**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

GRAZIELLE SANTOS SILVA ANDRADE

Produção de Biodiesel a partir de Óleos Vegetais usando
Células Íntegras Imobilizadas de Fungos Filamentosos com
Elevada Atividade Lipolítica
(Glicerol Éster Hidrolase – E.C. 3.1.1.3)

**Lorena – SP
2012**

GRAZIELLE SANTOS SILVA ANDRADE

Produção de Biodiesel a partir de Óleos Vegetais usando Células Íntegras Imobilizadas de
Fungos Filamentosos com Elevada Atividade Lipolítica (Glicerol Éster Hidrolase –
E.C.3.1.1.3)

Tese de Doutorado apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo no Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Industrial

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada
Orientador: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Lorena – SP
Março, 2012

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

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Especializada em Engenharia de Materiais
USP/EEL

Andrade, Grazielle Santos Silva

Produção de biodiesel a partir de óleos vegetais usando células íntegras imobilizadas de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica (glicerol éster hidrolase – E.C. 3.1.1.3)/ Grazielle Santos Silva Andrade. Orientador Heizir Ferreira de Castro.-- Lorena, 2012.
158f.: il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo.

1. Células íntegras 2. Imobilização 3. Óleos Vegetais
4. Biodiesel I. Título.

CDU 662.756

Dedicatória

*Aos meus pais: Celso e Elizabeth,
Por terem me proporcionado a realização deste sonho,
Por estarem presentes em todas as etapas da minha vida,
Pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela paciência,
Pelo amor incondicional...
Pelo privilégio de ser sua filha...*

*Ao meu marido: Karol,
Por todos os momentos que dividimos juntos,
Pela compreensão, carinho, respeito, paciência,
Por ser meu companheiro por toda vida...*

*Confie no Senhor de todo o coração
e não se apóie na sua própria inteligência.
Lembre de Deus em tudo o que fizer,
e ele lhe mostrará o caminho certo.”*

Provérbios 3:5-6 (NTLH)

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar e guiar minha vida, por renovar minha fé todos os dias, por me dar força e sabedoria nos momentos difíceis e por sua presença constante ao meu lado. Obrigada Pai pelas pessoas maravilhosas que colocastes em meu caminho, pelas bençãos e promessas cumpridas em minha vida.

Aos meus pais Celso e Elizabeth por contribuírem diretamente na minha formação profissional e pessoal, por me proporcionarem um ambiente familiar de muito amor e respeito, por terem incentivado e financiado meus estudos e por terem me ensinado seus valores e princípios de honestidade e caráter.

Ao meu marido Karol pelo amor, amizade, companheirismo, paciência, confiança e respeito. Obrigada por estar sempre ao meu lado e me fazer feliz.

A profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro pela orientação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Obrigada pela amizade, confiança, paciência, conselhos, incentivo, apoio e acima de tudo por sempre ter me ajudado em todos os momentos.

Ao prof. Júlio e prof. Pedro pela ótima convivência no laboratório de Biocatálise, pela amizade e contribuição neste trabalho.

A prof. Laura e aos funcionários dos laboratórios de Microbiologia e Fitopatologia da Embrapa/CE pelo auxílio fundamental na área de microbiologia no início deste trabalho.

A prof. Bernadete e a técnica Lucinha do laboratório de Microbiologia Industrial por todos os ensinamentos e por estarem sempre dispostas a me ajudar.

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

Aos meus sogros Sueli e Rui e minha cunhada Kelen, pela ajuda, carinho e incentivo ao meu trabalho.

Aos meus amigos e irmãos Luana, Douglas, Dani, Alexandre, Ciça, Rodrigo, Fernanda, Rafael, Giga e Nilton por tantos anos de amizade e companheirismo, por todos os momentos que compartilhamos juntos e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus queridos amigos presentes e aos que já fizeram parte do laboratório de Biocatálise Ana Karine, Larissa, Patrícia, Lívia, Gisele, Natália, Weriton, Márcio, William, Daniel, Mateus, Layne, Bruno e em especial minha amiga e irmã Ariela pelos anos de amizade, por sempre me ajudar, por seus conselhos e suas orações. Obrigado a todos pela rica convivência, pela amizade e por contribuírem na realização deste trabalho.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

ANDRADE, G. S. S. **Produção de Biodiesel a partir de Óleos Vegetais usando Células Íntegras Imobilizadas de Fungos Filamentosos com Elevada Atividade Lipolítica (Glicerol Éster Hidrolase – E.C.3.1.1.3).** 2012, 158f. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2012.

O objetivo deste trabalho foi contribuir no desenvolvimento de técnicas para obtenção de biocatalisadores imobilizados de baixo custo e alto poder catalítico para ser empregado na síntese de biodiesel a partir de óleos vegetais pela rota etílica. Baseia-se na utilização de células íntegras de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica (glicerol éster hidrolase – E.C. 3.1.1.3) imobilizadas em suporte adequado. O trabalho experimental foi desenvolvido em diferentes etapas e iniciado pela triagem de linhagens de fungos adquiridas de banco de cultura nacional, com habilidade de produzir lipase intracelular em cultivo submerso. Mediante a avaliação da atividade lipolítica do micélio, foram selecionadas as linhagens dos fungos: *Rhizopus oryzae* (3231 e 4692), *Mucor circinelloides* (4140 e 4182) e *Penicillium citrinum* (4216) e efetuados testes de imobilização por adsorção física (*in situ* e *extra-situ*) da biomassa produzida, utilizando os seguintes suportes: espuma de poliuretano, Celite e polihidroxibutirato. Nas condições testadas, o melhor desempenho foi alcançado pela matriz de poliuretano que permitiu a retenção de elevada concentração de biomassa celular para todas as linhagens selecionadas, exceto para fungo de *P.citrinum* (4216). Testes adicionais de imobilização da biomassa celular na espuma de poliuretano foram efetuados, complementando desta forma, as propriedades físicas e morfológicas desse suporte e do sistema imobilizado. Os resultados indicaram que espumas de poliuretano cortadas em cubos de 6 mm foram mais adequadas para promover completa adsorção da biomassa celular produzida pelos fungos selecionados, em especial do fungo *M. circinelloides* 4182, que apresentou elevado poder catalítico na reação de transesterificação. Em virtude desse fato, as condições de cultivo dessa linhagem foram estudadas, mediante variação das fontes de carbono e nitrogênio, aeração e inóculo. O biocatalisador obtido nas melhores condições (atividade lipolítica= 65 U/g) foi utilizado na etanólise do óleo de babaçu e o processo foi otimizado por meio de um delineamento fatorial, avaliando-se a influência da temperatura (33 – 47°C) e da razão molar entre óleo de babaçu e etanol (1:4,8 – 1:13,2) no rendimento de transesterificação. As condições otimizadas previstas pelo planejamento fatorial foram: temperatura de 35°C e razão molar etanol/óleo de 6:1, obtendo-se rendimento de 90,5% empregando 20% m/m de biocatalisador e terc-butanol como solvente. A estabilidade operacional do biocatalisador foi avaliada em reator operando em regime de bateladas consecutivas e em regime contínuo. Resultados satisfatórios foram obtidos em ambos os sistemas, entretanto o sistema contínuo evitou a dessorção do micélio do suporte, revelando tempo de meia-vida do biocatalisador superior a 20 dias. Finalmente, a influência de óleos vegetais contendo diferentes composições em ácidos graxos (andioba, macaúba, pinhão manso e palma) foi avaliada na reação de etanólise, sendo constatado a preferência do biocatalisador na transesterificação de ácidos graxos de cadeia média, presentes nos óleos de babaçu e macaúba. De forma geral, os resultados obtidos foram promissores e demonstraram a potencialidade de células íntegras de fungos filamentosos imobilizadas na síntese de biodiesel, com destaque para o desempenho obtido pelo fungo *Mucor circinelloides* 4182.

Palavras chaves: células íntegras, imobilização, óleos vegetais, biodiesel.

ABSTRACT

ANDRADE, G. S. S. **Biodiesel production from vegetable oils using immobilized whole cells with high lipase activity (Glycerol Ester Hydrolase – E.C. 3.1.1.3)** 2012, 158f. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2012.

The objective of this work was contributed in developing techniques to obtain immobilized biocatalysts with low cost and high catalytic activity to be applied in the biodiesel synthesis by ethanol route. It is based on the utilization of filamentous fungi whole cells with high lipase activity (glycerol ester hydrolase – E.C.3.1.1.3) immobilized in suitable support. The experimental work was developed in different ways and started by screening fungi strains acquired from National Culture Collection which has the ability to produce intracellular lipase in submerge cultivation. Through lipase activity the fungi strains: *Rhizopus oryzae* (3231 and 4692), *Mucor circinelloides* (4140 e 4182) and *Penicillium citrinum* (4216) were selected. Tests to evaluate the biomass immobilization by physical adsorption (*in situ* and *extra-situ*) using the supports: polyurethane foam, Celite and polyhydroxybutyrate were carried out. The best performance was attained by polyurethane matrix that allowed attain high biomass concentration for all strain fungi, except for *P. citrinum* (4216). Additional tests were performed to complement the physical and morphological properties of support and immobilized system. Results indicated that polyurethane foam cut in cubes 6-mm were suitable to provide full adsorption of biomass from all selected fungi strains, specially strain of *M. circinelloides* 4182 displayed high catalytic activity in the transesterification reaction. Consequently, cultivation conditions of this strain were studied, evaluating the carbon and nitrogen sources, aeration and inoculum level. The biocatalyst obtained under the best conditions (lipase activity = 65 U/g) was used in the ethanolysis of babassu oil and the process was optimized by experimental design. The influence of temperature (33 – 47°C) and ethanol to oil molar ratio (4.8:1 – 13.2:1) were investigated in the transesterification yield. Under the optimized conditions (35°C and oil to ethanol molar ratio 6:1) transesterification yield of 90.5% was obtained employing 20% wt. of biocatalyst and tert-butanol as solvent. The biocatalyst operational stability was assessed under consecutive batch runs and continuous system. Satisfactory results were attained in both systems, however, the continuous system avoided cells desorption from support, revealing biocatalyst half life higher than 20 days. Finally, the influence of vegetable oils with different fatty acid compositions (babassu, andiroba, macauba, *Jatropha*, palm) was studied in the ethanolysis reaction, being evidenced the specificity of the biocatalyst to transesterify medium chain fatty acids as presented in babassu and macauba oils. The results obtained were promise and demonstrated the potential of filamentous fungi whole cells immobilized as biocatalysts in the biodiesel synthesis, with prominence to the performance of *Mucor circinelloides* 4182 strain.

Key words: whole cells, immobilization, vegetable oils, biodiesel.

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. Aplicações industriais de lipases.	37
TABELA 3.2. Principais fungos produtores de lipase.	40
TABELA 3.2. Principais fungos produtores de lipase (continuação).	41
TABELA 3.3. Parâmetros de crescimento celular que podem ser modificados pela imobilização dos micro-organismos.	51
TABELA 3.4. Propriedades desejáveis para seleção de matriz ou suporte para imobilização de células microbianas.	52
TABELA 3.5. Reações de hidrólise e esterificação utilizando células íntegras imobilizadas em diferentes suportes.	56
TABELA 3.6. Processos de obtenção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando células íntegras imobilizadas.	58
TABELA 4.1. Linhagens de fungos filamentosos adquiridos do departamento de micologia da UFPE.	62
TABELA 4.2. Fornecedores das matérias-primas lipídicas.	63
TABELA 4.3. Condições operacionais para determinação dos ésteres de etila por CG.	72
TABELA 5.1. Concentração de biomassa e valores máximos de atividade lipolítica do filtrado (extracelular) e da biomassa (intracelular) para os fungos testados.	76
TABELA 5.2. Caracterização das propriedades físicas da espuma de poliuretano comercial.	82
TABELA 5.3. Comparação entre os valores de biomassa seca e de atividade da biomassa imobilizada em diferentes tamanhos de cubos de poliuretano.	85
TABELA 5.4. Valores de rendimento de transesterificação (rend.), viscosidade (visc.) e densidade (dens.) dos produtos obtidos pela etanólise do óleo de babaçu empregando biomassas imobilizadas dos fungos <i>R. oryzae</i> e <i>M. circinelloides</i>	89
TABELA 5.5. Composição em ácidos graxos dos óleos vegetais utilizados como fonte de carbono no cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> 4182.	92
TABELA 5.6. Biomassa imobilizada e atividade hidrolítica obtida no cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> empregando diferentes níveis de inóculo e variando os volumes dos frascos.	97
TABELA 5.7. Condições ótimas de cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> 4182.	98
TABELA 5.8. Efeito do carregamento de células imobilizadas na etanólise do óleo de babaçu.	99
TABELA 5.9. Influência de diferentes solventes na síntese enzimática do biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol catalisado por células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182.	102
TABELA 5.10. Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento central 2 ² estrela rotacional utilizado para avaliar a influência das variáveis: razão molar e temperatura (as variáveis estão codificadas e os valores reais estão entre parênteses) no rendimento da etanólise do óleo de babaçu.	104
TABELA 5.11. Estimativa dos efeitos das variáveis, erros padrão e teste t de student's t para o rendimento da etanólise do óleo de babaçu utilizando planejamento central 2 ² estrela rotacional.	107

TABELA 5.12. Análise de variância (ANOVA) para a regressão do moldeio que representa o rendimento da etanólise do óleo de babaçu utilizando o planejamento central 2 ² estrela rotacional...	109
TABELA 5.13. Caracterização do biodiesel purificado de óleo de babaçu.....	111
TABELA 5.14. Temperaturas de degradação térmica do óleo de babaçu, diesel mineral e biodiesel catalisado pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182.....	114
TABELA 5.14. Valores de biomassa imobilizada e atividade hidrolítica obtidos no cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> 4182 empregando tratamento com GA e PEI 0,1% nas espumas e nas células íntegras imobilizadas.	117
TABELA 5.16. Valores de rendimento de transesterificação e viscosidade do produto purificado obtido na síntese enzimática do biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol mediado pela biomassa imobilizada de <i>M. circinelloides</i> 4182 tratada com agentes cross-linking (suporte tratado e biomassa tratada).	119
TABELA 5.17. Valores de biomassa imobilizada e atividade hidrolítica obtidos no cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> 4182 empregando tratamento com GA e Aliquat 0,1% nas células íntegras imobilizadas.	124
TABELA 5.18. Variação da concentração de ésteres etílicos, rendimento, produtividade e viscosidade dos sistemas reacionais contínuo empregando células imobilizadas tratadas com GA e Aliquat.	128
TABELA 5.19. Parâmetros da estabilidade operacional das células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 com e sem tratamento na etanólise do óleo de babaçu operando em sistema contínuo.....	128
TABELA 5.20. Resultados referentes à biomassa recuperada e atividades de transesterificação e hidrólise das células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 com e sem tratamento após etanólise do óleo de babaçu em sistema contínuo.	130
TABELA 5.21. Composição em ácidos graxos das matérias-primas lipídicas utilizadas na síntese de biodiesel catalisado pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182.....	132
TABELA 5.22. Propriedades das matérias-primas lipídicas utilizadas na síntese de biodiesel catalisado pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182.....	134
TABELA 5.23. Valores de rendimento, viscosidade e densidade dos produtos obtidos da etanólise dos diferentes óleos vegetais catalisado pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182.....	137

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1. Estrutura de uma molécula de triglicerídeo	31
FIGURA 3.2. Reação de transesterificação de triglicerídeo e álcool.....	32
FIGURA 3.3. Mecanismo da reação de transesterificação do triglicerídeo com álcool, mediante catalisador, envolvendo as três reações consecutivas e reversíveis de formação dos ésteres alquílicos. R ₁ , R ₂ , R ₃ e R, representam os grupos alquila.	34
FIGURA 3.4. Diagrama da produção de biodiesel utilizando lipases como biocatalisador.	35
FIGURA 3.5. Parâmetros cruciais que afetam o rendimento da síntese enzimática do biodiesel (REIS et al., 2009).....	36
FIGURA 3.6. Comparação das etapas envolvidas no processo de obtenção de biodiesel por via enzimática empregando lipase purificada ou células íntegras imobilizadas: (a) lipase extracelular e (b) lipase intracelular (DU et al., 2008).....	48
FIGURA 3.7. Diagrama esquemático da maturação e localização das lipases ROL nas células de <i>R. oryzae</i> (HAMA et al., 2006 modificado).	49
FIGURA 3.8. Fotografia dos cubos de poliuretano e sua estrutura interna (De ORY et al, 2006).....	55
FIGURA 4.1. Suportes utilizados no processo de imobilização dos fungos.....	63
FIGURA 4.2 Esquema simplificado do reator de leito fixo a ser empregado neste projeto. 1- banho termostático, 2- agitador magnético, 3- tanque de alimentação, 4- condensador de refluxo, 5- bomba peristáltica, 6- reator tipo leito fixo, 7- saída de produto.....	68
FIGURA 4.3. Região entre 4,35 a 4,05 ppm dos espectros simulados de RMN ¹ H dos TAG, DAG, MAG e ésteres etílicos.....	74
FIGURA 4.4. Desdobramento dos picos de ressonância segundo a regra do n+1	74
FIGURA 4.5. Área dos desdobramentos do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio metilênicos do grupo etoxílico dos ésteres etílicos	75
FIGURA 5.1. Fotografias da biomassa fúngica produzida pelos fungos testados em 72 h de cultivo a 30°C.....	77
FIGURA 5.2. Valores de atividade lipolítica quantificada no filtrado (a) e na biomassa celular imobilizada (b) em diferentes suportes.....	79
FIGURA 5.3. Células de <i>M. circinelloides</i> 4182: microscopia das hifas e esporângios em ágar (a), microscopia das células imobilizadas em espumas de poliuretano (b), micrografia da superfície das células suspensas livres (c) micrografia da seção transversal das células imobilizadas em espumas de poliuretano (d).....	81
FIGURA 5.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da espuma de poliuretano.	83
FIGURA 5.5. Biomassas imobilizadas em espumas de poliuretano de 10 mm.	84
FIGURA 5.6. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C8; -□-C10, -●-C12, -○- C14, -▼- C16, -△-C18, -▼-C18:1, -▽-C18:2) em função do tempo na etanólise do óleo de babaçu catalisada por (a) <i>R. oryzae</i> 3231, (b) <i>R. oryzae</i> 4962 e (c) <i>M. circinelloides</i> 4182 imobilizadas em espumas de poliuretano de 6 mm. O valor total em ésteres de etila está indicado por uma linha cheia.	87
FIGURA 5.7. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C8; -□-C10, -●-C12, -○- C14, -▼- C16, -△-C18, -▼-C18:1, -▽-C18:2) em função do tempo na etanólise do óleo de babaçu catalisada por (a) <i>R. oryzae</i> 3231, (b) <i>R. oryzae</i> 4962 e (c) <i>M. circinelloides</i> 4182 imobilizadas em espumas de poliuretano de 10 mm. o valor total em ésteres de etila está indicado por uma linha cheia.	88

FIGURA 5.8. Biomassa imobilizada (■) e atividade hidrolítica (coluna) obtida no cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> empregando diferentes fontes de carbono como substrato do meio de cultura contendo peptona (70g/l) a 30°C em agitação orbital (170 rpm).....	92
FIGURA 5.9. Biomassa imobilizada (■) e atividade hidrolítica (coluna) obtida no cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> empregando diferentes concentrações de óleo de oliva como substrato do meio de cultura contendo peptona (70g/l) a 30°C em agitação orbital (170 rpm)....	94
FIGURA 5.10. Biomassa imobilizada (■) e atividade hidrolítica (coluna) obtida no cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> empregando meio de cultura contendo óleo de oliva (30g/l) suplementado com diferentes fontes de nitrogênio a 30°C em agitação orbital (170 rpm).....	96
FIGURA 5.11. Dispersão do biocatalisador com carregamento de (a) 5%, (b) 10% e (c) 20% de células imobilizadas em relação ao meio reacional.	100
FIGURA 5.12. Efeito de solventes e misturas de solventes na atividade de células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 para mediar a etanólise do óleo de babaçu (-▼-) isento de solvente, (-■-) terc-butanol, (-▲-) iso-octano e (-●-) mistura 50% terc-butanol e iso-octano.	101
FIGURA 5.13. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C8; -□-C10, -●-C12, -○- C14, -▼-C16, -△-C18, -▼-C18:1, -▽-C18:2) em função do tempo na etanólise do óleo de babaçu catalisada pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 sob diferentes condições operacionais (ensaios 1 ao 6).....	105
CONCLUSÃO FIGURA 5.13. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C8; -□-C10, -●-C12, -○- C14, -▼-C16, -△-C18, -▼-C18:1, -▽-C18:2) em função do tempo na etanólise do óleo de babaçu catalisada pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 sob diferentes condições operacionais (ensaios 7 ao 12).....	106
FIGURA 5.14. Superfície de resposta descrita pelo modelo da equação 5.1 que representa o rendimento da etanólise do óleo de babaçu catalisado pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 em função da razão molar (X_1) e temperatura (X_2) conforme modelo proposto na equação 1...	109
FIGURA 5.15. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C8; -□-C10, -●-C12, -○- C14, -▼-C16, -△-C18, -▼-C18:1, -▽-C18:2) em função do tempo na etanólise do óleo de babaçu catalisada pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 nas condições previstas pelo modelo matemático (razão molar óleo/etanol 1:6 a 35°C). O valor total em ésteres de etila está indicado por uma linha cheia.	110
FIGURA 5.16. Ressonância magnética nuclear de prótons do biodiesel de óleo de babaçu e etanol catalisado pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182.....	112
FIGURA 5.17. Análise termogravimétrica (TG) do óleo de babaçu, do biodiesel purificado e do diesel mineral (a) e derivada da curva termogravimétrica (DTG) do biodiesel (b) de óleo de babaçu e etanol catalisado pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182.....	113
FIGURA 5.18. Espectroscopia no infravermelho do biodiesel purificado de óleo de babaçu e etanol catalisado pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182.....	115
FIGURA 5.18. Efeito do tratamento do suporte (espumas) e células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 com GA e PEI nas reações de etanólise do óleo de babaçu. (a) tratamento do suporte, (b) tratamento da biomassa imobilizada.....	118
FIGURA 5.19. Rendimentos em ésteres etílicos obtidos pelas células íntegras imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 na síntese enzimática do biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol em bateladas consecutivas.	120
FIGURA 5.20. Estabilidade operacional das células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 na etanólise do óleo de babaçu. Símbolos: -○- atividade hidrolítica e -●- atividade de transesterificação.	121
FIGURA 5.21. Esquema da reação de etanólise do óleo de babaçu realizada em reator de leito fixo operando em sistema contínuo.	125

FIGURA 5.22. Concentração total dos ésteres etílicos formados na etanólise do óleo de babaçu catalisado pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 (a) sem tratamento – reação controle, (b) tratadas com GA 0,1% e (c) tratadas com Aliquat 0,1%, todos operando em sistema contínuo por 14 dias. 127

FIGURA 5.23. Ajuste do modelo de desativação das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 (a) sem tratamento – reação controle, (b) tratadas com GA 0,1% e (c) tratadas com Aliquat 0,1% na etanólise contínua do óleo de babaçu conduzida em reator de leito fixo a 35°C..... 129

FIGURA 5.24. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C8; -□-C10, -●-C12, -○- C14, -▼-C16, -△-C18, -▼-C18:1, -▽-C18:2) em função do tempo na etanólise dos óleos de (a) babaçu, (b) andiroba, (c) macaúba, (d) palma, (e) pinhão manso catalisada pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182. O valor total em ésteres de etila está indicado por uma linha cheia. 136

LISTA DE SIGLAS

ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível
BDA	Batata Dextrose Agar
BSP	Biomass Support Particles
CG	Cromatografia de fase Gasosa
DTG	Derivada Termogravimétrica
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GA	Glutaraldeído
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PEI	Polietilenoimina
PHB	Polihidroxibutirato
RMN¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
ROL	<i>Rizhopus oryzae</i> lipase
TGA	Análise Termogravimétrica
URM	University of Recife Mycology

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
3.1. BIOCOMBUSTÍVEIS COMO FONTES RENOVÁVEIS DE ENERGIA.....	26
3.2. BIODIESEL.....	27
3.3. PANORAMA ATUAL DO BIODIESEL.....	28
3.4. MATÉRIAS-PRIMAS LÍPIDICAS PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	30
3.5. PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO	32
3.5.1. <i>Transesterificação enzimática</i>	35
3.6. LIPASES	37
3.7. FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE LIPASE.....	39
3.7.1. <i>Rhizopus oryzae</i>	42
3.7.2. <i>Mucor circinelloides</i>	43
3.7.3. <i>Mucor hiemalis</i>	43
3.7.4. <i>Mucor piriformis</i>	44
3.7.5. <i>Penicillium citrinum</i>	44
3.8. FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE LIPASES FÚNGICAS	44
3.9. LIPASES FÚNGICAS INTRACELULAR	47
3.10. IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS	50
3.10.1. <i>Suportes de imobilização</i>	52
3.10.1.1. <i>Terra diatomácea: Celite</i>	53
3.10.1.2. <i>Polihidroxibutirato (PHB)</i>	54
3.10.1.3. <i>Espuma de poliuretano</i>	54
3.11. REAÇÕES ENZIMÁTICAS UTILIZANDO CÉLULAS ÍNTEGRAS IMOBILIZADAS COM ELEVADA ATIVIDADE LIPOLÍTICA.....	56
3.11.1. <i>Reações de hidrólise e esterificação</i>	56
3.11.2. <i>Síntese de biodiesel</i>	57
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
4.1. MATERIAIS	62
4.1.1. <i>Micro-organismos</i>	62
4.1.2. <i>Suportes de Imobilização</i>	62
4.1.3. <i>Matérias-primas</i>	63
4.1.4. <i>Outros reagentes</i>	63
4.2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	64
4.2.1. <i>Preparo do meio de cultura</i>	64
4.2.2. <i>Preparo das células íntegras</i>	64
4.2.3. <i>Preparo das células íntegras imobilizadas</i>	64
4.2.3.1. <i>Seleção de suportes de imobilização</i>	64
4.2.3.2. <i>Influência do tamanho das espumas de poliuretano na imobilização da biomassa celular</i>	65
4.2.3.3. <i>Efeito dos parâmetros físicos e nutricionais na imobilização da biomassa celular</i>	65
4.2.4. <i>Tratamento das espumas e das células íntegras imobilizadas</i>	65
4.2.5. <i>Síntese de biodiesel</i>	66
4.2.5.1. <i>Delineamento experimental</i>	66
4.2.6. <i>Testes de estabilidade operacional</i>	66
4.2.6.1. <i>Sistema descontínuo (bateladas consecutivas)</i>	66
4.2.6.2. <i>Sistema contínuo (reator de leito fixo)</i>	67

4.3. METODOLOGIA ANALÍTICA.....	68
4.3.1. Caracterização das propriedades das matérias-primas lipídicas	68
4.3.2. Determinação do perfil em ácidos graxos das matérias-primas lipídicas	69
4.3.3. Caracterização da espuma de poliuretano.....	69
4.3.3.1. Densidade aparente	69
4.3.3.2. Cálculo do diâmetro médio de poros.....	69
4.3.3.3. Sorção de água	70
4.3.3.4. Absorção dos solventes: etanol e terc-butanol	70
4.3.4. Determinação da atividade hidrolítica.....	70
4.3.5. Análise de umidade.....	71
4.3.6. Separação dos produtos formados na síntese de biodiesel.....	71
4.3.7. Análise de viscosidade.....	71
4.3.8. Determinação da densidade	71
4.3.9. Análise Termogravimétrica (TGA).....	72
4.3.10. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	72
4.3.11. Determinação dos ésteres de etila.....	72
4.3.12. Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN ¹ H).....	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
5.1. SELEÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE LIPASE INTRACELULAR.....	76
5.2. IMOBILIZAÇÃO DAS CEPAS SELECIONADAS: SELEÇÃO DOS SUPORTES	78
5.3. CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE SELECIONADO: ESPUMA DE POLIURETANO.....	82
5.4. IMOBILIZAÇÃO DA BIOMASSA EM ESPUMAS DE POLIURETANO: INFLUÊNCIA DA ÁREA SUPERFICIAL	84
5.5. PERFORMANCE DAS CÉLULAS IMOBILIZADAS NA ETANÓLISE DO ÓLEO DE BABAÇU.....	86
5.6. ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E IMOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE <i>M.</i> <i>CIRCINELLOIDES 4182</i>	91
5.6.1. Efeito da fonte de carbono.....	91
5.6.2. Efeito da concentração de óleo de oliva.....	94
5.6.3. Efeito da fonte de nitrogênio	95
5.6.4. Influência de fatores físicos: nível de inóculo e volume dos Erlenmeyers	96
5.7. ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS DA SÍNTESE DE BIODIESEL DE ÓLEO DE BABAÇU	98
5.7.1. Influência da quantidade de biocatalisador.....	98
5.7.2. Influência do solvente.....	100
5.7.3. Delineamento experimental.....	103
5.8. CARACTERIZAÇÃO DO BIODIESEL PURIFICADO.....	110
5.9. ESTABILIDADE OPERACIONAL DAS CÉLULAS IMOBILIZADAS NA SÍNTESE DO BIODIESEL DE ÓLEO DE BABAÇU	116
5.9.1. Sistema descontínuo.....	116
5.9.1.1. Tratamento do suporte e das células imobilizadas com agentes de ativação	116
5.9.1.2. Recuperação das células imobilizadas com terc-butanol	121
5.9.2. Sistema contínuo	123
5.10. DESEMPENHO DAS CÉLULAS IMOBILIZADAS NA SÍNTESE DE BIODIESEL A PARTIR DE DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS	131
5.10.1. Composição química e propriedades das matérias-primas lipídicas.....	131
5.10.2. Performance das células imobilizadas de <i>M. circinelloides 4182</i> na etanolise de diferentes óleos vegetais	135
6. CONCLUSÕES	139
RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	141
REFERÊNCIAS	142

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática e a biocatálise são ferramentas promissoras para síntese de compostos de alto valor agregado. Dentre as principais enzimas utilizadas em biocatálise destacam-se as lipases, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos e sua quimio-regio e enantiosseletividade (KRIEGER et al., 2004; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As lipases são encontradas na natureza em células microbianas, tecidos animais e vegetais. As lipases microbianas são freqüentemente mais utilizadas que as lipases derivadas de plantas ou animais devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, à facilidade de manipulação genética, por ser uma fonte regular devido à ausência de flutuação sazonal e pelo rápido crescimento do micro-organismo em meios de cultivo apropriados. Dessa forma, são mais estáveis e sua produção mais conveniente e segura (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Dentre os diversos micro-organismos produtores de lipases, do ponto de vista industrial, os fungos são preferidos como fontes de lipases, pois são considerados micro-organismos seguros para aplicação em indústrias de alimentos, bebidas e farmacêutica (BURKET; MAUGERI; RODRIGUES, 2004). A produção de lipases fúngicas em escala industrial tem sido realizada pelo cultivo em meio de cultura líquido (fermentação submersa) como processo majoritário, provavelmente por ser tecnologicamente fácil de executar e controlar, bem como apresentar rendimentos de produção considerados satisfatórios (SANT'ANNA JUNIOR, 2001). Entretanto, muitas aplicações industriais dessas lipases são ainda limitadas pelo seu alto custo de produção e baixa produtividade, pois são em sua maioria extracelulares, o que requer etapas posteriores de separação, purificação e imobilização em um suporte, por processos complexos para uso prático, gerando lipases instáveis e de custo elevado (BAN et al., 2002).

Nesse contexto, lipases intracelulares vem despertando grande interesse de investigação pelo seu potencial de uso na biotecnologia, pois sua aplicação pode reduzir consideravelmente os custos de um processo enzimático. Diversos estudos estão sendo direcionados na utilização de células íntegras de fungos filamentosos como biocatalisadores, baseados em sua habilidade de imobilização e na evidência de proteínas funcionais de

interesse na superfície celular, no caso, as lipases intracelulares que estão ligadas à membrana celular. Além disso, técnicas simples de imobilização e a relativa facilidade de ampliação de escala ao se utilizar fungos filamentosos tornam as células íntegras biocatalisadores com muitas vantagens comerciais (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2009).

Entretanto, para se utilizar células íntegras lipolíticas como biocatalisadores de uma forma conveniente, as células devem ser imobilizadas de tal maneira que assemelhem-se a catalisadores sólidos utilizados convencionalmente em reações químicas sintéticas. Entre diversos métodos de imobilização disponíveis, a técnica que utiliza partículas de suporte de biomassa, também denominadas por BSPs, tem muitas vantagens sobre outros métodos em termos de aplicações industriais, dentre os quais se destacam a possibilidade de reutilização do derivado imobilizado e o baixo custo de produção das BSPs (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

As células íntegras imobilizadas podem ser obtidas por simples separação das células e permeabilização por diferentes procedimentos, tais como, secagem a vácuo e tratamento com acetona. Entretanto, a atividade da biomassa imobilizada vai depender das diferentes isoformas de lipase produzidas pelas células que podem estar ligadas à parede ou à membrana celular (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2009).

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

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um processo eficiente baseado na transesterificação de óleos vegetais, para sua utilização como combustível alternativo ao diesel convencional, utilizando células íntegras de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica (glicerol éster hidrolase – E.C. 3.1.1.3) imobilizadas em suportes sólidos. Para alcançar o objetivo proposto, foram desenvolvidas as seguintes atividades:

1. Avaliar os níveis de atividade lipolítica de fungos filamentosos provenientes de Banco de Culturas nacionais; tomando por base as atividades quantificadas no micélio e extrato enzimático;
2. Selecionar o suporte mais adequado para imobilizar a biomassa celular produzida pelos fungos selecionados e testar a aplicabilidade dos sistemas imobilizados na síntese de biodiesel, utilizando como matéria-prima lipídica o óleo de babaçu e como agente acilante o etanol;
3. Estabelecer as melhores condições de cultivo e imobilização do fungo selecionado, bem como otimizar as condições reacionais da síntese de biodiesel a partir do óleo de babaçu pela rota etílica;
4. Determinar a estabilidade operacional das células imobilizadas em sistemas descontínuo (bateladas consecutivas) e contínuo (reator de leito fixo) na etanólise do óleo de babaçu;
5. Testar o desempenho do sistema imobilizado na síntese do biodiesel a partir de diferentes óleos vegetais (palma, macaúba, pinhão manso e andiroba) e etanol como agente acilante, utilizando as condições otimizadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico são abordados temas atuais referentes à importância mundial do biodiesel como uma nova fonte de energia renovável, incluindo as principais matérias-primas e o principal método de obtenção, a transesterificação. Em seguida, a revisão destaca o emprego das lipases como biocatalisadores da reação, os principais fungos produtores dessa enzima e a influência das condições de cultivo para a sua produção intracelular. A revisão enfoca ainda a importância da imobilização de células, os principais suportes utilizados e fornece uma listagem de artigos nos quais são usados como biocatalisadores células íntegras de fungos com elevada atividade lipolítica.

3.1. Biocombustíveis como fontes renováveis de energia

Combustíveis fósseis como petróleo, gás natural e carvão tem sido a principal fonte de suprimento de energia em todo o mundo. Muitos países dependem desses combustíveis para gerar energia, incluindo eletricidade que é essencial para o desenvolvimento e crescimento econômico. Entretanto, as reservas de combustíveis fósseis como petróleo tem sido depreciadas, causando o aumento no preço do barril (TAN et al., 2009).

Os esforços de investigação de novas formas de energia alternativa têm sido orientados pelo aumento da demanda por biocombustíveis que se caracteriza por: a) aumentos contínuos do preço do petróleo que hoje é a principal fonte primária de energia e devido a sua crescente utilização tem causado o encarecimento das matrizes energéticas de várias nações dependentes da *commodity*, desencadeando sérios desequilíbrios em suas balanças comerciais; b) benefícios que a expansão da utilização dos biocombustíveis pode trazer para o setor agrícola por meio da implantação de projetos específicos para fins energéticos com o objetivo de promover o desenvolvimento regional sustentável; e, c) redução das emissões de gás carbônico que além do benefício em si poderá ser fonte de ganhos no mercado de carbono uma vez que a parcela de gases não emitidos por um país poderá ser comercializada na forma de créditos a outro participante interessado em não reduzir suas emissões (MASIEIRO; LOPES, 2008).

Recentemente, os biocombustíveis têm se tornado atrativo devido aos seus benefícios ambientais, tornando-os necessários ao mercado global de combustível. Países em desenvolvimento levam vantagem na produção de biocombustíveis por possuírem grande disponibilidade de terras, condições climáticas favoráveis para a agricultura e baixos custos com mão de obra. No entanto, nos países desenvolvidos existe uma crescente tendência em

empregar tecnologias modernas e eficientes de conversão de bioenergia, usando biocombustíveis com custo-benefício competitivo com os combustíveis fósseis (BALAT, 2011).

Um dos grandes destaques da atualidade na área de biocombustíveis é o interesse pelo uso de recursos naturais baseados em materiais lignocelulósicos para a produção de etanol ou por fontes produtoras de lipídeos usados para a produção de biodiesel (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN; 2009). O Brasil é considerado um dos pioneiros no emprego de tecnologias renováveis e sua matriz energética é uma das mais “limpas” em comparação com outros países, visto que mais de 45% da energia total consumida no país provém de recursos renováveis (COSTA; PEREIRA Jr; ARANDA, 2010).

Nesse contexto, o potencial do uso do biodiesel como fonte energética “Nova e Renovável” é um dos assuntos mais discutidos no âmbito industrial e acadêmico, embora esse “velho” combustível já seja utilizado em um grande número de países, mesmo enfrentando sérias dificuldades para competir com o diesel de petróleo (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

3.2. Biodiesel

O biodiesel é composto por ésteres alquílicos de ácidos graxos, produzido por transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois de cadeia curta, gerando glicerina como subproduto (PINTO et al., 2005). É um substituto natural do diesel derivado do petróleo e tem composição similar ou até melhor no que diz respeito à densidade, número de cetano, viscosidade entre outros (BALAT; BALAT, 2008), sendo esta última a propriedade mais importante do biodiesel, particularmente em baixas temperaturas quando um aumento da viscosidade afeta a fluidização do combustível (DERMIBAS, 2009).

Uma das grandes vantagens do biodiesel é sua adaptabilidade aos motores do ciclo diesel, pois ao contrário de outros combustíveis limpos, como o gás natural ou biogás, a combustão de biodiesel não requer adaptação dos motores, configurando-se em uma alternativa técnica capaz de atender a frota movida a diesel (PINTO et al., 2005; RAMOS et al., 2003).

O biodiesel pode ser utilizado como combustível puro, designado de B100, na forma de mistura, como complemento ao diesel extraído de petróleo, ou em baixas proporções como aditivo (DU et al., 2008).

O biodiesel oferece inúmeros benefícios técnicos e ambientais sobre os combustíveis fósseis convencionais. O biodiesel, além de renovável, é biodegradável e tem ainda a vantagem de redução das emissões reguladas. Adicionalmente, permite melhorar o fechamento do ciclo do carbono (*carbon neutral*) e, quando de origem vegetal, intensifica o sequestro de CO₂ da atmosfera, impactando favoravelmente nas mudanças climáticas do planeta, ao retirar CO₂ no crescimento das plantas geradoras de óleo, deste modo compensando a adição de CO₂ à atmosfera durante a sua queima (QUINTELLA et al., 2009). Devido às similaridades entre as propriedades de combustão do biodiesel e do diesel fóssil, o biodiesel tem sido uma das alternativas mais promissoras de um combustível renovável e sustentável para o setor de transportes (LIN et al., 2011).

No entanto, para que o biodiesel seja classificado como fonte renovável de energia é essencial considerar não só o balanço de energia da sua produção, mas também as proporções de energia alocadas aos seus co-produtos e ao seu reaproveitamento (QUINTELLA et al., 2009).

Economicamente, para que o biodiesel tenha um papel ativo no mercado de energia, sendo mais do que um aditivo, o mesmo precisa ser produzido a um custo bem mais baixo e atender às especificações brasileiras e internacionais (QUINTELLA et al., 2009). Nesse caso, alguns aspectos importantes como o aumento da eficiência do processo de produção, uso de matérias-primas de baixo custo, desenvolvimento de um catalisador de custo efetivo e a utilização sustentável das terras na agricultura, devem ser considerados (LIN et al., 2011).

No Brasil, desde 01/01/2010 é obrigatória a adição de 5% de biodiesel (B5) ao diesel convencional, o que antecipa em três anos a meta do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) estima que essa nova mistura trará ao país uma economia da ordem de US\$ 1,4 bilhão por ano devido à queda das importações de diesel e reduzirá em 3% a emissão de dióxido de carbono (CO₂) em decorrência da queima do combustível no país (BIODIESELBR, 2010).

3.3. Panorama atual do Biodiesel

Nos últimos anos, a indústria de biodiesel se desenvolveu rapidamente. A busca pela inserção do biodiesel na matriz energética tem sido um dos focos de vários países e blocos comerciais (QUINTELLA et al., 2009). A força motriz fundamental por trás das políticas governamentais com intuito de desenvolver o biodiesel baseia-se em três aspectos: (1) a aproximação de uma crise global de energia, o que torna o biodiesel um combustível de

importante papel no fortalecimento da segurança energética da nação, (2) o fato de o biodiesel ser derivado de biomassa renovável, que pode contribuir para a redução das emissões de gases poluentes, por meio do manejo sustentável e (3) a geração de renda no campo, provocado pelo aumento da demanda por oleaginosas, conseqüentemente aumentando seu preço de mercado (LIN et al., 2011).

A união européia ocupa a posição de liderança no mundo em termos de produção de biodiesel. Alemanha e França são os principais produtores, e compartilharam aproximadamente 50% da produção total em 2009. A matéria-prima mais utilizada é o óleo de colza, contabilizando aproximadamente 84% da matéria-prima total do biodiesel europeu. Em termos de consumo, o biodiesel na Europa alcançou a marca de 9,6 milhões de toneladas em 2009, o que representa 79,5% da capacidade de energia de todos os biocombustíveis utilizados no transporte europeu (MALÇA; FREIRE, 2011).

A maior parte dos governos latino-americanos está buscando criar infraestrutura regulatória e financeira para a emergente indústria de biocombustíveis. Além do Brasil, a Colômbia se destaca no desenvolvimento de biocombustíveis. A esperança de poder diversificar o consumo de energia e de produção agrária e de criar empregos no campo tem impulsionado o país a investir nesse setor. A expectativa de expansão da produção bioenergética é grande também na Argentina que por possuir um sofisticado *agribusiness* e ser pesadamente dependente de combustíveis fósseis está procurando maneiras de diversificar sua matriz energética (MASIEIRO; LOPES, 2008).

O Brasil, devido ao seu pioneirismo no setor de biocombustíveis, tem firmado parcerias de transferência de tecnologia e cooperação na produção e comercialização de biocombustíveis com vários países (MASIEIRO; LOPES, 2008). O país está entre os maiores produtores e consumidores do mundo, com uma produção anual, em 2010, de 2,4 bilhões de litros e uma capacidade instalada, no mesmo ano, para cerca de 5,8 bilhões de litros. Atualmente existem 69 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação no país, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 17 mil m³/dia. De acordo com a Resolução n°6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), desde 1° de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel (ANP, 2011).

A produção e o uso do biodiesel no Brasil propiciam o desenvolvimento de uma fonte energética sustentável sob os aspectos ambiental, econômico e social e também trazem a perspectiva da redução das importações de óleo diesel, gerando divisas para o país. Além da diminuição da dependência do diesel importado, o biodiesel traz outros efeitos indiretos de

sua produção e uso, como o incremento a economias locais e regionais, tanto na etapa agrícola como na indústria de bens e serviços. Com a ampliação do mercado de biodiesel milhares de famílias brasileiras foram beneficiadas, principalmente agricultores do semi-árido brasileiro, como o aumento de renda proveniente do cultivo e comercialização das plantas oleaginosas utilizadas na produção do biodiesel. Outro benefício para a sociedade, resultante da ampliação do uso do biodiesel, é o efeito positivo sobre o meio ambiente, acarretando a diminuição das principais emissões veiculares em comparação ao diesel derivado do petróleo (ANP, 2011).

3.4. Matérias-primas lípidicas para produção de biodiesel

A questão mais importante a ser considerada em qualquer estudo ou análise com relação ao desenvolvimento sustentável do biodiesel, é a escolha da matéria-prima. A matéria-prima corresponde à cerca de 80% do custo total da produção do biodiesel (BALAT; BALAT, 2008).

As matérias-primas para a produção de biodiesel podem ser de diferentes origens: óleos vegetais, gorduras de animais e óleos e gorduras residuais. Diversas oleaginosas têm sido utilizadas como matérias-primas na produção de biodiesel em diferentes países, conforme sua disponibilidade. Nos Estados Unidos geralmente se utiliza o óleo de soja geneticamente modificado, enquanto a União Européia e o Canadá utilizam o óleo de colza. Em países asiáticos como a Malásia e Indonésia, o óleo mais utilizado é o de palma. A China, apesar de ser um país de agricultura, utiliza o óleo residual de cozinha na produção de biodiesel (SHARMA; SINGH; UPADHYAY, 2008).

Dentre as várias espécies vegetais no Brasil das quais se pode produzir biodiesel, destacam-se a soja, mamona, palma, girassol, babaçu, canola, pinhão manso e crambe. Além da diversificada disponibilidade de oleaginosas, há de se considerar as gorduras animais, como o sebo bovino, os óleos de peixes, o óleo de mocotó e a banha de porco, entre outros. Outra fonte de matéria potencial para produção de biocombustíveis no país consiste nos óleos e gorduras residuais, resultantes de processamento doméstico, comercial e industrial.

Os óleos vegetais são produtos naturais constituídos por uma mistura de ésteres resultantes da condensação de uma molécula de glicerol (triacilgliceróis ou triglicerídeos) com três moléculas de ácidos graxos (Figura 3.1) de cadeias curtas ou longas, cujo grau de saturação ou insaturação é função do tipo da semente que originou o óleo (SONNTAG, 1979).

Figura 3.1. Estrutura de uma molécula de triglicerídeo

Os fatores importantes e que devem nortear as pesquisas, os avanços e, consequentemente o sucesso do uso do biodiesel como combustível, no que diz respeito à escolha da matéria-prima são: composição química do óleo extraído da fonte em questão, elevado rendimento energético por unidade de área e produção abundante de óleos a custos reduzidos. Esses dois últimos itens são de extrema importância em termos de competitividade econômica, uma vez que produtividades agrícolas na faixa de 400 a 500 kg/hectare/ano como é o caso da soja no Brasil e nos Estados Unidos, ou de 500 a 900 kg/hectare/ano para a colza (canola) na Europa, inviabilizam economicamente a produção de biodiesel. Desta forma, o subsídio para estas culturas é inevitável. No caso da palma (dendê) rendimentos de até 6.000 kg/hectare/ano podem ser conseguidos, aumentando o potencial de produção (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009).

Entretanto, para que o óleo vegetal possa ser utilizado como matéria-prima na produção de biodiesel é de fundamental importância relacionar a estrutura química e os teores de cada uma das substâncias presentes na matéria-prima, pois estas refletirão não só nas propriedades físico-químicas do biocombustível, mas poderão afetar a queima no motor, a formação de depósitos no sistema de injeção e ainda o tipo e a quantidade de substâncias ou gases poluentes emitidos (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009). Além disso, deve-se levar em conta o custo da matéria-prima, visto que cerca de 80% do custo total da produção do biodiesel advém do tipo de óleo utilizado (BALAT; BALAT, 2008).

No Brasil, o biodiesel é produzido em escala industrial utilizando majoritariamente o óleo de soja como matéria-prima. Entretanto, o óleo de soja está inserido na cadeia alimentícia, o que leva a busca de óleos alternativos para a produção de biodiesel, como o

óleo de babaçu. Esse óleo é produzido nacionalmente e com reduzida concentração de ácidos poliinsaturados, gomas e fosfolipídios e não necessita da implantação de uma unidade de refino, o que torna atrativo a sua aplicação em reações de síntese de biodiesel (PINTO et al., 2005). No que tange à produção de óleo combustível, o óleo de babaçu possui características excelentes para produção de biodiesel, devido sua composição ser predominantemente láurica. Este fato facilita a reação de transesterificação, pois os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que interagem mais eficaz e efetivamente com o agente transesterificante e com o catalisador, de modo a se obter um produto, biodiesel, de excelentes características físico-químicas (LIMA et al., 2007). Além disso, o óleo de babaçu quando transformado em biodiesel pode ser uma alternativa econômica viável já que o combustível é produzido no próprio local de uso que normalmente são regiões isoladas do nosso país (ALBIERO et al., 2007).

Em função disso, para a realização deste trabalho foi selecionado o óleo de babaçu como principal fonte de triglicerídeos, no entanto, outros óleos vegetais também foram testados, tais como os óleos de palma, pinhão manso, andiroba e macaúba.

3.5. Produção de biodiesel por transesterificação

A principal tecnologia para obtenção de biodiesel é a transesterificação (ou alcoólise) alcalina homogênea de óleos e gorduras. Nessa reação, o óleo ou gordura, que são compostos basicamente de tri-ésteres da glicerina com ácidos graxos, é misturado a metanol ou etanol e, na presença de um catalisador, fornece uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e glicerina (SUAREZ et al., 2009). A reação de transesterificação com álcool pode ser representada pela equação geral ilustrada na Figura 3.2.

Figura 3.2. Reação de transesterificação de triglicerídeo e álcool.

A reação é reversível e por essa razão utiliza-se excesso de álcool para direcionar o equilíbrio da reação para o lado do produto (PARAWIRA, 2009). Na primeira etapa ocorre a conversão do triglicerídeo para diglicerídeo, seguido pela conversão do diglicerídeo para monoglicerídeo, e do monoglicerídeo para glicerol, fornecendo uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada etapa (Figura 3.3) (GANESAN; RAJENDRAM; THANGAVELU, 2009).

Em uma reação de transesterificação, alguns parâmetros devem ser levados em conta, como: o efeito da razão molar, temperatura e tempo de reação e o tipo de catalisador (químico ou bioquímico).

A razão molar entre álcool e triglicerídeo é um dos parâmetros que mais afeta o rendimento de uma reação de transesterificação. Embora a razão molar estequiométrica seja 3:1, razões molares mais altas normalmente são utilizadas com intuito de promover melhores conversões de ésteres em menor tempo. Com relação à temperatura e tempo reacional, as reações de transesterificação podem ocorrer em diferentes temperaturas dependendo do tipo de óleo e do catalisador empregado, em que rendimentos maiores são alcançados com maior tempo reacional (BALAT; BALAT, 2008).

Quanto ao tipo de catalisador, o processo comercial mais utilizado para a produção do biodiesel é a transesterificação química que utiliza catalisadores alcalinos (hidróxido de sódio ou potássio) com custo relativamente baixo, para converter óleo vegetal ou gordura e metanol em ésteres metílicos (AKOH et al., 2007).

Figura 3.3. Mecanismo da reação de transesterificação do triglicerídeo com álcool, mediante catalisador, envolvendo as três reações consecutivas e reversíveis de formação dos ésteres alquílicos. R₁, R₂, R₃ e R, representam os grupos alquila.

Embora a transesterificação química tenha proporcionado a industrialização da produção do biodiesel em muitos países, visto que resulta em altos níveis de conversão de triglicerídeos em seus correspondentes ésteres metílicos ou etílicos em curto espaço de tempo, essa reação ainda se depara com diversos problemas como dificuldade na separação do catalisador e remoção do glicerol formado, alta demanda de energia e necessidade de tratamento da água e catalisadores residuários (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006). Essas

desvantagens têm impulsionado muitas pesquisas por novos catalisadores, com destaque especial, para os catalisadores heterogêneos bioquímicos (lipases).

3.5.1. Transesterificação enzimática

A transesterificação enzimática consiste na modificação lipídica realizada pelas lipases e tem a vantagem de permitir maior controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases.

No processo de transesterificação enzimática, a fase pesada (glicerol) é simplesmente separada da fase leve (biodiesel) e não há necessidade de desodorização nem neutralização do produto final, o que reduz a duração do processo. Um excesso de álcool promove elevados rendimentos na síntese do biodiesel e o biocatalisador imobilizado pode ser utilizado diversas vezes. As reações podem ser conduzidas na presença ou não de solventes orgânicos (ANTCZAK et al., 2009). A Figura 3.4. ilustra o processo enzimático da produção de biodiesel.

Figura 3.4. Diagrama da produção de biodiesel utilizando lipases como biocatalisador.

Os fatores cruciais que afetam a produção enzimática do biodiesel estão ilustrados na Figura 3.5. Para alcançar a viabilidade econômica, deve-se optar por matéria-prima e preparações de lipase adequadas, sendo que esta última pode ser modificada a fim de aumentar sua estabilidade e eficiência catalítica. Além disso, devem-se avaliar alguns parâmetros importantes como seleção do solvente orgânico, otimização da razão molar, temperatura, atividade de água, pH do microambiente da enzima e a máxima concentração de glicerol nos produtos de reação (ANTCZAK et al., 2009).

Figura 3.5. Parâmetros cruciais que afetam o rendimento da síntese enzimática do biodiesel (REIS et al., 2009).

De acordo com a definição de biodiesel, não só o metanol, mas outros álcoois podem ser utilizados na transesterificação enzimática, sendo o mais comum deles o etanol, além de outros álcoois primários como propanol, butanol e doadores acila alternativos, como acil-acetato ou dimetil-carbonato (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2009).

A síntese enzimática do biodiesel também pode ser otimizada pela utilização de solventes no meio reacional, como terc-butanol. A primeira planta em escala industrial do mundo a utilizar tecnologia enzimática está operando na China com a capacidade de 20 milhões de toneladas por ano utilizando terc-butanol como co-solvente, o qual protege a enzima e proporciona alta produtividade (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2009).

O processo enzimático é uma alternativa biotecnologicamente sustentável com relação à catálise química, e é mais apropriada para a produção de biodiesel a partir de matérias-primas que contem alto valor de ácidos graxos livres e água, como óleos e gorduras residuais, pois esses ácidos graxos livres são completamente convertidos a biodiesel (PARAWIRA, 2009). Além disso, biocompatibilidade, biodegradabilidade e aceitabilidade ambiental obtida por procedimentos biotecnológicos utilizando lipases, são propriedades desejadas neste

método alternativo de produção do biodiesel (DEVANESAN; VIRUTHAGIRI; SUGUMAR; 2007; MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007).

3.6. Lipases

As lipases (glicerol éster hidrolases E.C.3.1.1.3) fazem parte da família das hidrolases que atuam na cadeia éster carboxílico e não requerem nenhum cofator. A função biológica primordial das lipases é catalisar a hidrólise de triglicerídeos, entretanto, em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida, a maioria das lipases é capaz de catalisar reações reversas como esterificação e transesterificação (interesterificação, alcóolises e acidólises), entre outras (FREIRE; CASTILHO, 2000). Essa versatilidade faz das lipases a enzima preferencial para aplicações em indústrias de alimentos, detergentes, farmacêuticas, couro, têxtil, cosméticos e de papel (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). A Tabela 3.1 resume as principais aplicações industriais das lipases.

Tabela 3.1. Aplicações industriais de lipases.

Indústria	Aplicação
<i>Laticínios</i>	Hidrólise da gordura do leite
<i>Panificação</i>	Aumento do aroma e da vida de prateleira
<i>Cervejaria</i>	Aceleração da fermentação em função dos lipídios
<i>Carne</i>	Desenvolvimento do aroma e remoção do excesso de gordura
<i>Farmacêutica</i>	Digestão de óleos e gorduras em alimentos
<i>Médica</i>	Determinação de triglicerídeos no sangue
<i>Papel</i>	Tratamento de polpas de celulose
<i>Tratamento de resíduo</i>	Decomposição e remoção de substâncias oleosas

Fonte: FERNANDES (2007)

O modo de ação das lipases é bastante complexo, porque estas enzimas atuam em sistemas bifásicos, são hidrofílicas, mas com substratos hidrofóbicos e sítio ativo protegido por uma tampa hidrofóbica. As reações lipolíticas ocorrem na interface lipídeo-água onde substratos lipolíticos geralmente formam um equilíbrio entre os estados monomérico, micelar e emulsificado (FABER, 1997).

Dependendo da sua origem, lipases podem apresentar massa molecular variando de 19 a 75 kDa e atuar numa ampla faixa de pH (4-9) e de temperatura, a qual varia da temperatura ambiente até 70°C (De CASTRO et al., 2004).

As propriedades catalíticas das lipases como a seletividade e a estereoespecificidade, dentre outras, podem ser de fácil controle por meio da manipulação das condições reacionais. A dependência destas propriedades catalíticas com o meio reacional pode ser uma consequência do complexo mecanismo de ação das lipases, que envolvem mudanças conformacionais em sua estrutura (SABUQUILLO et al., 1998).

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. A especificidade catalítica das lipases na síntese do biodiesel refere-se à sua regioespecificidade pelo tamanho da cadeia hidrocarbônica do ácido graxo. Nesse aspecto, a regioseletividade, ou seja, a posição de quebra da ligação éster, as lipases podem ser divididas em três tipos:

- *sn-1,3-específicas* (ex: *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii*): liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 e formam, por esta razão, produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não-regioseletivas, ou mesmo pelo catalisador químico (De CASTRO et al., 2004);

- *ácido graxo específicas* (ex: *Geotrichum candidum*): possuem ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em cis no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos insaturados, ou sem insaturação no carbono 9 são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é muito comum entre as lipases (De CASTRO et al., 2004);

- *não específicas* (ex: *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas* sp.): catalisam a quebra das moléculas de acilglicerol de forma aleatória, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, mono e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares daqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior (De CASTRO et al., 2004).

Além disso, lipases podem apresentar ainda especificidade estereoquímica, atuando particularmente sobre um tipo de isômero ótico.

Acredita-se que as lipases caracterizadas pela regioespecificidade limitada não são aplicadas à produção de biodiesel, entretanto algumas lipases *sn* 1,3 específicas como lipases de *Rhizopus oryzae* e *Mucor miehei* catalisam eficientemente reações de transesterificação, com rendimentos que excedem os rendimentos teóricos. Essa alta produtividade (em torno de 90%) é resultado da migração do resíduo acila da posição *sn*-2 para a posição terminal do glicerol (*sn*-1 e *sn*-3) (ANTCZAK et al., 2009).

A especificidade das lipases pelo substrato consiste na capacidade de distinguir as características estruturais das cadeias acila, tais como o comprimento, o número, posição ou configuração de ligações duplas. Em reações de transesterificação, as lipases distinguem o tamanho e o tipo de ácido graxo livre contido no triglicerídeo e o comprimento do álcool. As lipases de *R. oryzae* conseguem distinguir ácidos graxos livres de diferentes tamanhos e sob ótimas condições (em sistemas com solvente orgânico ou livre de solventes) e preferem ácidos graxos C18 e álcoois C2-C4. Isso evidencia que a seleção da preparação de lipase é uma das etapas mais importante na produção de biodiesel a partir de fontes renováveis (ANTCZAK et al., 2009).

Algumas poucas lipases têm sido relatadas como capazes de catalisar a síntese de biodiesel, além disso, poucas catalisam reações em ambos os sistemas: na presença de solventes orgânicos e em sistemas livres de solventes. A maioria consiste em preparações comerciais de lipase extracelular, que são imobilizadas em diferentes suportes. Entretanto, a preparação de lipase intracelular de *R. oryzae* é um exemplo de célula íntegra utilizada na síntese de biodiesel (ANTCZAK et al., 2009).

3.7. Fungos filamentosos produtores de lipase

Um grande número de micro-organismos produtores de lipases é conhecido, entretanto, este número representa um percentual muito baixo da biodiversidade estimada dos micro-organismos que potencialmente podem ser produtores de enzimas em geral e que ainda não foram caracterizados: cerca de 0,2 a 0,6% para bactérias e de 5% para fungos (Tabela 3.2). Esta grande abundância de micro-organismos existentes na natureza torna importante o *screening* e o isolamento de novas cepas produtoras de enzimas com características desejáveis em biocatálise (WUBBOLTS; BUCKE; BIELECKI, 2000).

Nesse contexto, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana, sendo reconhecidos como GRAS (Generally Regarded as Safe) (JAEGER et al., 1994).

Os fungos filamentosos são amplamente reconhecidos como as melhores fontes de lipases (Tabela 3.2), com várias patentes de aplicação da enzima tendo sido desenvolvidas (CARDENAS et al., 2001).

Tabela 3.2. Principais fungos produtores de lipase.

<i>Micro-organismo (Fungo)</i>	<i>Referência</i>
<i>Rhizopus</i> sp.	
<i>R. chinensis</i>	YASUDA et al., 1999.
<i>R. delemar</i>	HAAS; CICHOWICZ; BAILEY, 1992.
<i>R. homothallicus</i>	RODRIGUEZ et al., 2006; DIAZ et al., 2006.
<i>R. microsporus UZLT-4B</i>	DAVRANOV; KUILIBAEV, 1993.
<i>R. niveus</i>	KERMASHA; SAFARI; BISAKOWSKI, 1998.
<i>R. oligosporous</i>	DALSENTER et al., 2005; GHAMGUI; KARRA-CHAÂMOUNI ; GARGOURI, 2004;
<i>R. oryzae</i>	MINNING; SCHMIDT-DANNERT; SCHMID, 1998.

Tabela 3.2. Principais fungos produtores de lipase (continuação).

Micro-organismo (Fungos)	Referências
<i>Aspergillus</i> sp.	
<i>A. carneus</i>	SAXENA et al., 2003
<i>A. niger</i>	MAHADIK, et al., 2002
<i>A. repens</i>	KAMINISHI; TANIE; KUNIMOTO, 1999.
<i>A. oryzae</i>	TOIDA et al., 1995.
<i>A. nidullans</i>	MAYORDOMO; RANDEZ-GIL; PRIETOISOLATION, 2000.
<i>A. terreus</i>	GULATI et al., 1999
<i>Fusarium</i> sp.	
<i>F. solani</i>	MAIA et al., 1999.
<i>F. oxysporum</i> F sp vasinfectum	RAPP, 1995.
<i>F. heterosporum</i>	NAGAO et al., 1996.
<i>Geotrichum</i> sp.	
<i>G. candidum</i>	GOPINATH et al., 2003;
<i>Geotrichum</i> sp	MACEDO; PASTORE, 1997.
<i>Galactomyces geotrichum</i>	PHILLIPS; PRETORIUS, 1991.
<i>Mucor</i> sp.	
<i>M. hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i>	HIOL et al., 1999.
<i>Mucor</i> sp	ABBAS et al., 2002.
<i>M. hiemalis</i>	AKHTAR; MIRZA; CHUGHTAI, 1980.
<i>M. javanicus</i>	SAIKI et al., 1969.
<i>Rhizomucor miehei</i>	UVARANI et al., 1998.
<i>Neurospora</i> sp.	
<i>Neurospora</i> sp. tt-241	LIN; LEE; CHIOU, 1996.
<i>N. crassa</i>	KUNDU et al., 1987.
<i>Penicillium</i> sp.	
<i>P. abeanum</i>	SUGIHARA et al., 1996.
<i>P. aurantiogriseum</i>	LIMA et al., 2004.
<i>P. candidum</i>	RUIZ et al., 2001.
<i>P. chrysogenum</i>	FERRER et al., 2000.
<i>P. citrinum</i>	KRIEGER, 1995;
<i>P. coryophilum</i>	BARON et al., 2005.
<i>P. cyclopium</i>	CHAHINIAN et al., 2000;
<i>P. restrictum</i>	CASTILHO et al., 2000
<i>P. roqueforti</i> IAM 7268	MASE; MATSUMIYA; MATSUURA, 1995.
<i>P. simplicissimum</i>	SZTAJER et al., 1992.
<i>P. wortanii</i>	COSTA; AMORIM, 1999.

Fonte: FERNANDES (2007)

Dentre diversas enzimas lipolíticas obtidas pelo cultivo de fungos filamentosos, a literatura reporta que as cepas de *Mucor hiemalis*, *M. miehei*, *M. lipolyticus*, *M. pusillu*, *Rhizopus oryzae*, *R. delemar*, *R. microsporus* e *R. chinesis* são as mais estudadas (SAXENA et al., 1999).

Nesse contexto, para a realização do presente trabalho, fez-se um levantamento nos bancos de cultura nacionais e selecionaram-se alguns fungos filamentosos que estão descritos na literatura como produtores de lipase, conforme descrito a seguir.

3.7.1. *Rhizopus oryzae*

O fungo *R. oryzae* tem ampla distribuição na natureza, principalmente em zonas tropicais e sub tropicais. Pode ser isolado do solo, grãos, água poluída, frutos e vegetais em decomposição. É também conhecido como o mofo do pão.

Morfologicamente são fungos saprofíticos que apresentam hifas não-septadas (cenocíticas) e se reproduzem por esporos assexuais do tipo esporangiósporos, formado dentro de um esporângio, ou bolsa, na extremidade de uma hifa aérea. Seus esporângios são usualmente pequenos e negros e suas columelas são hemisféricas. Quando os esporângios se abrem, os esporangiósporos se dispersam e ao caírem em um meio adequado, dão origem a um novo fungo. Esses bolores também produzem agrupamentos de hastes semelhantes a raízes, denominados rizóides (raízes). As colônias possuem aspecto de um denso algodão marrom-amarelado quando estão na sua forma vegetativa, entretanto, com a maturação, adquirem coloração marrom-acinzentada devido à esporulação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2006).

Em condições adequadas possuem rápido crescimento (cerca de 1,6 mm/h), com temperatura ótima entre 30-35°C (PITT; HOCKING, 2009; SAMSOM et al., 1995). O fungo *R. oryzae* é conhecido por produzir a lipase D, muito utilizada em alimentos como biocatalisador de reações de esterificação de óleos e gorduras, visto que não apresenta toxicidade (FLOOD; KONDO, 2003).

3.7.2. *Mucor circinelloides*

O gênero *Mucor* é muito comum e difundido na natureza, ocorrendo em solos, alimentos e matéria orgânica em decomposição, principalmente como bolor de pão e vegetais, fezes e outros habitats úmidos onde crescem rapidamente. Algumas espécies possuem crescimento parecido com as leveduras, embora suas células sejam muito maiores, o que possibilita a distinção entre um e outro.

A espécie *M. circinelloides* é formada por fungos fitopatogênicos (patógenos de plantas e frutos), composto por colônias baixas e esparsas semelhantes ao algodão, podendo atingir até 60 mm de diâmetro. Possuem coloração marrom-amarelada e apresentam crescimento rápido numa temperatura máxima de 37°C (20 mm ou mais em 7 dias). Seus esporangiósporos são formados a partir de hifas aéreas de esporângia e columela esféricas que variam de 25 a 50 μ m. São transparentes, eretos e ramificados. Com o tempo, a colônia adquire coloração marrom escuro, devido à formação de esporangiósporos escuros. Apesar de possuir características semelhantes ao gênero *Rhizopus*, o gênero *Mucor* se diferencia pela ausência de rizóides (PITT; HOCKING, 2009; SAMSOM et al., 1995).

A espécie *M. circinelloides* tem grande importância biotecnológica por ser uma fonte de carotenos e lipídios, pois acumula altos níveis desses compostos em seu micélio. Atualmente essa propriedade tem sido muito destacada, uma vez que sua biomassa pode ser convertida facilmente em monoésteres, o que torna essa espécie uma fonte alternativa de oleaginosas para a produção de biodiesel.

3.7.3. *Mucor hiemalis*

A espécie *Mucor hiemalis* tem características semelhantes a *M. circinelloides*, pois também é formada por fungos fitopatogênicos (patógenos de plantas e frutos) e composta por colônias baixas e esparsas semelhantes ao algodão e relativamente densa. Forma colônias de coloração amarelo acinzentado, com hifas não ramificadas e columela elipsoidal. Apesar da semelhança com a espécie *M. circinelloides*, se diferencia no tamanho dos esporangiósporos e na temperatura de crescimento, pois não cresce a 37°C, mas sim a 5°C (PITT; HOCKING, 2009; SAMSOM et al., 1995).

3.7.4. *Mucor piriformis*

A espécie *M. piriformis* tem características semelhantes a *M. hiemalis* e também trata-se de fungos fitopatogênicos. Possui colônias baixas e esparsas com algumas hifas aéreas onde quase não se observa coloração. Assim como o *M. hiemalis*, possui esporângia e esporangiósporos elipsoidais grandes, bem maiores que a maioria das demais espécies de *Mucor*. Além disso, sua temperatura máxima de crescimento é em torno de 20°C (PITT; HOCKING, 2009; SAMSOM et al., 1995).

3.7.5. *Penicillium citrinum*

P. citrinum é descrito como fungo endofítico, ou seja, que coloniza raiz de plantas e cereais de plantas como trigo e óleo de soja e também causa o bolor no pão. Pode ser encontrado em diferentes condições ambientais, como em sedimentos provenientes de campos agrícolas e no solo de florestas. Forma colônias planas ou radialmente sulcadas, velutinosa, com micélio branco e conídias esferoidais (2-3 µm) abundantes de coloração verde. É uma espécie mesofílica, com temperatura ótima de crescimento que varia de 26-30 °C (PITT; HOCKING, 2009; SAMSOM et al., 1995).

É muito estudado devido à produção de uma micotoxina denominada citrinina de moderada toxicidade, que afeta principalmente animais domésticos. Também é explorado pelos seus metabólitos secundários e seus benefícios associados.

3.8. Fatores que influenciam a produção de lipases fúngicas

Para entender o crescimento de micro-organismos e a formação de produto microbiano é essencial entender a relação entre a regulação do metabolismo microbiano e o ambiente a que a célula microbiana fica exposta. O micro-organismo se adapta ao ambiente respondendo com mecanismos tanto de natureza física como química.

Para cultivar um micro-organismo é necessário empregar uma fonte de energia, disponibilizar nutrientes que forneçam materiais essenciais para a síntese de biomassa, evitar a presença de inibidores de crescimento, usar um inóculo viável e, submetê-lo às condições ambientais favoráveis, sejam físicas (atividade de água e temperatura) ou químicas (pH, fonte de carbono e fonte de nitrogênio). Por isso, um dos fatores importantes para otimização de um processo fermentativo, com o objetivo de se obter a substância desejada em quantidade satisfatória, é a formulação do meio de cultura para que atenda o crescimento do micro-

organismo e também as limitações de ordem técnica e econômica, no caso de processo industrial (COONEY, 1981).

Na produção de lipase por fungos filamentosos as respostas aos fatores ambientais são diferentes entre as cepas fúngicas sendo que, para uma determinada cepa o mesmo fator pode estimular a produção, enquanto que para outra pode não influenciar ou, até mesmo, inibir a produção. Normalmente, a produção de lipases pode ser estimulada por certos lipídios, tais como os contidos na manteiga, no óleo de oliva e devido sua composição de ácidos graxos (WOOLEY; PETERSON, 1994).

Neste caso, além dos fatores ambientais e condições de cultivo, a linhagem microbiana é, dentre vários fatores, o mais importante para o sucesso ou o fracasso de um processo fermentativo. Ela deve apresentar bom rendimento de produção, ser de fácil cultivo, de fácil manutenção e manter constância fisiológica.

As lipases fúngicas são produzidas tipicamente por processos submersos de fermentação, com o uso dos meios de cultura complexos que podem incluir como nutrientes aminoácidos e fontes complexas de compostos orgânicos, tais como extrato de levedura, peptona e óleos vegetais. Para fungos do gênero *Penicillium*, os melhores resultados podem ser obtidos como fontes orgânicas de nitrogênio ou com a combinação de fontes orgânicas e inorgânicas, como extrato de peptona ou de levedura com sulfato de amônio (LIMA et al., 2003).

A otimização das condições de cultivo para a produção de lipases microbianas é de suma importância, uma vez que os parâmetros influenciam as propriedades do micro-organismo produtor, assim como a razão de lipases extracelulares e intracelulares produzidas. A quantidade de lipase produzida depende de diversos fatores, tais como:

- **Aeração:** na produção de lipases fúngicas, a maioria dos fungos utiliza oxigênio como receptor final de elétrons para completar o processo respiratório. Como o ar contém 21% de oxigênio, os fungos crescem bem na superfície do meio de cultura, desde que haja agitação vigorosa da massa líquida (no caso de cultivo submerso) (CARLILE; WATKINSON, 1997);

- **Fontes de carbono:** além dos triglicerídeos ou derivados, diversos carboidratos podem ser utilizados como glicose, maltose, sacarose e amido (CASTILHO et al., 2000);

- **Fontes de nitrogênio:** a produção de lipases requer altas concentrações de fontes de nitrogênio, quando comparada a outras enzimas. Dentre as principais fontes citadas na literatura, a peptona vem sendo a mais utilizada. Essa fonte é usualmente adicionada na faixa de 1 a 7% (m/v) ao meio de cultivo (CASTILHO et al., 2000);

- **Meio de cultivo:** o meio utilizado para a produção de lipases fúngicas é em geral complexo, adicionado de indutores podendo este ser um triglicerídeo, um éster ou um ácido graxo, que pode ser adicionado ao meio como única fonte de carbono ou com baixa concentração em adição a carboidratos, em concentrações reduzidas. Frequentemente se utiliza o óleo de oliva (CASTILHO et al., 2000);

- **pH:** em geral, a produção máxima de enzimas ocorre quando o pH atinge valores entre 7,0 e 8,0. No final da fermentação, isto é, após o esgotamento da fonte de carbono, o pH continua subindo para a faixa alcalina, provavelmente devido à proteólise que origina aminoácidos que são desaminados, liberando amônia para o caldo fermentativo. Neste caso, a enzima produzida é rapidamente desnaturada por proteólise ou pH adverso (CASTILHO et al., 2000);

- **Temperatura:** a fermentação para a produção de lipases fúngicas é normalmente realizada na faixa de 22 a 30°C (CASTILHO et al., 2000);

- **Outros nutrientes:** elementos como enxofre, fósforo, magnésio e potássio são fornecidos ao fungo sob a forma de sais e, como macronutrientes são fornecidos em quantidades próximas a 10^{-3} M. Alguns fungos requerem fatores de crescimento, principalmente vitaminas e íons minerais como cobre, ferro, manganês, zinco e molibdênio, que, por serem micronutrientes, são requeridos em quantidades mínimas (cerca de 10^{-6} M) (CARLILE; WATKINSON, 1997).

Apesar dos fungos filamentosos serem as melhores fontes de lipases, principalmente para aplicações industriais, a maioria deles produz lipases extracelulares, que requerem etapas posteriores de custo elevado como as etapas de separação e purificação. Esse custo de produção das lipases pode ser reduzido por aplicação de genética molecular produzindo lipases de alta produtividade, seletividade e estabilidade, imobilização em suportes sólidos visando à reutilização em bateladas subsequentes ou ainda pela utilização de células íntegras

de micro-organismos produtores de lipase. Esta última alternativa evita gastos advindos das etapas de purificação, entretanto requer a utilização de células produtoras de lipase intracelular.

3.9. Lipases fúngicas intracelular

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) (ROBLES-MEDINA et al., 2009).

A maior desvantagem na produção de biodiesel pelo processo enzimático é o custo relativamente elevado das lipases, o que limita significativamente o seu emprego industrial. Os processos de separação, purificação e imobilização da lipase extracelular normalmente correspondem a mais de 70% do custo final da lipase.

Esse fato tem motivado pesquisas visando identificar o potencial de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, para utilização como biocatalisadores (células íntegras) baseado na sua habilidade de imobilização e de exposição das proteínas funcionais de interesse na superfície de sua célula (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). Nesse aspecto, lipases intracelulares têm recebido atenção especial para utilização na síntese de biodiesel.

Muitas lipases intracelulares com elevada atividade lipolítica provenientes de fungos filamentosos tem sido relatadas, com especial destaque para os gêneros *Mucor* e *Rhizopus*. As lipases intracelulares de *R. oryzae*, devido à sua regioespecificidade pela posição 1,3, são as mais utilizadas para síntese de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais ou esterificação de ácidos graxos livres (LI et al., 2008).

Entretanto, a viabilidade econômica do processo encontra-se na imobilização dessas células íntegras em um suporte que seja estável, inerte e que possua boa aderência ao micro-organismo (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). O uso de células fúngicas com elevada produção intrínseca de lipase em conjunto com as partículas de biomassa de suporte poroso para utilização como células íntegras representa uma tecnologia atrativa para o aumento da eficiência de reação e redução de custo (IFTIKHAR et al., 2008).

As células íntegras são preparadas de maneira simples, por meio do cultivo, e as enzimas permanecem aderidas no interior das células. A imobilização no suporte poroso

ocorre como consequência natural do seu crescimento e podem ser facilmente separadas do meio de cultivo (PARAWIRA, 2009). A estrutura celular age como uma matriz natural capaz de proteger as enzimas da ação de possíveis efeitos negativos de agentes externos, promovendo um efeito análogo ao empregado por matrizes comuns utilizadas na imobilização de enzimas (ROMERO; BAIGORI; PERA, 2007).

A simplicidade da técnica de imobilização e a relativa facilidade no processo de aumento de escala utilizando fungos filamentosos confere as células íntegras um biocatalisador com diversas vantagens comerciais (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009).

Uma comparação do processo de obtenção de biodiesel usando derivados imobilizados de lipase extracelular e intracelular é apresentado na Figura 3.6 (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001), na qual pode ser claramente observada a redução das etapas quando lipase intracelular é usada.

a)

b)

Figura 3.6. Comparação das etapas envolvidas no processo de obtenção de biodiesel por via enzimática empregando lipase purificada ou células íntegras imobilizadas: (a) lipase extracelular e (b) lipase intracelular (DU et al., 2008).

Apesar da utilização das células íntegras reduzir o número de etapas na produção de biodiesel, acarretando uma redução do custo final do processo, alguns inconvenientes devem ser levados em consideração. A utilização das células íntegras imobilizadas como biocatalisadores tornam a síntese do biodiesel mais lenta do que no processo em que se emprega lipase extracelular convencional (ROBLES-MEDINA et al., 2009). Além disso, as células íntegras possuem baixa estabilidade operacional em sistemas livres de solvente (LI et al., 2008).

A produção de lipase intracelular e sua retenção na membrana é um fator crucial para o desenvolvimento de biocatalisadores de células íntegras imobilizadas e com alta atividade em reações de etanolise. Hama et al (2006) imobilizaram as células de *R. oryzae* em partículas poliuretano (BSPs – Biomass Support Particles), caracterizaram as lipases intracelulares produzidas e verificaram que estes fungos produzem isoformas de lipases. Entretanto, estes mesmos autores, afirmam que a localização das lipases responsáveis pela atividade de transesterificação no interior do micélio permanece ainda desconhecida.

Segundo HAMA et al. (2006) as células de *R. oryzae* produzem dois tipos de lipase com massas moleculares de 34 e 31 kDa. Conforme ilustrado na Figura 3.10, a lipase de 34 kDa (ROL 34) está ligada a parede celular, enquanto que a lipase de 31 kDa (ROL 31) está ligada a membrana.

Figura 3.7. Diagrama esquemático da maturação e localização das lipases ROL nas células de *R. oryzae* (HAMA et al., 2006 modificado).

Durante o cultivo submerso, qualquer lipase produzida será secretada para o meio e a quantidade de lipase ligada à membrana decrescerá em função do tempo de cultivo. Ao contrário, em cultura na qual o micélio foi imobilizado em BSPs *in situ*, grandes quantidades de lipase ficam retidas no interior das células, mesmo após um longo período de cultivo. Os autores também verificaram que a adição de óleo de oliva auxilia na retenção da lipase nas células, o que contribui para a inibição da secreção de lipase para o meio, sugerindo que esse efeito de retenção de lipase na membrana causa um aumento da atividade da lipase intracelular. Esse fenômeno foi confirmado por imunofluorescência das hifas celulares. Embora a relação entre a morfologia celular e a secreção enzimática dependa da cepa fúngica e o tipo de enzima, a imobilização celular inibiu fortemente a secreção da ROL 31 para o meio de cultura na cepa testada.

3.10. Imobilização de células

Imobilização é um termo geral que descreve as muitas formas das células e enzimas serem fixadas, encapsuladas ou aprisionadas em suporte sólido. O conceito de biocatalisadores imobilizados, enzimas ou células, refere-se a catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000).

Especificamente, a imobilização de células representa uma forma particular de adesão celular baseada na habilidade de certos micro-organismos se fixarem em suportes sólidos por meio de ligações naturais físico-químicas (De ORY et al., 2006). Essa adsorção sobre o suporte permite a troca de substratos, produtos, inibidores e assim por diante, ao mesmo tempo em que separa a biomassa celular catalítica da fase concentrada que contém substratos e produtos (SABU; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2005). Tem sido reconhecido que a imobilização da biomassa microbiana reduz os problemas de separação e regeneração da biomassa e padroniza o tamanho das partículas imobilizadas (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

A reutilização das células imobilizadas é considerada uma das grandes vantagens do processo de imobilização, principalmente quando os suportes escolhidos para imobilização são inertes e apresentam alta resistência mecânica, como na produção de lipase por *R. oryzae* imobilizado em espumas de poliuretano (COVIZZI et al., 2007).

O processo de imobilização de células surgiu como alternativa à imobilização de enzimas, pois não requer etapas de extração, isolamento e purificação, e fornece maiores rendimentos de atividade enzimática depois da imobilização, maior estabilidade operacional, grande resistência às perturbações ambientais, baixo e eficaz custo de produção (HEMACHANDER; BOSE; PUVANAKRISHNAN, 2001). A utilização de células imobilizadas como catalisadores industriais em processos contínuos pode ser vantajosa quando comparada a procedimentos conduzidos em regime de batelada (ELLIAH et al., 2004).

As principais técnicas de imobilização normalmente aplicadas em processos de biotransformação são baseadas: na adsorção em suportes inertes, na encapsulação e aprisionamento em matrizes poliméricas ou ligação covalente, cruzada e iônica em suportes previamente ativados.

No entanto, o uso de células microbianas imobilizadas também apresenta algumas desvantagens. O processo de imobilização pode não ser econômico e as limitações de transferência de massa podem afetar a fisiologia e cinética do crescimento celular. Além disso, a matriz utilizada pode romper-se devido ao crescimento celular e produção de gases, devido às limitações na transferência de oxigênio (WANG et al., 2005). Assim, para que a imobilização celular apresente sucesso, é necessário escolher adequadamente a metodologia a ser utilizada. De maneira geral, todos os métodos de imobilização induzem alterações no crescimento, na fisiologia e na atividade metabólica de bactérias, leveduras e fungos (JUNTER; JOUENNE, 2004, NORTON; WATSON; D'AMORE, 1995, WALSH; MALONE, 1995), conforme os parâmetros descritos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Parâmetros de crescimento celular que podem ser modificados pela imobilização dos micro-organismos.

Parâmetro	Referência
Limitação da transferência de massa por difusão	FREEMAN; LILLY, 1998
Aumento ou diminuição da tensão superficial	YANG et al., 1992
Efeito na pressão osmótica	JAMAI et al., 2001
Redução da atividade de água	WEST; STROHFUS, 2001
Dificuldades nas interações célula-célula	PARASCANDOLA; BRANDUARDI; ALTERIIS, 2006
Alterações na fisiologia e morfologia celular	SLOKOSKA et al., 1999
Aumento ou diminuição da permeabilidade celular	KRISHNAN et al., 2001
Diminuição da viabilidade dos nutrientes	SRIDEVI; SRIDHAR, 1999
Crescimento de populações não-homogêneas	SERP et al., 2000

Assim, a escolha de uma matriz adequada para a imobilização das células é de fundamental importância para a obtenção do produto desejado, sendo esta escolha peculiar para cada micro-organismo e metabólito estudado (PETRE et al., 1999). O tamanho do poro, a porosidade e o grau de hidrofobicidade da matriz interferem na intensidade da adesão celular (COVIZZI et al., 2007). A Tabela 3.4 descreve as características que são desejáveis em um suporte de imobilização.

Além dos métodos tradicionais de imobilização celular, os micro-organismos também podem ser auto-imobilizados, ou seja, pode ocorrer a imobilização natural das células. Os

fungos quando submetidos a certas condições de crescimento, tendem a formar aglomerados de micélios, que geralmente adotam um formato esférico, os quais são comumente denominados “pellets” (WANG et al., 2005). As condições de cultivo interferem nas características físico-químicas e morfológicas das hifas e na tendência destas em formar agregados celulares ou não. Em alguns casos, o estado morfológico é determinante para obtenção do metabólito de interesse. Estes agregados são considerados como auto-imobilização celular, a qual é influenciada pela quantidade de inóculo, pelas forças mecânicas empregadas durante a fermentação, pelos componentes e pela tensão superficial do meio de cultivo, assim como pela presença de O₂ dissolvido (FENG et al., 2003; ZINDARSIC; PAVKO, 2001).

Tabela 3.4. Propriedades desejáveis para seleção de matriz ou suporte para imobilização de células microbianas.

Característica	Referência
Ter grande área superficial com espaço intersticial para o crescimento celular.	DEVI; SRIDHAR, 2000
Possuir grupos funcionais ligantes, no caso de adesão artificial. Ser facilmente regenerável e possível de reuso.	FREEMAN; LILLY, 1998 CHAMPAGNE; LACROIX; SONDINI-GALLOT, 1994.
Proporcionar a viabilidade celular e atividade catalítica por um longo período de tempo.	GARBAYO et al., 2003
Apresentar porosidade uniforme a fim de permitir trocas gasosas, entrada de substrato e fluxo de cofatores e produtos do metabolismo microbiano.	NORTON; WATSON; D'AMORE, 1995
Ter boa estabilidade mecânica, química, térmica e biológica.	DIAZ et al., 2001
Não ser degradável facilmente por enzimas ou solventes envolvidos no processo.	BERGMAIER; CHAMPAGNE; LACROIX, 2005
Ser estável a mudanças drásticas de pressão, temperatura e pH do meio.	MOREIRA et al., 1998
Proporcionar imobilização fácil, acessível e viável para uso em escala industrial.	FENICE et al., 2000

3.10.1. Suportes de imobilização

O método e o tipo de suporte a ser empregado em um determinado processo devem ser estabelecidos empiricamente, recaindo a escolha do binômio suporte-método sobre aquele que apresentar maior retenção da atividade. A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte dependerá basicamente de dois fatores: 1) das características peculiares do material

biológico; 2) das condições de uso do sistema imobilizado. Face à variabilidade destes fatores, pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização e nem um suporte universal adequados para qualquer processo (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

Na seleção de um suporte para determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como aquelas relativas à possibilidade de regeneração do material.

Existem diversos materiais que podem ser utilizados como suportes para a imobilização de células. Normalmente para a imobilização de fungos filamentosos, utilizam-se suportes porosos, visto que ocorre adesão das células microbianas à superfície do suporte. Quando os poros são maiores, as células em crescimento (hifas) penetram no suporte, preenchendo seu espaço interno (COVIZZI et al., 2007). Deste modo, entre muitos processos disponíveis para imobilização de células microbianas, a técnica que utiliza partículas porosas para suporte de biomassa (BSPs) tem muitas vantagens sobre outros métodos em termos de aplicação industrial, tais como ausência de aditivos químicos, de pré-produção de células, de assepsia, sendo que as partículas podem ser reutilizadas e são resistentes a cisalhamento, tornando este método com custos mais baixos quando comparados a outros (DIAS et al., 2001).

Para a realização do presente trabalho foram selecionados três tipos de suporte para avaliação, terra diatomácea (Celite), polihidroxibutirato (PHB) e espumas de poliuretano, cujas características são a seguir descritas.

3.10.1.1. Terra diatomácea: Celite

Terra diatomácea, também conhecida por Celite, é um sedimento amorfo, originado a partir de frústulas ou carapaças de organismos unicelulares vegetais tais como algas microscópicas aquáticas, marinhas e lacustres, normalmente denominada diatomita. Por apresentarem natureza silicosa, as frústulas desenvolvem-se indefinidamente nas camadas geológicas da crosta terrestre (SOUZA et al., 2003).

A terra diatomácea é um material leve e de baixa massa específica aparente, cuja coloração varia do branco ao cinza escuro. Além disso, este material é constituído principalmente por sílica opalina (58 até 91%) e impurezas tais como argilominerais, matéria orgânica, hidróxidos, areia quartzosa e carbonatos de cálcio e de magnésio. A maioria das diatomáceas apresenta tamanho entre 4 e 500 μm , bem como existem em mais de 12.000 espécies diferentes (SOUZA et al., 2003).

Partículas de terra diatomácea vêm sendo utilizadas com sucesso na imobilização de estreptomicetos para a produção de antibióticos como tienamicina e kasugamicina (KIM et al., 2001; KIM et al., 2002), entretanto para a realização deste trabalho, serão utilizadas esferas de terra diatomácea (Celite) para a imobilização de fungos filamentosos.

3.10.1.2. Polihidroxibutirato (PHB)

Os polímeros biodegradáveis são polímeros degradáveis, nos quais a degradação resulta primariamente da ação de micro-organismos de ocorrência natural.

Dentre os plásticos biodegradáveis, destaca-se o polihidroxibutirato (PHB), que é um polímero natural do tipo poliéster obtido por meio de bactéria que, em meio rico de sacarose ou com outra fonte de carbono, armazena energia na forma de poliéster (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998). O PHB pode ser processado como um termoplástico convencional por diversas técnicas para ser utilizado nas mais diversas aplicações, como embalagens, recipientes e materiais descartáveis, com propriedades mecânicas similares às dos plásticos convencionais (CARASCHI; RAMOS; LEÃO, 2001) e com a adicional propriedade de serem complemente biodegradáveis (HUANG; SHETTY; WANG, 1990). O PHB também apresenta uma boa resistência ao vapor da água e à umidade, além de ser estável sob circunstâncias de armazenamento normais e durante o seu uso, podendo durar mais de quatro anos em prateleiras e armários. Entretanto, quando depositado em ambientes ricos em bactérias (como aterros sanitários) sofre biodegradação, transformando-se em gás carbônico e água, sem a geração de resíduos tóxicos. A sua decomposição por meios biológicos vai depender de um número de fatores, tais como: a atividade microbiana do ambiente e da área de superfície exposta. Outros fatores são também importantes, como a temperatura (de 20 a 60°C), pH (de 5 a 8), massa molecular e cristalinidade do material, presença de oxigênio, umidade e nutrientes minerais (HUANG; SHETTY; WANG, 1990).

3.10.1.3. Espuma de poliuretano

O poliuretano é qualquer polímero que compreende uma cadeia de unidades orgânicas unidas por ligações uretânicas. É amplamente usado em espumas rígidas e flexíveis, em elastômeros duráveis e em adesivos de alto desempenho.

Recentemente, espumas de poliuretano têm adquirido grande relevância como suporte de imobilização, face ao crescimento do número de aplicações reportado na literatura, como

remoção de componentes orgânicos (MOE; IRVINE, 2001), fermentação do ácido acético (De ORY; ROMERO; CANTERO, 2004), reações de transesterificação (BAN et al., 2001; JIN et al., 2009) e produção de lipase (YANG et al., 2005).

A espuma de poliuretano pode ser sintetizada pela reação de um álcool com dois ou mais grupos hidroxilas e a partir de isocianatos com mais de um grupo de isocianato. Essa reação é conhecida como polimerização por adição. A combinação entre as ligações hidrogênio e a natureza dos grupos radicais amplia a faixa de propriedades observadas no poliuretano. A espuma é formada quando é injetado gás carbônico dentro do polímero durante a reação de isocianato com água (De ORY et al., 2006).

A espuma de poliuretano é um material inerte com ótimas propriedades mecânicas (alta resistência e elasticidade) e baixo custo comercial. Possui elevada porosidade (aproximadamente 97%), com densidade aparente de 0,02 g/mL e ampla superfície de adsorção. Além disso, as espumas de poliuretano não encontram problemas durante a ampliação de escala, pois possuem grande volume, o que facilita sua preparação. Outra importante vantagem desse suporte de imobilização é alta difusão de oxigênio obtida, resultante do seu amplo tamanho de poro (tamanho médio de poro por unidade de 400 μm) que é particularmente um fator relevante para micro-organismos aeróbicos (De ORY et al., 2006). Isso pode ser evidenciado pela Figura 3.8.

Figura 3.8. Fotografia dos cubos de poliuretano e sua estrutura interna (De ORY et al., 2006).

Nesse contexto, as espumas de poliuretano consistem em um material poroso que oferece suporte biológico e oxigenação ideal para o crescimento de micro-organismos, sendo por esse motivo muito utilizado na imobilização de células fúngicas.

3.11. Reações enzimáticas utilizando células íntegras imobilizadas com elevada atividade lipolítica.

3.11.1. Reações de hidrólise e esterificação

A literatura cita diversos artigos sobre a produção de lipase intracelular e a utilização de células íntegras livres ou imobilizadas obtidas a partir de diferentes espécies do gênero *Rhizopus* sp. e da espécie *M. circinelloides*, para aplicação em reações de hidrólise e esterificação. Alguns desses trabalhos envolvendo a aplicação dessas células íntegras em reações de síntese estão descritos na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Reações de hidrólise e esterificação utilizando células íntegras imobilizadas em diferentes suportes.

Micro-organismo	Suporte de imobilização	Fonte de carbono	Reação	Solvente	Referência
<i>R. niveous</i>	BSPs (celulose)	Ácido oleico	Esterificação	Isento	CHEN; WANG, 1997.
<i>M. circinelloides</i>	Esferas de PVA	Diversos ácidos graxos	Hidrólise e Esterificação	Isento	ANTCZAK et al., 2002
<i>M. circinelloides</i>	Quitosana	Óleo de oliva	Esterificação	Isento	ANTCZAK et al., 2004
<i>Rhizomucor miehei</i> ; <i>Yarrowia lipolytica</i>	BSPs (poliuretano e polipropileno)	Sebo bovino	Hidrólise	H ₂ O	ADAMCZAK; BEDNARSKI, 2004

Chen e Wang (1997) realizaram reações de esterificação entre álcoois de cadeia longa e ácido oléico a fim de produzir ésteres graxos, eficientemente catalisado por células íntegras de *R. niveous* imobilizadas em partículas de suporte de biomassa (BSPs) de celulose. As reações foram realizadas na presença ou ausência de solventes orgânicos, sendo avaliada a influência de parâmetros como temperatura e concentração de substrato no rendimento final da reação, que alcançou valores de 90% de conversão.

Antczak et al. (2002) estudaram a imobilização *in situ* de células de *Mucor circinelloides* em esferas de criogel obtidas de álcool polivinílico para mediar reações de hidrólise de *p*-nitrofenilpalmitato, *p*-nitrofenilacetato e óleo de girassol e síntese dos ésteres butiloleato, propiloleato e caprilato. A imobilização conferiu estabilidade térmica e operacional durante seu uso repetido na síntese de ésteres em sistemas não aquosos.

Antczak et al. (2004) testaram diferentes métodos de estabilização das lipases de *Mucor circinelloides* pela imobilização da lipase extraída do micélio em diferentes suportes sólidos e da imobilização *in situ* dos *pellets* do micélio em quitosana. Os autores observaram que os *pellets* do micélio imobilizado em quitosana obtiveram maior estabilidade mecânica e alta eficiência catalítica na síntese de ésteres de sacarose.

Adamczak e Bednarski (2004) otimizaram a produção de lipase intracelular a partir de *Rhizomucor miehei* e *Yarrowia lipolytica*, adicionando sebo bovino ao meio de cultivo e imobilizando as células desses micro-organismos em partículas de suporte de biomassa (BSPs) de poliuretano ou polipropileno. O melhor suporte de imobilização para ambas as preparações de células íntegras foram as partículas de poliuretano, que forneceram 130,5 U de atividade para *R. miehei* e de 90,3 U de atividade para *Y. lipolytica*. Os autores também realizaram a reação de hidrólise do sebo bovino e obtiveram 72% de rendimento ao utilizar as células imobilizadas de *R. miehei*.

3.11.2. Síntese de biodiesel

A maior parte dos artigos relatados a seguir, descreve processos de obtenção de biodiesel por catálise enzimática empregando células íntegras livres ou imobilizadas. Verifica-se que na maioria dos trabalhos publicados linhagens do fungo *R. oryzae* foram preferencialmente utilizadas e como suporte de imobilização, geralmente a seleção tem sido direcionada para o uso de partículas de poliuretano. Entretanto, já existem relatos de outros suportes fibrosos, como o tecido-não-tecido, utilizados em reatores de coluna e de diferentes espécies de fungos, como o *Aspergillus* sp. A síntese de biodiesel empregando diferentes óleos vegetais catalisada por células íntegras imobilizadas e não imobilizadas estão descritos na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Processos de obtenção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando células íntegras livres e imobilizadas.

Micro-organismo	Suporte de imobilização	Fonte de carbono	Matéria-prima lipídica	Agente acilante	Solvente	Éster metílico (%)	Referência
<i>R. oryzae</i>	BSP*	Óleo de oliva e glicose	Óleo de soja	Metanol	Isento	90	BAN et al., 2001; BAN et al., 2002; HAMA et al., 2007
<i>R. oryzae</i>	BSP*	Diversos ácidos graxos	Óleo de soja	Metanol	Isento	80	HAMA et al., 2004
<i>R. oryzae</i>	Ausente	Diversos óleos	Óleo de soja	Metanol	Isento	86	ZENG et AL., 2006
<i>R. oryzae</i>	BSP*	Óleo de oliva ou glicose	Óleo de pinhão manso	Diferentes álcoois	Isento	89	TAMALAMPUDI et al., 2007
<i>R. oryzae</i>	BSP*	Óleo de soja	Óleo de soja	Metanol	Terc-butanol	70	LI; DU; LIU, 2007a
<i>R. oryzae</i>	BSP*	Óleo de soja	Óleo de colza	Metanol	Terc-butanol	72	LI; DU; LIU, 2007b
<i>R. oryzae</i>	BSP*	Óleo de soja	Ácido oleico	Metanol	Terc-butanol	90	LI et al., 2008
<i>R. oryzae</i>	Ausente	Óleo de oliva	Óleos residuais e de canola	Metanol	Isento	89,7	JIN et al., 2009
<i>R. oryzae</i>	BSP*	Óleo de oliva	Óleo de soja	Metanol	Isento	73	CHEN; LIN, 2010
<i>A. niger</i>	BSP*	Óleo de oliva	Óleo de palma	Metanol	Isento	87	XIAO; MATHEW; OBBARD, 2010
<i>R. oryzae</i>	Alginato de sódio	Óleo de oliva	Óleo de pinhão manso	Metanol	n-hexano	80,5	GANESAN; THANGAVELU ; RAJENDRAN, 2011

* espumas de poliuretano

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

A estabilidade do biocatalisador é particularmente importante na biocatálise industrial quando se deseja a produção de biocombustíveis. Para estabilizar a biomassa celular de *R. oryzae* foi investigado o efeito de um tratamento da ligação entre o suporte e a biomassa celular com 0,1% (m/v) de glutaraldeído (BAN et al., 2002). Os resultados mostraram que no processo de metanólise com adição gradativa de metanol conduzido em bateladas consecutivas, a biomassa celular imobilizada sem o tratamento com glutaraldeído, resultou numa redução de 50% na conversão após 6 ciclos, enquanto que a biomassa imobilizada previamente tratada com glutaraldeído permitiu a manutenção da conversão entre 72-83% mesmo após 6 ciclos.

Hama et al. (2004) estudaram o aumento na estabilidade da atividade com a variação da composição de ácidos graxos na membrana celular, por meio da adição de diferentes ácidos graxos no meio de cultura. Os resultados indicaram que células enriquecidas com os ácidos oléico e linoleico mostraram maior atividade lipolítica do que as células enriquecidas com ácidos graxos saturados. Por outro lado, células enriquecidas com ácido palmítico mostraram maior estabilidade do que células enriquecidas com ácidos graxos insaturados. Esses dados forneceram base para determinação da quantidade ótima de ácidos graxos insaturados em relação ao total de ácidos graxos para fornecer um equilíbrio no sistema para obter biomassa celular com atividade e estabilidade elevadas, sendo encontrado um valor da ordem de 0,67. Nessas condições, foi possível manter uma conversão elevada e estável, mesmo após 10 ciclos de bateladas repetidas.

Zeng et al. (2006) estudaram o efeito dos parâmetros de cultivo e pré-tratamento nas células íntegras não imobilizadas de *R. oryzae*, com intuito de utilizá-las como biocatalisador na produção de biodiesel a partir de óleo de soja e metanol. Sob condições otimizadas de reação, e com adição em etapas de metanol, os autores obtiveram rendimento de 86% em ésteres metílicos.

Li, Du e Liu (2007a) demonstraram o efeito benéfico da adição do solvente terc-butanol na metanólise de diferentes óleos vegetais, utilizando células imobilizadas de *R. oryzae* como biocatalisador. A partir desse trabalho, foi estudado por Li, Du e Liu (2007 b) o efeito das quantidades de terc-butanol, metanol, água e biomassa seca da célula imobilizada por meio de um planejamento composto central, tendo como variável resposta o rendimento da transesterificação (biodiesel). Cada fator foi estudado em cinco níveis. A partir da superfície de resposta, uma equação quadrática polinomial foi obtida, demonstrando que sob ótimas condições, pode-se alcançar 72% de rendimento do biodiesel.

Hama et al. (2007) estudaram a produção de biodiesel em reator de leito fixo usando biomassa celular de *R. oryzae* na metanólise de óleos vegetais. Os autores observaram que o reator de leito fixo aumentou o número de bateladas repetidas de metanólise protegendo a biomassa celular de stress físico (agitação mecânica) e de inibição devido ao excesso de metanol. Hama et al. (2007) também reportaram que a emulsificação da mistura reacional resultou em incremento na produção (75,5%) devido ao aumento na área de superfície interfacial, enquanto que em meio não emulsificado a conversão máxima obtida foi de 63%. Nesse estudo, a vazão do meio reacional foi variada entre 5 a 55 L/h e as vazões mais elevadas causaram esfoliação da biomassa imobilizada, enquanto que vazões mais baixas resultaram em decréscimo da atividade lipolítica devido à uma ineficiente mistura no reator. Um fluxo ótimo de 25 L/h foi sugerido para alcançar uma conversão máxima de 90%.

Tamalampudi et al. (2007) realizaram um estudo comparativo entre células imobilizadas de *R. oryzae* e a lipase comercial Novozym® 435 como biocatalisadores na produção de biodiesel utilizando óleo de pinhão manso e diferentes álcoois. Os autores verificaram que as células imobilizadas em BSPs foram mais eficientes na transesterificação enzimática, alcançando um rendimento de 80% em 60 h contra 76% após 90 h de reação utilizando Novozym® 435. Além disso, as células imobilizadas tiveram um incremento em sua atividade lipolítica na presença de 5% de água, ao contrário da Novozym® 435 que tem sua atividade inibida em presença de água, necessitando de um meio anidro para uma eficiente catálise.

Li et al. (2008) utilizaram células íntegras de *Rhizopus oryzae* imobilizadas em partículas de poliuretano (BSPs) para obtenção de biodiesel a partir da reação de esterificação do ácido oléico e metanol. Terc-butanol foi utilizado como solvente orgânico e promoveu maior estabilidade às células quando comparado ao sistema livre de solvente.

Para remoção da água produzida ao longo da reação, os autores utilizaram peneiras moleculares e alcançaram um rendimento de formação de biodiesel de 90% em 48h.

Jin et al. (2006) investigaram a catálise de células íntegras não imobilizadas de *R. oryzae* na metanólise de diferentes óleos residuais e de óleo refinado de canola. As células íntegras foram capazes de produzir biodiesel em 72 h de reação, atingindo rendimento máximo de 90% com a adição de metanol ao longo da reação.

Chen e Lin (2010) otimizaram a produção de biodiesel a partir de óleo de soja e metanol, empregando células íntegras de *R. oryzae* imobilizadas em um suporte fibroso denominado de tecido-não-tecido. A imobilização foi realizada em um reator de coluna por meio de recirculação do meio de cultivo. A síntese do biodiesel foi otimizada por meio de um planejamento fatorial utilizando a metodologia de superfície de resposta, em que foi obtido um rendimento de $70,77 \pm 2,46$ % nas condições ótimas pré-determinadas.

Ganesan, Thangavelu e Rajendran (2011) utilizaram a metodologia de superfície de resposta (RSM) para otimizar as condições reacionais da metanólise do óleo de pinhão manso catalisado por células íntegras de *R. oryzae* imobilizadas em alginato de sódio em sistema contendo n-hexano como solvente. As condições ótimas encontradas para a produção de biodiesel foram: tempo de reação 77,25 h, temperatura de 40,18°C, concentração do biocatalisador de 3,70 m/v, razão molar álcool/óleo de 1:2,88 e teor de água de 11,20% (m/m de óleo). Sob essas condições reacionais, o rendimento experimental obtido foi de 80,5% (m/m), similar ao rendimento teórico calculado em 79,87% (m/m), confirmando a validade do modelo proposto.

Xiao, Mathew e Obbard (2010), otimizaram a produção de lipase intracelular a partir do cultivo de células de *Aspergillus niger* imobilizadas em partículas de poliuretano. Após 144h de incubação em meio contendo 7% (m/m) de polipeptona e 3% (m/m) de óleo de oliva em pH inicial de 6,6 a 25°C foi obtida uma concentração de biomassa celular com elevada atividade hidrolítica de 212,58 U/mL. Empregando as condições otimizadas de cultivo, os autores aplicaram as células íntegras imobilizadas na metanólise do óleo de palma e após 72 h de reação, com adição gradual de metanol, obtiveram rendimento de 87% em ésteres metílicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. *Micro-organismos*

Foram testadas diferentes linhagens de fungos filamentosos adquiridas da coleção de cultura da Micoteca URM do Departamento de Micologia (CCB/UFPE), conforme listado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Linhagens de fungos filamentosos adquiridos do Departamento de Micologia da UFPE.

Nº	Espécie / Autor	Fonte de isolamento
3231	<i>Rhizopus oryzae</i> /Went. & Prinsen Geere	castanha-do-Pará
4692	<i>Rhizopus oryzae</i> /Went. & Prinsen Geere	solo
4140	<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> /Schipper	fezes de bizão
4182	<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>griseo-cyanus</i> /Schipper	fezes de veado catingueiro
4144	<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>Luteus</i> /Schipper	fezes de cavalo
4145	<i>Mucor piriformis</i> /Fischer	fezes de cavalo
4216	<i>Penicillium citrinum</i> /Thom	óleo de oliva

Os fungos foram conservados sob refrigeração a 4°C em meio BDA (Batata Dextrose Agar – Difco), preparado conforme recomendação do fornecedor, sendo repicado a cada dois meses. O repique foi feito em tubos de ensaio contendo o meio BDA inclinado, com a ajuda de uma alça metálica. Após o repique, os tubos de ensaio contendo os esporos foram incubados em estufa a 30°C durante 7 dias e em seguida estocados sob refrigeração.

4.1.2. *Suportes de Imobilização*

Três suportes (Figura 4.1) com diferentes características foram utilizados: espuma de poliuretano (cubos 6x6 mm – Scotch-Brite^{MR}), Polihidroxibutirato (PHB) e Celite Bio-Catalyst Carrier R-630 (Manville).

Espumas de poliuretano

Celite Bio-Catalyst

Polihidroxibutirato (PHB)

Figura 4.1. Suportes utilizados no processo de imobilização dos fungos.

4.1.3. Matérias-primas

Foram utilizadas diferentes matérias-primas lipídicas obtidas de diferentes fornecedores, conforme descrito na Tabela 4.2. Como agente acilante utilizou-se etanol anidro (99,8%, Cromoline).

Tabela 4.2. Fornecedores das matérias-primas lipídicas.

Matéria-prima lipídica	Fornecedor
Óleo de babaçu	Pulcra Chemicals (Jacareí – SP)
Óleo de palma	Agropalma (Pará)
Óleo de andiroba	Pulcra Chemicals (Jacareí – SP)
Óleo de macaúba	*ACPPRRDA (Montes Claros – MG)
Óleo de pinhão manso	Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR)
Óleo de oliva	Comercial Carbonell
Óleo de soja	Comercial Soya
Óleo de castanha	INOVAM (Pará)
Óleo de linhaça	Comercial Pazze
Óleo de girassol	Comercial Lisa

4.1.4. Outros reagentes

Outros reagentes utilizados foram: solvente terc-butanol (Cromoline), iso-octano (Cromoline), glutaraldeído 25% (Cromoline), polietilenoamina 50% (Sigma-Aldrich), Aliquat 336 (Sigma-Aldrich), acetona (Cromoline) goma arábica em pó pura (Synth).

Todos os padrões comatográficos foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados de acordo com metodologia previamente descrita por Urioste et al. (2008).

4.2. Metodologia Experimental

4.2.1. Preparo do meio de cultura

Os fungos foram cultivados em meio de cultura líquido composto por óleo de oliva (comercial) 30g/L, peptona (Himedia) 70g/L, NaNO_3 (Vetec) 1g/L, KH_2PO_4 (Synth) 1g/L e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Vetec) 0,5g/L, previamente autoclavados (121°C/15 min).

4.2.2. Preparo das células íntegras

As células íntegras foram preparadas utilizando a técnica de fermentação submersa, realizada em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura, preparado conforme item 4.2.1. Para preparo do inóculo, os esporos foram raspados, suspensos em água estéril e submetidos à agitação até a obtenção de uma suspensão. A concentração de esporos na suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Um volume contendo 1×10^6 esporos de cada fungo foi inoculado em cada erlenmeyer, os quais foram incubados por 72 h a 30°C sob agitação orbital em shaker (170 rpm). A biomassa foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, lavada com água e acetona e seca em bomba de alto vácuo. Ao final do processo, foi determinada a atividade lipolítica da biomassa e do filtrado e a umidade da biomassa.

4.2.3. Preparo das células íntegras imobilizadas

4.2.3.1. Seleção de suportes de imobilização

Em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura (item 4.2.1) foram adicionados 100 cubos de poliuretano e após esterilização procedeu-se a inoculação, conforme descrito no item 4.2.2. Os demais suportes, 5g de Celite e 10g de PHB, foram adicionados após o crescimento das cepas no meio de cultura ao final de 72 h de cultivo. A biomassa imobilizada foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, lavada com água e acetona e seca em bomba de alto vácuo. Ao final do processo, foi determinada a atividade lipolítica da biomassa imobilizada e do filtrado e a umidade da biomassa imobilizada.

4.2.3.2. Influência do tamanho das espumas de poliuretano na imobilização da biomassa celular

Em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura (item 4.2.1) foram adicionados espumas de poliuretano em diferentes tamanhos e quantidades de (6x6 mm – 100 cubos e 10x10 mm – 25 cubos) e após esterilização procedeu-se a inoculação, conforme descrito no item 4.2.2. A biomassa imobilizada foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, lavada com água e acetona e seca em bomba de alto vácuo. Ao final do processo, foi determinada a atividade lipolítica da biomassa imobilizada e do filtrado e a umidade da biomassa imobilizada.

4.2.3.3. Efeito dos parâmetros físicos e nutricionais na imobilização da biomassa celular

Os parâmetros físicos e nutricionais do cultivo e imobilização das células íntegras imobilizadas foram avaliados empregando-se diferentes fontes de carbono (óleos vegetais refinados: oliva, girassol, castanha do Pará e linhaça), fontes de nitrogênio (peptonas de carne e soja e água de maceração de milho), concentração de inóculo (10^6 e 10^7 esporos/mL) e frascos de Erlenmeyers (250 e 500 mL) ao meio de cultura contendo NaNO_3 (1 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L). Nos frascos de Erlenmeyers, 100 cubos de poliuretano foram adicionados a 100 mL do meio de cultura e após esterilização procedeu-se a inoculação, sendo incubados por 72 h a 30°C sob agitação orbital em shaker (170 rpm). A biomassa imobilizada foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, lavada com água e acetona e seca em bomba de alto vácuo. Ao final do processo, foram determinadas a atividade lipolítica e a umidade da biomassa imobilizada.

4.2.4. Tratamento das espumas e das células íntegras imobilizadas

Após a etapa de lavagem com água, as células íntegras imobilizadas foram imersas em soluções de glutaraldeído, polietilenoimina ou Aliquat 336 (todas a 0,1% em tampão fosfato pH 7,0) por um período de 1h a temperatura ambiente. Após esse período, as células imobilizadas foram separadas da solução por filtração a vácuo, seguida de lavagens exaustivas com água destilada, tampão fosfato pH 7,0 e acetona e secas em bomba de alto vácuo, para serem então utilizadas nas reações de transesterificação. Com exceção da utilização de solução de Aliquat 336, as demais soluções foram empregadas para o mesmo tratamento nas espumas antes de serem adicionadas ao meio de cultivo, no entanto, após a

lavagem com água destilada e tampão pH 7,0 as espumas foram secas à temperatura ambiente por 24 h, para então serem utilizadas como suporte de imobilização.

4.2.5. Síntese de biodiesel

As reações de síntese do biodiesel foram realizadas em frascos Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, hermeticamente fechados, sob agitação orbital de 170 rpm. Os experimentos foram realizados com 30 gramas de meio reacional composto de óleo de babaçu e etanol numa razão molar 1:6 óleo/álcool e 30 gramas de solvente numa relação de 1:1,5 v/v óleo/solvente. Os meios foram incubados com 5, 10 e 20% (m/m) da biomassa imobilizada em relação a massa total dos reagentes de partida numa temperatura de 35°C. As reações foram conduzidas por um período máximo de 120h e monitoradas pela retirada de alíquotas do meio reacional a cada 24h para dosagem dos ésteres etílicos formados, conforme metodologia estabelecida por Urioste et al. (2008).

4.2.5.1. Delineamento experimental

A influência das variáveis (razão molar óleo/álcool e temperatura) na síntese de biodiesel foi investigada empregando o planejamento fatorial completo 2^2 estrela rotacional, obtendo como variável resposta o rendimento de transesterificação. Os ensaios foram conduzidos de forma randômica, sendo realizados três replicatas no ponto central, para estimar o erro experimental. Os resultados foram analisados empregando o programa Statistica versão 5.0 (StatSoft Co.). A significância estatística da regressão individual dos coeficientes e o modelo matemático foram determinados pelo teste de *Fischer* e a análise de variância explicada pelo modelo obtido, foi dada pelo coeficiente de determinação R^2 .

4.2.6. Testes de estabilidade operacional

4.2.6.1. Sistema descontínuo (bateladas consecutivas)

A estabilidade operacional das células de *M. circinelloides* 4182 imobilizadas foram avaliadas em sistema contínuo e descontínuo. No sistema descontínuo, as reações foram conduzidas em frascos Erlenmeyers de 250 mL, empregando 20% da biomassa imobilizada em relação à massa total dos reagentes de partida. O meio reacional foi composto por óleo de babaçu e etanol (razão molar 1:6 óleo/etanol) e solvente terc-butanol (razão volumétrica 1:1,5 óleo/terc-butanol) e as reações foram realizadas em bateladas consecutivas a 35°C por um período máximo de 96 h. Ao final de cada batelada, o produto

transesterificado foi removido dos frascos de Erlenmeyer e as células imobilizadas lavadas com hexano/terc-butanol, a fim de remover substrato e produto remanescente na matriz. As células imobilizadas foram filtradas sob vácuo até teor de umidade menor que 10%. A atividade hidrolítica das células recuperadas foi medida pelo método de hidrólise do óleo de oliva (SOARES et al., 1999) antes de ser utilizada em uma nova batelada. As células recuperadas foram adicionadas ao frasco de Erlenmeyer contendo novo meio reacional e uma nova reação foi conduzida, mantendo a mesma proporção entre reagentes e biocatalisador. A atividade de transesterificação foi estimada ao final de cada batelada, sendo a primeira batelada utilizada como referência.

4.2.6.2. Sistema contínuo (reator de leito fixo)

As reações em sistema contínuo foram conduzidas em reator de leito fixo (diâmetro interno= 45 mm, comprimento = 190 mm e volume total = 310 cm³) com o auxílio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-HATTO), operando numa vazão de 0,13 mL/min, por um período total de 14 dias. O esquema simplificado do sistema está apresentado na Figura 4.2. A mistura reacional composta por óleo de babaçu e etanol (razão molar 1:6 óleo/etanol) e terc-butanol como solvente (razão volumétrica 1:1,5 óleo/terc-butanol), foi mantida em um frasco de alimentação sob agitação magnética e temperatura de 35°C. A temperatura do reator encamisado foi mantida a 35°C pela circulação de água controlada em banho de aquecimento termoestabilizado. A coluna foi empacotada com 27 g de células imobilizadas, correspondendo a um volume de 270 cm³ e em seguida estabilizada pela recirculação do substrato através da coluna por um período de 1 dia, permitindo a eliminação de bolhas de ar formadas durante a etapa do empacotamento da coluna. A densidade média do derivado imobilizado foi de 0,102 ± 0,001 g/cm³. O tempo de residência foi calculado de acordo com Levenspiel (2000), conforme descrito na Equação 4.1. Alíquotas do meio reacional foram retiradas diariamente a fim de quantificar os ésteres etílicos formados na análise de cromatografia gasosa.

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

Equação 4.1

Ao final da reação, o produto transesterificado foi removido do reator e as células imobilizadas lavadas com terc-butanol, a fim de remover substrato e produto remanescente

na matriz. As células imobilizadas foram filtradas sob vácuo até teor de umidade menor que 10%. A atividade hidrolítica das células recuperadas foi medida pelo método de hidrólise do óleo de oliva (SOARES et al., 1999) e a atividade de transesterificação foi estimada por meio de uma nova reação em batelada, conforme descrito no item 4.2.5.

Figura 4.2 Esquema simplificado do reator de leito fixo a ser empregado neste projeto. 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Tanque de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo leito fixo, 7- Saída de produto.

4.3. Metodologia Analítica

4.3.1. Caracterização das propriedades das matérias-primas lipídicas

As matérias-primas lipídicas foram caracterizadas quanto aos índices de acidez, iodo, saponificação e peróxido, adotando normas estabelecidas pela AOCS (2004). O índice de acidez foi determinado de acordo com a Norma Cd 3d-63 e o resultado calculado pela relação entre a massa de hidróxido de potássio consumida (mg) por grama de amostra analisada. Para determinação do índice de iodo, foi utilizado o Método Cd 1b-87, expressando o resultado em quantidade de iodo reagido em 100 g de gordura ou óleo. O índice de saponificação foi determinado de acordo com método Ti Ia-64, sendo o resultado calculado pela quantidade de álcali em miligramas necessária para saponificar um grama de amostra. Na determinação do índice de peróxido foi utilizado o método oficial Cd 8b-

90, tendo como resultado a quantidade, em miliequivalentes de peróxido por 1000g de amostra.

4.3.2. Determinação do perfil em ácidos graxos das matérias-primas lipídicas

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia em fase gasosa segundo norma descrita pelo AOCS (2004), empregando cromatógrafo a gás (CGC Agilent 68650 Series GG System), equipado com coluna capilar DB-23 Agilent (50% cyanopropil-methylpolysiloxane, dimensões 60 m, diâmetro interno: 0,25 mm, 0,25 μm filme) operando nas seguintes condições: fluxo coluna = 1,00 mL.min⁻¹; velocidade linear = 24 cm.seg⁻¹; temperatura do detector = 280°C; temperatura do injetor = 250°C; temperatura do forno = 110°C, mantendo-se constante por 5 min e em seguida sendo elevada a 215°C numa taxa de 5°C/ min, mantendo-se constante por 24 min; como gás de arraste foi utilizado hélio.

4.3.3. Caracterização da espuma de poliuretano

4.3.3.1. Densidade aparente

A densidade aparente da espuma de poliuretano foi calculada de acordo com a norma ASTM D3574-02. As amostras cortadas precisamente em cubos (40x 40x 10 mm) tiveram suas massas medidas em uma balança eletrônica com precisão de 0,0001g. O valor é reportado em massa total (g) de amostra de espuma por unidade de volume (cm³). Todas as determinações foram feitas em triplicata.

4.3.3.2. Cálculo do diâmetro médio de poros

O tamanho médio de poros da espuma de poliuretano foi determinado através das micrografias obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) Modelo LEO1450VP (Schott Zeiss do Brasil Ltda). Com auxílio do software *ImageJ*, as micrografias foram tratadas e a distribuição dos diâmetros ao longo da seção transversal de crescimento da espuma foi calculada conforme descrito por Soares, 2012.

4.3.3.3. *Sorção de água*

A metodologia utilizada no cálculo da sorção estática da água destilada na espuma de poliuretano é uma modificação da norma ASTM F 716/726. As amostras cortadas precisamente em cubos de tamanho 40x40x10 mm e pesadas em balança eletrônica de precisão (0,0001g) foram imersas em água destilada em frascos hermeticamente fechados para evitar a evaporação. A massa úmida das amostras foi medida no início e ao final de 72 h para a realização do cálculo da massa de líquido penetrado nos poros da matriz. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente e em triplicata.

4.3.3.4. *Absorção dos solventes: etanol e terc-butanol*

Para determinar a quantidade de solvente absorvida pela espuma de poliuretano as amostras cortadas precisamente em cubos de tamanho 40x40x10 mm e pesadas em balança eletrônica de precisão (0,0001g) foram imersas em etanol e terc-butanol em frascos hermeticamente fechados para evitar a evaporação. Após 72 horas o excesso de solvente foi retirado dos poros das amostras e logo em seguida foi medida a massa das mesmas. A massa absorvida foi calculada pela diferença das massas inicial e final. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente e em triplicata.

4.3.4. *Determinação da atividade hidrolítica*

A atividade enzimática das células imobilizadas foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 mL de azeite de oliva e 90 mL de goma arábica a 3% (m/v). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 0,5 g de células imobilizadas (massa seca) ou 1,0 g do caldo fermentado. Os frascos foram incubados a 37°C por 30 min, em banho termostático com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona, etanol e água destilada (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,025 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela Equação 4.2 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em μmoles/g.min (U/g).

$$\text{Atividade} \left(\mu\text{mol} / \text{g} \cdot \text{min} \right) = \frac{(V_A - V_B) \cdot M \cdot 10^6}{t \cdot m} \quad \text{Equação 4.2}$$

Em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_B = volume do KOH gasto na titulação do branco (mL); M = molaridade da solução de KOH (M); t = tempo de reação (min); m = massa (g).

4.3.5. Análise de umidade

A umidade da biomassa livre e imobilizada foi determinada em balança de secagem acoplada a lâmpada de infravermelho (Marte, Modelo ID 50).

4.3.6. Separação dos produtos formados na síntese de biodiesel

Para a separação da glicerina liberada na síntese do biodiesel, o meio reacional foi submetido a uma etapa de purificação, constituída basicamente de três lavagens com água destilada. O volume da amostra recolhido foi medido e, em seguida, adicionado o mesmo volume de água destilada. A mistura foi transferida para um funil de decantação, efetuando-se uma agitação vigorosa e deixando a mistura em repouso por 24 h para a separação das fases. A fase superior foi composta pelos ésteres de etila (biodiesel) e a fase inferior por glicerol e água de lavagem. A fase inferior foi descartada e a fase superior submetida à evaporação em rota-evaporador. A amostra de biodiesel purificada foi submetida à análise dos parâmetros de interesse, conforme especificações da ANP.

4.3.7. Análise da viscosidade

Os valores da viscosidade absoluta em função da taxa de deformação foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas em duplicata a 40 °C para o óleo vegetal e para os ésteres de etila, empregando 1,0 mL de fluido.

4.3.8. Determinação da densidade

A densidade dos ésteres de etila foi determinada em densímetro digital Modelo DMA 35N EX (Anton Paar). As medidas foram realizadas em triplicatas a 15°C para o óleo vegetal e os ésteres de etila, utilizando 5,0 mL de amostra.

4.3.9. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise de termogravimetria dos ésteres de etila foi determinada pelo analisador termogravimétrico Shimadzu TGA 50, adotando as seguintes condições de análise: fluxo de 50mL/min de nitrogênio, taxa de aquecimento de 10°C/min na faixa de aquecimento de 25 a 1000°C.

4.3.10. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia no infravermelho dos ésteres de etila foi realizada no espectrômetro modelo Spectrum GX (Perkin Elmer). As amostras foram preparadas com pastilhas de KBr e as análises foram conduzidas na faixa de comprimento de onda de 4000 a 400 cm⁻¹.

4.3.11. Determinação dos ésteres de etila

As concentrações dos ésteres de etila foram determinadas por cromatografia de fase gasosa, utilizando-se uma coluna empacotada (6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh, HP), operando nas condições estabelecidas por Urioste et al., 2008 e descritas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Condições operacionais para determinação dos ésteres de etila por CG.

Padrão interno	Hexanol (18,0 g/L)
Programa de temperaturas	90°C (3min), 120 °C (10 min) e 170 °C (15 min)
Taxa de variação	25 °C/ min
Preparação da amostra	1:3 (amostra - hexano)
Preparação para injeção	1:1 (amostra - padrão interno)
Tempos de retenção dos Monoésteres de etila (min)	C8 EtOH = 3,28
	C10 EtOH = 5,26
	C12 EtOH = 8,56
	C14 EtOH = 12,06
	C16 EtOH = 13,96
	C18 EtOH = 17,10
	C18:1 EtOH = 17,81
	C18:2 EtOH = 19,26

O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel por via enzimática foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (Mt) em relação à massa total teórica esperada de ésteres de etila (ΣMe). M_e foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial da matéria-prima lipídica (M_0), da massa

molecular correspondente a cada ácido (M_{Ma}) e do éster correspondente (M_{Me}). Este cálculo é representado pela equação 4.3 (a), em que M₀ corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (Ca), com a massa inicial de óleo utilizada (Mi) equação 4.3 (b). O rendimento foi calculado dividindo a massa total de ésteres determinada pela análise de cromatografia gasosa (Mt) pela massa total teórica de ésteres de etila (Me), conforme mostrado na equação 4.3 (c).

$$(a) Me = \frac{(M_o.MMe)}{MMa} \quad (b) M_o = Ca.Mi \quad (c) R = \frac{Mt}{\sum Me} \times 100 \quad \text{Equação 4.3}$$

4.3.12. Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN¹H)

As amostras de biodiesel purificado foram dissolvidas em clorofórmio deuterado e os espectros de RMN registrados em espectrômetro Varian, modelo Mercury-300 MHz. A conversão do triglicerídeo em ésteres foi determinada tomando por base os dados gerados por RMN utilizando a equação proposta por Garcia (2006) e validada por Paiva (2010).

A metodologia de cálculo proposta por Garcia (2006), para determinação das conversões envolvendo ésteres etílicos, consiste basicamente na identificação das moléculas presentes, na região do 4,05–4,35 ppm, durante uma reação de transesterificação por RMN ¹H e certificação realizada por RMN ¹³C. A Figura 4.3 ilustra estas identificações e atribuições de sinais.

Figura 4.3. Região entre 4,35 a 4,05 ppm dos espectros simulados de RMN ^1H dos TAG, DAG, MAG e ésteres etílicos.

Como pode ser observado na Figura 4.3, no quarteto gerado pelos prótons do CH_2 etoxílico o desdobramento em menor deslocamento químico (4,08) é o único pico de ressonância que não apresenta sobreposição com nenhum outro sinal dos mono-, di- ou triglicerídeos. Por meio do fenômeno denominado desdobramento *spin-spin*, os picos de ressonância sofrem desdobramentos, que podem ser explicados empiricamente pela *regra do $n+1$* . Segundo esta regra, cada tipo de próton identifica o número de prótons equivalentes (n) do átomo de carbono vizinho ao átomo de carbono ao qual um dado próton está ligado. Assim, o pico de ressonância se desdobra em ($n+1$) componentes. Esses desdobramentos obedecem ao triângulo de Pascal, conforme indicado na Figura 4.4.

O pico de ressonância dos átomos de hidrogênio metilênicos dos ésteres etílicos é desdobrado em um quarteto, cuja área total é a somatória dos componentes externos do quarteto, que possuem uma área igual a $1/8$ da área total, mais os componentes internos, que têm áreas iguais a $3/8$ da área total do quarteto, conforme ilustra a Figura 4.5.

Figura 4.4. Desdobramento dos picos de ressonância segundo a regra do $n+1$

Em que:

Ac_1 = área do componente 1;

Ac_2 = área do componente 2;

Ac_3 = área do componente 3;

Ac_4 = área do componente 4

Figura 4.5. Área dos desdobramentos do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio metilênicos do grupo etoxílico dos ésteres etílicos

Desta forma, a metodologia de cálculo proposta por Garcia (2006) pode ser expressa pela Equação 4.4.

$$\%EE = [(Ac4 \times 8) / Add + ee] \times 100 \quad \text{Equação 4.4}$$

Em que: Ac_4 = área do componente 4; $Add + ee$ = área de todos os sinais entre 4,35 e 4,05 ppm; %EE = percentual de conversão em ésteres etílicos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção dos fungos produtores de lipase intracelular

A etapa inicial do trabalho foi direcionada para seleção de linhagens de fungos filamentosos produtoras de lipase intracelular. Para tanto, 7 linhagens de fungos filamentosos adquiridas do Banco de Cultura do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco descritas como produtoras de lipase intracelular, foram cultivadas em meio de cultura líquido composto por óleo de oliva e nutrientes adequados por um período máximo de 72 h, conforme descrito na seção 4.2.1. Os valores de biomassa seca de micélio, atividade lipolítica no filtrado e na biomassa ao final de 72 h de cultivo estão mostrados na Tabela 5.1. Todos os cultivos foram realizados em triplicatas.

Tabela 5.1. Concentração de biomassa e valores máximos de atividade lipolítica do filtrado (extracelular) e da biomassa (intracelular) para os fungos testados.

Fungo	Concentração da biomassa (g/L)	Atividade lipolítica (U/g)	
		Extracelular	Intracelular
<i>R. oryzae</i> 3231	27,5 ± 0,69	4,34 ± 0,81	20,98 ± 0,55
<i>R. oryzae</i> 4692	26,1 ± 0,64	3,16 ± 0,95	20,50 ± 0,57
<i>M. circinelloides</i> 4140	31,5 ± 0,94	2,28 ± 0,25	11,03 ± 0,45
<i>M. circinelloides</i> 4182	33,8 ± 0,83	2,91 ± 0,16	24,00 ± 3,66
<i>M. hiemalis</i> 4144	36,7 ± 0,26	2,85 ± 0,19	2,44 ± 0,60
<i>M. piriformis</i> 4145	12,6 ± 0,56	2,11 ± 0,60	3,33 ± 0,46
<i>P. citrinum</i> 4216	46,5 ± 0,50	3,00 ± 0,31	30,82 ± 0,51

De maneira geral, todos os fungos apresentaram crescimento microbiano expressivo, alcançando concentrações de biomassa seca entre 12,6 ± 0,83 e 46,5 ± 0,5 g/L ao final de 72 h de cultivo. A maior produção de biomassa foi obtida pelo cultivo da linhagem *P. citrinum* 4216, e a menor produção foi obtida pela linhagem de *M. piriformis* 4145.

As cepas de *R. oryzae* 4692 e 3231 apresentaram um crescimento bastante similar da ordem de 26,1 ± 0,64 e 27,5 ± 0,69 g/L, respectivamente. Esse crescimento foi um pouco inferior ao descrito por Silva et al. (2006) que utilizaram óleo de oliva como fonte de carbono no cultivo de células de *R. oryzae* imobilizadas em bucha vegetal. Os autores

reportaram a produção máxima de 51,3 g/L em apenas 48 h, sendo que após esse tempo, não houve aumento de biomassa. Zeng et al. (2006) verificaram um crescimento menos significativo, de apenas 15,6 g/L, para o mesmo fungo e suporte de imobilização.

Ao comparar os resultados de atividade lipolítica obtida no filtrado e na biomassa, verifica-se que todos os fungos apresentaram valores bem inferiores de atividade lipolítica no filtrado em relação aos valores de atividade da biomassa, sugerindo que a maior parte da lipase produzida ficou retida no micélio. Resultados semelhantes foram encontrados por Ban et al. (2001), que obtiveram baixos valores de atividade lipolítica extracelular comparados aos valores de atividade da biomassa do fungo *R. oryzae* imobilizado, empregando óleo de oliva como fonte de carbono.

O valor mais elevado de atividade lipolítica na biomassa celular, foi obtido pelo cultivo da linhagem de *P. citrinum* 4216, alcançando o valor de $30,82 \pm 0,51$ U/g em 72 h. Essa mesma linhagem de fungo forneceu o menor valor de atividade lipolítica no filtrado, de apenas $3,00 \pm 0,31$ U/g. Resultados similares foram obtidos pelas demais linhagens, com exceção das linhagens de *M. piriformis* 4145 e *M. hiemalis* 4144, que exibiram baixos valores de atividade no filtrado e na biomassa ($< 4,00$ U/g). A Figura 5.1 ilustra a biomassa fúngica produzida em 72 h de cultivo dos fungos testados.

Figura 5.1. Fotografias da biomassa fúngica produzida pelos fungos testados em 72 h de cultivo a 30°C.

É possível observar na Figura 5.1 que as células possuem estrutura típica de fungos filamentosos, explicado pela rigidez de suas paredes celulares. As cepas de *M. hiemalis* 4144, *M. piriformis* 4145 e *P. citrinum* 4216 apresentaram um crescimento em forma de “pellets”, ao contrário das demais linhagens, que obtiveram crescimento filamentoso. No caso das cepas de *M. hiemalis* 4144 e *M. piriformis* 4145 esse tipo de crescimento pode ter afetado negativamente a produção de lipase, explicando assim o baixo valor de atividade lipolítica obtido no filtrado e na biomassa.

Desta forma, de acordo com os resultados descritos na Tabela 5.1, as cepas de *M. hiemalis* e *M. piriformis* foram descartadas dos testes subsequentes de imobilização, em função da baixa atividade lipolítica no micélio em relação aos demais fungos.

5.2. Imobilização das cepas selecionadas: Seleção dos suportes

Selecionados os fungos mais promissores quanto à atividade lipolítica na biomassa, a etapa seguinte consistiu na realização do processo de imobilização da biomassa celular. O objetivo desta etapa foi selecionar o suporte que proporcionasse a melhor aderência aos fungos e mantivesse sua atividade lipolítica. Neste caso, os fungos foram imobilizados de duas maneiras diferentes: *in situ* (espumas de poliuretano) e após o cultivo (PHB e Celite). A imobilização em espumas de poliuretano ocorreu como consequência natural do crescimento celular durante o cultivo sob agitação, sendo este procedimento o mais utilizado na obtenção de células íntegras imobilizadas. Ambos os suportes PHB e Celite constituem matrizes de baixo custo que tem sido empregadas com sucesso na imobilização de enzimas e biomassa microbiana (DEEPAK et al., 2009; MENDES et al., 2012; TAPINGKAE et al., 2010). Esses suportes foram adicionados ao meio de cultura após o cultivo, imobilizando as células por simples adsorção.

Na imobilização com espumas de poliuretano, observou-se que os fungos cresceram tanto no interior dos poros como ao redor das espumas, formando um emaranhado de biomassa fortemente aderido ao suporte. Essa forte adesão se torna interessante na aplicação da biomassa imobilizada em reações de transesterificação, pois indica uma redução na dessorção de células do suporte, mesmo sob vigorosa agitação.

No caso dos suportes Celite e PHB, verificou-se que ambos possuem baixa resistência mecânica sob vigorosa agitação, fato que levou a adoção do procedimento de imobilização ao final do cultivo (*extra situ*). Neste caso, o procedimento de imobilização não foi muito efetivo, pois não houve forte adesão da biomassa às esferas desses suportes.

A fim de verificar se o processo de imobilização afetou a produção de lipase intracelular da biomassa, avaliou-se a atividade lipolítica nas biomassas imobilizadas (intracelular) e nos filtrados (extracelular). Os perfis das atividades extra e intracelular estão ilustrados na Figura 5.2 (a-b).

Figura 5.2. Valores de atividade lipolítica quantificada no filtrado (a) e na biomassa celular imobilizada (b) em diferentes suportes.

A Figura 5.2a demonstra que independente do suporte empregado, as atividades lipolíticas do filtrado foram mantidas em níveis baixos quando comparada aos valores alcançados pelas biomassas imobilizadas (Figura 5.2b).

A Figura 5.2b ilustra a comparação das atividades lipolíticas exibidas pelas biomassas imobilizadas nos diferentes suportes. Os valores mais altos foram obtidos ao se empregar espumas de poliuretano como matriz de imobilização para todos os fungos testados, visto que a adesão do micélio nesse polímero é muito mais forte se comparado aos demais suportes. Dentre as células imobilizadas em poliuretano, a cepa de *M. circinelloides* 4182 destaca-se das demais por ter apresentado atividade lipolítica superior, da ordem de $49,94 \pm 4,38$ U/g em 72 h de cultivo.

As demais células imobilizadas apresentaram valores de atividade intracelular menores, na faixa de $21,08 \pm 2,67$ a $28,27 \pm 1,86$ U/g. O pior desempenho foi exibido pela cepa imobilizada de *P. citrinum* 4216, que forneceu atividade lipolítica de apenas $10,53 \pm$

0,67 U/g, três vezes menor do que a atividade lipolítica da biomassa livre. Dentre todos os fungos testados, o *P. citrinum* 4216 foi a cepa que apresentou aderência mais fraca às espumas de poliuretano. Isso pode ter ocorrido devido a sua morfologia de crescimento, que consiste na formação “pellets”. Constatou-se que quando a cepa de *P. citrinum* 4216 foi cultivada como células livres suspensas, a morfologia em “pellets” não prejudicou a produção de lipase intracelular, conforme dados da Tabela 5.1, entretanto, esse tipo de morfologia limita sua difusão e adsorção do micélio para dentro das partículas de poliuretano, consequentemente prejudicando a produção de lipase intracelular. Ao contrário, a morfologia de crescimento da cepa de *M. circinelloides* na forma de filamentos facilitou a formação de um forte biofilme dentro e fora das partículas de poliuretano, favorecendo a produção de lipase intracelular. Isso pode ser confirmado através da Figura 5.3 (a-d), que mostra a microscopia do fungo cultivado em meio sólido (ágar), e a micrografia da superfície das células livres e da seção transversal das células imobilizadas da cepa de *M. circinelloides* 4182. A adesão celular à matriz de suporte aparenta ser forte, sugerindo que as células não se desprenderão com facilidade das espumas sob vigorosa agitação do meio reacional.

Esses resultados estão de acordo com os descritos na literatura que demonstram que a imobilização celular em espumas de poliuretano reticulado é a forma mais espontânea e efetiva de se obter biocatalisadores de células íntegras (BAN et al., 2001; LI; DU; LIU, 2008b). Hama et al. 2006 realizaram uma comparação entre a atividade lipolítica intracelular das células de *R. oryzae* de forma livre e imobilizadas em espumas de poliuretano. Os autores observaram um perfil de crescimento similar em ambos cultivos, no entanto para células livres, a atividade intracelular de metanólise e hidrólise decaiu significativamente com o aumento do tempo de cultivo, e a atividade de hidrólise extracelular manteve-se alta do começo ao fim do cultivo. Os autores atribuem esse comportamento a mudanças na morfologia das células de *R. oryzae* após o procedimento de imobilização, que inibiu fortemente a secreção de lipase para o meio de cultura.

(a)

(b)

Figura 5.3. Células de *M. circinelloides* 4182: microscopia das hifas e esporângios em ágar (a), microscopia das células imobilizadas em espumas de poliuretano (b), micrografia da superfície das células suspensas livres (c) micrografia da seção transversal das células imobilizadas em espumas de poliuretano (d).

Chen e McGill (1992) também sugeriram que as diferenças nas atividades de lipase intracelular entre células cultivadas em estado livre e células imobilizadas em BSPs podem ser devido a mudanças morfológicas. Teng, Xu e Wang (2009) demonstraram que a atividade sintética da lipase intracelular de *R. chinensis* é fortemente influenciada pela variação da morfologia das células cultivadas em estado livre. Segundo Adamczak e Bednarski (2004), devido à variedade de tamanho e forma das células obtidas em cultura livre, a atividade de tal preparação não é uniformemente distribuída, e a imobilização pode ajudar na produção de lipase com atividade uniforme.

Portanto, a espuma de poliuretano foi selecionada com melhor suporte de imobilização para os fungos previamente selecionados. No entanto, a cepa de *P. citrinum* 4216 não será mais utilizada nos testes subsequentes de etanólise, devido aos resultados insatisfatórios apresentados.

5.3. Caracterização do suporte selecionado: espuma de poliuretano

Selecionada a espuma de poliuretano como o melhor suporte de imobilização para a biomassa fúngica, julgou-se adequado realizar a caracterização desse suporte quanto as suas propriedades físicas e morfológicas. As análises efetuadas incluíram densidade aparente, cálculo do diâmetro médio de poros, grau de inchamento (sorção e absorção de solventes) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A Tabela 5.2 sumariza os dados obtidos na caracterização física do suporte e a Figura 5.4 ilustra a microscopia da espuma de poliuretano.

Tabela 5.2. Caracterização das propriedades físicas da espuma de poliuretano comercial.

Propriedades	Resultados	
Densidade aparente (g/cm^3)	$0,02 \pm 0,01$	
Diâmetro médio de poros (mm)	$0,36 \pm 0,14$	
Sorção de água ($\text{g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{espuma}}$)	$31,98 \pm 1,71$	
Absorção de solvente ($\text{g}_{\text{solvente}}/\text{g}_{\text{espuma}}$)	<i>etanol</i>	<i>terc-butanol</i>
	$3,40 \pm 0,46$	$2,98 \pm 0,37$

Conforme dados da Tabela 5.2, a densidade aparente da espuma de poliuretano foi de $0,02 \pm 0,01 \text{ g/cm}^3$ e o diâmetro médio de poros foi de $0,36 \pm 0,14 \text{ mm}$. Esses valores estão de acordo com Thomson, 2005, que relata que a densidade aparente esta intimamente ligada as propriedades físicas dos materiais, porém não apresenta linearidade com o tamanho dos poros, visto que espumas com diâmetro de poros diferentes podem apresentar mesma densidade. É possível visualizar o tamanho dos poros da espuma de poliuretano através da microscopia apresentada na Figura 5.4, ferramenta utilizada para o cálculo do diâmetro de poros e de células. O conhecimento do tamanho de poros da matriz de poliuretano é extremamente importante no processo de imobilização celular, pois influencia diretamente na difusão de oxigênio obtido que é particularmente um fator relevante para micro-organismos aeróbicos (De ORY et al., 2006).

Figura 5.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da espuma de poliuretano.

O valor de sorção de água obtido foi de $31,98 \pm 1,71$ g_{água}/g_{espuma}, revelando o caráter mais hidrofílico desse suporte quando comparado aos dados obtidos por Soares (2012), que obteve valores significativamente menores ao analisar espumas de poliuretano sintetizadas com diferentes polióis. Esse caráter hidrofílico é interessante para o processo de cultivo e imobilização, visto que facilita a transferência de massa do meio de cultura para o interior da matriz de poliuretano.

Para o teste de sorção de solventes foram selecionados o etanol e o terc-butanol por serem os solventes envolvidos diretamente na síntese de biodiesel. Ao final de 72h, verificou-se que não houve variação significativa de massa sorvida ao longo do tempo, sendo que a matriz ao entrar em contato com os solventes sorveu-os imediatamente e não variou essa massa ao longo do tempo. Desta forma, foi realizado o teste de absorção desses solventes, que ao contrário da sorção, avalia o quanto de solvente penetra no polímero. Os valores obtidos foram de $3,40 \pm 0,46$ g_{solvente}/g_{espuma} para o etanol e de $2,98 \pm 0,37$ g_{solvente}/g_{espuma} para o terc-butanol, considerados baixos, indicando pouca interação da matriz com os solventes utilizados. Isso sugere que a utilização de etanol como agente acilante e terc-butanol como solvente das reações de biodiesel, não vão interferir negativamente na atuação do biocatalizador na etanólise do óleo de babaçu.

5.4. Imobilização da biomassa em espumas de poliuretano

A etapa seguinte do trabalho consistiu em investigar a influência da área superficial da matriz na imobilização. De acordo com a literatura, as células do fungo *R. oryzae* formam um denso biofilme que se adere preferencialmente na superfície externa dos cubos de poliuretano no interior do suporte devido à dificuldade de transferência de oxigênio (De ORY et al., 2006). No entanto, constatou-se que o fungo *M. circinelloides* forma uma massa celular no interior das partículas de poliuretano, indicando que possui uma difusão de oxigênio melhor do que a demonstrada pelo fungo *R. oryzae*. Assim, pode-se inferir que o aumento da área de superfície dos cubos de poliuretano conduziria ao aumento da atividade lipolítica das células íntegras imobilizadas por unidade de volume de partícula de poliuretano.

Nesse aspecto, novos cultivos de imobilização foram realizados para ambas as linhagens dos fungos *R. oryzae* e *M. circinelloides*, utilizando cubos de poliuretano com faces de 10 mm, a fim de verificar a influência do tamanho das partículas na atividade lipolítica. Foram utilizados 25 cubos em cada cultivo, totalizando uma massa de aproximadamente 0,5 g em cada frasco de Erlenmeyer. A Figura 5.5 ilustra as partículas imobilizadas.

Figura 5.5. Biomassas imobilizadas em espumas de poliuretano de 10 mm.

Na Figura 5.5, é possível observar o biofilme formado pelas células de *R. oryzae* ao redor das partículas de poliuretano, mais evidenciado na linhagem de *R. oryzae* 3231 e o intumescimento das partículas pelas células de *M. circinelloides*.

Para efeito de controle, foi realizado simultaneamente um cultivo sob as mesmas condições de células imobilizadas em partículas de 6 mm, estabelecendo dessa forma uma comparação das diferentes áreas superficiais no processo de imobilização. A Tabela 5.3 descreve os resultados obtidos.

Tabela 5.3. Comparação entre os valores de biomassa seca e de atividade da biomassa imobilizada em diferentes tamanhos de cubos de poliuretano.

Espécie	Biomassa imobilizada (g)		Atividade da biomassa imobilizada (U/g)	
	6 mm	10 mm	6 mm	10 mm
<i>R. oryzae</i> (3231)	2,94±0,36	3,25±0,14	43,84±3,91	56,61±3,45
<i>R. oryzae</i> (4692)	2,09±0,19	3,69±0,66	28,27±0,15	16,37±2,40
<i>M. circinelloides</i> (4140)	3,17±0,46	4,62±1,06	21,08±0,05	21,15±0,04
<i>M. circinelloides</i> (4182)	3,00±0,58	4,95±1,09	42,06±0,51	19,47±1,23

Os dados da Tabela 5.3 revelam que a mudança no tamanho das partículas promoveu um ligeiro aumento no crescimento celular de todas as linhagens testadas. No entanto, as células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 tiveram a atividade lipolítica reduzida pela metade, ao contrário das células imobilizadas de *R. oryzae* 3231, que obtiveram um acréscimo de cerca de 23% na produção de lipase. Isso pode ter ocorrido em virtude do diferente processo de imobilização celular promovido por cada linhagem. Como as células de *M. circinelloides* 4182 não formam um filme no interior das partículas de poliuretano, o aumento no tamanho das partículas proporciona ao fungo uma área maior de colonização, o que explica o aumento da concentração da biomassa. Entretanto, há uma maior limitação difusional do substrato para o interior das células, impedindo assim a atuação da lipase retida na membrana na catálise da reação de hidrólise, levando a baixa atividade lipolítica.

Estudo semelhante foi realizado por Hama et al. (2007) que avaliaram a eficiência de células íntegras de *R. oryzae* imobilizadas em cubos de poliuretano de tamanho 6 mm e em cubóides de tamanho 6 x 6 x 3 mm na metanólise do óleo de soja. Os autores verificaram que os rendimentos mais elevados foram obtidos ao se empregar os cubos de 6 mm, por apresentarem uma área superficial maior comparado aos cubóides. Entretanto, para se estabelecer uma comparação plausível entre o presente trabalho e os descritos na literatura, é necessário o emprego das células íntegras imobilizadas em diferentes tamanhos em reações de transesterificação de óleos vegetais, visto que não há relatos desse tipo de reação empregando células íntegras de *M. circinelloides*. Simultaneamente, as reações de etanólise possibilitarão selecionar a melhor espécie imobilizada para mediar a produção de biodiesel.

5.5. Desempenho das células imobilizadas na etanólise do óleo de babaçu

O desempenho dos biocatalisadores (*R. oryzae* e *M. circinelloides*) imobilizados em espumas de poliuretano de diferentes tamanhos (6 e 10 mm) foi determinado em reações de etanólise do óleo de babaçu em meio contendo terc-butanol como solvente. Os resultados obtidos em concentração mássica de ésteres de etila em função do tempo de reação são apresentados nas Figuras 5.6 e 5.7.

O perfil de formação dos ésteres de etila na reação catalisada pela biomassa imobilizada de *M. circinelloides* 4140 não foi incluído nas Figuras 5.6 e 5.7 em função da baixa conversão do óleo de babaçu em ésteres, independentemente do tamanho das espumas de poliuretano utilizadas na etapa de imobilização. Em 96h de reação, a concentração mássica alcançada empregando os diferentes biocatalisadores foi menor que 15%.

A observação das Figuras 5.6 e 5.7 indicam que as biomassas imobilizadas testadas foram capazes de formar os principais ésteres de ácidos graxos presentes no óleo de babaçu. Entretanto, tanto a velocidade de reação como o rendimento em ésteres foi dependente da linhagem do fungo. Os valores máximos obtidos em concentração mássica de ésteres de etila variaram entre 44,48 a 67,62% m/m, correspondendo a rendimentos de transesterificação 13,13% a 83,22%.

Figura 5.6. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C8; -□-C10, -●-C12, -○-C14, -▼-C16, -△-C18, -▽-C18:1, -▽-C18:2) em função do tempo na etanólise do óleo de babaçu catalisada por (a) *R. oryzae* 3231, (b) *R. oryzae* 4962 e (c) *M. circinelloides* 4182 imobilizadas em espumas de poliuretano de 6 mm. O valor total em ésteres de etila está indicado por uma linha cheia.

Figura 5.7. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C8; -□-C10, -●-C12, -○-C14, -▼-C16, -△-C18, -▽-C18:1, -▽-C18:2) em função do tempo na etanólise do óleo de babaçu catalisada por (a) *R. oryzae* 3231, (b) *R. oryzae* 4962 e (c) *M. circinelloides* 4182 imobilizadas em espumas de poliuretano de 10 mm. O valor total em ésteres de etila está indicado por uma linha cheia.

Os rendimentos de transesterificação, a viscosidade cinemática a 40°C e a densidade aparente a 15°C alcançadas para cada biomassa imobilizada estão descritos na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Valores de rendimento de transesterificação (R%), viscosidade (Visc.) e densidade (D) dos produtos obtidos pela etanólise do óleo de babaçu empregando biomassas imobilizadas dos fungos *R. oryzae* e *M. circinelloides*.

Espécie	6 mm			10 mm		
	R (%)	Visc. (cSt)	D (g/cm ³)	R (%)	Visc. (cSt)	D (g/cm ³)
<i>R. oryzae</i> (3231)	53,35	9,94	sólido*	74,25	7,14	0,8977
<i>R. oryzae</i> (4692)	74,15	7,03	0,8870	66,34	7,99	0,8824
<i>M. circinelloides</i> (4140)	16,18	16,55	sólido*	13,13	19,64	sólido*
<i>M. circinelloides</i> (4182)	83,22	6,63	0,8792	72,45	7,32	0,8852

*produto solidificou a 15°C

Os dados da Tabela 5.4 demonstram que empregando espumas menores (6 mm) as células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 obtiveram o melhor desempenho, com rendimento de 83,22%. Ao se utilizar espumas maiores (10 mm), os rendimentos mais elevados foram alcançados pelas células imobilizadas de *R. oryzae* 3231 e *M. circinelloides* 4182, com valores de 74,25 e 72,45%, respectivamente. As células imobilizadas de *M. circinelloides* 4140 apresentaram os valores mais baixos de rendimento, de apenas 16,18 e 13,13% em espumas de 6 e 10 mm, respectivamente. De maneira geral, comparando-se as diferentes morfologia do suporte e as linhagens utilizadas, é notória a superioridade da cepa de *M. circinelloides* 4182 imobilizadas em espumas de 6 mm, visto que foi o único biocatalisador a obter rendimento maior que 80% nas reações de etanólise do óleo de babaçu.

A fim de confirmar os valores de rendimentos obtidos, foram realizadas análises de viscosidade e densidade dos produtos finais purificados. Tendo em vista que a viscosidade pode ser usada como um parâmetro para o controle da reação de transesterificação, através da redução acentuada da viscosidade da matéria-prima (KNOTHE et al., 2006), os dados da Tabela 5.5 revelam que houve uma redução acentuada da viscosidade da maioria das

amostras de biodiesel purificadas com relação à viscosidade do óleo de babaçu, que é de 29,51 cSt. As células de *M. circinelloides* 4182 imobilizadas em espumas de 6 mm obtiveram o menor valor de viscosidade (6,63 cSt), confirmando a elevada conversão alcançada do óleo de babaçu em ésteres etílicos. O alto valor de viscosidade obtido pela atuação da cepa de *M. circinelloides* 4140 reforça o baixo rendimento de transesterificação do produto final.

Com relação à densidade, os produtos purificados que obtiveram rendimentos inferiores a 55% se solidificaram a 15°C, demonstrando que uma quantidade expressiva do produto era composto por óleo de babaçu não convertido, levando a sua solidificação devido ao rebaixamento da temperatura.

Com exceção dos produtos obtidos ao se empregar a cepa de *M. circinelloides* 4140, os valores de rendimento obtidos pelas reações de etanólise do óleo de babaçu foram considerados satisfatórios, visto que praticamente não há relatos sobre a utilização de etanol para a produção de biodiesel empregando células íntegras imobilizadas. Um dos poucos relatos foi descrito por Jin et al. (2008) que empregaram células íntegras imobilizadas de *R. oryzae* para testar a eficiência do etanol em reações de transesterificação do óleo de canola, obtendo um rendimento de 66,1%. Os autores também testaram reações sequenciais de hidrólise e esterificação do óleo de canola e etanol e obtiveram um rendimento de 85,2%. Recentemente, Prakash e Aulakh (2011) realizaram simultaneamente o cultivo de células íntegras de *Aspergillus* sp. e a transesterificação de óleo residual de cozinha e óleos não comestíveis. Os autores avaliaram a influência de diferentes concentrações de óleos, fontes de nitrogênio e álcoois (metanol e etanol) no crescimento e no rendimento de transesterificação e verificaram que a utilização de etanol como agente acilante e razão percentual de 70:30 óleo/meio de cultura resultaram em 98% de conversão em 48h a 28°C e 120 rpm. Isso demonstra que apesar da maioria dos trabalhos publicados sobre células íntegras relatarem valores relativamente maiores ao se utilizar metanol ao invés de etanol como agente acilante nas reações de transesterificação de óleos vegetais, o etanol surge como alternativa interessante, pois tem a vantagem de reduzir o efeito inibitório na atuação da lipase intracelular, não sendo portanto, necessária adição gradativa do álcool ao meio reacional, conforme recomendado quando metanol é usado como agente acilante. Além disso, o etanol talvez produza ésteres mais estáveis na presença de lipase intracelular de *R. oryzae* (JIN et al. 2008).

Os rendimentos satisfatórios obtidos nas reações catalisadas pelas biomassas imobilizadas também pode ser atribuído a utilização do terc-butanol como solvente das

reações de transesterificação. Li, Du e Liu (2008a) demonstraram que a estabilidade das células imobilizadas aumenta significativamente na presença do terc-butanol, visto que esse solvente possui polaridade moderada, o que possibilita a diluição do glicerol formado. Os autores relatam que a inibição enzimática das células é causada pela limitação da transferência de massa devido ao acúmulo do glicerol dentro das células. Com a utilização do terc-butanol, foi possível obter rendimentos mais elevados e reutilizar as células íntegras imobilizadas repetidas vezes sem perda significativa de atividade lipolítica.

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que as biomassas imobilizadas dos fungos *R.oryzae* e *M. circinelloides* são potenciais biocatalisadores para mediar a etanólise do óleo de babaçu. No entanto, nos últimos anos o emprego de células íntegras de *R. oryzae* imobilizadas tem sido intensamente explorado na literatura científica, ao contrário da cepa de *M. circinelloides*, ainda não explorada no que diz respeito a sua utilização em síntese de biodiesel. Desta forma, o trabalho experimental foi direcionado para otimização da produção de lipase intracelular pela linhagem de fungo *M. circinelloides*, visando um posterior estabelecimento das condições de reação de etanólise do óleo de babaçu, por representar uma rota ainda pouca explorada na literatura.

5.6. Estabelecimento das condições de cultivo e imobilização das células de *M. circinelloides* 4182

5.6.1. Efeito da fonte de carbono

Diversos trabalhos têm reportado que os óleos vegetais são excelentes indutores na produção de lipase em diferentes tipos de micro-organismos (SUN et al, 2009). Em especial, o óleo de oliva tem sido descrito como o principal indutor na produção da lipase intracelular de células de *R. oryzae* (BAN et al, 2001). A fim de investigar a influência de outras fontes de carbono no crescimento celular e na produção de lipase intracelular, diferentes tipos de óleos vegetais foram testados como fonte de carbono e agente indutor no cultivo e imobilização das células de *M. circinelloides* 4182. Óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de linhaça, óleo de soja e óleo de castanha do Brasil, os quais tem sua composição em ácidos graxos descrita na Tabela 5.5, foram usados em uma concentração fixa de 30 g/L. A Figura 5.8 ilustra os resultados referentes a atividade hidrolítica e concentração biomassa imobilizada obtidos em 72 h de cultivo.

Tabela 5.5. Composição em ácidos graxos dos óleos vegetais utilizados como fonte de carbono no cultivo e imobilização das células de *M. circinelloides* 4182.

Ácido Graxo	Composição em ácidos graxos dos óleos vegetais (% m/m)				
	Oliva	Girassol	Castanha do Pará	Linhaça	Soja
C16:0 – palmítico	11,8	7,1	13,8	5,5	11,4
C18:0 – esteárico	2,6	4,7	10,2	6,0	4,4
C18:1 – oleico	74,2	25,5	29,4	21,0	20,8
C18:2 – linoleico	8,5	62,4	45,5	14,0	53,8
C18:3 – linolênico	0,7	-	0,1	53,5	9,3
Outros	2,2	0,3	1,0	-	0,3

Figura 5.8. Biomassa imobilizada (●) e atividade hidrolítica (coluna) obtida no cultivo e imobilização das células de *M. circinelloides* empregando diferentes fontes de carbono como substrato do meio de cultura contendo peptona (70g/L) a 30°C em agitação orbital (170 rpm).

A Figura 5.8 mostra que todos os óleos testados foram capazes de promover o crescimento das células de *M. circinelloides* 4182. Os valores de biomassa obtidos variaram de 26 a 34 g/L, sendo o máximo valor obtido pelo óleo de soja e o valor mínimo de concentração obtido pelo óleo de linhaça. Esses valores são superiores aos obtidos por Zeng et al (2006), que testaram os óleos de oliva, soja e algodão como substrato no cultivo

das células de *R. oryzae*. Os autores verificaram que em 40 h de incubação, o melhor crescimento celular foi obtido na presença de óleo de algodão, que induziu a formação de 16 g/L biomassa imobilizada.

O óleo de oliva foi a melhor fonte de carbono para a produção de lipase intracelular, alcançando atividade hidrolítica máxima de 67 U/g. As atividades hidrolíticas obtidas pelas células imobilizadas na presença de outros óleos vegetais foram inferiores e variaram na faixa de 40 a 49 U/g. Esses resultados podem estar relacionados à composição em ácidos graxos de cada óleo empregado, particularmente, com as diferentes proporções de ácido oleico. Conforme dados da Tabela 5.5, o ácido oléico (C18) é o principal ácido graxo presente no óleo de oliva (>70%), enquanto que o óleo de soja, girassol e castanha do Brasil têm alta porcentagem de ácido linoleico (C18:1) (54, 68 e 45%, respectivamente), e baixo teor de ácido oleico. Tem sido proposto que os ácidos graxos (incluindo os ácidos graxos presentes nos óleos) tem efeitos importantes na produção de lipase, que está relacionada com a quantidade de ácido oleico presente em cada óleo (WANG; XU; SHANG, 2008).

A literatura reporta diversos trabalhos sobre a síntese de lipase intracelular com elevada atividade lipolítica obtida a partir de alguns micro-organismos induzidos por ácido oléico ou óleo de oliva. Yang et al. (2005) investigaram a influência dos diferentes ácidos graxos como substrato indutores da lipase intracelular de *R. arrhizus* e verificaram que o ácido oleico foi o que promoveu maior produção de lipase intracelular. Semelhante resultado foi encontrado por Hama et al. (2004) que verificaram dentre diversos ácidos testados, que o ácido oleico foi o que promoveu maior atividade hidrolítica das células imobilizadas de *R. oryzae*, bem como maior atividade específica de metanólise do óleo de soja. Shimada et al. (1993) indicaram que ácidos graxos de longa cadeia participaram na expressão do gene da lipase de *Geotrichum candidum*, e ésteres de ácidos graxos insaturados de cadeia longa foram os mais efetivos na indução de lipase. No entanto, não há relatos na literatura sobre a influência de óleos vegetais na obtenção de lipase intracelular de *M. circinelloides*.

Os resultados obtidos confirmam que o óleo de oliva foi o melhor indutor de lipase intracelular de *M. circinelloides* 4182. Desta forma, o óleo de oliva foi adotado como a única fonte de carbono nos testes subsequentes.

5.6.2. Efeito da concentração de óleo de oliva

Para avaliar a influência da concentração do óleo de oliva na produção da lipase intracelular de *M. circinelloides* 4182, testes foram realizados variando a concentração de óleo de oliva entre 10 a 100 g/L. Essa faixa de concentração foi selecionada baseado nos dados reportados na literatura (WANG; XU; SHANG, 2008) levando em consideração o fato de que quantidades elevadas de substrato podem causar uma inibição do crescimento celular e que um substrato pobre em nutrientes pode acarretar decréscimo do crescimento celular, conseqüentemente, a redução da produção de lipase.

A Figura 5.9 ilustra o perfil de crescimento celular e da atividade hidrolítica da biomassa imobilizada em 72 h de cultivo.

Figura 5.9. Biomassa imobilizada (■) e atividade hidrolítica (coluna) obtida no cultivo e imobilização das células de *M. circinelloides* empregando diferentes concentrações de óleo de oliva como substrato do meio de cultura contendo peptona (70g/L) a 30°C em agitação orbital (170 rpm).

A Figura 5.9 mostra que a concentração do óleo de oliva adicionado ao meio de cultivo teve um efeito marcante na produção de lipase intracelular. Verificou-se que o aumento da concentração do óleo de oliva (de 10 a 100 g/L), foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de biomassa, alcançando um valor máximo de 100g/L de biomassa imobilizada com adição de 100 g/L de óleo de oliva. Entretanto, a máxima

atividade hidrolítica (66,78 U/g) foi obtida ao utilizar apenas 30 g/L de óleo de oliva em 72h de cultivo.

Esses resultados sugerem que não existe uma correlação direta entre crescimento celular e produção de lipase. Resultados similares foram encontrados por Wang, Xu e Shang et al (2008) na avaliação da influência de diferentes concentrações de óleo de oliva no meio de cultivo para a produção de lipase de *Rhizopus chinensis*. Os autores observaram que o crescimento celular foi proporcional a concentração do óleo de oliva adicionado, no entanto, concentrações superiores a 20 g/L provocaram a inibição da produção de lipase, possivelmente devido a ocorrência de hidrólise do excesso de óleo de oliva no meio de cultura, resultando em repressão da síntese de lipase.

5.6.3. Efeito da fonte de nitrogênio

Além da fonte de carbono, a fonte de nitrogênio também desempenha um papel importante na produção de enzima. Quando o fungo cresce em excesso de nitrogênio e o crescimento é limitado pela fonte de carbono, a proteína da célula é degradada rapidamente. Por outro lado, a limitação de nitrogênio no meio afeta significativamente o crescimento celular e o metabolismo de produção (PAPAGIANNI, 2004).

A influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de lipase intracelular de *M. circinelloides* 4182 foi avaliada. Para tanto, foram utilizados peptonas de carne e de soja devido aos diversos relatos sobre sua utilização no cultivo de células de *R. oryzae*, bem como água de maceração de milho, muito utilizada no cultivo de células de *M. circinelloides*. A concentração utilizada para todas as fontes de nitrogênio foi de 70 g/L. A Figura 5.10 ilustra os resultados obtidos.

Pode-se verificar (Figura 5.10) que não há uma diferença significativa na concentração da biomassa ao utilizar diferentes fontes de nitrogênio. Entretanto, na síntese de lipase a influência foi evidente para a água de maceração de milho, que afetou negativamente a atividade da lipase intracelular, reduzindo seu valor ao máximo de 32,22 U/g. Embora diferenças acentuadas não tenham sido encontradas no desempenho das diferentes fontes de peptonas (carne ou soja), um pequeno aumento de atividade (67,00 U/g) foi obtido quando a peptona de soja foi usada no meio de cultura.

Figura 5.10. Biomassa imobilizada (■) e atividade hidrolítica (coluna) obtida no cultivo e imobilização das células de *M. circinelloides* empregando meio de cultura contendo óleo de oliva (30g/L) suplementado com diferentes fontes de nitrogênio a 30°C em agitação orbital (170 rpm).

Esses resultados são similares aos obtidos por Yang et al 2005, que avaliaram diferentes fontes de nitrogênio no cultivo e imobilização das células de *R. arrhizus* e obtiveram a maior atividade hidrolítica empregando farinha e proteína de soja. Os autores atribuem esses resultados a contribuição da proteína macromolecular e dos óleos contidos na farinha de soja, os quais foram benéficos à síntese da lipase.

5.6.4. Influência de fatores físicos: nível de inóculo e volume dos Erlenmeyers

Inóculo e aeração são fatores muito importantes no cultivo micro-organismos, especialmente no que diz respeito aos fungos (PAPAGIANNI; MOO-YOUNG, 2002; PAPAGIANNI; MATTEY, 2006). Em diversos estudos, a concentração do inóculo empregada no cultivo, bem como a quantidade de oxigênio fornecido ao meio fermentativo, demonstrou ter extrema relevância na produção de lipase (TENG; XU, 2008). No entanto, apesar de se ter o conhecimento de que a maior parte dos fungos existentes na natureza requer oxigênio molecular para crescer, os estudos relacionados a essa exigência nutricional são limitados pela incapacidade de se medir concentrações tão baixas de oxigênio (PAPAGIANNI, 2004).

Desta forma, para avaliar a influência desses fatores, tais como inóculo e aeração, diferentes níveis de esporos (10^6 e 10^7 esporos/mL) e diferentes tamanhos de erlenmeyers (250 e 500 mL) foram investigados na produção de lipase intracelular de células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182. Ao variar o tamanho dos Erlenmeyers, aumentou-se a área superficial de crescimento celular e a quantidade de oxigênio retido, aumentando assim a aeração no interior dos frascos. A Tabela 5.6 descreve os dados obtidos.

Tabela 5.6. Biomassa imobilizada e atividade hidrolítica obtida no cultivo e imobilização das células de *M. circinelloides* empregando diferentes níveis de inóculo e variando os volumes dos frascos.

Análise	Inóculo (esporos/mL)		Volume dos frascos (mL)	
	10^6	10^7	250	500
Biomassa (g/L)	32,45	30,96	33,50	37,80
Atividade lipolítica intracelular (U/g)	65,70	52,59	66,24	43,66

Na Tabela 5.6 pode ser observado que não houve uma diferença expressiva no crescimento celular quando o nível de inóculo foi aumentado de 10^6 para 10^7 esporos/mL, obtendo-se valores de 41,5 e 39,6 g/L, respectivamente. Entretanto, a atividade hidrolítica mais elevada (50,37 U/g) foi obtida ao se utilizar uma menor proporção de esporos (10^6 esporos/mL). Esse comportamento pode estar relacionado com a influência do inóculo sobre a morfologia do micélio, e conseqüentemente, na produção de lipase. Teng, Xu e Wang (2009) investigaram a relação da morfologia de células de *R. chinensis* e a produção de lipase empregando diferentes concentrações de inóculo. Os autores constataram um aumento da produção de lipase quando o micélio se desenvolveu na forma de filamentos emaranhados, e isso ocorreu quando foram empregados baixos valores de concentração de inóculo. Além disso, os autores verificaram que concentrações de inóculo superior a 10^7 esporos/mL tende a formar micélios dispersos, prejudicando a produção de lipase.

Com relação à aeração, pode-se observar na Tabela 5.6, que o valor máximo de biomassa imobilizada (37,80 g/L) foi obtido quando se utilizou o Erlenmeyer de 500 mL, no entanto, houve um decréscimo da atividade hidrolítica (43,66 U/g). Ao se utilizar Erlenmeyers de menor capacidade (250 mL) a atividade hidrolítica foi superior (66,24

U/g), indicando que quanto maior o volume do frasco, maior a superfície de aeração do fungo, o que pode induzir a secreção da lipase para o meio fermentado.

Após a determinação das melhores condições de cultivo e imobilização da cepa de *M. circinelloides* 4182, um novo cultivo foi realizado a fim de confirmar os valores obtidos de atividade lipolítica e quantidade de biomassa produzida. Os resultados encontrados, juntamente com as melhores condições estabelecidas, estão expressos na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Condições estabelecidas para o cultivo e imobilização das células de *M. circinelloides* 4182.

Parâmetros	Resultados
Fonte de carbono	Óleo de oliva
Concentração da fonte de carbono (g/L)	30
Fonte de nitrogênio	Peptona de soja
Concentração do inoculo (esporos/mL)	10^6
Volume do frasco fermentador (mL)	250
Atividade lipolítica (U/g)	$66,46 \pm 0,51$
Biomassa imobilizada (g/L)	$32,37 \pm 1,36$

5.7. Estabelecimento das condições reacionais da síntese de biodiesel de óleo de babaçu

5.7.1. Influência da quantidade de biocatalisador

Determinadas as condições ótimas de cultivo e imobilização das células íntegras de *M. circinelloides* 4182, o trabalho foi direcionado para o estabelecimento das melhores condições reacionais da etanolise do óleo de babaçu, visando a obtenção de biodiesel. Inicialmente, avaliou-se o efeito da quantidade em massa do biocatalisador no rendimento final das reações de transesterificação do óleo de babaçu e etanol em meio contendo terc-butanol.

As reações foram conduzidas conforme metodologia descrita no item 4.2.5, sendo utilizada uma quantidade variável na faixa de 5, 10 e 20% em massa de biocatalisador, com relação aos reagentes de partida, óleo e etanol. Os resultados estão dispostos na Tabela 5.8.

Tabela 5.8. Efeito do carregamento de células imobilizadas na etanólise do óleo de babaçu.

Células imobilizadas (%)	Rendimento (%)	Viscosidade (cP)
5	52,3	10,1
10	71,7	6,3
20	82,7	5,0

Os valores de rendimento obtidos variaram de 52,3 a 82,7% ao final de 120h de reação (Tabela 5.8). Os resultados mostram que o rendimento final das reações é diretamente proporcional à quantidade de células imobilizadas utilizadas, ou seja, quanto maior a quantidade em massa de biocatalisador, maior o rendimento obtido. Isso sugere que a utilização de apenas 5% em massa é insuficiente para a conversão do óleo de babaçu em ésteres etílicos. Os valores de viscosidade confirmam esses resultados, sendo o produto com menor viscosidade (5,0 cSt) obtido a partir da utilização de 20% de biocatalisador, com valor de rendimento final de 82,7%.

Esses resultados podem também estar diretamente relacionado à dispersão do biocatalisador no meio reacional. A Figura 5.11 mostra a dispersão do biocatalisador nos diferentes carregamentos utilizados nas reações de transesterificação. Pode-se observar que a utilização de 5% de células imobilizadas promoveu uma melhor homogeneização do meio reacional, o que não ocorre com a utilização de 20% de biocatalisador. No entanto, devido a maior mobilidade do biocatalisador, a agitação vigorosa, faz com que certa quantidade das células se desprendam das espumas, causando um estresse físico à biomassa imobilizada. Neste caso, a utilização de maiores quantidades de células permite um comportamento semelhante ao de um reator de leito fixo, preservando assim a integridade física do biocatalisador. Cabe ressaltar que devido ao grande volume ocupado pelas células imobilizadas, carregamentos maiores que 20% são desnecessários, pois grande parte do biocatalisador não é adsorvida pelo meio reacional.

Figura 5.11. Dispersão do biocatalisador com carregamento de (a) 5%, (b) 10% e (c) 20% de células imobilizadas em relação ao meio reacional.

5.7.2. *Influência do solvente*

Nesta série de experimentos foi avaliada a influência de dois solventes de diferentes polaridades (terc-butanol e iso-octano), bem como a mistura equivalente de ambos na atividade catalítica das células íntegras imobilizadas na reação de transesterificação do óleo de babaçu com etanol. Além disso, a mesma reação foi realizada em meio isento de solvente para verificar a real necessidade da utilização desses solventes no meio reacional.

O preparo das células íntegras de *M. circinelloides* 4182 foi realizado por meio da imobilização da biomassa fúngica em espumas de poliuretano durante 72 h de cultivo, sendo obtido o biocatalisador imobilizado com atividade hidrolítica média de $59,6 \pm 1,89$ U/g. O carregamento médio de célula imobilizada por espuma foi de $24 \pm 0,5$ mg/espuma. O teor de umidade final do biocatalisador foi de aproximadamente 10%.

O efeito da adição de cada solvente ou mistura de solventes sobre a reação com óleo de babaçu está ilustrado na Figura 5.12.

Figura 5.12. Efeito de solventes e misturas de solventes na atividade de células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 para mediar a etanolise do óleo de babaçu (-▼-) isento de solvente, (-■-) terc-butanol, (-▲-) iso-octano e (-●-) mistura 50% terc-butanol e iso-octano.

O perfil de formação dos ésteres de etila (Figura 5.12) indica que independente do solvente empregado, o biocatalisador foi capaz de converter os ácidos graxos presentes no óleo de babaçu nos ésteres de etila correspondentes em todas as condições testadas. Entretanto, tanto a velocidade de reação como o rendimento total em ésteres foi fortemente influenciado pelo tipo de solvente utilizado.

A menor velocidade de reação foi verificada para reação conduzida em meio isento de solventes, sendo detectada formação dos ésteres somente após 72 h de reação. A máxima concentração em ésteres de etila de 20,69% foi alcançada em 96 h, correspondendo a um rendimento de transesterificação de 25,46%.

A adição dos solventes terc-butanol, iso-octano ou mistura de solventes (terc-butanol e iso-octano) favoreceu a partição dos materiais de partida e de produtos aumentando a concentração em ésteres etílicos para valores superiores a 48%. O melhor desempenho do biocatalisador foi obtido na reação conduzida na presença do solvente terc-butanol e da mistura terc-butanol e iso-octano, fornecendo uma concentração em ésteres etílicos da ordem de 68,95 e 67,06 % em 72h, correspondendo a um rendimento de transesterificação de 82,54 e 84,87%, respectivamente.

Para confirmar a conversão do óleo de babaçu em ésteres etílicos, a viscosidade dos produtos purificados foi também determinada. Os ésteres purificados apresentaram valores de viscosidade cinemática que variaram de 6,17 cSt a 14,0 cSt. Verificou-se que em todas as reações o biocatalisador promoveu uma redução da viscosidade do óleo de babaçu, sendo que os valores mais baixos foram obtidos nas reações conduzidas na presença de terc-butanol como solvente (puro ou misturado com iso-octano), confirmando as conversões elevadas do óleo em ésteres etílicos obtidas nessas reações (Figura 5.12). Da mesma forma, a elevada viscosidade do produto obtido na reação conduzida em meio isento de solvente está coerente com o baixo rendimento em ésteres atingido, o qual pode ser atribuído ao acúmulo do glicerol no meio reacional, que é hidrofílico e insolúvel em óleo, sendo assim facilmente adsorvido pelos poros das espumas ao longo da reação, prejudicando a transferência do substrato para o interior das células imobilizadas (LI; DU; LIU, 2008a). A Tabela 5.9 sintetiza os resultados obtidos nas reações empregando diferentes solventes e misturas de solventes mediadas pelas células imobilizadas.

Tabela 5.9. Influência de diferentes solventes na síntese enzimática do biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol catalisado por células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182.

Solvente	Rendimento (%)	Viscosidade (cSt)
Isento	25,46	14,0
Terc-butanol	84,87	6,17
Iso-octano	58,12	9,87
Terc-butanol/iso-octano	82,54	6,26

Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou terc-butanol puro (84,87%) ou misturado ao iso-octano (82,54%), indicando o efeito benéfico desses solventes às células imobilizadas (Tabela 5.9). Esses resultados podem ser creditados a polaridade desses solventes. O terc-butanol, devido à sua polaridade moderada ($\log P = 0,87$), favorece a diluição do glicerol acumulado nas espumas, melhorando a transferência do substrato para o interior das células imobilizadas. Por outro lado, tem sido demonstrado que as lipases extracelulares possuem elevada atividade catalítica em meio reacional contendo solventes orgânicos com valores de $\log P (>2)$, como é o caso do iso-octano ($\log P = 3,67$), e que esses solventes têm sido muito utilizados para a síntese enzimática convencional de biodiesel (LI et al., 2006). Entretanto, no presente trabalho, quando o iso-octano foi utilizado como solvente principal da etanolise do óleo de babaçu, o rendimento

obtido foi relativamente mais baixo (58,12%) que nas outras condições testadas, indicando que, ao contrário das lipases extracelulares, a utilização do iso-octano reduziu a atuação catalítica das células íntegras imobilizadas. Esses resultados sugerem que a utilização da mistura equivalente de ambos os solventes ou a utilização de terc-butanol puro forneceram as condições mais adequadas para a atuação das células imobilizadas, o que pode ser confirmado pelo rendimento de transesterificação mais elevado. No entanto, a utilização da mistura terc-butanol e iso-octano dificultou a separação dos ésteres etílicos do glicerol na etapa de purificação, portanto, para os testes subsequentes foi adotado terc-butanol puro como solvente das reações.

5.7.3. *Delineamento experimental*

Tendo selecionado o carregamento adequado de biocatalisador imobilizado na etanolise do óleo de babaçu, bem como definido o melhor solvente a ser utilizado na reação, novos testes reacionais foram realizados para otimizar o desempenho do biocatalisador na reação de transesterificação do óleo de babaçu e etanol. O delineamento experimental foi utilizado como ferramenta para estudar o efeito combinado das variáveis: (X_1) razão molar óleo/etanol e (X_2) temperatura. Para tanto, utilizou-se um planejamento fatorial completo 2^2 estrela rotacional com três replicatas no ponto central, considerando como variável resposta o rendimento obtido em 120 h de reação. A faixa de razão molar estudada foi de 1:4,8 a 1:13,2 e a faixa de temperatura utilizada foi de 33 a 47°C.

As células de *M. circinelloides* 4182 imobilizadas em espumas de poliuretano utilizadas em todos os experimentos foram cultivadas e imobilizadas conforme condições ideais estabelecidas anteriormente, obtendo-se atividade lipolítica média de $64,77 \pm 0,82$ U/g. Para evitar a reversibilidade da reação, o teor de umidade das células imobilizadas foi mantido em valores menores que 10%. Em todos os ensaios foi utilizada uma massa fixa de 20% de biocatalisador com relação aos reagentes de partida, óleo de babaçu e etanol. A matriz experimental e os rendimentos obtidos em cada ensaio estão descritos na Tabela 5.10 e o perfil de formação dos monoésteres de etila em função do tempo para essas reações está ilustrado na Figura 5.13.

Tabela 5.10. Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento central 2^2 estrela rotacional utilizado para avaliar a influência das variáveis: razão molar e temperatura (as variáveis estão codificadas e os valores reais estão entre parênteses) no rendimento da etanólise do óleo de babaçu.

Ensaio	Variáveis		Rendimento (%)
	Razão molar óleo/etanol	Temperatura (°C)	
1	-1 (1:6)	-1 (35)	88,81
2	+1 (1:12)	-1 (35)	68,53
3	-1 (1:6)	+1 (45)	79,29
4	+1 (1:12)	+1 (45)	50,23
5	0 (1:9)	0 (40)	72,76
6	0 (1:9)	0 (40)	68,56
7	0 (1:9)	0 (40)	69,81
8	-1,414 (1:4,8)	0 (40)	72,89
9	+1,414 (1:13,2)	0 (40)	63,00
10	0 (1:9)	-1,414 (33)	77,22
11	0 (1:9)	+1,414 (47)	55,48

Figura 5.13. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C8; -□-C10, -●-C12, -○-C14, -▼-C16, -△-C18, -▼-C18:1, -▽-C18:2) em função do tempo na etanólise do óleo de babaçu catalisada pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 sob diferentes condições operacionais (ensaio 1 ao 6).

Ensaio 7 **Ensaio 8** **Ensaio 9** **Ensaio 10** **Ensaio 11**

Conclusão Figura 5.13. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C8; -□-C10, -●-C12, -○-C14, -▼-C16, -△-C18, -▼-C18:1, -▽-C18:2) em função do tempo na etanólise do óleo de babaçu catalisada pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 sob diferentes condições operacionais (ensaios 7 ao 12).

A Figura 5.13 indica que a biomassa imobilizada foi capaz de formar os principais ésteres de ácidos graxos presentes no óleo de babaçu. Em todos os ensaios, o principal éster produzido foi o laurato de etila (C12), sendo os demais produzidos em menores quantidades. Este perfil encontra-se dentro do esperado, levando em consideração que a composição em ácidos graxos do óleo de babaçu é formada de aproximadamente 44% de ácido láurico.

Os resultados da Tabela 5.10 mostram que o rendimento de transesterificação foi afetado significativamente por ambas variáveis. Os valores de rendimentos obtidos variaram de 50,23 a 88,81%, sendo o rendimento mais alto obtido ao se utilizar baixos valores de razão molar (1:6) e temperatura (35°C) (ensaio 1). Por outro lado, a conversão sofreu uma queda acentuada quando elevados valores de razão molar (>1:9) e temperatura (>45°C) foram utilizados para compor o meio reacional (ensaios 4 e 11).

A Tabela 5.11 reúne os dados da análise dos efeitos, estimativa de erro padrão e o teste t de Student's. A análise estatística dos resultados revelou o efeito significativo de ambas as variáveis lineares (X_1 e X_2) estatisticamente ($p < 0,05$) ao nível de 95% de confiança. No entanto, as variáveis quadráticas e a interação entre as variáveis não foram estatisticamente significativas ao mesmo nível de confiança.

Tabela 5.11. Estimativa dos efeitos das variáveis, erros padrão e teste t de Student's t para o rendimento da etanolise do óleo de babaçu utilizando planejamento central 2^2 estrela rotacional.

Variável	Efeitos	Erro padrão	p
Média	70,36	$\pm 1,25$	0,0003*
X_1 (Linear)	-14,66	$\pm 1,53$	0,0107*
X_1 (Quadrático)	-1,73	$\pm 1,82$	0,4437
X_2 (Linear)	-15,87	$\pm 1,53$	0,0091*
X_2 (Quadrático)	-0,12	$\pm 1,82$	0,9532
$X_1 \cdot X_2$	-4,39	$\pm 2,16$	0,1787

*significativo ao nível de 95% de confiança:

X_1 e X_2 representam as variáveis: razão molar óleo/etanol e temperatura, respectivamente.

Cabe ressaltar que os principais efeitos estatísticos das variáveis lineares foram negativos. Neste aspecto, o efeito negativo da temperatura pode estar diretamente relacionada com a baixa estabilidade térmica das células de *M. circinelloides* 4182, por se

tratar de um fungo mesofílico. A literatura reporta que fungos mesofílicos, ou seja, fungos que crescem e sintetizam enzimas lipolíticas em faixas de temperatura de 20 a 30°C tendem a serem menos estáveis a um tratamento térmico (FERNANDES-LAHORE et al., 1999).

Com relação ao efeito negativo da razão molar, os resultados mostraram que quantidades em excesso de etanol provocam um declínio no rendimento das reações (ensaios 2, 4, 9 e 11). Embora um excesso de álcool em relação à quantidade estequiométrica é normalmente requerido para manter o equilíbrio da reação em direção à formação de ésteres (STAMENKOVIC; VELICKOVIC; VELJKOVIC, 2011), uma grande quantidade em excesso de etanol pode inibir a atividade de algumas lipases. No presente trabalho, foi utilizado etanol em excesso para promover a homogeneidade do meio reacional durante o processo, porém quando o excesso foi maior do que o necessário, ocorreu o efeito de inibição da enzima, diminuindo assim o rendimento final.

A partir desses dados, foi possível compor o modelo estatístico incluindo os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos como apresentado na Equação 5.1, em que Y: representa o rendimento de transesterificação (%); X_1 é o valor codificado da variável razão molar e X_2 o valor codificado da variável temperatura.

$$Y = 70,36 - 7,33.X_1 - 7,93.X_2 \quad \text{Equação 5.1}$$

A análise de variância do modelo foi avaliada pelo teste F (Tabela 5.12), que revelou que a regressão foi estatisticamente significativa ao nível de 95% de probabilidade. O modelo não apresentou falta de ajuste e o coeficiente de determinação ($R^2=0,8213$) indicou que o modelo explica 82,13% da variabilidade experimental.

Desta forma, considerou-se que o modelo estatístico obtido foi adequado para descrever o rendimento de transesterificação em função das variáveis estudadas (razão molar e temperatura), o qual foi utilizado para gerar a superfície de resposta apresentada na Figura 5.14. Os valores preditos pelo modelo representado na superfície de resposta indicam que o rendimento de transesterificação é maximizado numa temperatura de 35°C e razão molar óleo de babaçu/ etanol em 1:6.

Tabela 5.12. Análise de variância (ANOVA) para a regressão do modelo que representa o rendimento da etanólise do óleo de babaçu utilizando o planejamento central 2^2 estrela rotacional.

Variáveis	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	
				Valores	Prob>F
X_1	428,67*	1*	428,67*	92,17*	0,0107*
X_2	502,12*	1*	502,12*	107,96*	0,0091*
<i>Falta de ajuste</i>	198,36	3	66,12	14,22	0,0664
Erro puro	9,30	2	4,65		
Cor total	1162,11	10			
R^2	0,8213				

X_1 e X_2 representam as variáveis: razão molar óleo/etanol e temperatura, respectivamente.

F: Teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

Figura 5.14. Superfície de resposta descrita pelo modelo da Equação 5.1 que representa o rendimento da etanólise do óleo de babaçu catalisado pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 em função da razão molar (X_1) e temperatura (X_2) conforme modelo proposto na Equação 1.

Para confirmar o modelo matemático obtido, um ensaio adicional foi realizado nas condições previstas pelo modelo e constatou-se que a diferença entre o rendimento obtido experimentalmente e o rendimento teórico foi menor que 2%. O ensaio conduzido sob

condições otimizadas alcançou valores maiores que o gerado pelo delineamento experimental, obtendo-se concentração de 73,54% m/m de ésteres etílicos, que correspondem a um rendimento de transesterificação de 90,51 %. A Figura 5.15 ilustra os resultados obtidos, e revela que o perfil de ésteres etílicos produzidos foi similar ao perfil encontrado nos demais ensaios do planejamento.

Figura 5.15. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C8; -□-C10, -●-C12, -○-C14, -▼-C16, -△-C18, -▽-C18:1, -▽-C18:2) em função do tempo na etanólise do óleo de babaçu catalisada pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 nas condições previstas pelo modelo matemático (razão molar óleo/etanol 1:6 a 35°C). O valor total em ésteres de etila está indicado por uma linha cheia.

5.8. Caracterização do biodiesel purificado

Determinadas as condições otimizadas da etanólise do óleo de babaçu empregando as células de *M. circinelloides* 4182 imobilizadas em espumas de poliuretano, a próxima etapa do trabalho consistiu em caracterizar o produto obtido ao final da reação de transesterificação. O biodiesel obtido da etanólise do óleo de babaçu nas condições otimizadas foi submetido à etapa de purificação, conforme item 4.3.3, e caracterizado quanto as suas propriedades físico-químicas. Foram realizadas diferentes análises, tais como: viscosidade, densidade, teor de água, Ressonância magnética nuclear (RMN), Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) e Termogravimetria (TGA). Os resultados referentes à caracterização do biodiesel purificado estão descritos na Tabela 5.13.

Tabela 5.13. Caracterização do biodiesel purificado de óleo de babaçu.

Propriedade	Biodiesel	Especificação ANP
Aspecto	transparente	-
Cor	amarelado	-
Densidade a 15°C (g/cm ³)	0,888	0,820 a 0,884*
Viscosidade a 40°C (cSt)	6,09	2,0 a 5,0**
Teor de água (%)	0,24	0,05***
Rendimento CG (%)	90,51	
Rendimento RMN (%)	93,00	
Rendimento TGA (%)	89,00	

* normas: NBR 7148/14065 e ASTM D1298/4052

** normas: NBR 10441 e ASTM D445

*** normas: ASTM D2709

Os resultados mostram que o biodiesel obtido possui aspecto e cor característicos do biodiesel convencional obtido por via química. No entanto, as análises de densidade, viscosidade e teor de água revelam que o biodiesel obtido se encontra fora dos padrões estabelecidos pela legislação da ANP, o que pode ser explicado pelo fato de que a conversão do óleo de babaçu não ter sido completa, visto que o rendimento final obtido por cromatografia gasosa (CG) foi de 90,5%.

Além das análises de viscosidade e densidade, outras técnicas de análise permitiram avaliar a conversão do óleo vegetal em ésteres etílicos, bem como a pureza do biodiesel purificado.

Uma delas foi a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H), que consiste em uma técnica espectroscópica não destrutiva e que tem ganhado importância nos últimos anos, por requerer uma quantidade mínima de amostra no procedimento e por ser uma análise rápida. A espectroscopia por RMN¹H tem sido empregada para monitorar reações de transesterificação química e enzimática, inclusive no emprego de células íntegras (HORST et al., 2009; ROSSET et al., 2011; PRAKASH; AULAKH, 2011). A análise baseia-se no monitoramento das variações no sinal dos hidrogênios da glicerina, possibilitando assim confirmar a ocorrência da reação de transesterificação do triglicerídeo e a sua conversão em ésteres de ácidos graxos alquílicos.

A Figura 5.16 ilustra os espectros de RMN¹H referentes a amostra de biodiesel obtido.

Figura 5.16. Ressonância magnética nuclear de prótons do biodiesel de óleo de babaçu e etanol catalisado pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182.

Nos espectros da Figura 5.16 verifica-se a ausência dos sinais correspondentes aos átomos de hidrogênio do grupo do CH_2 do glicerol em 4,2 ppm e o aparecimento do sinal de um quarteto em 4,1 ppm, referente aos hidrogênios metilênicos da porção alcoólica do éster $[\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OC(=O)-R}]$. O valor de rendimento calculado por essa técnica foi de 93%, confirmando os resultados obtidos pela análise cromatográfica, visto que houve uma diferença de apenas 2,5% entre os resultados (Tabela 5.13). Resultados superiores foram obtidos por Prakash e Aulakh (2011), que alcançaram conversão de 98% na conversão dos óleos de karanja, pinhão manso e algodão em seus respectivos ésteres etílicos, os quais foram quantificados por RMN^1H e CG. Os autores empregaram como biocatalisadores células íntegras livres de *Aspergillus* sp.

Outra técnica muito utilizada na avaliação da conversão do óleo vegetal em biodiesel e que foi empregada neste trabalho, é a Termogravimetria que permite avaliar a conversão da reação de transesterificação, bem como determinar a estabilidade térmica do biodiesel.

A Termogravimetria (TGA) é o resultado de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do tempo ou da temperatura (MONTEIRO et al., 2008). Esta e outras técnicas termoanalíticas geram como resultado uma curva de decomposição térmica que informa as etapas de degradação das amostras em função da temperatura. Por meio da análise desses dados, é possível estabelecer parâmetros de estabilidade térmica do óleo *in-natura* e do

biodiesel obtido. O biodiesel por ser uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, possui propriedades físicas análogas às obtidas dos ésteres puros (LIMA et al., 2007).

A Termogravimetria Derivada (DTG) é a derivada primeira da curva termogravimétrica, ou seja, a derivada da variação de massa em relação ao tempo ou temperatura. A curva DTG apresenta as informações de uma forma mais visualmente acessível, mostrando com mais clareza os pontos inicial e final do processo, sendo a área diretamente proporcional à variação de massa, levando à pronta determinação da temperatura do pico e indicando as temperaturas inicial e final do processo (FERNANDES, 2005).

A Figura 5.17 (a-b) mostra a curva de decomposição térmica do óleo de babaçu, do biodiesel obtido e do diesel mineral, sendo este último utilizado como parâmetro de comparação, e a derivada primeira da curva termogravimétrica do biodiesel.

Figura 5.17. Análise termogravimétrica (TG) do óleo de babaçu, do biodiesel purificado e do diesel mineral (a) e derivada da curva termogravimétrica (DTG) do biodiesel (b) de óleo de babaçu e etanol catalisado pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182.

Na Figura 5.17a é possível observar que o óleo de babaçu se mostrou estável termicamente até a temperatura de 200°C, demonstrando apenas a ocorrência de um evento térmico entre 200 – 321 °C, com perda de massa de 98% referente à decomposição térmica

de triglicerídeos. Com relação ao biodiesel, verifica-se que a temperatura inicial de decomposição deste foi bem menor em relação à temperatura inicial de decomposição do óleo de babaçu, confirmando assim a maior volatilidade do biodiesel, e certificando a qualidade da mistura dos ésteres etílicos como biocombustível. No entanto, a DTG (Figura 5.17b) mostra que ocorreram três eventos térmicos na amostra de biodiesel. O primeiro evento ocorreu na faixa de temperatura de 23–67°C com perda de massa de 2%, provavelmente pela presença de traços de etanol remanescentes da etapa de purificação. O segundo evento térmico ocorreu na faixa de 72–305°C, com perda de massa de 89% referente à decomposição dos ésteres etílicos e o terceiro na faixa de temperatura de 323–402°C. O terceiro evento indica a presença de óleo de babaçu não convertido, visto que a análise foi realizada em atmosfera inerte, o que descarta a possibilidade desse evento térmico estar relacionado à oxidação do material. Além disso, nota-se que o perfil de decomposição do biodiesel (Figura 5.17a) não é tão semelhante ao perfil de decomposição do diesel mineral, confirmando assim a não conversão completa do óleo de babaçu. Os resultados referentes aos eventos térmicos do óleo de babaçu, biodiesel e diesel mineral estão descritos na Tabela 5.14.

Tabela 5.14. Temperaturas de degradação térmica do óleo de babaçu, diesel mineral e biodiesel catalisado pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182.

Amostra	Faixa de temperatura (T°C)	Perda de massa (%)
Óleo de babaçu	200 – 321	98
	23 – 67	2
Biodiesel	72 – 305	89
	323 – 402	9
Diesel mineral	56 – 270	100

A literatura relata trabalhos semelhantes que utilizam diferentes técnicas no monitoramento das reações de transesterificação de diferentes óleos vegetais. Moura et al. (2010) avaliaram o rendimento de transesterificação metílica do óleo de babaçu através das técnicas de CG, RMN¹H e TGA e obtiveram resultados semelhantes entre as técnicas, com valores de conversão de 98,54% (CG), 98,32% (RMN¹H) e 91,37% (TGA) empregando catalisador heterogêneo químico. Rosset et al. (2011) ao realizarem a etanólise do óleo de

soja catalisado por lipase de *Candida antarctica* compararam o rendimento obtido por CG e RMN¹H e encontraram valores de 87% ao utilizarem RMN¹H e de 82,9% com CG.

Para determinar qualitativamente os componentes formados na etanólise do óleo de babaçu foi realizada a análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Por ser não destrutiva e não necessitar da realização de pré-tratamento na amostra, essa técnica vem sendo empregada na identificação dos grupos funcionais e bandas correspondentes às vibrações dos estiramentos e flexões nas amostras de biodiesel. A posição do grupo carbonila no FT-IR é sensível aos efeitos substituintes dos ésteres e à estrutura da molécula (BIANCHI et al., 1995). Os ésteres têm duas bandas de absorção fortes e características do grupo carbonila (C=O) por volta de 1750-1730 cm⁻¹ e para o grupo ν C-O (estiramento axial simétrico e não simétrico) em 1300-1000 cm⁻¹ (SOARES et al., 2008). As vibrações de estiramento do CH₃, CH₂ e CH aparecem em 2980-2950, 2950-2850 e 3050-3000 cm⁻¹, enquanto que as vibrações de flexão (ρCH₂) desses grupos aparecem em 1475-1350, 1350-1150 e 722 cm⁻¹, respectivamente (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

A Figura 5.18 mostra a espectroscopia no infravermelho do biodiesel obtido do óleo de babaçu.

Figura 5.18. Espectroscopia no infravermelho do biodiesel purificado de óleo de babaçu e etanol catalisado pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182.

A Figura 5.18 mostra a ocorrência de bandas de absorção características em 1750 cm⁻¹ correspondentes a deformação axial da carbonila (–C=O), em 1170 cm⁻¹ relacionado à

deformação axial da ligação éster (C–O–C) e em 722 cm^{-1} atribuído a sequência de cadeia alifática $-(\text{CH}_2)_n$. Este comportamento é similar ao reportado para amostras de biodiesel obtidas de diferentes matérias-primas lipídica (SOARES et al., 2011). A ausência da banda na região de $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ relacionada à deformação axial característica do grupo hidroxila (OH), sugere que o biodiesel tem baixo teor de água, o que pode ser confirmado por outras técnicas que incluem a termogravimetria (discutida anteriormente), e a análise pelo método de Karl Fischer, realizada neste trabalho.

5.9. Estabilidade operacional das células imobilizadas na síntese do biodiesel de óleo de babaçu

A estabilidade operacional das células íntegras imobilizadas foi avaliada de duas maneiras distintas: inicialmente empregando sistema descontínuo (batelada repetida) e posteriormente empregando sistema contínuo (reator de leito fixo), conforme a seguir relatado.

5.9.1. Sistema descontínuo

5.9.1.1. Tratamento do suporte e das células imobilizadas com agentes de ativação

A estabilidade operacional das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 foi avaliada em sistema descontínuo através da realização de bateladas consecutivas das reações de etanólise do óleo de babaçu. Para tanto, foram testadas duas estratégias: tratamento do suporte (espumas antes da imobilização) e tratamento das células íntegras (após imobilização) usando como agentes de tratamento glutaraldeído (GA) e polietilenoimina (PEI) ambos a 0,1% em tampão fosfato pH 7,0. Esses agentes foram selecionados em virtude dos diversos relatos da literatura a respeito do sucesso na utilização do GA (SUN et al., 2010) e PEI (KILONZO; MARGARITIS; BERGOUGNOU, 2011) como agentes de reticulação ou ligação em suportes de imobilização de biomassa microbiana.

O preparo das células íntegras de *M. circinelloides* 4182 foi realizado por meio da imobilização da biomassa fúngica em espumas de poliuretano durante 72h de cultivo. A Tabela 5.15 descreve o efeito do tratamento com GA e PEI no crescimento celular e na atividade hidrolítica da biomassa imobilizada, tomando como base de comparação os

valores obtidos para o cultivo e imobilização de células em espumas sem tratamento (Controle).

Tabela 5.14. Valores de biomassa imobilizada e atividade hidrolítica obtidos no cultivo e imobilização das células de *M. circinelloides* 4182 empregando tratamento com GA e PEI 0,1% nas espumas e nas células íntegras imobilizadas.

Tratamento	Agente	Biomassa imobilizada (g/L)	Células por espuma (mg/espuma)	Atividade hidrolítica (U/g)
Controle*	Ausente	26,9	27	64,82
Espumas	GA 0,1%	28,6	28	50,11
Espumas	PEI 0,1%	26,2	26	45,82
Biomassa	GA 0,1%	22,3	22	60,48
Biomassa	PEI 0,1%	25,3	25	60,00

* reação sem tratamento.

Os dados indicam que não houve diferença expressiva na biomassa imobilizada após o tratamento das espumas, sendo o carregamento de células por espumas de 27 mg/espuma no cultivo sem tratamento e de 26 e 28 mg/espuma nas espumas tratadas com GA e PEI, respectivamente. O valor mais baixo foi obtido pelas células tratadas com GA após a imobilização, com um carregamento de 22 mg/espuma.

Entretanto, com relação à atividade hidrolítica, verifica-se que o tratamento do suporte com GA ou PEI reduziu a atividade da biomassa imobilizada em relação ao controle. A atividade hidrolítica do controle de 64,82 U/g, foi reduzida para valores da ordem de 50,11 e 45,82 U/g para as biomassas imobilizadas nos suportes tratados com GA e PEI, respectivamente. Provavelmente, a utilização de suportes ativados produziu alteração no meio de cultivo influenciando negativamente o metabolismo das células. Por outro lado, o tratamento das biomassas imobilizadas aparentemente não afetou atividade hidrolítica dos biocatalisadores, com obtenção de valores semelhantes ao controle, da ordem de 60 U/g para ambos os agentes de tratamentos.

Para verificar a influência dos tratamentos efetuados no desempenho catalítico das células íntegras imobilizadas, os biocatalisadores foram submetidos às reações de etanólise do óleo de babaçu, em meio contendo terc-butanol como solvente. A concentração mássica de ésteres etílicos formados está ilustrada na Figura 5.18 (a-b).

Figura 5.18. Efeito do tratamento do suporte (espumas) e células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 com GA e PEI nas reações de etanolise do óleo de babaçu. (a) tratamento do suporte, (b) tratamento da biomassa imobilizada.

Verifica-se nas Figuras 5.18 (a-b) que o tratamento com solução 0,1% de GA e PEI não afetou o desempenho catalítico das células íntegras de *M. circinelloides* 4182, independente da estratégia usada. A reação controle catalisada pela biomassa imobilizada sem nenhum tipo de tratamento, forneceu uma concentração total em ésteres de etila de 73,6% em 120 h, correspondendo um rendimento de transesterificação de 90,60%. Nas demais reações, apesar do aumento de velocidade de reação observada, a formação máxima em ésteres de etila variou entre 68,6 a 73,4%.

Na Tabela 5.16 apresentam-se os dados obtidos com relação à viscosidade dos produtos transesterificados, bem como os valores de rendimentos de transesterificação.

Tabela 5.16. Valores de rendimento de transesterificação e viscosidade do produto purificado obtido na síntese enzimática do biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol mediado pela biomassa imobilizada de *M. circinelloides* 4182 tratada com agentes cross-linking (suporte tratado e biomassa tratada).

Tratamento	Rendimento (%)	Viscosidade (cSt)
Controle ^a	90,6	5,95
GA 0,1% espumas	86,7	5,61
PEI 0,1% espumas	90,3	5,98
GA 0,1% células	87,1	5,93
PEI 0,1% células	84,4	5,60

^a reação sem tratamento

Os dados descritos na Tabela 5.16 mostram que independente do tipo de tratamento aplicado, seja com solução de GA ou com solução de PEI, seja no suporte ou na biomassa imobilizada, os rendimentos máximos em ésteres etílicos foram muito semelhantes, indicando que não houve influência do tipo de tratamento na conversão do óleo de babaçu em seus respectivos ésteres etílicos. Os baixos valores de viscosidade também confirmam os satisfatórios rendimentos obtidos. Esse comportamento foi similar ao reportado por Sun et al (2010) que realizaram um estudo comparativo entre as células íntegras de *R. oryzae* tratadas com solução de 0,1 % de GA e com células íntegras não tratadas, e verificaram que não houve diferença significativa no desempenho catalítico das células tratadas e não tratadas na metanólise do óleo de soja.

A estabilidade operacional foi avaliada por meio da reutilização das biomassas imobilizadas de regime de batelada consecutiva (reciclos). Para tanto, após o término das reações, as biomassas imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 foram recuperadas e lavadas exaustivamente com hexano para retirada do meio reacional e produtos eventualmente retidos no suporte. Em seguida, as biomassas foram submetidas à etapa de secagem em bomba de alto vácuo, até teor de umidade final menor que 10%. Verificou-se que mesmo após os tratamentos realizados, boa parte das células do suporte se desprende, o que provocou uma redução em 50% da massa inicial de células imobilizada empregadas nas reações de transesterificação. Desta forma, para manter a proporção de 20% de biocatalisador em relação aos reagentes de partida, o volume de meio reacional foi também reduzido. A Figura 5.19 ilustra a comparação entre os rendimentos obtidos na primeira e segunda batelada de reações de etanólise do óleo de babaçu.

Figura 5.19. Rendimentos em ésteres etílicos obtidos pelas células íntegras imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 na síntese enzimática do biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol em bateladas consecutivas.

A observação da Figura 5.19 revela que os tratamentos com GA e PEI não aumentaram a estabilidade operacional das células íntegras imobilizadas de *M. circinelloides* 4182, tendo em vista o baixo rendimento obtido em todas as reações de transesterificação realizadas pela segunda batelada. O baixo rendimento pode ter sido consequência da redução da massa inicial de células imobilizadas, devido ao desprendimento de micélio do suporte ocorrido durante a primeira reação de transesterificação. Esses resultados são diferentes dos obtidos por Ban et al. (2002) que avaliaram a estabilidade operacional das células íntegras de *R. oryzae* na metanólise do óleo de soja e não encontraram diferença no rendimento em ésteres metílicos entre as células tratadas e não tratadas durante 11 ciclos consecutivos de reações. Além disso, não houve decréscimo na velocidade de reação durante os 11 ciclos consecutivos. No entanto, o valor máximo alcançado em ésteres etílicos foi menor que 30%, devido à inibição causada pelo excesso de metanol. Sun et al. (2010) realizaram o mesmo estudo e observaram que as células íntegras imobilizadas mantiveram elevada atividade catalítica mesmo após serem reutilizadas em 15 bateladas consecutivas.

Apesar dos baixos valores de rendimento alcançados na segunda batelada, ao comparar o rendimento obtido pela reação controle e reações catalisadas com biomassa tratada com GA, verifica-se um pequeno incremento no rendimento de transesterificação

em relação ao controle (8,6% para 34,6%), sugerindo que o tratamento com GA na biomassa imobilizada pode ter favorecido a retenção parcial de células.

5.9.1.2. Recuperação das células imobilizadas com *tert*-butanol

Apesar dos inúmeros relatos da literatura apontarem o Glutaraldeído como melhor agente de tratamento para manutenção da estabilidade operacional das células imobilizadas (SUN et al. 2010), a utilização deste reagente em solução, bem como a utilização de Polietilenoimina, não se mostrou eficiente na retenção da biomassa e da atividade catalítica do biocatalisador na reutilização em reações de batelada consecutivas. Desta forma, uma nova estratégia foi adotada, visando à perda mínima de atividade catalítica das células imobilizadas ao longo de sua reutilização.

A nova estratégia consistiu em utilizar as células imobilizadas na reação de etanólise do óleo de babaçu sem nenhum tipo de tratamento prévio e após o término da reação, recuperá-las utilizando *tert*-butanol ao invés de hexano. A etapa de recuperação foi realizada conforme descrito no item 4.2.6.1, e as atividades de hidrólise e transesterificação do biocatalisador reutilizado foram avaliadas ao final de cada batelada, sendo a primeira batelada utilizada como referência. A Figura 5.20 mostra ambas atividades residuais ao longo de cinco ciclos consecutivos.

Figura 5.20. Estabilidade operacional das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 na etanólise do óleo de babaçu. Símbolos: -○- atividade hidrolítica e -●- atividade de transesterificação.

A Figura 5.20 mostra que a estratégia de se recuperar a biomassa imobilizada com terc-butanol, promoveu melhor reaproveitamento do biocatalisador, visto que foi possível reutilizá-lo por cinco ciclos consecutivos sem perda expressiva de atividade hidrolítica e de transesterificação. Ao longo do tempo operacional, a cada 96h, observou-se um decréscimo esperado de ambas as atividades, sendo observada uma redução de 28% na atividade de transesterificação e de 45% na atividade hidrolítica das células imobilizadas.

É importante destacar que as reações em bateladas consecutivas estão sujeitas a muitas variáveis que podem afetar o desempenho do biocatalisador, principalmente pela perda de massa celular durante sua repetida utilização. Daí a importância de se utilizar um solvente adequado na recuperação do biocatalisador. Esse fato pode explicar a diferença entre as atividades de hidrólise e de transesterificação ao longo do tempo reacional. No caso da atividade hidrolítica, o carregamento inicial de células imobilizadas (25,00 mg/espuma) diminuiu consideravelmente para 4,80 mg/espuma após cinco ciclos repetidos, provavelmente devido à esfoliação celular causada pela vigorosa agitação em shaker, resultando em uma perda expressiva de células durante a recuperação do biocatalisador por filtração. Como resultado, a atividade hidrolítica inicial que era de $63,21 \pm 1,29$ U/g foi reduzida em 50%.

Com relação à atividade de transesterificação, a estratégia de manter constante a proporção de 20% do biocatalisador com relação ao meio reacional, diminuindo proporcionalmente o volume de substrato conforme a perda de biomassa celular durante a etapa de recuperação, tornou possível a avaliação da perda de atividade residual, causada provavelmente pela inibição do glicerol formado como subproduto da reação de transesterificação. A utilização do terc-butanol na etapa de recuperação das células imobilizadas contribuiu para a retirada de possível glicerol acumulado nas partículas, melhorando assim a transferência de massa do substrato novo para o interior das células. Como pode ser visto na Figura 5.20, essa estratégia foi bem sucedida e a atividade inicial de $81,96 \pm 2,74\%$ reduziu para um valor de $59,39 \pm 1,24\%$ após 5 reciclos.

Os dados experimentais mostrados na Figura 5.20 foram normalizados conforme a Equação 5.2 e ajustados para um modelo de desativação de primeira ordem.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-K_d * t} \quad \text{Equação 5.2}$$

onde K_d é o coeficiente de desativação, t é o tempo de reação, A_0 é a atividade de transesterificação na primeira batelada e A é a atividade de transesterificação no dado tempo (t).

O tempo de meia vida do biocatalisador ($t_{1/2}$) foi estimado pela equação 5.3, em que $t_{1/2}$ é o tempo de meia vida e K_d é o coeficiente de desativação.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{K_d} \quad \text{Equação 5.3}$$

Neste trabalho, um tempo de meia vida de 33,2 dias e um coeficiente de desativação de $0,0802 \text{ h}^{-1}$ foram estimados. Estes valores foram considerados satisfatórios se comparados aos valores reportados na literatura (BAN et al., 2002; TAMALAMPUDI et al., 2007), no entanto muitos desses estudos não têm o cuidado de manter a mesma proporção entre biocatalisador e meio reacional durante o uso de bateladas consecutivas. Neste caso, uma alternativa seria a utilização de reatores providos de cesta, o que evitaria a perda de biocatalisador ou o emprego de reatores de leito fixo operando em sistema contínuo, diminuindo assim o estresse físico causado pela agitação das células, evitando o seu desprendimento das partículas de poliuretano.

5.9.2. Sistema contínuo

No que se refere à estabilidade operacional das células imobilizadas, resultados satisfatórios foram alcançados com a substituição do hexano por terc-butanol na recuperação do biocatalisador após as reações em bateladas consecutivas. No entanto, devido a grande perda de biomassa existente nesse processo, julgou-se conveniente à adoção de uma nova alternativa que evitasse o desprendimento das células da matriz de poliuretano e possibilitasse a utilização do biocatalisador por longos períodos sem perda de atividade catalítica. A alternativa adotada foi a utilização de um reator de leito fixo operando em sistema contínuo, no qual o biocatalisador não estivesse sujeito aos danos físicos causados pela agitação mecânica.

Em virtude dos resultados ineficientes apresentados pelo agente Polietilenoimina no sistema descontínuo, optou-se por testar um novo agente de tratamento, o Aliquat 336, além do Glutaraldeído. Desta forma, após o preparo das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182, as mesmas foram tratadas com Glutaraldeído e Aliquat 336, ambos em solução 0,1% em tampão fosfato pH 7,0, conforme item 4.2.4. A Tabela 5.17 descreve o efeito do tratamento com GA e Aliquat 336 no crescimento celular e na atividade hidrolítica da biomassa imobilizada, tomando como base de comparação os valores obtidos para o cultivo e imobilização de células sem tratamento (Controle).

Tabela 5.17. Valores de biomassa imobilizada e atividade hidrolítica obtidos no cultivo e imobilização das células de *M. circinelloides* 4182 empregando tratamento com GA e Aliquat 0,1% nas células íntegras imobilizadas.

Tratamento	Agente	Biomassa imobilizada (g/L)	Células por espuma (mg/espuma)	Atividade hidrolítica (U/g)
Controle*	Ausente	29,5	26	65,70
Biomassa	GA 0,1%	29,7	26	63,21
Biomassa	Aliquat 0,1%	28,4	25	39,17

* reação sem tratamento.

Conforme dados da Tabela 5.17, as células imobilizadas obtiveram um carregamento médio de células por espumas de 26 mg/espuma, valor considerado dentro do esperado. Com relação à atividade hidrolítica, o tratamento das células imobilizadas com GA não afetou negativamente atividade hidrolítica do biocatalisador, com obtenção de valores similares ao controle, da ordem de 63,21 U/g. No entanto, o tratamento com Aliquat reduziu esse valor médio de 65,70 U/g para 39,17 U/g, indicando que neste caso, o tratamento causou inibição da lipase intracelular contida nas células imobilizadas.

As reações de etanólise do óleo de babaçu em meio contendo terc-butanol como solvente foram conduzidas em sistema contínuo, nas condições otimizadas no sistema descontínuo, tais como: razão molar óleo/etanol 1:6 e temperatura 35°C. O reator foi empacotado com 27g (biomassa seca) de células imobilizadas misturadas com meio reacional e alimentadas numa vazão de 0,013 mL/min, em fluxo ascendente, correspondendo a um tempo espacial de 5h. Uma reação controle, no qual as células imobilizadas não foram tratadas, foi realizada para efeito de comparação com as demais. A Figura 5.21 mostra o sistema experimental utilizado para a realização dos testes contínuos.

Figura 5.21. Esquema da reação de etanólise do óleo de babaçu realizada em reator de leito fixo operando em sistema contínuo.

O comportamento dinâmico da formação dos ésteres etílicos obtidos em cada sistema é mostrado na Figura 5.22.

Todos os reatores operaram em regime contínuo por um período de 14 dias a 35°C, com algumas oscilações inerentes a esse tipo de sistema. O reator que utilizou células imobilizadas sem tratamento foi o que apresentou maior estabilidade ao longo do tempo de reação, com pequena variação de concentração de ésteres etílicos nos primeiros 9 dias de reação, com valores oscilando entre 50,35 a 55,08 % m/m (Figura 5.22a). A partir deste ponto, observou-se uma queda de cerca de 22,7% com relação aos valores iniciais de concentração dos ésteres.

O emprego de células imobilizadas tratadas com GA (Figura 5.22b) não afetou de maneira significativa à estabilidade da reação e a formação de ésteres. Apesar de não ter sido constatado a mesma constância de valores obtidos para a reação controle, o tratamento com GA promoveu um ligeiro acréscimo na concentração dos ésteres etílicos, alcançando o valor máximo de 61,37% m/m.

Por outro lado, o tratamento com Aliquat desestabilizou de forma mais acentuada o desempenho do reator, como pode ser verificado na Figura 5.22c, com a ocorrência de oscilações significativas na concentração de ésteres nos primeiros 6 dias e nos últimos 4 dias de operação do reator, em que os valores obtidos variaram de 35,19 a 63,77% m/m.

Figura 5.22. Concentração total dos ésteres etílicos formados na etanólise do óleo de babaçu catalisado pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 (a) sem tratamento – reação controle, (b) tratadas com GA 0,1% e (c) tratadas com Aliquat 0,1%, todos operando em sistema contínuo por 14 dias.

A variação da concentração de ésteres, do rendimento correspondente, da produtividade e da viscosidade obtida de cada sistema está descrita na Tabela 5.18.

Tabela 5.18. Variação da concentração de ésteres etílicos, rendimento, produtividade e viscosidade dos sistemas reacionais contínuo empregando células imobilizadas tratadas com GA e Aliquat.

Sistema	Δ Concentração (% m/m)	Δ Rendimento (%)	Δ Produtividade (mg _{éster} /g _{meio} ·h)	Δ Viscosidade (cSt)
Controle*	36,88 – 55,08	45,39 – 67,79	15,37 – 22,95	10,81 – 9,09
GA 0,1%	45,47 – 61,37	55,97 – 75,53	18,94 – 25,57	10,31 – 8,39
Aliquat 0,1%	35,19 – 63,77	43,31 – 78,49	14,66 – 26,31	13,50 – 8,75

* reação sem tratamento.

Para estimar o tempo de meia-vida do biocatalisador, avaliando assim a sua estabilidade operacional, os resultados experimentais dos sistemas, mostrados na Figura 5.22 (a-c), foram ajustados de acordo com o modelo de desativação de primeira ordem para o cálculo da constante de desativação (k_d) e do tempo de meia-vida do biocatalisador, conforme as Equações 5.2 e 5.3 descritas no item 5.7.1.2. O ajuste dos dados obtidos está ilustrado na Figura 5.22 (a-c) e os resultados obtidos estão na Tabela 5.19.

Tabela 5.19. Parâmetros da estabilidade operacional das células imobilizadas de *M. crircinelloides* 4182 com e sem tratamento na etanolise do óleo de babaçu operando em sistema contínuo.

Sistema	Parâmetros de estabilidade do biocatalisador	
	k_d (dia ⁻¹) x10 ³	$t_{1/2}$ (dias)
Controle*	26,7	25,9
GA 0,1%	16,2	42,8
Aliquat 0,1%	33,8	20,5

* reação sem tratamento.

Dentre os sistemas testados, o tratamento das células imobilizadas com GA demonstrou ser o mais eficiente para manter a atividade catalítica do biocatalisador. O tempo de meia-vida do biocatalisador determinado nesse sistema foi da ordem de 42,8 dias, enquanto nos outros dois sistemas foram estimados tempos de meia-vida de 25,9 e 20,5 dias, respectivamente, para as reações Controle e células tratadas com Aliquat.

Figura 5.23. Ajuste do modelo de desativação das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 (a) sem tratamento – reação controle, (b) tratadas com GA 0,1% e (c) tratadas com Aliquat 0,1% na etanólise contínua do óleo de babaçu conduzida em reator de leito fixo a 35°C.

Para confirmar os dados descritos, as células imobilizadas recuperadas ao final da operação de 14 dias ininterruptos, foram tratadas com terc-butanol, conforme descrito no item 4.6.2.1, para remoção de substrato e produtos eventualmente retidos nas partículas da matriz e reutilizadas numa nova reação de etanólise em regime de batelada, avaliando a atividade transesterificação do biocatalisador. Os dados referentes à recuperação do biocatalisador estão descritos na Tabela 5.20.

Tabela 5.20. Resultados referentes à biomassa recuperada e atividades de transesterificação e hidrólise das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 com e sem tratamento após etanólise do óleo de babaçu em sistema contínuo.

Sistema	Biocatalisador recuperado (g)	Atividade de transesterificação (%)	Atividade hidrolítica (U/g)	Viscosidade (cSt)
Controle*	15,80	68,15	59,44	9,26
GA 0,1%	13,70	78,17	59,57	8,16
Aliquat 0,1%	16,78	70,50	47,83	9,56

Os resultados mostram que em todos os sistemas ocorreram perdas acentuadas de biomassa (Tabela 5.20). O sistema que utilizou GA como agente de tratamento foi o que apresentou maior perda de massa, cerca de 49,3% com relação à massa inicial de biocatalisador, e a menor redução foi obtida pelo sistema com Aliquat, da ordem de 37,9% de perda de massa. Valor intermediário foi obtido pela reação controle que teve 41,5% de sua biomassa reduzida. Embora ainda sejam elevados os valores de perda de biomassa, constata-se que a utilização de um sistema desprovido de agitação mecânica, neste caso o reator de leito fixo, diminuiu o desprendimento de células da matriz de poliuretano, visto que nas reações em batelada, a perda de massa após 5 ciclos consecutivos foi de aproximadamente 80%.

Em se tratando da atividade catalítica das células imobilizadas, o sistema contínuo promoveu uma ligeira redução no rendimento médio de transesterificação (Tabela 5.18) em relação ao sistema em bateladas. No entanto, no primeiro reciclo do sistema contínuo, o qual foi realizado com único intuito de medir a atividade de transesterificação, verificou-se que o biocatalisador sem tratamento e tratado com GA manteve valores semelhantes aos valores máximos obtidos durante os 14 dias de operação. Por outro lado, as células tratadas com Aliquat tiveram seu rendimento máximo ligeiramente reduzido. Assim como no

sistema descontínuo, a estratégia de manter constante a proporção de 20% de biocatalisador com relação ao meio reacional, diminuindo proporcionalmente o volume de substrato conforme a perda de biomassa celular durante a etapa de recuperação possibilitou a avaliação precisa da atividade residual das células imobilizadas.

O mesmo comportamento foi obtido com relação à atividade hidrolítica das células sem tratamento e tratadas com GA, que tiveram seus valores iniciais reduzidos em apenas 10%. Fato interessante foi observado nas células tratadas com Aliquat, que após a etapa de recuperação tiveram um aumento na atividade hidrolítica que inicialmente era de 39,17 U/g e passou a 47,83 U/g.

Pode-se concluir que o sistema contínuo conferiu maior estabilidade ao biocatalisador, visto que promoveu a manutenção das atividades hidrolítica e de transesterificação das células imobilizadas. Isso pode ser atribuído em parte ao empacotamento das células que ficaram protegidas dos danos causados pela agitação mecânica e pela utilização de terc-butanol no meio reacional, que ao estar fluindo constantemente pelo leito empacotado, foi retirando o glicerol formado da parede das células, facilitando a transferência de massa entre o substrato e a lipase retida nas células.

5.10. Desempenho das células imobilizadas na síntese de biodiesel a partir de diferentes óleos vegetais

Até o momento, todos os testes de investigação sobre a atuação catalítica das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 foram realizados na reação de transesterificação do óleo de babaçu e etanol, em meio contendo solvente. Definidas as melhores condições operacionais com o óleo de babaçu, o trabalho agora foi direcionado para o emprego das células imobilizadas como catalisador de diferentes matérias-primas lipídicas nas reações de etanólise. Para tanto, foram avaliados os óleos de palma, andiroba, macaúba e pinhão manso, em virtude da crescente utilização desses óleos na produção de biodiesel.

5.10.1. Composição química e propriedades das matérias-primas lipídicas

Os óleos vegetais e gorduras animais são constituídos de triacilgliceróis, sendo estes triésteres resultantes da ligação entre glicerol e ácidos graxos. Até o presente momento, o trabalho foi direcionado para o estudo do desempenho das células

imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 na reação de transesterificação do óleo de babaçu e etanol. Entretanto, o estudo de diferentes matérias-primas lipídicas para a produção de biodiesel é de grande relevância visto que a estrutura molecular dos ésteres alquílicos obtidos pela transesterificação depende das características estruturais dos ácidos graxos da matéria-prima precursora. Nesse contexto, foi também avaliado o desempenho das células imobilizadas na etanólise de diferentes óleos vegetais, com composição variada de ácidos graxos, tomando por base as condições otimizadas na etanólise do óleo de babaçu.

Inicialmente, foi determinada a composição em ácidos graxos dos diferentes óleos vegetais utilizados, inclusive do óleo de babaçu, cujos dados estão descritos na Tabela 5.21.

Tabela 5.21. Composição em ácidos graxos das matérias-primas lipídicas utilizadas na síntese de biodiesel catalisado pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182.

Ácido Graxo	Composição em ácidos graxos dos óleos vegetais (% m/m)				
	Andiroba	Babaçu	Macaúba	Palma	Pinhão Manso
C8:0 – octanóico	-	3,50	5,39	-	-
C10:0 – cáprico	-	4,50	3,96	-	-
C12:0 – láurico	0,05	44,70	36,09	0,10	0,02
C14:0 – mirístico	0,06	17,50	10,19	1,20	0,07
C16:0 – palmítico	29,01	9,70	8,65	46,80	12,90
C18:0 – esteárico	9,95	3,10	3,58	3,80	5,63
C18:1 – oleico	46,90	15,20	27,70	37,60	39,73
C18:2 – linoleico	10,74	1,80	3,39	10,50	40,00
C18:3 – linolênico	0,25	-	-	-	0,22
Outros	1,94	-	0,40	-	0,36

Verifica-se que os perfis de ácidos graxos das amostras indicam uma composição bem diversificada, o que permitiu avaliar a atuação das células imobilizadas em termos de seletividade de reação. Sabe-se que a estrutura molecular dos ésteres alquílicos varia segundo as características estruturais dos ácidos graxos dos óleos vegetais precursores do biodiesel, e que o tamanho e o número de insaturações da cadeia carbônica são fatores determinantes de algumas propriedades do biodiesel, o que explica a importância do conhecimento prévio das matérias-primas lipídicas utilizadas. Como exemplo, observa-se que a elevação do número de cetano, calor de combustão (medida de conteúdo energético)

e dos pontos de fusão e ebulição do combustível são reflexos do aumento do comprimento da cadeia carbônica dos ésteres. O aumento do número de insaturações ocasiona uma diminuição da estabilidade oxidativa, além de diminuir também os valores do calor de combustão, do número de cetano e dos pontos de fusão e ebulição. Por outro lado, uma cadeia mais insaturada eleva a fluidez (parâmetro relacionado com a viscosidade e a cristalização do combustível) (KNOTHE, 2005).

De acordo com a Tabela 5.21, o óleo de pinhão manso foi que apresentou a maior proporção de ácidos insaturados (80%) em relação aos outros óleos, enquanto o óleo de babaçu apresentou 83% em ácidos graxos saturados, em virtude da sua composição ser predominantemente láurica. Essa característica do óleo de babaçu facilita a reação de transesterificação, pois os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que interagem mais eficaz e efetivamente com o agente acilante e com o catalisador. A esse fato se deve a escolha do óleo de babaçu nos testes iniciais, os quais servirão de parâmetro para os testes subsequentes.

Desta forma, a determinação da composição em ácidos graxos das diversas matérias-primas permitiu verificar a influência das matérias-primas selecionadas na qualidade do biodiesel gerado. Algumas das características estruturais que influenciam as propriedades do biodiesel originado são: o comprimento da cadeia, o grau de insaturação e a presença de ramificações (KNOTHE, 2005).

Outro aspecto de fundamental importância na reação de transesterificação é a qualidade da matéria-prima lipídica utilizada, tendo em vista que venenos ou inibidores catalíticos podem reduzir o rendimento da reação. Diante disso, as amostras dos óleos vegetais utilizadas como matérias-primas na síntese do biodiesel foram caracterizadas quanto aos teores de interesse para controle de qualidade, incluindo índices de acidez, iodo, peróxido e saponificação. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 5.22.

Tabela 5.22. Propriedades das matérias-primas lipídicas utilizadas na síntese de biodiesel catalisado pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182.

Óleos vegetais	Índice de acidez (mg KOH/g)	Índice de peróxido (mEq/ kg)	Índice de iodo (g I ₂ /100g)	Índice de saponificação (mgKOH/g)	Viscosidade Cinemática (cSt)
Babaçu	0,65	1,82	25	238	29,52
Andiroba	0,09	1,70	69	200	38,72
Macaúba	16,11	3,96	28	223	29,80
Palma	0,33	2,05	98	198	36,80
Pinhão Manso	0,30	4,23	101	141	34,53

Os índices de acidez e peróxido indicam a deterioração do material lipídico em termos de rancidez hidrolítica (pelo índice de acidez) a partir da concentração de ácidos graxos livres e rancidez oxidativa (pelo índice de peróxido). O índice de saponificação é útil para verificar a massa molecular média e a possível adulteração por outros óleos com índices de saponificação muito diferentes. O índice de iodo revela o grau de insaturação da matéria-prima.

Os valores determinados para o índice de acidez variaram de 0,09 a 16,11 mg KOH/g, sendo o valor mais elevado observado para o óleo de macaúba (16,11 mg KOH/g), provavelmente devido às condições inadequadas de manuseio das sementes de macaúba, incluindo colheita, refrigeração, armazenamento e ou técnicas de extração dos óleos das sementes (artesanal e industrial). Tais condições podem favorecer a degradação oxidativa e a hidrólise dos triglicerídeos contidos nos óleos, alterando de forma significativa as características físico-químicas dos mesmos.

O índice de Iodo das matérias-primas lipídicas variou entre 25 a 101 gI₂/100g, satisfazendo uma importante característica para ser usado como matéria-prima para obtenção de biocombustível. Estudos efetuados por Knothe (2002) mostraram que valores superiores a 115g I₂/100g, indicam uma menor estabilidade oxidativa dos óleos, que prejudica sua aplicação industrial.

O índice de peróxido dos óleos vegetais variou de 1,70 a 4,23 meq g/kg, atendendo ao limite estabelecido pela legislação para óleos comestíveis, no qual o máximo permitido é da ordem de 10 meq g/kg. Entretanto, para utilização como matéria-prima em reações enzimáticas o valor máximo recomendado é da ordem de 5 meq/kg, o que demonstra que todos os óleos vegetais foram considerados aptos a serem utilizados na síntese de biodiesel. Valores de peróxido superiores a 5 meq/kg foram designados como inibidores da atividade enzimática, visto que a polimerização das lipases ocorre devido à presença de

hidroperóxidos, os quais levam a desativação da lipase. No entanto, outros estudos revelaram que produtos da oxidação secundária levaram a efeitos mais acentuados que os produtos da oxidação primária, no que diz respeito a estabilidade das enzimas (IBRAHIM et al., 2007).

Realizada a caracterização das matérias-primas lipídicas, as mesmas foram empregadas na síntese de biodiesel, a fim de avaliar o desempenho das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182.

5.10.2. Performance das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 na etanólise de diferentes óleos vegetais

As células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 foram empregadas na síntese de biodiesel utilizando diferentes óleos vegetais, em meio contendo terc-butanol como solvente. Uma nova reação empregando o óleo de babaçu foi realizada e utilizada como parâmetro para as demais reações. A atividade média hidrolítica das células imobilizadas foi de $60,3 \pm 2,3$ U/g e o carregamento médio de célula imobilizada por unidade de espuma foi de $25 \pm 0,34$ mg. Para evitar reversibilidade, o teor de água do biocatalisador foi mantido em 4%. As reações foram conduzidas utilizando as mesmas condições reacionais otimizadas para a etanólise do óleo de babaçu (razão molar óleo/etanol 1:6 a 35°C), empregando massa fixa de 20% de biocatalisador com relação à massa de meio reacional. O perfil de ésteres etílicos obtidos em cada reação está ilustrado na Figura 5.24.

As células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 se mostraram eficientes na etanólise dos diferentes óleos vegetais, sob as condições operacionais testadas. As concentrações em ésteres etílicos variaram de 54,16 a 73,63% m/m, correspondendo a rendimentos de 66,09 a 90,62%. Conforme o esperado, houve uma correlação entre os ésteres etílicos formados e os principais ácidos graxos presentes na composição de cada óleo vegetal.

Figura 5.24. Perfil de formação dos monoésteres de etila (-■-C8; -□-C10, -●-C12, -○-C14, -▼-C16, -△-C18, -▼-C18:1, -▽-C18:2) em função do tempo na etanolise dos óleos de (a) babau, (b) andiroba, (c) macaúba, (d) palma, (e) pinhão manso catalisada pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182. O valor total em ésteres de etila está indicado por uma linha cheia.

Devido à semelhança na composição em ácidos graxos do óleo de babaçu e o óleo de macaúba, os principais ésteres etílicos formados em ambas matérias-primas foram o laurato de etila (C12) e o oleato de etila (C18:1). Por conta disso, era de se esperar que as condições reacionais otimizadas para a etanólise do óleo de babaçu promovessem rendimentos semelhantes para a etanólise do óleo de macaúba, entretanto observou-se que o óleo de babaçu apresentou rendimentos superiores, da ordem de 90,62%, em relação ao óleo de macaúba, que obteve rendimento de 77,38%. Provavelmente, a elevada acidez presente no óleo de macaúba pode ter provocado a inibição da atividade lipolítica das células imobilizadas, interferindo negativamente na produção de ésteres.

O menor rendimento foi obtido na etanólise do óleo de pinhão manso, que forneceu valores de apenas 66,09%. Isso pode estar relacionado com sua composição predominantemente formada por ácidos graxos insaturados (80%), que não foi favorecida pelas condições reacionais otimizadas para o óleo de babaçu, que possui apenas 17% de insaturação em sua composição. Em virtude de sua composição, os principais ésteres produzidos a partir do óleo de pinhão manso foram o oleato de etila (C18:1) e linoleato de etila (C18:2).

Os demais óleos, palma e andiroba, apresentaram rendimentos similares de 71,13 e 73,85%, tendo como principais ésteres formados o palmitato de etila (C16) e o oleato de etila (C18:1), visto que esses óleos apresentam em sua composição valores acima de 75% desses ácidos graxos.

Os rendimentos obtidos em cada reação, bem como os valores de viscosidade e densidade dos seus respectivos produtos purificados, estão descritos na Tabela 5.23.

Tabela 5.23. Valores de rendimento de transesterificação, viscosidade e densidade dos produtos obtidos da etanólise dos diferentes óleos vegetais catalisado pelas células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182.

Óleos utilizados	Rendimento (%)	Viscosidade (cSt)	Densidade (g/cm ³)
Babaçu	90,62	5,95	0,8881
Andiroba	71,13	7,21	sólido*
Macaúba	77,38	7,67	sólido*
Palma	73,85	7,87	sólido*
Pinhão manso	66,09	7,28	sólido*

* o produto solidificou a 15°C

Os valores de viscosidade confirmaram os rendimentos obtidos em cada sistema reacional. No entanto, não foi possível a realização da densidade dos produtos obtidos, visto que solidificaram a temperatura de 15°C. Provavelmente, isso ocorreu devido à presença de quantidade significativa de óleo não convertido nas amostras, favorecendo a solidificação do produto quando a temperatura foi rebaixada.

A utilização de diferentes óleos vegetais tem sido estudada por diferentes autores na produção de biodiesel catalisado por células íntegras imobilizadas. Tamalampudi et al. (2007) avaliaram o desempenho das células íntegras imobilizadas de *R. oryzae* na metanólise do óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) e alcançaram rendimento de 80% em 60 h de reação. Xiao, Mathew e Obbard (2010) otimizaram a metanólise do óleo de palma catalisado por células íntegras imobilizadas de *A. niger* e obtiveram rendimento de 87% empregando uma temperatura de 40°C por um período de 72h de reação.

No presente trabalho, os dados obtidos são promissores e revelam o potencial catalítico das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 na produção de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas lipídicas.

6. CONCLUSÕES

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de células íntegras de fungos filamentosos imobilizadas com elevada atividade lipolítica como biocatalisadores em reações de transesterificação de óleos vegetais e etanol, visando à obtenção do biodiesel. Os resultados obtidos foram altamente satisfatórios e nesse conjunto de dados pôde-se concluir que:

1. Dentre as sete linhagens de fungos filamentosos adquiridas do banco de cultura verificou-se que cinco demonstraram ser boas produtoras de lipase intracelular, por fornecerem valores significativos de crescimento e atividade lipolítica na biomassa;
2. Dentre os três suportes de imobilização testados, a matriz de poliuretano revelou ser o suporte mais promissor para imobilização das células íntegras, em função de sua satisfatória aderência as células e retenção elevada da atividade hidrolítica;
3. Os testes iniciais de etanólise do óleo de babaçu utilizando terc-butanol como solvente, forneceram resultados promissores ao se utilizar as linhagens *R. oryzae* 3231 e 4692 e *M. circinelloides* 4182 imobilizadas em espumas de poliuretano de 6 mm, com rendimentos de transesterificação que variaram de 53,35 a 83,22%. A cepa de *M. circinelloides* 4182 destacou-se por fornecer o valor máximo de rendimento, ao contrário da cepa de *M. circinelloides* 4140, que foi ineficiente na produção dos ésteres etílicos, apresentando um rendimento de apenas 16,18%.
4. A avaliação das condições de cultivo e imobilização da biomassa de *M. circinelloides* indicou que as melhores condições para um aumento na atividade catalítica foram: 30 g/L de azeite de oliva como fonte de carbono, 70 g/L de peptona de soja como fonte de nitrogênio, inóculo de 10^6 esporos/mL e fermentação submersa em frasco de Erlenmeyer de 250 mL. Nestas condições foram obtidas células imobilizadas com atividade hidrolítica média de 66,46 U/g de suporte e 32,37 g/L de biomassa imobilizada;

5. A determinação das condições reacionais da etanólise do óleo de babaçu, demonstrou que o emprego de 20% m/m de biocatalisador no meio reacional e a utilização de terc-butanol puro como solvente da reação promoveram rendimentos satisfatórios de transesterificação. O delineamento experimental pela metodologia de superfície de resposta, indicou que a razão molar 1:6 óleo/etanol e temperatura de 35°C forneceram condições ótimas de reação, atingindo rendimentos máximos de 90,5%.
6. A caracterização do biodiesel purificado empregando diferentes técnicas de análise espectroscópicas, tais como RMN¹H, TGA e FT-IR foram ferramentas eficientes na determinação da conversão do óleo de babaçu em ésteres etílicos, sendo obtido um rendimento médio de transesterificação de $90,8 \pm 2,02\%$.
7. Os testes de estabilidade operacional empregando o sistema de bateladas consecutivas revelaram perdas de biomassa e de atividade catalítica das células imobilizadas, mesmo após a utilização dos agentes de tratamento GA e PEI no suporte ou no derivado imobilizado. A estratégia de substituição do hexano por terc-butanol na etapa de recuperação do biocatalisador foi eficiente para reduzir a perda de atividade hidrolítica e de transesterificação ao longo de cinco ciclos consecutivos (tempo de meia-vida de 33,2 dias), entretanto não reduziu a dessorção das células do suporte.
8. A adoção do sistema contínuo por meio da utilização de reator de leito fixo promoveu maior estabilidade operacional às células imobilizadas. O sistema que utilizou células imobilizadas tratadas com GA forneceu rendimento máximo de 75,53% ao longo de 14 dias de operação, revelando um tempo de meia-vida do biocatalisador de 42,8 dias.
9. O desempenho das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 apresentou resultados promissores nas reações de etanólises de diferentes óleos vegetais, com rendimentos que variaram de 66,09 a 77,38%. Esses resultados indicam que sob condições reacionais adequadas para cada óleo, as células imobilizadas são capazes de produzir biodiesel a partir de diferentes matérias-primas lipídicas.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- Otimizar as condições reacionais de síntese de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas lipídicas em sistema contínuo, empregando as células íntegras imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 em reator de leito fixo.
- Testar outras configurações de suporte no processo de cultivo e imobilização da cepa de *M. circinelloides* 4182, para aplicação em reações de hidrólise e esterificação.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.; HIOL, A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 968-975, 2002.
- ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1347-1361, 2004.
- ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U. T.; BEDNARSKI, W. The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 808–813, 2009.
- AKHTAR, M. W.; MIRZA, A. Q.; CHUGHTAI, M. I. D. Lipase induction in *Mucor hiemalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, p. 257-263, 1980.
- AKOH, C. C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8995-9005, 2007.
- ALBIERO, D.; MACIEL, A. J. S.; LOPES, A. C.; MELLO, C. A.; GAMERO, C. A. Proposta de uma máquina para colheita mecanizada de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) para a agricultura familiar. **Acta Amazônica**, v. 37, p. 337-346, 2007.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/>> Acesso em: 03 jan. 2012.
- ANTCZAK, M. S.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; BIELECKI, S. Catalytic properties of membrane-bound *Mucor* lipase immobilized in a hydrophilic carrier. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 261–268, 2002.
- ANTCZAK, M. S.; ANTCZAK, T.; RZYSKA, M.; MODRZEJEWSKA, Z.; PATURA, J.; KALINOWSKA, H.; BIELECKI, S. Stabilization of an intracellular *Mucor circinelloides* lipase for application in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 29, p. 163-171, 2004.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Review: Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.
- AOCS. **American Oil Chemists' Society Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th Ed. AOCS Press. (2004).
- BALAT, M. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production – A review of current work. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 479–1492, 2011.
- BALAT, M.; BALAT, H. A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. **Energy Conversion and Management**, v. 49, p. 2727-2741, 2008.

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

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

BARON, A. M.; SARQUIS, M. I. M.; BAIGORÍ, M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. A comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 34, p. 35-32, 2005.

BERGMAIER, D.; CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, C. Growth and exopolysaccharide production during free and immobilized cell chemostat culture of *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 272-284, 2005.

BIANCHI, G.; HOWARTH, O. W.; SAMEUL, C. J.; VLAHOV, G. Long range γ -inductive interactions through saturated C–C bonds in polymethylene chains. **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 2**, p. 1427-1432, 1995.

BIODIESELBR. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>> Acesso em: 05 jan. 2010.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F.; Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127–161, 1998.

BURKET, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores Imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ano 9, 2006, p. 48-57.

CARASCHI, J. C.; RAMOS, U. M.; LEÃO, A. L. Compósitos biodegradáveis de polihidroxibutirato (PHB) reforçado com farinha de madeira: propriedades e degradação. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 6, p. 1609-1614, 2002.

CARDENAS, F.; CASTRO, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: Catalytic activity in reactions in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 145-154, 2001.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Academic Press, 1997, 460p.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA, G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 239-247, 2000.

CHAHINIAN, H.; VANOT, G.; IBRIK, A.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium*: purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 215-222, 2000.

CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, C.; SODINI-GALLOT, I. Immobilized cell technologies for the dairy industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 109-134, 1994.

CHEN, J. P.; MCGILL, S. D. Enzymatic hydrolysis of triglycerides by *Rhizopus delemar* immobilized on biomass support particles. **Food Biotechnology**, v. 6, p. 1-18, 1992.

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

CHEN, J-P.; WANG, J-B. Wax ester synthesis by lipase-catalyzed esterification with fungal cells immobilized on cellulose biomass support particles. **Enzyme and Microbial Technology**, v.20, p. 615-622, 1997.

COONEY, C. L. Growth of microorganisms. In: REHM H. J.; REED, G., **Microbial Fundamentals**. Weinheim: Verlag Chemie, 1981. v. 1, p. 73-112.

COSTA, A. C. A.; PEREIRA Jr., N.; ARANDA, D. A. G. The situation of biofuels in Brazil: New generation Technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 3041-3049, 2010.

COSTA, V.E.U.; AMORIM, H.L. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863-864, 1999.

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

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, p. 776-792, 2009.

DALSENTER, F.D.H.; VICCINI, G.; BARGA, M.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of growth in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 801-807, 2005.

DAVRANOV, K.; KUILIBAEV, I. Characteristics of the molecular forms of lipases synthesized by the fungus *Rhizopus microsporus*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 29, p. 788-790, 1993.

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

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

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

DEEPAK, V.; ILANGO VAN, S.; SAMPATHKUMAR, M. V.; VICTORIA, M. J.; PASHA, S. P. B. S.; PANDIAN, S. B. R. K.; GURUNATHAN, S. Medium optimization and immobilization of purified fibrinolytic URAK from *Bacillus cereus* NK1 on PHB nanoparticles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, p. 297-304, 2010.

DERMIBAS, A. Progress and recent trends in biodiesel fuels. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 14-34, 2009.

DEVANESAN, M. G.; VIRUTHAGIRI, T.; SUGUMAR, N. Transesterification of *Jatropha* oil using immobilised *Pseudomonas fluorescens*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2497-2501, 2007.

DEVI, S.; SRIDHAR, P. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 225-231, 2000.

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

DÍAZ, E.; FERNÁNDEZ, A.; PRIETO, M. A.; GARCÍA, J. L. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 523-569, 2001.

DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, S.; ROUSSOS, J.; CORDOVA, A.; ABOUSALHAM.; CARRIÉRE, F.; BARATTI, J. Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1042-1050, 2006.

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

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; TALEB, A. T.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 525-528, 2004.

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

FENG, K-C.; ROU, T-M.; LIU, B-L.; TZENG, Y-M.; CHANG, Y-N. Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 22-25, 2003.

FENICE, M.; FEDERICI, F.; SELBMANN, L.; PETRUCCIOLI, M. Repeated-batch production of pigments by immobilized *Monascus purpureus*. **Journal of Biotechnology**, v. 80, p. 271-276, 2000.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. 131 f. Dissertação (Doutorado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FERNANDES, V.J. **Curso de análise térmica (TG, DSC, DTA e TMA)**. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2005.

FERNANDEZ-LAHORE, H. M.; AUDAY, R. M.; FRAILE, E. R.; BONINO, M. B. J.; PIRPIGNANI, L.; MACHALINSKI, C.; CASCONE, O.; Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. **The Journal of Peptide Research**, v. 53, p. 599-605, 1999.

FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 75, p. 569-576, 2000.

FLOOD, M. T.; KONDO, M. Safety evaluation of lipase produced from *Rhizopus oryzae*: Summary of toxicological data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 293-304, 2003.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 335-345, 1998.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 81, p.48-56, 2000.

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

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

GANESAN, D.; THANGAVELU, V.; RAJENDRAN, A. Statistical optimisation of methanolysis of jatropha oil using immobilised *R. oryzae* cells in n-hexane system. **International Journal of Environmental Studies**, v. 68, n. 1, p. 31-42, 2011.

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. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 8, p. 367–394, 2009.

GARBAYO, I.; VILCHEZ, C.; NAVA-SAUCEDO, J. E.; BARBOTIN, J. N. Nitrogen, carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 629-634, 2003.

GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2006.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 335-363, 2004.

GOPINATH, S. C. B.; HILDA, A.; PRIYA, T. L.; ANNADURAI, G.; ANBU, P. Purification of lipase from *Geotrichum candidum*: conditions optimized for enzyme production using Box–Behnken design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 7, p. 681-689, 2003.

GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, S. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 459-464, 1999.

HAAS, M. J.; CICHOWICZ, D. J.; BAILEY, D. G. Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. **Lipids**, v. 27, p. 571-576, 1992.

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

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

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

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

HEMACHANDER, C.; BOSE, N.; PUVANAKRISHNAN, R. Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 629-633, 2001.

HIOL, A.; JONZO, M. D.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 1-2, p. 80-87, 1999.

HORST, M. T.; URBIN, S.; BURTON, R.; MCMILLAN, C. Using proton nuclear magnetic resonance as a rapid response research tool for methyl ester characterization in biodiesel. **Lipid Technology**, v. 21, n. 2, p. 39-41, 2009.

HUANG, J. C.; SHETTY, A. S.; WANG, M. S. Biodegradable plastics: A review. **Advances in Polymer Technology**, v. 10, p. 23-30, 1990.

IBRAHIM, N. A.; NIELSEN, S. T.; WIGNEWARAN, V.; ZHANG, H.; XU, X. Online pre-purification for the continuous enzymatic interestification of bulk fats containing omega-3 oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 85, p. 95-98, 2007.

IFTIKHAR, T.; MUBASHIR, N.; AFZAL, M.; HAQ, I.; RAJOKA, M. I. Maximization of intracellular lipase production in a lipase-overproducing mutant derivative of *Rhizopus oligosporus* DGM 31: a kinetic study. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, p. 402-412, 2008.

JAEGER, K.E.; RANASK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JAMAI, L.; SENDIDE, K.; ETTAYEBI, K.; ERRACHIDI, F.; HAMDOUNI-ALAMI, O.; TAHRI-JOUTI, M. A.; MCDERMOTT, T.; ETTAYEBI, M. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 2, p. 375-379, 2001.

JIN G.; BIERMA, T. J.; HAMAKER, C. G.; MUCHA, R.; SCHOLA, V.; STEWART, J.; WADE, C. Use of a whole-cell biocatalyst to produce biodiesel in a water-containing system. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 44, p. 21-28, 2009.

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

JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome in leader or the cart before the horse. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 8, p. 633-658, 2004.

KAMINISHI, Y.; TANIE, H.; KUNIMOTO, M. Purification and characterization of lipases from *Aspergillus repens* and *Eurotium herbariorum* NU-2 used in "Katsuobushi" molding. **Fisheries Science**, v. 65, p. 274-278, 1999.

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

KERMASHA, S.; SAFARI, M.; BISAKOWSKI, B. Characterization of purified lipase fractions from *Rhizopus niveus*. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 46, p. 4451-4456, 1998.

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

KIM, C.J.; CHANG, Y.K.; CHUN, G.T.; JEONG, Y.H.; LEE, S.J. Continuous culture of immobilized *Streptomyces* cells for kasugamycin production. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 453-461, 2001.

KIM, C.J.; CHANG, Y.K.; CHUN, G.T.; JEONG, Y.H.; LEE, S.J. Physiological characteristics of immobilized *Streptomyces* cells in continuous cultures at different dilution rates. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 557-562, 2002.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. 1a ed., São Paulo: Edgard Blucher, 2006.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structures of fatty acid alkyl esters. **Fuels Processing Technology**, v. 86, p.1059-1070, 2005.

KNOTHE, G. Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 79, p. 847-854, 2002.

KRIEGER, N. **Produção, Purificação e Caracterização de Lipases de *Penicillium citrinum***. 1995. 260 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.M.; LIMA, V.M.G.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p.279-286, 2004.

KRISHNAN, A. S.; LALITHA, R. G. A.; MISRA, A. M. C.; KARANTH, N. G. Physiological and morphological changes in immobilized *L. Plantarum ncim 2084* cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. **Food Biotechnology**, v. 15, p. 193-202, 2001.

KUNDU, M.; BASU, J.; GUCHHAIT, M.; CHAKRABARTI, P. Isolation and characterization of an extracellular lipase from the conidia of *neurospora-crassa*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 149-153, 1987.

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

LI, L.; DU, W.; LIU, D.; WANG, L.; LI, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 58-62, 2006.

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

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

LI, W.; DU, W.; LIU, D. *Rhizopus oryzae* whole-cell-catalyzed biodiesel production from oleic acid in tert-butanol medium. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 155-158, 2008a.

LI, W.; DU, W.; LIU, D.; YAO, Y. Study on factors influencing stability of whole cell during biodiesel production in solvent-free and tert-butanol system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 111–115, 2008b.

LIN L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. **Applied Energy**, v. 88, p. 1020–1031, 2011.

LIMA, J. R. O.; SILVA, R. B.; SILVA, C. C. M.; SANTOS, L. S. S.; SANTOS Jr., J. R.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R. Biodiesel de babaçu obtido por via etanólica. **Química Nova**, v. 30, p. 600-603, 2007.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C.; FILLIPPIS, I.; FONTANA, J.D. Kinetic characterization and stability in aqueous media and in organic solvents of a crude lipase preparation obtained from *Penicillium aurantiogriseum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 65-71, 2004.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M.I.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p 105-110, 2003.

LIN, S. F.; LEE, J. C.; CHIOU, C. M. Purification and characterization of a lipase from *Neurospora* sp TT-241. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, n. 6, p. 739-745, 1996.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 17, p. 115-119, 1997.

MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, J.M.K.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAIA, M. M.; MORAIS, M. M. C.; MORAIS Jr., M. A.; MELO, E. H. M.; LIMA, F. J. L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 304-309, 1999.

MALÇA J.; FREIRE, F. Life-cycle studies of biodiesel in Europe: A review addressing the variability of results and modeling issues. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 338–351, 2011.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 1300–1311, 2007.

MASE, T.; MATSUMIYA, E.; MATSUURA, A. Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 lipase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p. 329–330, 1995.

MASIERO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira de Políticas Internacionais**, v. 51, p. 60–79, 2008.

MAYORDOMO, I.; RANDEZ-GIL, F.; PRIETOISOLATION, J. A. Purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 105–109, 2000.

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

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VÉLEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; CASTRO, H. F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.01.020.

MINNING, S.; SCHMIDT-DANNERT, C.; SCHMID, R.D. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 147–156, 1998.

MOE, W. M.; IRVINE, R. L. Polyurethane foam based biofilter media for toluene removal. **Water Science and Technology**, v. 43, p. 35–42, 2001.

MONTEIRO, M. R.; AMBROZINI, A. R. P.; LIÃO, L. M.; FERREIRA, A. G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta**, v. 77, p. 593–605, 2008.

MOREIRA, M. T.; PALMA, C.; FEIJOO, O.; LEMA, J. M. Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 27–39, 1998.

NAGAO, T.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Expression of lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: high-level production and purification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, p. 488–492, 1996.

NORTON, S.; WATSON, K.; D'AMORE, T. Ethanol tolerance of immobilized brewers' yeast cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 18-24, 1995.

PAIVA, E. J. M. **Estudo da produção de biodiesel a partir de óleo de babaçu e etanol utilizando a transesterificação alcalina tradicional com agitação mecânica e assistida por ultrassons**. 2010. 173 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

PAPAGIANNI M, MOO-YOUNG M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1271–1278, 2002.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189–259, 2004.

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. **Microbial Cell Factories**, v. 5, n. 3, 2006.

PARASCANDOLA, P.; BRANDUARDI, P.; ALTERIIS, E. D. PVA-gel (Lentikats®) as an effective matrix for yeast strain immobilization aimed at heterologous protein production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 184-189, 2006.

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

PETRE, M.; ZARNEA, G.; ADRIAN, P.; GHEORGHIU, E. Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 27, p. 309-332, 1999.

PHILLIPS, A.; PRETORIUS, G. H. J.; Purification and characterization of an extracellular lipase of *Galactomyces geotrichum*. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 833-838, 1991.

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

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. In: **Fungi and food spoilage**. 3rd ed. New York: Springer, 2009. p. 145-263.

PRAKASH, R.; AULAKH, S. S. Transesterification of used edible and non-edible oils to alkyl esters by *Aspergillus sp.* as a whole cell catalyst. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, p. 607-613, 2011.

QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; COSTA NETO, P. R.; TORRES, E. A.; CASTRO, M. P.; JESUS, C. A. C.; Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. **Química Nova**, v. 32, p. 793-808, 2009.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M. Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 31, p. 28-37, 2003.

RAPP, P. Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 832-838, 1995.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 237-250, 2009.

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

RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J.C.; NUNGARY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2264-2269, 2006.

ROMERO, C. M.; BAIGORI, M. D.; PERA, L. M. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 861-866, 2007.

ROSSET, I. G.; TAVARES, M. C. H.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ¹H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, p. 136-142, 2011.

RUIZ, B.; FARRÉS, A.; LANGLEY, E.; MASSO, F.; SÁNCHEZ, S. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*. **Lipids**, v. 36, p. 283-289, 2001.

SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. L-Glutaminase as a Therapeutic Enzyme of Microbial Origin. In: BARREDO, J. L. **Methods in Biotechnology: Microbial Enzymes and Biotransformations**. Totowa: Humana Press Inc., 2005, v. 17, p. 75-90.

SABUQUILLO, P.; REINA, J.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Interfacial affinity chromatography of lipases: Separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1388, p. 337-348, 1998.

SAIKI, T.; TAKAGI, Y.; SUZUKI, T.; NARASAKI, T.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Studies on lipoprotein lipases of microorganisms: Purification and general properties of lipoprotein lipase produced by *Mucor javanicus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 414, 1969.

SAMSON, R. A.; HEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. S.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**, 4th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn Delft, 1995.

SANT'ANNA Jr., G. L. Produção de Enzimas Microbianas. In: BORZANI, W.; SCHIMIDEL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Eds.) **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Ed. Edgar Blücher, 2001. p. 351-362.

SAXENA, R. K.; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; W. S. DAVIDSON, BRADDOO, S.; GULATI, R.; Microbial lipases, potential biocatalysts for the future industry, **Current Science**, v. 77, p. 101–115, 1999.

SAXENA, R.K., SHEORAN, A., GIRI, B., DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiology Methods**, v. 52, p.1-18, 2003.

SERP, D.; CANTANA, E.; HEINZEN, C.; VONSTOCKAR, U.; MARISON, I. W. Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, n. 1, p. 41-53, 2000.

SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. **Fuel**, v. 87, p. 2355-2373, 2008.

SHIMADA, Y.; KOGA, C.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TAKADA, N.T.; TSUMASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 349-352, 1993.

SILVA, I. R. B. ; XAVIER, C. H. ; OLIVEIRA, M. T. B. ; MEDEIROS, M. F. ; SOUSA, E. M. B. D.; SANTOS, E.M.B.D.; PEDRINI, M. R. S. Produção de biocatalisadores utilizando bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) como suporte para biomassa produtora de lipase e óleo de mamona como fonte de carbono. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BODIESEL, 1., 2006, Brasília. **Anais...** p. 204-208.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X. **Spectrometric identification of organic compounds**, 6th ed. Wiley, New York, 1998.

SLOKOSKA, L.; ANGELOVA, M.; PASHOVA, S.; PETRICHEVA, E.; KONSTANTINOV, C. Production of acid proteinase by *Humicola lutea* 120-5 immobilized in mixed photo-cross-linked polyvinyl alcohol and calcium-alginate beads. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 73-76, 1999.

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

SOARES, I. P.; REZENDE, T. F.; SILVA, R. C.; CASTRO, E. V. R.; FORTES, I. C. P. Multivariate calibration by variable selection for blends of raw soybean oil / biodiesel from different sources using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) spectra data. **Energy Fuels**, v. 22, p. 2079–2083, 2008.

SOARES, I. P.; REZENDE, T. F.; PEREIRA, R. C. C. ; SANTOS, C. G.; FORTES, I. C. P. Determination of biodiesel adulteration with raw vegetable oil from ATR-FTIR data using chemometric tools. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 7, 1229-1235, 2011.

SOARES, M. S. **Síntese e caracterização de espuma de poliuretanos para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel**. 2012. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

SONNTAG, N. O. V. Structure and composition of fats and oils. In: _____ **Bailey's industrial oil and fat products**. 4th ed. New York: John Wiley and Sons. 1979. v. 1, p. 1-343.

SOUZA, G. P.; FILGUEIRA, M.; ROSENTHAL, R.; HOLANDA, J. N. F. Caracterização de material compósito diatomáceo natural. **Cerâmica**, v. 49, p. 40-43, 2003.

SRIDEVI, V.; SRIDHAR, P. Effect of support materials on cephamycin C production by immobilized *Streptomyces clavuligerus*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, p. 274-279, 1999.

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

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, p. 768-775, 2009.

SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TAKADA, N.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. *Penicillium abeanum* lipase: Purification, characterization, and its use for docosahexaenoic acid enrichment of tuna oil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 5, p. 498-501, 1996.

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

SUN, T.; DU, W.; ZENG, J.; DAI, L.; LIU, D. Exploring the effects of oil inducer on whole cell-mediated methanolysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 514-518, 2009.

SZTAJER, H.; LÜNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMIDT, R. Purification and some properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1124, p. 253-261, 1992.

TAMALANPUDI, S.; TALUKDER, M. R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study

of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 185-189, 2008.

TAN, K. T.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R.; BHATIA, S. Palm oil: Addressing issues and towards sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p. 420-427, 2009.

TAPINGKAE, W.; PARKIN, K. L.; TANASUPAWAT, S.; KRUEENATE, J.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Whole cell immobilisation of *Natrinema gari* BCC 24369 for histamine degradation. **Food Chemistry**, v. 120, p. 842-849, 2010.

TENG, Y., XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3900–3907, 2008.

TENG, Y.; XU, Y.; WANG, D. Changes in morphology of *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation and their effect on production of mycelium-bound lipase, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 3, p. 1615-7591, 2009.

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

TOIDA, J.; KONDOH, K.; FUKUZAWA, M.; OHNISHI, K.; SEKIGUCHI, J.; Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 7, p. 1199-1203, 1995.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**, 2006. Porto Alegre: Artmed.

URIESTE, D.; CASTRO, M. B. A.; BIAGGIO, F. C.; de CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v. 31, p. 407-412, 2008.

UVARANI, G.; JAGANATHAN, L.; SHRIDAS, P.; BOOPATHY. Purification and characterization of lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 57, p. 607-610, 1998.

WALSH, P. K.; MALONE, D. M. Cell growth patterns in immobilization matrices. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 1, p. 13-43, 1995.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 30–37, 2008.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

WEST, T. P.; STROHFUS, B. Polysaccharide production by immobilized *Aureobasidium pullulans* cells in batch bioreactors. **Microbiological Research**, v. 156, n. 3, p. 285-288, 2001.

WOOLEY, P.; PETERSON, S. B. Lipases their structure production. **Biochemistry and Application**, Cambridge University Press, 1994. Cap. 12.

WUBBOLTS, M.G.; BUCKE, C.; BIELEKI, S. How to get the biocatalyst. In: STRAATHOF, A.J.J.; ADLERCREUTZ, P. **Applied Biocatalysis**. 2nd ed. Amsterdam: Academic Publishers, Cap. 5, p. 153-211, 2000.

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

YANG, H.; REICHL, U.; KING, R.; GILLES, E. D. Measurement and simulation of the morphological development of filamentous microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 1, p. 44-48, 1992.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2095–2103, 2005.

YASUDA, M.; OGINO, H.; KIGUCHI, T.; KOTANI, T.; TAKAKURA, S.; ISHIBASHI, T.; NAKASHIMA, T.; FUKUDA, H.; ISHIKAWA, H. Purification and characterization of lipase from *Rhizopus chinensis* cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p. 571-573, 1999.

ZENG, J.; DU, W.; LIU, X.; LIU, D.; LINGMEI, D. Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 15–18, 2006.

ZINDARSIC, P.; PAVKO, A. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, p. 237-252, 2001.