carga (mm H₂O)
PL1100	13 -15
PL1101	25-26
PL3000	6 – 7
PL3001	3 – 4
PL3002	4 – 5
PL6000	20 – 21
Poliéster	100 – 110
Comercial	15 – 18

4.2.3. Grau de inchamento das EPU's e parâmetro de solubilidade (δ)

O processo de inchamento de um material polimérico ocorre a nível molecular envolvendo a difusão de um líquido para o interior do polímero. Esse fenômeno é possível devido à mobilidade das cadeias, levando ao alojamento de moléculas que apresentem semelhanças químicas e estruturais. Em caso contrário, essa difusão não ocorre devido ao polímero apresentar interações entre cadeias maiores que a interação matriz/solvente. Assim na presença de um solvente adequado os polímeros reticulados incham e os não reticulados se dissolvem.

Para então avaliar a reticulação das matrizes e levantar o parâmetro de solubilidade dos polímeros, foram calculados os coeficiente de inchamento para todas as espumas.

Nessa avaliação, a dependência entre o grau de inchamento Q em um solvente de baixo peso molecular e o δ deste solvente, é expressa por uma curva de Q (ordenada) *versus* δ (abscissa). Quanto menor for a reticulação maiores serão os valores de Q , ou ainda quanto maior for a interação polímero/polímero menores serão os valores de Q . O parâmetro de solubilidade do polímero é considerado como sendo o valor máximo da curva ajustada aos pontos experimentais, sendo esta uma curva característica de Gauss (SANTOS et al, 2000; YANG; KOEING, 2004)

Os solventes escolhidos para esta análise foram: hexano, acetato de etila, clorofórmio, etanol e terc-butanol, sendo os três primeiros muito utilizados para este tipo de estudo e os dois últimos escolhidos com o intuito de investigar as interações entre os solventes utilizados neste trabalho na síntese de biodiesel (etanol e terc-butanol). Os dados referentes aos ensaios de grau de inchamento encontram-se no Apêndice A.

Foi possível observar que as espumas apresentaram um perfil de solubilidade semelhante perante os solventes utilizados (Figura 4.2). O coeficiente utilizado para comparação foram os valores encontrados para o clorofórmio por ser o solvente nos quais as espumas apresentaram um maior grau de inchamento, revelando assim que as polaridades e os parâmetros de solubilidade dos polímeros estão próximo ao do clorofórmio, conforme dados da Tabela 4.4

Conforme a metodologia adotada, o ponto em que $dQ/d\delta = 0$ da curva de Gauss foi tomado como sendo o parâmetro de solubilidade das amostras. Os valores dos parâmetros de solubilidade das espumas de poliuretano apresentaram valores muito próximos aos da literatura, entre 9,3 a 10,3 ($\text{cal}\cdot\text{cm}^{-3}$)^{1/2} (GOPAKUMA; NAIR, 2005; LIU et al, 2011), porém o coeficiente de intumescimento (Q) máximo, apresentou grandes variações entre as espumas.

Tabela 4.4 Valores dos coeficientes de intumescimento no clorofórmio (Q) e parâmetro de solubilidade das espumas.

Amostra	Coefficiente de intumescimento no clorofórmio (Q)	Parâmetro de solubilidade do polímero (cal/cm^3)^{1/2}
PL1100	2,521± 0,161	9,577
PL1101	2,296 ± 0,103	9,539
PL3000	2,158 ± 0,071	9,459
PL3001	2,168 ± 0,089	9,420
PL3002	2,129 ± 0,074	9,454
PL6000	1,576 ± 0,138	9,412
Poliéster	1,185 ± 0,071	9,481
Comercial	1,949 ± 0,074	9,411

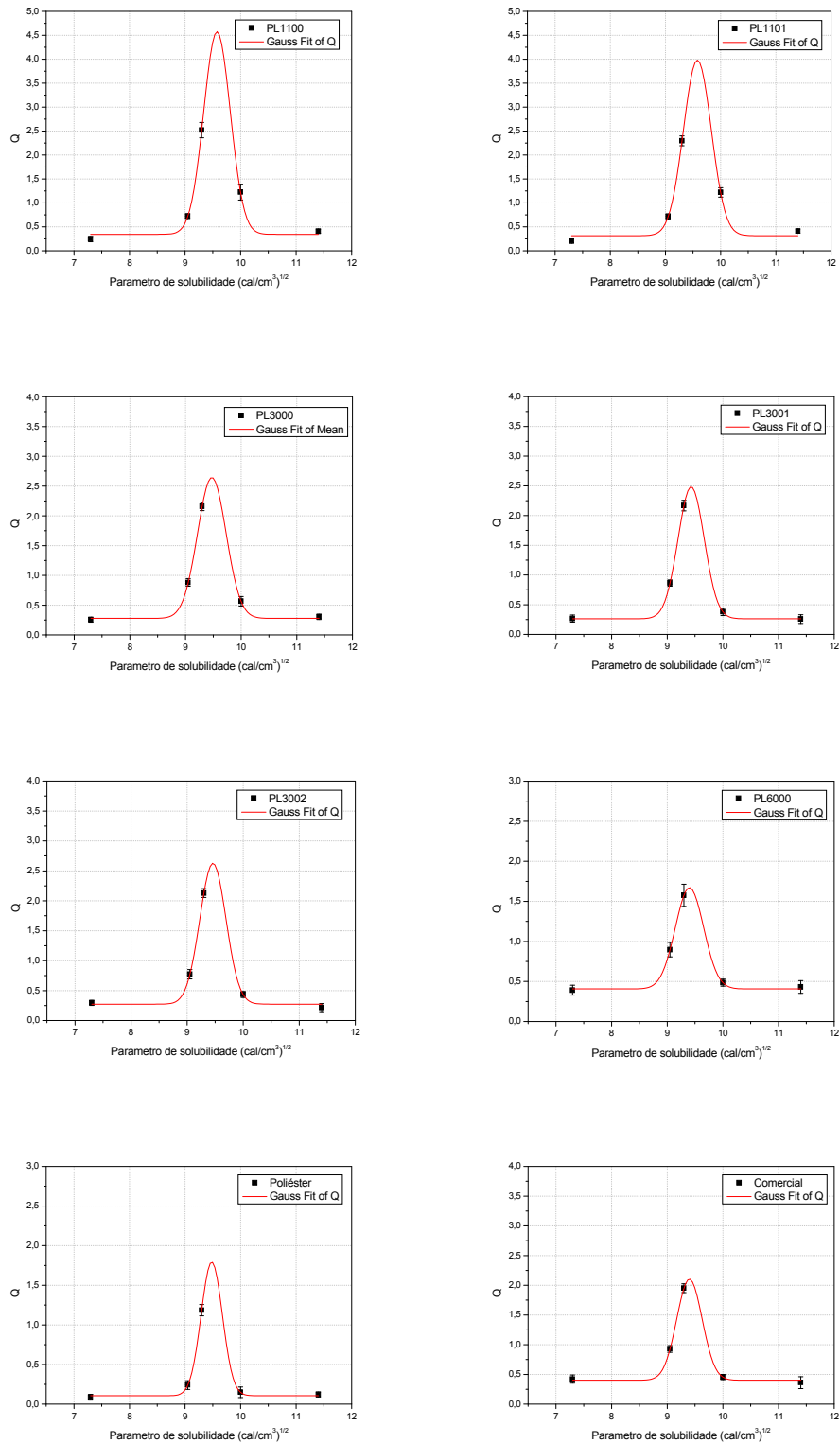


Figura 4.2. Gráficos do coeficiente de inchamento (Q) pelo parâmetro de solubilidade de solvente.

As espumas com o menor e o maior coeficiente de intumescimento foram respectivamente os poliuretanos sintetizados com o poliol poliéster e com o poliol Lupranol 1100 (PL1100). Isso se deve a natureza dos poliois utilizados, isto é, no caso do Lupranol 1100 sua estrutura é constituída de polipropilenoglicol com apenas duas hidroxilas, ocasionando uma baixa reticulação no polímero. Devido a essa baixa reticulação auxiliada pela natureza do poliol Lupranol 1100, o coeficiente de intumescimento foi maior. Por outro lado, para o poliol 8107 (poliéster), por apresentar cadeia ramificada e grupamentos ésteres, ocorre uma maior interação entre as cadeias do polímero. Além disso, devido a uma reticulação maior nesta matriz, o coeficiente de intumescimento foi menor, pois as interações entre cadeias poliméricas foram maiores que as interações polímero/solvente.

No trabalho feito por Gopakuma e Nair (2005), foi utilizado copolímero de bloco formado por poliuretano e borracha natural para um estudo de difusão de solventes, onde foram utilizadas diferentes razões molares entre o poliol e o isocianato, variando assim a quantidade de segmentos rígidos no polímero. Neste estudo foi encontrado um maior grau de inchamento para o solvente Tetrahydrofurfural, que apresenta um parâmetro de solubilidade de $9,52 \text{ (cal.cm}^{-3}\text{)}^{1/2}$. Os solventes com maiores e menores valores do parâmetro de solubilidade da espuma, interagiram apenas com um dos segmentos dos poliméricos.

Os autores também relatam que com a diminuição da razão molar do isocianato com poliol, ocorre um aumento do grau de inchamento das matrizes devido à diminuição das ligações do tipo alofanato responsáveis também pela reticulação do polímero. Assim quanto maior o valor de Q para um solvente melhor será a interação entre os segmentos flexíveis (cadeias do poliol) e rígidos da matriz, levando a uma melhor difusão do solvente para dentro da matriz polimérica.

4.2.4. Absorção dos solventes pela matriz

Objetivando investigar as interações das espumas com os solventes utilizados na síntese de biodiesel, foi então levantado a quantidade massa/massa de solvente absorvida pela espuma (Figura 4.3). Os resultados referentes a esses ensaios encontram-se no Apêndice B.

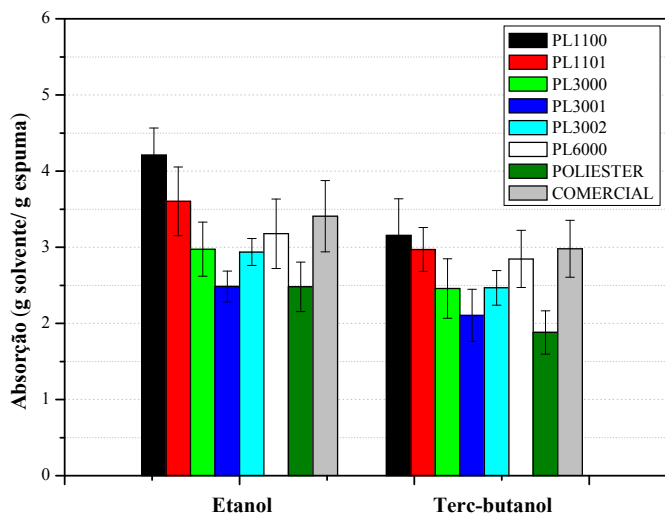


Figura 4.3. Gráfico de massa absorvida de solvente por massa espuma

As absorções dos solventes pelas espumas se apresentaram coerentes com os resultados obtidos nos ensaios do grau inchamento, nos quais a maior absorção foi para as espumas sintetizadas com Lupranol 1100, e a menor para a espuma de poliéster. Assim é possível verificar uma melhor interação das espumas PL1100 e PL1101 com os solventes utilizados na transesterificação.

4.2.5. Sorção de solventes

Para avaliar a penetração dos solventes, água, terc-butanol e etanol, através da matriz porosa, foi levantada a capacidade de sorção das espumas conforme procedimento descrito por Tanobe (2007).

Na análise de sorção dos solventes, todas as EPU's não apresentaram resistência à penetração para o terc-butanol e etanol, sendo que após o primeiro minuto, as amostras já se apresentavam completamente molhadas pelos solventes, não havendo grande variação no peso das espumas com o tempo. Todavia, quando foi utilizada água destilada, todas as espumas apresentaram resistência à penetração, como mostrado nas Figuras 4.4 e 4.5. Os resultados utilizados para a análise de sorção da água encontram-se no Apêndice C.

Foi possível verificar que entre os diferentes tipos de poliois, a espuma que obteve a menor resistência à difusão de água foi a espuma comercial e a que apresentou uma maior resistência foi a espuma de poliéster. Neste caso a difusão pode estar diretamente

associada com o póliol, à permeabilidade ao ar e ao diâmetro de poro. A espuma comercial apresentou a menor resistência entre as espumas testadas, este fato por ser explicado devido ao poliol utilizado na síntese da espuma. Estima-se que esse contém uma maior quantidade de óxido de etileno, uma vez que segundo a literatura, quanto maior a porcentagem de óxido de etileno, mais pronunciado fica o caráter hidrofílico da espuma (THOMSON, 2005). Embora a espuma PL1100 tenha apresentado diâmetro de poro semelhante ao da comercial, foi observada maior resistência a difusão dessa espuma. Esse comportamento pode estar relacionado com sua formulação na qual foi utilizado um poliol formado por apenas óxido de propileno, que confere um caráter mais hidrofóbico à espuma, dificultando a penetração da água.

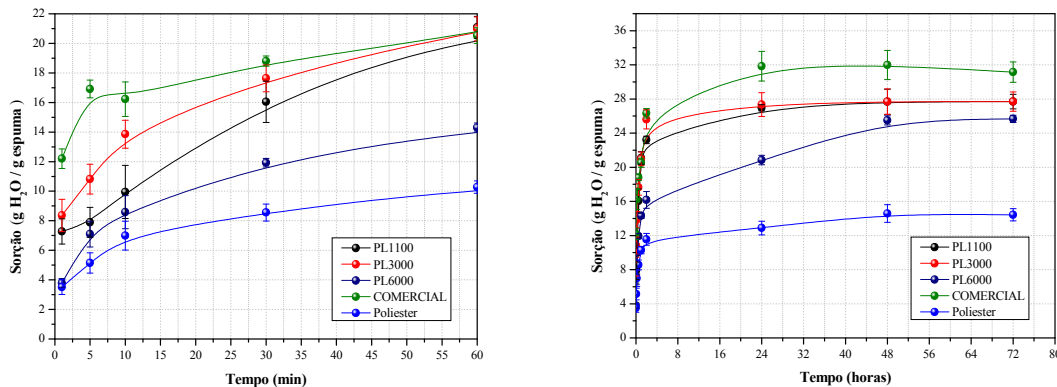


Figura 4.4. Gráfico de sorção de água pelas espumas PL1100, PL3000, PL6000, Comercial e a Poliester.

Por tratar-se de um ensaio estático, após 48 horas foi observado que a sorção chega a um equilíbrio e que provavelmente devido à menor permeabilidade e consecutivamente o maior número de poros fechados, a espuma de poliéster apresentou menor sorção. Já a espuma PL3000 por ter uma maior permeabilidade atingiu o equilíbrio em 24 horas, ao contrario da PL6000 que apresentou um comportamento linear somente após 48 horas. Já a formulação com o poliol poliéster, devido a grande quantidade de poros fechados a sua resistência é maior e a quantidade final de água adsorvida é menor.

O efeito do diâmetro de poros sobre a sorção de água foi investigado utilizando as formulações sintetizadas com os poliois Lupranol 1100 e Lupranol B50. Na figura 4.5, é possível observar que com o aumento do diâmetro de poros ocorre a diminuição da resistência à difusão e um aumento da sorção inicial. Porém, devido ao aumento do

diâmetro ocorre uma diminuição do número de poros, diminuindo assim a massa final da água que permanece na espuma por efeito capilaridade (BRAUN *et al.*, 2003; THOMSON, 2005; TANOBE,2007). Portanto, as espumas com diâmetros médio de poros maiores apresentam uma menor resistência ao fluxo e um comportamento de sorção mais linear.

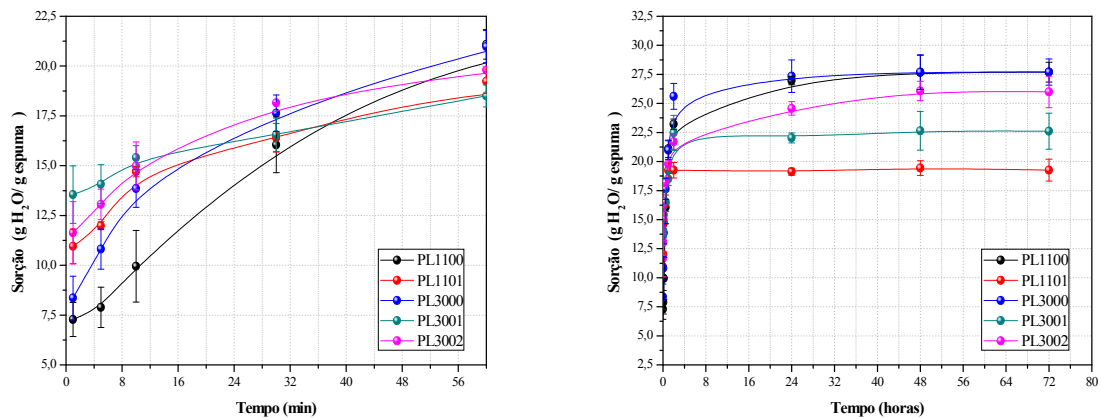


Figura 4.5. Gráfico de sorção de água pelas espumas PL1100, PL1101, PL3000, PL3001 e a PL3002.

Com os resultados apresentados neste ensaio foi possível observar que a espuma comercial apresentou um caráter mais hidrofílico entre as espumas testadas. Porém este comportamento de sorção de água apresentado pelas espumas são influenciados não apenas pela natureza do polioli e pelos parâmetros morfológicos das espumas, mas também pelas propriedades dos solventes utilizados, uma vez que a tensão superficial, a viscosidade e a polaridade do líquido influenciam nesta penetração (BRAUN *et al.*, 2003; THOMSON, 2005; TANOBE,2007).

Com a obtenção de matrizes poliméricas com grande área superficial, porosidade uniforme, boa estabilidade e sendo permeável a passagem de fluidos, todas as espumas formulações selecionadas para utilização como suporte para imobilização da biomassa.

4.3. Imobilização de células fúngicas nas EPU's

As espumas sintetizadas e a espuma comercial foram utilizadas como suporte para a imobilização do fungo filamentososo de *Mucor circinelloides*, sendo utilizado dois Erlenmeyers para cada tipo de espuma, contendo cerca de 100 ml de meio de cultura e 100

cubos de EPU em cada meio. Após 72 horas de cultivo a 30°C, as biomassas imobilizadas nas espumas foram lavadas e secadas conforme a metodologia (item 3.2.2).

Foram calculadas as atividades hidrolíticas dos biocatalisadores e a razão de imobilização, na qual é calculado pela razão entre a massa de biomassa seca adsorvida nas espumas e a massa de espuma utilizada ($M_{\text{micélio}}/M_{\text{espuma}}$) (Tabela 4.5). A formação do biofilme nas espumas foi analisada com auxílio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias são apresentadas na Figura 4.6.

Tabela 4.5. Valores das razões entre a massa seca de micélio adsorvida pela massa de espuma utilizada e a atividade hidrolítica da biomassa imobilizada

Espuma	$M_{\text{micélio}}/M_{\text{espuma}}$ (g/g)	Atividade da biomassa imobilizada (U/g)
PL1100	2,34 ± 0,70	41,19 ± 9,47
PL1101	1,45 ± 0,19	32,16 ± 13,24
PL3000	1,68 ± 0,55	42,53 ± 8,15
PL3001	1,45 ± 0,34	37,85 ± 16,16
PL3002	1,65 ± 0,31	47,43 ± 5,67
PL6000	2,07 ± 0,19	52,03 ± 11,39
Poliéster	2,25 ± 0,57	38,43 ± 12,43
Comercial	3,32 ± 0,52	58,58 ± 11,14

A maior razão ($M_{\text{micélio}}/M_{\text{espuma}}$) foi observada para a espuma comercial seguida da espuma PL1100. Esse comportamento se deve ao fato de que o sucesso da imobilização celular depende das características morfológicas do microrganismo, tais como a natureza e a idade das células, das condições do meio de cultura e ainda das propriedades da matriz utilizada (ROSCHE *et al.*, 2009).

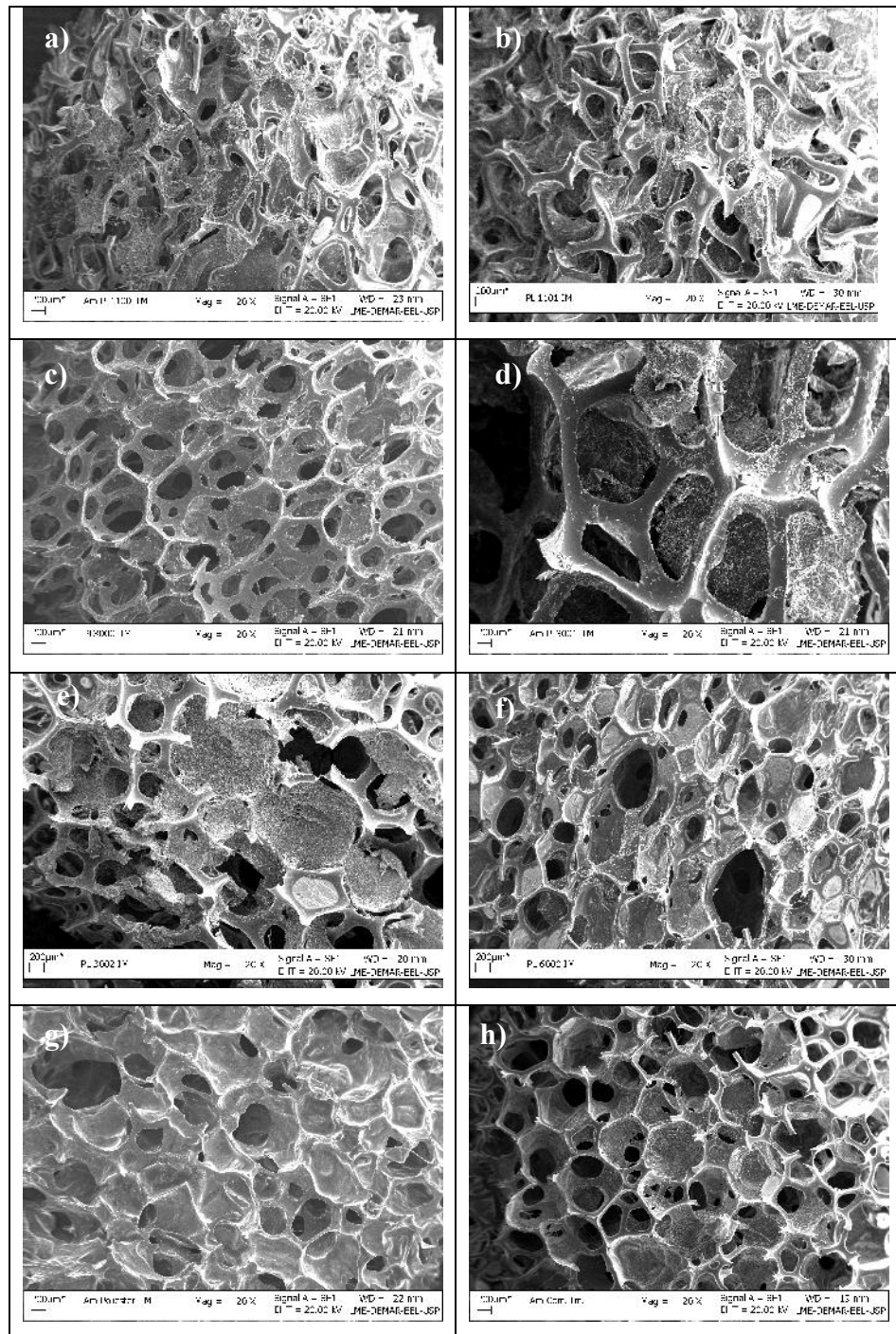


Figura 4.6. Micrografias das biomassa immobilizadas nas espumas sintetizadas (20x): a) PL1100; b) PL1101; c) PL3000; d) PL3001; e) PL3002; f) PL6000; g) Poliester; h) Comercial.

As matrizes devem apresentar um balanceamento entre o caráter hidrofílico e hidrofóbico para que se tenha uma boa biocompatibilidade. Como a imobilização natural está diretamente vinculada às interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre as células e a matriz, torna-se necessário que as espumas apresente este caráter, pois segundo Kilonzo,

Margaritis e Bergougnou (2011) na imobilização de leveduras, os esporos a uma distância superior a 50 nm da superfície, as forças de van der Waals são as únicas forças relevantes entre levedura e suporte; já a uma distância de 20 nm, as forças de van der Waals e de repulsão eletrostática começam a governar a adsorção celular sobre a superfície, uma vez que a superfície artificial da EPU e a superfície das células apresentam cargas negativas em condições fisiológicas comuns.

Já o caráter hidrofílico, assim como a sorção, influenciam na adsorção do micro-organismo e no crescimento do biofilme devido principalmente à difusão dos substratos até as células que se encontram dentro da matriz. Uma vez que o meio de cultura é essencialmente aquoso, certo caráter hidrofílico facilitará a sorção e a transferência de massa para dentro da espuma, mantendo um gradiente menor de concentração dos substratos necessários ao crescimento celular, entre o interior e a superfície da matriz (ROSCHE *et al.*, 2009; KILONZO; MARGARITIS; BERGOUGBOU, 2011).

Nas figuras 4.3 e 4.4 é possível verificar que em 72 horas as espumas já estavam em equilíbrio, não ocorrendo mais difusão da água para dentro da matriz. Como a espuma comercial apresentou uma melhor sorção da água e uma boa permeabilidade ao ar, é de se esperar uma maior adsorção das células nesta matriz, pois esta apresentou, em princípio, um caráter hidrofílico mais acentuado que o das outras espumas. Por outro lado, a espuma PL1100 apresentou alta razão de imobilização. Esse resultado pode estar ligado ao caráter mais hidrofóbico do poliol utilizado, aumentando a interação entre célula e superfície, como é possível observar na micrografia “a” da Figura 4.6, na qual é possível observar uma deformação da matriz, sugerindo indícios de uma forte interação com as células, contribuindo para uma maior proteção contra as forças cisalhantes.

Entre as espumas PL3000, PL3001 e PL3002 foi observado que, com o aumento do diâmetro médio de poros ocorre uma redução na adsorção celular, apesar do aumento do espaço de crescimento. Isto pode ser atribuído ao fato da maior permeabilidade da espuma, fazendo com que a força cisalhante do meio de cultura atue mais nas células em crescimento, ocorrendo um arraste. O mesmo é observado nas espumas PL1100 e PL1101, sendo que a espuma PL1101 apresentou a menor razão de imobilização entre as espumas testadas.

Yang *et al.* (2004) reportam o efeito do diâmetro médio da espuma e do tipo de leito utilizado na fixação de biomassa e na degradação anaeróbica de compostos orgânicos. Os autores observaram que numa espuma de diâmetro médio de poros maior a fixação da biomassa foi menor e conseqüentemente o rendimento foi menor na produção de biogás,

parâmetro utilizado para avaliar o desempenho das biomassas imobilizadas. Além disso, para um reator de leito fluidizado houve um menor rendimento de imobilização e de produção de metano quando comparado com o reator de leito fixo.

Nesse trabalho a quantidade de biomassa presente na matriz utilizada não se mostrou diretamente relacionada com a atividade hidrolítica do catalisador como é possível observar na Figura 4.7, na qual as células de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espumas de poliuretano apresentaram uma atividade hidrolítica diversificada, independente da quantidade de biomassa, levando a crer que a espuma esteja influenciando na medição da atividade de hidrólise da biomassa.

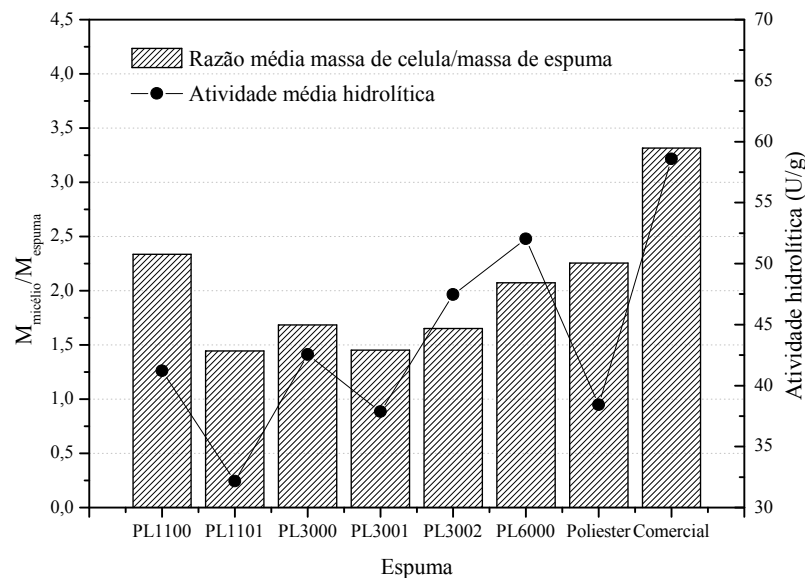


Figura 4.7. Razão de imobilização média e atividade hidrolítica média das biomassas imobilizadas.

Observar-se que, apesar de apresentarem alta razão de imobilização, as atividades hidrolíticas das biomassas imobilizadas nas espumas PL1100 e de Poliéster, não apresentaram uma alta atividade hidrolítica. Já nas espumas do grupo 3000, é possível observar uma variação da atividade em relação ao diâmetro médio de poros, sendo que esta variação pode estar relacionada com a sorção de H_2O . Verifica-se um comportamento mais linear para a espuma PL3002, quando comparado com a PL3000, que apresentam razões de imobilização próximas. Por sua vez, a espuma PL3001, que apresentou o maior diâmetro médio, obteve uma menor atividade hidrolítica, causado provavelmente pela maior dimensão dos micélios adsorvidos e menos dispersos dentro da matriz.

Esta variação das atividades pode ainda ser explicada pela dificuldade de transferência de massa entre os substratos utilizados na medida da atividade de hidrólise, proporcionada pelas propriedades da matriz, como é o caso da espuma de poliéster por apresentar uma baixa permeabilidade e baixa sorção de água e ainda pela deformação ocasionada pelo fungo e ao caráter hidrofílico mais acentuado das espumas PL1100 e PL1101. Destaca-se ainda o fato de que fungos filamentosos apresentam algumas características peculiares que influenciam diretamente no desempenho do processo fermentativo.

Assim, as mudanças na diferenciação celular causadas pelas dificuldades de transferência de massa, calor e nutrientes, podem levar a mudanças também nas transições das fases de metabolismo primário e secundário, modificando todo o comportamento da cinética de produção de enzimas e outros metabólitos pelo microrganismo (PAPAGIANNI, 2004, DE ORY et al., 2006; COVIZZI, 2007; LIN; SCHOLZ; KRULL, 2010).

4.4. Etanolise do óleo de babaçu

Com os teores de umidade inferiores a 10%, para evitar a reversibilidade, as células fúngicas imobilizadas foram colocados no meio reacional, contendo uma razão molar de 1:6 de óleo de babaçu e etanol e uma razão de 1,5/1 em volume de terc-butanol por volume de meio reacional e cerca de 20% em massa de biocatalisador. A reação foi acompanhada medindo a porcentagem massa/massa formada de cada éster etílico através da cromatografia gasosa, durante o período 120 horas. Estes resultados encontram-se no Apêndice D.

Com o intuito de avaliar a influência da massa molecular do poliol utilizado na síntese das espumas sobre o rendimento de esterificação, foram comparados os resultados da transesterificação entre as biomassas imobilizadas nas espumas PL1100, PL3000, PL6000 e a Comercial servindo como referencia. Pela Figura 4.8 é possível verificar que os biocatalisadores converteram todos os ácidos graxos presentes no óleo de babaçu nos seus respectivos ésteres de etila.

Através do gráfico é possível analisar que, após 120 horas, a massa molecular de poliol utilizado na síntese das espumas não apresentou forte influencia no rendimento final de esterificação, embora os comportamentos durante a síntese tenham sido diferentes.

Nas primeiras 24 horas, a biomassa imobilizada na espuma PL6000 apresentou maior conversão, cerca de 0,51g de ésteres de etila/grama de meio, que equivale a um

rendimento de 62,49%. A biomassa imobilizada na espuma PL3000 apresentou menor conversão, com cerca de 0,37g de ésteres/grama de meio, equivalendo a um rendimento de 46,28%. Esta diferença pode ser explicada pela menor permeabilidade da PL6000, ocasionando maior concentração de células na superfície externa da espuma, fazendo com que as enzimas intracelulares fiquem mais expostas ao substrato. Ao contrário da espuma PL3000 que apresentou boa permeabilidade, a massa fúngica encontrou-se mais difundida (Figura 4.5c), porém com menor razão de imobilização. Os rendimentos finais estão apresentados na Tabela 4.6 e comprovados com as faixas de viscosidade cinemática,

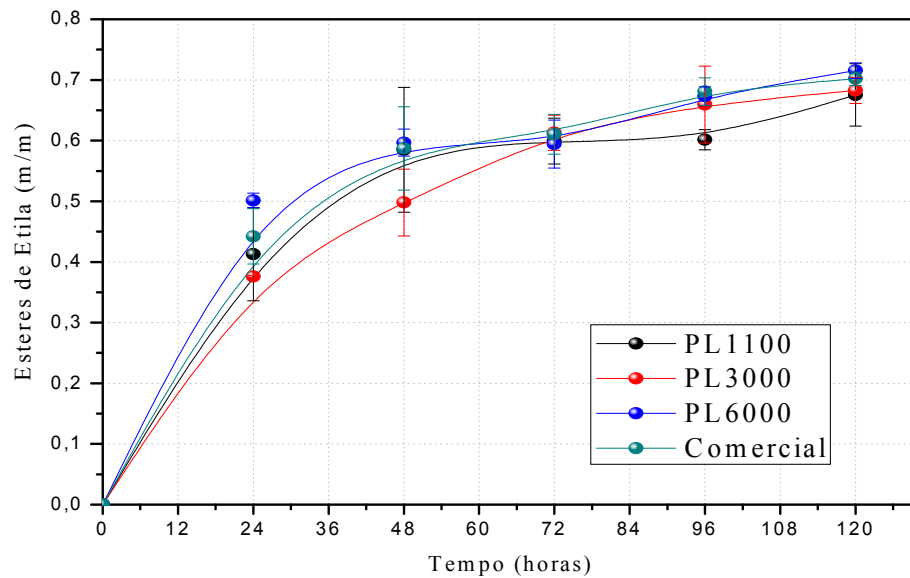


Figura 4.8. Comparação dos perfis de formação dos ésteres de etila totais em função do tempo para as biomassas imobilizadas nas espumas PL1100, PL3000, PL6000 e Comercial.

Tabela 4.6. Valores de rendimento médio de transesterificação do óleo de babaçu, e as viscosidade dinâmica, densidade e viscosidade cinemática dos biodiesel catalisados pelas biomassas imobilizadas nas espumas PL1100, PL3000, PL6000 e Comercial.

Espuma	Rendimento	Viscosidade dinâmica (cP)	Densidade (Kg/m ³)	Viscosidade cinemática (cSt)
	médio de transesterificação (%)			
PL1100	83,12 ± 6,31	3,89 - 6,40	0,8766 - 0,8906	4,37 – 7,18
PL3000	84,06 ± 2,65	4,84 – 5,07	0,8849 - 0,8872	5,47 – 5,71
PL6000	87,27 ± 1,10	4,47 – 4,93	0,8835 - 0,8850	5,06 – 5,57
Comercial	86,19 ± 1,83	4,68 – 4,86	0,8841- 0,8889	5,29 - 5,40

Com o intuito de analisar o efeito do diâmetro de poros sobre a biocatálise foram comparados os perfis de formação dos ésteres de etila mediados pelas biomassas imobilizadas nas espumas PL3000, PL3001 e PL3002 (Figura 4.9) e nas espumas PL1100 e PL1101(Figura 4.10).

Na figura 4.9 é comparado os perfis das reações catalisadas com biomassas imobilizadas em espumas sintetizadas com o póliol Lupranol B50. É possível verificar que com o aumento do diâmetro de poros, uma diferenciação nos rendimentos e no comportamento das reações é observado. Com o aumento do diâmetro de poro ocorreu um aumento na conversão do ésteres no período de 24 horas, isto é, a PL3001 apresentou um rendimento de 57,71% contra 51,69% da PL3000. Este comportamento pode ser explicado pela maior exposição das células ao substrato quando utilizado poros de maiores dimensões.

Por outro lado, com o aumento do diâmetro médio de poros ocorreu um comprometimento dos rendimentos finais, sugerindo uma relação com o tamanho dos micélios adsorvidos no interior da espuma, pois há mais espaço para a biomassa crescer aumentando o tamanho do micélio e conseqüente diminuição da área superficial de contato das células com os substratos. Os resultados dos rendimentos de transesterificação, viscosidades e densidades estão apresentados na Tabela 4.7.

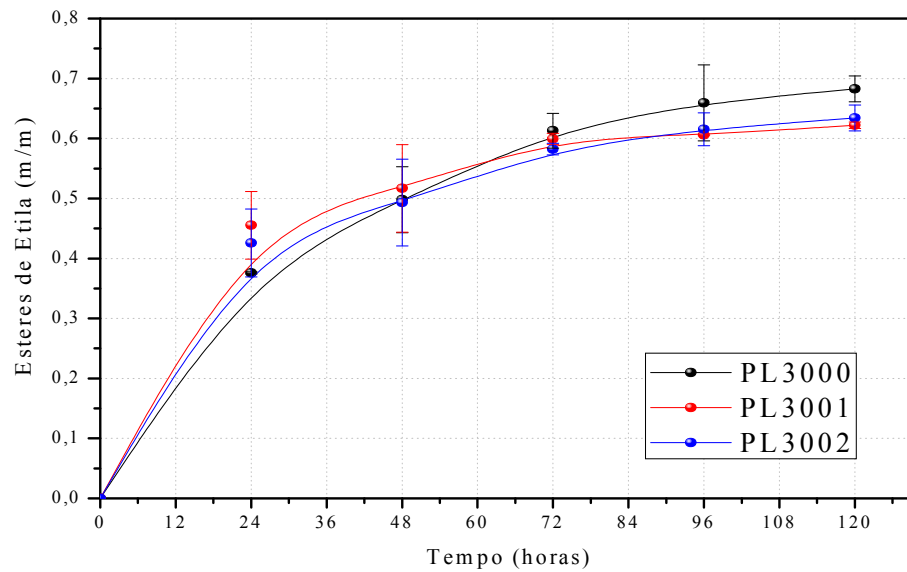


Figura 4.9. Comparação dos perfis de formação dos ésteres de etila totais em função do tempo para as biomassas imobilizadas nas espumas PL3000, PL3001, PL3002.

Tabela 4.7. Valores de rendimento médio de transesterificação do óleo de babaçu, e as viscosidade dinâmica, densidade e viscosidade cinemática dos biodieseis catalisados pelas biomassas imobilizadas nas espumas PL3000, PL3001, PL3002.

Espuma	Rendimento		Densidade (g/cm ³)	Viscosidade cinemática (cSt)
	médio de transesterificação (%)	Viscosidade dinâmica (cP)		
PL3000	84,06 ± 2,65	4,84 – 5,07	0,8849 - 0,8872	5,47 – 5,71
PL3001	77,29 ± 0,35	5,27 – 6,44	0,8852 - 0,8906	5,95 – 7,23
PL3002	80,13 ± 4,37	5,27 – 5,46	0,8855 - 0,8861	5,95 – 6,16

Nas espumas PL1100 e 1101 (Figura 4.10) esse comportamento não foi observado. Esta característica pode ser atribuído à alta absorção do etanol e terc-butanol pelas matrizes facilitando o contato das células com os substratos, e ainda pelo fato da espuma PL1101 apresentar quantidade inferior de células imobilizadas, diminuindo o rendimento de

transesterificação. Os resultados dos rendimentos de transesterificação, viscosidades e densidades estão apresentados na Tabela 4.8.

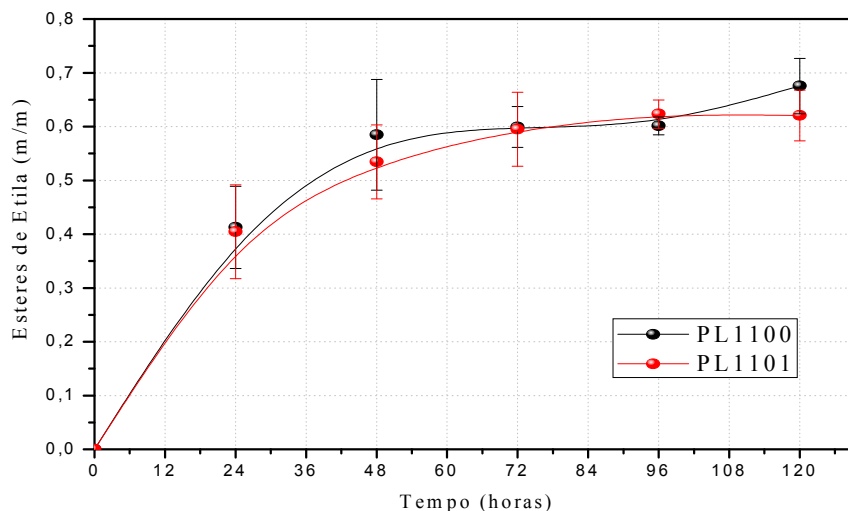


Figura 4.10. Comparação dos perfis de formação dos ésteres de etila totais em função do tempo para as biomassas imobilizadas nas espumas PL1100 e PL1101.

Tabela 4.8. Valores de rendimento médio de transesterificação do óleo de babaçu, e as viscosidade dinâmica, densidade e viscosidade cinemática dos biodiesel catalisados pelas biomassas imobilizadas nas espumas PL1100 e PL1101.

Espuma	Rendimento		Densidade (g/cm ³)	Viscosidade cinemática (cSt)
	médio de transesterificação (%)	Viscosidade dinâmica (cP)		
PL1100	83,12 ± 6,31	3,89 - 6,40	0,8766 - 0,8906	4,37 – 7,18
PL1101	79,46 ± 1,44	5,17 – 5,66	0,8864 - 0,8871	5,83 – 6,38

Na Figura 4.11 é comparada a conversão dos ésteres de etila entre a espuma comercial e a espuma poliéster. Neste caso é possível verificar que a utilização do polioli poliéster na síntese de EPU interferiu na formação das lipases intracelulares no micro-organismo após imobilização, uma vez que mesmo com a alta quantidade de célula imobilizada nesta matriz, a biomassa apresentou baixa atividade hidrolítica e baixa conversão dos ésteres, sendo entre as espumas testadas a que obteve o menor rendimento

de transesterificação, cerca de 60%. Os resultados obtidos nas transesterificações, após a purificação do biodiesel, estão na Tabela 4.9.

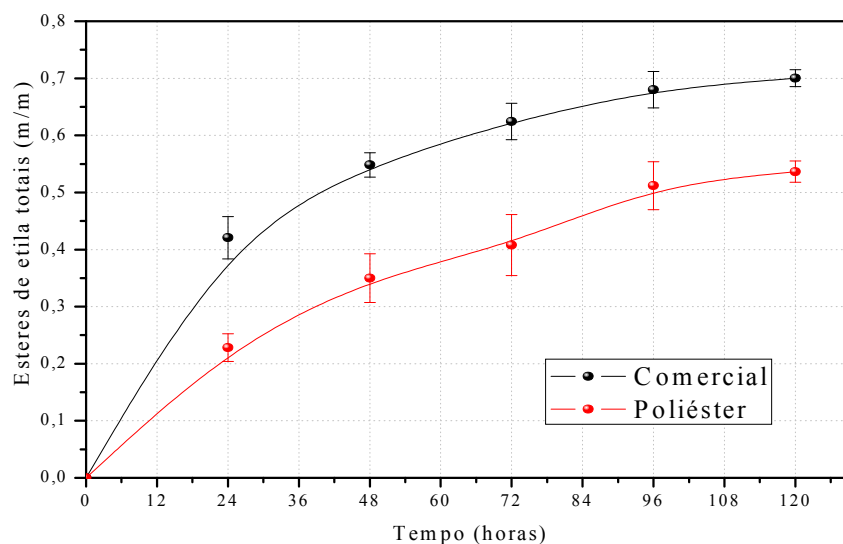


Figura 4.11. Comparação dos perfis de formação dos ésteres de etila totais em função do tempo para as biomassas imobilizadas nas espumas Poliéster e Comercial.

Tabela 4.9. Valores de rendimento médio de transesterificação do óleo de babaçu, e as viscosidade dinâmica, densidade e viscosidade cinemática dos biodiesel catalisados pelas biomassas imobilizadas nas espumas Poliéster e Comercial.

Espuma	Rendimento		Densidade (g/cm ³)	Viscosidade cinemática (cSt)
	médio de transesterificação (%)	Viscosidade dinâmica (cP)		
Poliéster	64,40 ± 2,31	9,48 – 9,67	0,8879 - 0,8945	10,67 – 10,18
Comercial	86,19 ± 1,83	4,68 – 4,86	0,8841- 0,8889	5,29 - 5,40

Os rendimentos apresentados pelas biomassas imobilizadas nas espumas de poliuretano ficaram dentro das faixas de resultados apresentados por outros autores e assim devido aos resultados apresentados pelas biomassas imobilizadas nas espumas PL1100, PL3000, PL6000 e a Comercial, esses biocatalisadores foram empregados em reações de bateladas consecutivas de etanolise do óleo de babaçu em meio com solvente, para a avaliação das estabilidades dos biocatalisadores. Foram acompanhados os rendimentos de

transesterificação, atividade hidrolítica e as porcentagens de perda de massa em cada reutilização e realizado um comparativo.

4.5. Reações de bateladas consecutivas

Após 120 horas, as biomassas foram separadas do meio reacional, com auxílio de uma tela de aço, lavadas com terc-butanol em filtração a vácuo. A umidade das biomassas foi controlada para manter-se em torno de 10% para então serem reutilizadas em uma nova batelada.

Para todas as biomassas imobilizadas foi possível a reutilização em até três bateladas consecutivas, com perda de atividade hidrolítica da ordem de 50% da atividade inicial após a última batelada. Devido a esta perda acentuada da atividade hidrolítica, os ciclos foram encerrados. Todos os dados referentes as reações de bateladas consecutivas estão no Apêndice E.

Na Figura 4.12 é possível observar que não houve perda significativa na atividade hidrolítica da biomassa imobilizada na espuma PL1100 até o terceiro ciclo, o mesmo ocorre para o rendimento, tendo cerca de 79% de rendimento, caindo para um rendimento de 67% na terceira batelada. Este fato está relacionado com a perda de massa ocorrida em cada ciclo e com a perda de enzima para o meio (DU; LIU; YAO, 2008). Após o primeiro ciclo, ocorreu uma perda de massa de 21,04%, após segundo ciclo a perda de massa foi de 8,89% e após o terceiro ciclo a perda foi de 28,76%.

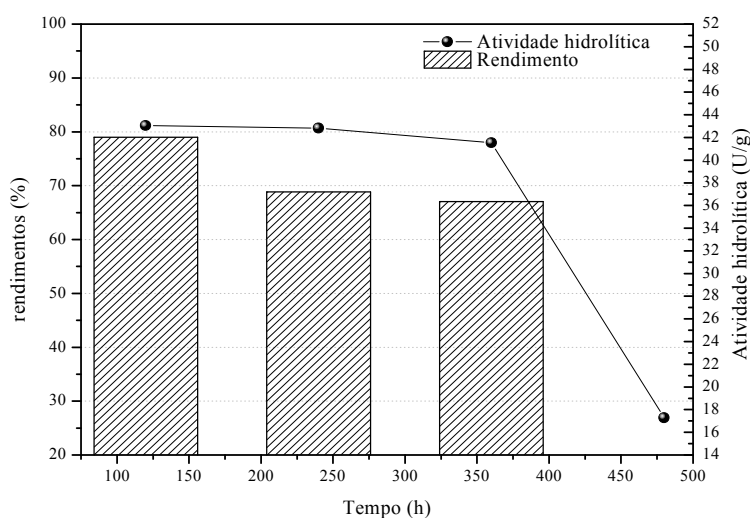


Figura 4.12. Gráfico dos rendimentos e das atividades em cada ciclo, para a biomassa imobilizada na espuma PL1100.

Na biomassa imobilizada na espuma PL3000 (figura 4.13), a atividade hidrolítica sofre uma perda mais acentuada a cada ciclo, atingindo 50% da atividade inicial após o terceiro ciclo. Porém os rendimentos de transesterificação não sofreram perda muito acentuada quanto à perda da atividade hidrolítica, no qual apresentou um rendimento inicial de 84% e caiu para 65% no terceiro ciclo. A perda de massa após o primeiro ciclo foi de 22,38%, após segundo ciclo foi de 32,30% e após terceiro ciclo a perda foi de 30,08%.

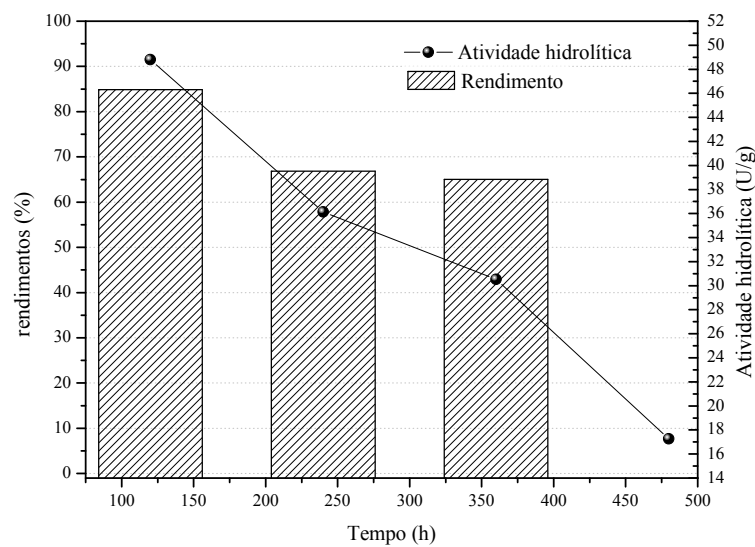


Figura 4.13. Gráfico dos rendimentos e das atividades hidrolítica em cada ciclo, para a biomassa imobilizada na espuma PL3000

Na biomassa imobilizada na espuma PL6000 é possível observar na Figura 5.14, que não ocorreu o mesmo comportamento dos outros sistemas com relação a perda de atividade e rendimento. Após o primeiro ciclo, com um rendimento de 84,90%, ocorreu uma perda de massa de 41,10%, no segundo ciclo após o uso houve uma perda de massa de 13,18% apresentando um rendimento de 50,95%, e após o terceiro ciclo a perda foi de 7,25% e o rendimento ficou em 60%. Este comportamento pode estar relacionado com a estrutura mais fechada desta matriz (permeabilidade ao ar) e ao diâmetro médio menor, contribuindo assim, para uma maior imobilização de células na superfície externa da espuma e uma maior área de contato das células, ocorrendo assim um desprendimento maior das enzimas e das células por estarem mais expostas ao solvente, e após o segundo ciclo as células sem atividades são retiradas devido a sucessivas lavagens, facilitando a difusão dos substratos até as células ainda ativas.

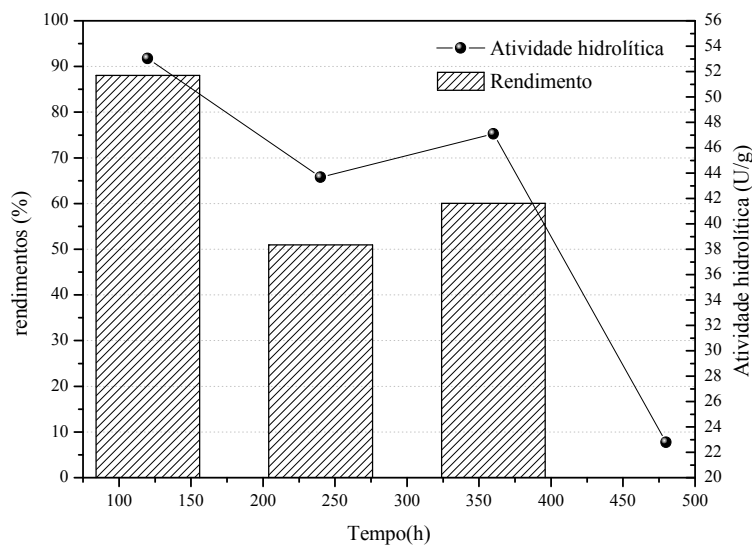


Figura 4.14. Gráfico dos rendimentos e das atividades hidrolítica em cada ciclo, para a biomassa imobilizada na espuma PL6000

Na Figura 4.15 é possível verificar o mesmo comportamento nas bateladas consecutivas para a biomassa imobilizada na espuma comercial. Nesta matriz após o primeiro ciclo ocorre uma perda de massa de 49,54%, após o segundo ciclo a perda é de 27,62% e no final a perda foi de 15,88%. O rendimento da etanolise do óleo de babaçu iniciou com 86,79%, caindo para 64,23% para a segunda batelada e na terceira batelada foi obtido um rendimento de 57,71%. A queda da atividade e do rendimento pode ser explicada pela perda de células e lipase para o meio reacional e uma possível desnaturação delas.

Essa perda da atividade após o terceiro ciclo não ocorre no estudo realizado por Antczak et al. (2002) utilizando cepas de *M. circinelloides* como biocatalisadores em reações de esterificação, onde é relatada a alta estabilidade após vários ciclos. Esta perda da atividade pode estar ligada à perda de massa e às sucessivas lavagens após cada ciclo, além de uma possível alteração do teor de água dos solventes utilizados na lavagem, provocando um arraste das lipases.

Du, Liu e Yao (2008) estudaram a influência do glicerol, dos ésteres metílicos e do solvente terc-butanol sobre a atividade enzimática da lipase intracelular encontrada no fungo *Rhizopus orizae*. Segundo autores foram realizados seis ciclos com o sistema com solvente, contra dois ciclos do sistema sem solvente. Neste estudo foi verificado que o solvente auxiliava na retirada do acúmulo de glicerol sobre as células fúngicas, e que em

ambos os sistemas ocorreram uma perda de lipase intracelular para o meio reacional e que os ésteres metílicos acumulados também influenciavam na perda da atividade enzimática, sendo atribuído às mudanças ocorridas na estrutura secundária da lipase (SUN; DU; LIU, 2011).

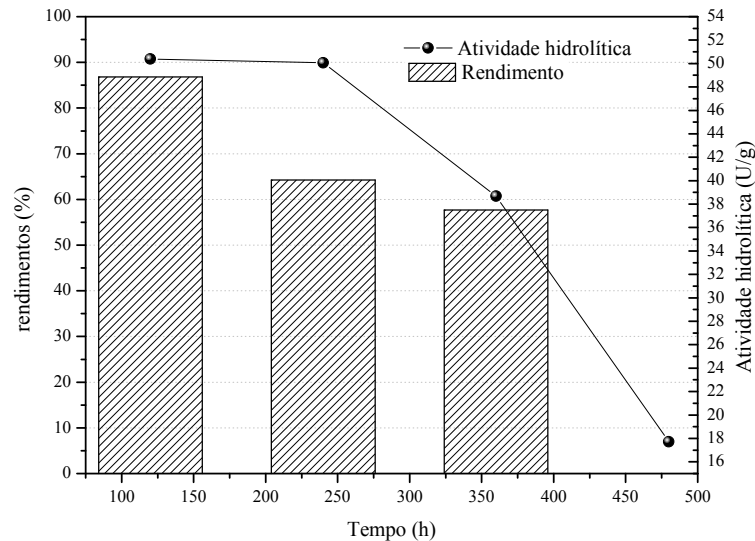


Figura 4.15 – Gráfico dos rendimentos e das atividades hidrolítica em cada ciclo, para a biomassa imobilizada na espuma Comercial.

Todas as biomassas imobilizadas em espuma de poliuretano apresentaram perda de massa significativa para o meio reacional, sendo esta uma característica intrínseca da imobilização celular. Ressalta-se que essa perda foi diferente para cada tipo de espuma. A PL1100 apresentou uma menor perda de massa para cada ciclo. Este fato pode ser atribuído ao maior caráter hidrofóbico da matriz e a deformação ocasionada após a imobilização, contribuindo para uma maior estabilidade apresentada por esta biomassa.

Para as biomassas imobilizadas nas espumas PL6000 e comercial, ocorreu uma perda significativa logo após o primeiro ciclo, com conseqüente abaixamento do rendimento no segundo ciclo. Na espuma PL3000 a estabilidade ficou mais comprometida devido à menor razão de imobilização e a alta permeabilidade da espuma fazendo com que as células ficassem mais expostas ao meio reacional, contribuindo para o declínio acentuado da atividade hidrolítica.

A maneira mais utilizada para aumentar a estabilidade das células absorvidas é a utilização de agentes reticulantes como o glutaraldeído. Sun et al. (2010) estudaram sistematicamente o efeito estabilizante do glutaraldeído sobre células de *Rhizopus orizae*,

utilizado da transesterificação do óleo de soja como metanol. Realizando a reação com diversas razões molares entre os substratos e com cerca de 5% em peso de biomassa imobilizada em relação ao peso do óleo, eles relatam que houve um aumento da estabilidade das células tratadas com o agente reticulante e uma maior tolerância ao metanol, sendo este fato atribuído a menor perda de lipase para o meio reacional promovido pela adição do glutaraldeído. O mesmo foi observado por Antczak et al. (2004) para micélios de *M. circinelloides* após tratamento com glutaraldeído.

Com o objetivo de realizar uma comparação entre as espumas testadas, calculou-se as atividades residuais hidrolíticas (Figura 4.16) e de transesterificação (Figura 4.17), considerando a atividade hidrolítica inicial e o rendimento de transesterificação inicial como sendo 100%.

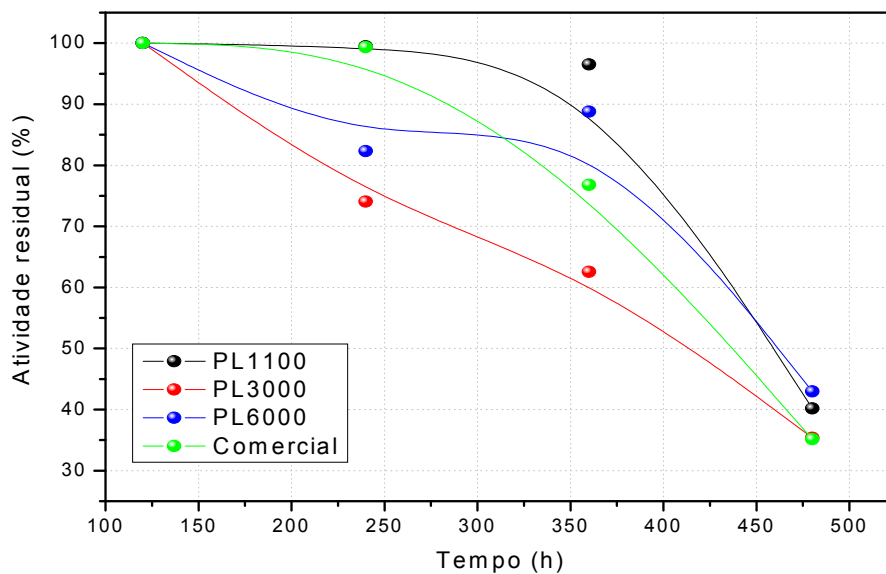


Figura 4.16. Atividade hidrolítica residual das espumas PL1100, PL3000, PL6000 e Comercial

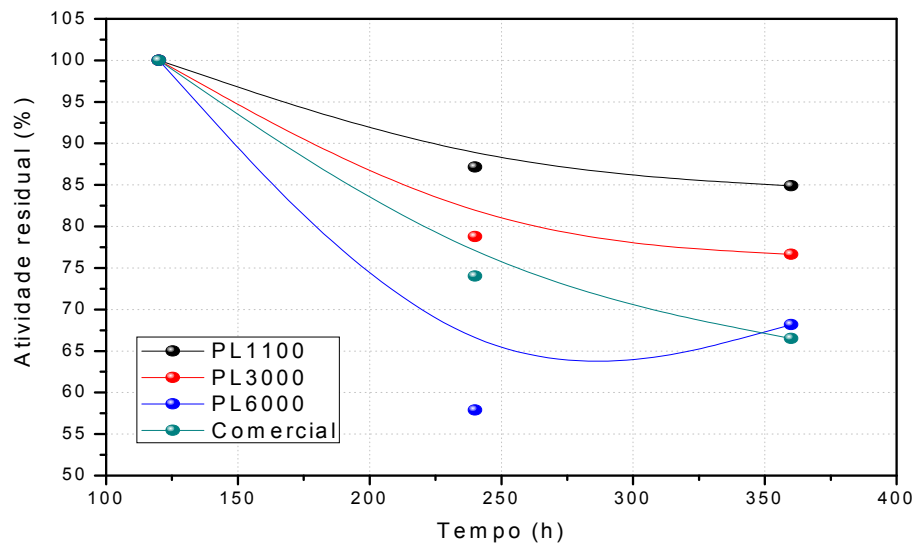


Figura 4.17. Atividade de transesterificação residual das espumas PL1100, PL3000, PL6000 e Comercial

Pela análise dos gráficos é possível verificar que a espuma PL1100 apresentou a melhor estabilidade operacional, enquanto que, apesar da biomassa imobilizada na espuma PL6000 apresentar um alto rendimento inicial de etanolise, não manteve os altos rendimentos durante as bateladas consecutivas. Esse mesmo comportamento foi verificado na espuma de referencia (comercial). Este fato, como já discutido, está relacionado com a baixa perda de biomassa apresentada pela espuma PL1100 e ainda devido a boa interação da espuma com os solventes (a alta absorção de solvente pela matriz) fazendo com que nem todo o etanol fique em contato com as células, preservando a camada hidratante necessária para a atuação da lipase.

5. CONCLUSÕES

O principal objetivo deste trabalho foi sintetizar espumas flexíveis de poliuretano para imobilização de células íntegras com elevada atividade lipolítica para catalisar reações de transesterificação de óleo de babaçu e etanol. Foram avaliadas algumas características das espumas que afetam a imobilização de células fúngicas de *Mucor circinelloides*, tanto no aspecto de crescimento do biofilme como na formação da lipase intracelular. O desempenho da biomassa imobilizada foi verificado na transesterificação do óleo de babaçu com etanol em meio contendo terc-butanol como solvente.

Os resultados apresentados permitem concluir que:

1. Entre as características da espuma que influenciaram a imobilização e a atividade do biocatalisador destacam-se: o diâmetro de poros, que quanto menor melhor a dispersão do biofilme na matriz porosa; a permeabilização e a sorção à água, sendo estas responsáveis pela boa difusão dos nutrientes necessários ao crescimento celular e a produção de enzimas intracelulares; o caráter hidrofílico e hidrofóbico da matriz, fazendo com que a matriz apresente uma melhor fixação do micro-organismo e uma maior compatibilidade com o meio reacional e de cultura, auxiliando na transferência de massa dos nutrientes e substratos; e por fim o tipo de polioli, pois foi verificado que a utilização do polioli poliéster na síntese de uma EPU prejudicou a formação das lipases intracelulares pela biomassa imobilizada.
2. Dentre os fatores que levam ao controle de tamanho de poros numa espuma de poliuretano pôde-se destacar a agitação do meio reacional como sendo um fator de ajuste para o controle da dimensão dos poros da espuma, sendo responsável pela nucleação de microbolhas na massa polimérica influenciando no diâmetro de poros formados;
3. Dentre as espumas sintetizadas utilizadas como suporte para imobilização de células de *M. circinelloides* 4186, as espumas com menores diâmetros médios de poros apresentaram melhores rendimentos na etanólise, com destaque para as formulações PL6000, devido ao alto rendimento na etanólise e PL1100 pela alta estabilidade operacional.
4. As análises de viscosidade das amostras de biodiesel purificado confirmaram os rendimentos satisfatórios obtidos com os biocatalisadores, mostrando que as espumas flexíveis de poliuretano podem ser matrizes promissoras para imobilização de células integras de alta atividade lipolítica.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade e complementar os estudos de síntese de espumas de poliuretanos com fins de imobilização de células de alta atividade lipolítica:

- Utilizar outros agentes de expansão que não formem uréia na síntese de espumas de poliuretano, com o intuito de avaliar as possíveis influências das poliuréias no caráter hidrofóbico da espuma e na fixação do micro-organismo.
- Avaliar o desempenho de poliois para sintetizar espumas com alto caráter hidrofílico para a imobilização de células com alta atividade lipolítica.
- Utilizar as espumas que se destacaram neste trabalho para serem empregadas em reatores contínuos de leito fixo e ainda avaliar o desempenho na imobilização de outras cepas fúngicas.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, O. B. G.; ARRIAGA, S.; BARRIOS, V. A. E.; FLORES, S. C.; CAMARILLO, A. A. Performance of innovative PU-foam na natural fiber-base composites for the biofiltration of a mixture of volatile organic compounds by a fungal biofilm. **Journal of Hazardous Materials**, 2012. In press.
- ADACHI, D.; HAMA, S.; NUMATA, T.; NAKASHIMA, K.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Develolpment of an *Aspergillus niger* whole-cell biocatalyst coexpressing triglyceride and partial glyceride lipases for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6723-6729, 2011.
- 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.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standart test methods for flexible cellular materials – slab, bonded, and molded urethane foams**, ASTM D3574, 2011.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standart test methods for rubber property – effect of liquids**, ASTM D471, 2011.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standart test methods for sorbent performance of absorbents**, ASTM F712/26, 2011.
- ANEJA, A.; WILKES, G. L.; RIGHTOR, E. G. Study of slabstock flexible polyurethane foams based on varied toluene diisocyanate isomer ratios. **Journal of Polymer Science**, v.41, p. 258-268, 2003.
- ANTCZAK, M. S.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; BIELECKI, S. Catalytic properties of membrane-bound *Mucor* lipase immobilized in a hydrophilic carrier. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.19-20, p. 261-268, 2002.
- ANTCZAK, M. S.; ANTCZAK, T.; WASIAK, M. P.; RZYSKA, M.; BINKOWSKA, N.; BIELECKI, S. Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1214-1222, 2006.
- ANTCZAK, M. S.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; MODRZEJEWSKA, Z.; PATURA, J.; KALINOWSKA, H.; BIELECKI, S. Stabilization of an intracellular *Mucor circinelloides* lipase for application in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 29, p. 163-171, 2004.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Review: Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, n. 34, p. 1185-1194, 2009.
- BALAT, M. Potencial alternatives to edible iols for biodiesel production – A review of current work. **Energy Conversion an Management**, v. 52, p. 1479-1492, 2011.

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.

BAN, K.; HAMA, S.; NISHIZUKA, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 157-165, 2002.

BOWEN, H. J. M. Absorption by polyurethane foams; new method of separation, **J. Chem. Soc. A**, p. 1082 – 1085, 1970.

BRAUN, J.; KLEIN, M. O.; BERNARDING, J. LEITNER M. B.; MIKA H. D. Non-destructive, three-dimensional monitoring of water absorption in polyurethane foams using magnetic resonance imaging. **Polymer Testing**, v.22, p. 761-767, 2003.

CALVERT, K. L.; TRUMBLE, K. P.; WEBSTER, T. J.; KIRKPATRICK, L. A. Characterization of commercial rigid polyurethane foams used as bone analogs for implant testing. **J.Mater.Sci: Mater. Med.**, v. 21, p. 1453-1461, 2010.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores Imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 11, p. 48-57, 2006.

CAIRNEY, J.W.G. Basidiomycete mycelia in forest soils: dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution. **Mycological Research**, v. 109, p. 7-20, 2005.

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.

CORCUERA, M. A.; D'ARLAS, B. F.; ARBELAIZ, A.; MARIETA, C.; MONDRAGON, I.; ECEIZA, A. Microstructure and properties of polyurethanes derived from castor oil. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 2175-2184, 2010.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

COVIZZI, L. G. **Seleção de um suporte sintético para imobilização celular do *Botryosphaeria rhodina* e comparação da produção de lacase por células livres e imobilizadas**. 2007. 86p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciência Exatas (UNESP), São José do Rio Preto, 2007.

CRUZ, T. G.; PEREIRA, P. H. F.; SILVA, M. L. C. P.; CIOFFI, M. O. H.; VOORWALD, H. J. C. Quantitative microscopy characterization of hydrous niobium phosphate into bleached cellulose. **Micron**, v. 41, p. 402-411, 2010.

DA ROS, P. C. M., **Etanólise de óleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de micro-ondas**. 2009. 131 f Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena – EEL-USP, Lorena, 2009.

DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilidade. In: BON, E. P., FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia**: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro, Brasil: Interciência, 2008. Cap. 6. p. 123. ISBN 978-85-7193-189-3.

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 ORY, I.; ROMERO, L. E.; CANTERO, D. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter acet*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 547-555, 2004.

DE ORY, I.; CABRERA, G.; RAMIREZ, M.; BLANDINO, A. Immobilization of Cells on Polyurethane Foam. In: GUISAN, J. M. **Methods in Biotechnology**: Immobilization of Enzymes and Cells. 2nd ed. Totowa: Humana Press Inc, 2006.v. 22, p. 357-365.

DIAS, M.A.; LACERDA, I.C.A.; PIMENTEL, P.F.; DE CASTRO, H. F.; ROSA, C.A. Removal of heavy metals by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 1-5, 2001.

DO CARMO, F. R.; SOUSA Jr., P. M.; SANTIAGO-AGUIAR, R. S.; de SANT'ANA, H. B. Development of a new model for biodiesel viscosity prediction based on the principle of corresponding state. **Fuel**, v.92, p. 250-257, 2012

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.

EL-SHAHAWI. M. S.; HAMZA, A.; AL-SIBBAI, A. A.; AL-SAIDI, H. M. Fast na selective removal of trace concentrations of bismuth (III) from water onto procaine hydrochloride loaded polyurethane foams sorbent: Kinetics and thermodynamics of bismuth (III) study. **Chemical Engineering Journal**, v. 173, p. 29-35, 2011.

HERRINGTON, R., HOCK, K. **Dow polyurethanes flexible foams**, 2^a ed. Midland MI :Dow Chemical Publications. 1997.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**: A Textbook. 3rd ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft. 1997, Cap. 1, 2 e 3.

FAZAL, M. A.; HASEEB, A. S. M. A.; MASJUKI, H. H. Biodiesel feasibility study: An evaluation of material compatibility;performance; emission and engine durability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 1314-1324, 2011.

FERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 1298-1315, 2009

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

GOG, A.; ROMAN, M.; TOSA, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspective. **Renewable Energy**, v. 39, p.10-16, 2012.

GOPAKUMAR, S.; NAIR, M. R. G. Determination of molecular parameters of NR/PU block copolymers by transport studies. **Euro. Poly. Journal**, v.41, p.2002-2009, 2005.

HAKIM, A. A. A.; NASSAR, M.; EMAM, A.; MAHA, S. Preparation and characterization of rigid polyurethane foam prepared from sugar-cane bagasse polyol. *Materials Chemistry and Physics*, v. 129, p. 301-307, 2011.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; FUKUMIZU, T.; MIURA, K.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 328-333, 2006.

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.

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

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive reviews. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 786-798, 2009

HE, Q.; XU, Y.; TENG, Y.; WANG, D. Biodiesel production catalyzed by whole cell lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, p. 41-46, 2008.

HUANG, D.; HAN, S.; HAN, Z.; LIN, Y. Biodiesel production catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase displaying *Pichia pastoris* whole cell in an isooctane system. **Biochemical Engineering Journal**, In Press, 2011.

JANG, W. Y.; KRAYNIK, A. M.; KYRIAKIDES, S. On the microstructure of open-cell foams and its effect on elastic properties. **Internacional Journal of Solids and Structure**, v. 45, p.1845-1875, 2008.

JOSSET, S.; HAJIMESMAILI, S.; BEGIN, D.; EDOUARD, D.; PHAM-HUU, C.; LETT, M. C.; KELLER, N.; KELLER, V. UV-A photocatalytic treatment of *Legionella pneumophila* bacteria contaminated airflows through three-dimensional solid foam structured photocatalytic reactors, **Journal of Hazardous Materials**, v.175, p.371-381, 2010.

KAMPRAD, I.; GOSS, K. U. Systematic investigation of sorption properties of polyurethane foams for organic vapor. **Anal. Chem.**, v. 79, p. 4222-4227, 2007.

KAUSHIVA, B. D; MCCARTNEY, S. R.; ROSSMY, G. R.; WILKES, G. L. Surfactant level influences on structure and properties of flexible slabstock polyurethane foams. **Polymer**, v. 41, p. 285-310, 2000.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of Molecular Catalysis**, v.10, p.157-176, 2000.

KILONZO, P.; MARGARITIS, A.; BERGOUGNOU, M. Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3662-3672, 2011.

KLOSS, J. R. **Síntese e caracterização de poliuretanos biodegradáveis à base de poli(ϵ -caprolactona)diol**. 2007. 153 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências dos Materiais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

LAN, Q.; HAUGSTAD, G. Characterization of polymer morphology in polyurethane foams using atomic force microscopy. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, p. 2644-2651, 2011.

LEÓN, R.; FERNANDES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S. Whole-cell biocatalysis in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, p. 483-500, 1998.

LI, W.; DU, W.; LIU, D. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response 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. *Rhizopus oryzae* whole-cell-catalyzed biodiesel production from oleic acid in tert-butanol medium. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 155-158, 2008.

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.

LIU, X.; XU, K.; LIU, H.; CAI, H.; SU, J.; FU, Z.; GUO, Y.; CHEN, M. Preparation and properties of waterborne polyurethanes with natural dimer fatty acids based polyester polyol as soft segment. **Progress in Organic Coatings**, 2011. In press

LIN, J. P.; SCHOLZ, A.; KRULL, R. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 213-220, 2010.

LIN, YUN-HUIN; SZ-CHWUN, J. H.; WEN-CHANG, S.; KUO-CHENG CHEN. Development of a Novel Microorganism Immobilization Method Using Anionic Polyurethane. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, p. 738-743, 2006

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 32, p. 38-46, 2004.

MANIQUE, M. C.; FACCINI, C. S.; ONOREVOLI, B.; BENVENUTTI, E.V.; CAMARÃO, E. B. Rice husk saw as an adsorbent for purifying biodiesel from waste frying oil. **Fuel**, v. 92, p. 56-61, 2012

MATSUMURA, S.; SOEDA, Y.; TOSHIMA, K. Perspectives for synthesis and production of polyurethanes and related polymers by enzymes directed toward green and sustainable chemistry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 12-20, 2006.

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

MUKHOPADHYAY, R.; CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, B. P.; BANERJEE, P. C.; GUHA, A. K. Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 3, p. 299-303, 2005.

OCHIAI, B.; INOUE, S.; ENDO, T. One-pot non-isocyanate synthesis of polyurethanes from bisepoxide, carbon dioxide, and diamine. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 43, p. 6613 – 6618, 2005.

OH, Y.S.; MAENG, J.; KIM, J. Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. **Microbiology Biotechnology**, v. 54, pg 418 – 423, 2000.

PACHECO, M. F. M.; FIORIO, R.; ZATTERA, A. J.; ZENI, M.; CRESPO, J. S. Efeito da concentração de segmentos rígidos nas propriedades físico-mecânica, químicas e na morfologia de elastômeros microcelulares de poliuretano. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.17, p.234-239, 2007.

PALOMO, J. M.; SEGURA, R. L.; MATEO, C.; TERRENI, M.; GUISAN, J. M.; LAFUENTE, R. F. Synthesis of enantiomerically pure glycidol via a fully enantioselective lipase-catalyzed resolution. **Asymmetry**, v.16, p. 869-874, 2005.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolites production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advances**, n. 22, p. 189-259, 2004

PARAWIRA, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**; v. 29, p. 82–93, 2009.

PRIEGNITZ, B. E.; WARGENAU, A.; BRANDT, U.; ROHDE, M.; DIETRICH, S.; KWADE, A.; KRULL, R.; FLEIBNER, A. The role of initial spore adhesion en pellet an biofilm formation in *Aspergillus niger*. **Fungal Genetics and Biology**, 2011. In press

QIN ZHANG; LO, C.M.; JU, L.K., Cell immobilization with polyurethane foam for retaining *Trichoderma reesei* cells during foam fractionation for cellulase collection, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 156, p. 442-453, 2009.

ROBAINA, N. F.; SORIANO, S.; CASSELLA, R. J. Polyurethane foam loaded with SDS for the adsorption of cationic dyes from aqueous medium: Multivariate optimization of the loading process. **Journal of Hazardous Materials**, v.167, p.653-659, 2009.

ROGALSKI, J.; SZSZODRAK, J.; JANUSZ, G. Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 469-476, 2006.

ROKICKI, G.; PIOTROWSKA, A. A new route to polyurethanes from ethylene carbonate, diamines and diols. **Polymer**, v. 43, p.2927-2935, 2002.

ROSCHE, B.; LI, X. Z.; HAUER, B.; SCHMID, A.; BUEHLER, K. Microbial biofilms: A concept for industrial catalysis? **Trends in Biotechnology**, v.27, n. 11, p. 636-643, 2009.

RYU, H. W.; CHO, K. S.; CHUNG D. J. Relationships between biomass, pressure drop, and performance in polyurethane biofilter. **Bioresource Technology**, v.101, p.1745-1751, 2010.

SATO, L. M. **Planejamento estatístico de experimentos aplicado ao processo de produção de protetores auditivos de espuma de poliuretano**. 2002. 156 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química – UNICAMP, Campinas-SP, 2002.

SANTOS, E. M.; AGUIAR, M.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; ZAWADZKI, S. F.; AKCELRUD, L. Determinação do parâmetro de solubilidade de poliuretanos de PBLH. **Polímero: Ciência e Tecnologia**, v. 10, n. 2, p. 64-69, 2000.

SERVE, V. **Espumas Flexíveis de poliuretana à base de poliois de óleo de mamona etoxilado**. 2007. 120f . Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química – UNICAMP, Campinas-SP, 2007

SILVA, G. S.; BRUNO, L. M.; DE CASTRO, H. F. Seleção e imobilização de fungos filamentosos produtores de lipase intracelular. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS – SINAIFERM, 17., 2009a, Natal – RN. **Anais...**

SILVA, G. S.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Imobilização de fungos produtores de lipase intracelular em esponjas de poliuretano. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS - SHEB, 17., 2009b, Maringá-PR. **Anais...**, p. 131.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77/79, p. 745-757, 1999.

SONNENSCHNEIN, M.; WENDT, B. L.; SCHROCK, A. K.; SONNEY, JEAN-MARIE; RYAN, A. J. The relationship between polyurethane foam microstructure and foam aging. **Polymer**, v. 49, p. 934-942, 2008.

SUN, T.; DU, W.; LIU, D. Comparative study on stability of whole cell during biodiesel production in solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 661-664, 2011.

SUN, T.; DU, W.; LIU, D.; DAI, L. Improved catalytic performance of GA cross-linking treated *Rhizopus orizae* IFO 4697 whole cell for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1192-1195, 2010.

TAMALANPUDI, S.; TALUKDER, M. R.; 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 biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 185-189, 2008.

TAN, S.; ABRAHAM, T.; FERENC, D.; MACOSKO, C. W. Rigid polyurethane foams from a soybean oil-based polyol. **Polymer**, v. 52, p. 2840-2846, 2011.

TAN, K.; OBENDORF, K. Surface modification of microporous polyurethane membrane with poly(ethylene glycol) to develop novel membrane. **Memb. Sci. Journal**, v. 274, p. 150-158, 2006.

TANOBE, V. O. A. **Desenvolvimento de sorventes à base de espumas de poliuretanos flexíveis para o setor do petróleo**. 2007. 153 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências dos Materiais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

TINDEMANS, S.H.; KERN, N.; MULDER, B.M. The diffusive vesicle supply center model for tip growth in fungal hyphae. **Journal of Theoretical Biology**, v. 238, p. 937-948, 2006.

THOMSON, T. **Polyurethanes as Specialty Chemicals – Principles and Applications**, 1ª Ed. CRC Press, 2005.

URIESTE, D.; CASTRO, M. B. A.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método 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.

VILAR, W. D. **Química e tecnologia dos poliuretanos**, Vilar Consultoria Técnica, Disponível em: <<http://www.poliuretanos.com.br>> Acesso 10 dez. 2011.

VILLENA, G. K.; FUJIKAWA, T.; TSUYUMU, S.; CORREA, M. G. Structural analysis of biofilm and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. **Bioresource Technology**, v. 101, p.1920-1926, 2010.

WANG, X.; MIN, B. G. Comparison of porous poly(vinyl alcohol)/hidroxyapatite composite cryogels and cryogel immobilized on poly(vinyl alcohol) and polyurethane foams for removal of cadmium. **Harz. Mater. Journal**, v. 156, p. 381-386, 2008

WOODS, G. Flexible Polyurethane foams – Chemistry and Technology; **Applied Science Publishers**, London; p 93 – 313; 1982.

YILGOR, I.; YILGOR, E.; GULER, I. G.; WARD, T. C.; WILKES, G. L. FTIR investigation of influence of diisocyanate symmetry on the morphology development in model segmented polyurethanes. **Polymer**, v. 47, p. 4105-4114, 2006.

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**, 2012. In press.

ZECK, S. E. C. **Utilização de espumas uretânicas no tratamento de óleo mineral isolante contaminado com PCB.** (Dissertação de Mestrado), Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba 2004.

ZHANG, L.; JEON, H. K.; MALSAM, J.; HERRINGTON, R.; MACOSKO, C. Substituting soybean iol-based polioli into polyurethane flexible foams. **Polymer**, v. 48, p. 6656-6667, 2007.

APÊNDICE

Apêndice A.1 – Dados referentes aos ensaios de grau de inchamento das espumas PL1100, PL1101, PL3000, PL3001.

Solventes	Parâmetro de solubilidade (cal/cm ³) ^{1/2}	Coeficiente de inchamento (Q)			
		PL1100	PL1101	PL3000	PL3001
Hexano	7,3	0,24 ± 0,06	0,20 ± 0,04	0,25 ± 0,41	0,27 ± 0,06
Acetato de etila	9,05	2,52 ± 0,16	2,29 ± 0,10	2,16 ± 0,07	2,17 ± 0,09
Clorofórmio	9,3	0,72 ± 0,05	0,71 ± 0,05	0,89 ± 0,06	0,86 ± 0,05
Etanol	10	1,22 ± 0,16	1,21 ± 0,10	0,56 ± 0,08	0,38 ± 0,06
Ter-Butanol	11,4	0,41 ± 0,04	0,41 ± 0,04	0,30 ± 0,04	0,26 ± 0,07

Apêndice A.2 – Dados referentes aos ensaios de grau de inchamento das espumas PL3002, PL6000, Poliéster, Comercial.

Solventes	Parâmetro de solubilidade (cal/cm ³) ^{1/2}	Coeficiente de inchamento (Q)			
		PL3002	PL6000	Poliéster	Comercial
Hexano	7,3	0,29 ± 0,04	0,39 ± 0,06	0,11 ± 0,09	0,42 ± 0,07
Acetato de etila	9,05	2,13 ± 0,07	1,58 ± 0,14	1,18 ± 0,07	1,95 ± 0,07
Clorofórmio	9,3	0,77 ± 0,08	0,90 ± 0,09	0,24 ± 0,05	0,93 ± 0,05
Etanol	10	0,43 ± 0,05	0,49 ± 0,04	0,15 ± 0,06	0,45 ± 0,04
Ter-Butanol	11,4	0,21 ± 0,07	0,43 ± 0,08	0,12 ± 0,03	0,36 ± 0,10

Apêndice B.1 – Dados referentes aos ensaios de absorção de solventes pelas espumas PL1100, PL1101, PL3000, PL3001.

Solventes	Absorção (m _{solvente} /m _{espuma})			
	PL1100	PL1101	PL3000	PL3001
Etanol	4,20 ± 0,35	3,60 ± 0,45	2,97 ± 0,35	2,48 ± 0,20
Ter-Butanol	3,15 ± 0,48	2,97 ± 0,28	2,46 ± 0,39	2,10 ± 0,34

Apêndice B.1 – Dados referentes aos ensaios de absorção de solventes pelas espumas PL3002, PL6000, Poliéster, Comercial.

Solventes	Absorção ($m_{\text{solvente}}/m_{\text{espuma}}$)			
	PL3002	PL6000	Poliéster	Comercial
Etanol	$2,93 \pm 0,17$	$3,18 \pm 0,46$	$2,48 \pm 0,32$	$3,40 \pm 0,47$
Ter-Butanol	$2,47 \pm 0,22$	$2,84 \pm 0,37$	$1,88 \pm 0,28$	$2,98 \pm 0,37$

Apêndice C.1 – Dados referentes aos ensaios de sorção de água pelas espumas PL1100, PL1101, PL3000, PL3001.

Tempo (minutos)	Sorção ($m_{\text{água}}/m_{\text{espuma}}$)			
	PL1100	PL1101	PL3000	PL3001
1	$7,28 \pm 0,85$	$10,95 \pm 0,87$	$8,36 \pm 1,09$	$13,55 \pm 1,44$
5	$7,89 \pm 1,01$	$11,99 \pm 0,19$	$10,81 \pm 1,01$	$14,07 \pm 0,98$
10	$9,95 \pm 1,80$	$14,69 \pm 0,26$	$13,85 \pm 0,95$	$15,40 \pm 0,60$
30	$16,05 \pm 1,40$	$16,40 \pm 0,72$	$17,64 \pm 0,90$	$16,55 \pm 0,84$
60	$21,09 \pm 0,74$	$19,24 \pm 0,62$	$20,98 \pm 0,80$	$18,50 \pm 0,55$
120	$23,21 \pm 0,44$	$19,25 \pm 0,66$	$25,61 \pm 1,11$	$22,47 \pm 1,50$
1220	$26,97 \pm 0,36$	$19,13 \pm 0,31$	$27,35 \pm 1,40$	$22,03 \pm 0,43$
2880	$27,67 \pm 1,48$	$19,44 \pm 0,63$	$27,69 \pm 1,49$	$22,64 \pm 1,66$
4320	$27,69 \pm 0,85$	$19,26 \pm 0,94$	$27,70 \pm 1,13$	$22,61 \pm 1,55$

Apêndice C.2 – Dados referentes aos ensaios de sorção de água pelas espumas PL3002, PL6000, Poliéster, Comercial

Tempo (minutos)	Sorção (m _{água} /m _{espuma})			
	PL3002	PL6000	Poliéster	Comercial
1	11,63 ± 1,56	3,79 ± 0,29	3,51 ± 0,50	12,20 ± 0,66
5	13,05 ± 0,77	7,10 ± 0,87	5,15 ± 0,68	16,92 ± 0,60
10	14,98 ± 1,20	8,58 ± 1,11	6,99 ± 0,97	16,22 ± 1,16
30	18,15 ± 0,01	11,92 ± 0,29	8,55 ± 0,57	18,80 ± 0,35
60	19,80 ± 0,16	14,31 ± 0,30	10,28 ± 0,42	20,53 ± 0,53
120	21,71 ± 0,66	16,17 ± 0,98	11,55 ± 0,69	26,34 ± 0,55
1220	24,57 ± 0,58	20,85 ± 0,55	12,88 ± 0,80	31,83 ± 1,74
2880	26,08 ± 0,83	25,50 ± 0,53	14,58 ± 1,03	31,99 ± 1,70
4320	25,99 ± 1,36	25,67 ± 0,43	14,43 ± 0,71	31,16 ± 1,20

Apêndice D.1 – Dados referentes aos ensaios de etanolise do óleo de babaçu catalisada pela biomassa imobilizada na espuma PL1100.

Esteres de etila (m/m)	Tempo				
	24h	48h	72h	96h	120h
C8	0,020 ± 0,004	0,026 ± 0,005	0,027 ± 0,003	0,027 ± 0,002	0,028 ± 0,002
C10	0,012 ± 0,004	0,018 ± 0,005	0,019 ± 0,003	0,021 ± 0,001	0,022 ± 0,002
C12	0,174 ± 0,035	0,235 ± 0,046	0,247 ± 0,011	0,254 ± 0,007	0,282 ± 0,031
C14	0,054 ± 0,008	0,070 ± 0,014	0,072 ± 0,012	0,073 ± 0,022	0,081 ± 0,008
C16	0,044 ± 0,007	0,055 ± 0,014	0,056 ± 0,005	0,055 ± 0,004	0,061 ± 0,003
C18	0,028 ± 0,008	0,030 ± 0,010	0,031 ± 0,009	0,031 ± 0,009	0,031 ± 0,008
C18:1	0,068 ± 0,017	0,115 ± 0,032	0,125 ± 0,015	0,125 ± 0,010	0,147 ± 0,020
C18:2	0,009 ± 0,001	0,015 ± 0,004	0,017 ± 0,003	0,017 ± 0,003	0,020 ± 0,003
Totais	0,408 ± 0,078	0,565 ± 0,125	0,598 ± 0,039	0,603 ± 0,014	0,672 ± 0,052
Rendimentos (%)	50,45 ± 9,56	69,96 ± 14,85	74,35 ± 5,52	76,61 ± 4,21	83,12 ± 6,31

Apêndice D.2 – Dados referentes aos ensaios de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela biomassa imobilizada na espuma PL1101.

Esteres de etila (m/m)	Tempo				
	24h	48h	72h	96h	120h
C8	0,020 ± 0,006	0,022 ± 0,005	0,023 ± 0,005	0,027 ± 0,001	0,027 ± 0,003
C10	0,011 ± 0,009	0,015 ± 0,009	0,016 ± 0,008	0,020 ± 0,001	0,020 ± 0,007
C12	0,188 ± 0,022	0,238 ± 0,014	0,247 ± 0,011	0,258 ± 0,013	0,267 ± 0,019
C14	0,054 ± 0,010	0,062 ± 0,015	0,068 ± 0,014	0,072 ± 0,022	0,072 ± 0,011
C16	0,046 ± 0,007	0,058 ± 0,006	0,058 ± 0,010	0,065 ± 0,001	0,065 ± 0,001
C18	0,030 ± 0,005	0,033 ± 0,004	0,030 ± 0,011	0,038 ± 0,005	0,038 ± 0,005
C18:1	0,051 ± 0,022	0,093 ± 0,014	0,115 ± 0,021	0,116 ± 0,002	0,118 ± 0,020
C18:2	0,007 ± 0,001	0,012 ± 0,002	0,016 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,019 ± 0,001
Totais	0,404 ± 0,087	0,534 ± 0,069	0,595 ± 0,069	0,623 ± 0,026	0,621 ± 0,047
Rendimentos (%)	51,77 ± 10,08	68,42 ± 7,95	76,19 ± 7,95	79,79 ± 3,05	79,46 ± 1,44

Apêndice D.3 – Dados referentes aos ensaios de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela biomassa imobilizada na espuma PL3000.

Esteres de etila (m/m)	Tempo				
	24h	48h	72h	96h	120h
C8	0,021 ± 0,004	0,025 ± 0,005	0,027 ± 0,002	0,029 ± 0,004	0,028 ± 0,003
C10	0,012 ± 0,004	0,015 ± 0,003	0,020 ± 0,004	0,022 ± 0,003	0,022 ± 0,002
C12	0,139 ± 0,023	0,204 ± 0,021	0,250 ± 0,017	0,272 ± 0,018	0,280 ± 0,002
C14	0,051 ± 0,011	0,060 ± 0,004	0,075 ± 0,003	0,079 ± 0,004	0,081 ± 0,004
C16	0,042 ± 0,009	0,047 ± 0,009	0,062 ± 0,003	0,063 ± 0,010	0,064 ± 0,004
C18	0,030 ± 0,005	0,031 ± 0,010	0,036 ± 0,006	0,037 ± 0,008	0,037 ± 0,006
C18:1	0,069 ± 0,004	0,099 ± 0,023	0,126 ± 0,004	0,137 ± 0,019	0,150 ± 0,011
C18:2	0,010 ± 0,001	0,014 ± 0,004	0,018 ± 0,003	0,020 ± 0,004	0,021 ± 0,004
Totais	0,376 ± 0,002	0,493 ± 0,077	0,613 ± 0,029	0,659 ± 0,063	0,683 ± 0,022
Rendimentos (%)	46,28 ± 0,14	60,73 ± 5,88	75,44 ± 2,22	81,17 ± 4,84	84,06 ± 1,65

Apêndice D.4 – Dados referentes aos ensaios de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela biomassa imobilizada na espuma PL3001.

Esteres de etila (m/m)	Tempo				
	24h	48h	72h	96h	120h
C8	0,022 ± 0,003	0,025 ± 0,002	0,026 ± 0,002	0,026 ± 0,003	0,026 ± 0,001
C10	0,015 ± 0,003	0,018 ± 0,002	0,020 ± 0,004	0,021 ± 0,004	0,021 ± 0,003
C12	0,202 ± 0,010	0,243 ± 0,006	0,27 ± 0,013	0,263 ± 0,009	0,266 ± 0,003
C14	0,060 ± 0,005	0,070 ± 0,001	0,074 ± 0,006	0,078 ± 0,002	0,077 ± 0,001
C16	0,049 ± 0,006	0,057 ± 0,004	0,059 ± 0,007	0,060 ± 0,007	0,059 ± 0,005
C18	0,030 ± 0,007	0,032 ± 0,006	0,033 ± 0,008	0,034 ± 0,012	0,034 ± 0,009
C18:1	0,086 ± 0,014	0,122 ± 0,021	0,130 ± 0,011	0,125 ± 0,010	0,128 ± 0,013
C18:2	0,014 ± 0,004	0,016 ± 0,001	0,016 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,028 ± 0,001
Totais	0,466 ± 0,044	0,535 ± 0,061	0,611 ± 0,022	0,618 ± 0,021	0,625 ± 0,006
Rendimentos (%)	57,71 ± 2,58	66,25 ± 3,56	75,61 ± 1,26	76,47 ± 1,22	77,29 ± 0,35

Apêndice D.5 – Dados referentes aos ensaios de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela biomassa imobilizada na espuma PL3002.

Esteres de etila (m/m)	Tempo				
	24h	48h	72h	96h	120h
C8	0,021 ± 0,005	0,022 ± 0,004	0,026 ± 0,001	0,026 ± 0,001	0,026 ± 0,003
C10	0,012 ± 0,005	0,017 ± 0,005	0,018 ± 0,003	0,020 ± 0,002	0,021 ± 0,001
C12	0,178 ± 0,038	0,212 ± 0,033	0,238 ± 0,008	0,259 ± 0,009	0,269 ± 0,014
C14	0,056 ± 0,008	0,063 ± 0,009	0,071 ± 0,003	0,077 ± 0,003	0,079 ± 0,005
C16	0,047 ± 0,006	0,048 ± 0,011	0,057 ± 0,001	0,058 ± 0,010	0,060 ± 0,001
C18	0,029 ± 0,005	0,030 ± 0,005	0,033 ± 0,005	0,035 ± 0,010	0,034 ± 0,006
C18:1	0,078 ± 0,013	0,102 ± 0,027	0,119 ± 0,014	0,127 ± 0,010	0,132 ± 0,018
C18:2	0,009 ± 0,001	0,013 ± 0,003	0,016 ± 0,002	0,018 ± 0,003	0,019 ± 0,003
Totais	0,426 ± 0,057	0,493 ± 0,072	0,582 ± 0,010	0,615 ± 0,027	0,634 ± 0,022
Rendimentos (%)	53,77 ± 5,77	62,28 ± 7,35	73,56 ± 1,94	77,71 ± 5,55	80,13 ± 4,37

Apêndice D.6 – Dados referentes aos ensaios de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela biomassa imobilizada na espuma PL6000.

Esteres de etila (m/m)	Tempo				
	24h	48h	72h	96h	120h
C8	0,025 ± 0,001	0,027 ± 0,002	0,029 ± 0,002	0,029 ± 0,001	0,029 ± 0,002
C10	0,017 ± 0,003	0,021 ± 0,002	0,021 ± 0,001	0,023 ± 0,001	0,024 ± 0,001
C12	0,202 ± 0,014	0,244 ± 0,009	0,236 ± 0,022	0,274 ± 0,009	0,284 ± 0,011
C14	0,060 ± 0,004	0,070 ± 0,004	0,067 ± 0,005	0,077 ± 0,007	0,080 ± 0,005
C16	0,049 ± 0,001	0,058 ± 0,005	0,054 ± 0,005	0,065 ± 0,003	0,066 ± 0,001
C18	0,032 ± 0,001	0,037 ± 0,001	0,035 ± 0,002	0,039 ± 0,005	0,038 ± 0,003
C18:1	0,108 ± 0,008	0,133 ± 0,001	0,128 ± 0,015	0,152 ± 0,009	0,164 ± 0,006
C18:2	0,014 ± 0,004	0,019 ± 0,002	0,019 ± 0,003	0,022 ± 0,002	0,024 ± 0,001
Totais	0,508 ± 0,007	0,609 ± 0,012	0,588 ± 0,054	0,681 ± 0,013	0,709 ± 0,009
Rendimentos (%)	62,49 ± 0,84	74,92 ± 1,47	72,42 ± 6,6	83,76 ± 1,59	87,27 ± 1,10

Apêndice D.7 – Dados referentes aos ensaios de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela biomassa imobilizada na espuma Poliéster.

Esteres de etila (m/m)	Tempo				
	24h	48h	72h	96h	120h
C8	0,009 ± 0,001	0,017 ± 0,001	0,020 ± 0,001	0,024 ± 0,003	0,024 ± 0,002
C10	0,005 ± 0,004	0,009 ± 0,005	0,011 ± 0,003	0,015 ± 0,001	0,016 ± 0,001
C12	0,083 ± 0,014	0,133 ± 0,007	0,157 ± 0,011	0,200 ± 0,014	0,207 ± 0,009
C14	0,029 ± 0,003	0,045 ± 0,006	0,051 ± 0,004	0,065 ± 0,001	0,062 ± 0,004
C16	0,021 ± 0,001	0,039 ± 0,007	0,046 ± 0,008	0,050 ± 0,008	0,057 ± 0,002
C18	0,030 ± 0,004	0,031 ± 0,003	0,040 ± 0,012	0,037 ± 0,004	0,040 ± 0,007
C18:1	0,046 ± 0,001	0,059 ± 0,010	0,064 ± 0,005	0,106 ± 0,014	0,116 ± 0,008
C18:2	0,005 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,017 ± 0,003	0,019 ± 0,001
Totais	0,228 ± 0,024	0,350 ± 0,043	0,408 ± 0,053	0,512 ± 0,042	0,537 ± 0,019
Rendimentos (%)	27,33 ± 2,92	41,96 ± 5,13	48,92 ± 6,44	61,41 ± 5,10	64,40 ± 2,31

Apêndice D.8 – Dados referentes aos ensaios de etanólise do óleo de babaçu catalisada pela biomassa imobilizada na espuma Comercial.

Esteres de etila (m/m)	Tempo				
	24h	48h	72h	96h	120h
C8	0,023 ± 0,001	0,027 ± 0,001	0,027 ± 0,003	0,029 ± 0,003	0,029 ± 0,003
C10	0,015 ± 0,001	0,022 ± 0,003	0,021 ± 0,003	0,023 ± 0,001	0,024 ± 0,001
C12	0,188 ± 0,017	0,243 ± 0,029	0,247 ± 0,010	0,276 ± 0,005	0,282 ± 0,001
C14	0,056 ± 0,008	0,068 ± 0,012	0,069 ± 0,004	0,078 ± 0,003	0,079 ± 0,002
C16	0,046 ± 0,005	0,054 ± 0,008	0,058 ± 0,009	0,066 ± 0,001	0,064 ± 0,003
C18	0,032 ± 0,002	0,035 ± 0,004	0,034 ± 0,002	0,040 ± 0,002	0,038 ± 0,003
C18:1	0,095 ± 0,001	0,130 ± 0,036	0,139 ± 0,013	0,158 ± 0,009	0,168 ± 0,003
C18:2	0,012 ± 0,004	0,019 ± 0,001	0,020 ± 0,003	0,023 ± 0,002	0,024 ± 0,002
Totais	0,421 ± 0,037	0,548 ± 0,021	0,628 ± 0,032	0,680 ± 0,032	0,700 ± 0,015
Rendimentos (%)	51,78 ± 4,55	67,49 ± 2,65	76,84 ± 3,95	83,70 ± 3,96	86,19 ± 1,83

Apêndice E.1 – Dados referentes aos ensaios de transesterificação em batelada consecutivas, valores de rendimentos, perda de massa após as reações, atividades hidrolítica e as atividades residuais da espuma PL1100.

Tempo (horas)	Rendimentos (%)	Atividade hidrolítica (U/g)	Perda de massa (%)	Atividade residual de transesterificação	Atividade residual de hidrolise
120	79,00	43,04	21,04	100	100
240	68,83	42,81	8,89	87,12	99,49
360	67,05	41,53	28,76	84,87	96,49
480	-	17,29	-	-	40,17

Apêndice E.2 – Dados referentes aos ensaios de transesterificação em batelada consecutivas, valores de rendimentos, perda de massa após as reações, atividades hidrolítica e as atividades residuais da espuma PL3000.

Tempo (horas)	Rendimentos (%)	Atividade hidrolítica (U/g)	Perda de massa (%)	Atividade residual de transesterificação	Atividade residual de hidrólise
120	84,85	48,80	22,38	100	100
240	66,83	36,14	32,30	78,76	74,06
360	65,03	30,53	30,08	76,64	62,56
480	-	17,27	-	-	35,39

Apêndice E.3 – Dados referentes aos ensaios de transesterificação em batelada consecutivas, valores de rendimentos, perda de massa após as reações, atividades hidrolítica e as atividades residuais da espuma PL6000.

Tempo (horas)	Rendimentos (%)	Atividade hidrolítica (U/g)	Perda de massa (%)	Atividade residual de transesterificação	Atividade residual de hidrólise
120	84,90	53,04	41,10	100	100
240	50,95	43,67	13,18	57,87	82,33
360	60,02	47,10	7,25	68,17	88,78
480	-	22,77	-	-	42,95

Apêndice E.4 – Dados referentes aos ensaios de transesterificação em batelada consecutivas, valores de rendimentos, perda de massa após as reações, atividades hidrolítica e as atividades residuais da espuma Comercial.

Tempo (horas)	Rendimentos (%)	Atividade hidrolítica (U/g)	Perda de massa (%)	Atividade residual de transesterificação	Atividade residual de hidrólise
120	86,79	54,30	49,54	100	100
240	64,23	50,39	27,62	74,00	99,32
360	57,71	38,69	15,88	66,49	76,78
480	-	17,73	-	-	35,16

ANEXO A

Fichas técnicas



Lupranat® T 80 A

Technical Datasheet

Page: 1 of 3
Version: 07
Edition: 04.10

Chemical nature

Lupranat T 80 A is an isomer mixture of 80 % 2,4- and 20 % 2,6-toluene diisocyanate (TDI).

Applications

Lupranat T 80 A is used principally for the manufacture of polyurethane flexible foams for the furniture and automotive industries. It is also used for the production of polyurethane paints, adhesives and textile coatings.

Typical properties

Appearance:	colourless liquid		
Colour number	10	HAZEN, APHA	DIN EN ISO 6271-2
Purity	99.5	g/100 g	EN ISO 14896
NCO-content	48.2	g/100 g	EN ISO 14896
2,4-Isomer	80.5	g/100 g	GC
Acidity as HCl	15	mg/kg	ISO 14898
Hydrolysable chlorine	40	mg/kg	ISO 15028
Viscosity at 25 °C	3	mPa·s	DIN 51 550/53 018
Density at 25 °C	1.22	g/cm ³	DIN 51 757

Delivery

The delivery is by tankers and in non-returnable drums. If delivered in road tankers, temperature during transport should be maintained between 20 °C and 40 °C. If delivered in drums, temperature should not fall below crystallization point. Exposure to intensive sunlight should be avoided.



The Chemical Company

Lupranol® 1100

Technical Datasheet

Page: 1 of 2
Version: 05
Edition: 04.10

Chemical nature

Lupranol 1100 is a polypropyleneglycol with a molecular weight of 1100.

Applications

Lupranol 1100 is used for the production of polyurethane foams and elastomers.

Typical properties

Appearance:	colourless liquid of low viscosity		
OH Number	104	mg KOH/g	DIN 53 240
Viscosity at 25 °C	155	mPa·s	DIN 51 550
Water Content	≤ 0.05	%	DIN 51 777
Density at 25 °C	1.00	g/cm ³	DIN 51 757
Colour	≤ 30	Pt/Co, APHA	DIN ISO 6271
Flash Point	> 160	°C	DIN EN 22 719

Safety advice

Lupranol 1100 is a polymer or No-longer-polymer, made from monomers, which are listed in the Bedarfsgegenständeverordnung (consumer goods regulation) (Germany) dated December 23, 1997, annexe 3, paragraph A or B as well as in the directive 90/128/EG (Europe) and its amendments (latest: 96/11/EC), in annexe II, paragraph A or B.

The components of Lupranol 1100 or its product groups are listed in the BgVV (Germany) as Codes of Practice No. XXVIII dated June 1, 1981, and XXXIX dated June 1, 1998.

The components of Lupranol 1100 or its product groups or the polyurethanes made from Lupranol 1100 are listed in the 21st CFR, part 175 105 (edition of April 1, 1998) of FDA (USA).

All digests and codes of practice mentioned impose on the manufacturer of consumer goods the obligation to conduct tests on migration and trace monomers. BASF Polyurethanes GmbH cannot take this responsibility for the use of its products from our customers.



The Chemical Company

Lupranol® BALANCE 50

Technical Data Sheet

Page: 1 of 3

Version: 06

Edition: 04.11

Chemical nature

Lupranol BALANCE 50 is a trifunctional polyether polyol based on a renewable raw material which contains mainly secondary hydroxyl groups. This polyol contains a low-emission antioxidant combination which is free from BHT (di-butyl-hydroxy-toluene)

Applications

Lupranol BALANCE 50 is used in the continuous production of soft flexible polyurethane foams according to the slabstock foaming process. Because of its special stabilizer combination Lupranol BALANCE 50 is suitable for the production of low-emission flexible slabstock foams. Lupranol BALANCE 50 cannot be used in HR- and CMHR-formulations because of incompatibilities. This also applies to the use of Lupranol BALANCE 50/melamine- and/or chalk-suspensions in HR- and CMHR-formulations.

Typical properties

Appearance:	slightly yellow viscous liquid		
OH Number	50	mg KOH/g	DIN 53 240
Viscosity at 25 °C	725	mPa·s	DIN 51 550
Water Content	≤ 0.10	%	DIN 51 777
Acid Number	≤ 0.06	mg KOH/g	DIN EN ISO 2114
Density at 25 °C	0.996	g/cm ³	DIN 51 757
Colour	≤ 130	Pt/Co, APHA	DIN ISO 6271
Flash Point	> 160	°C	DIN EN 22 719

Safety advice

If it is intended to use BASF Polyurethanes GmbH materials for the manufacture of consumer goods (e. g. products which will come into contact with foodstuffs or with the skin, toys) or medical products, national and international regulations have to be observed. Where no regulations exist, consumer goods or medical products must at least comply with European legislation. We recommend contacting our Sales and our Ecology and Product Safety departments.



Lupranol® 2092

Technical Datasheet

Page: 1 of 2
Version: 06
Edition: 04.10

Chemical nature

Lupranol 2092 is a trifunctional polyether polyol which contains primary hydroxyl groups. It contains a combination of antioxidant which is free from BHT (2,6-Di-t-butyl-hydroxy-toluene).

Applications

Lupranol 2092 is used in the production of high resilient polyurethane slabstock foams, when required in combination with polymer polyols. It has a higher reactivity than Lupranol 2090. Due to its special combination of stabiliser Lupranol 2092 is especially suitable for the production of low emission slabstock foams.

Typical properties

Appearance:	colourless viscous liquid		
OH Number	28	mg KOH/g	DIN 53 240
Viscosity at 25 °C	1 125	mPa·s	DIN 51 550
Water Content	≤ 0.05	%	DIN 51 777
Density at 25 °C	1.02	g/cm ³	DIN 51 757
Colour	≤ 30	Pt/Co, APHA	DIN ISO 6271
Flash Point	> 160	°C	DIN EN 22 719

Safety advice

If it is intended to use BASF Polyurethanes GmbH materials for the manufacture of consumer goods (e. g. products which will come into contact with foodstuffs or with the skin, toys) or medical products, national and international regulations have to be observed. Where no regulations exist, consumer goods or medical products must at least comply with European legislation. We recommend contacting our Sales and our Ecology and Product Safety departments.

Lupranol 2092 has not to be marked according to the EC standard 67/548 and its guidelines. Before processing the product we recommend reading the safety data sheet. For further information on safety measures at the processing of polyurethane products consult our Technical Information 'Safety and Precautionary Measures for the Processing of Polyurethane Systems'.



The Chemical Company

Lupraphen® 8107

Technical Datasheet

Page: 1 of 3

Version: 11

Edition: 04.10

Chemical nature

Lupraphen 8107 is a partially-branched, aliphatic, polyester polyol.

Applications

Lupraphen 8107 is used for the production of polyurethane slab stock foam.

Typical properties

Appearance:	Colourless to pale yellow, viscous liquid		
OH Number	61	mg KOH/g	DIN 53 240
Viscosity at 25 °C	19 000	mPa·s	DIN 53 015
Viscosity at 75 °C	1 050	mPa·s	DIN 53 015
Water Content	≤ 0.07	%	DIN 51 777
Acid Number	≤ 1.5	mgKOH/g	DIN EN ISO 2114
Density at 25 °C	1.19	g/cm ³	DIN 51 757
Colour	≤ 2	Iodine	DIN 6162
Flash point	> 160	°C	DIN EN 22 719

Safety advice

Lupraphen 8107 is a polymer or No-longer-polymer, made from monomers and additives, which are listed in the directive 90/128/EG (Europe) and its amendments (latest: 2004/19/EG), in annexe II, paragraph A or B or annexe III, paragraph A or B.

The components of Lupraphen 8107 or its product groups or the polyurethanes made from Lupraphen 8107 are listed in the 21st CFR, part 175.105 (edition of April 1, 1998) of FDA (USA).