UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ANA LETÍCIA DE LIMA RICO

Produção enzimática de biodiesel etílico em reator de leito fixo e regime de
fluxo contínuo utilizando células íntegras de *Mucor circinelloides*
imobilizadas em espuma de poliuretano

Lorena - SP

2015

ANA LETÍCIA DE LIMA RICO

**Produção enzimática de biodiesel etílico em reator de leito fixo e regime de
fluxo contínuo utilizando células íntegras de *Mucor circinelloides*
imobilizadas em espuma de poliuretano**

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira

Versão reimpressa e corrigida

Lorena- SP

Janeiro, 2015

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

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

Rico, Ana Letícia de Lima

Produção enzimática de biodiesel etílico em reator de leito fixo e regime de fluxo contínuo utilizando células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano / Ana Letícia de Lima Rico; orientador Pedro Carlos de Oliveira - ed. reimp., corr. - Lorena, 2015.
97 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientador: Pedro Carlos de Oliveira

1. Células íntegras. 2. Imobilização. 3. Biodiesel etílico. 4. Lipase. 5. Poliuretano. I. Título. II. Oliveira, Pedro Carlos de, orient.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por iluminarem o meu caminho, dando forças nas horas difíceis, renovando a minha fé a cada dia.

Aos meus pais Paulo e Maria Lúcia por contribuírem na minha formação, me ensinando valores importantes para a vida, me incentivando e também participando ativamente dos meus estudos, sendo peças-chaves para a conclusão do meu mestrado através do apoio financeiro e das inúmeras idas aos sábados, domingos e feriados à universidade.

Ao prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira pela orientação e oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço a amizade, a confiança, os conselhos, o incentivo e a paciência.

À prof. Dr. Heizir Ferreira de Castro por ter me recebido no seu laboratório e participar do desenvolvimento do meu trabalho, sempre me orientando em prol do meu desenvolvimento pessoal e profissional. Agradeço toda a paciência e todos os conselhos recebidos.

Às professoras Larissa e Patrícia, à doutoranda Ana Karine e aos ex-alunos do laboratório Weriton e Willian por todo conhecimento compartilhado que foi utilizado diretamente no desenvolvimento da minha dissertação.

Aos alunos de iniciação científica Bruna e Guilherme que participaram do trabalho experimental.

À Evonik por terem me recebido e ajudado no desenvolvimento das espumas de poliuretano que foram utilizadas como suporte neste trabalho.

Ao meu amigo Guilherme Alves que esteve presente durante todo meu trabalho de mestrado, sobretudo por me acompanhar a muitos finais de semana e feriados no laboratório durante meus experimentos contínuos.

A todos os professores da EEL-USP que participaram de forma direta ou indireta para a concretização deste trabalho.

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

RESUMO

RICO, A. L. L. R. **Produção enzimática de biodiesel etílico em reator de leito fixo e regime de fluxo contínuo utilizando células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano.** 2014. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

O biodiesel, que possui grande potencial para substituição do diesel tradicional na matriz energética, é amplamente estudado pela rota enzimática, cujo biocatalisador pode ser usado de duas formas principais: extra e intracelular. A forma intracelular é considerada mais vantajosa por evitar processos complexos de isolamento, purificação e imobilização, diminuindo o custo efetivo das enzimas. O custo enzimático também pode ser reduzido pela imobilização em suporte adequado. Com base neste contexto, este trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar espumas de poliuretano utilizando diferentes formulações e verificar a influência das variáveis temperatura, pH, tempo de cultivo e quantidade mássica de suporte no crescimento de biomassa microbiana *in situ* de *Mucor circinelloides* URM 4182 nas espumas de poliuretano sintetizadas, visando a aplicação em processo não contínuo e contínuo de produção de biodiesel etílico a partir do óleo de babaçu. Definidas as melhores condições de cultivo, o trabalho teve como foco a otimização dos parâmetros de produção em sistema contínuo e reator de leito fixo: tempo espacial e razão molar óleo:álcool. Na primeira etapa de trabalho, a biomassa imobilizada em pH 5,5 a 35 °C em 96 h e com 100 cubos de suporte EPU3 foi a que apresentou resultados de conversão mais elevados no sistema não contínuo (98%). Esta condição foi utilizada para definir os parâmetros da produção de biodiesel em reator de leito fixo e regime de fluxo contínuo. Inicialmente utilizou-se um reator com 44 mm de diâmetro e 56 mm de altura. Com este reator o melhor resultado em termos de rendimento foi da ordem de $64 \pm 1,66$ % obtido com um tempo espacial de 86 h e razão molar óleo:álcool de 1:6 com 120 cubos de biomassa imobilizada. Outras geometrias de suporte foram analisadas, mas o formato cúbico foi o mais estável, mantendo o rendimento durante o período analisado, apresentando uma perda de biomassa de 2% e produtividade de $5,68 \pm 0,15$ mg éster g⁻¹ meio h⁻¹. Visando aumentar o rendimento e a produtividade do sistema contínuo, utilizou-se uma segunda configuração de reator com 30 mm de diâmetro e 420 mm de altura. Utilizando os parâmetros já definidos e a nova configuração de reator, obteve-se um rendimento médio de $86 \pm 3,53$ % a partir do primeiro tempo espacial. A reação foi conduzida por um período máximo de 30 dias. O resultado apresentado em termos de produtividade foi de $7,57 \pm 0,31$ mg éster g⁻¹ meio h⁻¹ e a perda da biomassa de $44,55 \pm 2,40$ %. Os resultados de rendimento e produtividade apresentados pelo reator de razão diâmetro:altura de 1:14 foram superiores aos do primeiro reator utilizado que possuía essa razão de 1:1,3. Todavia, grande perda de biomassa foi observada. De forma geral, os resultados encontrados foram promissores para a utilização das células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano EPU3 para produção de biodiesel em reator de leito fixo operando em fluxo contínuo. Alguns ajustes ainda são necessários, como reduzir a vazão de alimentação inicial para estabilização do leito, visando uma menor perda de biomassa para obtenção de resultados ainda mais relevantes.

Palavras-chave: Células íntegras, Imobilização, Biodiesel etílico, Lipase, Poliuretano.

ABSTRACT

RICO, A. L. L. R. **Enzymatic production of ethyl biodiesel in a packed-bed continuous flow reactor using *Mucor circinelloides* whole-cell immobilized in polyurethane foam as biocatalyst.** 2014. 97 p. Dissertation (Master in Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

Biodiesel has a great potential to replace traditional diesel in the energy matrix and has been widely studied by enzymatic route, whose biocatalyst can be used in two main forms: extra and intracellular. The intracellular is considered more advantageous to avoid complex processes of isolation, purification and immobilization, reducing the effective cost of the enzymes which can also be reduced by immobilization of such biocatalysts on suitable matrix. This study aimed the synthesis and characterization of polyurethane foams with different recipes and to verify the influence of the variables temperature, pH, cultivation time and mass amount of support in the growth *in situ* of *Mucor circinelloides* URM 4182 microbial biomass in the synthesized polyurethane foams, for application in non-continuous and continuous production process of ethyl biodiesel from babassu oil. After the best growing conditions were defined, the focuses of this work changed to the optimization of the parameters of continuous production system in a fixed bed reactor: space time and molar ratio oil: alcohol. In the first stage of the work, the biomass immobilization in 100 cubes of support EPU3 at pH 5.5 and 35 °C in a period of 96h showed the highest conversion results in non-continuous system (98%). This condition was used to define the parameters of biodiesel production in a continuous flow fixed bed reactor. Initially, a 45 mm diameter and 55 mm height reactor was used. The best yield result with this reactor was approximately $64 \pm 1.66\%$ with a space-time of 86 h and the molar ratio oil: alcohol of 1:6 with 120 cubes of immobilized biomass. Different geometries of support were also analyzed, but the cuboid was the most stable, maintaining stable during the period analyzed, with a loss of 2% of biomass and productivity of 5.68 ± 0.15 mg ester. g^{-1} medium. h^{-1} . In order to increase the yield and productivity in the continuous system, we used a second configuration of reactor: 30 mm in diameter and 420 mm height. It was obtained an average yield of $86 \pm 3.53\%$ from the first residence time using the parameters defined and the new configuration of the reactor. The reaction was carried for a period of 30 days. The productivity of was 7.57 ± 0.31 mg ester g^{-1} medium. h^{-1} and the biomass loss $44.55 \pm 2.40\%$. The yield and productivity results presented with the second reactor, which diameter:height ratio was 1:14 was higher than that used in the first reactor which the diameter:height ratio was 1:1.3. However, great loss of biomass was observed. Overall, the results were promising for the use of whole cells of *Mucor circinelloides* immobilized in polyurethane foam EPU3 for biodiesel production in fixed bed reactor operating in continuous flow. Some adjustments are still needed, as the reduction the initial flow feed to stabilize the bed, in order to decrease biomass loss.

Key-words: Whole cells, Immobilization, Ethyl biodiesel, Lipase, Polyurethane.

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 2.1. Produção de óleo de várias culturas de plantas oleaginosas.	23
Tabela 2.2. Vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização de enzimas.	29
Tabela 4.1. Reagentes utilizados na preparação das EPU's estudadas neste trabalho.	37
Tabela 4.2. Composição do óleo de babaçu (Mundo dos Óleos).	38
Tabela 4.3. Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.	39
Tabela 4.4. Formulações propostas pela EVONIK®.	40
Tabela 4.5. Parâmetros de solubilidade dos solventes.	45
Tabela 4.6. Condições operacionais para determinação dos ésteres de etila por CG.	54
Tabela 5.1. Formulação das espumas de poliuretano denominadas EPU3 e EPU9.	57
Tabela 5.2. Resultados das análise de permeabilidade ao ar.	57
Tabela 5.3. Dados referentes aos ensaios de grau de inchamento das espumas EPU3, EPU9 e Comercial.	62
Tabela 5.4. Valores dos Coeficientes de Intumescimento no Clorofórmio (Q) e Parâmetro de Solubilidade (δ) das espumas.	62
Tabela 5.5. Atividade ($U\ g^{-1}$) das biomassas imobilizadas em diferentes condições de pH e Temperatura ($^{\circ}C$), rendimento (%) de transesterificação, viscosidade (cSt) e densidade ($kg.m^{-3}$) dos produtos.	68
Tabela 5.6. Dimensões (mm), áreas superficiais (mm^2) e volume (mm^3) das unidades de espuma de poliuretano utilizadas como suporte para imobilização das células íntegras de <i>M. circinelloides</i>	70
Tabela 5.7. Biomassa Imobilizada (g) e Atividade ($U\ g^{-1}$) das células íntegras de <i>M. circinelloides</i> imobilizadas em EPU3 e EPU9 (cultivo em pH 5,5, temperatura de $35^{\circ}C$, 96h e 100 unidades de suporte para os formatos cúbico e paralelepípedo e 50 unidades para o formato cilíndrico. Rendimento (%) e características (viscosidade e densidade) dos produtos das etanolises do óleo de babaçu e biomassa recuperada (%).	71
Tabela 5.8. Propriedades do biodiesel de babaçu obtido em reator de leito fixo operando em regime de fluxo contínuo com configuração geométrica 1:14 diâmetro:altura, com tempo espacial de 86h e razão molar óleo:álcool 1:6.	78

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 2.1. Esquema da reação de transesterificação de triglicerídeo e álcool.....	23
Figura 2.2. Esquema do ciclo de crescimento de fungo. Fonte: ROSCHE <i>et al.</i> , 2009.	25
Figura 4.1. Calibragem da micrografia no programa <i>ImageJ</i>	42
Figura 4.2. Sequência de tratamento das micrografias das espumas realizado pelo software <i>ImageJ</i> para o levantamento do diâmetro de poros.	43
Figura 4.3. Modelo padrão de gráfico de Parâmetro de Solubilidade (δ_1) vs Coeficiente de Inchamento (Q) com a linha de tendência gaussiana traçada.	45
Figura 4.4. Esquema simplificado do reator de leito fixo tipo 1 utilizado neste projeto.	50
Figura 4.5. Esquema simplificado do reator de leito fixo tipo 2 utilizado neste projeto.	51
Figura 5.1. Microscopia eletrônica de varredura das espumas sintetizadas a) EPU3 b) EPU9 e c) Comercial.....	58
Figura 5.2. Histograma dos Diâmetros médios de Poros das espumas a) EPU3 b) EPU9 e c) Comercial.....	59
Figura 5.3. Gráficos do Coeficiente de Inchamento (Q) vs Parâmetro de Solubilidade (δ) a) EPU3, b) EPU9 e c) Comercial.....	61
Figura 5.4. Esquema da estabilidade de uma lipase quando ligada a um suporte hidrofóbico. Fonte: Adaptado de GARCIA-GALAN <i>et al.</i> , 2013.....	63
Figura 5.5. Gráfico de massa absorvida de solvente / massa espuma.	64
Figura 5.6. Representação da estrutura química da espuma de poliuretano (Fonte: VILAR, 2002).	65
Figura 5.7. Estruturas das aminas constituintes da Tegoamin ® BDE e Tegoamin ® 33.....	65
Figura 5.8. Gráficos de sorção de água pela espuma EPU3.	66
Figura 5.9. Gráficos de sorção de água pela espuma EPU9.	66
Figura 5.10. Gráficos de sorção de água pela espuma Comercial.	66
Figura 5.11. a) Biomassa Imobilizada (g) e b) Atividade ($U\ g^{-1}$) em relação ao tempo (h) (imobilização na EPU3 em pH 5,5 e temperatura de 35°C).....	69
Figura 5.12. a) Biomassa Imobilizada (g) e b) Atividade ($U\ g^{-1}$) em relação a quantidade de suporte (un.) (EPU3, pH 5,5, temperatura de 35°C e 96h de reação).	69
Figura 5.13. Rendimentos de transesterificação em função do tempo de reação.	71

Figura 5.14. Rendimentos de transesterificação (%) em função do tempo (h) com diferentes tempos espaciais (17, 35 e 86h) e razões molares óleo:álcool de a) 1:6, b) 1:4, c) 1:8 e d) 1:12.....	73
Figura 5.15. a) Gráfico dos rendimentos de transesterificação (%) em função do tempo espacial (h) e razões molares óleo:álcool de 1:4, 1:6, 1:8 e 1:2. b) Histograma da biomassa recuperada (%) em função das razões molares (óleo:álcool).....	74
Figura 5.16. Gráfico dos rendimentos de transesterificação (%) em função do tempo espacial (h) de reação: a) 50 unidades de suporte no formato cilíndrico e b) 100 unidades de suporte paralelepípedo com tempo espacial de 86h e razão molar óleo:álcool de 1:6.	75
Figura 5.17. Gráfico dos rendimentos médios de transesterificação (%) e histograma da biomassa recuperada (%) em função do formato do EPU utilizada como suporte para a biomassa.....	76
Figura 5.18. Rendimentos de transesterificação (%) em função do tempo (h) para biodiesel de babaçu produzido em reator de leito fixo operando em regime de fluxo contínuo com configuração geométrica 1:14 diâmetro:altura, com tempo espacial de 86h e razão molar óleo:álcool 1:6.....	77
Figura 5.19. Ajuste do modelo de desativação das células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 na etanólise contínua do óleo de babaçu conduzida em reator de leito fixo (configuração geométrica 1:14 diâmetro:altura) em regime de fluxo contínuo com tempo espacial de 86h e razão molar óleo:álcool de 1:6.....	79

LISTA DE SIGLAS

BSP - Biomass Suport Particles

BSTR - Batch Stirred Tank Reactor

CG - Cromatografia Gasosa

k_d - Constante de desativação

EPU - Espuma de poliuretano

EtOH - Etanol

HPLC - High-performance liquid chromatography

MEV - Microscopia Eletronica de Varredura

PBR - Packed Bed Reactor

EPU3 - Nome dado a uma espuma de poliuretano sintetizada na EVONIK®

EPU9 - Nome dado a uma espuma de poliuretano sintetizada na EVONIK®

t_{1/2} - Tempo de meia vida

TAG - Triglicerídeos

TDI - Tolueno diisocianato

URM - University of Recife Mycology

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Biodiesel.....	21
2.2. Matérias-primas empregadas na produção de biodiesel	21
2.2.1. Agente acilante.....	21
2.2.2. Matérias-primas lipídicas	22
2.3. Produção de biodiesel por transesterificação	23
2.3.1. Transesterificação química e enzimática	24
2.4. Lipases como catalisadores para a produção de biodiesel	24
2.4.1. Fungos filamentosos produtores de lipases.....	25
2.4.1.1. Mucor circinelloides	26
2.4.2. Interferência de fatores extrínsecos da produção de células microbianas na atividade catalítica e formação de biomassa fúngica.....	26
2.4.2.1. Temperatura	27
2.4.2.2. pH.....	27
2.4.2.3. Tempo de Cultivo	27
2.4.3. Lipases Imobilizadas.....	28
2.4.3.1. Principais métodos de imobilização.....	28
2.4.4. Suportes para imobilização de células visando à produção de biodiesel.....	30
2.4.4.1. Espumas de poliuretano	30
2.4.5. Interferência do suporte de poliuretano na atividade catalítica e formação de biomassa fúngica.....	31
2.4.5.1. Características do Suporte.....	31
2.4.5.2. Quantidade Mássica de Suporte	32
2.5. Biorreatores com biomassa imobilizada	32
2.5.1. Razão molar do substrato	32
2.5.2. Solventes orgânicos	33
2.5.3. Configuração do reator.....	33
2.5.3.1. Reator de fluxo descontínuo de tanque agitado (BSTR)	33
2.5.3.2. Reator de leito fixo e fluxo contínuo (PBR)	34
2.5.3.3. Configuração geométrica do reator de leito fixo e fluxo contínuo (PBR)	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo Geral.....	35

3.2. Objetivos Específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Materiais	37
4.1.1. Reagentes de síntese das EPU's	37
4.1.2. Biocatalisador	37
4.1.3. Síntese de Biodiesel	38
4.1.4. Outros Reagentes	38
4.1.5. Equipamentos	38
4.2. Metodologia	39
4.2.1. Suporte	39
4.2.1.1. Síntese de espuma de poliuretano	40
4.2.1.2. Cálculo do diâmetro médio de poros	41
4.2.1.3. Permeabilidade ao ar	44
4.2.1.4. Densidade aparente das EPU's	44
4.2.1.5. Grau de inchamento das EPU's e parâmetro de solubilidade	44
4.2.1.6. Sorção de água e solventes	46
4.2.1.7. Absorção dos solventes pela matriz	46
4.2.2. Biocatalisador	46
4.2.2.1. Preparo do meio de cultura	46
4.2.2.2. Preparo das células íntegras imobilizadas	47
4.2.2.3. Influência das variáveis temperatura e pH no crescimento de biomassa microbiana e seleção do suporte	47
4.2.2.4. Efeito do tempo de cultivo na quantidade de biomassa celular imobilizada	47
4.2.2.5. Influência da massa de suporte na imobilização da biomassa celular	48
4.2.2.6. Variação da Geometria do Suporte	48
4.2.2.7. Cálculo da Densidade cristalina da biomassa imobilizada	48
4.2.3. Síntese do Biodiesel	49
4.2.3.1. Processo em regime de fluxo descontínuo	49
4.2.3.2. Processo em regime de fluxo contínuo em reator de leito fixo – tipo 1	49
4.2.3.3. Processo em regime de fluxo contínuo em reator de leito fixo – tipo 2	51
4.3. Metodologia Analítica	52
4.3.1. Determinação da atividade hidrolítica	52
4.3.2. Análise de umidade	53
4.3.3. Separação dos produtos formados na síntese de biodiesel	53

4.3.4. Análise da viscosidade	53
4.3.5. Determinação da densidade	53
4.3.6. Determinação dos ésteres de etila	53
4.3.7. Determinação dos mono e diacilgliceróis	55
4.3.8. Determinação do tempo de meia vida.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1. Síntese e Caracterização das Espumas de Poliuretano	57
5.1.1. Permeabilidade do ar	57
5.1.2. Microscopias Eletrônicas de Varredura	58
5.1.3. Diâmetro Médio de Poros	59
5.1.4. Grau de Inchamento e Parâmetro de Solubilidade.....	60
5.1.5. Adsorção dos Solventes pela Matriz.....	63
5.1.6. Sorção da Água e Solventes.....	64
5.2. Otimização das condições de cultivo do <i>Mucor circinelloides</i>	67
5.2.1. Influência das variáveis temperatura e pH no crescimento da biomassa microbiana e seleção do suporte	67
5.2.2. Efeito do tempo de cultivo na quantidade de biomassa celular imobilizada	69
5.2.3. Influência da massa de suporte na imobilização da biomassa celular	69
5.2.4. Variação da Geometria do Suporte	70
5.3. Sistema Contínuo	72
5.3.1. Otimização da Vazão e Razão Molar.....	72
5.3.2. Variação da Geometria do Suporte	75
5.3.3. Variação da Configuração do Reator	76
6. CONCLUSÕES	81
7. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	83
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE A	93
APÊNDICE B	95
APÊNDICE C	97

1. INTRODUÇÃO

O esgotamento das reservas e o constante aumento do preço dos combustíveis fósseis, associados com a degradação do meio ambiente, consistem em um grande problema para a humanidade. Mantendo-se a demanda atual, estima-se que as reservas de óleo e gás se esgotarão dentro de 41 e 63 anos respectivamente (BISEN *et al.*, 2010; SHAHID; JAMAL, 2012; HWANG *et al.*, 2014). Além disso, os produtos a base de petróleo são uma das principais causas antropogênicas de emissão de dióxido de carbono (CO₂) para a atmosfera (BALAT; BALAT, 2010).

Dentre as emissões de CO₂ provenientes da atividade humana encontra-se o setor de transportes, responsável por um quinto das emissões globais do gás, o que representa cerca de 60% do consumo mundial de petróleo. Segundo projeções, em 2050 esses números serão ainda maiores, uma vez que o número de carros e caminhões leves nas estradas deverá ultrapassar o dobro dos 806 milhões de 2007 atingindo cerca de 2 bilhões, causando mudanças drásticas no clima, afetando a estabilidade dos ecossistemas e as reservas de petróleo. Dessa forma, pesquisas científicas voltadas para a descoberta de novas fontes de energia ganharam foco, sobretudo para o desenvolvimento de combustíveis alternativos (BALAT; BALAT, 2010).

Nesse contexto, se destacam os bicomcombustíveis por serem ambientalmente favoráveis se comparados aos derivados de petróleo notadamente em relação às propriedades de combustão, biodegradabilidade, toxicidade e emissão de gases poluentes (PARAWIRA, 2009). Nos últimos anos, muitos estudos tem investigado a viabilidade econômica e o impactos ambiental dos bicomcombustíveis, especialmente do bioetanol, biogás, biodiesel e biohidrogênio (BALAT, 2011).

O biodiesel é produzido industrialmente através da transesterificação de óleos vegetais pela rota química (alcoólise) usando catalisadores homogêneos (ácidos ou básicos) que promovem a clivagem das moléculas de triglicerídeos gerando uma mistura de ácidos graxos e glicerol. Apesar do elevado rendimento obtido por esta via, este processo apresenta desvantagens e limitações: o catalisador utilizado tem que ser separado do produto, é necessário o tratamento das águas residuais e os ácidos graxos livres bem como a água, interferem na reação. Para superar estes inconvenientes, tentativas vem sendo propostas para desenvolver um processo enzimático utilizando lipase (extra ou intracelular) como biocatalisador. Uma vantagem considerável oferecida por esse método é a eliminação de parte dos processos de separação do produto formado. Entretanto, muitas

aplicações dessas lipases ainda encontram entraves provocados pela baixa produtividade do processo biocatalítico (baixo rendimento do produto – biodiesel) e pelo alto custo de produção do biocatalisador, consequência da necessidade de procedimentos complexos para a purificação das enzimas (BAN *et al.*, 2002, YOSHIDA *et al.*, 2012).

Portanto, o uso direto de células íntegras contendo lipases intracelulares, desperta interesse pela sua potencial utilização na biotecnologia devido a processos simples de produção e imobilização celular, pois as células íntegras são imobilizadas em decorrência do seu crescimento natural (YOSHIDA *et al.*, 2012). Resultados promissores com o uso de células íntegras estão sendo obtidos pelo Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena – USP utilizando espumas de poliuretano (EPUs) na imobilização da biomassa de *Mucor circinelloides* 4182 empregando como matéria-prima óleo de babaçu e etanol (ANDRADE *et al.*, 2012; SOARES, 2012).

Embora o foco destes trabalhos tenha sido a utilização de reatores operando em regime de fluxo descontínuo para produção em pequena escala, na prática, os processos que envolvem enzimas e células imobilizadas são preferivelmente operados em regime contínuo. Tal regime apresenta vantagens técnicas e econômicas, como controle automático, facilidade de operação e controle de qualidade do produto, alta eficiência e baixo custo. Reatores de leito fixo proporcionam ainda uma grande área superficial para a reação e não têm a desvantagem das elevadas tensões de cisalhamento devido à agitação mecânica (HALIM *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011; DORS *et al.*, 2012).

A partir do exposto, o presente trabalho objetivou selecionar uma EPU com características semelhantes às utilizadas nos trabalhos já desenvolvidos no Laboratório de Biocatálise, para ser utilizada como BSP (*Biomass Support Particles*) na imobilização de células íntegras de *Mucor circinelloides*. Adicionalmente foram determinadas as melhores condições de cultivo em termos de pH e temperatura bem como o tempo de cultivo e massa de suporte para a imobilização da biomassa. Após a imobilização na matriz de poliuretano (EPU) a biomassa microbiana foi utilizada como biocatalisador na produção de biodiesel etílico utilizando óleo de babaçu, em reatores de leito fixo operando em fluxo descontínuo e contínuo. Na etapa de produção de biodiesel por sistema contínuo, o foco principal do trabalho restringiu-se à melhoria das condições desse sistema operacional: tempo espacial e razão molar óleo:álcool. Buscou-se ainda avaliar uma segunda configuração de reator, variando a razão geométrica diâmetro:altura, utilizando as condições ótimas pré-definidas na etapa anterior.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na revisão bibliográfica serão abordados tópicos importantes para a compreensão da proposta deste trabalho. Serão descritos a importância mundial do biodiesel, a produção de biodiesel por transesterificação e a importância da escolha da matéria prima e do agente acilante. Em seguida, será demonstrada a importância do uso dos biocatalisadores enzimáticos imobilizados com enfoque principal no uso das células íntegras de fungos com elevada atividade lipolítica. A revisão enfoca ainda a importância na escolha do tipo de suporte para imobilização e finaliza abordando os tipos de processos e reatores mais utilizados para produção de biodiesel.

2.1. Biodiesel

Biodiesel é o nome dado a misturas de ésteres metílicos e/ou etílicos de ácidos graxos (dezenas de espécies diferentes) obtidos através da transesterificação de triglicerídeos (TAGs) contidos em plantas oleaginosas.

Uma das grandes vantagens do biodiesel é a capacidade de ser utilizado em motores de ciclo diesel sem necessidade de adaptações como no caso do biogás ou do gás natural. Além disso, o biodiesel pode ser utilizado na sua forma pura, designada B100 ou na sua forma de mistura como complemento ao diesel de petróleo (ANTCZAK *et al.*, 2009; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Considerando o cenário atual, no qual é possível estimar o esgotamento das reservas de petróleo em menos de 50 anos, o contínuo aumento dos preços, a demanda destes combustíveis e a necessidade de redução das emissões de dióxido de carbono (CO₂), o biodiesel se torna uma proposta interessante para substituição dos combustíveis fósseis na matriz energética mundial (HWANG *et al.*, 2014).

O Biodiesel pode ser produzido a partir de óleo vegetal, gordura animal e óleos e gorduras residuais e de um agente acilante. Considerando que a matéria-prima corresponde à 70-80% do custo do biocombustível, é importante uma cuidadosa seleção dos reagentes que irão compor o meio reacional (BALAT; BALAT, 2008; HWANG *et al.*, 2014).

2.2. Matérias-primas empregadas na produção de biodiesel

2.2.1. Agente acilante

A reação de transesterificação ocorre na presença de moléculas reativas chamadas acil-aceptores (agente acilante), tais como alcoóis e acetatos. Os álcoois que conferem altas

conversões são os alcoóis não ramificados, com baixo impedimento estérico, tais como metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico, dos quais o metanol e o etanol são os mais empregados na produção de biodiesel (BRUNSCHWIG; MOUSSAVOU; BLIN, 2012).

Normalmente o biodiesel é produzido utilizando metanol como reagente, pois este álcool geralmente apresenta menor custo que o etanol e promove maior velocidade de reação. Porém, o metanol apresenta algumas desvantagens de manuseio, colocando em risco a saúde e o meio ambiente por ser altamente tóxico, inflamável e apresentarem chama invisível. Além disso, o metanol é proveniente do petróleo bruto, o que resulta em um biodiesel que não é totalmente renovável. Dentro deste contexto, o etanol apresenta vantagens sobre o metanol, por apresentar: consolidada produção alcooleira no Brasil, produz biodiesel com maior índice de cetano e maior lubricidade se comparado ao biodiesel metílico, produz um combustível 100% renovável e que não apresenta riscos para saúde e para o meio ambiente e possui menor risco de incêndio (COSTA; OLIVEIRA, 2006; STAMENKOVIĆ; VELIČKOVIĆ; VELJKOVIĆ, 2011; MATA *et al.* 2012). Portanto, o etanol foi selecionado como agente acilante a ser utilizado no presente trabalho.

2.2.2. Matérias-primas lipídicas

A escolha da matéria-prima é um fator de extrema importância a ser considerado em qualquer processo de produção de biodiesel, visto que esta representa cerca de 70-80% do custo total de produção (HWANG *et al.*, 2014).

Mais de 95% da matéria-prima lipídica empregada para a produção de biodiesel provêm de óleos vegetais comestíveis, devido à consolidada produção mundial. Entretanto, a competição com a cadeia alimentícia resulta na elevação dos preços do biocombustível e do óleo comestível, gerando limitações no emprego desses óleos na síntese. Para contornar tais limitações, pesquisas têm sido direcionadas para a utilização de óleos não comestíveis (GUI; LEE; BHATIA, 2008; KANSEDO; LEE; BHATIA, 2009; LEUNG; WU; LEUNG, 2010; LI *et al.* 2012).

Entre os óleos não comestíveis se destaca o óleo de babaçu, devido aos vastos babaçuais espalhados ao sul da bacia amazônica, predominantemente nos estados do Maranhão, Piauí e Tocantins, cujo principal produto é o óleo da amêndoa, constituindo 65% do peso (ALBIERO *et al.*, 2007; BABAÇU, 2013). Dessa forma, esse óleo se enquadra entre os 12 tipos que apresentam maior produtividade em litro por hectare produzido, como pode ser observado com a Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Produção de óleo de várias culturas de plantas oleaginosas.

Planta	Litros de óleo / ha cultivado	Planta	Litros de óleo / ha cultivado
Palma (dendê)	5710	Abacate	2530
Macaúba	4310	Castanha do Pará	2290
Pequi	3580	Macadâmia	2150
Buriti	3130	Pinhão Manso	1810
Oiticia	2870	Babaçu	1760
Côco	2580	Jojoba	1740

Fonte: Adaptado de KURKI *et al.*, 2010.

Com relação à produção de biodiesel, o óleo de babaçu apresenta uma composição predominantemente láurica, o que é excelente para produção de biodiesel, visto que os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que interagem de forma mais efetiva com o agente acilante e com o biocatalisador. Dessa forma os produtos apresentam excelentes características físico-químicas (CARVALHO *et al.*, 2013). Portanto, o óleo de babaçu foi selecionado como óleo de partida para o presente trabalho.

2.3. Produção de biodiesel por transesterificação

A principal forma de obtenção de biodiesel ocorre pela reação de transesterificação, na qual os triglicerídeos (TAG) presentes na matéria-prima (óleo ou gordura) reagem com os álcoois de cadeia curta formando ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos e glicerol (SUAREZ *et al.*, 2009). A reação é reversível e, portanto, o álcool é utilizado em excesso visando direcionar o equilíbrio da reação no sentido de formação do produto (PARAWIRA, 2009). A reação de transesterificação pode ser representada pela equação apresentada na Figura 2.1.

Figura 2.1. Esquema da reação de transesterificação de triglicerídeo e álcool.

2.3.1. Transesterificação química e enzimática

O biodiesel possui produção industrial tradicionalmente pela rota química, utilizando catalisadores homogêneos ácidos ou básicos. Embora seja um processo simples, rápido e com alto rendimento, apresenta algumas desvantagens e limitações. Na catálise alcalina: os triglicerídeos e o álcool precisam ser anidros para evitar a saponificação e consequente emulsão; o teor de acidez dos ácidos graxos deve ser extremamente baixo ($\leq 0,5\%$), pois alta acidez provoca a diminuição do rendimento. Na catálise ácida: apesar do alto rendimento, a reação é lenta quando comparada com a catálise alcalina; além disso, este tipo de transesterificação acarreta em graves problemas ambientais e de corrosão. (KNOTHE *et al.*, 2006, PRAKASH; AULAKH, 2011; AULAKH; PRAKASH; PRAKASH, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

Dessa forma, a rota enzimática para produção de biodiesel empregando lipases como biocatalisador se destaca por possuir inúmeras vantagens, tais como alta eficiência e seletividade, facilidade de remoção do glicerol e purificação do produto, tolerância à água presente no óleo, menor consumo de energia e geração de quantidade baixa de resíduos. Entretanto, o custo das lipases e a baixa velocidade de reação ainda são as principais dificuldades para a produção enzimática de biodiesel (NARWAL; GUPTA, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

2.4. Lipases como catalisadores para a produção de biodiesel

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) constituem o grupo de biocatalisadores mais importantes para aplicações biotecnológicas, pois fazem parte da família das hidrolases que atuam na cadeia éster carboxílico e não requerem nenhum co-fator, são de baixo custo se comparadas a outras enzimas e atuam em uma ampla faixa de pH e temperatura. Adicionalmente, catalisam eficientemente a reação de transesterificação dos óleos vegetais para produção de biodiesel. Apesar de poderem ser obtidas de fontes animais e vegetais, a maioria das lipases comerciais é de origem microbiana. (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

As lipases podem ser utilizadas como biocatalisador de duas formas: extracelular, na qual as enzimas são recuperadas do meio de cultivo com subsequente purificação, e intracelular, na qual as enzimas permanecem no interior ou na parede das células em que foram produzidas. A produção de lipases intracelulares ganha destaque por evitar processos complexos de isolamento, purificação e imobilização, diminuindo o seu custo efetivo. Lipases intracelulares são produzidas por fungos filamentosos, tais como *Rhizopus*

oryzae, *Mucor circinelloides*, *Mucor hiemalis*, *Mucor piriformis* e *Penicillium citrinum* (ANDRADE *et al.*, 2012).

2.4.1. Fungos filamentosos produtores de lipases

Os fungos filamentosos são organismos amplamente conhecidos pela importância que representam na decomposição de matéria orgânica, mas possuem também ampla utilização na indústria para a produção de alimentos, fármacos, intermediários químicos, enzimas e materiais agroindustriais (PAPAGIANNI, 2004).

Esses micro-organismos se reproduzem através da esporulação, em que de um único esporo emergem “tubos” cilíndricos com raio entre 1 a 10 μm chamados de hifas. O conjunto de hifas entrelaçadas é denominado micélio. Por meio desse ciclo de crescimento, os fungos tendem a se fixarem em uma superfície e se imobilizam naturalmente por adsorção. O processo inicia com a aderência dos esporos na superfície e esses esporos por apresentarem um caráter hidrofóbico e um potencial de superfície negativo, acabam por interagir com a superfície através de forças eletrostáticas (PAPAGIANNI, 2004; TINDEMANS; KERN; MULDER, 2006; ROSCHE *et al.*, 2009; PRIEGNITZ *et al.*, 2012).

A Figura 2.2 apresenta um esquema do ciclo de crescimento do fungo. Pode ser observado que após os esporos se fixarem na superfície **(a)**, o crescimento se inicia com o alongamento do “tubo” germinativo **(b)** que cresce **(c)** e se ramifica **(d)**, levando a propagação do micro-organismo por toda superfície. Após o ciclo completo de crescimento o biofilme, já com uma complexa mistura de células de diferentes fisiologias, entra na fase de dispersão **(e)** na qual ocorre o crescimento de hifas especializadas em reprodução, onde ocorre a formação e a dispersão dos esporos (ROSCHE *et al.*, 2009).

Figura 2.2. Esquema do ciclo de crescimento de fungo.

Fonte: ROSCHE *et al.*, 2009.

2.4.1.1. *Mucor circinelloides*

Dentre os fungos filamentosos produtores de lipase se encontra a espécie *Mucor circinelloides*. Essa espécie é formada por fungos fitopatogênicos (patógenos de plantas e frutos), compostas por colônias baixas e esparsas semelhantes ao algodão, que atingem 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). Entre 20-30°C apresenta um ótimo crescimento, entre 10-15°C o crescimento e a esporulação se tornam mais lentos e em 5°C o crescimento é extremamente lento e sem esporulação. Com relação ao pH, apresentam crescimento em uma ampla faixa (3,0 a 8,0) e seus esporângios são formados a partir de hifas aéreas de esporângia e cogumela esféricas que variam de 25 a 50 µm. São transparentes, eretos e ramificados. Com o tempo, a colônia adquire coloração marrom escuro, devido à formação de esporangiósporos escuros (SCHIPPER, 1976; XIA *et al.*, 2011; ANDRADE, 2012).

Antczak *et al.* (2004) investigaram a produção de lipase pelo fungo *M. circinelloides* e descobriram que as suas lipases intracelulares possuíam atividade catalítica superior à das lipases extracelulares, mesmo na forma imobilizada. Os autores atribuem ainda a alta atividade das células do fungo ao arranjo espacial das lipases que seria favorecido pela membrana celular, facilitando a ligação do substrato ao sítio catalítico da lipase. Resultados similares foram reportados por Andrade (2012) e Galan-Garcia *et al.* (2013).

2.4.2. *Interferência de fatores extrínsecos da produção de células microbianas na atividade catalítica e formação de biomassa fúngica*

É importante o estudo dos fatores extrínsecos na produção de células microbianas, pois o equilíbrio da quantidade de biomassa imobilizada vs atividade pode interferir no rendimento do processo no qual a biomassa é aplicada como biocatalisador. Fukuda *et al.*, 2008, relata que obteve um rendimento de 78,6% em termos de ésteres de metila em 72 h de reação contrastando com um rendimento de 71% em termos de ésteres de metila em 165 h de reação para um biocatalisador com uma quantidade mássica maior de células íntegras de *Rhizopus oryzae*. Segundo o autor, esta diferença estaria relacionada com a facilidade do acesso das moléculas do substrato a superfície das células fúngicas. Em caso de uma grande quantidade de células, esse acesso seria dificultado, demonstrando que a quantidade

de biomassa imobilizada não está diretamente ligada ao rendimento da produção de biodiesel (FUKUDA *et al.*, 2008)

Dentro deste contexto, uma quantidade reduzida de biomassa imobilizada poderia se tornar interessante para aumentar o rendimento da produção de biodiesel. Dessa forma, estudos preliminares quanto à temperatura, pH e tempo de cultivo/imobilização de *Mucor circinelloides* foram realizados, utilizando como parâmetros iniciais dados de trabalhos anteriores (ANDRADE, 2012; ANDRADE *et al.*, 2012; SOARES, 2012).

2.4.2.1. Temperatura

A fermentação para produção de lipases fungicas é normalmente realizada na faixa de temperatura de 22 a 30°C, entretanto o *M. circinelloides* apresenta bom crescimento até 37°C (CASTILHO *et al.*, 2000; ANDRADE, 2012).

2.4.2.2. pH

De forma geral, a produção máxima de enzimas ocorre no final da fermentação, quando o pH atinge valores entre 7,0 e 8,0, após o esgotamento da fonte de carbono. Entretanto, nesta condição o pH continua subindo para a faixa alcalina, podendo desnaturar as enzimas por proteólise ou pH adverso (CASTILHO *et al.*, 2000). Estudos na literatura relataram a imobilização do fungo *Mucor circinelloides* em sílica macroporosa em pHs entre 5 e 8, sendo os melhores resultados, em termos de atividade hidrolítica, obtidos para a imobilização realizada em pH 6,0 (GARCIA-GALAN *et al.*, 2013).

2.4.2.3. Tempo de Cultivo

O tempo é um parâmetro importante a ser determinado para o cultivo de células íntegras, uma vez que o pH do meio tende a se tornar cada vez mais alcalino, desnaturando as lipases formadas. Entretanto, é importante que esse tempo não seja demasiado curto, para que a fonte de carbono possa se esgotar e as lipases possam ser formadas. Estudos relatam tempos de cultivo de 72h para produção de lipases de *M. circinelloides*, entretanto é possível encontrar tempos de cultivo de até 96 h para lipases microbianas de outras culturas, como de *Rhizopus oryzae* (CHEN; LIN, 2010; ANDRADE *et al.*, 2012; SOARES, 2012). Portanto, no presente trabalho, buscou-se avaliar o crescimento do *M. circinelloides* entre 48 h e 96 h a fim de identificar o tempo ótimo de cultivo.

2.4.3. Células Imobilizadas

A utilização das lipases para produção de biodiesel tem sido limitada por alguns fatores como instabilidade enzimática, dificuldade de recuperação e solubilidade da enzima. Para contornar esses problemas, diferentes estratégias têm sido propostas, como por exemplo, o desenvolvimento de técnicas e suportes para a imobilização de enzimas. A imobilização da enzima tem um efeito benéfico na sua estabilidade, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima. Além disso, permitem a utilização das lipases de forma contínua e repetidamente, contribuindo para a redução do custo do biocatalisador (MEUNIER; LEGGE, 2012).

2.4.3.1. Principais métodos de imobilização

As principais técnicas de imobilização normalmente aplicadas em processos de biotransformação são baseadas na adsorção a suportes inertes, na encapsulação e no aprisionamento em matrizes poliméricas ou ligação covalente, cruzada e iônica em suportes previamente ativados (DE CASTRO, 2008), cujas vantagens e desvantagens são apresentadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização de enzimas.

Método de Imobilização	Adsorção	Ligação covalente	Encapsulação	Ligação Cruzada
Vantagens	Baixo custo, simples, não ocorre modificação química da enzima e pode ser possível a regeneração do suporte.	Não é afetado pelo pH, força iônica do meio ou concentração do substrato.	Não ocorre modificação química da enzima.	Enzimas fortemente ligadas, reduz a perda de lipase.
Desvantagens	A imobilização pode ocorrer apenas na superfície e dessorção da enzima com o tempo/uso.	Não é possível regenerar o suporte e apresenta um alto custo.	Apresenta limitação de difusão, susceptível à inativação da enzima e ocorre perda contínua de atividade devido ao tamanho dos poros.	Ocorre perda da atividade enzimática durante o preparo, possui baixa resistência mecânica e alto custo.

Fonte: DE CASTRO *et al.*, 2008.

2.4.4. Suportes para imobilização de células visando à produção de biodiesel

A imobilização de células fúngicas normalmente ocorre durante crescimento natural quando as células microbianas se aderem à superfície do suporte. Quando o suporte apresenta poros nos quais é possível a penetração das hifas, estas preenchem também o espaço interno disponível. Dentre os processos para a imobilização, a adsorção em partículas porosas para suporte de biomassa apresenta inúmeras vantagens como ausência de aditivos químicos, pré-produção de células e assepsia. Outra característica importante desse método a ser considerada é a possibilidade de reutilização do suporte, garantindo vantagem econômica desse método (ANDRADE, 2012).

2.4.4.1. Espumas de poliuretano

Poliuretanos são polímeros formados por uma cadeia de unidades orgânicas unidas por ligações de uretano (ligações uretânicas). São produtos da reação de um monômero funcional contendo pelo menos dois grupos alcoóis com outro monômero que contém pelo menos dois grupos isocianatos, na presença de catalisador (CADENA *et al.*, 2010). São formados a partir de segmentos macios que se referem aos polióis poliméricos, e domínios rígidos que são produzidos a partir da reação dos diisocianatos com extensores de cadeia (hidroxila ou amina). Os segmentos macios possuem efeito sobre as propriedades elastoméricas do polímero em baixas temperaturas, enquanto os segmentos rígidos contribuem para as propriedades a alta temperatura tais como a estabilidade dimensional, a resistência térmica e a reticulação física. Dentro desse contexto, é amplamente usado em espumas rígidas e flexíveis, devido à sua excelente resistência química e propriedades físicas (DAEMI *et al.*, 2013).

A espuma de poliuretano é um material inerte com elevada porosidade, baixa densidade, ampla superfície de adsorção e baixo custo de produção. Suas unidades constituintes são chamadas de “células” que possuem formato poliédrico e suas arestas e faces são definidas por suportes e paredes. Durante o processo de fabricação os materiais de partida reagem e expandem-se, de forma que as células são geralmente alongadas na direção em que a espuma se expande garantindo um amplo tamanho de poro que facilita a difusão de oxigênio, fator importante para o crescimento de micro-organismos aeróbicos (DE ORY *et al.*, 2004, DA SILVA *et al.*, 2013).

Por conta dessas particularidades, células íntegras de *M. circinelloides* vêm sendo imobilizadas com sucesso em espumas de poliuretano e utilizadas na produção de biodiesel com óleo de babaçu e etanol como matérias-primas e *terc*-butanol como co-solvente (SOARES, 2012; ANDRADE, 2012; ANDRADE *et al.*, 2012), demonstrando a consistência das características selecionadas para a realização do presente trabalho.

2.4.5. Interferência do suporte de poliuretano na atividade catalítica e formação de biomassa fúngica

2.4.5.1. Características do Suporte

As lipases imobilizadas são fixadas, encapsuladas ou aprisionadas em um suporte sólido que mantém a atividade catalítica, melhorando a estabilidade e permitindo a reutilização do biocatalisador (MEUNIER; LEGGE, 2012). Quando se trata de imobilização de biomassa fúngica por adsorção em suportes porosos (espumas de poliuretano) alguns fatores devem ser levados em consideração:

Porosidade: Suportes porosos podem imobilizar grandes cargas de biomassa, porém além de possíveis efeitos de transferência de massa externos, podem também existir resistências à difusão interna do substrato, uma vez que este tem de se difundir através dos poros de modo a chegar à enzima. Dessa forma, o tamanho do poro do biocatalisador é um fator importante, visto que poros pequenos podem impedir um crescimento adequado, serem totalmente preenchidos ou impedir uma transferência de massa eficiente, enquanto que poros muito grandes podem facilitar a desorção. Além disso, é importante que o suporte tenha a maior quantidade possível dos poros abertos, pois da mesma forma que os poros muito pequenos, poros fechados interferem negativamente na transferência de massa (CABRAL, AIRES-BARROS; GAMA, 2003; RATLEDGE; KRISTIANSEN, 2006; BAYNE; ULIJN; HALLING, 2013).

Hidrofobicidade: As lipases tendem a ficar na forma aberta quando são ligadas a suportes hidrofóbicos, portanto está é uma característica importante que deve ser levada em consideração na formulação de um suporte para imobilização de células fúngicas (GARCIA-GALAN *et al.*, 2013).

Na formulação de uma espuma hidrofóbica de poliuretano, os componentes que influenciam no tamanho dos poros e na quantidade de poros abertos são o catalisador de enxofre e a amina utilizada na composição. Com base neste contexto, foram propostas pela

EVONIK® duas formulações visando melhorar as características da espuma comercial (marca EsfreBom).

2.4.5.2. Quantidade Mássica de Suporte

A quantidade mássica de suporte influencia diretamente na formação de biomassa fúngica, visto que parte da biomassa pode ficar dispersa no meio de cultivo, devido ao carregamento de imobilização ter sido máximo (não há mais suporte para as células íntegras se fixarem, então elas crescem livres) ou, pode existir suporte em excesso, de forma que a biomassa formada se distribua pelas unidades de suporte, formando biocatalisadores com menor quantidade de biomassa. Dessa forma, a quantidade mássica de suporte influencia também a atividade do biocatalisador, visto que, quanto maior o carregamento, maior será a atividade catalítica, desde que não sejam variadas as condições de cultivo. Andrade *et al.* (2012) utilizaram 100 unidades cúbicas de 6 mm de aresta de espuma de poliuretano como suporte. Portanto, a quantidade mássica de suporte inicial utilizada no presente trabalho tomou como base a quantidade de unidades reportadas em trabalhos anteriores (ANDRADE *et al.* 2012; ANDRADE, 2012; SOARES, 2012).

2.5. Biorreatores com biomassa imobilizada

Quando se trabalha com biorreatores com biomassa imobilizada é importante determinar o tipo de biorreator que será utilizado de acordo com o propósito para o qual ele é empregado. Para tanto é preciso analisar se o reator será utilizado apenas para levantamento de dados sobre o processo ou se o foco será a otimização de fatores visando à produção em escala industrial, por exemplo. Os parâmetros que afetam o processo também devem ser estudados, a fim de estabelecer as condições que proporcionam as mais altas conversões, tais como: razão molar do substrato, ausência ou presença de solvente e tempo espacial.

2.5.1. Razão molar do substrato

A razão molar álcool:óleo desempenha um papel vital na produção do biodiesel. A medida que a razão molar aumenta, aumenta o contato das moléculas do álcool com o óleo. Dessa forma, quanto maior for a concentração do álcool em relação a do óleo, maior será a concentração de ésteres produzida até um determinado limite. Acima desse limite a conversão não aumenta mais, aumentando apenas o custo de recuperação do álcool e, em caso de elevada concentração de álcool o processo se reverte, diminuindo o contato entre as moléculas com consequente diminuição do rendimento de transesterificação (NARWAL; GUPTA, 2013).

2.5.2. Solventes orgânicos

Além da matéria-prima lipídica e do agente acilante, ao utilizar biorreatores com lipases imobilizadas, é muito importante avaliar o uso ou não de solvente no meio reacional. O uso de solventes orgânicos na síntese enzimática de biodiesel melhora a solubilidade entre os triglicerídeos hidrofóbicos e os alcoóis hidrofílicos, além de evitar a inativação da enzima pela elevada concentração do álcool. Vários solventes orgânicos têm sido usados na síntese enzimática de biodiesel. Os solventes orgânicos mais apropriados são os de caráter hidrofóbicos como o *terc*-butanol. (GOG *et al.*, 2012).

O *terc*-butanol quando utilizado em meios com células íntegras imobilizadas para produção de biodiesel não apenas reduz o tempo reacional, mas melhora a estabilidade operacional do sistema. Este efeito é atribuído a melhor transferência de massa do que em um meio isento de solvente. Entretanto, um sistema eficiente de recuperação do *terc*-butanol deve ser estabelecido para que a produção seja ecologicamente sustentável (LI; DU; LIU, 2007; FUKUDA *et al.*, 2008).

2.5.3. Configuração do reator

A utilização de reatores em regime descontínuo é de extrema importância para coletar dados sobre o processo, como a cinética da reação. Entretanto, quando se considera a ampliação de escala e aplicação industrial, a transesterificação enzimática de óleos vegetais é substancialmente mais rápida e economicamente mais viável em reatores de fluxo contínuo do que em reatores de fluxo descontínuo (LEE *et al.*, 2010; DA RÓS *et al.*, 2010). Dessa forma, após a otimização dos parâmetros de cultivo, o biocatalisador foi utilizado em reações conduzidas em regime de fluxo não contínuo e em seguida aplicadas em sistema contínuo para estudo dos parâmetros de produção.

2.5.3.1. Reator de tanque agitado (BSTR)

No processo em regime descontínuo, a enzima é usualmente introduzida no reator junto com o substrato e as partículas de biocatalisador ficam dispersas no meio reacional. Ao alcançar a conversão desejada, todo o conteúdo é descarregado. Esta configuração apresenta vantagens em escala de bancada quando se deseja conhecer o processo e coletar dados cinéticos sobre o sistema reacional. Entretanto, quando se considera o uso em escala industrial, algumas limitações são apresentadas, pois os sistemas imobilizados não podem ser carregados em

grande quantidade e estão susceptíveis às rupturas devido às altas tensões de cisalhamento impostas pela agitação mecânica (CIFTCI; TEMELI, 2013; YAAKOB *et al.*, 2013).

2.5.3.2. Reator de leito fixo e fluxo contínuo (PBR)

Para a produção em larga escala, são tradicionalmente utilizados reatores de leito fixo operando em sistema contínuo, por apresentarem alta eficiência, baixo custo, facilidade de operação, construção, automação e ampliação de escala e menor grau de cisalhamento, evitando a ruptura das partículas do biocatalisador. Além disso, a área disponível para o contato entre a enzima e o substrato é relativamente grande em qualquer tempo considerado e o biocatalisador pode ser reutilizado por longos períodos de operação, apresentando menor custo do que o processo batelada. (BALTARU *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2009; HALIM *et al.*, 2009; CHEN; LIN, 2010; AL-ZUHAIR *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011). No processo contínuo é preciso ainda considerar o tempo de residência, que consiste no tempo em que a partícula permanece no reator e que está diretamente relacionado com a conversão. Em um processo ideal o tempo de residência é exatamente o mesmo que o tempo espacial.

2.5.3.3. Relação geométrica do reator de leito fixo e fluxo contínuo (PBR)

Damstrup, 2007 avaliou diferentes configurações de coluna de reatores de leito fixo operando em fluxo contínuo para definir as condições em que o produto é formado com maior velocidade de reação. Com base nos resultados encontrados, é possível perceber que a produtividade pode estar associada com as dimensões do reator, uma vez que esta aumenta de acordo com valores crescentes da razão diâmetro:altura da coluna do reator até um limite de 1:14. Portanto, buscou-se testar diferentes configurações, em termos de dimensionamento do reator, para avaliar o comportamento do rendimento e da produtividade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Aperfeiçoar os parâmetros de produção de biodiesel etílico através da rota enzimática em reator de leito fixo e regime de fluxo contínuo utilizando células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano.

3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar espumas de poliuretano utilizando diferentes formulações.
- Determinar as melhores condições de cultivo e imobilização (pH, temperatura, tempo de cultivo, massa de suporte, geometria do suporte) do fungo *Mucor circinelloides* nas espumas de poliuretano sintetizadas para aplicação no processo de produção de biodiesel etílico em reator de fluxo não contínuo utilizando óleo de babaçu.
- Aplicar a biomassa imobilizada nas melhores condições de cultivo e de imobilização em reator de leito fixo e regime de fluxo contínuo.
- Definir os parâmetros de produção (tempo espacial e razão molar) do biodiesel etílico de babaçu utilizando células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano e análise da influência da geometria do catalisador em reator de leito fixo e sistema contínuo.
- Determinar a melhor configuração (dimensões) de reator de leito fixo operando em fluxo contínuo para ser realizada a produção de biodiesel.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Reagentes de síntese das EPU's

Foram utilizados na síntese das EPU's reagentes encontrados comercialmente na área de “espumação” e listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Reagentes utilizados na preparação das EPU's estudadas neste trabalho.

Reagente	Nome Comercial	Composição	Fornecedor
Catalisador	<i>Kosmos 29</i>	Octanoato de estanho	EVONIK
Aminas	<i>Tegoamin 33</i> <i>Tegoamin 75</i>	Aminas Terciárias	EVONIK
Surfatante	<i>Tegostab 8228</i>	Copolímero em bloco de polisiloxano e poliaquilenos	EVONIK
Isocianato	<i>TDI</i>	Tolueno diisocianato, 80% de isômero 2,4 e 20% de isômero 2,6	EVONIK
Poliol Poliéter	<i>Lupranol 3040</i>	Massa molecular (PM) = 1100 Índice de Hidroxila = 104 mg KOH g ⁻¹	EVONIK

Todos os reagentes foram gentilmente cedidos pela EVONIK e utilizados primeiramente para a síntese em suas próprias instalações e na segunda etapa, no Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena – USP. Foi utilizado como agente de expansão água destilada e álcool comercial como solvente de limpeza.

4.1.2. Biocatalisador

A linhagem do fungo *Mucor circinelloides* URM-4182 adquirida da micoteca da Universidade Federal de Pernambuco foi selecionada com base em resultados obtidos em trabalhos anteriores (Andrade, 2012, Andrade *et al.*, 2014).

4.1.3. Síntese de Biodiesel

Como materiais de partida foram utilizados óleo de babaçu refinado (Mundo dos Óleos) cuja composição é apresentada na Tabela 4.2, etanol anidro 99,8% e terc-butanol 99% (Cromoline).

Tabela 4.2. Composição do óleo de babaçu (Mundo dos Óleos).

Ácido graxo	%
Ácido Caprílico (C8)	3,18
Ácido Capríco (C10)	3,21
Ácido Laurico (C12)	45,35
Ácido Mirístico (C14)	15,14
Ácido Palmítico (C16)	8,37
Ácido Esteárico (C18)	2,39
Ácido Oleico (C18:1)	16,35
Ácido Linoleico (C18:2)	4,94
% ácidos graxos	75,87
MM _{média ácido} (g mol ⁻¹)	716,76

4.1.4. Outros Reagentes

Clorofórmio (Cromoline), Acetato de etila (Cromoline), Hexano (Cromoline), Etanol anidro (99,8%, Cromoline), Terc-butanol (Cromoline). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1.5. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.

Tipo de análise e/ou ensaio	Equipamento	Modelo/Fabricante
Agitação	Agitador mecânico	Marconi
Aquecimento	Estufa	Modelo Fanem, Nova Ética
Permeabilidade do ar	Aparelho de Permeabilidade	EVONIK®
Pesagem	Balança analítica	Modelo UX4200H, Shimadzu (UniBloc)
Cultivo, imobilização e reação de fluxo não contínuo	Shaker	Marconi Nova Ética
Contagem de esporos	Microscópio	Sppencer scientific
Atividade Hidrolítica	Banho termostatzado com agitação	Modelo 145, Marconi
Atividade Hidrolítica	Bureta Digital	Modelo Jencons – Digitrat
Teor de umidade dos derivados imobilizados	Balança Analítica	ID 50, Marte
Preparo do Tampão Citrato	pHmetro digital	pH meter tec-2 TECNAL
Controle da vazão do sistema contínuo	Bomba peristáltica	ATTO Corporation
Viscosidade	Viscosímetro	DV-II + Pro (Brookfield)
Densidade	Densímetro	DMA 35N EX (Anton Paar)
Análise dos Ésteres de Etila e Etanol	Cromatógrafo Gasoso	Varian 3800
Análise dos mono e diglicerídeos residuais	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência	Agilent 1200 Series

4.2. Metodologia

4.2.1. Suporte

Tomando como base o trabalho desenvolvido por Soares (2012) neste trabalho foram utilizados, como suporte, dois tipos de unidades geométricas de espuma de poliuretano sintetizadas com formulações propostas pela EVONIK®. Estas formulações tiveram como objetivo melhorar as características da espuma comercial através da produção de novas espumas, semelhantes a ela no que diz respeito ao tamanho e número de poros, porém com poros maiores e maior quantidade de poros abertos. A espuma comercial utilizada como parâmetro foi a multiuso da marca EsfreBom.

4.2.1.1. Síntese de espuma de poliuretano

Para cada bloco de espuma foram utilizadas 3 formulações e os reagentes foram adicionados em um copo de polipropileno de 1 litro de capacidade. Primeiramente foi colocado o catalisador de octoato de estanho (*Kosmos 29*) e logo em seguida o poliól poliéter (*Lupranol 3040*), pois dessa forma o poliál irá proteger e minimizar a reação entre o catalisador de estanho com ar e água. Posteriormente adicionou-se o catalisador de amina (*Tegoamin 33* ou *Tegoamin 75*), responsável por catalisar a reação de hidrólise do isocianato, liberando CO₂, responsável pela formação dos poros. Na sequência foram colocados, o surfatante (*Tegostab 8228*), para organizar e estabilizar as células, e a água, para a expansão da matriz.

A mistura de todos reagentes, exceto o isocianato, foi homogeneizada com a rotação da primeira agitação (da Tabela 4.3) por 50 segundos. Após o tempo de homogeneização, foi adicionado o isocianato (*TDI*) e o meio reacional foi misturado com a rotação da segunda agitação da Tabela 4.4, por 5 segundos e então transferido, antes de iniciar a expansão, para um recipiente quadrangular de madeira com 13,82 L de volume, previamente forrado com papel “Kraft”. O creme formou-se em aproximadamente 10 segundos e então, a mistura foi levada a estufa a 70°C por 10 minutos para acelerar a cura do polímero (também se pode deixar a temperatura ambiente por 24h).

Em seguida, no bloco de espuma já pré-curada, foram realizados cortes com auxílio de uma serra, para a obtenção de lamina de espuma para serem analisadas. As espumas foram avaliadas visualmente, para verificar a uniformidade das células e em seguida foi realizado um teste permeabilidade ao ar, nomeando as espumas de acordo com o resultado do teste.

Tabela 4.4. Formulações propostas pela EVONIK®.

Formulação EPU3		Formulação EPU9	
<i>Poliol Lupranol 3040</i>	100,00 g	<i>Poliol Lupranol 3040</i>	100,00 g
<i>TDI</i>	52,00 g	<i>TDI</i>	52,00 g
<i>Tegostab 8228</i>	0,80 g	<i>Tegostab 8228</i>	0,80 g
<i>Tegoamin 33</i>	0,18 g	<i>Tegoamin 75</i>	0,18 g
<i>Kosmos 29</i>	0,12 g	<i>Kosmos 29</i>	0,12 g
<i>Água</i>	4,025 g	<i>Água</i>	4,025 g
<i>Primeira agitação</i>	1000 rpm	<i>Primeira agitação</i>	1000 rpm
<i>Segunda agitação</i>	2500 rpm	<i>Segunda agitação</i>	2500 rpm

As espumas foram cortadas de acordo com as dimensões estipuladas para cada experimento e caracterizadas quanto ao diâmetro médio de poros, densidade aparente, grau de inchamento, parâmetro de solubilidade, sorção de água e solventes, e absorção dos solventes pela matriz. As amostras foram medidas com um paquímetro digital e as massas em uma balança eletrônica com precisão de 0,0001g.

4.2.1.2. Cálculo do diâmetro médio de poros

Para determinar o diâmetro médio de poros, avaliar a morfologia das espumas e analisar as células adsorvidas nas espumas, foram utilizadas micrografias obtidas do microscópio eletrônico de varredura LEO1450VP (Schott Zeiss do Brasil Ltda) (MEV). As amostras das espumas de poliuretano e Comercial, fixadas num suporte adequado, foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro, e as imagens foram obtidas com aumento de 35 e 1000 vezes.

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

Primeiramente foi calibrado a imagem no programa *ImageJ*. A imagem foi aberta no programa, neste caso uma micrografia com 50 vezes de aumento, para então realizar a calibragem da imagem no programa. Com a utilização da ferramenta *Straight* foi feito uma linha do tamanho da barra de metragem da imagem (Figura 4.1) e então com a ferramenta *Set Scale* na opção *Analyze* da barra de ferramentas, foi colocado a distância conhecida e a unidade utilizada na micrografia, neste caso 200 μm equivalem a 40 pixels, obtendo assim a calibragem para a imagem de 0,20 pixel/ μm .

Figura 4.1. Calibragem da micrografia no programa *ImageJ*.

As sequências de tratamento das imagens estão mostradas nas Figuras 4.2 a-f. Primeiramente foi recortada a área de interesse (Figura 4.2.a) e aberta em outra janela (Figura 4.2.b) onde foi feito o primeiro tratamento. Nesta etapa todas as bordas são realçadas com a utilização da ferramenta *Find Edges* dentro da opção *Process* da barra de ferramentas (Figura 4.2.c). Em seguida ocorreu o preenchimento dos poros contornados (Figura 4.2.d). Após o preenchimento dos poros foi realizado um tratamento da imagem utilizando *Binary* na opção *Process*, transformando a imagem em preto e branco (Figura 4.2. e).

Com esse tratamento os poros ficaram na cor preta e a espuma na cor branca, sendo possível então realizar as medições dos diâmetros dos poros e a sua distribuição. Em *Set Measurement* foi selecionado *Feret's diameter*, conhecido também como máximo de paquímetro, para calcular o diâmetro dos poros e então utilizado a ferramenta *Analyze Particles*, ambas na opção *Analyze* da barra de ferramentas, quando foi efetuada a medição (Figura 4.2. f).

a) Seleção da área de análise

b) Recorte da área de seleção

c) Levantamento das bordas

d) Preenchimento dos poros

e) Tratamento binário

f) Cálculo dos diâmetros de *Feret*

Figura 4.2. Sequência de tratamento das micrografias das espumas realizado pelo software *ImageJ* para o levantamento do diâmetro de poros.

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

4.2.1.3. Permeabilidade ao ar

O teste de permeabilidade ao ar foi realizado no laboratório da EVONIK, de acordo com a norma ASTM D3574-02. O cálculo foi feito através da média dos valores de cada canto e centro do quadrado cortado para análise.

As espumas foram submetidas a um fluxo de ar, com uma vazão de 14 L min^{-1} , e a resistência a passagem do fluxo expressa com base no ganho de pressão da linha. Quanto maior for o ganho da pressão, maior será a quantidade de poros fechados na espuma. Dessa forma, a espuma EPU3, foi a que apresentou uma elevação na pressão de 3 milímetros de coluna de água (mmca), a EPU9, 9 mmca.

4.2.1.4. Densidade aparente das EPUs

A densidade aparente foi calculada de acordo com a ASTM D3574-02. As amostras foram cortadas com dimensões aproximadas de 40x40x8 mm, medidas com um paquímetro digital, sendo depois medidas as massas de cada uma das amostras, em uma balança eletrônica com precisão de 0,0001g. O valor foi reportado com massa total (Kg) de amostra de espuma por unidade de volume (m^3). Todas as determinações foram feitas em triplicata.

4.2.1.5. Grau de inchamento das EPUs e parâmetro de solubilidade

Para determinar os graus de inchamento e os parâmetros de solubilidade das espumas, 15 amostras de cada uma foram cortadas com dimensões aproximadas de 30x30x8 mm, medidas com paquímetro digital. Para cada tipo de espuma as amostras foram pesadas em uma balança eletrônica com precisão de 0,0001g. Após pesagem foram imersas em solventes pré-selecionados (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e terc-butanol), em frascos fechados e de acordo com a norma ASTM 471. O inchamento foi feito em temperatura ambiente e na ausência de luz por 15 dias.

O grau de inchamento no equilíbrio expresso pelo parâmetro Q é também chamado de coeficiente de inchamento no equilíbrio e é determinado experimentalmente pela relação representada pela Equação 4.1.

$$Q = \frac{(V_f - V_i)}{V_i} \quad (4.1)$$

Em que: V_i = Volume inicial do polímero
 V_f = Volume final no equilíbrio do polímero

Para o levantamento do parâmetro de solubilidade do polímero (δ_2), vários solventes foram selecionados com o intuito de cobrir uma faixa de valores de parâmetros de solubilidade (Tabela 4.5). Com um gráfico de parâmetro de solubilidade do solvente (δ_1) por Q (Figura 4.3.) é utilizado uma curva de tendência gaussiana, e assim tomado como parâmetro de solubilidade do polímero o ponto máximo da curva.

Tabela 4.5. Parâmetros de solubilidade dos solventes.

Solvente	Parâmetro de Solubilidade (cal cm ⁻³) ^{1/2}
Hexano	7,29
Acetato de Etila	9,05
Clorofórmio	9,30
Etanol	10,00
Terc-Butanol	11,40

Figura 4.3. Modelo padrão de gráfico de Parâmetro de Solubilidade (δ_1) vs Coeficiente de Inchamento (Q) com a linha de tendência gaussiana traçada.

4.2.1.6. Sorção de água e solventes

Para avaliar a sorção, a metodologia proposta foi uma modificação da ASTM F 716/726 conforme descrito por Tanobe (2007). A avaliação, da sorção estática da água destilada e dos solventes (etanol e *terc*-butanol), foi realizada em um sistema de frascos com tampas, nos quais as amostras das espumas, com dimensões 30x30x8 mm, previamente pesadas foram completamente imersas nos líquidos contidos nos frascos que foram fechados para evitar a evaporação. Em tempos pré-determinados (1, 5, 10, 30 minutos e em 1, 2, 24, 48, 72 horas) foram retiradas as amostras dos frascos com auxílio de uma tela de aço e medido o peso amostra com solvente. Com o cálculo das massas dos líquidos penetrados nas amostras, os resultados foram dispostos em um gráfico de tempo de sorção *versus* a massa penetrada, sendo todos experimentos feitos em triplicata.

4.2.1.7. Absorção dos solventes pela matriz

Foi determinada a quantidade de solvente retida na matriz de cada EPU. As amostras das espumas com as mesmas dimensões utilizadas para o levantamento do grau de inchamento foram imersas em etanol e *terc*-butanol em frascos fechados. Após 72 horas as amostras foram retiradas com auxílio de uma pinça e colocadas em uma tela de aço para que o excesso de solvente dos poros fosse liberado após 30 segundos de repouso, sem que fosse feito compressão. Em seguida as amostras foram pesadas e pela diferença de massa foi calculada a massa de solvente absorvida por massa de espuma utilizada. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente e em triplicata.

4.2.2. Biocatalisador

A metodologia de partida utilizada para o preparo do biocatalisador foi descrita por Andrade (2012). Com base nesta metodologia, foram definidas as variáveis visando a otimização do processo de cultivo e imobilização das células íntegras e, a partir dos resultados obtidos, a metodologia foi adaptada para dar prosseguimento ao trabalho.

4.2.2.1. Preparo do meio de cultura

Os fungos foram cultivados em meio de cultura líquido composto por 30g de óleo de oliva (comercial), 70g de peptona (Himedia), 1g de NaNO₃ (Vetec), 1g de KH₂PO₄ (Synth) e 0,5g de MgSO₄.7H₂O (Vetec) para cada e 1L de H₂O (para meios com pH 6,5) ou 1L de

tampão Citrato pH 4,5 1,0M (para meios com pH 5,5) previamente autoclavados (121°C/15 min).

4.2.2.2. Preparo das células íntegras imobilizadas

As unidades de suporte (50 a 150 cubos de 6x6x6 mm ou 100 paralelepípedos de 4x5x11 mm ou 50 cilindros (altura h= 2 mm e raio r= 8 mm) foram adicionadas nos erlenmeyers antes da autoclavagem. O meio de cultivo foi preparado conforme descrito no item 4.2.2.1. Para o 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 de 48 a 96 h sob agitação orbital em shaker (170 rpm) sob temperaturas de 30°C e 35°C. A biomassa foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, lavada com acetona e seca em bomba de alto vácuo. Ao final do processo, foi determinada a atividade lipolítica e a umidade da biomassa.

4.2.2.3. Influência das variáveis temperatura e pH no crescimento de biomassa microbiana e seleção do suporte

Em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura (item 4.2.2.1) foram adicionados 100 cubos de poliuretano EPU3 ou EPU9 e após esterilização procedeu-se a inoculação, conforme descrito no item 4.2.2.2. Os meios de cultura foram preparados com pHs 5,5 e 6,5 e cultivados a temperaturas de 30°C e 35°C durante 96 h. 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 e a umidade da biomassa imobilizada.

4.2.2.4. Efeito do tempo de cultivo na quantidade de biomassa celular imobilizada

Em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura (item 4.2.2.1) foram adicionados 100 cubos da espuma EPU3 e após esterilização procedeu-se a inoculação, conforme descrito no item 4.2.2.2. Os meios de cultura foram preparados em pH 5,5 e cultivados em temperatura de 35°C durante 48 h, 72 h e 96 h. 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 a umidade da biomassa imobilizada.

4.2.2.5. *Influência da massa de suporte na imobilização da biomassa celular*

Em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura (item 4.2.2.1) foram adicionados 50, 100 e 150 cubos da espuma EPU3 e após esterilização procedeu-se a inoculação, conforme descrito no item 4.2.2.2. Os meios de cultura foram preparados em pH 5,5 e cultivados em temperatura de 35°C durante 96 h. 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 e a umidade da biomassa imobilizada.

4.2.2.6. *Variação da Geometria do Suporte*

Em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura (item 4.2.2.1) foram adicionados 100 cubos ou 100 paralelepípedos ou 50 cilindros da espuma EPU3 e após esterilização procedeu-se a inoculação, conforme descrito no item 4.2.2.2. Os meios de cultura foram preparados em pH 5,5 e cultivados em temperatura de 35°C durante 96 h. 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 e a umidade da biomassa imobilizada.

Para utilização no sistema não contínuo, foram acrescentadas unidades de biocatalisador imobilizado correspondente a 20% (m/m) de acordo com metodologia do item 4.3.2.1. Para o sistema contínuo, entretanto, a fim de manter uma uniformidade volumétrica, o biocatalisador foi utilizado em termos de quantidade de unidades (*Biomass Support Particles* - BSP) correspondente a 120 unidades cubos ou paralelepípedos ou 60 unidades cilindros.

4.2.2.7. *Cálculo da Densidade cristalina da biomassa imobilizada*

A densidade cristalina ou densidade do esqueleto sólido foi determinada em balão volumétrico previamente aferido com água à temperatura ambiente. Colocou-se uma massa conhecida de partículas no interior do balão e as mesmas foram imersas em água destilada sob vácuo, a fim de se eliminar o ar contido nos espaços intra e interpartículas. O balão volumétrico foi completado com água, sendo o volume ocupado pelo sólido obtido por diferença após preencher o balão. A densidade foi calculada como a relação entre a massa e o volume ocupado pelos sólidos (ZANIN, 1989).

4.2.3. Síntese do Biodiesel

4.2.3.1. Processo em regime de fluxo descontínuo

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 20% m/m da biomassa imobilizada em relação à massa total dos reagentes de partida numa temperatura de 35°C. As reações foram conduzidas por um período máximo de 120 h e monitoradas pela retirada de alíquotas do meio reacional a cada 24 h para dosagem dos ésteres etílicos formados, conforme metodologia estabelecida por Urioste *et al.* (2008). Ao final de cada batelada, o produto transesterificado foi removido dos frascos erlenmeyers e as células imobilizadas foram lavadas com hexano/*terc*-butanol, a fim de remover substrato e produto residuais na matriz. As células imobilizadas foram filtradas sob vácuo até teor de unidade menor que 10%. Foram medidas a atividade hidrolítica pelo método de hidrólise do óleo de oliva (adaptado de ANDRADE *et al.*, 2012 – ver APÊNDICE A) e a massa do biocatalizador recuperado.

4.2.3.2. Processo em regime de fluxo contínuo em reator de leito fixo – tipo I

As reações em sistema de fluxo contínuo foram conduzidas inicialmente em reator de leito fixo (diâmetro interno= 45 mm, altura = 55 mm e volume total = 87,5 cm³) com o auxílio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-L ATTO ou SJ-1211-H ATTO), operando em vazões de 1,0 mL h⁻¹, 2,5 mL h⁻¹ e 5,0 mL h⁻¹, por um período médio de 14 dias. O esquema simplificado do sistema está apresentado na Figura 4.4. A mistura reacional composta por óleo de babaçu e etanol (razão molar 1:4, 1:6, 1:8 ou 1:12 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 120 unidades (cubos e paralelepípedos) ou 60 unidades (cilindro) de biomassa imobilizada correspondente ao volume de (3,016 ± 0,041) cm³. Em seguida, a coluna foi estabilizada pela alimentação do substrato com vazão 5 vezes a de operação mínima do reator por um período de 4 h, eliminando bolhas de ar formadas durante a etapa do empacotamento. A densidade média do derivado imobilizado foi de (0,9532 ± 0,0014) g cm⁻³. O tempo de residência foi calculado de acordo com Levenspiel (1972), conforme descrito nas Equações 4.2

a 4.4. Alíquotas do meio reacional foram retiradas diariamente a fim de quantificar os ésteres etílicos formados por análise de cromatografia gasosa.

Ao final do tempo pré-estabelecido de reação, o produto da transesterificação foi removido do reator e as células imobilizadas lavadas com *terc*-butanol, a fim de remover substrato e produto residuais da matriz. As células imobilizadas foram filtradas sob vácuo até teor de umidade menor que 10%. Foram medidas a atividade hidrolítica pelo método de hidrólise do óleo de oliva (conforme metodologia adaptada de Andrade *et al.* (2012) e a massa do biocatalizador recuperado.

$$\tau = \frac{V}{v_0} \quad (4.2)$$

Em que: τ = é o tempo espacial (min), V = volume útil do reator (mL), v_0 = vazão volumétrica sobre a seção da coluna (mL h^{-1});

$$V_{\text{útil}} = V_{\text{reator}} - V_{\text{catalisador}} \quad (4.3)$$

Em que: V_{reator} = volume total do reator, $V_{\text{catalisador}}$ = volume ocupado pelo catalisador no interior do reator;

$$V_{\text{catalisador}} = \frac{w}{\rho} \quad (4.4)$$

Em que: w = massa do catalisador seco (g), ρ = densidade do biocatalisador seco (g mL^{-1}).

Figura 4.4. Esquema simplificado do reator de leito fixo tipo 1 utilizado neste projeto.

4.2.3.3. Processo em regime de fluxo contínuo em reator de leito fixo – tipo 2

Após a definição dos parâmetros de razão molar 1:6 óleo de babaçu:álcool e tempo espacial de 86 h, a reação em reator de leito fixo operando em fluxo contínuo foi reproduzida em um reator de leito fixo com razão diâmetro:altura de 1:14 (30 mm de diâmetro, 420 mm de altura e 30 mm de altura da tampa do reator, correspondente a um volume total de 320 cm³). A vazão de 0,0589 mL min⁻¹ foi ajustada com auxílio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-H ATTO), operando por um período total de 30 dias. O esquema simplificado do sistema está apresentado na Figura 4.5. 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 termoequilibrado. A coluna foi empacotada com 500 unidades cúbicas de biomassa imobilizada correspondendo a um volume de 15,72 cm³. Em seguida, foi estabilizada pela alimentação do substrato com vazão 5 vezes a da operação do reator por um período de 24 h, eliminando bolhas de ar formadas durante a etapa do empacotamento.

Figura 4.5. Esquema simplificado do reator de leito fixo tipo 2 utilizado neste projeto.

Alíquotas do meio reacional foram retiradas diariamente a fim de quantificar os ésteres etílicos formados por análise de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Ao final do tempo pré-estabelecido de reação, o produto da transesterificado foi removido do reator e as células imobilizadas lavadas com *terc*-butanol, a fim de remover substrato e produto residuais da matriz. As células imobilizadas foram filtradas sob vácuo até teor de umidade menor que 10%. Foram medidas a atividade hidrolítica pelo método de hidrólise do óleo de oliva (conforme metodologia adaptada de Andrade *et al.* (2012) e a massa do biocatalizador recuperado.

4.3. Metodologia Analítica

4.3.1. Determinação da atividade hidrolítica

A atividade enzimática das células imobilizadas foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia adaptada de Andrade *et al.* (2012) (APÊNDICE A). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 mL de azeite de oliva e 90 mL de água com adição 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 0,3 g de células imobilizadas (massa seca). Os frascos foram incubados a 37°C por 5 min, em banho termostatizado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona, etanol e água destilada (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,025 mol L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela Equação 4.5 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⁻¹ min⁻¹ (U g⁻¹).

$$A = \frac{(V_A - V_B) \times C \times 1000}{m \times t} \quad (4.5)$$

Em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_B volume do KOH gasto na titulação do branco (mL); C = molaridade da solução de KOH (mol L⁻¹); t = tempo de reação (min); m = massa seca (g).

4.3.2. 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).

4.3.3. 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.

4.3.4. 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.

4.3.5. 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 20°C para o óleo vegetal e para os ésteres de etila, utilizando 5,0 mL de amostra.

4.3.6. Determinação dos ésteres de etila

Os ésteres de etila formados foram dosados por cromatografia de fase gasosa (Cromatógrafo a gás, Varian 3800), com detector de ionização de chama e uma coluna de aço inoxidável 5% DEGS em Chromosorb WHP, 80/100 mesh, adotando metodologia previamente estabelecida por Urioste *et al.* (2008). Nitrogênio foi usado como gás de arraste. A temperatura da coluna inicialmente foi mantida a 90°C por 3 min, 120°C por 10 min e 170°C por 15 min sendo aquecida numa taxa de 25°C min⁻¹. As condições para determinação dos ésteres de etila são apresentadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Condições operacionais para determinação dos ésteres de etila por CG.

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

	Éster Etilico	Tempo (min)
	C8 EtOH =	3,28
	C10 EtOH =	5,26
	C12 EtOH =	8,56
Tempos de retenção dos monoésteres de etila	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 (M_T) em relação à massa total teórica esperada de ésteres de etila (ΣM_e). M_e foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial da matéria-prima lipídica (M_o), da massa molecular correspondente a cada ácido (MM_a) e do éster correspondente (MM_e). Este cálculo é representado pela equação 4.6 (a), em que M_o corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (C_a), com a massa inicial de óleo utilizada (M_i) equação 4.6 (b). O rendimento foi calculado dividindo a massa total de ésteres determinada pela análise de cromatografia gasosa (M_T) pela massa total teórica de ésteres de etila (M_e), conforme mostrado na equação 4.6 (c).

$$(a) \ M_e = \frac{(M_o \times MM_e)}{MM_a} \quad (b) \ M_o = C_a \times M_i \quad (c) \ R = \frac{M_T}{\Sigma M_e} \times 100 \quad (4.6)$$

4.3.7. Determinação dos mono e diacilgliceróis

Mono e diacilgliceróis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em equipamento Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Inc. SP, Brasil), com detector evaporativo de espalhamento de luz e coluna de aço inoxidável Fenomenex Gemini C18 110 A (150 x 4,6 mm) (Allcrom, Ltd., SP, Brasil), nas seguintes condições: temperatura da coluna de 40 °C e do detector de 70 °C. Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC (J. T. Baker). As fases móveis utilizadas foram: acetonitrila (A) e metanol (B) numa proporção de 80% A e 20% B por 35 min. A taxa de fluxo de 1 mL/min foi mantida durante os seis primeiros minutos; 1,5 mL/min durante os 24 min seguintes e 3,0 mL/min durante os cinco minutos restantes. Todas as amostras foram dissolvidas em acetato de etila-hexano (1:1, v/v) e o volume de injeção foi de 10 µL. Os padrões utilizados foram a monolaurina, monomiristina, monopalmitina, monoestearina, mono-oleína, dilaurina, dipalmitina, dimiristina, diestearina, dioleína. Os teores de mono e diacilgliceróis foram calculados nas amostras de biodiesel purificadas.

4.3.8. Determinação do tempo de meia vida

A atividade inicial (A_0) e residual (A) da biomassa imobilizada foi determinada com base na conversão de ésteres, em que a conversão no primeiro tempo espacial (96 h) foi considerada como sendo correspondente a 100% de atividade. Empregando o modelo de inativação de primeira ordem foram calculados as constante de inativação (K_d) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), pelas equações 4.7 e 4.8, respectivamente.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-k_d.t} \quad (4.7)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (4.8)$$

Em que A_0 e A referem-se, respectivamente, às atividades hidrolíticas inicial e final do biocatalisador.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese e Caracterização das Espumas de Poliuretano

O processo de aumento na quantidade de poros e número de poros abertos em relação à espuma de poliuretano comercial (marca Esfrebom) foi conduzido através da redução da quantidade do catalisador Kosmos 29 empregado na produção das espumas, sem que afetasse a estrutura das mesmas, e pela utilização de diferentes tipos de aminas. A redução do catalisador aumenta a quantidade de poros abertos até um limite que compromete a estrutura, o que pode ser visualizado pelo aparecimento de rachaduras. Enquanto isso, os diferentes tipos de amina (Tegoamin 33 e Tegoamin 75) influenciam no tamanho dos poros das espumas. É importante ressaltar que a estrutura química final de ambas as espumas são iguais, mudando apenas as características físicas descritas. As formulações das EPUs sintetizadas podem ser observadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Formulação das espumas de poliuretano denominadas EPU3 e EPU9.

Formulação EPU3		Formulação EPU9	
<i>Poliol Lupranol 3040</i>	100,00 g	<i>Poliol Lupranol 3040</i>	100,00 g
<i>TDI</i>	52,00 g	<i>TDI</i>	52,00 g
<i>Tegostab 8228</i>	0,80 g	<i>Tegostab 8228</i>	0,80 g
<i>Tegoamin 33</i>	0,18 g	<i>Tegoamin 75</i>	0,18 g
<i>Kosmos 29</i>	0,12 g	<i>Kosmos 29</i>	0,12 g
<i>Água</i>	4,025 g	<i>Água</i>	4,025 g
<i>Primeira agitação</i>	1000 rpm	<i>Primeira agitação</i>	1000 rpm
<i>Segunda agitação</i>	2500 rpm	<i>Segunda agitação</i>	2500 rpm

5.1.1. Permeabilidade do ar

Os nomes das formulações EPU3 e EPU9 foram decorrentes das caracterizações quanto à permeabilidade ao ar das espumas logo após a síntese, cujos resultados podem ser observados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Resultados das análise de permeabilidade ao ar.

Espuma	Perda de Carga (mmca H ₂ O)
EPU3	3
EPU9	9
Comercial	17

Nesta análise, as espumas foram submetidas a um fluxo de ar, com uma vazão de 14 L min⁻¹, e a resistência à passagem do fluxo foi expressa com base no ganho de pressão na linha. Quanto maior foi o ganho da pressão, maior a quantidade de poros fechados na espuma. Dessa forma, a espuma EPU3, foi a que apresentou menor elevação na pressão, equivalente a 3 milímetros de coluna de água (mmca), demonstrando que a formulação EPU3 foi a que resultou em uma espuma com maior quantidade de poros abertos. Quando comparadas com espuma comercial, percebeu-se que as espumas apresentaram cerca de 1,9 vezes (EPU9) a 5,7 vezes (EPU3) mais poros abertos que as disponíveis no mercado.

5.1.2. Microscopias Eletrônicas de Varredura

As microscopias eletrônicas de varredura das espumas sintetizadas e comercial são apresentadas na Figura 5.1.

Figura 5.1. Microscopia eletrônica de varredura das espumas sintetizadas. **a)** EPU3 **b)** EPU9 e **c)** Comercial.

Pode-se perceber a diferença de poros abertos pela existência ou não de películas preenchendo a abertura dos poros, predominantes na espuma comercial e poucas nas espumas EPU3 e EPU9.

5.1.3. Diâmetro Médio de Poros

As espumas foram caracterizadas também quanto ao diâmetro médio de poros, dados apresentados na Figura 5.2.

Figura 5.2. Histograma dos Diâmetros médios de Poros das espumas
a) EPU3 b) EPU9 e c) Comercial.

A Figura 5.2 permite observar que a espuma EPU3 não só apresentou o maior diâmetro de poros ($0,7874 \pm 0,2439 \mu\text{m}$) como também ampla distribuição de tamanho de poros em relação às espumas EPU9 e comercial.

5.1.4. Grau de Inchamento e Parâmetro de Solubilidade

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

Nessa avaliação, a dependência entre o grau de inchamento Q em um solvente de baixo peso molecular e o δ (parâmetro de solubilidade) deste solvente, é expressa por uma curva de Q (ordenada) *versus* δ (abscissa). Quanto menor for a reticulação maiores serão os valores de Q , ou ainda, quanto maior for a interação polímero/polímero menores serão os valores de Q .

Para determinar o parâmetro de solubilidade foi traçada a linha de tendência de Gauss, que de acordo com metodologia previamente descrita (GOPAKUMAR; NAIR, 2005; LIU *et al*, 2011) o ponto em que $dQ/d\delta = 0$ será o parâmetro de solubilidade das amostras.

Os solventes escolhidos para esta análise foram: hexano, acetato de etila, clorofórmio, etanol e *terc*-butanol, sendo os três primeiros muito utilizados para este tipo de estudo e os dois últimos escolhidos com o intuito de investigar as interações entre os solventes que serão utilizados nas etapas que se seguem às imobilizações das células íntegras. Os dados referentes aos ensaios de grau de inchamento encontram-se na Figura 5.3 e na Tabela 5.3.

Figura 5.3. Gráficos do Coeficiente de Inchamento (Q) vs Parâmetro de Solubilidade (δ) **a)** EPU3, **b)** EPU9 e **c)** Comercial.

Tabela 5.3. Dados referentes aos ensaios de grau de inchamento das espumas EPU3, EPU9 e Comercial.

Solventes	Parâmetro de solubilidade (δ) (cal cm ⁻³) ^{1/2}	Coeficiente de inchamento (Q)		
		EPU3	EPU9	Comercial
Hexano	7,30	0,0590 ± 0,0118	0,0680 ± 0,0201	0,3151 ± 0,0401
Acetato de Etila	9,05	0,7215 ± 0,0267	0,6708 ± 0,0450	0,6967 ± 0,0335
Clorofórmio	9,30	1,4926 ± 0,1339	1,7692 ± 0,1226	1,5079 ± 0,0853
Etanol	10,00	0,5941 ± 0,0016	0,5455 ± 0,0242	0,4271 ± 0,0470
<i>Terc</i> -Butanol	11,40	0,3745 ± 0,0526	0,4860 ± 0,0117	0,6288 ± 0,0796

Tabela 5.4. Valores dos Coeficientes de Intumescimento no Clorofórmio (Q) e Parâmetro de Solubilidade (δ) das espumas.

Espuma	Coeficiente de Intumescimento no Clorofórmio (Q)	Parâmetro de Solubilidade do polímero (δ) (cal cm ⁻³) ^{1/2}
EPU3	1,4926 ± 0,1339	9,4983
EPU9	1,7692 ± 0,1226	9,5004
Comercial	1,5079 ± 0,0853	9,3448

Foi possível observar que as espumas apresentaram perfis de solubilidade semelhantes para os solventes utilizados (Figura 5.3). O coeficiente usado para comparação foram os valores encontrados para o clorofórmio por ser o solvente nos quais as espumas apresentaram um maior coeficiente de inchamento, revelando assim que as polaridades e os parâmetros de solubilidade dos polímeros estão próximos ao do clorofórmio, conforme dados da Tabela 5.4.

Estes parâmetros comprovam a hidrofobicidade do suporte utilizado, caráter importante na escolha de um suporte para imobilização, uma vez que a lipase tende a ficar na sua forma aberta de modo estável quando associada a um suporte de caráter hidrofóbico, conforme esquema apresentado na Figura 5.4.

Figura 5.4. Esquema da estabilidade de uma lipase quando ligada a um suporte hidrofóbico.
Fonte: Adaptado de GARCIA-GALAN *et al.*, 2013.

5.1.5. Adsorção dos Solventes pela Matriz

Outra caracterização importante à qual as espumas foram submetidas foi a absorção dos solventes pela matriz. Com o objetivo de investigar as interações das espumas com os solventes que serão utilizados após a imobilização, foram calculadas as relações entre massa de solvente absorvida/massa de espuma. Os resultados referentes a esses ensaios encontram-se na Figura 5.5.

Figura 5.5. Gráfico de massa absorvida de solvente / massa espuma.

As adsorções dos solventes pelas espumas apresentaram diferenças que se relacionam diretamente com a quantidade de poros abertos e fechados. Tendo em vista que as estruturas dos poros das espumas são bem similares acredita-se que pelo fato da espuma comercial ter mais poros fechados conforme a análise de permeabilidade, esta espuma teve menor liberação de solventes de sua matriz, e assim a EPU3 e EPU9 foram as que liberaram mais solventes após o tempo de contato, por possuírem mais poros abertos. Deste modo, embora a massa de solvente que entrou em cada uma das espumas tenha sido semelhante, e a capacidade de retenção tenha relação direta com o número de poros fechados. As espumas EPU3 e EPU9 foram caracterizadas como as que possuem maior capacidade de troca de massa que a espuma comercial.

5.1.6. Sorção da Água e Solventes

Para completar a caracterização das espumas, buscou-se avaliar a penetração dos solventes, água, *terc*-butanol e etanol, na matriz porosa.

Na análise de sorção, todas as EPU não apresentaram resistência aos álcoois testados (*terc*-butanol e etanol), sendo constatadas que logo após o primeiro minuto, as amostras já se apresentavam completamente molhadas pelos solventes, não havendo grande variação no peso das espumas com o tempo. Logo, não foi possível avaliar

quantitativamente a sorção destes solventes. Todavia, quando foi utilizada água destilada, todas as espumas apresentaram resistência à penetração. Esta facilidade de penetração dos compostos menos polares (*terc*-butanol e etanol) e dificuldade dos compostos mais polares (água) podem ser explicadas pela estrutura química das espumas de poliuretano apresentada na Figura 5.6.

Figura 5.6. Representação da estrutura química da espuma de poliuretano (Fonte: VILAR, 2002).

Como pode ser observado não existem grupos polares livres, devido à interação das pontes de hidrogênio entre os grupos uretânicos e poliuréias, produzindo uma espuma com caráter muito pouco polar. Nesse ponto, é importante ressaltar que as diferenças entre as características físicas das espumas EPU3 e EPU9 como poros mais abertos ou menos abertos, tamanho de poros e quantidade de poros são resultantes apenas da estrutura química das aminas utilizadas. Dessa forma, a EPU3 apresenta na sua estrutura uma amina com cadeia mais longa, uma vez que a Tegoamin 75 é formada de 75% da Tegoamin® 33 e 25% da Tegoamin® BDE, resultando em um total de 17,5% de bis (2-dimetilaminoetil) éter proveniente da Tegoamin® BDE, enquanto que a Tegoamin® 33 possui na sua composição apenas a amina de trietenodiamina, de cadeia mais curta. As estruturas das aminas podem ser observadas na Figura 5.7.

Figura 5.7. Estruturas das aminas constituintes da Tegoamin® BDE e Tegoamin® 33.

Dessa forma, como as espumas não podem ser diferenciadas quanto ao caráter hidrofóbico, a diferença apresentada na sorção da água pode estar relacionada com o tamanho dos poros que devem influenciar diretamente a transferência de massa, facilitando ou dificultando a entrada e saída da fase líquida. Os resultados referentes à sorção da água são apresentados nas Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 (Dados detalhados no APENDICE B).

Figura 5.8. Gráficos de sorção de água pela espuma EPU3.

Figura 5.9. Gráficos de sorção de água pela espuma EPU9.

Figura 5.10. Gráficos de sorção de água pela espuma Comercial.

5.2. Otimização das condições de cultivo do *Mucor circinelloides*

5.2.1. Influência das variáveis temperatura e pH no crescimento da biomassa microbiana e seleção do suporte

As espumas EPU3 e EPU9, foram utilizadas como BSPs para a imobilização de células fúngicas de *Mucor circinelloides*. Para cada suporte foram avaliadas diferentes condições de cultivo: em termos de temperatura (30°C e 35°C) e pH (5,5 e 6,5). Foi dosado o pH final de todos os experimentos. Os sistemas imobilizados foram empregados como biocatalizador da reação de transesterificação do óleo de babaçu utilizando etanol como agente acilante. Foram realizadas análises de rendimento, viscosidade e densidade. Também foi avaliada a biomassa recuperada para cada reação. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.5.

Por meio dos dados da Tabela 5.5 pode-se observar que os melhores resultados de atividade e rendimento apresentados pelo suporte denominado EPU3. Este fato pode ser explicado pelo diâmetro médio de poros de cada um dos suportes. A EPU3 possui diâmetro médio duas vezes maior ($0,7874 \pm 0,2438 \mu\text{m}$) ao diâmetro médio da EPU9 ($0,4268 \pm 0,1621$). Além disso, o suporte EPU3 também possui maior número de poros abertos, que pode ser verificado pela maior permeabilidade do ar.

Quanto à estabilidade da biomassa (biomassa recuperada), rendimento, viscosidade e densidade, a condição de imobilização, dentre as utilizadas, que apresentou melhores resultados, foi a de imobilização em pH 5,5 à 35°C. Em termos de atividade hidrolítica todas as condições testadas apresentaram valores semelhantes.

Desta forma, o suporte EPU3 foi considerado o melhor suporte para a imobilização do *Mucor circinelloides* em meio de pH 5,5 com temperatura de 35°C e posterior aplicação na reação de transesterificação.

Tabela 5.5. Atividade (U g^{-1}) das biomassas imobilizadas em diferentes condições de pH e Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), rendimento (%) de transesterificação, viscosidade (cSt) e densidade (kg.m^{-3}) dos produtos.

Suporte	pH _{inicial}	pH _{final}	T ($^{\circ}\text{C}$)	Biomassa Imobilizada (g)	Biomassa Recuperada (%)	Atividade (U g^{-1})	Rendimento (%)	Viscosidade (cSt)	Densidade (kg m^{-3})
EPU3	5,5	7,85	30	4,0563	7,38	292,15	84	7,34	891,6
	5,5	6,30	35	2,1898	67,19	352,98	98	5,89	887,2
	6,5	7,91	30	2,3067	28,71	246,36	86	7,08	892,2
	6,5	7,35	35	1,4066	44,10	290,13	94	6,99	889,6
EPU9	5,5	7,72	30	3,1511	34,78	278,07	77	7,73	894,2
	5,5	6,25	35	1,9499	76,89	303,26	86	7,04	893,4
	6,5	7,87	30	2,2624	36,02	271,46	81	7,23	892,7
	6,5	7,31	35	1,0549	67,18	291,86	85	7,03	892,5

5.2.2. Efeito do tempo de cultivo na quantidade de biomassa celular imobilizada

Visando aperfeiçoar as condições determinadas (suporte EPU3 e cultivo em pH 5,5 e temperatura de 35°C), foi realizado um experimento variando o tempo de imobilização. Os resultados são apresentados na Figura 5.11.

Figura 5.11. a) Biomassa Imobilizada (g) e **b)** Atividade (U g⁻¹) em relação ao tempo (h) (imobilização na EPU3 em pH 5,5 e temperatura de 35°C).

É possível observar que um aumento em torno de 21% de biomassa imobilizada e 37% de aumento na atividade no tempo de imobilização de 96h em relação ao tempo de 48h, portanto este resultado foi utilizado para dar prosseguimento ao trabalho.

5.2.3. Influência da massa de suporte na imobilização da biomassa celular

Nesta etapa do trabalho foi estudada a quantidade de massa de suporte para imobilização, fixando as quantidades de 50, 100 e 150 unidades como padrão. Os resultados são apresentados na Figura 5.12.

Figura 5.12. a) Biomassa Imobilizada (g) e **b)** Atividade (U g⁻¹) em relação a quantidade de suporte (un.) (EPU3, pH 5,5, temperatura de 35°C e 96h de reação).

É possível perceber que a quantidade de biomassa imobilizada por unidade de suporte (*BSP*) teve um acréscimo de 15% ao dobrar a quantidade de suporte utilizada para imobilização (50 para 100 cubos). Entretanto, em um segundo acréscimo no número de cubos (150 cubos), a quantidade de biomassa imobilizada por unidade de suporte sofre uma redução de 33% em relação à biomassa do experimento realizado com 2/3 dos cubos (100) e de 21% em relação ao experimento com 1/3 dos cubos (50).

Conforme Fukuda *et al.* (2008) relataram, a quantidade de biomassa não está necessariamente ligada de forma linear à atividade do biocatalisador, necessitando então de avaliação complementar. Portanto, foram comparados os valores das atividades obtidos com o primeiro aumento das partículas do suporte e notou-se um aumento de 22% na atividade hidrolítica. No segundo aumento, porém, a atividade foi reduzida em 21%. Neste caso, portanto, uma menor quantidade de biomassa resultou também em uma menor atividade da lipase. Dessa forma, a condição de 100 cubos foi definida como ideal para a imobilização, a qual já era descrita como ideal em trabalhos anteriores, embora não houvesse estudos sobre uma quantidade maior de partículas de suporte (ANDRADE, 2012, ANDRADE *et al.*, 2012, SOARES, 2012).

5.2.4. Variação da Geometria do Suporte

Determinadas as condições ideais, buscou-se analisar a influência geométrica do suporte. Para tanto foram escolhidas 3 formas geométricas: cubo, paralelepípedo e cilindro. As dimensões, áreas superficiais e volumes podem ser observados na Tabela 5.6. Os resultados obtidos com as condições determinadas podem ser verificados na Tabela 5.7.

Tabela 5.6. Dimensões (mm), áreas superficiais (mm²) e volume (mm³) das unidades de espuma de poliuretano utilizadas como suporte para imobilização das células íntegras de *M. circinelloides*.

Formato	 Cubo	 Paralelepípedo	 Cilindro
Dimensões (mm)	6x6x6	4x5x11	h= 2 e r= 8
Área Superficial (mm ²)	216	220	402
Volume (mm ³)	216	238	502

Tabela 5.7. Biomassa Imobilizada (g) e Atividade (U g^{-1}) das células íntegras de *M. circinelloides* imobilizadas em EPU3 e EPU9 (cultivo em pH 5,5, temperatura de 35°C, 96h e 100 unidades de suporte para os formatos cúbico e paralelepípedo e 50 unidades para o formato cilíndrico. Rendimento (%) e características (viscosidade e densidade) dos produtos das etanólises do óleo de babaçu e biomassa recuperada (%).

Formato	Biomassa Imobilizada (g)	Atividade (U g^{-1})	Rendimento (%)	Viscosidade (cSt)	Densidade (kg m^{-3})	Biomassa Recuperada (%)
Cubo	2,1898	352,98	98	5,89	887,2	67,19
Paralelepípedo	1,3650	306,18	81	7,08	887,3	67,52
Cilindro	1,6810	335,73	86	7,11	889,2	44,05

Figura 5.13. Rendimentos de transesterificação em função do tempo de reação.

Segundo os resultados obtidos mostrados na Tabela 5.7 o experimento que propiciou uma melhor imobilização, melhor transferência de massa e resultou em melhor rendimento foi aquele no qual foram utilizados cubos de 6x6x6 mm como suporte para a biomassa.

Considerando que as condições de cultivo foram iguais, pode-se perceber que o formato cilíndrico resultou em uma maior perda de biomassa, que pode estar relacionada à sua alta área superficial e a agitação vigorosa do processo não contínuo. Na Figura 5.13 é possível notar que o formato cilíndrico teve um elevado rendimento inicial e com o passar do tempo, esse rendimento aumentou muito pouco, demonstrando que no início aconteceu uma boa troca de massa devido à sua grande área superficial e com o decorrer da reação houve um grande desprendimento da biomassa do suporte e consequentemente estagnação do rendimento. Já o formato paralelepípedo teve uma pequena queda na imobilização e na atividade. Entretanto, estas características, que influenciaram negativamente a conversão no processo não contínuo, podem ser úteis no processo em fluxo contínuo devido ser esse um processo que pouco agride o suporte, diminuindo a perda de biomassa (no caso do cilindro) e que pode necessitar de um maior volume útil (no caso do paralelepípedo), podendo elevar o rendimento da reação.

Para tanto, a etapa seguinte consistiu em avaliar a produção de biodiesel em fluxo contínuo em reator de leito fixo empregando a biomassa imobilizada na melhor condição de cultivo: pH 5,5 a 35°C em 96h e com 100 cubos de suporte. Quanto ao formato do suporte, como os dados de referência (ANDRADE, 2012) empregaram o suporte cúbico para imobilização, este foi escolhido como suporte para ser utilizado inicialmente no sistema em fluxo contínuo. O suporte selecionado foi analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresentada no APÊNDICE C.

5.3. Sistema Contínuo

5.3.1. Otimização da Vazão e Razão Molar

Buscou-se otimizar as condições do sistema contínuo variando o tempo espacial em 86h, 35h e 17h (sendo 86h a vazão empírica mínima possível para que o substrato conseguisse superar a resistência do suporte) e as razões molares óleo:álcool de 1:4, 1:6, 1:8 e 1:12, sendo a razão molar inicial utilizada de 1:6, pois utilizou-se como parâmetro de comparação com os dados obtidos no sistema descontínuo que já utilizava esta razão molar. Os resultados são apresentados na Figura 5.14.

Figura 5.14. Rendimentos de transesterificação (%) em função do tempo (h) com diferentes tempos espaciais (17, 35 e 86h) e razões molares óleo:álcool de **a)** 1:6, **b)** 1:4, **c)** 1:8 e **d)** 1:12.

Com base na Figura 5.14 é possível perceber que para todas as reações realizadas, o tempo espacial de 86h utilizando vazão de $1,0 \text{ mL h}^{-1}$ foi o que apresentou maiores rendimentos. É possível perceber também que o sistema que utilizou razão molar óleo:álcool 1:6 apresentou boa estabilidade, uma vez que o aumento na vazão em cinco vezes e o retorno à vazão inicial, apresentou rendimentos semelhantes aos das primeiras 96h de reação. Foi plotado o gráfico Rendimento (%) x Tempo Espacial (h) para analisar as melhores condições, bem como foi feito o histograma Biomassa Recuperada (%) x Razão Molar (Óleo:Álcool). Ambos são apresentados na Figura 5.15.

Figura 5.15. a) Gráfico dos rendimentos de transesterificação (%) em função do tempo espacial (h) e razões molares óleo:álcool de 1:4, 1:6, 1:8 e 1:2. **b)** Histograma da biomassa recuperada (%) em função das razões molares (óleo:álcool).

O gráfico dos rendimentos de transesterificação (%) em função do tempo espacial (h) apresentado na Figura 5.15 (a) comprova os resultados já observados na Figura 5.14 e o histograma apresentado na Figura 5.15 (b) mostra que a perda de biomassa variou com a razão molar, sendo que perda mínima (2%) para a razão molar óleo:álcool de 1:6. Este resultado corrobora com o fato de que após uma mudança drástica de vazão o rendimento se manteve para esta condição como observado na Figura 5.14 (a). O experimento, cuja razão molar álcool:óleo foi de 1:6, apresentou perda mínima de biomassa (2%).

5.3.2. Variação da Geometria do Suporte

A etapa seguinte consistiu em investigar o comportamento dos outros formatos de suporte em sistema de fluxo contínuo nas condições otimizadas de razão molar óleo:álcool de 1:6 e tempo espacial de 86h. Os resultados são apresentados na Figura 5.16.

Figura 5.16. Gráfico dos rendimentos de transesterificação (%) em função do tempo espacial (h) de reação: **a)** 50 unidades de suporte no formato cilíndrico e **b)** 100 unidades de suporte paralelepípedo com tempo espacial de 86h e razão molar óleo:álcool de 1:6.

Na Figura 5.16 é possível observar que ambos os formatos foram estáveis para o sistema em fluxo contínuo dentro do período de dias em que a reação foi realizada. Portanto, para analisar o melhor formato geométrico deve-se levar em conta o rendimento médio de cada sistema. Para analisar melhor estes dados foi feito um gráfico de rendimento médio (%) sobreposto sobre um histograma da biomassa recuperada (%) em função do formato do biocatalisador apresentado na Figura 5.17.

Através da Figura 5.17 é possível perceber que a Biomassa Recuperada (%) é proporcional ao Rendimento (%) obtido nas reações de transesterificação. Uma vez que a perda de biomassa está associada ao formato que possui maior ou menor capacidade de retenção/proteção das biomassas, o formato cúbico foi o que apresentou os melhores resultados.

Figura 5.17. Gráfico dos rendimentos médios de transesterificação (%) e histograma da biomassa recuperada (%) em função do formato do EPU utilizada como suporte para a biomassa.

Com base nos resultados observados, a reação de transesterificação em reator de leito fixo e sistema contínuo com tempo espacial de 86h correspondente a uma vazão de $1,0 \text{ ml h}^{-1}$, razão molar óleo:álcool de 1:6, empregando como biomassa imobilizada em 120 cubos da EPU3 sob condições de cultivo de pH 5,5 e temperatura de 35°C , foi a que apresentou maiores rendimentos ($64 \pm 1,66 \%$) e menor perda de biomassa (2%). Sendo, portanto, estes os parâmetros adotados para dar prosseguimento ao trabalho.

Para esta condição, foi ainda calculada a produtividade: $5,68 \pm 0,15 \text{ mg éster g}^{-1} \text{ meio h}^{-1}$. A produtividade obtida foi menor do que os valores reportados na literatura, em contrapartida, o rendimento apresentou resultados superiores (ANDRADE, 2012; ANDRADE *et al.*, 2014). Considerando que Damstrup, 2007 sugeriu que a produtividade poderia estar associada com as dimensões do reator, indicando que quanto maior a razão diâmetro:altura maior a produtividade até um limite de 1:14 e que a razão do reator utilizado foi menor que as reportadas, este parâmetro foi selecionado para ser verificado na próxima etapa do trabalho.

5.3.3. Variação da Configuração do Reator

Um reator de proporção diâmetro:altura 1:14 (30 mm de diâmetro, 420 mm de altura e 30 mm de altura da tampa do reator, correspondente a um volume total de 320 cm^3) foi utilizado para dar prosseguimento ao trabalho. As condições de operação do reator foram às definidas na etapa anterior do trabalho: razão molar óleo de babaçu:etanol 1:6 e tempo espacial de 86 h utilizando como biocatalisador 500 unidades de biomassa de *Mucor*

circinelloides imobilizada em espuma de poliuretano do tipo EPU3 em meio de pH 5,5, à 35°C e demais condições descritas anteriormente. Os resultados obtidos em termos de rendimento com desvio padrão e % mássica de ésteres de etila em função do tempo são apresentados na Figura 5.18.

Figura 5.18. Rendimentos de transesterificação (%) em função do tempo (h) para biodiesel de babaçu produzido em reator de leito fixo operando em regime de fluxo contínuo com configuração geométrica 1:14 diâmetro:altura, com tempo espacial de 86h e razão molar óleo:álcool 1:6.

De acordo com a Figuras 5.18 pode-se perceber que a reação de produção de biodiesel etílico de babaçu sob as condições determinadas foi estável, apresentando rendimento médio da ordem de $86 \pm 3,53$ %. A produtividade foi de $7,57 \pm 0,31$ mg éster g^{-1} meio h^{-1} e a perda da biomassa de $44,55 \pm 2,40$ %. Os resultados apresentados em termos de rendimento e produtividade foram mais elevados que o primeiro sistema contínuo que apresentou rendimento médio de $64 \pm 1,66$ % e $5,68 \pm 0,15$ mg éster g^{-1} meio h^{-1} de produtividade. Estes resultados corroboram com os resultados descritos na literatura por Damstrup, 2007, de que o rendimento e a produtividade aumentam conforme aumenta a razão diâmetro:altura do reator até um limite de 1:14. Entretanto, o sistema apresentou uma alta perda de biomassa se comparado com os 2% do primeiro sistema. Este resultado pode estar atrelado ao alto tempo

de alimentação do substrato (24 h) para estabilização do sistema e eliminação de bolhas, pois este procedimento foi realizado com vazão 5 vezes superior ($\sim 15,0 \text{ mL h}^{-1}$) a vazão normal de operação do reator ($3,5 \text{ mL h}^{-1}$). No caso da primeira configuração de reator além do período de alimentação inicial para estabilização do reator ter sido 6 vezes menor (apenas 4h), a vazão dessa alimentação inicial correspondente a 5 vezes a vazão normal de operação do reator ($\sim 5,0 \text{ mL h}^{-1}$) foi 3 vezes menor do que a utilizada no segundo reator.

Na tabela 5.8 são apresentadas as propriedades do biodiesel de babaçu obtido neste experimento correspondente as amostras do 4º dia (72-96h) e do 7º dia (144-168h). Os resultados apresentados indicam uma correspondência entre os valores de densidade, viscosidade cinemática e rendimento obtido.

Tabela 5.8. Propriedades do biodiesel de babaçu obtido em reator de leito fixo operando em regime de fluxo contínuo com configuração geométrica 1:14 diâmetro:altura, com tempo espacial de 86h e razão molar óleo:álcool 1:6.

Propriedade	Valor	
	4º dia (72-96 h)	7º dia (144-168 h)
Densidade 20°C (kg m^{-3})	889,3	891,1
Viscosidade cinemática a 40 °C ($\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}$)	5,79	6,35
Composição de ésteres etílicos (% m/m)		
Etil Caprilato (C8)	2,60	2,92
Etil Capronato (C10)	2,22	2,48
Etil Laurato (C12)	33,65	35,43
Etil Miristato (C14)	9,85	10,11
Etil Palmitato (C16)	6,05	5,01
Etil estearato (C18)	2,13	2,38
Etil oleato (C18:1)	10,30	7,49
Etil Linoleato (C18:2)	2,82	2,54
Total	69,61	68,35
Rendimento (%)	92,67	90,20
Monoglicerídeos (% m/m)	5,39	7,65
Diglicerídeos (% m/m)	1,78	1,89
Triglicerídeos (% m/m)	0	0

Para estimar o tempo de meia-vida do biocatalisador, avaliando assim a sua estabilidade operacional, os resultados experimentais, apresentados na Figura 5.18, 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 4.7 e 4.8 descritas no item 4.3.8. O ajuste dos dados obtidos está ilustrado na Figura 5.19.

Figura 5.19. Ajuste do modelo de desativação das células imobilizadas de *M. circinelloides* 4182 na etanólise contínua do óleo de babaçu conduzida em reator de leito fixo (configuração geométrica 1:14 diâmetro:altura) em regime de fluxo contínuo com tempo espacial de 86h e razão molar óleo:álcool de 1:6.

Neste trabalho, um tempo de meia vida de 138,9 dias e um coeficiente de desativação de 0,00499 h⁻¹ foram estimados. Estes valores foram considerados bastante bons quando comparados aos valores reportados na literatura (ANDRADE *et al.*, 2014).

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo aperfeiçoar os parâmetros de produção de biodiesel etílico através da rota enzimática em reator de leito fixo e regime de fluxo contínuo utilizando células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano. Os resultados obtidos demonstraram que:

- As espumas de poliuretano sintetizadas apresentaram propriedades melhores que as da comercial para aplicação na imobilização de células íntegras de *Mucor circinelloides* e subsequente aplicação em reações de produção de biodiesel.
- A biomassa imobilizada em pH 5,5 a 35°C em 96h e com 100 cubos de suporte EPU3 foi a que apresentou resultados de conversão mais elevados tanto para o reator batelada (98%) como para o reator de leito fixo operando em sistema contínuo ($64 \pm 1,66$ %) para um reator com razão diâmetro:altura 1:1,2. Os resultados encontrados foram superiores aos relatados na literatura tanto para o reator batelada como para o reator de leito fixo e sistema contínuo.
- O melhor resultado em termos de rendimento no sistema contínuo para o reator com razão diâmetro:altura 1:1,2 foi obtido com um tempo espacial de 86 h e razão molar óleo:álcool de 1:6, com 120 cubos de biomassa imobilizada e foi da ordem de $64 \pm 1,66$ %, produtividade de $5,68 \pm 0,15$ mg éster g⁻¹ meio h⁻¹ e 2% de perda de biomassa.
- Os parâmetros otimizados no reator com razão diâmetro:altura 1:1,2 foram dimensionados para um reator com razão diâmetro:altura 1:14 obtendo resultados superiores de rendimento ($86 \pm 3,53$ %) e produtividade ($7,57 \pm 0,31$ mg éster).
- O resultado apresentado em termos de produtividade ($7,57 \pm 0,31$ mg éster) foi baixo em comparação com os resultados na literatura, porém nesta reação uma alta perda de biomassa ($44,55 \pm 2,40$ %) foi decorrente do alto fluxo da alimentação inicial do substrato.
- Apesar da baixa produtividade, o reator de leito fixo operando em sistema contínuo com razão diâmetro:altura 1:14, apresentou resultados de rendimento ($86 \pm 3,53$ %) superiores e mais próximos aos valores obtidos no batelada com as mesmas condições (98%) do que os reportados na literatura para o mesmo substrato, além de um tempo de meia vida de 138,9 dias, valor três vezes superior aos reportados em trabalhos científicos até então.

7. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar o experimento do reator de leito fixo com razão diâmetro:altura 1:14 operando em fluxo contínuo, utilizando como vazão de alimentação inicial do substrato a mesma da reação ($3,5 \text{ mL h}^{-1}$) para avaliar a perda de biomassa inicial e seu impacto no rendimento e produtividade da reação.
- Verificar o rendimento e a produtividade da reação bem como a estabilidade do biocatalisador para o reator de leito fixo com razão diâmetro:altura 1:1,2 operando em série (2 ou mais reatores).

REFERÊNCIAS

AL-ZUHAIR, S; ALMENHALI, A; HAMAD, I; ALSHEHHI, M; ALSUWAIDI, N; MOHAMED, S. Enzymatic production of biodiesel from used/waste vegetable oils: Design of pilot plant. **Renewable Energy**, v. 36, p. 2605-2614, 2011.

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, n.3, p.337-346, 2007.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th ed. Local: AOCS Press, 2004.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard test methods for flexible cellular materials – slab, bonded, and molded urethane foams**. ASTM D3574, 2011.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard test methods for rubber property – effect of liquids**. ASTM D471, 2011.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard test methods for sorbent performance of absorbents**. ASTM F712/26, 2011.

ANDRADE, G. S. S. **Produção de biodiesel a partir de óleos vegetais usando Células Integras imobilizadas de Fungos Filamentosos com elevada atividade lipolítica (Glicerol Éster Hidrolase E.C. 3.1.1.3.)** 158 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.

ANDRADE, G. S. S. ; CARVALHO, A. K. F. ; ROMERO, C. M. ; OLIVEIRA, P. C. ; DE CASTRO, H. F. . *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 84, p. 183-188 2014.

ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 183-188, 2012.

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**, n. 34, p. 1185-1194, 2009.

AULAKH, S. S.; PRAKASH, N. T.; PRAKASH, R. Transesterification of triglycerides by dried biomass of *Aspergillus* sp. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 5, p. 297-303, 2013.

BABAÇU. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/plantas/babacu/babacu.htm>> Acesso em: 01 de Setembro de 2013.

BALAT, M. Potential alternatives to edible oils for biodiesel production – a review of current work. **Energy Conversion and Management**, v.52, p.1479-1492, 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.

BALAT, M.; BALAT, H. Progress in biodiesel processing. **Applied Energy**, v. 87, p. 1815-1835, 2010.

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

BALTARU, R; GALACTION, A. I; CASCAVAL, D. Bioreactors of “Basket” type with immobilized biocatalysts.. In: WSEAS INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOMEDICAL ELECTRONICS AND BIOMEDICAL INFORMATICS, 2., 2009. p. 238-243- ISBN: 978-960-474-110-6, ISSN: 1790-5125.

BAYNE, L.; ULIJN, R. V.; HALLING, P. J. Effect of pore size on the performance of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 9000-9010, 2013.

BISEN, P. S.; SANODYIA B. F.; THAKUR, G. S.; BAGHEL, R. K.; PRASAD, G. B. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1019-1030, 2010.

BRUNSCHWING, C; MOUSSAVOU, W; BLIN, J. Use of ethanol for biodiesel production. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 283-301, 2012.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. **Engenharia Enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003.

CADENA, P.G.; JERONIMO, R.A.S.; MELO, J.M.; SILVA, R.A.; LIMA FILHO, J.L.; PIMENTEL, M.C.B. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1595-1602, 2010.

CARVALHO, L. M. G.; ABREU, W. C.; SILVA, M. G. O.; SILVA, J. R. O.; OLIVEIRA, J. E.; MATOS, J. M. E.; MOURA, C. V. R.; MOURA, E. M. Heterogeneous catalysis afford biodiesel of babassu, castor oil and blends. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 24, n.4, p. 550-557, 2013.

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.

CHANG, C.; CHEN, J.; CHANG, C. J.; WU, T.; SHIEH, C.; Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by isopropanolysis in a continuous packed-bed reactor using response surface methodology. **New Biotechnology**, v. 26, n. 3-4, p. 187-192, 2009.

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

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

CIFTCI, O. N; TEMELLI, F. Enzymatic conversion of corn oil into biodiesel in a batch supercritical carbon dioxide reactor and kinetic modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 75, p. 172-180, 2013.

COSTA, B. J; OLIVEIRA, S. M. M. **Dossiê técnico: produção de biodiesel**. Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná, 2006.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-

commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5508–5516, 2010.

DA SILVA, V.R.; MOSIEWICKI, M.A.; YOSHIDA, M.I.; DA SILVA, M.C.; PABLO M. STEFANI, MARCOVICH, N.E. Polyurethane foams based on modified tung oil and reinforced with rice husk ash II. **Mechanical Characterization Polymer Testing**, v. 32, p. 665-672, 2013.

DAEMI, H.; BARIKANI, M.; BARMAR, M. Compatible compositions based on aqueous polyurethane dispersions and sodium alginate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n.1, p. 490-496, 2013.

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

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

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

DORS, G; FREITAS, L; MENDES, A. A; FURIGO JR, A; DE CASTRO, H. F. Transesterification of palm oil catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase in a packed-bed reactor. **Energy&Fuels**, v. 26, p. 197-203, 2012.

FUKUDA, H.; HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; NODA, H. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. **Trends in Biotechnology**. v. 26, n. 12, 2008.

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

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

GOPAKUMAR, S.; NAIR, M. R. G. Determination of molecular parameters of NR/PU block copolymers by transport studies. **European Polymer Journal**, v. 41, n.9, p. 2002-2009, 2005.

GUI, M. M.; LEE, K. T.; BHATIA, S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. **Energy**, v. 33, p. 1646-1653, 2008.

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

HWANG, H. T.; QI, F.; YUAN, C.; ZHAO, X.; RAMKRISHNA, D.; LIU, D.; VARMA, A. Review. Lipase-Catalyzed Process for Biodiesel Production: Protein Engineering and Lipase Production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 4, 2014.

KANSEDO, J.; LEE, K. T.; BHATIA, S. *Cerbera odollam* (sea mango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. **Fuel**, v. 88, n. 6, p. 1148-1150, 2009.

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

KURKI, A.; HILL, A.; MORRIS, M. **Biodiesel: the sustainability dimensions**. ATTRA – National Sustainable Agriculture Information Service, p. 4, 2010. Disponível em: <http://www.attra.ncat.org/attra-pub/biodiesel_sustainable.html>. Acesso em: 01/09/2013.

LEE, J. H.; KIM, S. B.; PARK, C.; TAE, B.; HAN, S. O.; KIM, S.W. Development of batch and continuous processes on biodiesel production in a packed-bed reactor by a mixture of immobilized *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 365–371, 2010.

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

LEVENSPIEL, O. **Chemical Reaction Engineering**, 2nd ed. New York: John Wiley, 1972.

LI, A.; THAO, P. N.; YAN, J.; TIAN, K.; LI, Z. Whole cell based solvent-free system for one pot production of biodiesel from waste grease. **Bioresource Technology**. v. 144, p. 725-729, 2012.

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, 2007.

LIU, X.; XU, K.; LIU, H.; CAI, H.; SU, J.; FU, Z.; GUO, Y.; CHEN, M. Preparation and properties of waterborne polyurethanes with natural dimer fatty acids based polyester polyol as soft segment. **Progress in Organic Coatings**, v.72, n.4, p. 612-620, 2011.

MATA, T. M.; SOUSA, I. R. B. G.; VIEIRA, S. S.; CAETANO, N. S. Biodiesel production from corn oil via enzymatic catalysis with ethanol. **Energy&Fuels**. v. 26, p. 3034-3041, 2012.

MEUNIER, S. M.; LEGGE, R. L. Evaluation of diatomaceous earth supported lipase sol gels as a medium for enzymatic transesterification of biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 92-87. 2012.

NARWAL, S. K.; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology Letter**, v. 35, p. 479-490, 2013.

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

PARAWIRA, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, p. 82-83, 2009.

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

PRIEGNITZ, B. E.; WARGENAU, A.; BRANDT, U.; ROHDE, M.; DIETRICH, S.; KWADÉ, A.; KRULL, R.; FLEIBNER, A. The role of initial spore adhesion on pellet and biofilm formation in *Aspergillus niger*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, p. 30-38, 2012.

RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic Biotechnology**. 3rd ed. United Kingdom: Cambridge University Press, 2006.

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

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 126-131, 2010.

SCHIPPER, M. A. A. On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. Studies in mycology, n. 12, p. 40, CBS, Baarn, 1976.

SHAHID, E. M.; JAMAL, Y. Production of biodiesel: A technical review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4732-4745, 2011.

SILVA, W. C.; TEIXEIRA, L. F.; CARVALHO, A. K. F.; MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F. Influence of feedstock source on the biocatalyst stability and reactor performance in continuous biodiesel production. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry - Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, p. 881-886, 2014.

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

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.

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

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

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

VILAR, W. D. **Química e tecnologia dos poliuretanos**, Vilar Consultoria Técnica, Disponível em: <<http://www.poliuretanos.com.br>> Acesso em: 01 de Setembro de 2013.

WANG, X; LIU, X; ZHAO, CM; DING, Y; XU, P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase–nanoparticle biocomposite. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6352-6355, 2011.

XIA, C.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; HU, B. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. **Biotechnology for Biofuels**, n. 4, p. 15, 2011.

YAAKOB, A; MOHAMMAD, M; ALHERBAWI, M; ALAM, Z; SOPIAN, K. Overview of production of biodiesel from Waste cooking oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 18, p. 184-193, 2013.

YOSHIDA, A.; HAMA, S.; TAMADAMI, N.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Improved performance of a packed-bed reactor for biodiesel production through whole-cell biocatalysis employing a high-lipase-expression system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 76-80, 2012.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas Imobilizadas. In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (ed.) **Enzimas como agentes biotecnológicos**, Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 4. p.35-85.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 1989.

APÊNDICE A

Determinação das condições reacionais para cálculo da atividade hidrolítica da biomassa imobilizada de *M. circinelloides* em suporte de poliuretano

A atividade enzimática das células imobilizadas foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia adaptada de Andrade *et al.* (2012). O substrato foi preparado pela emulsão de azeite de oliva e água nas proporções 10:90 e 25:75 com adição 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 0,3 g de células imobilizadas (massa seca). Os frascos foram incubados a 37°C por 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 30,0 minutos, em banho termostatizado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona, etanol e água destilada (1:1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,025 mol L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador. Um branco foi feito sem adição de biocatalisador para identificar os ácidos graxos livres no início da reação. Os cálculos foram realizados pela Equação 1 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⁻¹ min⁻¹ (U g⁻¹). Os ácidos graxos formados foram calculados pela Equação 1 sem a divisão pelo tempo de reação.

$$A = \frac{(V_A - V_B) \times C \times 1000}{m \times t} \quad (1)$$

Em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_B volume do KOH gasto na titulação do branco (mL); C = molaridade da solução de KOH (mol L⁻¹); t = tempo de reação (min); m_{seca} = massa seca (g).

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 1 e na Tabela 1. De acordo com os resultados apresentados, utilizou-se a faixa de valores crescentes para quantidade de ácidos graxos formados e baixo desvio padrão para atividade hidrolítica dosada, para selecionar como tempo ideal e fonte de carbono 5 minutos e 10% de óleo de azeite de oliva respectivamente.

Figura 1. Ácidos graxos formados em função do tempo (min) dosados a partir da reação de hidrólise do azeite de oliva utilizando como biocatalisador células íntegras de *M. circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano PU3 sintetizada.

Tabela 1. Atividade hidrolítica em função do tempo (min) dosada a partir da reação de hidrólise do azeite de oliva utilizando como biocatalisador células íntegras de *M. circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano PU3 sintetizada.

Tempo (min)	Atividade (U g ⁻¹)	
	25% Azeite	10% Azeite
0	0,00	0,00
0,5	2850,64 ± 13,51	2831,04 ± 8,41
1	1532,08 ± 12,59	1504,49 ± 9,91
2,5	680,48 ± 0,73	682,14 ± 6,29
5	352,98 ± 0,92	383,55 ± 2,03
7,5	244,49 ± 2,49	271,39 ± 3,77
10	183,86 ± 2,05	211,12 ± 4,02
15	123,91 ± 0,12	143,14 ± 3,70
30	61,81 ± 0,69	71,18 ± 0,22

APÊNDICE B

Tabela 1. Dados referentes aos ensaios de absorção de solventes pelas espumas PU3, PU9 e Comercial.

Solventes	Absorção ($m_{\text{solvente}}/m_{\text{espuma}}$)		
	PU3	PU9	Comercial
Etanol	$11,0923 \pm 0,3879$	$13,6975 \pm 0,9367$	$27,1058 \pm 0,4052$
<i>Terc</i>-Butanol	$11,3654 \pm 0,4220$	$13,6521 \pm 0,8617$	$23,8707 \pm 0,6784$

Tabela 2. Dados referentes aos ensaios de sorção da água pela espuma PU3.

Tempo (min)	Massa média do conjunto (g)	Sorção ($m_{\text{água}} / m_{\text{espuma}}$)
0	$0,1448 \pm 0,0050$	-
1	$0,8038 \pm 0,0341$	$4,5589 \pm 0,3896$
5	$0,9651 \pm 0,0268$	$5,6661 \pm 0,0522$
10	$1,0848 \pm 0,0390$	$6,4993 \pm 0,4195$
30	$1,2706 \pm 0,0683$	$7,7806 \pm 0,5379$
60	$1,4729 \pm 0,1027$	$9,0687 \pm 0,2737$
120	$1,5849 \pm 0,0118$	$9,8484 \pm 0,3810$
1440	$2,1100 \pm 0,1197$	$13,4276 \pm 0,2048$
2880	$3,8316 \pm 0,1061$	$25,2162 \pm 0,3903$
4320	$5,1958 \pm 0,5378$	$32,4886 \pm 5,1035$

Tabela 3. Dados referentes aos ensaios de sorção da água pela espuma PU9.

Tempo (min)	Massa média do conjunto (g)	Sorção ($m_{\text{água}} / m_{\text{espuma}}$)
0	$0,1682 \pm 0,0173$	-
1	$0,9448 \pm 0,1038$	$4,6144 \pm 0,1616$
5	$1,0758 \pm 0,0172$	$5,4418 \pm 0,6902$
10	$1,1986 \pm 0,0440$	$6,1635 \pm 0,5899$
30	$1,4306 \pm 0,1253$	$7,5189 \pm 0,3932$
60	$1,5728 \pm 0,1226$	$8,3724 \pm 0,4739$
120	$1,8129 \pm 0,0488$	$9,8366 \pm 0,8852$
1440	$2,8665 \pm 0,3168$	$16,0306 \pm 0,3206$
2880	$4,2762 \pm 0,6100$	$24,3531 \pm 1,3618$
4320	$4,9829 \pm 0,2307$	$28,7735 \pm 2,4545$

Tabela 4. Dados referentes aos ensaios de sorção da água pela espuma comercial.

Tempo (min)	Massa média do conjunto (g)	Sorção ($m_{\text{água}} / m_{\text{espuma}}$)
0	$0,0396 \pm 0,0003$	-
1	$0,1991 \pm 0,0158$	$4,0289 \pm 0,4304$
5	$0,2345 \pm 0,0196$	$4,9239 \pm 0,5321$
10	$0,3045 \pm 0,0451$	$6,6942 \pm 1,1838$
30	$0,3718 \pm 0,0208$	$8,3888 \pm 0,5446$
60	$0,4594 \pm 0,0529$	$10,6056 \pm 1,3939$
120	$0,5722 \pm 0,0420$	$13,4522 \pm 1,1306$
1440	$0,8776 \pm 0,0591$	$21,1660 \pm 1,6001$
2880	$1,3927 \pm 0,0987$	$34,1815 \pm 2,7117$
4320	$1,4575 \pm 0,0815$	$35,8124 \pm 2,2450$

APÊNDICE C

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura da biomassa imobilizada na PU3 (pH 5,5 e temperatura de 35°C).