Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Norma Patricia Durán Osorio

Estudo do uso de fungos filamentosos como biocatalisadores para a produção de biodiesel e avaliação de alguns parâmetros reacionais

Belo Horizonte

2019

UFMG/ICEX/DQ. 1.308ª

T. 594ª

Norma Patricia Durán Osorio

Estudo do uso de fungos filamentosos como biocatalisadores para a produção de biodiesel e avaliação de alguns parâmetros reacionais

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Química.

Belo Horizonte

2019

Osorio, Norma Patricia Durán.
Estudo do uso de fungos filamentosos como biocatalisadores para a produção de biodiesel e avaliação de alguns parâmetros reacionais [manuscrito] /Norma Patricia Durán Osorio
[xv], 130 f.: il.

O835e
2019

Orientadora: Isabel Cristina Pereira Fortes.

Coorientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Quimica organica - Teses 2. Fungos - Teses 3.Biodiesel – Teses 4. Lipases - Teses I. Fortes, Isabel Cristina Pereira - Orientadora II.Takahashi,Jacqueline Aparecida - Coorientadora III. Título.

CDU 043

UFMG
Programa de Pós-Graduação em Química
Departamento de Química - ICEx

50 anos química pós-graduação-ufmg

"Estudo do Uso de Fungos Filamentosos como Biocatalisadores para a Produção de Biodiesel e Avaliação de Alguns Parâmetros Reacionais"

Norma Patricia Duran Osorio

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Isabel Cristina Pereira Fortes - Orientadora
UFMG

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi - Coorientadora
UFMG

Prof. Luiz Antônio d'Avila
UFRJ

Dr. Ivanildo Evódio Marriel
EMBRAPA

Profa. Letícia Malta Costa
UFMG

Profa. Renata Costa Silva Araújo
UFMG

Belo Horizonte, 20 de novembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe pelo apoio e amor incondicional sempre.

A minha tia Cenelia e meus primos Julian e Mauricio pelo carinho e apoio.

Aos meus amigos em Colômbia e os amigos e colegas que conheci em Brasil pelo acompanhamento em cada etapa deste doutorado, pela ajuda e pela amizade sincera.

A Aurita, Andrés e Jhon Jairo que foram meus companheiros de moradia e se tornaram amigos, também a Isabel e Stefanya que nos receberam e ajudaram muito desde nossa chegada.

Agradecimentos especiais a Mary, Clarita, Aurita, León, Leydi, Eduard, Ana Delia, Luz e Edgar pela sua presença e carinho que fez todo mais fácil e mais amigável.

As professoras Jacqueline Takahashi e Isabel Fortes pela oportunidade, orientação e ajuda.

Ao pessoal do laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química pelo acompanhamento e ajuda.

Ao pessoal técnico e administrativo do Departamento de Química da UFMG pela ajuda, orientação e apoio.

Ao pessoal da Pos-graduação pela ajuda e preocupação em cada etapa.

Ao laboratório LEC e seu pessoal técnico e administrativo pela ajuda permanente e permitir a realização dos ensaios.

A Denise e Elaine de Farmácia pela ajuda com seus conhecimentos e recomendações.

A entidade de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela oportunidade e pelo apoio financeiro.

A Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade e aos professores do Departamento de Química pelos ensinamentos.

A Universidade Tecnológica de Pereira e ao Professor Óscar Marino pelo apoio.

Aos meus colegas da Escola de Química da UTP pela amizade e carinho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

E agradeço a todas às pessoas que em diferentes momentos tornaram minha vida mais fácil e agradável durante este processo acadêmico e nesta história de vida.

Obrigada.

“Los científicos dicen que estamos hechos de átomos, pero a mí un pajarito me contó que estamos hechos de historias”.

Eduardo Galeano.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....vii
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....viii
LISTA DE FIGURAS.....x
LISTA DE EQUAÇÕES.....xiii
RESUMO.....xiv
ABSTRACT.....xv
CAPÍTULO 1.....1
BIBLIOGRAFIA DA INTRODUÇÃO.....5
CAPÍTULO 2.....9
OBJETIVOS.....9
2.1 OBJETIVO GERAL.....9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....9
CAPÍTULO 3 10
ESTADO DA ARTE.....10
3.1 BIODIESEL.....10
3.2 MATÉRIAS-PRIMAS.....15
3.3 ENZIMAS.....17
3.3.1 Classificação das enzimas.....17
3.4 LIPASES.....19
3.4.1 Características cinéticas e físico-químicas.....20
3.4.2 Lipases em células íntegras.....21
3.4.3 Lipases na produção de biodiesel.....21
3.5 VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM A TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.....22
3.5.1 Efeito da temperatura na transesterificação enzimática.....22
3.5.2 Efeito da água na transesterificação enzimática.....23
3.5.3 Efeito dos aceptores acila na transesterificação enzimática.....25
3.5.4 Efeito do co-solvente na transesterificação enzimática.....26

3.5.5 Efeito da relação molar óleo/álcool na transesterificação enzimática.....28

3.6 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS.....29

BIBLIOGRAFIA DE ESTADO DA ARTE.....30

CAPÍTULO 4.....47

PARTE EXPERIMENTAL.....47

4.1 Reagentes e Soluções.....47

4.2 Fungos.....47

4.2.1 Manutenção e cultivo fúngico.....49

4.2.2 Preparo das suspensões de esporos.....49

4.2.3 Contagem de esporos.....50

4.2.4 Separação da biomassa.....50

4.2.5 Otimização de parâmetros reacionais.....53

4.3 Avaliação da reutilização das biomassas sem liofilizar e produzidas pelos fungos *S. racemosum, R. stolonifer* e *R. oryzae*.....55

4.4 Avaliação de parâmetros reacionais para os fungos *S. racemosum. R.stolonifer* e *R. Oryzae*.....56

4.4.1 Caldo liofilizado como biocatalisador.....56

4.5 Estudo dos parâmetros reacionais tempo de reação, relação molar óleo/álcool, teor de água e quantidade do biocatalisador para os fungos *S. racemosum* e *R. stolonifer* na sua forma de filtrado liofilizado.....57

4.5.1 Planejamento Fatorial 3^2 para o fungo *S. racemosum*.....58

4.5.2 Análise do Teor de água (Método Karl Fischer).....58

4.5.3 Secagem de metanol.....59

4.5.4 Avaliação do teor de água.....59

4.5.5 Análise dos produtos da reação de transesterificação.....59

4.5.6 Determinação da atividade enzimática do material liofilizado.....60

4.6 Estudo do fungo *S. racemosum* na sua forma biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador.....61

4.6.1 Planejamento Fatorial 2^K.....62

4.6.2 *Clean up* do produto da reação.....64

4.6.3 Análise por cromatografia gasosa com detecção por chama (GC-FID).....64

4.7 Estudo do fungo *R. stolonifer* na sua forma de caldo liofilizado como biocatalisador.....65

4.7.1 Planejamento Fatorial 3^2 para o fungo *R. stolonifer*.....65

4.7.2 Análise de variação ANOVA para o fungo *R. stolonifer*.....65

4.8 Estudo do fungo *R. stolonifer* na sua forma biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador.....65

4.9 Comparação entre as biomassas liofilizadas e as biomassas sem liofilizar dos fungos *S. racemosum* e *R. stolonifer*.....67

4.10 Determinação do teor de glicerol livre no produto final por Espectrofotometria de Absorção Molecular na região de UV-Vis (EAM UV-Vis.....67

BIBLIOGRAFIA PARTE EXPERIMENTAL.....69

CAPÍTULO 5.....71

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....71

5.1 Seleção dos Fungos.....71

5.1.1 Triagem dos 7 fungos do estudo.....72

5.2 Reutilização dos biocatalisadores.....77

5.3 Avaliação de parâmetros reacionais tempo de reação e relação molar óleo/álcool, para os fungos *S. racemosum, R.stolonifer* e *R. Oryzae*.....80

5.3.1 Caldo liofilizado como biocatalisador.....80

5.3.1.1 Tempo de reação.....80

5.3.1.2 Relação Molar.....84

5.4 Estudo dos parâmetros reacionais tempo de reação, relação molar óleo/álcool, teor de água e quantidade do biocatalisador para os fungos *S. racemosum* e *R. stolonifer* na sua forma de filtrado liofilizado.....87

5.4.1 Análise dos parâmetros reacionais para o fungo *S. racemosum*.....87

5.4.1.1 Planejamento fatorial 3^2.....87
5.4.1.2 Determinação da atividade enzimática do material liofilizado.....91

5.4.1.3 Teor de água.....92

5.5 Estudo do fungo *S. racemosum* na sua forma biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador.....96

5.5.1 Planejamento fatorial 2^3.....97

5.5.2 Desenho Box-Behnken.....101

5.6 Análise dos parâmetros reacionais para o fungo *R. stolonifer* na sua forma de caldo liofilizado como biocatalisador.....106

5.6.1 Planejamento fatorial 3^2.....106

5.6.2 Teor de água.....108

5.6.3 Superfície de resposta Box Behnken com o fungo *R. stolonifer* na sua forma de biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador.....109

5.7 Comparação entre biomassas liofilizadas e biomassas sem liofilizar produzidas pelos fungos *S. racemosum* e *R. stolonifer*.....114

5.8 Analise de glicerol livre.....117

5.9 Análise de teor de éster por cromatografia gasosa em amostras de biodiesel.....120

BIBLIOGRAFIA DE RESULTADOS E DISCUSÃO.....122

CAPÍTULO 6.....128
CONCLUSÕES.....128
PERSPECTIVAS FUTURAS.....130

LISTA DE ABREVIATURAS

AG - Ácido graxo

ASTM - American Society for Testing and Materials

Bep - Barril equivalente de Petróleo

CDE - Consumo de Energia

CNPE - Conselho Nacional de Política Energética

CG - Cromatografia gasosa

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DG – Diglicerídeos

FID - Flame Ionization Detector

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

LaβB - Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios

MG – Monoglicerídeos

Mtep - Milhões de Toneladas Equivalentes de Petróleo

PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel

OIE - Oferta de Energia Interna

rpm - rotações por minuto

TG - Triglicerídeos

LISTA DE TABELAS E QUADROS

***Tabela 3.1**: Perfil de ácidos graxos típicos em óleos vegetais de algumas oleaginosas.....13*
***Quadro 3.1** Classificação das principais classes de enzimas.....18*
***Quadro 3.2** Principais reações catalisadas por lipases.....22*

***Tabela 4.1** Otimização de alguns parâmetros reacionais (razão molar óleo/álcool, tempo de reação, temperatura, velocidade de agitação) no trabalho com os fungos M. plumbeus (M.p), P. citrinum (P.c), S. racemosum (S.r), P. janthinellum (P.j), R. stolonifer (R.s), R. oryzae (R.o) e A. niger (A.n).....53*

***Tabela 4.2** Otimização de alguns parâmetros reacionais (razão molar óleo/álcool, tempo de reação, temperatura, velocidade de agitação) no trabalho com os fungos S. racemosum, R. stolonifer e R. oryzae.....57*

***Tabela 4.3** Condições experimentais do planejamento 3^2 utilizando o caldo liofilizado como biocatalisador produzido pelo fungo S. racemosum.....58*

***Tabela 4.4** Planejamento fatorial 2^3 para estudo dos parâmetros reacionais quando se utiliza o S. Racemosum na sua forma biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador.....62*

***Tabela 4.5** Desenho Box-Behnken para estudo dos parâmetros reacionais quando se utiliza o S. Racemosum na sua forma biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador.....63*
***Tabela 4.6** Condições experimentais do planejamento 3^2 utilizando o caldo liofilizado como biocatalisador produzido pelo fungo R. stolonifer.....65*

***Tabela 4.7** Desenho Box-Behnken para estudo dos parâmetros reacionais quando se utiliza o fungo R. stolonifer na sua forma biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador.....66*

***Tabela 5.1** Rendimentos em teor de ésteres para as diferentes biomassas de fungos utilizadas.....77*

***Tabela 5.2** Rendimentos em Percentagem de área de ésteres em função do tempo de reação, para uma razão molar de 1:12.....81*

***Tabela 5.3** Rendimentos em áreas de ésteres para os fungos S. racemosum, R. stolonifer e R. oryzae (cada fungo por triplicata).....82*

Tabela 5.4 % *Área de éster para os fungos (a) S. racemosum,(b) R. stolonifer e (c) R. oryzae, nas condições tempo de reação 72 horas e relações molares óleo/álcool 1:3, 1:6, e 1:12.....84*

Tabela 5.5 *Porcentagens de área de éster obtidos com o caldo liofilizado como biocatalisador produzido pelo fungo S. racemosum.....88*

Tabela 5.6 *Análise de variância ANOVA para o planejamento 2^3.....98*

Tabela 5.7 *Análise de variância ANOVA do desenho Box-Behnken.....98*

Tabela 5.8 *Porcentagens de área de éster do desenho Box-Behnken utilizando biomassa liofilizada do fungo S. racemosum como biocatalisador.....102*
Tabela 5.9 *Análise de variância do desenho Box-Behnken.....103*

Tabela 5.10 *Porcentagens de área de éster do planejamento 3^2 obtidos com o caldo liofilizado como biocatalisador produzido pelo fungo R. stolonifer.....107*

Tabela 5.11 *Porcentagens de área de éster do desenho Box-Behnken com o fungo R. stolonifer na sua forma de biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador.....110*

Tabela 5.12 *Análise de variância do desenho Box-Behnken.....111*

Tabela 5.13 *Porcentagens área de éster para os biocatalisadores liofilizados e sem liofilizar produzidos pelos fungos S. racemosum e R. stolonifer.....115*

Tabela 5.14 *ANOVA dos porcentagens de área de éster obtidos com biocatalisadores produzidos pelos fungos S. racemosum e R. stolonifer.....115*

Tabela 5.15 *Série de padrões de glicerol e suas leituras em absorvância para a construção da curva analítica para método de glicerol livre em biodiesel.....117*

Tabela 5.16 *Estimativa de glicerol livre em amostras de biodiesel.....119*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1 *Reação de Transesterificação.....4*

Figura 4.1 *Fluxograma das etapas experimentais de preparo, cultivo dos fungos e obtenção do biocatalisador para realização da reação de transesterificação.....48*

Figura 4.2 *Execução da inoculação de fungos em ágar.....49*

Figura 4.3 *Câmara de Neubauer utilizada para contagem dos esporos.....50*

Figura 4.4 *Ilustração das Biomassas obtidas para os sete fungos.....51*

Figura 4.5 *Etapas para obtenção dos biocatalisadores a partir da biomassa produzida por fungo.....52*

Figura 4.6 *Reação de transesterificação usando caldo sem liofilizar.....53*

Figura 5.1*. Cromatogramas do óleo de soja e seu respectivo biodiesel obtidos pela técnica de HPLC mostrando as regiões características da presença de TG,DG, MG AGL e ésteres.....72*

Figura 5.2 *Cromatogramas obtidos por HPLC para o estudo realizado para os fungos selecionados no LAβB para serem avaliados com relação ao seu potencial para a produção de biodiesel. As condições empregadas foram aquelas As condições utilizadas foram relação molar óleo/álcool (1:3), temperatura ambiente, agitação 100 rpm e tempo de reação 72h. M. plumbeus (M.p), P. citrinum (P.c), S. racemosum (S.r), P. janthinellum (P.j), R. stolonifer (R.s), R. oryzae (R.o) e A. niger (A.n).....74*

Figura 5.3 *Perfil cromatográfico para os filtrados dos fungos S. racemosum, R. stolonifer e R. oryzae. (tempo de reação 72h, relação molar óleo/álcool 1:3).....76*

Figura 5.4 a, b e c *Biomassa nova (Biomassa 1) e Biomassas reutilizadas (Biomassa 2 e Biomassa 3), (a) S. racemosum, R. stolonifer e R. oryzae. Relação molar 1:12, Tempo de reação 72 horas.....78*

Figura 5.5 *Cromatogramas da reação de transesterificação com biocatalisador produzido pelos fungos S. racemosum, R. stolonifer, e R. oryzae. em tempos de reação de 60 e 84 horas e relação molar óleo/álcool 1:12.....84*

Figuras 5.6 a, b e c, *Perfil cromatográfico das amostras do (a) S. racemosum, (b) R. stolonifer e (c) R. oryzae, Tempo de reação 72 horas, para relações molares óleo/álcool 1:3, 1:6, e 1:12.....85*

Figura 5.7 *Perfil cromatográfico do produto de reação obtido utilizando as enzimas extracelulares do fungo S. racemosum, relação molar óleo:álcool 1:6, com tempos de reação de 24, 48 e 72 horas.....8*

Figura 5.8 *Superfície de resposta para o planejamento 3^2 com os fatores relação molar e tempo de reação para o fungo S. racemosum.....90*

Figura 5.9 *Perfil cromatográfico do produto de reação obtido para fungo S. racemosum com filtrado liofilizado e filtrado sem liofilizar. Relação molar 1:3, tempo de reação 72 horas.....93*

Figura 5.10 *Variância dos efeitos do fator teor de água no resultado do produto da transesterificação enzimática.....95*

Figura 5.11 *Perfil cromatográfico do produto de reação obtido utilizando as enzimas extracelulares do fungo S. racemosum, relação molar óleo/álcool 1:3, tempo de reação 72 horas.....96*

Figura 5.12 *Diagrama de pareto para o resultado do planejamento fatorial 2^3 utilizando como biocatalisador o fungo s. racemosum.....100*

Figura 5.13 *Superfície de resposta para o planejamento com os fatores relação molar óleo/álcool e quantidade do catalisador para o planejamento 2^3 utilizando como biocatalisador o fungo s. racemosum.....101*

Figura 5.14 *Diagrama de pareto para o resultado da superfície de resposta Box-Behnken utilizando como biocatalisador o fungo S. racemosum.....104*

Figura 5.15 *Gráfico de superfície de resposta com os fatores tempo de reação e relação molar óleo/álcool utilizando como biocatalisador o fungo S. racemosum.....105*

Figura 5.16 *Superfície de resposta com os fatores tempo de reação e quantidade do catalisador utilizando como biocatalisador o fungo S. racemosum.....108*

Figura 5.17 *Gráfico dos efeitos do fator teor de água no resultado do produto da transesterificação enzimática com biocatalisador produzido pelo fungo R. stolonifer..109*

Figura 5.18 *Diagrama de pareto para o resultado da superfície de resposta Box-Behnken utilizando como biocatalisador o fungo R. stolonifer.....112*

Figura 5.19 *Gráfico de superfície de resposta do desenho Box-Behnken com os fatores tempo de reação e relação molar óleo/álcool utilizando como biocatalisador o fungo R. stolonifer.....113*

Figura 5.20 *Variação das porcentagens de área de éster para os dados das biomassas liofilizadas e biomassas sem liofilizar dos fungos S. racemosum (S.r) e R. stolonifer (R.s).....116*

Figura 5.21 *Curva analítica para glicerol livre em biodiesel.....118*

Figura 5.22 *Amostra de biodiesel produzido com biocatalisador (biomassa liofilizada produzida pelo fungo S. racemosum 121*

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 *Quantificação de esporos . mL^{-1}.....51*

RESUMO

O uso de biocatalisadores para a produção de biodiesel é atualmente uma alternativa promissória para ajudar a resolver os problemas mais comuns associados com a rota convencional. Os fungos filamentosos são hoje em dia a principal fonte produtora de lipases para serem utilizadas como biocatalisadores na reação de transesterificação. As lipases são bastante atrativas pela sua versatilidade e a ampla variedade de substratos que são capazes de biotransformar. Uma das formas de usar estes biocatalisadores é através da sua célula íntegra com a sua maquinaria enzimática ativa e que pode ser excretada para o meio de cultivo onde o fungo se desenvolve ou retida no micélio (biomassa fúgica). O objetivo deste trabalho foi selecionar dentre um conjunto de fungos filamentosos aqueles com maior capacidade de serem usados como biocatalisadores na reação de transesterificação de óleo de soja com mistura dos álcoois metanol/ter-butílico em relação 1:1. Primeiramente, foram escolhidos sete fungos filamentosos dos quais as espécies foram selecionados os fungos *Syncephalastrum racemosum, Rhizopus stolonifer* e *Rhizopus oryzae*. Estes apresentaram resultados mais promissores para serem utilizados com biocatalisadores. Eles foram avaliados na forma de biocatalisador presente no meio de cultura onde o micro-organismo se desenvolveu (lipase extracelular) e na forma de biocatalisador presente na célula íntegra (biomassa- lipase intracelular). Posteriormente, foram avaliadas as melhores condições reacionais para a produção de biodiesel para os fungos *Syncephalastrum racemosum e Rhizopus stolonifer.* Foram estudadas as seguintes variáveis: tempo de reação, razão molar óleo/álcool, teor de água e quantidade de biocatalisador apresentando resultados satisfatórios em 72 horas, razão molar óleo/álcool 1:6, quantidade do biocatalisador 0,3 gramas e teor de água 5% m/m. Para *Syncephalastrum racemosum* foram obtidos rendimentos de teor de éster de 37,15% utilizando-o no misturado ao meio de cultrura e 85,5% na sua forma de célula integra. Para o fungo *Rhizopus stolonifer* os rendimentos foram de 27,2% e 52%, respectivamente, para as mesmas condições. Foram utilizadas ferramentas estatísticas na avaliação da informação como planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta e os dados analisados através do pacote estatístico STATISTICA 8.

Palavras-chave: Fungos filamentosos, biocatalisadores, biodiesel.

ABSTRACT

The use of biocatalysts for biodiesel production is currently a promissory alternative to help resolve the most common problems associated with the conventional route. The filamentous fungi are nowadays the main source producing lipases to be used as biocatalysts in the transesterification reaction. The lipases are quite attractive for their versatility and the wide variety of substrates that are capable of biotransform. One of the ways to use these biocatalysts is through its full cell with its active enzymatic machinery and which can be excreted to the cultivation medium where the fungus develops or retained in the mycelium (biomass). The purpose of this work was to select from a set of filamentous fungi those with greater capacity to be used as biocatalysts in the reaction of transesterification of soybean oil with mixture of methanol/ter-butyl alcohols compared to 1:1. First, seven filamentous fungi were chosen of which species were selected the fungi *Syncephalastrum racemosum*, *Rhizopus stolonifer* and *Rhizopus oryzae*. These have presented more promising results to be used with biocatalysts. They were evaluated in the form of biocatalyst present in the culture medium where the microorganism developed (lipase extracellular) and in the form of biocatalyst present in the full cell (biomass-lipase intracellular). Subsequently, the best reactional conditions were evaluated for the production of biodiesel for fungi *Syncephalastrum racemosum* and *Rhizopus stolonifer*. The following variables were studied: reaction time, molar ratio oil/alcohol, water content and quantity of biocatalyst presenting satisfactory results in 72 hours, molar ratio oil/alcohol 1:6, biocatalyst quantity 0.3 grams and water content 5% m/m. For *Syncephalastrum racemosum* were obtained yields of ester content of 37.15% using it in mixed in the middle of Cultrura and 85.5% in its form of integral cell. For the fungus Rhizopus stolonifer the yields were 27.2% and 52% respectively for the same conditions. Statistical tools were used in the evaluation of information as factorial planning and response surface methodology and the data analyzed through statistical package Statistics 8.

Key words: Filamentous fungi, biocatalysts, biodiesel

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O atual consumo mundial de energia é fortemente dominado pelos combustíveis fósseis que incluem os hidrocarbonetos gasosos (metano e outros gases), líquidos (petróleo bruto) e materiais sólidos (carvão), no entanto estas fontes de energia são limitadas a longo prazo [1]. O aumento da demanda por combustíveis e a crescente preocupação com o meio ambiente, preconizou a busca por fontes alternativas de energia tanto no Brasil quanto no mundo [2,3].

Os biocombustíveis líquidos tornaram-se uma importante alternativa como combustíveis verdes, pois oferecem várias vantagens, incluindo a sua renovabilidade, alto teor energético e baixo perfil de emissões de dióxido de carbono, o que contribui para a redução do efeito estufa [4,5]. Geralmente, os biocombustíveis são produzidos a partir de biomassa e categorizados como biodiesel, bioetanol, biogás e biohidrogênio. Atualmente, eles são estudados extensivamente como fontes de energia renováveis [6].

De acordo com a American Society for Testing and Materials (ASTM), o biodiesel é definido como mono-ésteres de alquil derivados de matérias-primas de lipídeos [7]. Atualmente, o biodiesel é utilizado como substituto para o petrodiesel, sem que haja qualquer necessidade de modificações nos motores a diesel (até 20% v/v), podendo ser obtido a partir de óleos vegetais (comestíveis ou não comestíveis), gorduras animais ou espécies particulares de microalgas [8]. No Brasil, atualmente, o porcentual de teor de biodiesel presente no diesel fóssil é de 10% [9].

A reação clássica utilizada para a produção de biodiesel é a transesterificação por catálise homogênea. Sendo que nesta reação é adicionado um álcool ao óleo vegetal na

presença de catalisadores ácidos ou básicos. Na catálise ácida há necessidade do emprego de grandes quantidades de álcool, maior tempo de reação e temperatura, para a obtenção de biodiesel com rendimentos satisfatórios; já na catálise básica não há necessidade do excesso de álcool e as condições de reação são mais brandas. No entanto, as reações de saponificação são observadas, o que causa dificuldade de purificação dos ésteres formados [10]. Muitas pesquisas com o objetivo de tentar diminuir essas desvantagens, têm impulsionado o uso de novos catalisadores entre os quais estão os biocatalisadores ou enzimas e são principalmente as enzimas hidrolíticas como as lipases, as proteases e as esterases as mais utilizadas em processos de biotransformação [11].

A produção de biodiesel utilizando a transesterificação com lipases é promissora em comparação com a utilização da catálise química convencional. As lipases têm a capacidade de transformar os triglicerídeos e ácidos graxos livres em biodiesel, o que significa que são capazes de catalisar diversos óleos, incluindo os óleos usados com um teor elevado de ácidos graxos livres (AGL). Por outro lado, o biodiesel pode ser facilmente separado da mistura reacional por filtração quando é catalisado por lipases evitando a etapa de lavagem tão comum na catálise homogênea [12].

Para a síntese do biodiesel existem duas categorias principais de biocatalisadores enzimáticos: (1) lipase extracelular (a enzima é previamente extraída do caldo fermentativo do micro-organismo produtor e então purificada) e (2) lipase intracelular (a enzima fica retida no interior ou na parede celular do micro-organismo produtor) [13]. As lipases (triacilglicerol éster hidrolases) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interfase orgânica – aquosa catalisando a hidrólise de óleos e gorduras

com a liberação de ácidos graxos, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol. Em meios com baixa concentração de água, as lipases catalisam reações de esterificação, transesterificação e interesterificação [14,15].

O uso destes biocatalisadores na produção de biodiesel está sendo cada vez mais estudado por causa de algumas de suas vantagens como a facilidade da hidrólise química, por requererem temperaturas mais baixas, o que impede a degradação dos produtos, reduzindo os custos do processo. Além disso, são biodegradáveis e são, portanto, menos poluentes do que os catalisadores químicos [16].

Nos últimos anos, as lipases têm ganhado significativa atenção, pois elas podem ser produzidas em larga escala. As lipases comerciais mais utilizadas para biocatálise são produzidas a partir de microrganismos tais como fungos, leveduras e bactérias [17]. Os fungos e as bactérias produzem a maioria das lipases usadas em aplicações biotecnológicas, dentre estes microrganismos, os fungos filamentosos são uma fonte interessante para a produção de lipases [18,19].

Na produção de biodiesel com o uso de lipase como catalisador é importante o estudo do efeito de alguns parâmetros como temperatura de reação, o tipo de aceptor acila, o uso de co-solventes na reação de transesterificação, a razão molar óleo/álcool e a presença de água na reação. Esta última é de particular interesse, pois existe a necessidade de um teor mínimo de água para manter as lipases ativas na interface óleo-água [20].

Na reação de transesterificação requer-se um mol de triglicerídeo para cada três moles de álcool para produzir três moles de ésteres de ácidos graxos e um mol de glicerol. Entretanto, quando o catalisador é a lipase é importante a escolha do álcool a ser

utilizado, pois as lipases são susceptíveis a sofrer inativação na presença de álcoois de cadeia curta e também no caso de um excesso de Ealcoolno meio reacional[21].

Figura 1. 2 *Reação de Transesterificação [Autora]*

Várias estratégias têm sido reportadas na literatura para solucionar o problema da estabilidade de lipase durante transesterificação dos triglicerídeos com um álcool, incluindo: (i) a imobilização da lipase sobre um substrato inerte, (ii) adição gradual ou fracionada de álcool ao longo de intervalos de tempo específicos, (iii) o uso de vários compostos que sejam doadores de grupamento acila, ou (iv) a utilização de células íntegras [6,22,23].

O uso como biocatalisador de lipase produzida por fungo filamentoso e ligada ao micélio (célula íntegra) na produção de biodiesel, tem atraído considerável atenção. Neste caso a célula íntegra é usada como suporte, evitando as etapas de extração, isolamento e purificação as quais são normalmente trabalhosas e contribuem para aumentar o custo do processo [24].

Este trabalho teve por objetivo o uso de fungos filamentosos que pudessem atuar como biocatalisadores na reação de transesterificação de óleo de soja com mistura de álcool metílico e álcool ter-butílico (1:1), para produzir biodiesel. Além disso, foi realizado o estudo de algumas variáveis como tempo de reação, razão molar óleo/álcool, teor de água e quantidade de biocatalisador que influenciam o desenvolvimento e o rendimento da reação. Estas variáveis foram avaliadas através de ferramentas estatísticas. A utilização destes fungos filamentosos como biocatalisadores, representa uma alternativa para diminuir os custos elevados do emprego de lipases purificadas para este fim.

Este trabalho é constutuído de 6 capítulos, sendo o capítulo 1 uma breve introdução apresentando a relevância do estudo. No capítulo 2 estão os objetivos. O capítulo 3 apresenta uma revisão bibliográfica, que mostra o estado da arte com relação a produção de biodiesel e sua obtenção através da via enzimática (uso de lipases produzidas por fungos) e das variáveis que influenciam o rendimento do processo e noções básicas das ferramentas estatísticas empregadas.. O capítulo 4 apresenta as etapas que foram seguidas para o preparo, manutenção e a geração de biomassa fúngica, bem como da produção do biocatalisador para a sua posterior utilização na obtenção do biodiesel. Além disso, são apresentados os diversos experimentos realizados para o estudo de alguns dos parâmetros que afetam a produção de biodiesel utilizando esta rota sintética. O capítulo 5 mostra os resultados referentes aos dados obtidos e o capítulo 6 estão as conclusões gerais deste trabalho e as perspectivas futuras paradar continuidade a este trabalho.

BIBLIOGRAFIA

[1] Xiao M, Mathew S, Obbard JP. Biodiesel fuel production via transesterification of oils using lipase biocatalyst. Global Change Biology Bioenergy 2009; 1:115-125.

[2] Pousa G, Santos ALF, Suarez PAZ. History and policy of biodiesel in Brazil. Energy Policy 2007; 35:5393-5398.

[3] Suarez P, Meneghetti SM. 70° Aniversário do biodiesel em 2007: evolucão hIstórica e situação atual no brasil. Química nova 2007; 30:2068-2071.

[4] Simasatitkula LG, Arpornwichanopa A. Optimal design of biodiesel production process from waste cooking palm oil. Procedia Engineering 2012; 42:1292-1301.

[5] Atabani AE, Silitonga AS, Mahlia TMI, Masjuki HH, Mekhilef S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2012; 16:2070-2093.

[6] Amini Z, Ilham Z, Ong HwaiChyuan O, Mazaheri H, WeiHsin C. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. Energy Conversion and Management, 2016; 141:339-353.

[7] Avhad MR, Marchetti JM. A review on recent advancement in catalytic materials for biodiesel production. Renewable & Sustainable Energy Reviews 2015;50:696-718.

[8] Borugadda VBG, Vaibhav V. Biodiesel Production from Renewable Feed Stocks: Status and Opportunities. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2012;16:4763-4784.

[9] http://www.anp.gov.br/wwwanp/biocombustiveis/biodiesel. Acessado em 2017.

[10] Gamba M. *Produção de Biodiesel através de catalise enzimática em líquido iônico*. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.

[11] Treichel H, de Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M, Oliveira JV. A Review on Microbial Lipases Production. Food and Bioprocess Technology 2010;3:182-196.

[12] Yan YJ, Li X, Wang GL, Gui XH, Li GL, Su F, Wang XF, Liu T. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. Applied Energy 2014;113:1614-1631.

[13] Robles-Medina A, Gonzalez-Moreno PA, Esteban-Cerdan L, Molina-Grima E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. Biotechnology Advances 2009;27:398-408.

[14] Ramos Sánchez LB, CujilemaQuitio MC, Julian-Ricardo MC, Cordova J, Fickers P. Fungal Lipase Production by Solid State Fermentation. Bioprocessing & Biotechniques 2015;5:1-9.

[15] Mendes AA, Oliveira PC, de Castro HF. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2012; 78:119-134.

[16] Pourzolfaghar, H. Abnisa, F. Ashri, W.M. Daud, W. Aroua, M.K. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2016; 61;245-257.

[17] Moussavou Mounguengui RW, Brunschwig C, Baréa B, Villeneuve P, Blin J. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? Progress in Energy and Combustion Science 2013; 39:441-456.

[18] Yoo HY, Simkhada JR, Cho SS, Park DH, Kim SW, Seong CN, Yoo JC. A novel alkaline lipase from Ralstonia with potential application in biodiesel production. Bioresource Technology 2011;102:6104-6111.

[19] Kotogan A, Nemeth B, Vagvolgyi C, Papp T, Tako M. Screening for Extracellular Lipase Enzymes with Transesterification Capacity in Mucoromycotina Strains. Food Technology and Biotechnology 2014;52:73-82.

[20] Bisen PS, Sanodiya BS, Thakur GS, Baghel RK, Prasad G. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. Biotechnology Letters 2010;32:1019-1030.

[21] Lam MK, Lee MT, Mohamed AR. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. Biotechnology Advances 2010;28:500-518.

[22] Tran DT, Chen Cl, Chang JS. Continuous biodiesel conversion via enzymatic transesterification catalyzed by immobilized Burkholderia lipase in a packed-bed bioreactor. Applied Energy. 2016;168; 340-350.

[23] Canet A, Bonet-Ragel K, Benaiges MD, Valero F. Lipase-catalysed transesterification: Viewpoint of the mechanism and influence of free fatty acids. Biomass and Bioenergy, 2016; 85;94-99.

[24] Cortez DV, De Castro HF, Andrade GSS. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. Quimica Nova, 2017; 40;85-96.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

1. Estudar o uso de fungos filamentosos como biocatalisadores para a produção de biodiesel.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selecionar dentre um conjunto de fungos filamentosos previamente escolhidos no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LAβB) do Departamento de Química da UFMG, aqueles que possuem maior capacidade para a produção de lipase visando o seu uso como biocatalisadores na reação de transesterificação para produção de biodiesel.
2. Avaliar se a produção de lipase é intra ou extracelular.
3. Estudar o efeito combinado dos fatores: razão molar óleo/álcool, tempo de reação, quantidade do biocatalisador e presença/ausência de água no meio reacional e como estes fatores influenciam a produção de biodiesel.
4. . Avaliar o uso da biomassa liofilizada: fungo + meio de cultura e micélios como biocatalisador do processo.
5. Fazer uso de ferramentas estatísticas para avaliar quais dos fatores escolhidos são mais significativos no desenvolvimento da reação de transesterificação com os biocatalisadores e, portanto, na formação de ésteres.

CAPÍTULO 3

ESTADO DA ARTE

3.1 BIODIESEL

O nome biodiesel foi introduzido em 1992 nos Estados Unidos pela *National Soy Diesel Development Bord*, que foi a pioneira na comercialização deste produto. Este combustível pode ser utilizado em misturas com diesel, pois ambos apresentam características físicas muito similares, porém emite menos poluentes, é biodegradável, não tóxico e essencialmente livre de enxofre e de compostos aromáticos [1]. Nos últimos 20 anos, o desenvolvimento de tecnologias para se produzir biodiesel tem avançado rapidamente por ser um combustível derivado de fonte renovável [2,3].

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de biodiesel. A Secretaria de Planejamento e Desenvolvimento Energético do Ministério de Minas e Energia (MME) na Resenha Energética Brasileira de 2018 destaca que a produção de biodiesel foi de 4.291 mil m³ em 2017, com alta de 12,9% sobre 2016 e correspondendo a uma mistura de 8% ao diesel fóssil e que o biodiesel respondeu por 1,2% da matriz energética brasileira [4,5].

O Brasil tem o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), que tem por objetivo implementar de forma técnica e economicamente sustentável, a produção e utilização de biodiesel, com foco na inclusão social, desenvolvimento regional, criação de emprego e renda [6,7].

Existem várias tecnologias bem estabelecidas para a produção de biodiesel. Os óleos vegetais e gorduras animais são apropriados para serem modificados de modo a reduzir as suas viscosidades e gerar um produto com propriedades adequadas para ser usado como combustível em motores diesel [8]. Todos os óleos vegetais comestíveis e

não comestíveis têm diferentes composições de ácidos graxos, o que influencia nas propriedades físico-químicas do biodiesel produzido [9]. A seleção da matéria-prima para a produção de biodiesel depende da produção nacional. Além de óleos comestíveis como a soja, que ainda é a matéria-prima mais utilizada, outras potenciais matérias primas para a produção de biodiesel são óleos usados, óleos vegetais não comestíveis, outras plantas oleaginosas, óleo extraído de microalgas e de micro-organismos [10,11].

A principal tecnologia para a produção de biodiesel no Brasil e no mundo é a transesterificação alcalina homogênea (ou alcoólise). Nesta reação, um álcool (normalmente metanol ou etanol) é adicionado ao óleo ou gordura na presença de um catalisador (ácidos ou bases Brönsted). Uma mistura de glicerina e ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) é gerada. Os catalisadores alcalinos, em especial hidróxido de sódio, tornaram-se dominantes para a produção de biodiesel, devido aos custos inferiores e cinética mais rápida [12]. A reação de transesterificação é um processo reversível e, por conseguinte, um excesso de álcool é geralmente necessário para deslocar o equilíbrio da reação no sentido da formação de produtos. Os tipos de álcool que poderiam ser utilizados para as reações de alcoólise incluem aqueles de cadeia curta, cadeia longa e álcoois cíclicos; no entanto, o metanol e o etanol são mais amplamente utilizados devido à reatividade superior, polaridade, disponibilidade e baixo custo [9].

Apesar de possuírem algumas características físicas semelhantes, o diesel tem estrutura química bastante diferente dos óleos vegetais e de seus ésteres. O diesel contém apenas átomos de carbono e de hidrogênio arranjados em cadeia linear, ou estruturas da cadeia ramificada, podendo também conter hidrocarbonetos insaturados. Em geral a fórmula para o óleo diesel é $C_{12}H_{23}$, podendo variar entre $C_{10}H_{20}$ e $C_{15}H_{28}$. Já

os óleos vegetais contêm triglicerídeos (TG), ácidos graxos livres (AGL), fosfolipídios, fosfatídeos, carotenoides e traços de água. Os ácidos graxos mais encontrados em óleos vegetais são o esteárico, o palmítico, o oleico, o linoleico e o linolênico [1].

Triglicerídeos são formados pela condensação entre ácidos graxos e o triol conhecido popularmente por glicerol, formando monoglicerídeos, diglicerídeos ou triglicerídeos, dependendo, se uma, duas ou três moléculas de ácido graxo se associam ao glicerol, respectivamente. Triglicerídeos podem ser formados por ácidos graxos iguais ou diferentes entre si [13]. A Tabela 3.1 lista o perfil de ácidos graxos típicos presentes em algumas oleaginosas.

***Tabela 3.2**: Perfil de ácidos graxos típicos em óleos vegetais de algumas oleaginosas. Adaptado de [14]*

Nome IUPAC	Nomenclatura comum	Abreviação	Massa Molar (g/mol)	Oleaginosa						
				Algodão	Amendoim	Canola	Girassol	Coco	Palma	Soja
Ácido graxo saturado (%)				25,4	19,3	7,2	12,7	92,1	50,0	15,1
Ácido Hexanoico	Ácido Caproico	C6:0	116,16					0,5		
Ácido Octanoico	Ácido Caprílico	C8:0	144,21					7,8		
Ácido Decanoico	Ácido Cáprico	C10:0	172,26					6,7		
Ácido Dodecanoico	Ácido Laúrico	C12:0	200,32					47,5		
Ácido Tetradecanoico	Ácido Mirístico	C14:0	228,37	0,7	0,1	0,1	0,1	18,1	1,1	0,1
Ácido Hexadecanoico	Ácido Palmítico	C16:0	256,43	21,6	11,1	4,1	7,0	8,8	44,0	10,6
Ácido Heptadecanoico	Ácido Margárico	C17:0	270,46							0,1
Ácido Octadecanoico	Ácido Esteárico	C18:0	284,48	2,6	2,4	1,8	4,5	2,6	4,5	4,0
Ácido Eicosanoico	Ácido Araquídico	C20:0	312,54	0,3	1,3	0,7	0,4	0,1	0,4	0,3
Ácido Docosanoico	Ácido Behênico	C22:0	340,59	0,2	2,9	0,3	0,7			
Ácido tetracosanoico	Ácido Lignocérico	C24:0	368,64	<0,1	1,5	0,2	<0,3			<0,4
Ácido graxo monoinsaturado (%)				19,2	48,5	62,9	18,9	6,2	39,3	23,4
Ácido *cis*-9-Hexadecenoico	Ácido Palmitoléico	C16:1	254,41	0,6	0,2	0,3	0,1		0,1	0,1
Ácido *trans*-9-Octadecenoico	Ácido Elaídico	C18:1n9t	282,47			<0,3				
Ácido *cis*-9-Octadecenoico	Ácido Oleico	C18:1n9c	282,47	18,6	46,7	60,9	18,7	6,2	39,2	23,3
Ácido *cis*-11-Eicosanoico	Ácido Gondoico	C20:1n9	310,52	<0,1	1,6	1,0	0,1	<0,2		<0,3
Ácido 13-Docosanoico	Ácido Erúcico	C22:1n9	338,57	<0,3	<0,3	0,7	<0,2			<0,3
Ácido 15-Tetracosanoico	Ácido Nervônico	C24:1n9	366,62		<0,3					
Ácido graxo di-insaturado (%)				54,4	32,0	21,0	67,5	1,6	10,1	53,7
Ácido *cis,cis*-9,12-Octadecadienoico	Ácido Linoleico	C18:2n6c	280,45	54,4	32,0	21,0	67,5	1,6	10,1	53,7
Ácido graxo tri-insaturado(%)				0,7	<0,1	8,8	0,8		0,4	7,6
Ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-Octadecatrienoico	Ácido α-Linolênico	C18:3n3	278,44	0,7	<0,1	8,8	0,8		0,4	7,6

A reação de transesterificação ocorre em uma série de reações consecutivas e reversíveis, em que os triglicerídeos (TG) são convertidos em etapas a diglicerídeos (DG), monoglicerídeos (MG) e finalmente a glicerol. Acredita-se que a formação do alquil éster a partir do monoglicerídeo seja a etapa que determina a velocidade desta reação, uma vez que o monoglicerídeo é o intermediário mais estável produzido. Esta reação é um processo de equilíbrio e a transformação ocorre essencialmente pela mistura dos reagentes em uma estequiometria que requer 1 mol de triglicerídeo e 3 mols de álcool. No entanto, é utilizado um excesso de álcool para deslocar o equilíbrio e consequentemente, aumentar o rendimento dos ésteres, permitindo assim, a separação de fases a partir do glicerol formado [15].

Atualmente, o metanol é o álcool mais empregado para produção de biodiesel, tem alto teor de pureza e não é higroscópico mas é obtido a partir de gas natural e é tóxico. [16]. O etanol também pode ser utilizado para a produção de biodiesel, a presença de água no etanol hidratado favorece a formação de sabão durante a reação de transesterificação por catálise alcalina, o que provoca a emulsificação do glicerol e dificulta consideravelmente a sua separação dos ésteres alquílicos produzidos [17-19].

A reação de transesterificação pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a razão molar de álcool com o óleo, tipo de catalisador, presença de água, ácidos graxos livres presentes no óleo, temperatura, velocidade e tempo de agitação. Neste contexto, um entendimento dos fatores que afetam o processo é muito importante para tornar a produção de biodiesel economicamente e ambientalmente viável [20].

Para acelerar a taxa de reação, o processo de transesterificação é realizado na presença de catalisadores, que podem ser químicos ou enzimáticos. A reação enzimática

é mais atraente devido à capacidade de gerar um produto de alta qualidade, simplificar a separação dos produtos, usar condições de reação mais brandas, possibilitar a reutilização do catalisador e gerar menor impacto ambiental. Porém, a conversão e a taxa de reação podem ser melhores com catalisadores químicos [21].

Os tipos de catálise química são: homogênea, catalisada por base, [6,22-26], e catalisada por ácido, [27] e a heterogênea catalisada por base, [28-31] e catalisada por ácido [32-34]. Além disso, esta mesma reação pode ser processada utilizando-se biocatalisadores que, além de sintetizarem alquil ésteres específicos, realizam a transesterificação de óleos com alto teor de ácidos graxos livres.

Na catálise enzimática, a síntese do biodiesel é realizada em meio aquo-restrito e não é necessária a lavagem do produto final para a retirada do catalisador. Além disso, o glicerol obtido possui melhor qualidade devido às condições brandas de reação [35,36]. Outra vantagem da transesterificação enzimática é a possibilidade de utilizar álcoois contendo uma pequena quantidade de água, como por exemplo, o etanol [32]. A lipase é um biocatalisador importante que catalisa a esterificação e a reação de transesterificação para produzir ésteres metílicos (biodiesel). Li *et al* [37], Chen *et al* [38], Jeong *et al* [39], estudaram enzimas de *R. oryzae* e Novozyme 435 como biocatalisadores.

3.2 MATÉRIAS-PRIMAS

O objetivo principal das pesquisas com biodiesel é obter um produto que terá um preço competitivo em comparação com outras fontes de energia convencionais [40]. Assim a seleção da matéria-prima representa entre 75-80% do custo global de produção do biodiesel. Entre os diferentes tipos de matéria-prima estão o óleo vegetal comestível,

óleo vegetal não comestível, gorduras animais, resíduos de óleo, óleo microbial e óleo de microalgas, que podem ser usados para transesterificação com catálise enzimática [10,11].

Os óleos vegetais são candidatos como combustíveis alternativos para motores diesel mas sua utilização não é possível devido a sua alta viscosidade que é quase 10 vezes superior ao diesel, e que leva a muitos problemas no motor [41,42]. Portanto é necessária a modificação do óleo vegetal para obter o biodiesel. Os óleos vegetais comestíveis como soja [43,44] girassol, palma, milho, algodão, canola [45-50] e azeites de oliva [51] têm sido amplamente utilizados na transesterificação enzimática.

Os óleos não comestíveis não são aptos para o consumo humano por conteremem alguns casos, como a mamona, componentes tóxicos. Portanto, os óleos não comestíveis não competem com as culturas alimentares. Assim, os óleos vegetais não comestíveis como Babaçu, canola, pinhão manso, macaúba, palanga, karanja, árvore da borracha, mahua, crambe e tabaco, são matérias-primas alternativas para produção de biodiesel [11,52-54]. Gorduras animais são outro grupo de matéria-prima para produção de biodiesel, as mais usadas através da rota enzimática incluem banha de porco [55], gordura de cordeiro [56] e sebo bovino [8,10,57].

Em geral, no mundo apenas a metade dos óleos comestíveis usados são reciclados como matéria-prima para lubrificantes e pinturas, o resto é descartado no ambiente, portanto, o uso de óleos e gorduras residuais para produção de biodiesel é muito importante tanto para reduzir e reciclar esses resíduos, como para diminuir o impacto no meio ambiente [58-60].

Atualmente, há um considerável interesse no uso de óleos de algas (micro e macro) para síntese de biodiesel, já que estes óleos são matérias-primas baratas, têm taxa de crescimento rápido, alto teor lipídico, tolerância a água de má qualidade e precisam de menor área de solo para seu crescimento [61-71].

3.3 ENZIMAS

As enzimas são proteínas altamente especializadas, sintetizadas por células vivas, e como todas as proteínas são heteropolímeros de vinte diferentes aminoácidos, são macromoléculas com massa molecular variando entre 5 até mais de 1000 KDa. As enzimas são catalisadores biológicos, que facilitam a conversão de um substrato em um produto, pelo fornecimento de condições, que diminuam a energia de ativação da reação. O grande interesse no uso das enzimas pode ser explicado por diversos fatores A ampla variedade de substratos sobre os quais elas podem atuam, as reações complexas, que são capazes de catalisar em diferentes rotas onde a geração de resíduos e subprodutos são reduzidos. Além disso, elas possuem a capacidade de atuar como catalisadores a altas velocidades em condições reduzidas de energia [72].

3.3.1 Classificação das enzimas

A classificação das enzimas foi elaborada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), dividindo as enzimas em seis grandes classes (Quadro 3.1) e cada uma em subclasses de acordo com o tipo de reação química que elas catalisam [72].

Quadro 3.1 *Principais classes de enzimas [73]*

CLASSE N°	NOME DA CLASSE	TIPO DE REAÇÃO CATALISADA	SUBCLASSE
1	Oxidorredutases	Reações de oxidação e redução de ligações do tipo C-H, C-C, C=C	Hidrogenases, Oxidases, Peroxidases, etc
2	Transferases	Transferências de grupos aldeídico, cetônico, acila, fosforila ou metila	Transaldolases, Transcetolases, etc
3	Hidrolases	Hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos e glicosídeos	Esterases, Lipases, Peptidases, Fosfatases, etc
4	Liases	Adição - eliminação de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, Cetoacidoliases, Hidrolases
5	Isomerases	Transferências de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, Epimerases
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e ésteres de fosfato	Sintetases

Adaptado da ref [73].

Cada enzima tem atribuído a si um número da Comissão de Enzimas (número E. C., do inglês *Enzyme Commission*), esse número de quatro dígitos, identifica o tipo de reação que a enzima catalisa. As enzimas classificadas como E.C. 3.1.1.3 (Lipases ou Glicerol Éster Hidrolases), onde o número (3) indica o nome da classe (Hidrolases), o segundo número (1), a subclasse (atua sobre ligações éster), o terceiro número (1), a

subclasse (Carboxil éster hidrolase), e o quarto número (3), significa que a enzima atua sobre triglicerídeos [72,73].

3.4 LIPASES

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) pertencem à família das α/β-hidrolases e são proteínas cuja as estruturas têm um arranjo central hidrofóbico de oito folhas β empacotadas entre duas camadas de α hélices anfifílicas [74]. Diz-se que a lipase com a tampa que cobre o centro ativo está em uma conformação fechada e, na presença de uma emulsão, ao entrar em contato com a interface formada pelo lipídeo, as lipases sofrem uma mudança conformacional na região da tampa, expondo o seu centro ativo para a hidrólise das moléculas de triglicerídeo [75]. O centro ativo só fica exposto quando a tampa abre, ou seja, a enzima só catalisa uma reação em interfaces hidrofóbicas-hidrofílicas, ou ainda, na presença de um solvente hidrofóbico. O mecanismo de passagem da conformação fechada para conformação aberta ocorre por ativação interfacial [76].

As enzimas lipases são enzimas que catalisam a hidrólise de gorduras e óleos, liberando ácidos graxos (AGL), diglicerídeos (DG), monoglicerídeos (MG) e glicerol. Elas possuem a capacidade de catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos. Estas enzimas catalisam a hidrólise de óleos e gorduras em glicerol e AGL na interface óleo-água, no entanto, também são capazes de catalisar uma grande variedade de reações em ambos os meios (aquosos e não aquosos), particularidade que as distingue das esterases [74]. O Quadro 3.2 apresenta as reações catalisadas pelas lipases.

Quadro 3.2 *Principais reações catalisadas por lipases [77]*

HIDRÓLISE

$R_2COOCH_2R_1 + H_2O \rightleftharpoons R_2COOH + R_1CH_2OH$

ESTERIFICAÇÃO

$R_1CH_2OH + R_2COOH \rightleftharpoons R_2COOCH_2R_1 + H_2O$

INTERESTERIFICAÇÃO

$R_1COOR_2 + R_3COOH \rightleftharpoons R_1COOCH + R_3COOR_2$

$R_1COOR_2 + R_3COOR_4 \rightleftharpoons R_1COOR_4 + R_3COOR_2$

TRANSESTERIFICAÇÃO

$R_1COOR_2 + R_3OH \rightleftharpoons R_3COOR_1 + R_2\text{- OH (ALCOÓLISE)}$

$R_1COOR_2 + CH_2OHCH_2OHCH_2OH \rightleftharpoons CH_2OHCH_2OHCH_2COOR_1 + R_2\text{ -OH}$

As lipases têm alto potencial biotecnológico já que podem catalisar diversas reações, conservam sua estrutura e estabilidade em solventes orgânicos e apresentam uma ampla especificidade pelos substratos. Assim, elas podem ser específicas com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. As lipases *não específicas* clivam as moléculas de glicerídeos produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoglicerídeos e diglicerídeos como intermediários. As lipases *1,3 específicas* liberam de um glicerídeo os ácidos graxos das posições 1 e 3 e fazem a hidrólise das ligações éster nestas posições e as lipases *ácido graxo específicas* fazem a hidrólise de ésteres que possuem ácidos graxos de cadeia longa e com ligações duplas [78-80].

3.4.1 Características cinéticas e físico-químicas

A maioria das lipases apresenta faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e temperatura ótima para uma atividade máxima entre 30 e 40 °C. No entanto,

estas propriedades podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo de suas isoformas (uma das distintas formas de uma proteína), produzidas por um mesmo micro-organismo [77,81].

3.4.2 Lipases em células íntegras

Uma alternativa ao uso de lipase purificada é usar diretamente os organismos que produzem a enzima. Enzimas intracelulares são aquelas que ficam na parede celular ou membrana e podem ser usadas como biocatalisadores. Estas células íntegras não precisam de extração e purificação do meio de cultura [82]. Evidências sugerem que, em alguns casos a lipase é limitada à membrana no interior da parede celular. Hama *et al 2006* mostraram que células de *R. oryzae* produzem dois tipos de lipases, uma na parede celular e outra ligada à membrana celular [83].

3.4.3 Lipases na produção de biodiesel

O uso de biocatalisadores em aplicações biotecnológicas estão recebendo cada vez mais atenção. As lipases são importantes biocatalisadores devido às suas excelentes propriedades bioquímicas e fisiológicas. A reação de transesterificação catalisada por lipase ocorre em duas etapas, que envolve a hidrólise da ligação éster e a esterificação com o segundo substrato [84].

As lipases podem ser isoladas de muitas espécies de plantas (látex do mamão, lipase de semente de aveia e lipase de semente de mamona), animais (porco e lipases pancreáticas humanas), bactérias, fungos filamentosos e leveduras [85,86]. Para a produção de enzimas industriais geralmente os micro-organismos são preferidos devido ao menor tempo de geração. As vantagens dos micro-organismos podem ser listadas

como alto rendimento de conversão de substrato a produto, grande versatilidade de condições ambientais e simplicidade de manipulação genética [87].

Os fungos filamentosos são micro-organismos que alimentam-se de matéria orgânica já elaborada, absorvem nutrientes simples e solúveis e têm a capacidade de excretar proteínas. Estas características e o avanço da fisiologia, da bioquímica e da genética dos fungos filamentosos, fazem deles fontes interessantes para a produção de lipases [74]. As lipases provenientes de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, como as lipases bacterianas e fúngica, que são utilizados na produção de biodiesel, tais como aquelas provenientes de *Aspergillus niger*, *Candida antártica*, *Candida rugosa, Mucor miehei, Pseudomonas cepacia, Rhizopus oryzae, Streptomyces sp*. e *Thermomyces lanuginose*. Shimada *et al* relatam porcentagem de conversão em torno de 95%, Watanabe *et al* (90%,) Samukawa *et al* (97%) e Rayon *et al* (97%) entre outros, em trabalhos com biocatalisadores para produzir biodiesel [32,88,89].

3.5 VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM A TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A transesterificação ou reação de alcoólise pode ser realizada com enzimas, e diversos exemplos são encontrados na literatura [90-101]. A maioria das pesquisas recentes envolvem a determinação de uma melhor fonte de enzima e a otimização das condições da reação [102,103].

3.5.1 Efeito da temperatura na transesterificação enzimática

A transesterificação enzimática ocorre em baixas temperaturas variando de 25 a 60 °C. Em geral, a taxa de conversão aumenta com o aumento da temperatura de reação. No entanto, o aumento da temperatura após a temperatura ótima promove a

desnaturalização e desativação da enzima e diminui a atividade catalítica Várias pesquisas têm sido efetuadas para descobrir o efeito da temperatura sobre a produção de biodiesel com enzimas, no entanto, a temperatura ótima é específica para cada enzima [104].

Chen *et al*. relataram que uma temperatura de reação maior de 40 °C resultou em perda de atividade catalítica da lipase de *R. oryzae*, para a metanólise do óleo residual de cozinha. Já Jeong e Park relataram que a temperatura de reação ótima para a Novozyme 435 foi de 40 °C, o que permite a, alta atividade de lipase e baixa viscosidade do reagente [105,106].

Verdugo *et al*. utilizaram na síntese enzimática óleo de girassol com temperaturas de reação entre 20°C e 60°C, que são temperaturas aonde a síntese enzimática tem sido geralmente conduzida, e uma relação molar óleo/álcool 1:3 [107,108]. Outros autores reportam condições de trabalho com enzimas a temperaturas entre 35°C e 40°C, [105,109,110] relação metanol/óleo 4:1 e 1:1, com rendimentos de reação que variam entre 88% até 93% [111-113].

3.5.2 Efeito da água na transesterificação enzimática

O teor de água é um dos fatores chave para reação de transesterificação enzimática já que tem um forte efeito sobre a conformação tridimensional do sítio ativo da lipase [114,115]. Biocatalisadores precisam de uma pequena quantidade de água para manter as suas atividades. Quando a adição de água aumenta, a quantidade de água disponível para o óleo formar gotículas de óleo – água aumentam também, proporcionando um aumento da área interfacial disponível [116]. Assim, a atividade enzimática é dificultada em meios livres de água, no entanto, o excesso de água causa

uma reação inversa de hidrólise. A quantidade de água necessária para proporcionar uma atividade ideal da enzima difere de acordo com o tipo de enzima e reação. Enzimas, substratos, uso de solvente orgânico e também apoio imobilizado têm um papel crucial na atividade de água ideal para a lipase. O conteúdo de água ideal, não só mantem a hidrólise das ligações éster no nível mínimo, mas também garante o mais alto grau de transesterificação. Assim, um melhor controle do teor de água é muito importante para o processo enzimático [117].

Em geral, lipases mostram maior atividade quando uma pequena quantidade de água é adicionada em sistemas livres de solventes. Para a lipase de *Candida sp* o conteúdo de água ideal é entre 10 a 20% m/m para manter a maior atividade de transesterificação [118]. Noureddini *et al*. testaram a lipase imobilizada de *P. cepacia* na transesterificação de óleo de soja com metanol e etanol e observaram que o aumento de água fornece um aumento considerável no rendimento do biodiesel obtido. Noureddini *et al.* determinaram as condições ideais para a reação de 10 g de óleo de soja, com 475 mg de lipase , tempo de reação de 1h, relação molar metanol/óleo de 1:7,5 e 0,5 g de água na presença de metanol, o que resultou em 67% de rendimento no teor de ésteres; e com razão molar de óleo/etanol 1:15,2 e 0,3 g de água na presença de etanol resultou em 65% de rendimento no teor de éster [119]

Sousa *et al* usaram lipase imobilizada de *P. cepacia* na etanólise de óleo de pinhão-manso e com o melhor rendimento de 98% na presença de 4-5% (m/m) de água e tempo de reação de 8 h , O rendimento foi de apenas 70% na ausência de água [120]. Kawakami *et al.* determinaram o efeito do teor de água na transesterificação de óleo de pinhão-manso com metanol para caracterizar a lipase de *B. cepacia* imobilizada . Os

autores relataram que esse rendimento de biodiesel atingiu 90% com teor de água de 0,6% (m/m) após 12 h, usando uma mistura estequiométrica de metanol/óleo (3:1) [121]. Chen *et al*. investigaram o efeito do teor de água na produção de biodiesel com ácido oleico e metanol catalisada por lipase de *A. oryzae*, em sistemas bifásicos aquosos-óleo e descobriram que o rendimento de esterificação é baixo, se a água fosse escassa. Um maior rendimento de éster foi obtido com 10% (m/m) de água em relação ao ácido oleico [122]. Na última década inúmeras investigações foram realizadas para determinar o conteúdo de água ideal para transesterificação, no entanto, isso depende de cada enzima e de suas condições de reação [123].

3.5.3 Efeito dos aceptores acila na transesterificação enzimática

Os álcoois utilizados para a produção de biodiesel compreendem metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, n-butanol e isobutanol. Álcoois com massa molecular mais elevada têm a densidade e temperatura de ebulição mais elevados. Entre estes álcoois metanol e etanol são os mais baratos e produzidos em maior escala e, portanto, eles têm sido usados, principalmente, para a produção de biodiesel industrial [124].

Enquanto etanol e metanol são muito utilizados como aceptores acila, na maioria dos processos de transesterificação, *Yu et al 2013* mostraram que estes dois álcoois têm efeitos inibidores significativos nas lipases. A sua investigação mostrou que a desativação da enzima aumentou com o aumento de átomos de carbono do álcool. No entanto, este efeito inibitório pode ser controlado através do emprego de adição gradual do álcool [125]. Recentemente o uso de novos aceptores acila são investigados, como o acetato de etila, acetato de metila, acetato de butila, acetato de vinil e dimetil carbonato [126,127].

3.5.4 Efeito do co-solvente na transesterificação enzimática

A utilização de solventes orgânicos tem várias finalidades, incluindo: assegurar a mistura de reação homogénea, evitar problemas de formação de duas fases na reação, reduzir a viscosidade da mistura de reação para aumentar a velocidade de difusão, reduzindo assim os problemas de transferência de massa em torno da enzima e melhorando sua estabilidade [128]. Os solventes orgânicos protegem as enzimas da inativação causadas por concentrações mais elevadas de metanol / etanol e glicerol, uma vez que eles são capazes de melhorar a solubilidade mútua entre os álcoois hidrofílicos e os triglicerídeos hidrofóbicos [129].

Para superar a desativação da lipase e melhorar a sua atividade, vários solventes orgânicos têm sido utilizados para a síntese enzimática de biodiesel. Ciclo-hexano, n-hexano, terc-butanol, éter de petróleo, isooctano e 1,4-dioxano, são os mais estudados. Em sistemas com solvente, o álcool é adicionado totalmente desde o início; quando o sistema está livre de solvente, o álcool é adicionado em pequenas quantidades passo a passo para prevenir a desativação da enzima. [130] Geralmente, o hexano é o solvente preferido devido ao seu baixo custo e fácil disponibilidade no mercado. Alguns estudos foram realizados em sistemas hexano com óleo de soja e hexano com sebo usando álcoois monohídricos, Rodrigues *et al 2010* compararam os rendimentos de transesterificação de óleo de soja com etanol por *Lipozyme TL IM* na presença de n-hexano com razão molar de 1:7,5 óleo de soja/ etanol. A conversão de transesterificação foi de 100%, enquanto no sistema livre de solvente o rendimento foi de 75% [131].

Alguns estudos foram realizados na presença do solvente ter-butanol devido ao seu efeito positivo na reação de transesterificação enzimática. O ter-butanol tem

polaridade moderada e tanto metanol como glicerol são facilmente solúveis neste álcool. O metanol solubilizado em álcool ter-butílico impede a inibição da enzima e o glicerol produzido não se acumula no material do portador de enzima. A síntese enzimática do biodiesel também pode ser otimizada pela utilização de ter-butanol. A primeira planta em escala industrial do mundo a utilizar tecnologia enzimática está operando na China com capacidade de 20 milhões de toneladas por ano utilizando ter-butanol como co-solvente, o qual protege a enzima e proporciona alta produtividade [132].

Na metanólise, independentemente do tipo de lipase, a taxa de conversão é superior na presença de ter-butanol do que a obtida em sistema livre do solvente. A *Novozym 435* mostrou maior taxa de conversão com álcoois monohídricos e ter-butanol. *Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM* mostraram baixa conversão em sistema livre de solvente. Resultados semelhantes foram obtidos por *Halim e Raian*, na transesterificação de óleo de palma usando várias lipases comerciais (*Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozyme 435)* com ter-butanol no meio de reação [133]. Foi também demonstrado que, para o sistema com razão molar óleo/metanol 1:3, não há inibição da enzima *Novozyme 435* quando o ter-butanol é empregado. Du *et al* mostraram que *Lipozyme TL IM* pode ser usado sem perda de atividade até para 200 bateladas em sistema com ter-butanol como co-solvente [134].

Li *et al 2010* usaram mistura de acetonitrila e ter-butanol como co-solvente na transesterificação de óleo de stillingia com metanol. O maior rendimento de biodiesel (90,57%) foi obtido no sistema com 40% de ter-butanol e 60% de acetonitrila (v/v) como co-solventes. Eles também relataram que a mistura desses dois solventes aumentou a tolerância da lipase ao metanol [135].

3.5.5 Efeito da relação molar óleo/álcool na transesterificação enzimática

O rendimento na produção de biodiesel aumenta devido ao excesso molar do álcool sobre ácidos graxos nos triglicerídeos no sistema tradicional de transesterificação [84]. A reação de transesterificação é reversível. Assim, um aumento na quantidade de um dos reagentes resultará em maior rendimento dos ésteres produzidos e são necessários pelo menos três equivalentes molares de metanol para a conversão completa de éster metílico. Por outro lado, na transesterificação enzimática o metanol em excesso fica como gotículas insolúveis produzindo efeitos negativos sobre a atividade da enzima e também diminuindo o rendimento da reação [136]. Portanto é importante determinar a razão molar ideal de álcool e óleo no meio de reação, já que a inativação de lipases ocorre pelo contato com álcoois insolúveis, pois os álcoois altamente hidrofílicos eliminam a camada de água essencial para as enzimas [137].

Moreno-Pirajan e Giraldo adicionaram diferentes quantidades de álcool, ao meio reacional. Eles variaram desde 2,7 a 13,7 equivalentes molares de metanol e de 5,7 até 26,7 equivalentes molares para o etanol, na transesterificação de óleo de palma catalisada por lipase *C. rugosa.* A razão molar ideal de álcool encontrada com rendimento de 85% de ésteres metílicos, foi 10,4 [46]. Dizge *et al* usaram lipase imobilizada de *T. lanuginosus* para produzir biodiesel com óleo de canola e metanol, e investigaram o papel da razão molar. A produção de biodiesel foi conduzida em razões molares óleo/metanol que variaram desde 1:1 até 1:10 a temperatura de 40 °C, obtendo rendimento de éster metílico de 85,8% com razão molar óleo/metanol de 1:6 [138].

O aumento no número de moles de álcool pode resultar em um aumento da produção de ésteres, mas quando a formação de ésteres atinge o nível máximo, novas

adições de álcool podem causar diminuição na sua formação devido à possibilidade de inativação da enzima. Deste modo, a quantidade de álcool necessário para que a reação enzimática aconteça, pode variar significativamente dependendo da origem da lipase e da fonte de gordura utilizada [139].

3.6 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS

O uso de ferramentas estatísticas é amplamente utilizado com o intuito de conhecer como alguns fatores ou variáveis independentes podem influenciar uma variável dependente ou resposta. Entre as ferramentas estatísticas estão a análise de variância ANOVA, o planejamento fatorial completo e a metodologia de superfície de resposta. Em um planejamento fatorial são estudados as influências das variáveis experimentais de interesse (fatores) e os efeitos de interação entre elas na variável de resposta. O planejamento fatorial 2^K permite reduzir o número de experimentos necessários para a otimização de um processo [140]. Após conhecer os fatores significativos para a variável de resposta, é possível selecionar uma metodologia de superfícies de respostas como desenho de composto central (CCD), desenho Doehlert ou desenho Box-Behnken, que tem por objetivo atingir uma região ótima da superfície em estudo e assim encontrar os valores dos fatores que irão produzir a melhor resposta desejada [141]. O usso de desenhos fatoriais e metodologias de superfície de resposta também tem sido utilizado em estudos para a produção de biodiesel [142-146]. Em nosso estudo foram utilizados o deseho fatorial 2^2, 3^2 e 2^3 com o intuito de estudar através dos experimentos as variáveis que influenciam a produção de biodiesel como a relação molar óleo/álcool, o tempo de reação, o teor de água e a massa do biocatalisador; também era importante conhecer

como as variáveis interagiam entre elas, seu efeito na produção de ésteres e depois com o resultado avaliar com a análise de variância as que deram o resultado significativo. Após esses resultados foi feito o desenho Box;Behnken que permitiu observar a curvatura da otimização com a interação de alguns dos fatores estudados.

BIBLIOGRAFIA

[1] Singh SP, Singh D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. Renewable & Sustainable Energy Reviews 2010;14:200-216.

[2] Wang Y, Zhang LH. Ectoine improves yield of biodiesel catalyzed by immobilized lipase. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2010;62:90-95.

[3] Ramos LP, Da Silva FR, Mangrich AS, Cordeiro CS. Tecnologias de produção de biodiesel. Revista Virtual de Quimica 2011; 3:385-405

[4]http://www.anp.gov.br/wwwanp/publicacoes/anuarioestatistico/2441anuarioestatistico 2016#Seção4

[5] Energia MdMe. Resenha Energerg/publicacoes/anuarioestat8.

[6] Pousa G, Santos ALF, Suarez PAZ. History and policy of biodiesel in Brazil. Energy Policy 2007; 35:5393-5398.

[7] Garcez CAG, Vianna JND. Brazilian Biodiesel Policy: Social and environmental considerations of sustainability. Energy 2009;34:645-654.

[8] Abbaszaadeh A, Ghobadian B, Omidkhah MR, Najafi G. Current biodiesel production technologies: A comparative review. Energy Conversion and Management 2012;63:138-148.

[9] Avhad MR, Marchetti JM. A review on recent advancement in catalytic materials for biodiesel production. Renewable & Sustainable Energy Reviews 2015;50:696-718.

[10] Hama S, Kondo A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. Bioresource Technology 2013;135:386-395.

[11] Kuss VV, Kuss AV, da Rosa RG, Aranda DAG, Cruz YR. Potential of biodiesel production from palm oil at Brazilian Amazon. Renewable & Sustainable Energy Reviews 2015;50:1013-1020.

[12] Suarez PAZ, Santos ALF, Rodrigues JP, Alves MB. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. Energy Reviews 2009;32:768-775.

[13] Bolzani SE. *Etanólise do Óleo de Milho Empregando Catalisadores Alcalinos Enzimáticos*. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná; 2005.

[14] Brien RDO. Fats and Oils: Formulating and Precessing for Aplications. 3er Edition ed. New York; 2009.

[15] Demirbas A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. Progress in Energy and Combustion Science 2005; 31:466-487.

[16] Borges J. *Produção de lipases por fungos termofílicos e mesofílicos e uso na produção de biodiesel etílico*. Tese de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. 2012.

[17] Szczesna-Antczak M, Kubiak A, Antczak T, Bielecki S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. Renewable Energy 2009;34:1185-1195.

[18] Demirbas A. Biodiesel for Future Transportation Energy Needs. Energy Sources Part A: Recovery, Utilization & Environmental Effects, 2010;32:1490-1509

[19] Demirbas A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. Energy Conversion and Management 2009; 50: 14-34.

[20] Ghaly AE, Dave D, Brooks M S, Budge S.Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 2010; 6:54-76.

[21] Akoh CC, Chang SW, Lee GC, Shaw JF. Enzymatic approach to biodiesel production. J. Agric. Food. Chem. 2007; 55:8995-9005.

[22] Araujo V, Hamacher S, Scavarda LF. Economic assessment of biodiesel production from waste frying oils. Bioresource Technology 2010; 101:4415-4422.

[23] Predojevic ZJ, Skrbic BD. Alkali-catalyzed production of biodiesel from waste frying oils. Journal of the Serbian Chemical Society 2009; 74:993-1007.

[24] Predojevic ZJ. The production of biodiesel from waste frying oils: A comparison of different purification steps. Fuel 2008;87:3522-3528.

[25] Dias JM, Alvim-Ferraz MCM, Almeida MF. Comparison of the performance of different homogeneous alkali catalysts during transesterification of waste and virgin oils and evaluation of biodiesel quality. Fuel 2008;87:3572-3578.

[26] Uzun BB, Kilic M, Ozbay N, Putun AE, Putun E. Biodiesel production from waste frying oils: Optimization of reaction parameters and determination of fuel properties. Energy 2012;44:347-351.

[27] Jacobson K, Gopinath R, Meher LC, Dalai AK. Solid acid catalyzed biodiesel production from waste cooking oil. Applied Catalysis B-Environmental 2008;85:86-91.

[28] Kouzu M, Kasuno T, Tajika M, Sugimoto Y, Yamanaka S, Hidaka J. Calcium oxide as a solid base catalyst for transesterification of soybean oil and its application to biodiesel production. Fuel 2008;87:2798-2806.

[29] Liu XJ, Piao XL, Wang YJ, Zhu SF. Calcium ethoxide as a solid base catalyst for the transesterification of soybean oil to biodiesel. Energy & Fuels 2008;22:1313-1317.

[30] Wan T, Yu P, Wang SG, Luo YB. Application of Sodium Aluminate As a Heterogeneous Base Catalyst for Biodiesel Production from Soybean Oil. Energy & Fuels 2009;23:1089-1092.

[31] Zabeti M, Daud W, Aroua MK. Activity of solid catalysts for biodiesel production: A review. Fuel Processing Technology 2009;90:770-777.

[32] Ranganathan SV, Narasimhan SL, Muthukumar K. An overview of enzymatic production of biodiesel. Bioresource Technology 2008; 99:3975-3981.

[33] Semwal S, Arora AK, Badoni RP, Tuli DK. Biodiesel production using heterogeneous catalysts. Bioresource Technology 2011;102:2151-2161.

[34] de Almeida RM, Noda LK, Goncalves NS, Meneghetti SMP, Meneghetti MR. Transesterification reaction of vegetable oils, using superacid sulfated TiO2-base catalysts. Applied Catalysis a-General 2008;347:100-105.

[35] Jachmanian I, Dobroyan M, Moltini M, Segura N, Irigaray B, Veira JP, Vieitez I, Grompone MA. Continuous Lipase-Catalyzed Alcoholysis of Sunflower Oil: Effect of Phase-Equilibrium on Process Efficiency. Journal of the American Oil Chemists Society 2010; 87:45-53.

[36] Bajaj A, Lohan P, Jha PN, Mehrotra R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2010;62:9-14.

[37] Li LL, Du W, Liu DH, Wang L, Li ZB. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2006;43:58-62.

[38] Chen GY, Ying M, Li WZ. Enzymatic conversion of waste cooking oils into alternative fuel-biodiesel. Applied Biochemistry and Biotechnology 2006;132:911-921.

[39] Jeong GT, Park DH. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert-butanol. Applied Biochemistry and Biotechnology 2008;148:131-139.

[40] Atabani AE, Silitonga A S, Badruddin I A, Mahlia TMI, Masjuki HH, Mekhilef S. A. comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2012; 16: 2070-2093.

[41] Hama S, Kondo A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. Bioresource Technology 2013;135:386.

[42] Koh MY, Ghazi TIM. A review of biodiesel production from Jatropha curcas L. Oil. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2011;15: 224022-4035:

[43] Singh SP, Singh D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of biodiesel: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2010;12:200.

[44] Mander P, Cho SS, Simkhada JR, Choi YH, Park DJ, Yoo JC. An organic solvent Simkhada JR, Choi YH, Park DJ, Yoo JC. JC. fferr enzymatic transesterification of vegetable oils in organic media. Process Biochemistry 2012; 47:635-642.

[45] Huang D, Han S, Han Z, Lin Y. Biodiesel production catalyzed by Rhizomucor miehei lipase-displaying Pichia pastoris whole cells in an isooctane system. Biochemical Engineering Journal 2012; 63: 10-14.

[46] Moreno-Pirajan JC, Giraldo L. Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. Arabian Journal of Chemistry 2011; 4: 55.

[47] Talukder MMR, Das P, Fang TS, Wu JC. Enhanced enzymatic transesterification of palm oil to biodiesel. Biochemical Engineering Journal 2011; 55:119.

[48] Mata TM, Sousa IRBG, Vieira SS, Caetano NS. Biodiesel Production from Corn Oil via Enzymatic Catalysis with Ethanol. Energy Fuels 2012;26: 3034-3041.

[49] Chattopadhyay S, Karemore A, Das S, Deysarkar A, Sen R. Biocatalytic production of biodiesel from cottonseed oil: Standardization of process parameters and comparison of fuel characteristics. Applied Energy 2011; 88: 1251-1256.

[50] Jang MG, Kim DK, Park SC, Lee JS, Kim SW. Biodiesel production from crude canola oil by two-step enzymatic processes. Renewable Energy 2012; 42: 99-104.

[51] Tran DT, Yeh KL, Chen CL, Chang JS. Enzymatic transesterification of microalgal oil from Chlorella vulgaris ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized Burkholderia lipase. Bioresource Technology 2012; 108:119-127.

[52] Jain S, Sharma MP. Prospects of biodiesel from Jatropha in India: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2010;14:63-71.

[53] Hama S, Kondo A. Enzymatic biodiesel production: an overview of potential feedstocks and process development. Bioresour Technol 2013; 135:386

[54] Carvalho AKF, Da RDa Rdevelopment. Bioresour Technol 2aninc GM, de Castro HF. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. Ind Crops Prod 2013;50:485-93.

[55] Lu J, Nie K, Xie F, Wang F, Tan T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized Candida sp. Process Biochem 2007;42:1367-1370.

[56] Al-Zuhair S, Hussein A, Al-Marzouqi A H, Hashim I. Continuous production of biodiesel from fat extracted from lamb meat in supercritical CO_2 media. Biochemical Engineering Journal 2012; 60: 106-110.

[57] Da Ros PCM, De Castro HF, Carvalho AKF,. Soares CMF, De Moraes FF, Zanin GM. Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel. Ind Microbiol Biotechnol 2012; 39:529-536.

[58] Gnanaprakasam A, Sivakumar VM, Surendhar A, Thirumarimurugan M, KannadasanT. Recent strategy of biodiesel production from waste cooking oil and processin fluencing parameters:a review. JEnergy 2013;59:131-140.

[59] Hama S, Yoshida A,Tamadani N, Noda H, Kondo A. Enzymatic production of biodiesel from waste cooking oil in a packed-bedreactor:an engineering approach to separation of hydrophilic impurities. BioresourTechnol 2013;135:417-421.

[60] Firoz A, Mobin S, Chowdhury H. Third generation biofuel from algae. Procedia Eng 2015;105:763-768.

[61] Karatay SE, Donmez G. Microbial oil production from thermophile cianobacteria for biodiesel production. Applied Energy 2011;88:3632-3635.

[62] Mata TM, Martins AA, Caetano N S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2010;14: 217-232.

[63] Talebian-Kiakalaieh A, Amin N, Mazaheri H. Are view on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. Appl Energy 2013;104:683-710.

[64] Feofilova EP, Sergeeva YE, Ivashechkin AA. Biodiesel-fuel: content production, producers, contemporary biotechnology (Review). ApplBiochem Microbiol 2010;46:369-378.

[65] Kawentar WA, Budiman A. Synthesis of biodiesel from second-used cooking oil. Energy Procedia 2013;32:190-199.

[66] Stephen J, Periyasamy B. Innovative developments in biofuels production from organic waste materials: A review. Fuel 2018;214:623-633.

[67] Galadima A, Muraza O. Biodiesel production from algae by using hetero- geneous catalysts: a critical review. Energy 2014;78:72-83.

[68] Marchetti JM. A summary of the available technologies for biodiesel produc- tion based on a comparison of different feedstock's properties. Process Saf Environ Prot 2012;90:157-163.

[69] Avhad MR, Marchetti J.M. A review on recent advancement in catalytic materials for biodiesel production. Renew Sustain Energy Rev 2015;50:696-718.

[70] Vicentini KV, Vicentini A, Gomes da Rosa R, Aranda DAG, Cruz YR. Potential of biodiesel production from palm oil at Brazilian Amazon. Renew Sustain Energy Rev 2015;50:1013-1020.

[71] Baskar G, Aiswarya R. Trends in catalytic production of biodiesel from various feedstocks. Renew Sustain Energy Rev 2016;57:496-504.

[72] Nunes L. *Síntese Enzimática de Ésteres Catalisada por Lipases Imobilizadas em Diferentes Suportes*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 2013.

[73] Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª Edição ed; 2014.

[74] Cortez DV, de Castro HF, Andrade GS. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. Quim. Nova; 2017;40:85-96.

[75] Brzozowski, AM. Savage, H. Verma, CS. Turkenburg, JP, Lawson D M. Svendsen, A. Patkar, S. Structural origins of the interfacial activation in thermomyces (humicola) lanuginosa lipase. Biochemistry; 2000;39:15071-15082.

[76] Kuncova G, Szilva J, Hetflejs J, Sabata S. Catalysis in organic solvents with Lipase immobilized by Sol- Gel Technique. J. Sol-Gel. Sci. Technol 2003;26:1183-1187.

[77] Colen G. *Isolamento e Seleção de Fungos Filamentosos Prudutores de Lipase.* Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais 2006.

[78] Ribeiro B, Castro A, Coelho M, Freire D. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. Enzyme Res 2011;2011:1-16.

[79] Li W, Li R, Li Q, Du W, Liu D. Acyl migration and kinetics study of 1(3)- positional specific lipase of Rhizopus oryzae-catalyzed methanolysis of tri- glyceride for biodiesel production. Process Biochem 2010;45:1888-1893.

[80] Fjerbaek L, Christensen KV, Norddahl B. Are view of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. Biotechnol Bioeng 2009;102:1298-1315.

[81] Vaz MC. Biocatalizadores da Hidrólise de Triacilglicerois. Revista Eletrônica de Biología. Instituto Politécnico de Bragança. 2012.

[82] Oda M, Kaieda M, Hama S, Yamaji H, Kondo A, Izumoto E, Fukuda H. Facilitatory effect of immobilized lipase-producing Rhizopus oryzae cells on acyl migration in biodiesel fuel production. Biochemical Engineering Journal 2005;23:45-51.

[83] 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 2006;101:328-333.

[84] Fan X. Enzymatic biodiesel production – the way of the Future. Lipid Technology 2012;24:31-32

[85] Hasan F, Shah AA, Javed S, Hameed A. Enzymes used in detergents: lipases. African Journal of Biotechnology 2010;9:4836-4844.

[86] Zhang B, Weng Y, Xu H, Mao Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. Applied Microbiol Biotechnol 2012; 93:61-70.

[87] Kareem SO, Falokun EI, Balogun SA, Akinloye OA, Omeike SO. Enzymatic biodiesel production from palm oil and palm kernel oil using free lipase. Egyptian Journal of Petroleum 2017;26:635-642.

[88] Ranganathan SV, Narasimhan SL. Muthukumar K. An overview of enzymatic production of biodiesel. Bioresource Technology 2008;99:3975-3981.

[89] Treichel H, de Oliveira D, Mazutti MA, Di Luccio M, Oliveira JVA Review on Microbial Lipases Production. Food and Bioprocess Technology 2010; 3:182-196.

[90] Nwuche CO, Ogbonna JC. Isolation of Lipase Producing Fungi from Palm Oil Mill Effluent (POME) Dump Sites at Nsukka. Brazilian Archives of Biology and Technology 2011;54:113-116.

[91] Ognjanovic ND, Petrovic SD, Bezbradica DI, Knezevic-Jugovic ZD. Lipases as biocatalysts for biodiesel production. Hemijska Industrija 2010; 64:1-8.

[92] Chen GY, Ying M, Li WZ. Enzymatic conversion of waste cooking oils into alternative fuel-biodiesel. Applied Biochemistry and Biotechnology 2006;132:911-921.

[93] Halim SFA, Kamaruddin AH. Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. Process Biochemistry 2008; 43:1436-1439.

[94] Li NW, Zong MH, Wu H. Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from Penicillium expansum. Process Biochemistry 2009; 44:685-688.

[95] Ying M, Chen GY. Study on the production of biodiesel by magnetic cell biocatalyst based on lipase-producing Bacillus subtilis. Applied Biochemistry and Biotechnology 2007; 137:793-803.

[96] Hwang HT, Qi F, Yuan CL, Zhao XB, Ramkrishna D, Liu DH, Varma A. Lipase-Catalyzed Process for Biodiesel Production: Protein Engineering and Lipase Production. Biotechnology and Bioengineering 2014;111:639-653.

[97] Pizarro AVL, Park EY. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. Process Biochemistry 2003;38:1077-1082.

[98] Park EY, Mori M. Kinetic study of esterification of rapeseed oil contained in waste activated bleaching earth using Candida rugosa lipase in organic solvent system. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2005;37:95-100.

[99] Du W, Xu YY, Liu DH, Zeng J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2004;30:125-129.

[100] Wang L, Du W, Liu DH, Li LL, Dai NM. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2006;43:29-32.

[101] Nie KL, Xie F, Wang F, Tan TW. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2006;43:142-147.

[102] Bisen PS, Sanodiya BS, Thakur GS, Baghel RK, Prasad G. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. Biotechnology Letters 2010;32:1019-1030.

[103] Akoh CC, Chang SW, Lee GC, Shaw JF. Enzymatic approach to biodiesel production. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2007;55:8995-9005.

[104] Leca M, Tcacenco L, Micutz M, Staicu T.Optimization of biodiesel production by transesterification of vegetable oils using lipases.Romanian Biotechnological Letters 2010;15:5618-5630.

[105] Chen GY, Ying M, Li WZ. Enzymatic conversion of waste cooking oils into alternative fuel-biodiesel. Applied Biochemistry and Biotechnology 2006;132:911-921.

[106] Jeong GT, Park DH. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert-butanol. Applied Biochemistry and Biotechnology 2008;148:131-139.

[107] Szczesna-Antczak M, Kubiak A, Antczak T, Bielecki S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. Renewable Energy 2009;34:1185-1194.

[108] Verdugo C, Luna D, Posadillo A, Sancho ED, Rodriguez S, Bautista F. Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from Thermomyces lanuginosus: Optimization by response surface methodology. Catalysis Today 2011;167:107-112.

[109] Ying M, Chen GY. Study on the production of biodiesel by magnetic cell biocatalyst based on lipase-producing Bacillus subtilis. Applied Biochemistry and Biotechnology 2007; 137:793-803.

[110] Hama S, Yamaji H, Fukumizu T, Numata T, Tamalampudi S, Kondo A, Noda H, Fukuda H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing Rhizopus oryzae cells immobilized within biomass support particles. Biochemical Engineering Journal 2007; 34:273-278.

[111] Du W, Liu DH, Li LL, Dai LM. Mechanism exploration during lipase-mediated methanolysis of renewable oils for biodiesel production in a tert-butanol system. Biotechnology Progress 2007;23:1087-1090.

[112] Du W, Li W, Sun T, Chen X Liu, D. Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts. Applied Microbiology & Biotechnology 2008;79:331-338.

[113] Hsu AF, Jones K, Foglia TA, Marmer WN. Immobilized lipase-catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. Biotechnology and Applied Biochemistry 2002;36:181-186.

[114] Su F, Li GL, Fan YL, Yan YJ. Enhancing biodiesel production via a synergic effect between immobilized Rhizopus oryzae lipase and Novozym 435. Fuel Processing Technology 2015;137:298-304.

[115] Petersson AEV, Adlercreutz P, Mattiasson B. A water activity control system for enzymatic reactions in organic media. Biotechnology and Bioengineering. 2007;97:235-241.

[116] Gog A, Roman M, Tosa M, Paizs C, Irimie FD. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. Renewable Energy 2012;39:10-16.

[117] Jegannathan KR, Eng-Seng C, Ravindra P. Economic assessment of biodiesel production: Comparison of alkali and biocatalyst processes. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2011;15:745-751.

[118] Tan T, Lu J, Nie K, Deng L, Wang F, Biodiesel production with immobilized lipase: A review. Biotechnology Advances 2010;28:628-634.

[119] Noureddini H, Gao X, Philkana R S. Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. Bioresource Technology 2005 96:769-777.

[120] Shah S, Gupta MN. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. Process Biochem 2007;42:4092:409

[121] Kawakami K, Oda Y, Takahashi R. Application of a Burkholderia cepacia lipase immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude Jatropha oil. Biotechnology for Biofuels 2011;4:42-43.

[122] Chen X, Du W, Liu D. Effect of several factors on soluble lipase-mediated biodiesel preparation in the biphasic aqueous-oil systems. World J Microbiol Biotechnol 2008;24:2097-2102.

[123] Foresti ML, Pedernera M, Bucalá V, Ferreira ML. Multiple effects of water on solvent- free enzymatic esterifications. Enzyme and Microbial Technology 2007;41:62-70.

[124] Szczesna-Antczak M, Kubiak A, Antczak T, Bielecki S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. Renewable Energy 2009;34:1185-1194.

[125] Yu XW, Sha C, Guo YL, Xiao R, Xu Y. High-level expression and characterization of a chimeric lipase from Rhizopus oryzae for biodiesel production. Biotechnology for Biofuels 2013;6:29-40.

[126] Jeong GT, Park DH. Synthesis of rapeseed biodiesel using short-chained alkyl acetates as acyl acceptor. Appl Biochem Biotechnol 2010;161:195-208.

[127] Su EZ, Zhang MJ, Zhang JG, Gaoa JF, Wei DZ. Lipase-catalyzed irreversible transesterification of vegetable oils for fatty acid methyl esters production with dimethyl carbonate as the acyl acceptor. Biochemical Engineering Journal 2007;36:167-173.

[128] Poppe JK, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC, Ayub MAZ. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. Biotechnology Advances 2015;33:511-525.

[129] Yan YJ, Li X, Wang GL, Gui XH, Li GL, Su F. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. Applied Energy 2014;113:1614-1631.

[130] Antczak MS, Kubiak A, Antczak T, Bielecki S. Enzymatic biodiesel synthesis esis iesel and its high-valued derivatives: A review. swable Energy 2009;34:1185-1194.

[131] Rodrigues R, Pessela B, Volpato G, Fernandez-Lafuente R, Guisan J, Ayub M. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilizedlized chemical Enginerom Thermomyces lanuginosus. Process Biochemistry 2010; 45:1268-1273.

[132] Adamczak M, Bornscheuer UT, Bednarski W. The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. European Journal of Lipid Science and Technology 2009;111:800-813.

[133] Halim SFAl, Kamaruddin AH. Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. Process Biochemistry 2008;43:1436-1439.

[134] Du W, Liu D, Li L, Dai L. Mechanism exploration during lipase-mediated methanolysis of renewable oils for biodieselproduction in a tert-butanol system. Biotechnol Prog. 2007;23:1087-1090.

[135] Li Q, Zheng J, Yan Y. Biodiesel preparation catalyzed by compound-lipase in co-solvent. Fuel Processing Technology 2010;91:1229-1234.

[136] Ganesan D, Rajendran A, Thangavelu V. An overview on the recent advances in the transesterification of vegetable oils for biodiesel production using chemical and biocatalysts. Rev Environ Sci Biotechnol 2009;8:367-394.

[137] De Vieira APA, Da Sılva MAP, Langone MAP, Biodiesel production via esterification reactions catalyzed by lipase. Latin American Applied Research 2006;36:283-288.

[138] Dizge N, Keskinler B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. Biomass and Bioenergy 2008;32:1274-1278.

[139] Zhao T, NoDS, Kim Y, Kim YS, KimI-H. Novel strategy for lipase-catalyzed synthesis of biodiesel using blended alcohol as an acyl acceptor. JMolCatal B: Enzym 2014;107:17-22.

[140] R. Myers, D. Montgomery, and C. Anderson-Cook, Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. Wiley, 2009.

[141] Teófilo RF. Métodos Quimiométricos: Uma visão geral. Conceitos Básicos de Quimiometria. Viçosa MG. 2013.

[142] Shieh, CJ, Liao HF, Lee CC. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. Bioresour. Technol 2003;88:103-106.

[143] Nie K, Xie F, Wang F, Tan T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. J. Mol. Catal. B: Enzymatic 2006;43:142-147.

[144] Tan KT, Lee KT, Mohamed AR. Response to “Comment on a glycerol-free process to produce biodiesel by supercritical methyl acetate technology: An optimization study via response surface methodology”. Bioresour. Technol 2011;102:3990-3991.

[145] Verdugo C, Luna D, Posadillo A, Sancho ED, Rodriguez S, Bautista F, Luque R, Marinas JM, Romero AA. Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from thermomyces lanuginosus: Optimization by response surface methodology. Catal. Today 2011;167:107-112.

[146] Chang C, Chen JH, Chang CMJ, Wu TT, Shieh CJ. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by isopropanolysis in a continuous packed-bed reactor using response surface methodology. New Biotechnol 2009;26:187-192.

CAPÍTULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e Soluções

Para a preparação dos meios de cultura os reagentes utilizados foram de grau analítico, das marcas DIFCO, HIMEDIA, Synth e Biobrás. Para as análises por cromatografia líquida e gasosa foram utilizados os solventes e padrões da marca Sigma-Aldrich de grau cromatográfico Para o cultivo dos fungos foi usado meio de cultura líquido com a seguinte composição: Caldo de batata dextrosado (24 g L^{-1}), Peptona bacteriológica (5,0 g L^{-1},), $NaNO_3$ (1,0 g L^{-1}), K_2HPO_4 (1,0 g L^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$ (0,5 g L^{-1}) [1]. Para a reação de transesterificação foram utilizados álcool metílico marca Synth, e álcool ter-butílico marca Vetec e óleo de soja adquirido no comércio local.

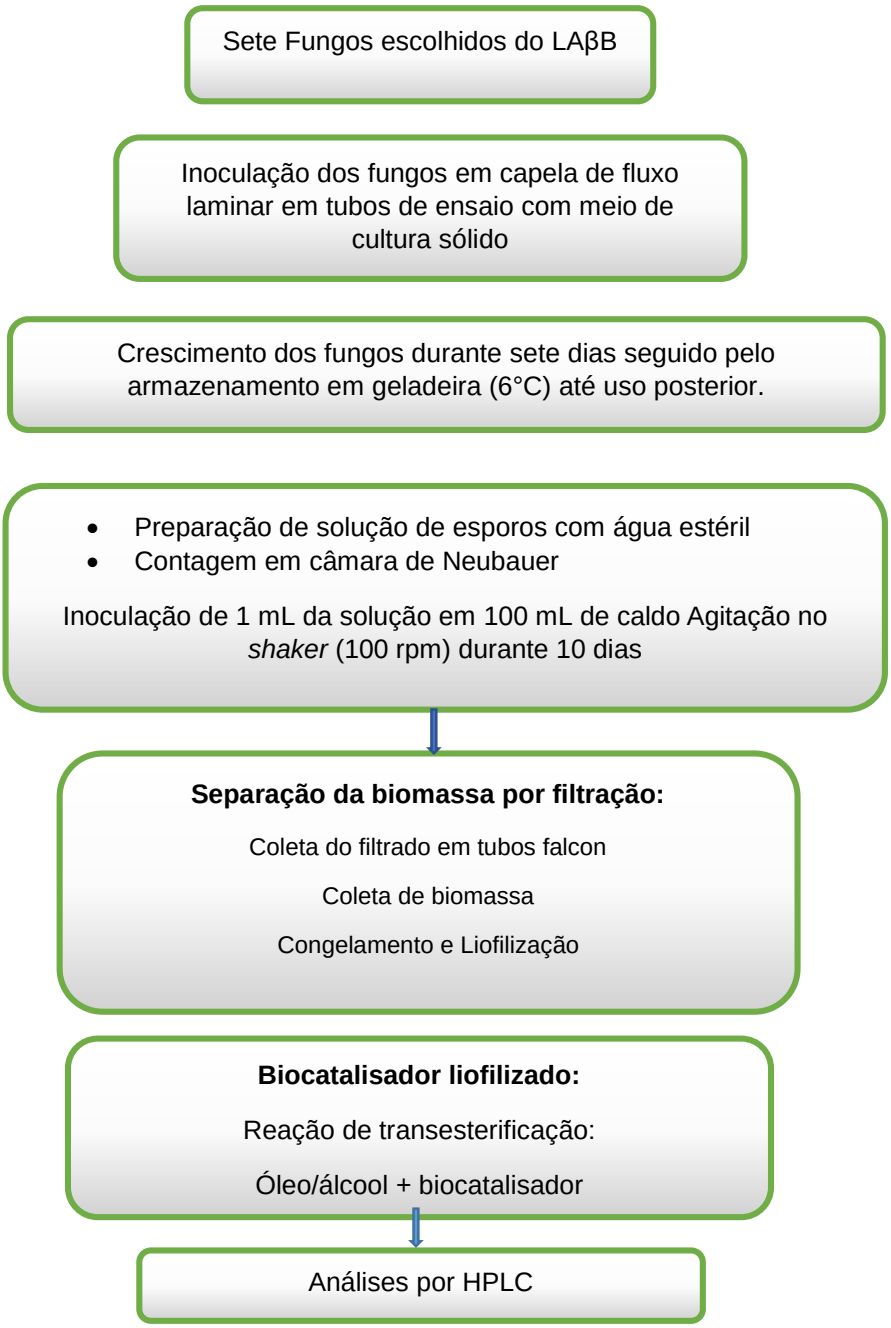
4.2 Fungos

Sete fungos da coleção do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LaβB) foram escolhidos para serem avaliados com relação ao seu potencial para produção de lipase, visando a sua utilização como catalisador na reação de transesterificação. Os fungos foram codificados como: *Mucor plumbeus*, (M.p) *Penicillium citrinum*, (P.c) *Syncephalastrum racemosum,* (S.r) *Penicillium janthinellum,* (P.j) *Rhizopus stolonifer,* (R.s) *Rhizopus oryzae* (R.o) e *Aspergillus niger* (A.n).

R. oryzae foi considerado como referência, pois existem inúmeros trabalhos na literatura que utilizam a lipase proveniente deste fungo, para a produção de biodiesel por via enzimática.

A Figura 4.1 sumariza as etapas experimentais desenvolvidas deste trabalho para a seleção dos fungos mais promissores visando a produção de lipase para a sua utilização na reação de transesterificação como catalisador (produção de biodiesel).

Figura 4.1 *Fluxograma das etapas experimentais de preparo, cultivo dos fungos e obtenção do biocatalisador para realização da reação de transesterificação*



Os procedimentos que envolveram cultivo e manipulação de micro-organismos que foram conduzidos em capela de fluxo laminar (Capela VECO, modelo JLF 912, série FL 5799). Os materiais utilizados na manipulação dos micro-organismos foram esterilizados em autoclave vertical Fanen, modelo 415/3, série J03610.

4.2.1 Manutenção e cultivo fúngico

Para manutenção dos fungos foi utilizado o meio de cultura sólido (ágar batata dextrosado (Biobrás S.A.) (39,0 g L^{-1}), preparado em água destilada. A solução obtida foi aquecida até a formação de um líquido translúcido, que foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 min. Foram preparados tubos de ensaio com meio de cultura sólido inclinado. Cada fungo foi repicado com uma alça de platina estéril. O crescimento ocorreu durante 48h à temperatura ambiente. Subsequentemente, estes foram armazenados na geladeira durante 7 dias para uso posterior.

Figura 4.2 *Execução da inoculação de fungos em ágar (protocolo LAβB)*

4.2.2 Preparo das suspensões de esporos

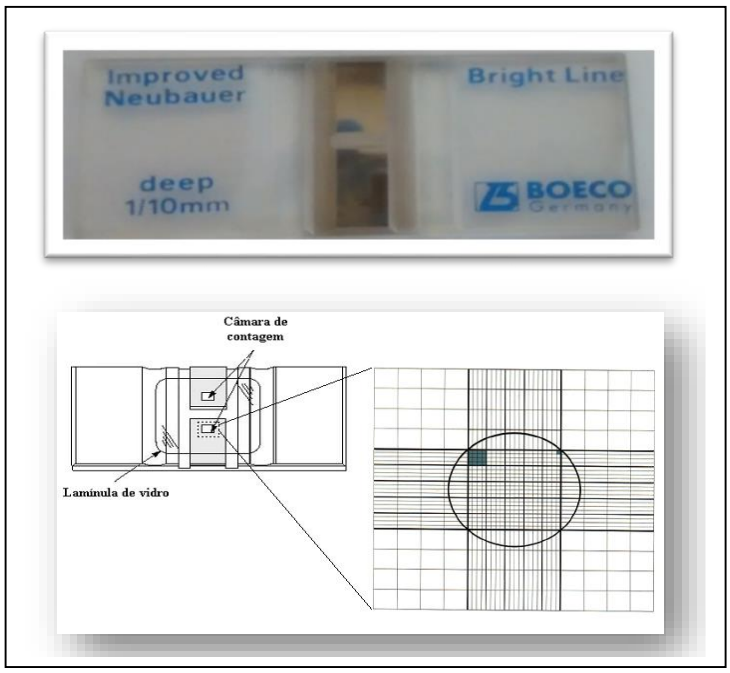
Para a preparação da suspensão de esporos dos fungos filamentosos foram utilizados os fungos incubados em ágar batata. Em seguida, foi adicionada água estéril

(água destilada após tratamento em autoclave) e o meio foi agitado manualmente. Posteriormente, foi realizada a raspagem com cotonete para a liberação dos esporos e foi realizada uma diluição adequada para que a concentração final fosse da ordem de 5 x 10^3 esporos mL^{-1}.

4.2.3 Contagem de esporos

A suspensão contendo esporos foi padronizada por contagem de esporos por mL utilizando-se câmara de Neubauer (Figura 4.3) visualizada no microscópio Olympus CX40 e com base nos protocolos do *(LAβB)*

Figura 4.3 *Câmara de Neubauer utilizada para contagem dos esporos* [1] *[Autora]*



Cada câmara é dividida em nove quadrados grandes. O quadrado grande central é subdividido em 25 quadrados médios. Estes 25 quadrados são novamente subdivididos em 16 quadrados menores. Uma lamínula deve ser utilizada para cobrir as duas câmaras de contagem. Uma alíquota de 100 µL da suspensão preparada foi pipetada e adicionada

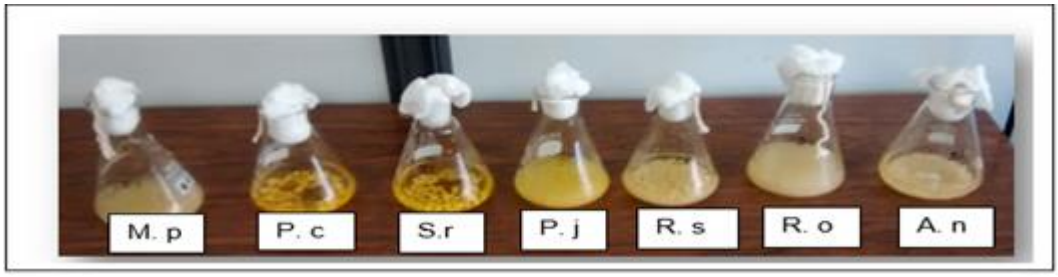
à câmara, para a contagem de esporos, uma lamínula foi utilizada para cobrir a câmara. A contagem de esporos foi realizada em microscópio (objetiva de 40x). Após a contagem, a quantidade de esporos por mL foi calculada, conforme a equação abaixo.

$Esporos.mL^{-1}$= (média esporos/2) x 10.000 =5 x 10^3 (**Equação 1**)

4.2.4 Separação da biomassa

Após 10 dias de formação de biomassa com agitação constante (agitação 100 rpm) esta foi separada da parte líquida em papel filtro. O líquido foi recolhido em tubos tipo Falcon e a biomassa separada também foi acondicionada em tubos Falcon. Depois ambas as frações foram liofilizadas.

Figura 4.4 *Ilustração das Biomassas obtidas para os sete fungos [Autora]*



M. plumbeus, (M.p) *P. citrinum*, (P.c) *S. racemosum,* (S.r) *P. janthinellum,* (P.j) *R. stolonifer,* (R.s) *R. oryzae* (R.o) e *A. niger* (A.n).

A Figura 4.5 apresenta as imagens das etapas para obtenção dos biocatalisadores utilizados na reação de transesterificação para a produção de biodiesel.. Após a obtenção da biomassa, o caldo foi separado por filtração. Tanto a biomassa(micélio) quanto o caldo (50 mL) foram colocados em tubos falcon e foram submetidos ao processo de liofilização em Liofilizador LIOBRAS K105 até total secura do material (3 dias). .

Figura 4.5 *Etapas para obtenção dos biocatalisadores a partir da biomassa produzida por fungo.*

4.2.5 Otimização de parâmetros reacionais

Para selecionar os fungos escolhidos com maior potencial para serem usados como biocatalisadores, foram realizados estudos preliminares, para avaliação de alguns parâmetros como razão molar óleo/álcool, tempo de reação, teor de água e tipo de interação do meio (agitação, ultrassom). A Tabela 4.1 sumariza as condições dos experimentos realizados para a otimização de alguns parâmetros reacionais. Todos os fungos foram submetidos a cada uma das condições experimentais apresentadas no Tabela 4.1

Tabela 4.1 *Otimização de alguns parâmetros reacionais (razão molar óleo/álcool, tempo de reação, temperatura, velocidade de agitação) no trabalho com os fungos M. plumbeus (M.p), P. citrinum (P.c), S. racemosum (S.r), P. janthinellum (P.j), R. stolonifer (R.s), R. oryzae (R.o) e A. niger (A.n).*

Condições experimentais			
Experimento N°	Razão molar (óleo/álcool*)	Tempo de reação (h)	Teor de água % v/v
1	1:3	72	
2	1:6	24, 48, 72	Água em excesso
3	1:3 1:6 1:12	60	
	1:3 1:6 1:12	72	
4	1:12	60, 72, 84, 96, 120	
5	1:12	72, 96, 120, 144	
6	1:12	72	
7			

*Tempo de crescimento da biomassa 10 dias; *A velocidade de agitação do *shaker* foi 100 rpm. Os experimentos 6 e 7 foram realizados visando comparar os resultados com agitação no *shaker* (100 rpm) e o ultrassom (1 min e 50% de 500 watts)

* razão molar óleo/ álcool; onde álcool é uma mistura 1:1 de álcool metílico/ter- butílico

Conforme apresentado na Tabela 4.1 diversas condições foram testadas para os sete fungos escolhidos. Com o objetivo de melhorar as condições reacionais o parâmetro relação molar óleo/álcool foi variado. No início foi utilizada uma relação molar óleo/álcool 1:3, a qual foram testadas outras como 1:6 e 1:12. Para avaliar a influência do tempo de reação na obtenção do produto final foram testados tempos que variaram de 60 horas até 144 horas, além destas variáveis foram estudadas também o teor de água e modo de agitação no meio reacional (*shaker* e ultrassom).

Nos estudos preliminares, para a reação de transesterificação, foram realizados utilizando o próprio meio de cultura (caldo), após a formação da biomassa, como catalisador como é apresentado na Figura 4.6. Assim, nos primeiros experimentos o teor de água foi 100%. Ensaios posteriores foram realizados com teores de água que variaram entre 2 e 8%(m/m), pois o teor de água, quando utilizamos a lipase como catalisador, tem um papel bastante expressivo no resultado da reação [2].

Figura 4.6 *Reação de transesterificação usando caldo sem liofilização*

A partir dos resultados obtidos optou-se por trabalhar em um primeiro momento com o filtrado do caldo liofilizado (lipase extracelular) e posteriormente, com a biomassa liofilizada (micélios), lipase intracelular).

Para dar continuidade aos estudos foram selecionados os seguintes fungos: *S. racemosum, R. stolonifer* e *R. oryzae* , pois estes apresentaram os melhores resultados quando se utilizou o caldo liofilizado como biocatalisador .

4.3 Avaliação da reutilização das biomassas sem liofilizar e produzidas pelos fungos *S. racemosum, R. stolonifer e R. oryzae*

Após ter sido produzidas as biomassas para os fungos *S. racemosum, R. stolonifer e R. oryzae*, estas foram separadas do caldo, pesadas e, em seguida, usadas como biocatalisador. A reação de transesterificação foi realizada uma primeira vez com a biomassa de cada fungo. Em seguida, esta biomassa foi reutilizada por mais 2 vezes para avaliação de seu potencial de reutilização como catalisador.,

4.4 Avaliação de parâmetros reacionais para os fungos *S. racemosum. R. stolonifer* e *R. Oryzae*

4.4.1 Caldo liofilizado como biocatalisador

Foi pesada cerca de 0,880 g de óleo de soja comercial, a esta massa foi adicionada uma mistura 1:1 de álcool metílico/ter- butílico e o caldo liofilizado (onde 50 mL de caldo liofilizado produz cerca de 0,2-0,3 g) como biocatalisador. O álcool ter-butílico é adicionado ao meio reacional para aumentar a solubilidade do álcool com o óleo permitindo a transesterificação enzimática. O seu uso também evita a desativação da lipase e melhorando a sua atividade. As reações de transesterificação foram realizadas à temperatura ambiente sob agitação. Com o intuito de determinar aquele(s) parâmetro(s) mais significativos para a produção de biodiesel em nível estatístico foram avaliados o teor de água (%m/m), relação molar (óleo/álcool) e tempo de reação (h), e a forma do catalisador (em meio aquoso ou liofilizado) [2-4].

A Tabela 4.2 apresenta as condições experimentais testadas para os fungos selecionados.

Tabela 4.2 *Otimização de alguns parâmetros reacionais (razão molar óleo/álcool, tempo de reação, temperatura, velocidade de agitação) no trabalho com os fungos S. racemosum, R. stolonifer e R. oryzae*

Condições experimentais			
Experimento N°	Razão molar (óleo/álcool*)	Tempo de reação (h)	Quantidade de biocatalisador
8	1:12	84	
9	1:12	72	0,2-0,3 g
10	1:12	72	
11	1:12	72	
12	1:12	84	
13	1:12	84	
14	1:12	60 e 84	
15	1:15	72 e 96	

*Tempo de crescimento da biomassa 10 dias e velocidade de agitação do *shaker* foi 100 rpm, Teor de água 5% m/m.

* razão molar óleo/ álcool; onde álcool é uma mistura 1:1 de álcool metílico/ter- butílico

4.5 Estudo dos parâmetros reacionais tempo de reação, relação molar óleo/álcool, teor de água e quantidade do biocatalisador para os fungos *S. racemosum* e *R. stolonifer* na sua forma de filtrado liofilizado

Por ter apresentado os melhores resultados nas condições experimentais otimizadas o fungo *S. racemosum* foi selecionado para um estudo mais detalhado de sua utilização como biocatalisador para a reação de transesterificação.

4.5.1 Planejamento Fatorial 3^2 para o fungo *S. racemosum*

Para avaliar alguns parâmetros reacionais para o fungo *S. Racemosum* foi utilizado um planejamento fatorial 3^2. Assim, podemos determinar a influência significativa dos fatores em estudo e determinar quais seriam as condições mais favoráveis para a realização dos experimentos visando a maior conversão em teor de ésteres. Duas variáveis foram selecionadas, para o estudo da síntese de biodiesel: relação molar óleo/álcool e tempo de reação. A Tabela 4.3 apresenta os níveis propostos para as variáveis do planejamento experimental 3^2 o que resultou em nove experimentos [5-9].

Na Tabela 4.3 são apresentadas as condições experimentais utilizadas no planejamento 3^2 visando a formação de ésteres utilizando o caldo liofilizado do fungo *S. racemosum* como biocatalisador, com o teor de água 5,34 % m/m.

Tabela 4.3 *Condições experimentais do planejamento 3^2 utilizando o caldo liofilizado como biocatalisador produzido pelo fungo S. racemosum*

Variável	**-1**	**0**	**+1**
Relação molar óleo/álcool	1:3	1:6	1:9
Tempo de reação (h)	24	48	72

4.5.2 Análise do Teor de água (Método Karl Fischer)

A determinação do teor de água foi realizada pelo o método Coulométrico utilizando a reação Karl Fischer. Os equipamentos e reagentes utilizados foram Coulômetro 831 KF, equipado com eletrodo gerador e eletrodo indicador, balança analítica com precisão de +/- 0,01 mg, seringa com capacidade total de 5 mL, solução de

Karl Fischer catódica Hydranal Coulomat CG, solução de Karl Fischer anódica Hydranal Coulomat AG, xileno grau reagente, hexano grau reagente, óleo mineral, peneira molecular e metanol [10].

4.5.3 Secagem de metanol

Para a obtenção do metanol seco, foram misturados 5 g de magnésio seco limpo e aquecido e 0,5 g de iodo com 50-75 mL de metanol "absoluto" em um balão até o iodo desaparecer e todo o magnésio ter sido convertido a metóxido. Em seguida, foi adicionado metanol até completar 1 L. Após o refluxo por 2-3 h foi retirada a umidade do sistema [11].

4.5.4 Avaliação do teor de água

Para avaliar a influência do teor de água no meio reacional optou-se por empregar a técnica estatística de análise de variância (ANOVA) para esta variável em 3 níveis (2, 5 e 8% (%m/m)) e as condições de relação molar 1:6 e tempo de reação de 72 horas. Para análise de resultados foi utilizado o programa STATISTICA 8.

4.5.5 Análise dos produtos da reação de transesterificação

Os perfis cromatográficos foram obtidos em cromatógrafo líquido da marca SHIMADZU, modelo LC- 20AT, com sistema de gradiente binário e detector de UV/VIS, modelo SPD – 20 A, à temperatura de 40 ºC. Foi utilizada uma coluna ODS HYPERSIL de dimensão 250 mm x 46 mm. As amostras foram diluídas em metanol para perfazerem uma solução de concentração 1% (v/v). Uma alíquota de 20 µL das amostras foi injetada. Como fase móvel foram utilizados os seguintes solventes: metanol, 2-propanol e hexano (grau HPLC). No reservatório A foi adicionado metanol e no reservatório B uma solução contendo 2-propanol e hexano em uma proporção de 5:4 (v/v). Foi empregado um

gradiente linear de 100% de A para 50% de A e 50% de B em 15 minutos. A eluição foi feita isocraticamente com 100% de B, por mais 5 minutos, totalizando um tempo de análise de 20 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 1mL/min. O comprimento de onda de detecção utilizado foi o λ = 205 nm. Para tratamento dos dados foi utilizado o software LC Solution da Shimadzu [12].

4.5.6 Determinação da atividade enzimática do material liofilizado

Para a determinação da atividade enzimática usou-se metodologia adaptada de Winkler e Stuckmann (1979). Por definição, uma unidade de atividade enzimática é a quantidade necessária para liberar 1 µmol de para-nitrofenol (pNP) por mg de proteínas e por mL do preparado enzimático adicionado ao ensaio, por min.

Prepararam-se as seguintes soluções:

- Solução A, que consiste em dissolver 90 mg de *p*-nitrofenil palmitato (pNPP) em 30 mL de isopropanol. Essa solução foi estocada a -18 °C e resfriada à temperatura ambiente no momento do uso.
- Solução B, tampão da reação adicionando-se 9 g de Triton x-100 e 0,90 g de goma arábica em 450 mL de tampão Tris-HCl 0,09 M, pH 8,0. Essa solução foi estocada a 4 °C e resfriada à temperatura ambiente no momento do uso.
- Solução C, que consiste no gotejamento lento e suave de 1 parte de solução A sobre 9 partes de solução B em agitação suave. Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso e permanece estável por 1 hora.

As amostras foram preparadas da seguinte forma: Em uma placa de micro ensaio adicionaram-se 40 µL de amostra (ou de amostra diluída, de forma que as absorbâncias

obtidas caíssem entre 0,1 e 0,9 a 405 nm), 160 µL de solução C e procedeu-se a leitura a 37° C por 10 minutos. Observaram-se as leituras inicial e final.

Para a construção da curva analítica, preparou-se a curva de *p*-nitrofenol (pNP) em isopropanol nas concentrações 35,94 µM (micro molar), 71,9 µM, 143,8 µM 215,7 µM, .287,6 µM, e 359,5 µM diretamente na placa de micro ensaio (placa de Elisa). Em seguida, procedeu-se a leitura em Leitora de microplacas TP-Reader Marca Thermoplate no comprimento de onda 405 nm, à temperatura ambiente. O valor da absorbância do branco foi subtraído daqueles valores de absorbâncias das soluções padrões preparadas e com estes valores construiu-se a curva analítica a 405nm.

O resultado é dado em unidades de atividade enzimática por mL de enzima usada, por minuto de reação, ou seja, a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de pNP por mL, por minuto de reação nas condições ensaiadas.

4.6 Estudo do fungo *S. racemosum* na sua forma biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador

Com o intuito de avaliar a produção de ésteres na reação de transesterificação foram feitos experimentos utilizando a biomassa liofilizada do fungo S. racemosum como biocatalisador e os fatores tempo de reação, razão molar óleo/álcool e massa do biocatalisador [5-9].

.

4.6.1 Planejamento Fatorial 2^K

Com o intuito de analisar como os fatores tempo de reação, relação molar óleo/álcool e quantidade do catalisador influenciam a variável de resposta formação de éster que é apresentada como % área de éster obtida pelo análise HPLC, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 apresentado na Tabela 4.4 onde os níveis para cada variável se codificaram como -1 (nível baixo) e +1 (nível alto).

Tabela 4.4 *Planejamento fatorial 2^3 para estudo dos parâmetros reacionais quando se utiliza o S. Racemosum na sua forma biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador.*

Tempo de reação (t_R) (h)	Razão molar óleo/álcool	Massa do catalisador (g)
1	1	1
-1	1	1
1	-1	1
-1	-1	1
1	1	-1
-1	1	-1
1	-1	-1
-1	-1	-1

Fatores	Níveis	
	-1	1
Tempo (h)	24	72
Razão Molar	1:3	1:9
Massa catalisador (g)	0,1	0,5

* razão molar óleo/ álcool; onde álcool é uma mistura 1:1 de álcool metílico/ter- butílico

Tabela 4.5 *Desenho Box-Behnken para estudo dos parâmetros reacionais quando se utiliza o S. Racemosum na sua forma biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador*

Tempo de reação (t_R) (h)	Razão molar (óleo/álcool*)	Massa do catalisador (g)
-1	1	0
-1	-1	0
-1	0	1
-1	0	-1
0	1	-1
0	1	1
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	-1	-1
0	-1	1
1	1	0
1	0	-1
1	0	1
1	-1	0

Fatores	Níveis	
	-1	0
Tempo (h)	24	48
Razão Molar	1:3	1:6
Massa catalisador (g)	0,1	0,5

* razão molar óleo/ álcool; onde álcool é uma mistura 1:1 de álcool metílico/ter- butílico

4.6.2 *Clean up* do produto da reação

A partir dos resultados obtidos nos experimentos com planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta, foram realizados experimentos com as condições ótimas para a formação do biodiesel: cerca de aproximadamente 0,880 gramas de óleo, teor de água de 5% m/m, relação molar óleo álcool 1:6, massa do biocatalisador 0,300 gramas e tempo de reação 48 horas. Em seguida, o produto da reação foi separado (volume final 30 mL). Para proceder-se a uma etapa de extração com 1mL de dietil éter(4vezes). A camada superior contendo o biodiesel e a inferior o glicerol foram então separadas. O solvente em excesso foi evaporado com nitrogênio. Em seguida, o biodiesel foi submetido a 4 lavagens com volume de 1mL de água para retirada de qualquer resíduo de glicerol. A amostra foi centrifugada a cada lavagem para separação das fases. Ao final adicionou-se sulfato de sódio anidro para retirada total da água e o biodiesel purificado foi analisado por GC-FID.

4.6.3 Análise por cromatografia gasosa com detecção por chama (GC-FID)

A determinação de teor de ésteres em biodiesel foi realizada em cromatógrafo gasoso com detector FID, auto-injetor, modelo GC-2010-Shimadzu e sistema computacional com software GCsolution para análise de dados. As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes: volume de amostra injetada 1 µL no modo split 50:1, gás de arraste hidrogênio a um fluxo de 1,5 $mLmin^{-1}$, temperatura do injetor 255 °C, temperatura do detector 260 °C programação do forno foi: isoterma de 60 °C por 1 minuto, depois aumento da temperatura a uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} até 200 °C, seguido de aumento de temperatura até 250 °C a uma taxa de 5 °C* min. A temperatura final foi mantida por e se manteve assim por 15 minutos [13].

4.7 Estudo do fungo *R. stolonifer* na sua forma de caldo liofilizado como biocatalisador

4.7.1 Planejamento Fatorial 3^2 para o fungo *R. stolonifer*

A Tabela 4.6 apresenta as condições para o planejamento fatorial 3^2 feito utilizando o caldo liofilizado produzido com o fungo *R. stolonifer*

Tabela 4.6 *Condições experimentais do planejamento 3^2 utilizando o caldo liofilizado como biocatalisador produzido pelo fungo R. stolonifer*

Variável	**-1**	**0**	**+1**
Relação molar óleo/álcool	1:3	1:6	1:9
Tempo de reação (h)	24	48	72

4.7.2 Avaliacao do efeito do teor de água para o fungo *R. stolonifer*

Foi utilizada a técnica de análise de variância ANOVA para avaliar como a variável teor de água influencia nos produtos da reação de transesterificação usando o caldo liofilizado produzido pelo fungo *R. stolonifer.*

4.8 Estudo do fungo *R. stolonifer* na sua forma biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador

Com o intuito de avaliar a produção de ésteres na reação de transesterificação foi realizado o experimento utilizando a biomassa liofilizada do fungo *R. stolonifer* como biocatalisador e os fatores tempo de reação, razão molar óleo/álcool e massa do biocatalisador. As condições para cada um desses fatores são apresentadas na Tabela 4.7

Tabela 4.7 *Desenho Box-Behnken para estudo dos parâmetros reacionais quando se utiliza o fungo* R. stolonifer na sua forma biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador

Tempo de reação (t_R) (h)	Razão molar (óleo/álcool*)	Massa do catalisador (g)
-1	1	0
-1	-1	0
-1	0	1
-1	0	-1
0	1	-1
0	1	1
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	-1	-1
0	-1	1
1	1	0
1	0	-1
1	0	1
1	-1	0

Fatores	Níveis	
	-1	0
Tempo (h)	24	48
Razão Molar	1:3	1:6
Massa catalisador (g)	0,1	0,5

* razão molar óleo/ álcool; onde álcool é uma mistura 1:1 de álcool metílico/ter- butílico

4.9 Comparação entre as biomassas liofilizadas e as biomassas sem liofilizar dos fungos *S. racemosum* e *R. stolonifer*

Foram realizados experimentos utilizando a biomassa de cada fungo como biocatalisador sem e com liofilização. Os resultados obtidos foram comparados entre si e as diferenças com a análise de variância foram analisadas.

4.10 Determinação do teor de glicerol livre no produto final por Espectrofotometria de Absorção Molecular na região de UV-Vis (EAM UV-Vis)

O teor de glicerol livre presente no meio reacional foi determinado pela técnica de Espectrofotometria de Absorção Molecular na região de UV-Vis. O método espectrofotométrico determina o teor de glicerol livre pela sua oxidação com o periodato, conhecida como reação de Hantzsch. A leitura é realizada no comprimento de onda de 410 nm.

Reagentes e Soluções:

Solução de ácido acético 1,6 mol/L (9,6 g/100 mL), solução de acetato de amônio 4,0 mol/L (30,8 g/100 mL), misturadas em volumes iguais, essas soluções resultam em uma solução tampão de pH 5,5.

Solução de Acetilacetona, 0,2 mol/L: 195 mg de acetilacetona em 5 mL de solução de ácido acético e 5mL de solução de acetato de amônio. Este reagente deve ser preparado diariamente.

Solução de periodato de sódio, 10 mmol/L: pesar 21 mg de periodato de sódio, adicionar 5mL da solução de ácido acético, agitar para dissolver o periodato até ficar

completamente dissolvido, adicionar 5 mL de solução de acetato de amônio. Este reagente deve ser preparado diariamente.

Solução de água e etanol (95%) 1:1 Este solvente é usado para extração da amostra, e das soluções padrão de glicerol e solução estoque de glicerol.

Solução padrão de glicerol: pesar aproximadamente 150 mg de glicerol para um balão de 50 mL. Dissolver na mistura 1:1 de água e etanol e preencher até à marca. Esta solução contém 3 mg/mL de glicerol.

Solução estoque de glicerol: usando uma pipeta de precisão, transferir 1mL da solução padrão de glicerol para um balão de 100 mL diluir com o a mistura de solventes 1:1 Esta solução contém 0,03 mg/mL de glicerol.

Preparo da curva de analítica

Com uma série de dez tubos de ensaio de 10 mL, transferir, 0,00, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50, 1,75 e 2,00 mL da solução estoque de glicerol 0,03 mg/mL. Diluir com a mistura de solventes 1:1 perfazendo um volume final de 2 mL em cada tubo. Adicionar 1,2 mL de solução de periodato de sódio 10 mmol/L e agitar durante 30 s. Em seguida, adicionar 1,2 mL da solução de acetilacetona 0,2 mol/L e colocar em um banho maria a 70 ° C durante 1 min e depois agitar manualmente. Após o tempo de reação, cada amostra deve ser resfriada 2 min até temperatura ambiente. As amostras são, finalmente, lidas em um espectrofotômetro Multiskan spectrum termo scientific, no comprimento de onda de 410 nm.

Preparo das amostras:

Num tubo de ensaio 10 mL, pesar 1 g de amostra do produto final da reação de transesterificação, dissolver em 4mL de hexano e adicionar 4mL da mistura de solventes

(1:1) agitar durante 5 min em Vortex, em seguida centrifugar por 15 min a 2000 rpm, após a centrifugação, remover a camada superior, usando uma pipeta Pasteur, transferir exatamente 0,5 mL da camada inferior para um tubo de ensaio de 10 mL e seguir o mesmo procedimento realizado para o preparo das soluções padrão [14].

BIBLIOGRAFIA

[1] Oliveira MR. *Obtenção de biodiesel via catálise enzimática e caracterização através de técnicas cromatográficas e espectrometria infravermelho associada a calibração multivariada*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.

[2] Yunjun Y, Xiang L, Guilong W, Xiaohua G, Guanlin L, Feng S, Xiaofeng W, Tao L. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. Applied Energy 2014;113:1614-1631

[3] Antczak MS, Kubiak A, Antczak T, Bielecki S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. Renewable Energy 2009;34:1185-1194.

[4] Nasir NF, Daud WRW, Kamarudin SK, Yaakob Z. Methyl Esters Selectivity of Transesterification Reaction with Homogenous Alkaline Catalyst to Produce Biodiesel in Batch, Plug Flow, and Continuous Stirred Tank Reactors. International Journal of Chemical Engineering 2014;2014:1-13.

[5] Neto B, Bruns RE, Scarminio IS. Como Fazer Experiments: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na indústria. 2a ed, Campinas. Unicamp 2001.

[6] R. Myers, D. Montgomery, and C. Anderson-Cook, Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. 3a ed, USA. Wiley 2009.

[7] Brito ES, Pinto GAS, Bruno LM. A metodologia de superfície de resposta (MSR) na otimização de processos biológicos: A determinação dos valores de pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática. Universidade Federal de Ceará. Available at http://sbbq.iq.usp.br/arquivos/regional/2002/cdresumo/Estendido/001.pdf Accessed 11 September 2017

[8] Miller JC, Miller JN. Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4a ed, Madrid. Pearson 2002.

[9] Mongay FC. Quimiometría, 1a ed, Valencia. PUV 2005.

[10] Wilfred L.F Amarego. Christina L.L. Chai. Purification of laboratory chemicals 6 ed. Burlington. Elsevier, 2009.

[11] Standard Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils, and Additives by Coulometric Karl Fischer Titration. ASTM D6304 - 16ed. USA. 2007.

[12] Holcapek M, Jandera P, Fisher J, Prokes B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. J. Chromatogr. A. 1999;858:13-31.

[13] EN 14103 Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. USA 2003.

[14] Bondioli P, Della Bella L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel Eur. J. Lipid Sci. Technol 2005;107:153-157

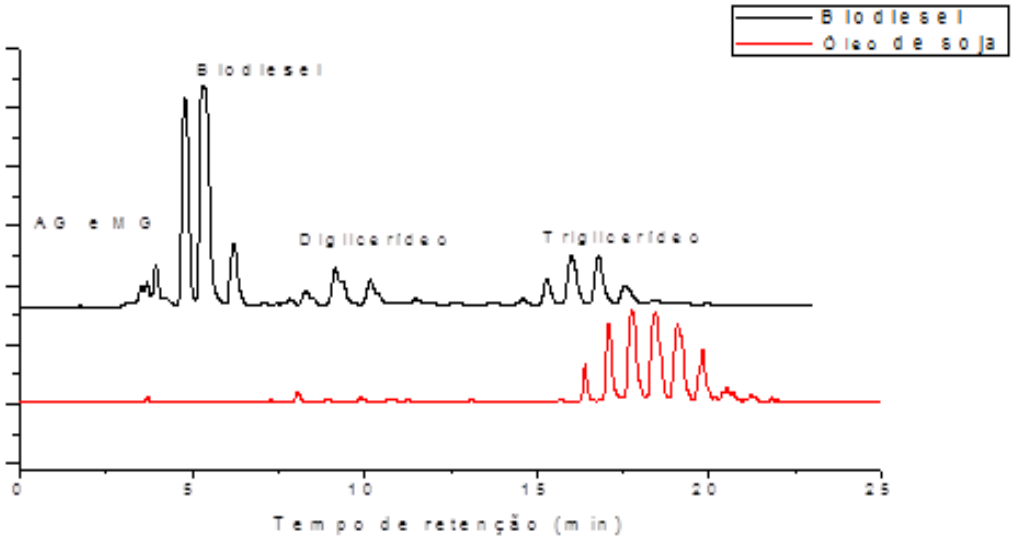
CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção dos Fungos.

Os sete fungos escolhidos foram avaliados quanto ao seu potencial para serem usados como biocatalisadores na produção de biodiesel. A técnica de HPLC foi utilizada para monitorar a reação de transesterificação em que estes fungos foram utilizados como biocatalisadores. A Figura 5.1 apresenta os cromatogramas do óleo de soja e seu respectivo biodiesel. Ela mostra que existem regiões específicas em que se pode identificar a predominância dos TG, DG, MG, AGL e ésteres (biodiesel). Assim é possível através desta técnica monitorar a extensão em que a reação de transesterificação está ocorrendo.

***Figura 5.1**. Cromatogramas do óleo de soja e seu respectivo biodiesel obtidos pela técnica de HPLC mostrando as regiões características da presença de TG, DG, MG AGL e ésteres (biodiesel).*



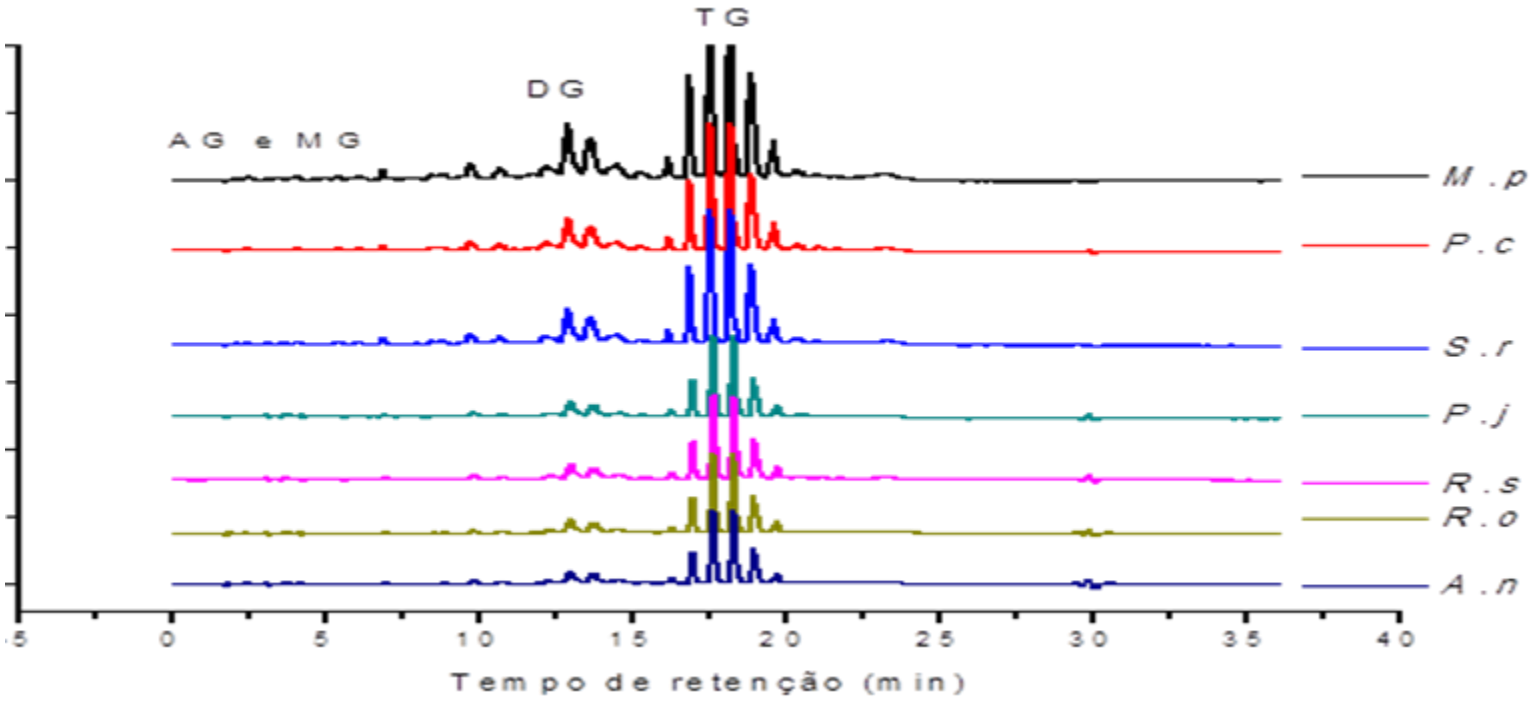
Os sete fungos escolhidos foram avaliados quanto ao seu potencial para ser usados como biocatalisadores na produção de biodiesel, A Figura 5.2 apresenta os cromatogramas obtidos para os fungos codificados como *M. plumbeus, P. citrinum, S. racemosum*, *P. janthinellum*, *R. stolonifer*, *R. oryzae* e *A. niger*.

5.1.1 Triagem dos 7 fungos do estudo.

Após ter sido obtida a biomassa para cada fungo e a biomassa submersa no caldo, onde ela se desenvolveu, este produto (caldo + biomassa) foi utilizado como biocatalisador na reação de transesterificação nas condições de tempo de reação 72 horas, relação molar óleo/álcool 1:3, temperatura ambiente e agitação 100 rotações por minuto (100 rpm) [1]. A Figura 5.2 apresentada os resultados dos perfis cromatográficos

das amostras de biodiesel obtidos com os sete fungos analisados. Observa-se que não houve a formação de ésteres (biodiesel), pois não há nenhum sinal na região caracterisitca destes compostos. Há apenas sinais correspondentes aos triglicerídeos TG), diglicerídeos(DG), monoacilglicerídeos (MG) e ácidos graxos livres(AGL).

Figura 5.2 *Cromatogramas obtidos por HPLC para o estudo realizado para os fungos selecionados no LAβB para serem avaliados com relação ao seu potencial para a produção de biodiesel. As condições empregadas foram aquelas As condições utilizadas foram relação molar óleo/álcool (1:3), temperatura ambiente, agitação 100 rpm e tempo de reação 72h. M. plumbeus (M.p), P. citrinum (P.c), S. racemosum (S.r), P. janthinellum (P.j), R. stolonifer (R.s), R. oryzae (R.o) e A. niger (A.n).*



.

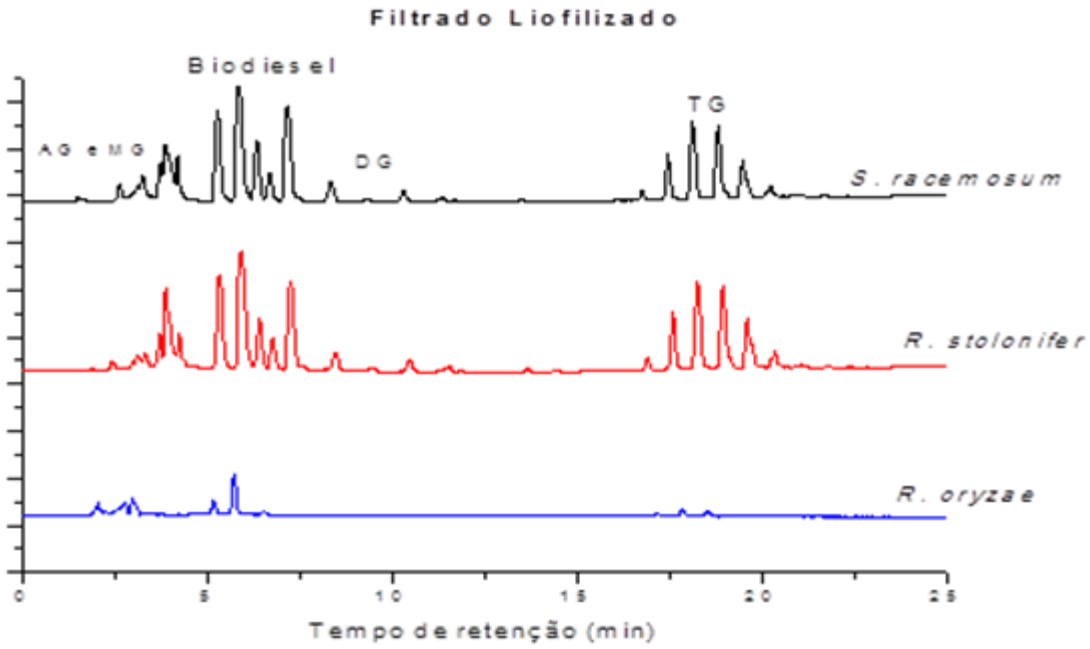
Estes primeiros resultados mostram que a reação de transesterificação não ocorreu e consequentemente não houve a produção do biodiesel, pois não podemos identificar nenhum pico na região de ésteres. Assim, foram realizados novos experimentos em diferentes condições. Como foi apresentado no Quadro 4.1 foram avaliados alguns parâmetros que podem afetar o processo de transesterificação, relação molar óleo/álcool, tempo de reação e teor de água entre outras.

Os resultados posteriores correspondem as variações das variáveis que afetam, principalmente, o processo de transesterificação. Algumas das variáveis operacionais mais importantes são a temperatura de reação, tempo de reação, a relação molar de álcool para óleo, concentração e tipo de catalisador, teor de água e tipo de matérias-primas [2].

Foi detectado que o alto teor de água poderia estar dificultando a formação de ésteres na reação de transesterificação. Assim, optou-se por liofilizar o material obtido após a produção da biomassa de cada fungo no meio de cultura. Em seguida, este material foi utilizado como biocatalisador.

A Figura 5.3 mostra que após o processo de liofilização do biocatalisador foram obtidos os melhores resultados na produção de biodiesel com os fungos *S. racemosum, R. stolonifer e R. Oryzae*. Houve uma redução dos picos na região dos triglicerídeos e um aumento na região dos ésteres. Já para os fungos *M. plumbeus, P. citrinum, P. janthinellum*, e *A. niger*, não foi possível obter os ésteres após a reação de transesterificação. Desta forma, deu-se sequencia ao trabalho utilizando-se os fungos *S. racemosum, R. stolonifer e R. oryzae*.

Figura 5.3 *Perfil cromatográfico para os filtrados dos fungos S. racemosum, R. stolonifer e R. oryzae. (tempo de reação 72h, relação molar óleo/álcool 1:3)*



Aqui fica evidenciado que a redução da quantidade de água presente no filtrado, que foi usado como biocatalisador, melhorou a extensão em que ocorreu a reação de transesterificação. A desidratação por liofilização do filtrado recolhido tem a vantagem de se tornar um produto atemporal e manter as suas propriedades até seu uso na reação de transesterificação. Esse procedimento também é apropriado para remover o alto conteúdo de água, que pode afetar a reação.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos usando o caldo liofilizado como biocatalisador foram selecionados os seguintes fungos para dar continuidade ao trabalho: *S. racemosum, R. stolonifer* e *R. Oryzae.*

5.2 Reutilização dos biocatalisadores

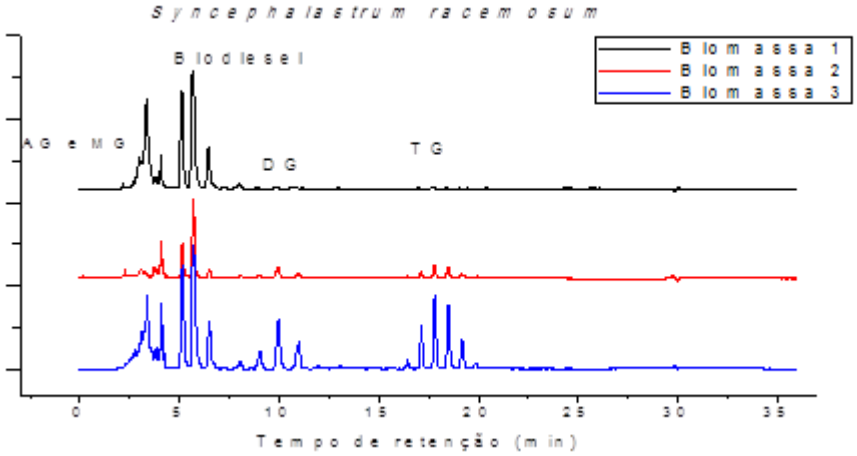
Para avaliar o potencial biocatalítico da reutilização das biomassas liofilizadas produzidas pelos fungos *S. racemosum, R. stolonifer e R. oryzae,* foram realizados experimentos em que se reutilizaram estas biomassas (biocatalisadores). A Tabela 5.1 apresenta os rendimentos em porcentagens de área de ésteres do experimento feito com biomassa nova, biomassa reutilizada pela segunda e terceira vez . As Figuras 5.4 a,b e c apresentam os cromatogramas correspondentes para cada um dos fungos.

Tabela 5.1 *Rendimentos em teor de ésteres para as diferentes biomassas de fungos utilizadas.*

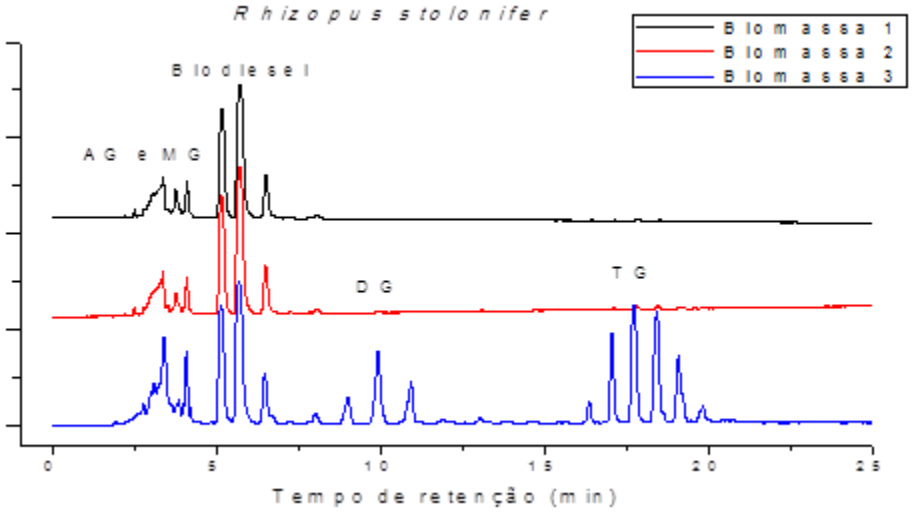
Biomassa	**Fungo** ***S. racemosum***	**Fungo** ***R. stolonifer***	**Fungo** ***R. oryzae***
		% Área de éster	
Nova (1)	66,6	69,7	58,1
Reutilizada pela 2 vez	54,2	69,6	67,2
Reutilizada pela 3 vez	36,9	29,4	36,2

Figura 5.4 a, b e c. *Biomassa nova (Biomassa 1) e Biomassas reutilizadas (Biomassa 2 e Biomassa 3), (a) S. racemosum, R. stolonifer e R. oryzae. Relação molar 1:12, Tempo de reação 72 horas.*

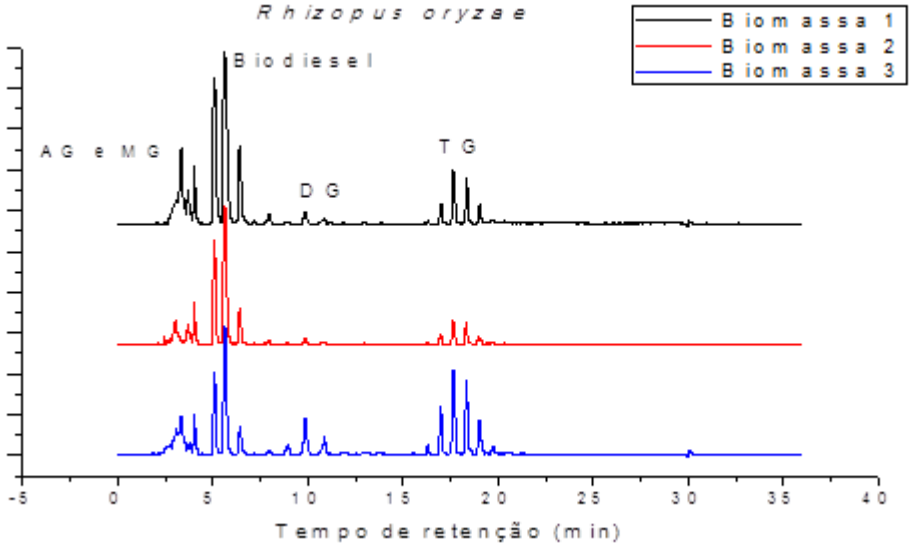
a)



b)



c)


Rhizopus oryzae
Biomassa 1
Biomassa 2
Biomassa 3
Biodiesel
AG e MG
DG
TG
-5
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tempo de retenção (min)

É possível observar nas Figuras 5.4 a, b e c, que a reutilização do biocatalisador produzido pelos fungos *S. racemosum R. stolonifer* e *R. oryzae* acontece a reação de transesterificação até uma segunda apresenta uma boa resposta, mas que para uma terceira reutilização a reação não é favorável.

Com o intuito de otimizar as variáveis tempo de reação, relação molar, teor de água e quantidade de biocatalisador para os resultados já obtidos optou-se por dar continuidade aos trabalhos com os fungos *S. racemosum* e *R. Stolonifer,* como biocatalisadores.

5.3 Avaliação de parâmetros reacionais tempo de reação e relação molar óleo/álcool, para os fungos *S. racemosum, R.stolonifer* e *R. Oryzae*

5.3.1 Caldo liofilizado como biocatalisador

Os parâmetros relação molar óleo/álcool e tempo de reação (h), e a forma do catalisador (em meio aquoso ou liofilizado) foram avaliados com o intuito de determinar aquele(s) mais significativo para a produção de biodiesel em nível estatístico. A Tabela 4.2, na seção de Metodologia, apresenta as condições experimentais testadas para os fungos selecionados.

5.3.1.1 Tempo de reação

Como a reação de transesterificação é uma reação reversível [3] é importante conhecer qual é a faixa de tempo em que a reação ocorre e qual é o tempo em que se tem a melhor taxa de conversão em biodiesel.

Com o intuito de avaliar a influência do parâmetro tempo de reação no rendimento de biodiesel para os três fungos selecionados *S. racemosum, R. stolonifer e R. oryzae.* foram realizados experimentos em que a relação molar óleo/álcool foi de 1:12. A Tabela 5.2 apresenta os rendimentos em porcentagens de área de ésteres obtidos para cada um dos fungos estudados. Com base nestes resultados, observa-se que há uma diferença significativa no rendimento da reação com relação aos tempos de reação de 60, 72, 84, 96 e 120 horas avaliados.

Tabela 5.2 *Rendimentos em Percentagem de área de ésteres em função do tempo de reação, para uma razão molar de 1:12*

FUNGO	**TEMPOS DE REAÇÃO (h)**				
	60	72	84	96	120
	% Área de éster				
S. racemosum	57,2	57,7	58	65,9	0,4
R. stolonifer	60,2	55,6	67,6	59,6	0,5
e R. oryzae	12,2	31	69,7	0,6	26,7

Com os resultados obtidos é possível observar que o melhor tempo para o fungo *S. racemosum* foi 96 horas apresentando um % de área de ester de 65,9%. No caso do fungo *R. Stolonifer e R. oryzae* este tempo correspondeu a 84 horas com uma porcentagem de área de ésteres de 67,6% e 69,7%, respectivamente.

Foram realizados experimentos utilizando as condições a partir das quais os fungos já começaram a fazer a transesterificação, assim para os fungos *S.*

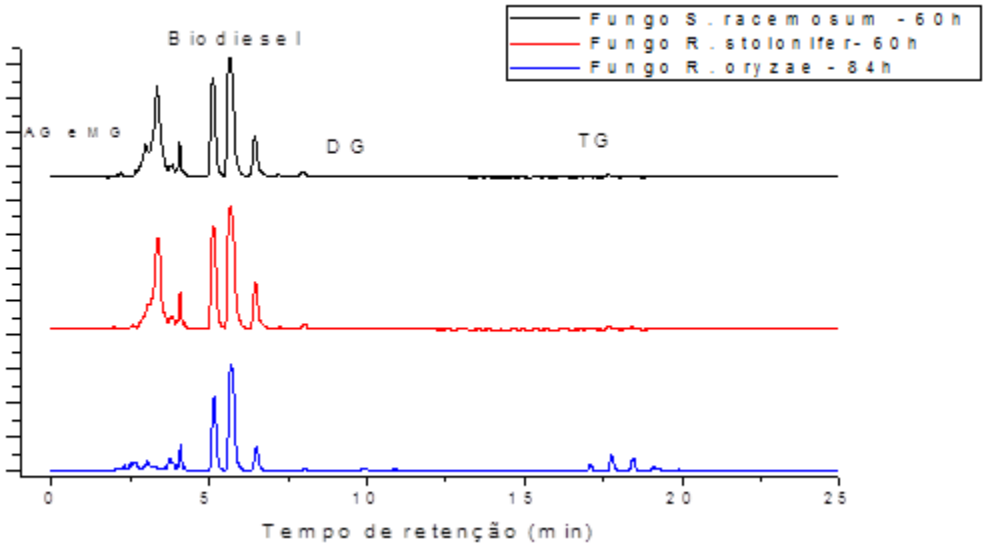
racemosum e R. stolonifer, o tempo de reação de 60 horas e para o fungo *R. oryzae* 84 horas. Os experimentos foram conduzidos com razão molar óleo/álcool 1:12. A Tabela 5.3 apresenta os resultados obtidos neste experimento e os valores médios para cada fungo.

Tabela 5.3 *Rendimentos em áreas de ésteres para os fungos S. racemosum, R. stolonifer (60 h de tempo de reação) e R. oryzae (84 h de tempo de reação). Cada fungo por triplicata.*

	Fungo	**Fungo**	**Fungo**
Réplica	***S. racemosum***	***R. stolonifer***	***R. oryzae***
	% Área de éster		
1	65,1	74,2	70,1
2	57,5	65,9	62,0
3	64,8	64,3	66,4
Média	**62,5 +/- 4,3**	**68,2 +/- 5,3**	**66,2 +/- 4,1**

Os três fungos obtiveram bons resultados para as suas triplicatas (valores médios 62,5% para *S. racemosum,* 68,2% para *R. stolonifer* e 66,2% para *R. oryzae,* no entanto, o fungo *R. stolonifer* obteve o melhor resultado, já que não apresenta nenhum sinal na região de triglicerídeos e conseguiu a melhor conversão em termos de ésteres. A Figura 5.5 apresenta os cromatogramas para a reação de transesterificação desenvolvida nos tempos de reação, que foram mais favoráveis para cada um dos fungos usados como biocatalisadores.

Figura 5.5 *Cromatogramas da reação de transesterificação com biocatalisador produzido pelos fungos S. racemosum, R. stolonifer, e R. oryzae. em tempos de reação de 60 e 84 horas e relação molar óleo/álcool 1:12*



A Figura 5.5 mostra que para o fungo *R. Oryzae, após um tempo de 84 h* ainda há a presença de triglicerídeos. Já para os fungos *S. racemosum, R. stolonifer* o tempo gasto para a reação ocorrer foi menor, 60 h. O rendimento em termos de % área de ésteres é bem baixo variando entre 62 a 68% para os fungos estudados.

5.3.1.2 Relação Molar

Um aumento na quantidade de álcool pode favorecer a formação de biodiesel na reação, no entanto, um excesso pode desativar a lipase produzida pelo fungo [4]. Foram realizados novos experimentos fazendo uma variação da razão molar óleo/álcool variando desde 1:3, 1:6 e 1:12 aumentando o teor de álcool a cada 24 horas e foi escolhido o tempo final de reação de 72 horas,o anterior com o intuito de avaliar se o aumento progressivo (passo a passo) do álcool na reação de transesterificação favorecia a formação de ésteres.

A Tabela 5.4 apresenta os resultados da conversão em ésteres destes experimentos em porcentagens de área de éster, para cada um dos fungos utilizados como biocatalisadores.

***Tabela 5.4* %** *Área de éster para os fungos (a) S. racemosum, (b) R. stolonifer e (c) R. oryzae, nas condições tempo de reação 72 horas e relações molares óleo/álcool 1:3, 1:6, e 1:12.*

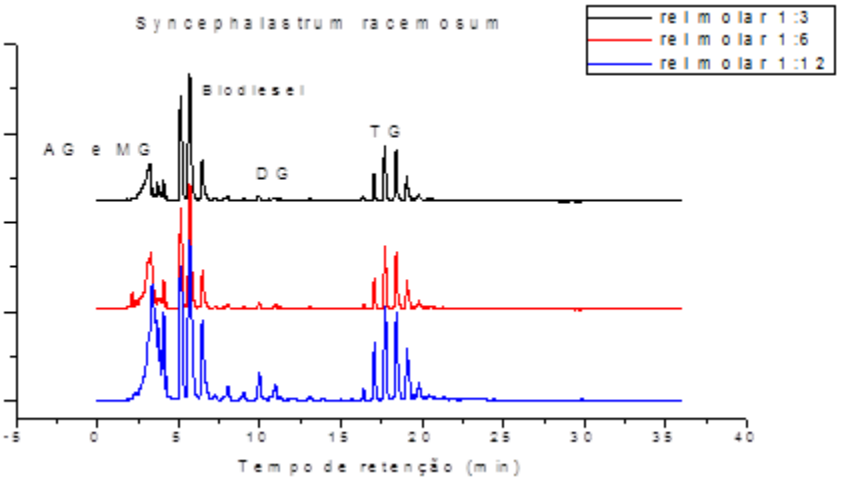
	RAZÃO MOLAR(óleo: álcool*)		
FUNGO	**1:3**	**1:6**	**1:12**
S. racemosum	55,5	45,9	36,2
R. stolonifer	57,9	52,8	49,7
R. oryzae	32,6	57,9	63,3

* razão molar óleo/ álcool; onde álcool é uma mistura 1:1 de álcool metílico/ter- butílico

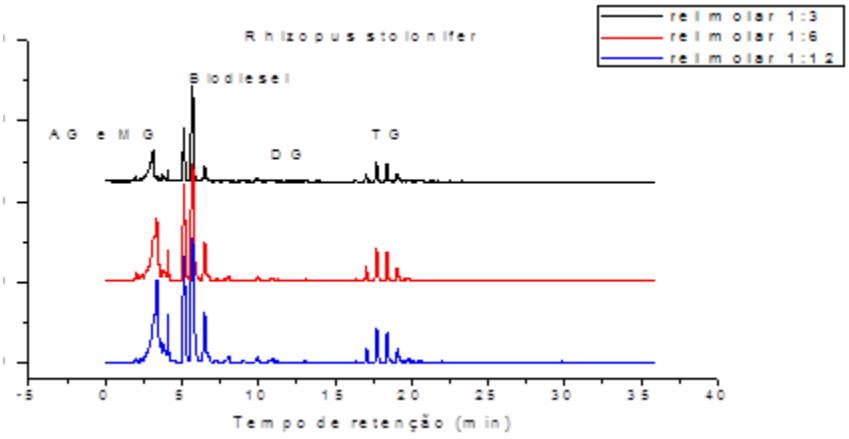
As Figuras 5.6 a, b e c apresentam os resultados dos experimentos realizados onde a relação molar óleo/álcool variou entre 1:3, 1:6 e 1:12 e o tempo reacional total foi de 72 horas.

Figuras 5.6 a, b e c, *Perfil cromatográfico das amostras do (a) S. racemosum, (b) R. stolonifer e (c) R. oryzae, Tempo de reação 72 horas, para relações molares óleo/álcool 1:3, 1:6, e 1:12.*

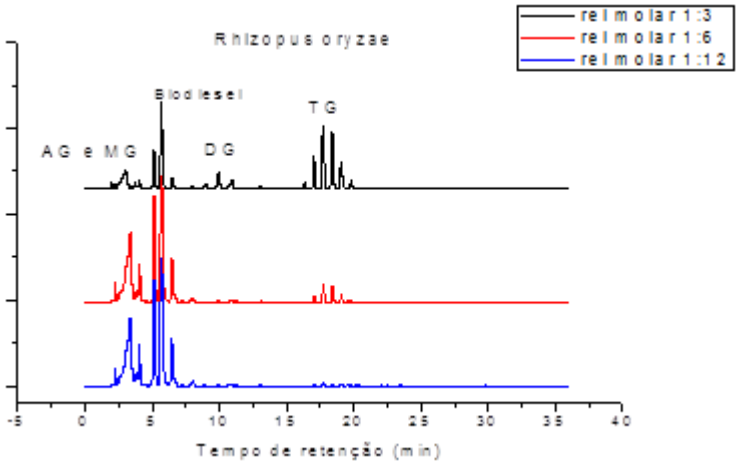
a)



b)



c)



As Figuras 5.6 a, b e c mostram que as relações molares óleo/álcool de 1:3 e 1:6 são mais favoráveis quando se utiliza como biocatalisadores os fungos *S. racemosum* e *R. stolonifer* . No entanto, para o fungo *R. oryzae* a relação molar 1:12 foi melhor para a produção do biodiesel. O excesso molar de álcool sobre os ácidos graxos contidos nos TG sempre aumenta o rendimento da reação de transesterificação mas também pode inativar a atividade catalítica do biocatalisador, em particular quando o álcool é insolúvel na mistura de reação [5]. Um estudo realizado por Du *et al*. revelou que a utilização de razão molar de álcool/óleo 3:1, 4:1 e 5:1 num sistema isento de solvente catalisada por lipase de *T. lanuginose* IM, resultou em rendimentos de 75, 92 e 80%, respectivamente, de metil ésteres de ácidos graxos [6].

Neste momento do trabalho o fungo *R. oryzae* foi retirado dos experimentos, já que ele era o fungo de referência com relação aos inúmeros trabalhos reportados

na literatura,. Desta forma, demso prioridade para os fungos *S. racemosum* e *R. Stolonifer*, dos quais exsitem menos relatos na literatura.

5.4 Estudo dos parâmetros reacionais tempo de reação, relação molar óleo/álcool, teor de água e quantidade do biocatalisador para os fungos *S. racemosum* e *R. stolonifer* na sua forma de filtrado liofilizado.

5.4.1 Análise dos parâmetros reacionais para o fungo *S. racemosum*

5.4.1.1 Planejamento fatorial 3^2

O rendimento do biodiesel aumenta devido ao excesso molar do álcool sobre os ácidos graxos nos triglicerídeos no sistema de transesterificação tradicional [7]. A reação de transesterificação é reversível e um aumento na quantidade de um dos reagentes resultará num maior rendimento dos ésteres e são necessários, como mínimo, 3 equivalentes molares de metanol para a conversão completa [8].

A partir do planejamento fatorial 3^2 foram realizados os experimentos com variação da relação molar óleo/álcool e tempo de reação. Os resultados obtidos são expressados em porcentagem de área de éster na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 *Porcentagens de área de éster obtidos para o planejamento 3^2 com o caldo liofilizado como biocatalisador produzido pelo fungo S. racemosum*

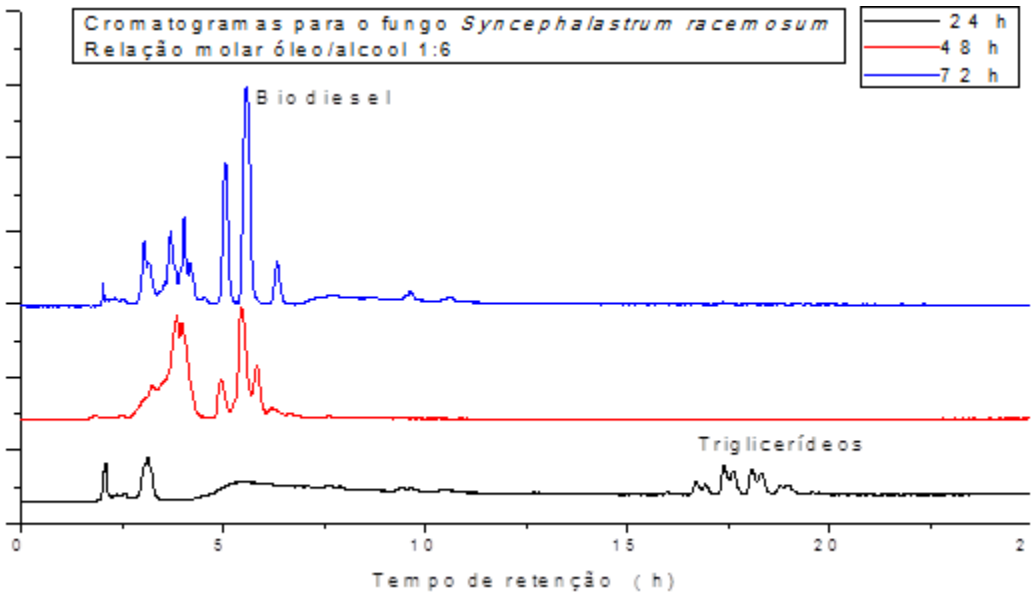
Razão molar	Tempo de reação (h)		
	24	**48**	**72**
	% área de éster		
1:3	46,2	37,4	40,1
1:6	0,3	42,9	52,6
1:9	1,2	45,7	40,5

A Tabela 5.5 mostra que o melhor resultado em % área de éster foi obtido para uma razão molar de 1:6 e 72 h de tempo de reação. Um incremento na razão molar até 1:9 fez diminuir o rendimento, o que é razoável já que quantidades maiores do álcool no meio reacional podem conduzir a queda da atividade do biocatalisador.

A Figura 5.7 apresenta os cromatogramas obtidos para os tempos de 24, 48 e 72 horas, relação molar 1:6, e teor de água de 5 % (%m/m). Há a presença do sinal caraterístico dos ésteres formados (biodiesel) na região de tempo de retenção entre 5 min – 6,5 min. Esta região é caracterizada pelos picos relativos à formação de ésteres, que evidencia a extensão com que a reação de transesterificação ocorreu. Observa-se que a medida em que há um aumento do tempo de reação há também um aumento de intensidade de picos presentes nesta região. Neste experimento os álcoois utilizados foram o metanol e o álcool ter butílico em relação

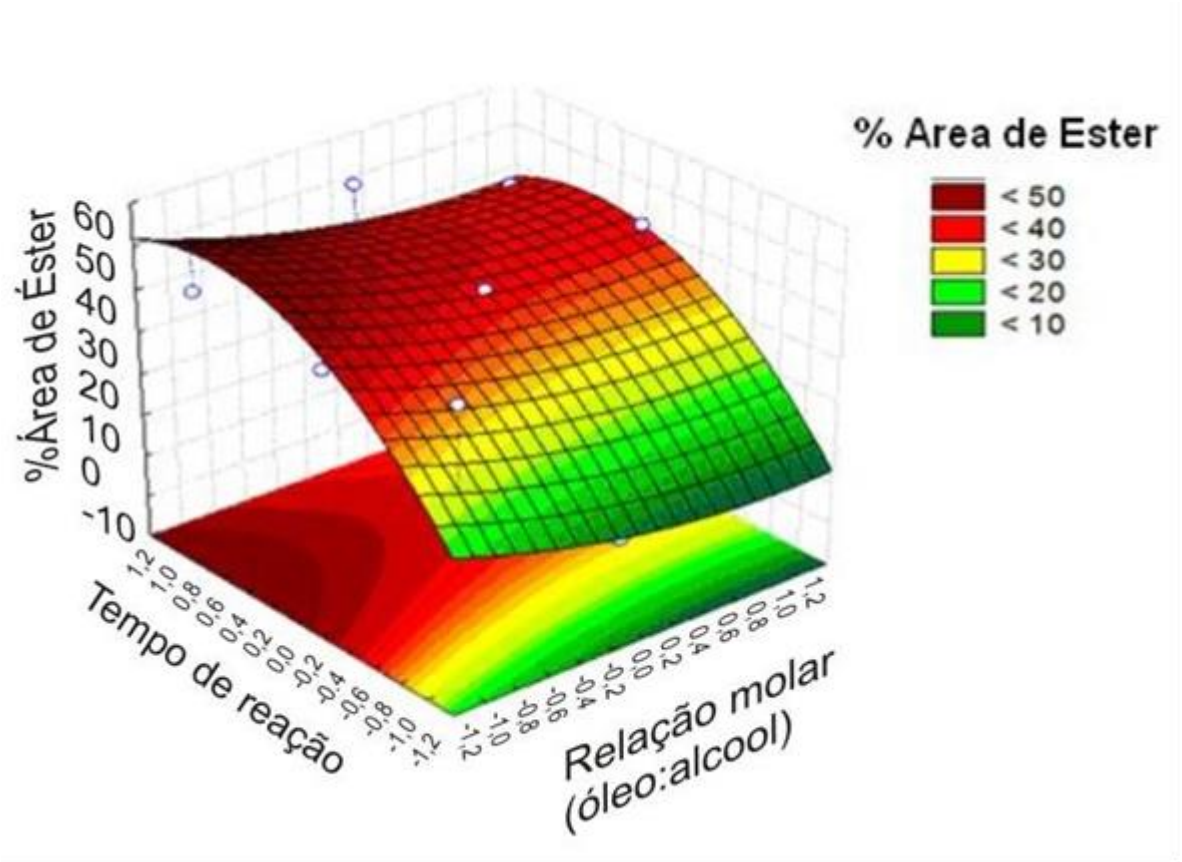
1:1, para aumentar o rendimento da reação em termos de teor de ésteres (biodiesel).

Figura 5.7 *Perfil cromatográfico do produto de reação obtido utilizando as enzimas extracelulares do fungo S. racemosum, relação molar óleo:álcool 1:6, com tempos de reação de 24, 48 e 72 horas.*



A partir dos resultados obtidos pelos vários experimentos realizados foi possível construir uma superfície de resposta dos dados. A Figura 5.8 apresenta o resultado da superfície de resposta para os dados obtidos para o planejamento 3^2 para os parâmetros relação molar óleo/álcool nos níveis 1:3, 1:6, 1:9 e tempo de reação nos níveis 24, 48 e 72 horas.

Figura 5.8 *Superfície de resposta para o planejamento 3^2 com os fatores relação molar e tempo de reação para o fungo S. racemosum*



Nas condições do experimento, a superfície de resposta representa a direção em que o rendimento da formação de ésteres ocorreu. A cor vermelha e sua intensidade demonstra que o tempo de reação foi um fator mais significativo do que a relação molar. Com os resultados apresentados no Quadro 5.4 observar-se que a melhor resposta é obtida quando o tempo de reação aumenta, e que a razão molar 1:6 foi suficiente para que os triglicerídeos fossem transformados em ésteres em um tempo de reação de 72 horas.

Moreno-Pirajan e Giraldo [9] adicionaram diferentes quantidades de álcool variando de 2,7 a 13,7 equivalentes molares de metanol para a transesterificação de óleo de palma catalisado pela lipase de *Candida rugosa*. A proporção molar de 10,4 foi determinada como a ótima dando um rendimento de 85% de ésteres metílicos. Liu et al usaram lipase *Burkholderia cenocepacia* (BCL) em relação molar metanol/óleo 4:1 e tempo de reação 8 horas e obtiveram um rendimento total de biodiesel de 98% [10].

Neste trabalho, embora a reação de transesterificação tenha sido realizada (52,6% em área de éster) com uma razão molar 1:6 em 72 horas, ainda o resultado não foi significativo dentro do domínio experimental. Portanto, procede a *dúvida da* variável teor de água, que pode influenciar na extensão em que a reação ocorre.

5.4.1.2 Determinação da atividade enzimática do material liofilizado

A curva analítica construída para a determinação da atividade enzimática do material liofilizado (caldo liofilizado produzido pelo fungo *S. racemosum*), pelo método de p-nitrofenil palmitato, apresentou uma curva de equação y=0,0073x+0,655 (R^2 0,9981). O resultado da atividade enzimática obtido com esta curva foi de 595 U/g.min (5,95 U/mL min) que pode ser considerada baixa, pois outros autores reportam atividades enzimáticas pelo mesmo método. Salihu *et al* [11] apresentam uma atividade de 20,26 U/mL para a lipase de *Candida cylindracea* e Iftikhar *et al* [12] reportam atividade enzimática de 9,07 U/mL para a lipase de *Rhizopus oligosporus*. O resultado obtido é menor em comparação com outras investigações, no entanto, reação de transesterificação dos triglicerídeos ocorreu em um extensão bastante promissorra com o liofilizado do fungo, mesmo trabalhando com a enzima presente na biomassa (micélio) sem nenhuma extração

ou e purificação, como em outras pesquisas, onde foram utilizadas as enzimas puras.

5.4.1.3 Teor de água

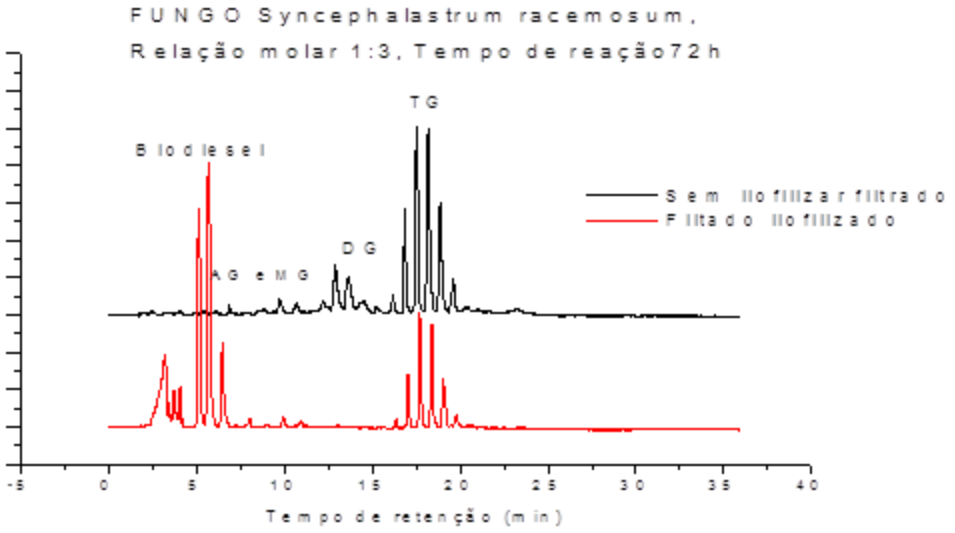
O teor de água desempenha um papel importante durante a conversão lipolítica de óleo para biodiesel. Os biocatalisadores, precisam de uma pequena quantidade de água para manter as suas atividades [13,14]. A lipase tem uma característica única na interface água-óleo, e a atividade da lipase depende desta interface. A presença de uma interface óleo-água é necessária porque proporciona um ambiente adequado para a ativação enzimática, que ocorre devido ao desmascaramento e reestruturação do sítio ativo, através de alterações conformacionais da molécula de lipase. [15,16].

A Figura 5.9 apresenta o perfil cromatográfico do material proveniente da reação entre o óleo, a mistura de álcool e o caldo fermentado sem liofilizar, após separação por HPLC. De acordo com esta figura não há sinais indicativos da formação de ésteres (biodiesel) na região de tempo de retenção de 5 min até 6,5 min. Este resultado demonstrou a importância do teor de água no meio racional, que induz a reação de hidrólise dos ésteres [17]. O ideal é ter controle sobre a variável teor de água. Assim, com o intuito de minimizar o processo de hidrólise, novos experimentos foram delineados, de modo a retirar-se a maior parte da água presente no catalisador (filtrado contendo enzimas extracelulares) por liofilização. Verificou-se também a presença de água também nos álcoois metílico e ter-butílico, utilizados nos experimentos. O teor de água destes foi determinado pelo método de Karl Fischer [18]. Os resultados mostraram a presença de 9,23% de água no álcool

metílico, 0,034% no álcool ter-butílico e 0,19% no óleo, e assim, para reduzir o conteúdo de água na reação à faixa ideal para a atividade enzimática, os álcoois foram secados utilizando o procedimento para o tratamento de impurezas em compostos orgânicos [19].

Após ser feita a liofilização do filtrado produzido pelo fungo *S. racemosum* e utilizado como biocatalisador com uma relação molar óleo/álcool 1:3 e tempo de reação de 72 horas e teor de água do meio reacional com catalisador liofilizado de 5,3% (m/m) foi quantificado pelo método de Karl-Fisher, É possível observar na Figura 5.9 que a redução do teor de água do meio favoreceu a formação de ésteres, ou seja, houve um aumento no sinal dos ésteres (biodiesel) e uma redução dos teores de mono-di e triglicerídeos no meio reacional.

Figura 5.9. *Perfil cromatográfico do produto de reação obtido para fungo S. racemosum com filtrado liofilizado e filtrado sem liofilizar.* Relação molar 1:3, tempo de reação 72 horas



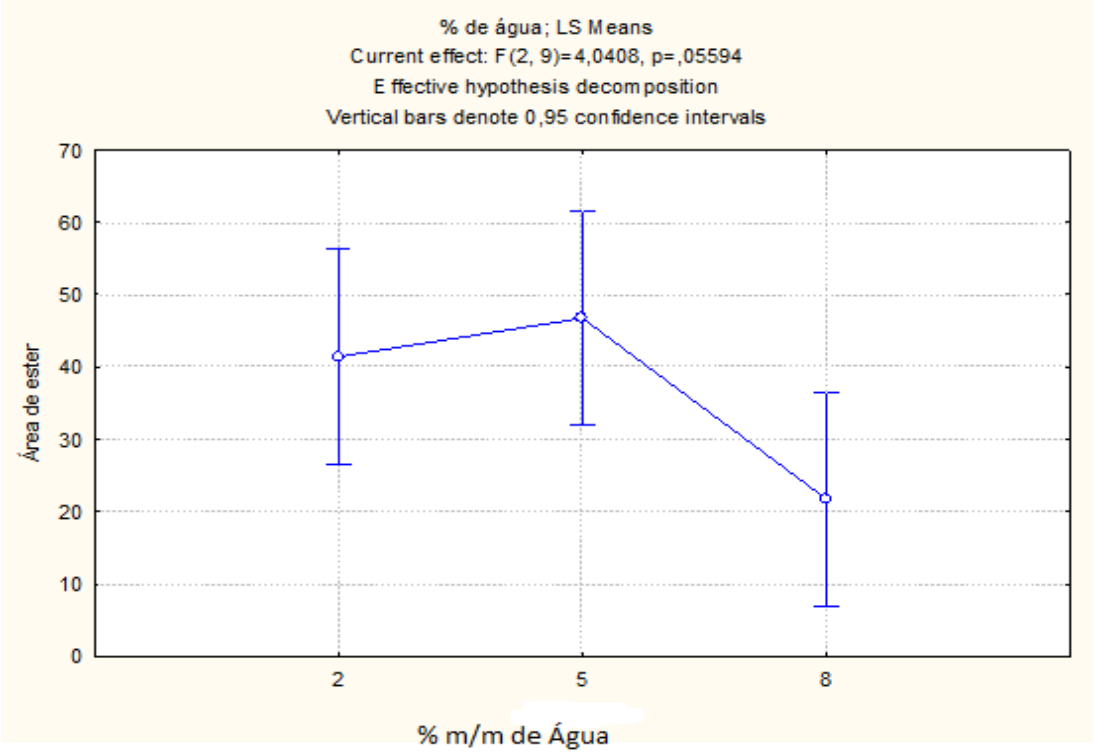
Os resultados demonstram que o processo de liofilização contribui favoravelmente para que a reação de transesterificação acontecesse em maior extensão, mas que é importante quantificar e controlar o conteúdo de água nesta reação. Hama *et al* reportam um teor de água de 3% durante a metanólise de óleo de colza usando como catalisador células completas de *R. oryzae* gerando conversões acima de 70% [20]. Arai *et al* tem utilizado 5% de teor de água (m/m de óleo) com células completas da estirpe *R. oryzae* e resultou numa conversão de 60% [21]. Quando cerca de 10% de água (com base no peso de óleo) foi adicionada a um sistema de reação com óleo de soja e metanol, após 18 h, uma conversão muito baixa de 7% foi obtida, enquanto que a adição de água no início da reação aumentou a conversão acima de 30% [22].

Al-Zuhair *et al* [15] reportam um bom desempenho da lipase de *M. miehei* na esterificação de ácido butírico com metanol num sistema bifásico n-hexano/água onde os resultados foram eficientes para teor alto de água (10%v/v – 25% v/v). Nie *et al* [23] conseguiram transesterificação com metanol e lipase *Candida sp*, seus resultados reportam conversões entre 90% - 92% com conteúdo de água variando entre 0% até 40%. Pizarro *et al* [24] estudaram a metanólise de óleo de palma entre outros com lipase de *R. oryzae* como biocatalisador, na presença de teor de água elevado (75%), tempo de reação 96 horas a 35°C e reportaram rendimento de 55%.

Com o intuito de avaliar a influência do conteúdo de água na transesterificação enzimática foram realizados experimentos em condições onde o teor de água variou-se entre 2, 5 e 8 %(m/m) O tempo de reação foi de 72 horas e a relação molar óleo/álcool 1:6. A Figura 5.10 apresenta o resultado da estimativa do efeito da variável teor de água realizado neste experimento com nível de

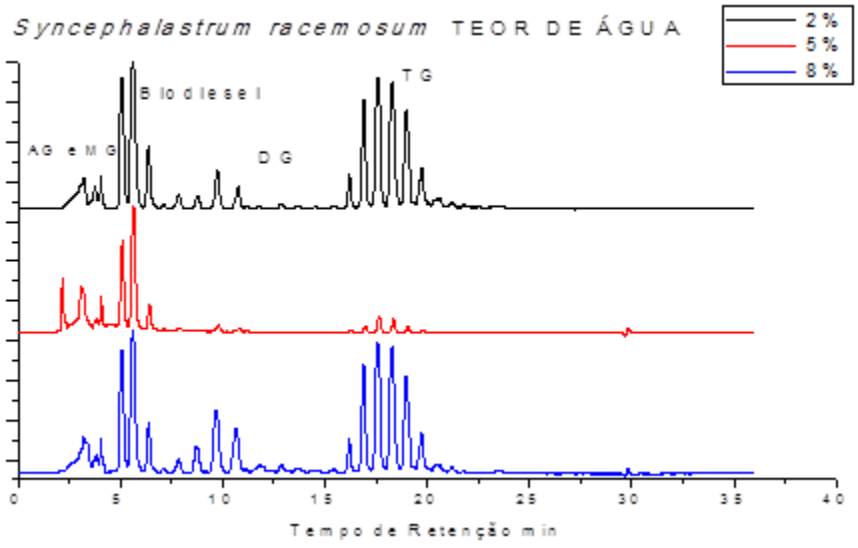
confiança de 95% e significância 0,05. A melhor taxa de conversão da reação de transesterificação foi para um teor de água de 5%(m/m). Porém, o resultado do p-valor 0,05594 demonstra que não existe uma diferença significativa entre os três porcentagens do estudo, pois o p-valor experimental é maior que 0,05 de significância. Portanto, quando o teor de água aumenta do nível mínimo 2% até o máximo 8% não há um ganho significativo na extensão em que a reação de transesterificação ocorre..

Figura 5.10 *Variância dos efeitos do fator teor de água no resultado do produto da transesterificação enzimática*



A Figura 5.11 apresenta os cromatogramas para o experimento realizado com variação do teor de água. A produção de biodiesel foi satisfatória nas condições de reação de relação molar 1:6 e tempo de reação de 72 horas e teor de água de 5%(m/m). Observa-se que quando o teor de água aumenta de 2 até 5% houve um incremento na produção de ésteres, ou seja, a reação de transesterificação ocorreu em maior extensão (aproximadamente 55% na área de ésteres formados). No entnto, quando há um aumento para 8% houve uma redução da área para.23.3% Isto pode ser explicado porque o aumento do teor de água pode ter favorecido a reação inversa, a reação de hidrólise.

Figura 5.11 Perfil cromatográfico do produto de reação obtido utilizando as enzimas extracelulares do fungo *S. racemosum,* relação molar óleo/álcool 1:3, tempo de reação 72 horas.



5.5 Estudo do fungo *S. racemosum na sua forma biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador*

A produção de biodiesel catalisada por lipase é influenciada por vários fatores tais como razão molar óleo/álcool, concentração de enzima, teor de água, temperatura entre outras. Assim, a otimização desses parâmetros torna-se crucial para obter o máximo rendimento. Os métodos estatísticos tais como a metodologia de superfície de resposta (RSM) têm sido amplamente utilizados para otimização da produção de biodiesel catalisada por lipase [25,26].

Os resultados foram avaliados considerando-se a análise de variância ANOVA, o diagrama de pareto, gráfico de contorno e gráficos de superfície de resposta.

5.5.1 Planejamento fatorial 2^3

Diferentes estudos têm sido desenvolvidos na produção de biodiesel com lipase como catalisador e a análise e otimização das variáveis que mais influenciam através da metodologia de superfície de resposta. [27-32]. No planejamento 2^3 foram avaliadas as variáveis razão molar óleo/álcool, tempo de reação e massa do biocatalisador e os resultados dos porcentagens de área de éster são apresentados na Tabela 5.6, onde o teor de água na reação foi de 5% m/m. O resultado obtido com a análise de variância ANOVA da Tabela 5.7 apresenta os resultados para os três fatores do planejamento 2^3.

Tabela 5.6 *Porcentagens de área de éster para o planejamento 2^3 obtido com a biomassa liofilizada do fungo S. racemosum.*

Tempo de reação (t_R) (h)	Razão molar (óleo/álcool*)	Massa do catalisador (g)	% Área de éster
1	1	1	9
-1	1	1	4
1	-1	1	94
-1	-1	1	89
1	1	-1	53
-1	1	-1	60
1	-1	-1	70
-1	-1	-1	8

Fatores	Níveis	
	-1	1
Tempo (h)	24	72
Razão Molar	1:3	1:9
Massa catalisador (g)	0,1	0,5

* razão molar óleo/ álcool; onde álcool é uma mistura 1:1 de álcool metílico/ter- butílico

Tabela 5.7 *Análise de variância ANOVA para o planejamento 2^3 obtido com a biomassa liofilizada do fungo S. racemosum.*

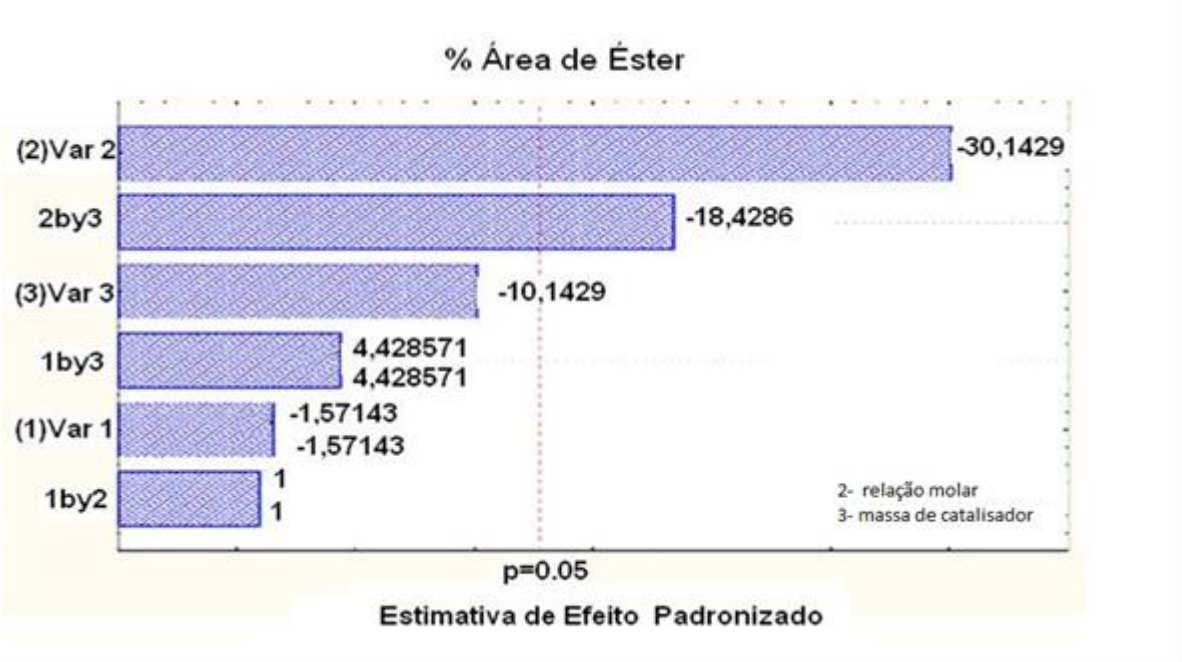
Fator	SS	df	MS	F	*p*
1 Tempo	15,125	1	15,125	2,4694	0,360791
2 Relação Molar	5565,125	1	5565,125	908,5918	0,021112
3 Massa do catalisador	630,125	1	630,125	102,8776	0,062563
1*2	6,125	1	6,125	1,0000	0,500000
1*3	120,125	1	120,125	19,6122	0,141382
2*3	2080,125	1	2080,125	339,6122	0,034511
Erro	6,125	1	6,125		
Total S	8422,875	7	8422,875		

R^2: 0,99927;
Adj:0,99491

SS: soma de quadrados, df: gaus de liberdade, MS: média quadrática.

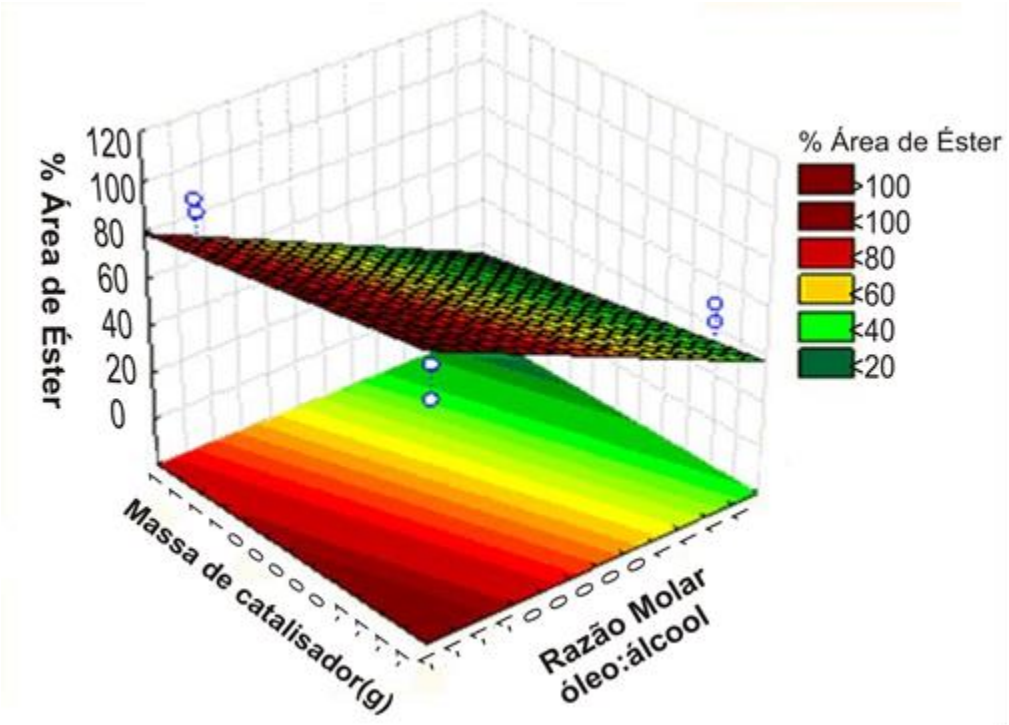
Através do resultado da análise de variância, a variável relação molar óleo/álcool foi a mais significativa com p valor de 0,021112, o qual é menor do que 0,05, que é considerado o valor crítico da análise. Além disso, a interação entre as variáveis relação molar óleo/álcool e massa do catalisador foi significativa com p valor 0,034511 também menor a 0,05. Esses dois resultados podem ser melhor observados no diagrama de pareto da Figura 5.12, onde a linha vermelha, que separa valor crítico de 0,05 é ultrapassada pela variável 2 (relação molar óleo/álcool) e pela interação entre as variáveis 2 e 3 (relação molar e massa do catalisador).

Figura 5.12 *Diagrama de pareto para o resultado do planejamento fatorial 2^3 utilizando como biocatalisador o fungo S. racemosum*



A Figura 5.13 (superfície de resposta) mostra na região vermelha como a variável quantidade do catalisador e a variável relação molar óleo/álcool tem uma alta correlação e que para valores baixos de catalisador precisa-se de uma relação molar mais baixa, porém ainda não foi atingido o topo de curvatura que apresentaria os valores ótimos para cada um dos fatores em estudo mas que a sua interação seria muito melhor para valores menores.

Figura 5.13 *Superfície de resposta para o planejamento com os fatores relação molar óleo/álcool e quantidade do catalisador para o planejamento 2^3 utilizando como biocatalisador o fungo S. racemosum*



5.5.2 Desenho Box-Behnken

O desenho Box-Behnken foi implementado visando otimizar a variável de resposta porcentagem da área de éster (%A) colocando mais um nível para cada um dos fatores em estudo. A Tabela 5.8 apresenta os resultados dos porcentagens

de área de éster obtidos utilizando a biomassa liofilizada do fungo *S. Racemosum*, como biocatalisador.

Tabela 5.8 *Porcentagens de área de éster do desenho Box-Behnken utilizando biomassa liofilizada do fungo S. racemosum como biocatalisador.*

Tempo de reação (t_R) (h)	Razão molar óleo/álcool	Massa do catalisador (g)	% Área de éster
-1	1	0	0,02
-1	-1	0	0,35
-1	0	1	0,6
-1	0	-1	59,1
0	1	-1	63,6
0	1	1	80,2
0	0	0	74,7
0	0	0	81,6
0	0	0	77,5
0	-1	-1	96,4
0	-1	1	95
1	1	0	92,5
1	0	-1	89,7
1	0	1	88,7
1	-1	0	87,7

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Tempo (h)	24	48	72
Razão Molar	1:3	1:6	1:9
Massa catalisador (g)	0,1	0,5	0,8

* razão molar óleo/ álcool; onde álcool é uma mistura 1:1 de álcool metílico/ter- butílico

Com os resultados obtidos neste desenho construí-se a Tabela 5.9 com os resultados da análise de variância.

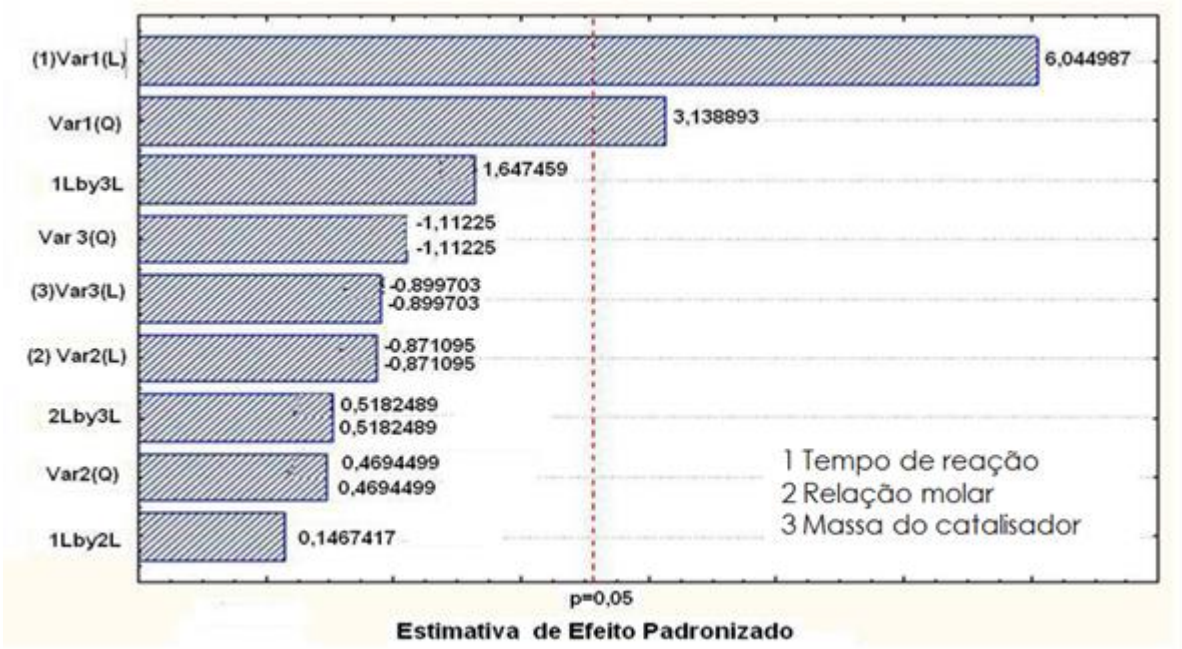
Tabela 5.9 *Análise de variância ANOVA do desenho Box-Behnken*

Fator	SS	df	MS	F	*p*
1 Tempo (L)	11143,23	1	11143,23	36,54186	0,001785
1 Tempo (Q)	3004,51	1	3004,51	9,85265	0,025698
2 Relação Molar (L)	231,39	1	231,39	0,75881	0,423546
2 Relação Molar (Q)	67,20	1	67,20	0,22038	0,658507
3 Massa do catalisador (L)	246,84	1	246,84	0,80947	0,409515
3 Massa do catalisador (Q)	377,25	1	377,25	1,23710	0,316628
1*2	6,57	1	6,57	0,02153	0,889069
1*3	827,66	1	827,66	2,71412	0,160380
2*3	81,90	1	81,90	0,26858	0,626393
Erro	1524,72	5	304,94		
Total SS	17661,46	14			
R^2: 0,91367; Adj:0,75827					

SS: soma de quadrados, df: gaus de liberdade, MS: média quadrática.

Observa-se a partir dos resultado apresentado na Tabela 5.9 que a variável tempo de reação é a mais significativas, com *p* valor inferior a 0,05 ,que é o valor crítico da análise, e que o aumento do tempo de reação favorece o desenvolvimento da reação. Esses resultados são apoiados pelo gráfico de pareto da Figura 5.14, que mostra essa variável ultrapassando a linha vermelha do valor crítico de 0,05.

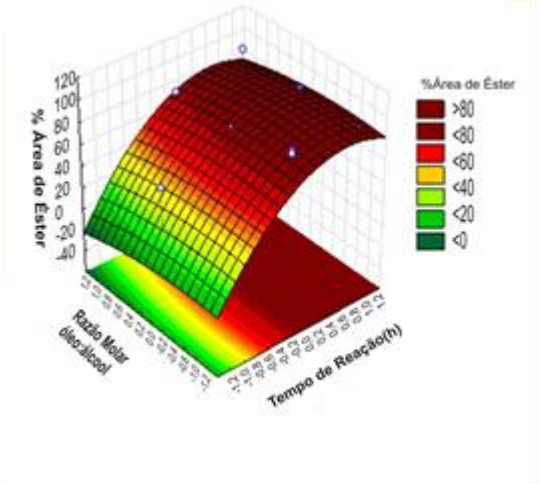
Figura 5.14 *Diagrama de pareto para o resultado da superfície de resposta Box-Behnken utilizando como biocatalisador o fungo S. racemosum*



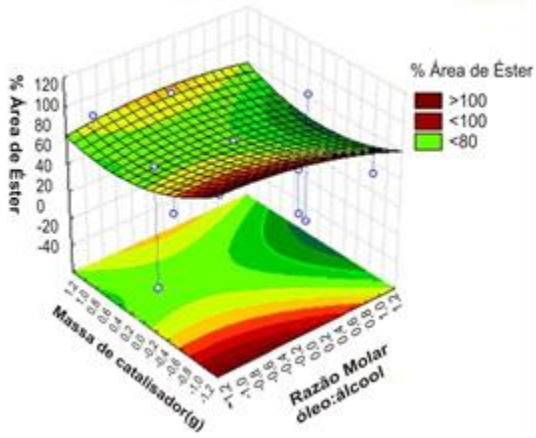
As Figuras 5.15 a, b e c apresentam os gráficos de superfície de resposta das interações dos três fatores em estudo. Observa-se que a interação entre as variáveis tempo de reação e razão molar óleo/álcool e como a variável resposta porcentagem área de éster aumenta, quando o tempo de reação aumenta, embora a variável razão molar ainda não seja significativa.

Figura 5.15 *Superfície de resposta para a reação de transesterificação utilizando como biocatalisador o fungo S. Racemosum para as variáveis: a)tempo de reação e relação molar óleo/álcool , b) tempo de reação e quantidade do catalisador e c) quantidade do catalisador e relação molar óleo/álcool*

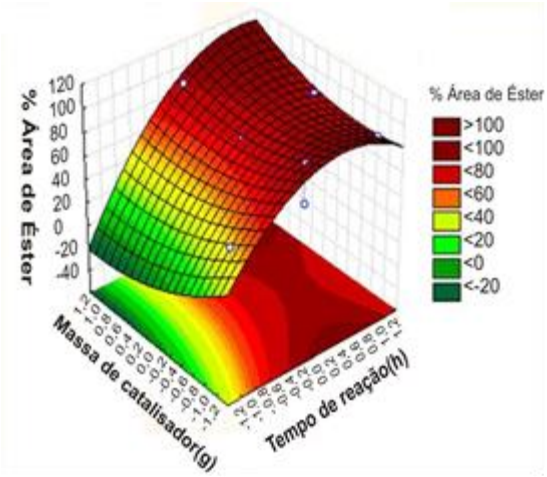
a)



c)



b)



Na Figura 5.15 a é possível observar que o tempo de reação a partir do valor médio de 48 horas começa a maximizar o resultado na variável de resposta.No entanto, a variável razão molar ainda não é significativa no domínio estabelecido.

A Figura 5.15b mostra que o tempo de reação, é a variável mais significativa, maximiza a resposta porcentagem área de éster. Observa-se ainda que uma quantidade menor do biocatalisador favorece o rendimento da reação.

Apesar dos resultados da ANOVA não serem significativos para a interação das variáveis quantidade do catalisador e relação molar no gráfico de superfície de resposta pode-se observar que elas têm uma correlação. Há um aumento do %A de éster para baixos valores de massa do catalisador e razão molar óleo/álcool.

A Figura 5.15 c demonstra a interação entre as variáveis razão molar óleo/álcool e quantidade do catalisador. Neste caso, é mais significativo a variável razão molar, já que há uma maximização da variável de resposta porcentagem de área de éster com valores baixos e médios desta variável e que variável quantidade de catalisador ainda não é significativa.

5.6 Análise dos parâmetros reacionais para o fungo *R. stolonifer* na sua forma de caldo liofilizado como biocatalisador

5.6.1 Planejamento fatorial 3^2

A partir do planejamento fatorial 3^2 foram realizados os experimentos com variação da relação molar óleo/álcool e tempo de reação. Os resultados obtidos são expressados em porcentagem de área de éster na Tabela 5.10.

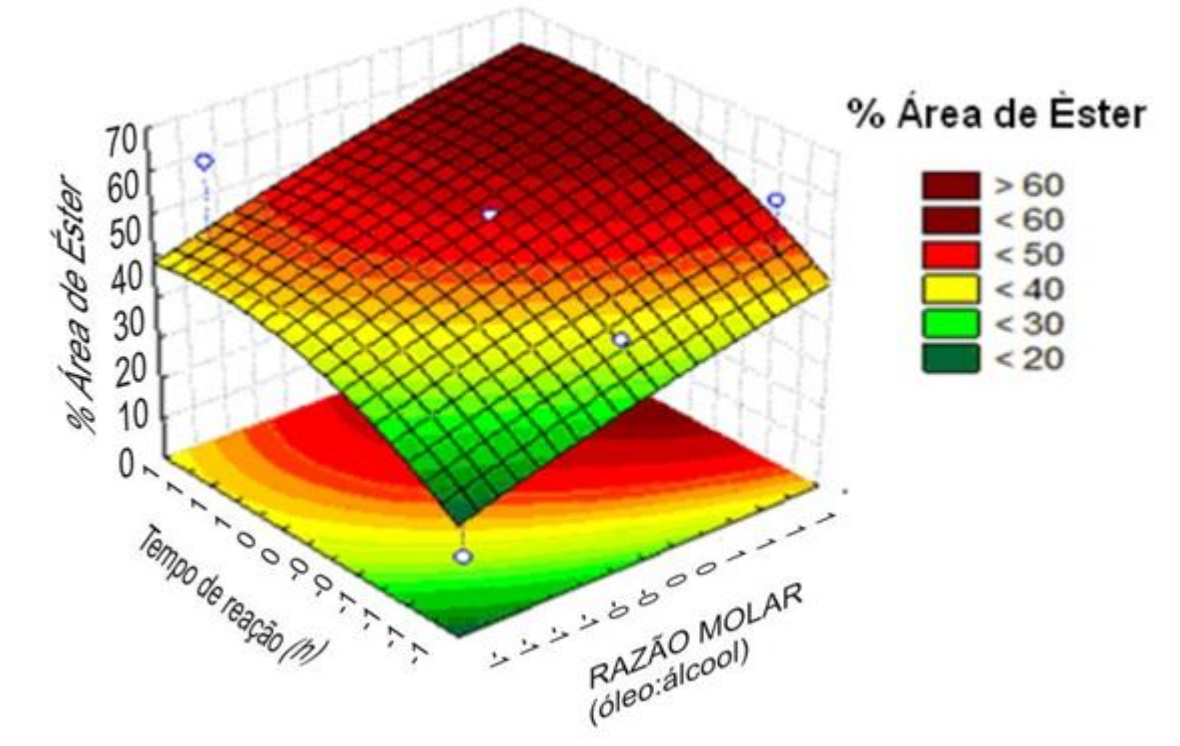
Tabela 5.10 *Porcentagens de área de éster do planejamento 3^2 obtidos com o caldo liofilizado como biocatalisador produzido pelo fungo R. stolonifer*

Razão molar (óleo/álcool*)	Tempo de reação (h)		
	24	48	72
	% Area de éster		
1:3	2,32	38,7	62,7
1:6	39,7	52,8	43,2
1:9	58,9	54,1	48,0

A Tabela 5.10 apresenta os resultados obtidos quando utilizou-se o caldo liofilizado produzido pelo fungo *R. Stolonifer.* Observa-se que o melhor rendimento de % área de éster (62,7%) aconteceu com uma razão molar óleo/álcool 1:3 em um tempo de reação de 72 h, porém com o aumento das relações molares ainda foi possível a formação dos ésteres na transesterificação.

Na Figura 5.16 é apresentada a superfície de resposta para o planejamento 3^2 com a interação das variáveis relação molar óleo/álcool e tempo de reação.

Figura 5.16 *Superfície de resposta para o planejamento 3^2 com os fatores relação molar e tempo de reação para o fungo R. stolonifer*



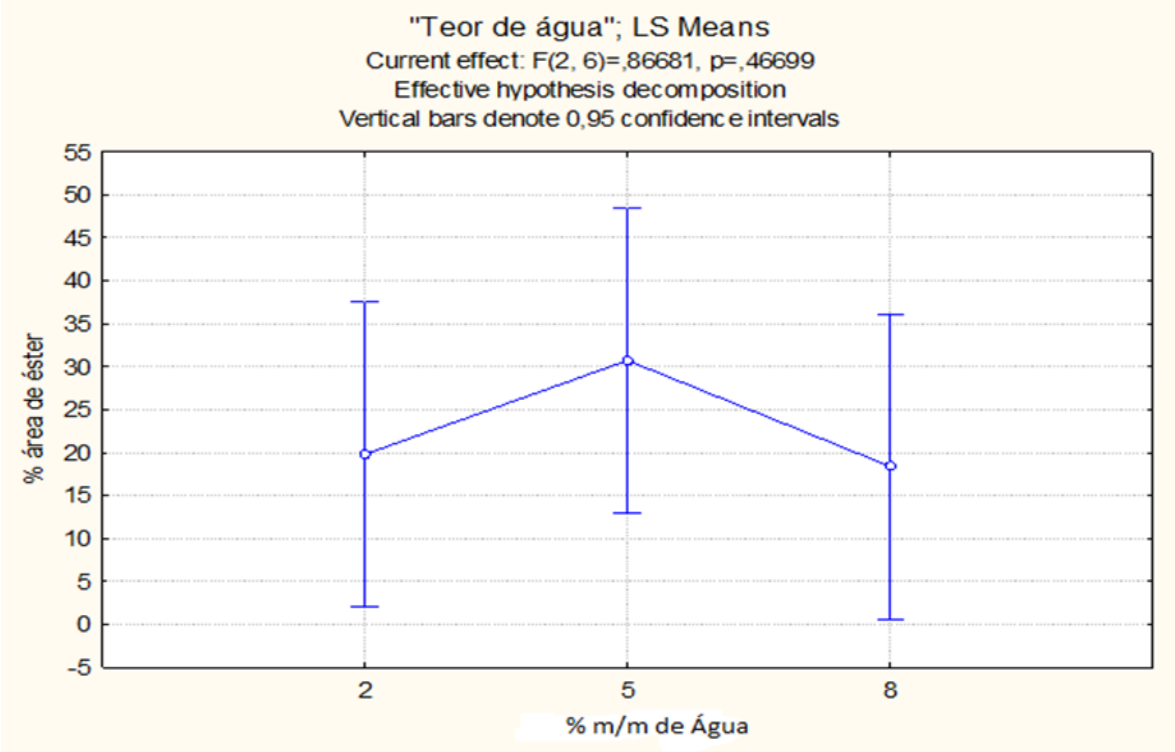
A Figura 5.16 demonstra que a variável relação molar óleo/álcool é mais significativa para maximizar a resposta.No entanto, no caso da variável tempo de reação, esta ainda não é significativa.Estas duas variáveis não mostraram-se estatisticamente significativas para os níveis propostos.

5.6.2 Teor de água

A Figura 5.17 mostra os resultados obtidos para o experimento utilizando como biocatalisador o liofilizado do fungo *R. Stolonifer. Neste experimento, variou-se* o conteúdo de água no meio reacional onde o tempo de reação foi de 72 horas e a razão molar óleo/água foi de 1:3. Observa-se que o teor de água de 5% apresenta maior rendimento na porcentagem de área de estes, porém o resultado não foi

estatisticamente significativo, já que o p valor foi 0,46699, que é maior que 0,05 o valor crítico da análise.

Figura 5.17 *Gráfico dos efeitos do fator teor de água no resultado do produto da transesterificação enzimática com biocatalisador produzido pelo fungo R. stolonifer*



5.6.3 Superfície de resposta Box Behnken com o fungo *R. stolonifer* na sua forma de biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador.

Na Tabela 5.11 são apresentados os resultados do desenho Box-Behnken obtidos utilizando como biocatalisador a biomassa liofilizado do fungo *R. stolonifer*.

Tabela 5.11 *Porcentagens de área de éster do desenho Box-Behnken com o fungo R. stolonifer na sua forma de biomassa (micélios) liofilizada como biocatalisador*

Tempo de reação (t_R) (h)	Razão molar (óleo/álcool*)	Massa do catalisador (g)	% Área de éster
-1	1	0	0,052
-1	-1	0	0,055
-1	0	1	0,103
-1	0	-1	3,635
0	1	-1	62
0	1	1	73
0	0	0	98,2
0	0	0	98
0	0	0	98,8
0	-1	-1	90
0	-1	1	84
1	1	0	77
1	0	-1	76
1	0	1	75
1	-1	0	70

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Tempo (h)	24	48	72
Razão Molar	1:3	1:6	1:9
Massa catalisador (g)	0,1	0,5	0,8

* razão molar óleo/ álcool; onde álcool é uma mistura 1:1 de álcool metílico/ter- butílico

A Tabela 5.12 apresenta os resultados da análise de variância ANOVA para o resultado da análise de superficie de resposta Box Behnken, onde as variáveis de estudo foram o tempo de reação, a razão molar óleo/álcool e a quantidade do biocatalisador.

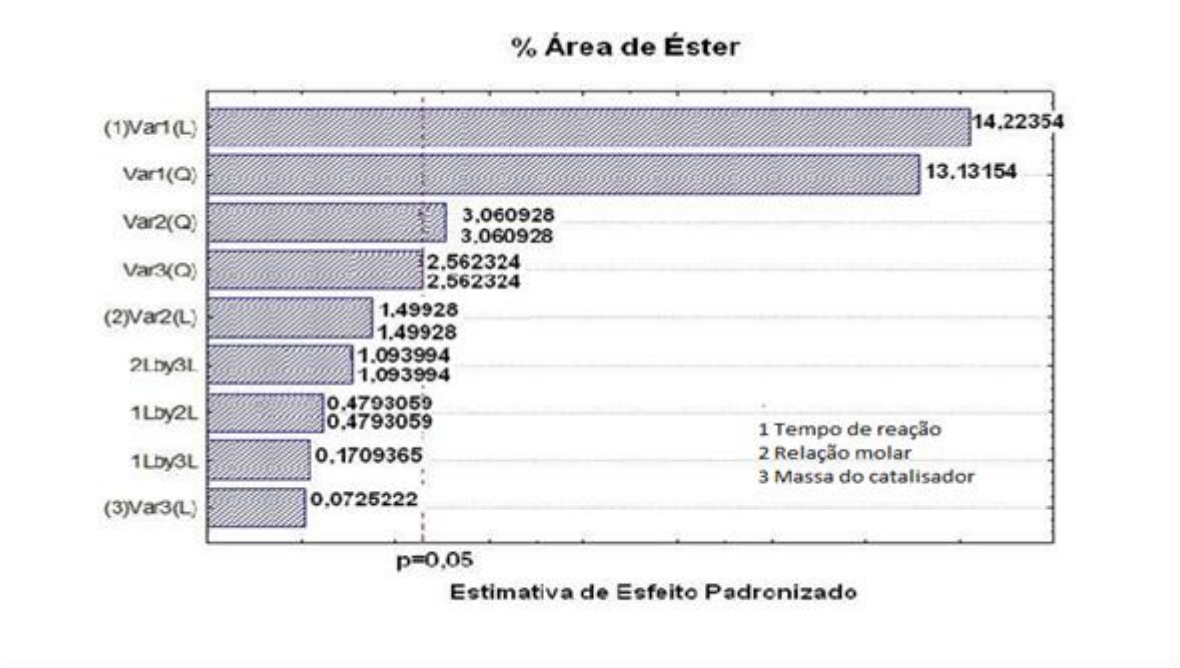
Tabela 5.12 *Análise de variância do desenho Box-Behnken*

Fator	SS	df	MS	F	*p*
1 Tempo (L)	10818,47	1	10818,47	202,3091	0,000031
1 Tempo (Q)	9221,08	1	9221,08	172,4373	0,000046
2 Relação Molar (L)	120,20	1	120,20	2,2478	0,194084
2 Relação Molar (Q)	501,02	1	501,02	9,3693	0,028072
3 Massa do catalisador (L)	0,28	1	0,28	0,0053	0,944998
3 Massa do catalisador (Q)	351,09	1	351,09	6,5655	0,050504
1*2	12,29	1	12,29	0,2297	0,651950
1*3	1,56	1	1,56	0,0292	0,870976
2*3	64,00	1	64,00	1,1968	0,323839
Erro	267,37	5	53,47		
Total SS	20838,34	14			
R^2: 0,98717; Adj:0,96407					

SS: soma de quadrados, df: gaus de liberdade, MS: média quadrática.

A Tabela 5.12 apresenta os resultados da análise de variância para a superfície de resposta Box-Behnken utilizando biomassa liofilizada do fungo *R. stolonifer* como biocatalisador.As três variáveis estudadas foram significativas com p valores inferiores a 0,05 ,que é o valor crítico da análise., demosntrando que as três variáveis influenciam a reação em forma positiva.Isto significa que o aumento de cada uma delas favorece a formação de ésteres. Também é possível corroborar esse resultado na Figura 5.18, onde o diagrama de pareto mostra que esses fatores ultrapassando a linha vermelha do valor crítico 0,05.

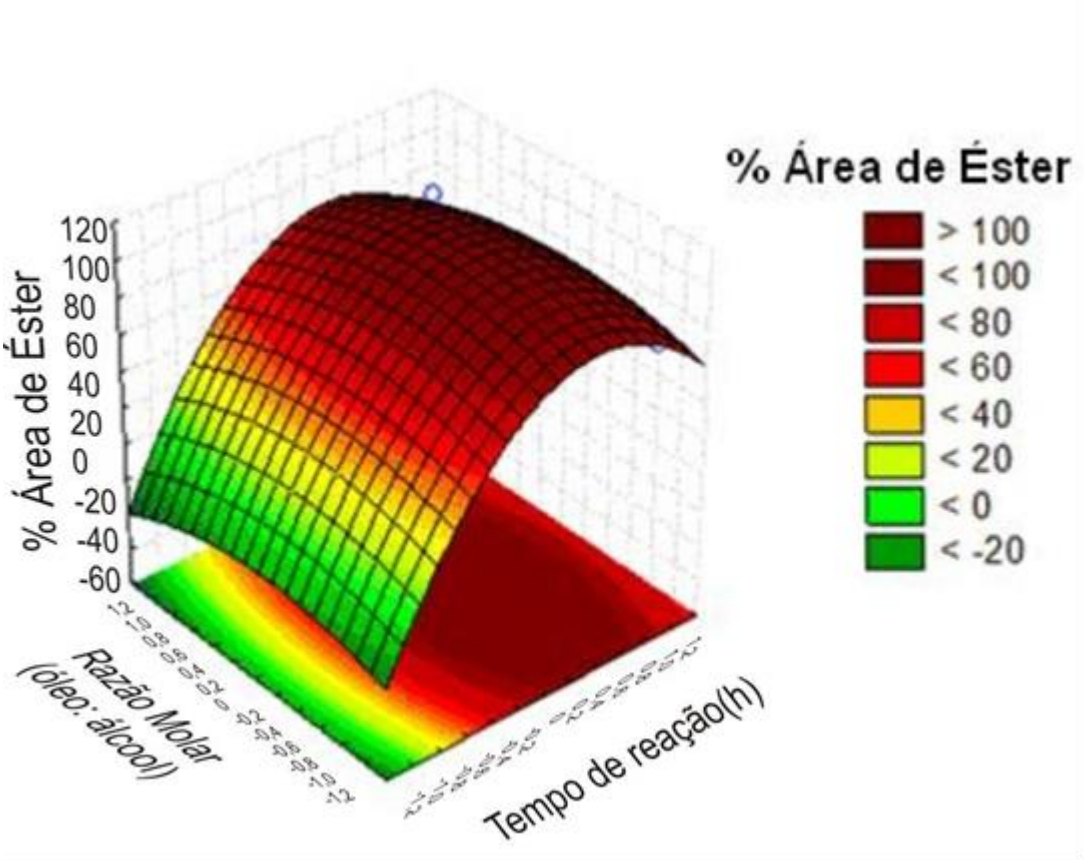
Figura 5.18 *Diagrama de pareto para o resultado da superfície de resposta Box-Behnken utilizando como biocatalisador o fungo R. stolonifer*



O diagrama de pareto para os fatores tempo de reação, razão molar óleo/álcool e quantidade do catalisador (Figura 5.18) mostra que estas variáveis , são significativos com relação à variável de resposta porcentagem área de éster, porém as interações entre eles não foram significativas.

A Figura 5.19 mostra a interação das variáveis tempo de reação e relação molar óleo/álcool para o fungo *R. Stolonifer(biomassa liofilizada)*, como biocatalizador

Figura 5.19 *Gráfico de superfície de resposta do desenho Box-Behnken com os fatores tempo de reação e relação molar óleo/álcool utilizando como biocatalisador o fungo R. stolonifer*



A Figura 5.19,demonstra que a variável tempo de reação maximiza a resposta da variável porcentagem área de éster, mas a sua interação com a variável razão molar ainda é significativa, como já foi visto no diagrama de pareto de Figura 5.18.

5.7 Comparação entre biomassas liofilizadas e biomassas sem liofilizar produzidas pelos fungos *S. racemosum* e *R. stolonifer*

A Tabela 5.13 apresenta os resultados obtidos para a variável resposta porcentagem de área de ésteres comparando as biomassas liofilizadas e as biomassas sem liofilizar dos fungos *S. racemosum* e *R. stolonifer* e utilizadas como biocatalisadores na reação de transesterificação sob as seguintes condições: tempo de reação 72 horas, razão molar óleo/álcool 1:6, massa do biocatalisador 0,3 g de biomassa liofilizada e teor de água 5% m/m. Para as biomassas sem liofilizar de ambos os fungos o conteúdo de água foi estimado como 98,2% m/m para o fungo *S. racemosum* e 98,5% m/m para o fungo *R. stolonifer*, e as massas foram estimadas como 10,51g e 11,13g respectivamente, logo estas biomassas foram usadas como biocatalisadores na reação de transesterificação com razão molar óleo/álcool 1:6 e tempo de reação 72 horas.

Tabela 5.13 *Porcentagens área de éster para os biocatalisadores liofilizados e sem liofilizar produzidos pelos fungos S. racemosum e R. stolonifer*

Biocatalisador	**% Área de éster**
Biomassa liofilizada (fungo *S. racemosum*)	94,4 87,2 96,3
Biomassa sem liofilizar fungo (*S. racemosum*)	79,2 69,6 71,1
Biomassa liofilizada fungo *R. stolonifer*.	98,9 89,1 69,2
Biomassa sem liofilizar fungo *R. stolonifer*.	37,8 28,0 32,9

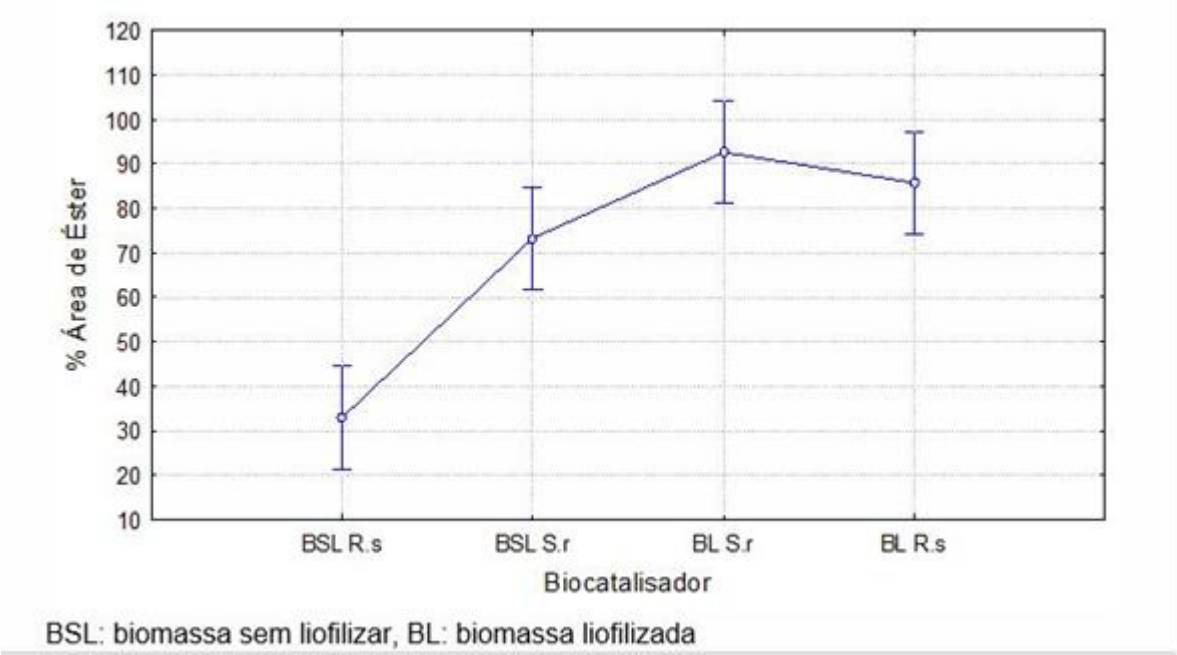
A partir dos dados apresentados na Tabela 5.13 foi feita uma análise de variância e os resultados são apresentados na Tabela 5.14. Com os dados da Tabela 5.14 foi construída a Figura 5.20 que apresenta a comparação entre os valores encontrados.

Tabela 5.14 *ANOVA dos porcentagens de área de éster obtidos com biocatalisadores produzidos pelos fungos S. racemosum e R. stolonifer*

Efeito	SS	df	MS	F	*p*
Intercepto	60733,64	1	60733,64	802,4351	0,000000
Variável biocatalisador	6425,58	3	2141,89	28,2995	0,000131
Erro	605,49	8	75,69		

SS: soma de quadrados, df: gaus de liberdade, MS: média quadrática.

Figura 5.20 *Variação das porcentagens de área de éster para os dados das biomassas liofilizadas e biomassas sem liofilizar dos fungos S. racemosum (S.r) e R. stolonifer (R.s)*



A partir dos resultados mostrados pela Tabela 5.11 e Figura 5.20 observa-se que existe uma diferença estatística significativa,o valor da significância do ANOVA foi de 0,000131 que é muito menor que 0,05, que é o valor crítico da análise, portanto é diferente o rendimento obtido em porcentagem de área de éster com biocatalisador liofilizado que com biocatalisador sem liofilizar.Também exite uma diferença estatística significativa, , entre o biocatalisador produzido pelo fungo *S. racemosum* e o produzido pelo fungo *R. stolonifer*, e a Figura 5.20 mostra que quando foi utilizado o fungo *S. racemosum* como biocatalisador, o rendimento em porcentagem de área de éster foi maior.

5.8 Analise de glicerol livre

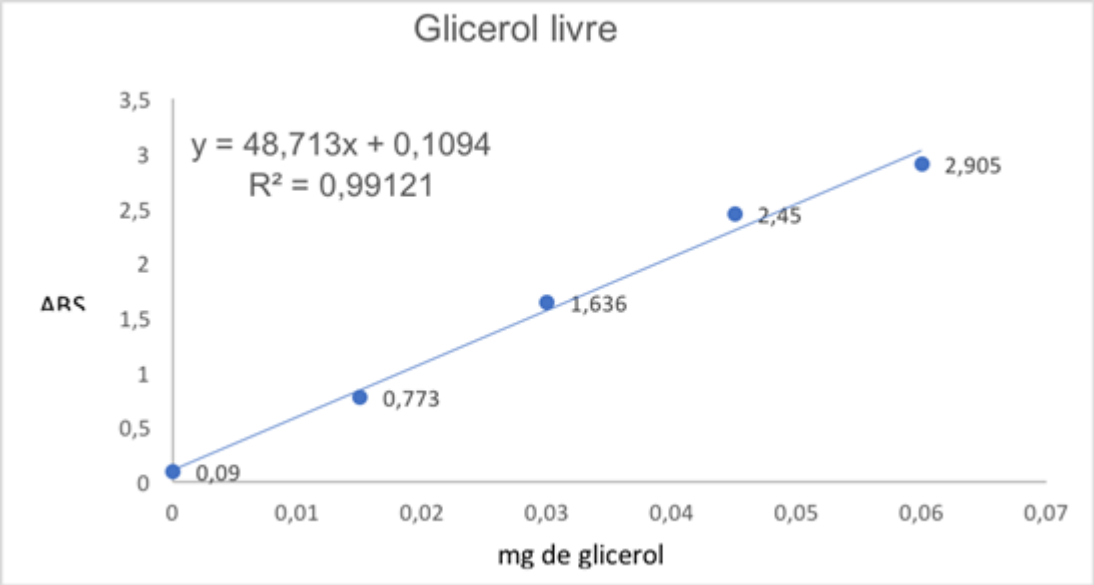
A análise de glicerol livre em amostras de biodiesel é uma alternativa para acompanhar os resultados obtidos na reação de transesterificação. Com base no protocolo do método desenvolvido por Bondioli *et al* [33], foram analisadas as amostras de biodiesel produzidas na reação de transesterificação com uso dos biocatalisadores produzidos pelos fungos *S. racemosum,* e *R. stolonifer*. Foram realizados quatro experimentos sob as seguintes condições: a) biomassa liofilizada do fungo *S. racemosum S. racemosum:* tempo de reação 72 horas, razão molar óleo/álcool 1:6, massa do biocatalisador 0,3 g de biomassa liofilizada ;

b) biomassa liofilizada do fungo *R. Stolonifer*: tempo de reação 72 horas, razão molar óleo/álcool 1:6, massa do biocatalisador 0,3 g de biomassa liofilizada. Estes experimentos foram acompanhados pela análise do teor de glicerol livre nas amostras. Os resultados são apresentados na Tabela 5.15 e Figura 5.21(curva analítica).

Tabela 5.15 *Série de padrões de glicerol e suas leituras em absorvância para a construção da curva analítica para método de glicerol livre em biodiesel*

Amostra	mg de glicerol	ABS
Branco	0	0,090
Padrão 1	0,015	0,773
Padrão 2	0,030	1,636
Padrão 3	0,045	2,450
Padrão 4	0,060	2,905

Figura 5.21 *Curva analítica para glicerol livre em biodiesel*



Foram determinadas as quantidades de glicerol livre nas amostras de biodiesel produzidas com os fungos *S. racemosum e R. stolonifer* como biocatalisadores.As as equações para cada um dos experimentos são apresentadas na Tabela 5.16 e o resultado da quantidade de glicerol é expressa como gramas de glicerol livre por Kg de biodiesel.

Tabela 5.16 *Estimativa de glicerol livre em amostras de biodiesel*

Experimento	Equação	R^2	ABS de amostras	gramas de glicerol/Kg de biodiesel
1	Y=27,947X-0,0298	0,9728	0,706 (S.r)	0,26
			0,230 (R.s)	0,093
2	Y=48,713X-0,1094	0,9912	2,780 (S.r)	0,55
			2,748	0,52
			2,665	0,52
3	Y=18,293X-0,051	0,9806	1,773 (S.r)	0,997
4	Y=27,867X-0,029	0,9849	0,202 (R.s)	0,082
			0,205	0,084
			0,154	0,066

(S.r) *S. racemosum,* (R.s) *R. stolonifer*.

A Tabela 5.16 demonstra que foi obtida uma maior quantidade de glicerol livre quando se utilizou como biocatalisador o fungo *S. racemosum. Isto significa que a reação de transesterificação ocorreu em maior extensão.* Esta metodologia se mostrou útil para acompanhar a reação de transesterificação como alternativa às análises por HPLC.

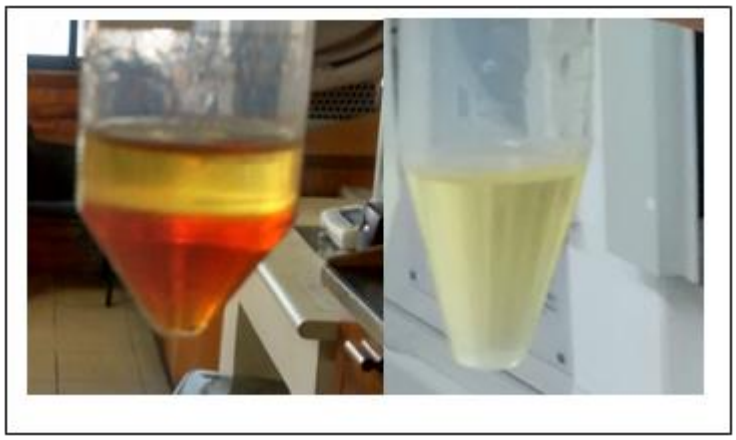
5.9 Análise de teor de éster por cromatografia gasosa em amostras de biodiesel

As amostras de biodiesel obtidas pela transesterificação de óleo de soja com álcool metílico e álcool ter-butílico e como biocatalisador o caldo liofilizado que foi produzido com a fermentação submersa do fungo *S. racemosum* foram analisdas pela técnica cromatografia gasosa. O teor de éster encontrado foi de 37,15%. Já para o experimento que utizou-se o caldo liofilizado do fungo *R. stolonifer* o resultado de teor de éster foi de 27,2%. Estas amostras de biodiesel foram submetidas a previa purificação com mistura de água-etanol 1:1 e hexano. Também foram analisadas amostras de biodiesel obtido pela transesterificação com biomassa liofilizada do fungo *S. racemosum.* Este biodiesel foi purificado com mistura de água-etanol 1:1 e hexano, o resultado do teor de éster foi de 71% e para amostra com o biocatalisador a biomassa liofilizada do fungo *R. stolonifer*, de 52%.

A reação de transesterificação foi novamente realizada utilizando a biomassa liofilizada como biocatalisador. Os produtos da reação: o glicerol e o biodiesel, foram separados e posteriormente analisados. O biodiesel foi purificado com mistura de água e detil éter, em seguida, este foi analisado por cromatografia gasosa apresentando um teor de ésteres de 85,5%, para amostra onde o biocatalisador foi a biomassa liofilizada do fungo *S. racemosum* e 6,3% para amostra onde o biocatalisador foi a biomassa liofilizada do fungo *R. stolonifer*.

A Figura 5.22 mostra os produtos da reação de transesterificação onde o biocatalisador foi a biomassa liofilizada do fungo *S. racemosum*, (camada inferior o glicerol e camada superior o biodiesel) e na segunda imagem o biodiesel após ser purificado.

Figura 5.22 *Amostra de biodiesel produzido com biocatalisador (biomassa liofilizada produzida pelo fungo S. racemosum)*



Após ter sido feita a limpeza de biodiesel, é possível observar que o produto fica mais claro já que foram tiradas as impurezas e o glicerol residual.

O uso de célula integra como biocatalisador na produção de biodiesel é uma tecnologia relativamente mais recente. As espécies de *Rhizopus. sp* e *Aspergillus. Sp* que são produtoras de lipase intracelular são atualmente as mais empregadas e tem diversos trabalhos publicados nesta área. Qin *et al* usaram a espécie *Rhizopus chinensis* como biocatalisador na transesterificação de óleo de soja com metanol com razão molar 1:3, teor de água 2% m/m, temperatura de reação 30 °C, tempo de reação 72 horas e obtiveram um rendimento de teor de ésteres de 86%. Colin *et al* usaram micélios de *A. niger* para avaliar seu potencial como produtor de lipase intracelular e possível uso como biocatalisador na reação de transesterificação de azeite de oliva com etanol e estudaram as variáveis pH e temperatura achando o

melhor rendimento de 71%. Ban et al usaram *R. Oryzae* como biocatalisador para a reação com óleo de soja e metanol em relação 1:3 a 35 °C, com teor de água de 15% m/m, tempo de reação de 70 horas e obtiveram o rendimento de teor de éster de 91,1%. Tamalampudi *et al* usaram também *R. oryzae* na transesterificação de óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) com metanol em relação 1:3, teor de água 5% m/m, temperatura de reação 30 °C, tempo de reação 60 horas e obtiveram um rendimento de 80% na formação de ésteres. Hama *et al* com *R. oryzae* como biocatalisador da reação de óleo de soja com metanol em adições sucessivas em 4 passos até uma razão de 1:4, temperatura ambiente, teor de água 5,2% m/m e tempo de reação de 50 horas, obtiveram um rendimento de 90,9%. Arumugam *et al* com células de *R. oryzae* na reação de transesterificação de óleo não comestível de *Calophyllum inophyllum* com metanol 1:12, teor de água 15% v/v, temperatura de reação 35 °C e tempo de reação de 72 horas, obtiveram um rendimento de 87% [34-39].

BIBLIOGRAFIA

[1]Ronan M. *Obtenção de biodiesel via catálise enzimática e caracterização através de técnicas cromatográficas e espectrometria infravermelho associada a calibração multivariada*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.; 2009.

[2] Abbaszaadeh A, Ghobadian B, Omidkhah MR, Najafi G. Current biodiesel production technologies: A comparative review. Energy Conversion and Management 2012;63:138-148.

[3] Zhao T, No DS, Kim Y, Kim YS, Kim IH. Novel strategy for lipase-catalyzed synthesis of biodiesel using blended alcohol as an acyl acceptor. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2014;107:17-22.

[4] Fukuda H, Kondo A, Noda H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. Journal of Bioscience and Bioengineering 2001;92:405-416.

[5] Szczesna-Antczak M, Kubiak A, Antczak T, Bielecki S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. Renewable Energy 2009;34:1185-1194.

[6] Yu XW, Sha C, Guo YL, Xiao R, Xu Y. High-level expression and characterization of a chimeric lipase from Rhizopus oryzae for biodiesel production. Biotechnology for Biofuels 2013;6:29-40.

[7] Fan X. Enzymatic biodiesel production – the way of the Future. Lipid Technology 2012;24:31-32.

[8] Köse O, Tüter M, Aksoy H A. Immobilized Candida antarctica lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. Bioresource Technology 2002; 83:125-129.

[9] Moreno-Pirajan JC, Giraldo L. Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. Arabian Journal of Chemistry 2011;4:55–62.

[10] Liu Y, Liu T, Wang XF, Xu L, Yan YJ. Biodiesel synthesis catalyzed by Burkholderia cenocepacia lipase supported on macroporous resin NKA in solvent-free and isooctane systems. Energy Fuel 2011;25:1206-1212.

[11] Iftikhar T, Niaz M, Zia MA, Haq I. Production of extracellular lipases by Rhizopus oligosporus in a stirred fermentor. Brazilian Journal of Microbiology. 2010;41:1124-1132.

[12] Salihu A, Alam MZ, Abdulkarim MI, Salleh HM. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. Resources, Conservation and Recycling. 2012;58:36-44.

[13] Petersson AEV, Adlercreutz P, Mattiasson B. A water activity control system for enzymatic reactions in organic media. Biotechnology and Bioengineering. 2007;97:235-241.

[14] Bommarius AS, Riebel-Bommarius B R. Biocatalysts:Fundamentals and Applications. USA. John Wiley & Sons, 2000.

[15] Al-Zuhair S, Jayaraman K V, Krishnan S, Chan W H. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. Biochemical Engineering Journal 2006; 30:212-217

[16] Al-Zuhair S, Hasan M, Ramachandran K B. Kinetic hydrolysis of palm oil using lipase. Proc Biochem 2003; 38:1155-1163.

[17] Al-Zuhair S, Taher H, The use of alternative solvents in enzymatic biodiesel production: a review. Biofuels, Bioprod. Bioref.2017;11:168-194.

[18] Standard Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils, and Additives by Coulometric Karl Fischer Titration. ASTM D6304 - 16ed. USA. 2007.

[19] Wilfred L.F Amarego. Christina L.L. Chai. Purification of laboratory chemicals 6 ed. Burlington. Elsevier, 2009.

[20] 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 2004;21:155-160.

[21] Arai S, Nakashima K, Tanino T, Ogino C, Kondo A, Fukuda H. Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids, Enzyme and Microbial Technology 2010;46:51-55.

[22] Pazouki M, Zamani F, Zamzamian AH, Fahar M, Najafpour G. Esterification of Free Fatty Acids by Rhisopus oryzae as Cell-Catalyzed from Used Cooking Oil for Biodiesel Production., World Applied Sciences Journal 2010;8:719-724.

[23] Nie KL, Xie F, Wang F, Tan TW. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production, Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic 2006;43:142-147.

[24] Pizarro AVL, Park EY, Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth, Process Biochemistry 2003;38:1077-1082.

[25] Verdugo C, Luna D, Posadillo A, Sancho ED, Rodriguez S, Bautista FM, Luque R, Marinas JM, Romero AA. Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from Thermomyces lanuginosus: Optimization by response surface methodology. Catalysis Today 2011; 167:107-112.

[26] Luna C, Verdugo C, Sancho ED, Luna D, Calero J, Posadillo A, Bautista FM, Romero AA. A Biofuel Similar to Biodiesel Obtained by Using a Lipase from Rhizopus oryzae, Optimized by Response Surface Methodology. Energies 2014;7**:** 3383-3399.

[27] 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 2007; 45:122-127.
[28] Chen HC, Ju HY, Wu TT, Liu YC, Lee CC. Continuous Production of Lipase-Catalyzed Biodiesel in a Packed-Bed Reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2011; 2011:1-11.
[29] Halim SF, Kamaruddin AH, Fernando WJ. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response Surface methodology (RSM) and mass transfer studies. Bioresource Technology 2009;100:710-716
[30] Jin Z, Han SY, Zhang L, Zheng SP, Wang Y, Lin Y. Combined utilization of lipase-displaying Pichia pastoris whole-cell biocatalysts to improve biodiesel production in co-solvent media. Bioresource Technology 2013;130:102-109
[31] Bup Nde D, Astete C, Boldor D. ESolvent-free, enzyme-catalyzed biodiesel production from mango, neem, and shea oils via response surface methodology. Springer 2015;5:1-12.
[32] Hoang Chinh Nguyen, Shih-Hsiang Liang, Thien Thanh Doan, Chia-Hung Su Pei-Cheng Yang. Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel from black soldier fly (Hermetica illucens): Optimization by using response surface methodology Energy Conversion and Management 2017;145:335-342
[33] Bondioli P, Bella LD. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel Eur. J. Lipid Sci. Technol 2005;107:153-157.

[34] Qin H, Yan X, Yun T, Dong W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from Rhizopus chinensis. Chin J Catal 2008;29:41-46.

[35] Colin VL, Baigori MD, Pera LM. Mycelium-bound lipase production from Aspergillus niger MYA 135, and its potential applications for the transesterification of ethanol. J Basic Microbiol 2011;51:236-242.

[36] Ban 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. Biochem Eng J 2001;8:39-43.

[37] Tamalampudi S, Talukder MR, Hama S, Numata T, Kondo A, Fukuda H. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: a comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. Biochem Eng J 2008;39:185-189.

[38] Hama S, Yamaji H, Fukumizo T, Numata T, Tamalampudi S, Kondo A. Biodiesel fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing Rhizopus oryzae cells immobilized within biomass support particles. Biochem Eng J 2007;34:273-278.

[39] Arumugam A, Ponnusami V. Biodiesel production from Calophyllum inophyllum oil using lipase producing Rhizopus oryzae cells immobilized within reticulated foams. Renew Energy 2014;64:276-282.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

Foram avaliados os parâmetros relação molar óleo/álcool, tempo de reação, teor de água e quantidade de biocatalisador envolvidos na produção de biodiesel utilizando como biocatalisadores os fungos filamentosos *S. racemosum e R. stolonifer*. Os resultados obtidos provaram que os fungos em estudo têm produtividade e rendimento na reação de transesterificação envolvendo a reutilização da sua biomassa como biocatalisador, determinou-se que esta pode ser utilizada pelo menos duas vezes, já a tentativa de uma terceira reutilização não gerou bons resultados para a produção de biodiesel.

A razão molar entre óleo/álcool é um dos parâmetros que mais afeta o rendimento da reação de transesterificação, embora a razão molar estequiométrica seja 1:3 razões molares mais altas 1:6, 1:9 e 1:12 foram utilizadas neste estudo com o objetivo de promover melhores conversões e mostraram que é possível obter melhor rendimento sem afetar a atividade catalítica dos fungos estudados.

O estudo da variável teor de água demostrou que é um fator importante a ser analisado na reação de transesterificação com biocatalisadores e que é importante para cada espécie de biocatalisador estudado achar a melhor faixa de desenvolvimento.

Apesar do material caldo liofilizado produzido pelo fungo *S. racemosum* apresentar baixa atividade enzimática quando comparada a outros autores, o material conseguiu uma boa conversão de 65% (porcentagem de área de ésteres) nas condições estudadas. Vale salientar que foi utilizado aqui o material puro sem

nenhum pré- tratamento, separação ou purificação para a separação da lipase extracelular existente. Estes resultados nos mostram que se conseguirmos otimizar ainda mais as condições da reação obteremos melhores resultados. Esta forma de utilização da lipase extracelular sem a sua purificação torna o processo de catálise enzimático economicamente mais viável.

A utilização dos fungos filamentosos *S. racemosum e R. stolonifer* como biocatalisadores na sua forma de célula íntegra para a produção de biodiesel é uma alternativa promissora para contornar os problemas associados com a via convencional. Com o uso das células íntegras liofilizadas do fungo filamentoso *S. racemosum* como biocatalisador na reação de transesterificação, foi obtido um rendimento na produção de biodiesel de 85%, o que torna esta forma de lipase intracelular viável para a obtenção deste produto.

Com os resultados obtidos nas análises de superfície de resposta Box-Behnken para os fungos *S. racemosum e R. stolonifer* na sua forma de biomassa liofilizada como biocatalisador, foi possível ver que o fator tempo de reação é muito significativo no caso de *S. racemosum* e para o fungo *R. stolonifer* os fatores tempo de reação, razão molar óleo/álcool e quantidade de biocatalisador foram muito significativos.

A metodologia para quantificar glicerol livre em amostras de biodiesel aplicada à produção de biodiesel obtido pela rota biocatalítica, demonstrou que é uma alternativa para acompanhar os resultados da reação de transesterificação no caso que não seja possível analisar as amostras por HPLC.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento deste trabalho abre a possibilidade de serem realizadas no futuro outras pesquisas dentro deste tema algumas delas estão elencadas a seguir:

- Utilização das biomassas produzidas pelos fungos do estudo que poderiam ser imobilizadas em diferentes meios de suporte e melhorar assim a sua reutilização.

- Fazer a extração e purificação das lipases produzidas pelos fungos estudados.

- Otimizar outras variáveis que afetam a reação de transesterificação como a temperatura de reação e o pH do meio de desenvolvimento dos fungos estudados.