

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

**Ana Paula Teixeira da Silva**

**Síntese de biolubrificantes por transesterificação de lipídeo microbiano com óleo fúsel empregando catalisador heterogêneo químico e bioquímico**

Lorena  
2019



ANA PAULA TEIXEIRA DA SILVA

**Síntese de biolubrificantes por transesterificação de lipídeo microbiano com óleo fúsel empregando catalisador heterogêneo químico e bioquímico**

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

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Caroline M. Da Rós

**Versão Original**

Lorena  
2019

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

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

Silva, Ana Paula Teixeira da  
Síntese de biolubrificantes por transesterificação  
de lipídeo microbiano com óleo fúsel empregando  
catalisador heterogêneo químico e bioquímico / Ana  
Paula Teixeira da Silva; orientadora Patrícia  
Caroline Molgero da Rós - Versão Original. - Lorena,  
2019.  
100 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós  
Graduação em Engenharia Química na Área de  
Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de  
Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.  
2019

1. Biolubrificante. 2. Microalgas. 3. Lipase. 4.  
Óleo fúsel. I. Título. II. Molgero da Rós, Patrícia  
Caroline , orient.

*Dedico este trabalho ao meu maior motivador,  
Arthur.*



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido sonhar, em colocar pessoas especiais nesse processo e fortalecendo a minha fé. Obrigada Senhor por me capacitar a conquistar esse sonho, por ter o carinho de escolher pessoas tão especiais e poder sentir através destas o seu amor para comigo e que através de todo esse processo houve um capricho em cada detalhe.

Ao meu filho Arthur, por ter mudado a minha vida, me fazendo amor todos os dias e inspirando a cada dia ir mais longe. À minha mãe Neide, que mesmo sem entender o que faço, cuidou com muito amor do meu filho para que esse processo fosse mais leve.

Aos meus avós, Vicente e Henriqueta por toda base, sabedoria e humanidade que fez com que a nossa família fosse tão especial. Aos meus tios Marcelo e Marilea que foram os grandes responsáveis para que hoje eu estivesse aqui, me cuidando nos pequenos detalhes. À minha Tia Maria Helena e minha prima Gina Olissara, por todo o suporte me ajudando a superar alguns obstáculos.

À Profa. Dra. Patrícia, minha orientadora e presente de Deus na minha vida. Agradeço pela paciência, carinho, incentivo e pelo apoio em cada etapa deste trabalho. Obrigada por sua contribuição na minha evolução profissional.

À Profa. Dra. Heizir, pela valiosa co-orientação, por cada um de seus ensinamentos, por seu exemplo e apoio constante. Obrigada pelo carinho, pela disponibilidade e por acreditar em mim.

Aos meus queridos amigos Bárbara Camelo, Denise Palma, Cintia Costa, Cintia Rosa, Isadora Teixeira, Valdmir e Wallyson Ribeiro por todo carinho e me manter confiante em minhas escolhas.

Ao meu namorado Edson Ribeiro, por toda paciência, sensibilidade, cuidado e amor para comigo. Obrigada pelas palavras de carinho, pelo afeto, por estar ao meu lado nessa caminhada.

Aos amigos de laboratório que me acompanharam e me ajudaram nesta etapa: Dra. Ana Karine, Dra. Annie Ceron, Carolina Azevedo, Dr. Cristiano Reis, Dra. Daniela Cortez, Dr. Eduardo Bredda, Heitor Buzetti, Profa. Dra. Larissa, Mateus Casagrande, Dra. Renata Vilas Bôas, Rosemar Lima e Savienne Elerbrock.

Aos Professores da EEL-USP, Dra. Jayne, Dra. Liana e Dr. Pedro, pela sua colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Lúcia Pradella por ter me inspirado a seguir na pesquisa. Obrigada por toda paciência, motivação e carinho.

Aos meus professores Alessandra Pacini, Ana Maria Barbosa, Angela Krabbe, Fátima Borca, Francisco Rocha, Heidi Korzenowski, Ivone Oliveira, Juvalina Pereira, Liu Ycho, Mônica Barbosa, Valdirene Silva e Vanesa Mitchell que foram responsáveis pela minha base na engenharia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido.



## RESUMO

SILVA, A. P. T. da **Síntese de biolubrificantes por transesterificação de lipídeo microbiano com óleo fúsel empregando catalisador heterogêneo químico e bioquímico**. 2019. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de ésteres com propriedades lubrificantes a partir de matérias-primas renováveis, como a biomassa microbiana, e um subproduto da indústria sucroalcooleira (óleo fúsel), avaliando a eficiência de catalisadores heterogêneos (bioquímicos e químicos) por meio de duas rotas catalíticas: 1) transesterificação do óleo microalgal empregando a lipase de *Burkholderia cepacia* (LBC) imobilizada em Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 2) transesterificação direta da biomassa microbiana catalisada por H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub> impregnado em Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. O trabalho foi desenvolvido em cinco etapas. Inicialmente, a microalga *Dunaliella salina* foi cultivada em fotobiorreator de coluna de bolhas com capacidade de 10 L visando obtenção de material lipídico suficiente para as reações. Foram realizados 15 cultivos, obtendo-se um volume total de 150 L, correspondente a 172,5 g de biomassa e 32,76 g de material lipídico. Em seguida foram preparados os catalisadores propostos por protocolos já estabelecidos, sendo obtido para o catalisador químico acidez superficial de 5,644 mmol H<sup>+</sup> g<sup>-1</sup> e para o catalisador bioquímico elevada atividade hidrolítica (1400 ± 103 U g<sup>-1</sup>). Na terceira etapa, as reações de transesterificação por catálise bioquímica, empregando o óleo microalgal e diferentes aceptores do grupo acila (alcoóis etílico, butílico e isoamílico) óleo fúsel simulado e óleo fúsel foram conduzidas em reatores de vidro com capacidade de 50 mL, contendo 10 gramas de meio reacional à 45 °C e agitação magnética (150 rpm), durante um período máximo de 120 h, empregando iso-octano como solvente. Como reação controle foram efetuados testes com óleo de macaúba nas mesmas condições reacionais. A transesterificação direta da biomassa microalgal, empregando como catalisador H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub> impregnado em Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> foi a quarta etapa do trabalho, em que as reações foram conduzidas em reator pressurizado (Parr Série 5500), a 250 °C, agitação de 300 rpm e razão molar 1:180 material lipídico/aceptor do grupo acila. Finalmente, os produtos obtidos foram purificados e quantificados por cromatografia gasosa, RMN <sup>1</sup>H, viscosimetria e teor de glicérides. Os resultados obtidos demonstraram o potencial da microalga *Dunaliella salina* na produção de biolubrificantes, visto que ambos os catalisadores (químico e bioquímico) atuaram de forma eficiente convertendo os ácidos graxos presentes no óleo microalgal nos ésteres alquílicos correspondentes. Apesar do desempenho similar dos catalisadores testados, a via química foi superior em relação à via bioquímica, fornecendo conversões mais elevadas (≤ 92 %) em menor tempo reacional. Com relação à qualidade dos produtos obtidos nas reações que forneceram elevadas conversões (≥ 95 %) foram constatados baixos teores de monoacilglicéreis (≤4 %) e diacilglicéreis (≤1,73 %). As viscosidades cinemáticas a 40 °C confirmaram o elevado grau de transesterificação do óleo de microalga modificando a viscosidade inicial do óleo de 60,1 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> para valores na faixa entre 4,6 a 11,3 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios demonstrando que os catalisadores heterogêneos testados possuem potencial para a produção de ésteres com potencial uso como lubrificantes a partir da biomassa microalgal de *D. salina* e óleo fúsel.

**Palavras-chave:** Biolubrificante. Microalgas. Lipase. Óleo fúsel.

### ABSTRACT

SILVA, A. P. T. da **Synthesis of biolubricants by transesterification of microalgal oil with fusel oil using chemical and biochemical heterogeneous catalysts.** 2019. 100p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

This study aimed to synthesize lubricant esters from two renewable raw materials, microalgal biomass and a by-product of the sugar-ethanol industry (fusel oil), via two routes: i) transesterification of microalgal oil with fusel oil using lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized on Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and ii) direct transesterification of microalgal biomass with fusel oil catalyzed by H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub> impregnated in Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. The study was carried out in five stages. First, *Dunaliella salina* microalgae were grown in a 10 L bubble column photobioreactor. Fifteen batches were cultivated (150 L), yielding 172.5 g of biomass and 32.76 g of microbial oil. In the second stage, the catalysts were prepared according to established protocols. The chemical catalyst had a surface acidity of 5.644 mmol H<sup>+</sup> g<sup>-1</sup>, and the biochemical catalyst had a hydrolytic activity of 1400 ± 103 U g<sup>-1</sup>. In the third stage, enzymatic transesterification reactions were catalyzed by immobilized *B. cepacia* using microbial oil and fusel oil components (ethyl, butyl, or isoamyl alcohols) and simulated fusel oil as acyl acceptors. Reactions were carried out in a 50 mL glass reactor containing 10 g of reaction medium at 45 °C under constant magnetic stirring (150 rpm) for a maximum of 120 h using isooctane as solvent. Macauba oil was used as a control under the same reaction conditions. The fourth stage consisted of direct transesterification of microalgal biomass at a ratio of 1:180 lipid material/acyl acceptor catalyzed by H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub> impregnated in Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in a pressurized reactor (Parr 5500 series) at 250 °C under constant agitation (300 rpm). Finally, products were purified and quantified by gas chromatography, <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, viscosimetry, and glyceride analysis. The results demonstrated the potential of *D. salina* as feedstock lipid for the production of biolubricants. Both chemical and biochemical catalysts efficiently converted microalgal oil fatty acids into their corresponding alkyl esters. Although the catalysts showed similar performance, the chemical pathway provided higher conversions (≤92 %) at shorter reaction times. The products obtained from high-conversion reactions (≥95 %) had low monoacylglycerol (≤4 %) and diacylglycerol (≤1.73 %) contents. Kinematic viscosities at 40 °C confirmed the high degree of transesterification of microalgal oil: viscosity decreased from 60.1 to 4.6–11.3 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> after modification. The heterogeneous catalysts have potential to be used for the production of lubricant esters from *D. Salina* biomass and fusel oil.

**Keywords:** Biolubricant. Microalgae. Lipase. Fusel oil.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Reação de esterificação.....	22
<b>Figura 2</b> - Etapas da reação de alcoólise.....	22
<b>Figura 3</b> - Imagem de microscopia eletrônica de varredura obtida na literatura de células da microalga <i>Dunaliella salina</i> .....	25
<b>Figura 4</b> - Imagens ilustrando: (a) "racewaypond" e os fotobiorreatores: (b) coluna de bolhas; (c) tubular e (d) placas planas. ....	27
<b>Figura 5</b> - Produção global de etanol por país entre os anos de 2007 a 2015.....	33
<b>Figura 6</b> - Esquema das etapas envolvidas no desenvolvimento do trabalho experimental. ....	39
<b>Figura 7</b> - Fotobiorreator do tipo coluna de bolhas, de formato cilíndrico com diâmetro de 15 cm, altura de 1 m e capacidade útil de 10 L. ....	43
<b>Figura 8</b> - Sistema utilizado nas reações de transesterificação do óleo microalgal. ....	47
<b>Figura 9</b> - Sistema utilizado nas reações de transesterificação direta da biomassa microalgal. ....	48
<b>Figura 10</b> - Micrografia eletrônica do óxido de nióbio silanizado, ativado, derivado imobilizado e derivado imobilizado recuperado após reação. ....	56
<b>Figura 11</b> - Espectros de FTIR das amostras de óxido de nióbio puro e óxido de nióbio ativado (a), lipase LBC livre e imobilizada em óxido de nióbio (b). ....	58
<b>Figura 12</b> - Gráficos da relação das atividades hidrolíticas da LBC livre (a), imobilizada no suporte inorgânico Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (b), em função de diferentes concentrações do substrato, e ajuste ao modelo de <i>Michaelis-Menten</i> . ....	61
<b>Figura 13</b> - Desativação térmica da LBC livre e imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (experimentos conduzidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 6,5 sob temperatura de 45 °C)....	64
<b>Figura 14</b> - Conversão do óleo de macaúba em ésteres de etila empregando razão molar óleo/etanol de 1:8 catalisada pela LBC imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> . ....	67
<b>Figura 15</b> - Perfil dos ésteres formados na transesterificação do óleo de macaúba com etanol na razão molar 1:8 usando a LBC imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> para 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de reação. ....	67
<b>Figura 16</b> - Influência da razão molar na conversão do óleo em ésteres de butila utilizando LBC imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> . ....	68
<b>Figura 17</b> - Perfil de formação dos ésteres na transesterificação do óleo de macaúba com butanol em diferentes razões molares: 1:6 (a) e 1:8 (b), usando LBC imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> para 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de reação.....	69

<b>Figura 18</b> - Influência da razão molar na formação de ésteres de isoamila utilizando lipase <i>B. cepacia</i> immobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .....	70
<b>Figura 19</b> - Perfil de formação dos ésteres na transesterificação do óleo de macaúba com álcool isoamílico em diferentes razões molares usando LBC immobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> para 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de reação.....	71
<b>Figura 20</b> - Influência do tipo de aceptor do grupo acila na formação de ésteres de macaúba utilizando razão molar 1:8 óleo/álcool e LBC immobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> como biocatalisador. ....	72
<b>Figura 21</b> - Formação de ésteres empregando óleo microalgal e diferentes aceptores do grupo acila na razão molar fixa 1:8 óleo/álcool catalisada pela LBC immobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (a-etanol, b-butanol, c-isoamílico, d-comparação). ....	73
<b>Figura 22</b> - Perfil de formação dos ésteres na transesterificação do óleo microalgal com diferentes aceptores do grupo acila na razão molar 1:8 usando LBC immobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> para 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de reação.....	75
<b>Figura 23</b> - RMN <sup>1</sup> H do óleo microalgal e ésteres obtidos pelas reações com os respectivos aceptores do grupo acila: etanol, butanol, isoamílico, óleo fúsel simulado e óleo fúsel. ....	77
<b>Figura 23</b> - RMN <sup>1</sup> H do óleo microalgal e ésteres obtidos pelas reações com os respectivos aceptores do grupo acila: etanol, butanol, isoamílico, óleo fúsel simulado e óleo fúsel. ....	78
<b>Figura 24</b> - RMN <sup>1</sup> H do produto resultante da transesterificação do óleo de macaúba com diferentes aceptores do grupo acila: etanol e óleo fúsel na razão molar 1:180 óleo/álcool para 6 h de reação.....	80
<b>Figura 25</b> - RMN <sup>1</sup> H da reação de transesterificação empregando a biomassa direta da microalga <i>D. salina</i> com diferentes aceptores do grupo acila: etanol, butanol, álcool isoamílico, óleo fúsel simulado e óleo fúsel na razão molar 1:180 óleo/álcool para 6 h de reação. ....	82
<b>Figura A1</b> - Difractogramas de raios-x a) suporte Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e b) catalisador H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> /Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .....	98
<b>Figura A2</b> - Micrografias do catalisador H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> /Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> . ....	99
<b>Figura A3</b> - Espectros de FTIR do suporte Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e catalisador H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> /Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> . ....	99
<b>Figura A4</b> - Isotermas de adsorção-dessorção de N <sub>2</sub> para o suporte Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e catalisador H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> /Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .....	100

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Resultados obtidos para a biomassa celular oriunda da linhagem <i>Dunaliella salina</i> cultivada no fotobiorreator tipo coluna de bolhas.....	53
<b>Tabela 2</b> - Composição em ácidos graxos e propriedades físico-químicas do óleo microalgal da linhagem <i>D. salina</i> e macaúba. ....	54
<b>Tabela 3</b> - Análise de área superficial específica, volume e tamanho dos poros pelo método B.E.T, das amostras do suporte puro, silanizado e ativado com glutaraldeído. ....	56
<b>Tabela 4</b> - Resultados obtidos avaliando a influência das variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da LBC na forma livre e imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .....	60
<b>Tabela 5</b> - Valores de Km e Vmax obtidos para lipase de diferentes fontes a partir das curvas da atividade hidrolítica em função da concentração de substrato. ....	62
<b>Tabela 6</b> - Constantes de inativação térmica da LBC livre e imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e seus respectivos tempos de meia-vida. ....	64
<b>Tabela 7</b> - Desempenho da LBC imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , na transesterificação do óleo de macaúba com diferentes aceptores do grupo acila e razões molares para 120 h de reação. ....	66
<b>Tabela 8</b> - Desempenho da LBC imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , na transesterificação do óleo microalgal com diferentes aceptores do grupo acila na razão molar 1:8 óleo/álcool para 120 h de reação. ....	74
<b>Tabela 9</b> - Desempenho da LBC imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , na transesterificação do óleo microalgal com óleo fúsel simulado e óleo fúsel como aceptores do grupo acila na razão molar 1:8 óleo/álcool para 120 h de reação. ....	79
<b>Tabela 10</b> - Desempenho do catalisador químico H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> impregnado em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , na transesterificação do óleo de macaúba com etanol e óleo fúsel como aceptores do grupo acila na razão molar 1:180 óleo/álcool para 6 h de reação. ....	80
<b>Tabela 11</b> - Desempenho do catalisador químico H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> impregnado em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , na transesterificação da biomassa direta da microalga <i>D. salina</i> com etanol, butanol, álcool isoamílico, óleo fúsel simulado e óleo fúsel como aceptores do grupo acila na razão molar 1:180 óleo/álcool para 6 h de reação. ....	84
<b>Tabela 12</b> - Comparação do desempenho dos catalisadores heterogêneos na síntese de biolubrificantes a partir do material lipídico da microalga <i>D. salina</i> com diferentes aceptores do grupo acila. ....	85

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Estudos reportados na literatura referentes a obtenção de ésteres com propriedades lubrificantes por meio de reações de esterificação e transesterificação. ....	21
<b>Quadro 2</b> - Reagentes utilizados na execução da metodologia experimental.....	41
<b>Quadro 3</b> - Principais equipamentos utilizados. ....	42
<b>Quadro 4</b> - Outros equipamentos usados. ....	42
<b>Quadro 5</b> - Condições de operação do cromatógrafo e parâmetros dos métodos de quantificação dos ésteres.....	52

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

<b>BET</b>	Brunauer, Emmet e Teller
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>cP</b>	Viscosidade absoluta
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
<b>HPA</b>	Heteropolicido
<b>kd</b>	Constante de desativao
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>LBC</b>	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>
<b>MAG</b>	Monoacilglicerol
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>MS</b>	cidos graxos monoinsaturados
<b>P</b>	Concentrao de lipídeos
<b>PS</b>	cidos graxos poli-insaturados
<b>q<sub>P</sub></b>	Taxa específica de produo de lipídeos
<b>Q<sub>P</sub></b>	Taxa de produo de lipídeos volumétrica
<b>Q<sub>X</sub></b>	Taxa de produo de biomassa volumétrica
<b>RM</b>	Razão molar
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância magnética nuclear de próton
<b>S</b>	cidos graxos saturados
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Tempo de meia-vida
<b>X</b>	Biomassa
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidade máxima
<b>Y<sub>P/X</sub></b>	Rendimento específico de lipídeos





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
3.1 Biolubrificantes.....	20
3.2 Óleo microbiano produzido por microalgas .....	23
3.2.1 Cultivo e colheita das microalgas .....	25
3.2.2 Meio de cultivo .....	27
3.2.3 Extração de lipídeos.....	30
3.3 Precursor da reação de transesterificação: óleo fúsel .....	32
3.4 Catalisadores.....	33
3.4.1 Lipases .....	35
3.5 Imobilização de enzimas.....	37
3.5.1 Catalisador químico $H_3PMO_{12}O_{40}$ .....	37
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
4.1 Materiais .....	40
4.1.1 Linhagem de microalga .....	40
4.1.2 Catalisadores.....	40
4.1.3 Materiais de partida .....	40
4.1.4 Outros reagentes .....	41
4.2 Equipamentos.....	41
4.3 Metodologia experimental .....	43
4.3.1 Cultivo da microalga.....	43
4.3.2 Colheita e recuperação da biomassa .....	44
4.3.3 Extração de lipídeos.....	44
4.3.4 Preparo do catalisador químico.....	44
4.3.5 Preparo do catalisador bioquímico .....	44
4.3.5.1 Preparo do suporte .....	44
4.3.5.2 Imobilização da lipase .....	45
4.3.5.3 Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas .....	45
4.3.5.4 Testes de estabilidade térmica do biocatalisador .....	46
4.3.6 Síntese dos ésteres biolubrificantes .....	46
4.3.6.1 Síntese de biolubrificantes via transesterificação do óleo microalgal empregando lipase imobilizada como biocatalisador.....	46
4.3.6.2 Produção de ésteres lubrificantes a partir da biomassa de <i>D. salina</i> por catálise heterogênea química empregando $H_3PMO_{12}O_{40}$ impregnado em $Nb_2O_5$ como catalisador.....	47
4.3.7 Purificação dos biolubrificantes.....	48
4.4 Metodologia analítica .....	49
4.4.1 Caracterização dos catalisadores .....	49
4.4.1.1 Análise de área superficial (B.E.T.).....	49
4.4.1.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	49

4.4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49
4.4.2 Tratamento do óleo fúsel.....	50
4.4.3 Caracterização das propriedades das matérias-primas lipídicas e biolubrificantes ....	50
4.4.3.1 Análise do perfil de ácidos graxos .....	50
4.4.3.2 Viscosidade .....	50
4.4.4 Quantificação dos ésteres lubrificantes.....	50
4.4.4.1 Caracterização dos monoésteres de ácidos graxos por RMN <sup>1</sup> H .....	50
4.4.4.2 Quantificação de mono e diacilgliceróis .....	51
4.4.4.3 Quantificação dos ésteres lubrificantes por cromatografia gasosa .....	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
5.1 Valores obtidos de biomassa microalgal e lipídica após a etapa de cultivo da linhagem.....	53
5.2 Propriedades das matérias-primas lipídicas .....	53
5.3 Atividade dos catalisadores.....	55
5.3.1 Atividade enzimática do biocatalisador .....	55
5.3.2 Acidez do catalisador químico .....	55
5.4 Caracterização das propriedades do suporte Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e biocatalisador .....	55
5.4.1 Caracterização morfológica .....	55
5.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	57
5.5 Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas do biocatalisador .....	59
5.5.1 Estudo da influência do pH e temperatura .....	59
5.5.2 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	60
5.5.3 Estabilidade térmica .....	63
5.6 Síntese dos ésteres biolubrificantes via catálise enzimática .....	65
5.6.1 Síntese de ésteres empregando óleo de macaúba como substrato lipídico .....	66
5.6.2 Comparação do desempenho catalítico da LBC imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> nas reações de transesterificação do óleo de macaúba com diferentes aceptores do grupo acila utilizando a razão molar 1:8.....	72
5.6.3 Síntese de ésteres empregando óleo da microalga <i>Dunaliella salina</i> como substrato lipídico das reações .....	72
5.6.4 Síntese de ésteres lubrificantes usando óleo fúsel simulado e óleo fúsel comoceptor do grupo acila.....	76
5.7 Síntese dos ésteres biolubrificantes via catálise química.....	79
5.7.1 Síntese de ésteres empregando óleo de macaúba como substrato lipídico .....	79
5.7.2 Síntese de ésteres empregando a biomassa da microalga <i>Dunaliella salina</i> como substrato lipídico das reações.....	81
5.8 Comparação do desempenho de catalisadores heterogêneos na síntese de ésteres biolubrificantes a partir da biomassa microalgal de <i>Dunaliella salina</i> .....	85
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>98</b>
Anexo 1 – Características do catalisador químico .....	98

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a maior parte dos lubrificantes é derivada de frações do petróleo (óleos minerais) acrescido de aditivos com funções antioxidante, antidesgaste, detergente/dispersante, dentre outras (SILVA; FREIRE, 2016). O eminente esgotamento das reservas de petróleo aliado aos danos ambientais causados devido a toxicidade e baixa biodegradabilidade destes óleos, torna imprescindível à busca por alternativas inseridas nos princípios da química verde (MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2014).

Além disso, a crescente demanda no mercado global por esse produto, que atingiu 36,36 milhões de toneladas em 2014, com projeção de crescimento para 43,87 milhões de toneladas até 2022 (taxa de crescimento de 2,4 % ao ano), justifica a necessidade pela busca de novas estratégias de produção (BASSI et al., 2016).

Os biolubrificantes são compostos biodegradáveis obtidos, em geral, a partir de óleos vegetais, e sua aplicação tem como objetivo reduzir o impacto ambiental. Enquanto o mercado de lubrificantes de origem mineral se encontra estagnado, os biolubrificantes vêm apresentando um crescimento médio de 10 % ao ano (SILVA; FREIRE, 2016) e são considerados atualmente a principal alternativa em substituição aos lubrificantes minerais.

Em termos gerais, biodegradabilidade significa a tendência de um material ser metabolizado por microrganismos em até um ano. Quando a degradação é completa, significa que o lubrificante retornou essencialmente à natureza, e quando é parcial, indica que um ou mais componentes do lubrificante não são degradáveis. A demanda por lubrificantes biodegradáveis está relacionada a uma conscientização crescente quanto ao impacto das tecnologias sobre o meio ambiente. Essa conscientização está ocorrendo tanto como resultado da combinação de regulações locais e nacionais quanto como por influência dos consumidores (SILVA; FREIRE, 2016).

Os ésteres com capacidade lubrificante podem ser sintetizados por diversas rotas de produção, como transesterificação de óleos e gorduras (GRYGLEWICZ; MUSZYŃSKI; NOWICKI, 2013; SILVA; HABERT; FREIRE, 2012), esterificação de ácidos graxos livres (ÅKERMAN et al., 2011; LAGE et al., 2016) e hidroesterificação (BRESSANI et al., 2015; CHOWDHURY et al., 2014), empregando catalisadores químicos ( $H_2SO_4$ ,  $H_3PMo_{12}O_{40}$ , NaOH, KOH, entre outros) (CARVALHO et al., 2018a; DA CONCEIÇÃO et al., 2016; HASHEM et al., 2013; MADANKAR; PRADHAN; NAIK, 2013) ou bioquímicos (lipases imobilizadas) (CORTEZ et al., 2018; SILVA; FREIRE, 2016).

O interesse industrial por tecnologias envolvendo catálise heterogênea vêm aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia química, bioquímica, dentre outras e, devido às inúmeras vantagens que essa rota catalítica proporciona perante os processos homogêneos clássicos, tais como pouca ou nenhuma corrosão; fácil separação; fácil manuseio e possibilidade de reutilização. Além disso, o uso de catalisador heterogêneo minimiza os problemas relativos às etapas finais de purificação dos produtos finais e permite simplificação e redução dos custos dos processos pela diminuição do número de operações associadas (SILVA; FREIRE, 2016).

Além da catálise heterogênea, rotas que empregam óleos não comestíveis (óleos microbianos) e alcoóis superiores (óleo fúsel) apresentam vantagens adicionais para obtenção dos biolubrificantes, por não competir com a indústria alimentícia, além de acarretar em menor custo de produção, devido a utilização de um resíduo da indústria alcooleira como precursor da reação (óleo fúsel).

O óleo fúsel é a fração menos volátil obtida durante o processo de destilação do álcool combustível, atingindo cerca de 120 milhões de litros ano<sup>-1</sup> (CALAM et al., 2015; VILAS BOAS et al., 2017). No entanto, apenas 25 % desse valor gerado é aproveitado pelo mercado nacional (FERREIRA; MEIRELLES; BATISTA, 2013). Possíveis alternativas para a aplicação deste resíduo incluem a produção de alcoóis superiores por destilação fracionada simples ou dupla (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011) e síntese de ésteres por via química ou biotecnológica.

Os principais componentes do óleo fúsel são o etanol (13 %), butanol (15 %), álcool isoamílico (51 %) e pequenas proporções de outros alcoóis secundários e água (15 %). Entretanto, o principal constituinte deste resíduo é o álcool isoamílico, que provém da decomposição de iso-leucina, aminoácido proveniente da hidrólise de proteínas da levedura (AZANIA et al., 2010).

Nesse contexto, o trabalho visou investigar rotas alternativas para a produção de biolubrificantes a partir de fontes renováveis, microbianas e resíduos industriais, no intuito de obter um biolubrificante sustentável e ambientalmente favorável. Para essa finalidade foram empregadas duas vias catalíticas: 1) a transesterificação do óleo microalgal com óleo fúsel via catálise enzimática e 2) transesterificação direta de biomassa microbiana com óleo fúsel via catálise química heterogênea.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi obter ésteres com propriedades lubrificantes a partir de matérias-primas renováveis, como a biomassa microbiana, e um subproduto da indústria sucroalcooleira (óleo fúsel). Este objetivo geral foi atingido mediante a execução dos seguintes objetivos específicos:

- Cultivo das microalgas em fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas com capacidade de 10 L, empregando condições apropriadas de cultivo para obtenção de biomassa microbiana;
- Extração e caracterização do óleo microbiano quanto à viscosidade, índice de acidez e perfil de ácidos graxos;
- Avaliação do desempenho da microalga *Dunaliella salina* como fonte de matéria-prima lipídica na reação de síntese de biolubrificantes empregando óleo fúsel como acceptor do grupo acila, testando duas rotas catalíticas:
  - ✓ *Transesterificação do óleo microbiano empregando como catalisador, a lipase de Burkholderia cepacia imobilizada em matriz óxido de nióbio ( $Nb_2O_5$ ).*
  - ✓ *Transesterificação direta da biomassa microbiana empregando como catalisador, o  $H_3PMo_{12}O_{40}$  impregnado em óxido de nióbio ( $Nb_2O_5$ ).*
- Caracterização e quantificação do produto obtido quanto à viscosidade, teor de ésteres e glicerídeos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biolubrificantes

Lubrificante é uma substância (geralmente um líquido) introduzida entre duas superfícies móveis para reduzir o atrito entre elas, melhorando a eficiência e reduzindo o desgaste. Lubrificantes dissolvem e transportam micropartículas provenientes do próprio desgaste do motor, ou distribuem o calor (MORTIER; FOX; ORSZULIK, 2010; RIZVI, 2009). Além das aplicações industriais, os lubrificantes são utilizados para diversos outros fins, incluindo aplicações biomédicas (por exemplo, lubrificantes para articulações artificiais). Os lubrificantes são obtidos majoritariamente a partir de óleos minerais e sintéticos, derivados de refinação de petróleo, acarretando em complicações ambientais. No entanto, fontes alternativas como os óleos vegetais e microbianos vêm sendo investigados como matéria-prima para obtenção de lubrificantes ecologicamente seguros (BOZELL; PATEL, 2006).

O termo biolubrificante é aplicado a todos os lubrificantes que possuem a capacidade comprovada de ser decomposto, por ação microbiana, em um determinado intervalo de tempo. Em termos gerais, biodegradabilidade significa a tendência de um lubrificante ser metabolizado por microrganismos em até um ano (SILVA; FREIRE, 2016).

A biodegradabilidade resulta em autodecomposição por meio de microrganismos em produtos não tóxicos (CO<sub>2</sub> e água). Os óleos vegetais e de origem microbiana são tipicamente 99 % biodegradáveis, reduzindo para 90 % a 98 % após a mistura com aditivos. Por outro lado, a biodegradabilidade dos óleos minerais é de apenas 20 % (SALIMON; SALIH; YOUSIF, 2010; SILVA; FREIRE, 2016). A maior limitação da utilização dos biolubrificantes se deve a sua baixa estabilidade oxidativa, impedindo sua utilização por períodos mais longos. Sendo assim, torna-se necessário a realização de modificações químicas estruturais ou acréscimo de aditivos para melhorar esse aspecto (SALIMON; SALIH; YOUSIF, 2010; SRIVASTAVA; SAHAI, 2013).

A utilização direta de óleos vegetais como lubrificantes apresenta algumas desvantagens, como principalmente sua elevada viscosidade. Desta forma, processos que diminuam a viscosidade destes óleos são necessários, como transesterificação, pirólise, dentre outros (RAMOS et al., 2017; XIE; HUANG; LI, 2007). Com base nesse contexto,

os ésteres com capacidade lubrificante podem ser sintetizados por diversas rotas de produção, como transesterificação de óleos e gorduras (GRYGLEWICZ; MUSZYNSKI; NOWICKI, 2013; SILVA; HABERT; FREIRE, 2012), esterificação de ácidos graxos livres (ÅKERMAN et al., 2011; LAGE et al., 2016) e hidroesterificação (BRESSANI et al., 2015; CHOWDHURY et al., 2014), empregando catalisadores químicos ou bioquímicos (lipases imobilizadas) (SILVA; FREIRE, 2016).

O Quadro 1 ilustra exemplos de estudos reportados na literatura para alguns processos de obtenção de biolubrificantes a partir de reações de transesterificação e esterificação empregando diferentes matérias-primas e catalisadores.

**Quadro 1** - Estudos reportados na literatura referentes a obtenção de ésteres com propriedades lubrificantes por meio de reações de esterificação e transesterificação.

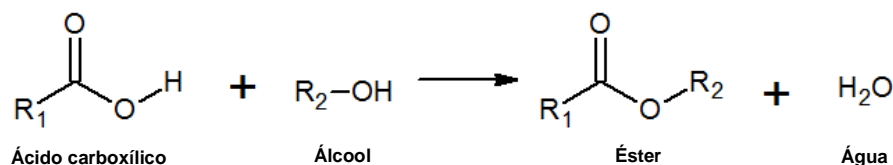
<b>Matéria-prima</b>	<b>Reação</b>	<b>Catalisador</b>	<b>Referência</b>
Álcoois superiores e óleo de palmiste	Transesterificação	Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em suportes híbridos de SiO <sub>2</sub> -βCD e SiO <sub>2</sub> -HEC	CERON, 2017
Ésteres metílicos de óleo de colza e álcoois trimetilopropano (TMP), 2-etil hexanol (2-EH) e neopentil glicol (NPG)	Transesterificação	Lipozyme IM, Novozym® 435 e Lipase <i>Pseudomonas cepacia</i> imobilizada	GRYGLEWICZ; MUSZYNSKI; NOWICKI, 2013
Ésteres metílicos e etílicos de óleo de mamona com trimetilopropano	Transesterificação	Amberlyst 15, dilaurato de dibutil-estanho emetóxido de sódio	SILVA; HABERT; FREIRE, 2012
Óleos de girassol, linhaça e pinhão-manso com pentaeritritol	Transesterificação	NaOH e ácido <i>p</i> -toluenosulfônico	HASHEM et al., 2013
Mamona com metanol	Transesterificação	KOH	MADANKAR; PRADHAN; NAIK, 2013
n-octanol e ácido oleico	Esterificação	Lipases ( <i>M. javanicus</i> , <i>Candidasp.</i> , <i>R. miehei</i> , <i>T. lanuginosus</i> e pancreática) imobilizadas em partículas de polimetacrilato	BASSI et al., 2016
Óleo fúsel e ácido oleico	Esterificação	Novozym® 435	DÖRMO et al., 2004
Trimetilopropano (TMP) e ácidos graxos (valérico, caprílico e oleico)	Esterificação	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e Novozym® 435	ÅKERMAN et al., 2011

Fonte: Autoria própria.

A esterificação consiste na reação de um ácido graxo com um álcool formando um éster e água, conforme pode ser visualizado na Figura 1, enquanto a transesterificação

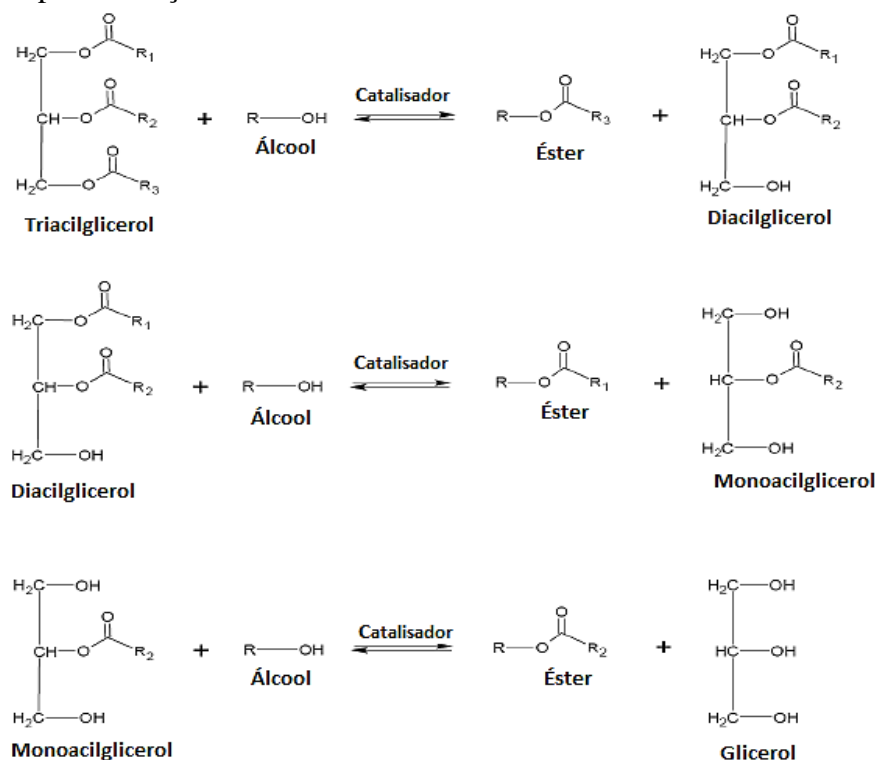
consiste na reação de óleos vegetais com álcool (alcoólise) na presença de um catalisador e tem sido o método mais adequado para obtenção de biolubrificantes (RAMOS et al., 2017; TALEBIAN-KIAKALAEH; AMIN; MAZAHERI, 2013) (Figura 2).

**Figura 1** - Reação de esterificação.



Fonte: Autoria própria.

**Figura 2** - Etapas da reação de alcoólise.



Fonte: Adaptado de Knothe et al., 2005.

Para que a reação de transesterificação ocorra de forma adequada é importante que as três etapas consecutivas sejam monitoradas, bem como a reversibilidade da reação (Figura 2). Na primeira etapa, os triacilgliceróis são convertidos para diacilgliceróis, os quais são convertidos a monoacilgliceróis na etapa posterior. Por último, monoacilgliceróis liberam glicerol como subproduto. Em cada etapa da reação, ocorre a liberação de uma molécula do éster de interesse (RAMOS et al., 2017; MOBARAK et al., 2014).



Geralmente, a reação de transesterificação envolve alguns parâmetros que influenciam significativamente a conversão final dos produtos. As variáveis mais importantes são: temperatura de reação, teor de água no óleo, quantidade de catalisador, tempo de reação, razão molar álcool/óleo, dentre outros. A reação de transesterificação pode ocorrer na presença de catalisadores químicos ou enzimáticos, homogêneos ou heterogêneos (RAMOS et al., 2017).

A produção de biolubrificantes utilizando óleos vegetais é tópico amplamente estudado, e os resultados são promissores no que diz respeito à substituição gradual dos derivados de petróleo. No entanto, a maioria dos óleos vegetais compete com a indústria de alimentos. Além disso, o aumento da produção exige alguns pontos que podem representar problemas e colocam a produção de óleo vegetal em desvantagem comparado à produção de óleos microbianos.

Dessa forma, é importante aprofundar o estudo do potencial dos óleos microbianos para a produção de produtos como os biolubrificantes. A utilização de óleo microbiano é um tópico não muito explorado, com grande possibilidade de geração de conhecimento.

### **3.2 Óleo microbiano produzido por microalgas**

Microalgas são organismos fotossintéticos eucariotos que podem ser encontrados em diferentes regiões, como água doce ou salgada, bem como em alguns tipos de solo. As microalgas podem ser classificadas em 12 subdivisões (AL HATTAB; GHALY, 2015; GONÇALVES; SILVA, 2018; TOMASELLI, 2004). O gênero *Dunaliella*, do qual a microalga estudada no presente trabalho faz parte, *Dunaliella salina*, pertence à classe *Chlorophyta*. Esta classe é bastante abrangente, sendo que muitas das que a compõem possuem flagelo e produzem pigmentos como clorofilas e carotenoides (TOMASELLI, 2004).

Com relação à *Dunaliella salina*, a literatura tem demonstrado bons resultados de produtividade de biomassa, teor e produtividade de lipídeos. Dependendo da condição de cultivo empregada, tipo de fotobiorreator, meio de cultivo, os valores de produtividade lipídica variam de 6 a 39 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (CHEN et al., 2015b; GAO; YANG; WANG, 2013).

Com relação à produtividade de biomassa os valores obtidos estão em torno de 25 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> a 73 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, ressaltando que valores mais elevados são alcançados quando o meio de cultivo é suplementado com uma fonte de carbono orgânico ou inorgânico, como o NaHCO<sub>3</sub> (GAO; YANG; WANG, 2013). Diversos autores relatam que

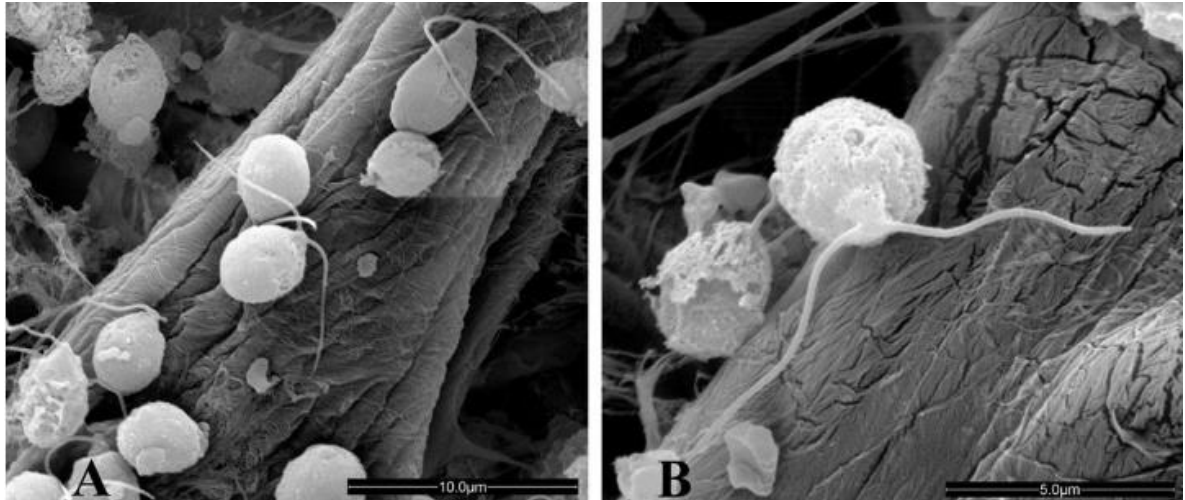
a linhagem da microalga *Dunaliella salina*, possui tolerância a elevados níveis de íons  $\text{HCO}_3^-$  (bicarbonato) (HOU et al., 2016), além de melhorar significativamente o seu crescimento celular quando é cultivada em meio contendo essa fonte de carbono. Além disso, essa microalga também é halotolerante, resistindo às grandes variações de salinidade (com a concentração de sal variando de 0,1 a 5,5 mol L<sup>-1</sup>) (CHEN et al., 2015a).

O óleo resultante da microalga *Dunaliella salina*, tem se destacado perante outras matérias-primas lipídicas de origem microbiana em função de seus elevados teores de ácidos graxos poli-insaturados, dentre os quais se sobressaem os ácidos linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) (CHEN et al., 2015b; CHO et al., 2015a, 2015b, 2016). Outra característica importante para essa microalga é quanto à produção de carotenoides, principalmente  $\beta$ -caroteno, especialmente em meio com alto índice de iluminação e escassez de nitrogênio (FACHET et al., 2016; HOSSEIN; GHASEMI, 2016; KEERTHI; DEVI; SARMA, 2015). Este é um produto de grande interesse devido ao seu elevado valor agregado, podendo ser empregado como pigmento na formulação de cosméticos em geral e também no setor alimentício. Estudos apontam ainda evidências de que o  $\beta$ -caroteno obtido a partir do cultivo da microalga *Dunaliella salina* pode futuramente apresentar diversas aplicações de interesse industrial, como ação anti-inflamatória, para prevenir inflamações em casos de doenças infecciosas ocasionadas por vírus (LIN et al., 2014) e também no tratamento de câncer, como, por exemplo, o de próstata (JAYAPPRIYAN et al., 2013).

Outra aplicação das microalgas está na produção de alimentos para criação de peixes, camarão, dentre outros organismos marinhos e de água doce, além da larvicultura (FERREIRA et al., 2018; TEULING et al., 2017). Com base neste contexto, diversos trabalhos utilizam espécies de microalgas, como é o caso da *Dunaliella salina* para o estudo de impacto de substâncias tóxicas sobre a vida marinha (BHUVANESHWARI et al., 2018; DEGENS et al., 2018; SENDRA et al., 2016).

A Figura 3 mostra a imagem de microscopia eletrônica de varredura da microalga em estudo no presente trabalho, *Dunaliella salina*.

**Figura 3** - Imagem de microscopia eletrônica de varredura obtida na literatura de células da microalga *Dunaliella salina*.



Fonte: Hou et al., 2016.

### 3.2.1 Cultivo e colheita das microalgas

Existem diversos fatores que influenciam o crescimento celular, bem como a produtividade celular e lipídica das microalgas, tais como: configuração e tamanho do fotobiorreator a ser utilizado no cultivo; concentração dos nutrientes adicionados ao meio; qualidade e intensidade de iluminação; dentre outros. Os fotobiorreatores, onde o cultivo das microalgas é realizado, podem ser das mais variadas formas e tamanhos e sua classificação ocorre, basicamente de duas maneiras distintas: internos ou externos (dependendo se estão instalados em salas fechadas ou ao ar livre); abertos ou fechados (em virtude da possibilidade de contato direto entre o meio de cultivo e atmosfera) (CARVALHO et al., 2014).

Com relação à primeira classificação dos fotobiorreatores, os cultivos feitos em ambientes externos (ou “*outdoor*”) tem a vantagem de reduzir custos com a economia de energia elétrica, uma vez que a iluminação é solar, não necessitando a instalação de lâmpadas ou refletores. Por outro lado, embora os cultivos internos (“*indoor*”) tenham o gasto energético com a iluminação, eles não sofrem as constantes variações climáticas, como dia e noite e as estações do ano. Portanto, parâmetros como foto período, temperatura e intensidade luminosa são mais facilmente controlados nestes cultivos.

Quanto à classificação aberto/fechado, em geral, os fotobiorreatores do tipo abertos como é o caso da “*racewaypond*” ilustrada na Figura 4 (a) apresentam custos de construção e operação menores, além de serem mais fáceis de operar. Contudo, a principal

desvantagem destes sistemas de cultivo está justamente na principal característica que os distingue, que é o contato direto entre o meio de cultivo e o meio externo (atmosfera). Este contato aumenta a probabilidade de contaminação do meio de cultivo com microrganismos presentes na atmosfera, prejudicando a qualidade da biomassa final obtida.

Outras desvantagens para esse tipo de sistema são o aumento da taxa de evaporação de água, que deve ser repostada com o decorrer do tempo, a ocorrência de chuvas, resultando na diluição do cultivo e, além disso, contaminação por folhas e insetos, que podem cair no meio de cultivo. Os fotobiorreatores fechados, por sua vez, não apresentam este problema e são considerados mais produtivos em relação às “*racewayponds*”, além de ocuparem uma menor extensão de área, porém com custos de operação mais elevados. Os fotobiorreatores fechados, em especial os “*indoor*”, são mais empregados quando se quer utilizar a biomassa para uma finalidade mais nobre (AL HATTAB; GHALY, 2015; CARVALHO et al., 2014).

Alguns exemplos de fotobiorreatores fechados apresentados na literatura podem ser citados: coluna de bolhas (b), tubular (c), placas planas (d), conforme ilustrados na Figura 4. Dentre estes, a coluna de bolhas (b) se destaca por sua versatilidade, fácil manuseio e operação. Esta classe de fotobiorreatores consiste de um recipiente cilíndrico feito de material transparente, para a passagem da luz, aerados pelo fundo (GONÇALVES; SILVA, 2018). O sistema de aeração neste caso, como mencionado anteriormente, cumpre a função de mistura, agitação e, principalmente, troca gasosa (com remoção de  $O_2$  e injeção de  $CO_2$ ). O fotobiorreator do tipo tanque, por sua vez, tem semelhanças com o de coluna de bolhas, mas com algumas diferenças, principalmente no sistema de agitação, que nesse caso é mecânica, e, auxilia a aeração na homogeneização do meio (CARVALHO et al., 2014).

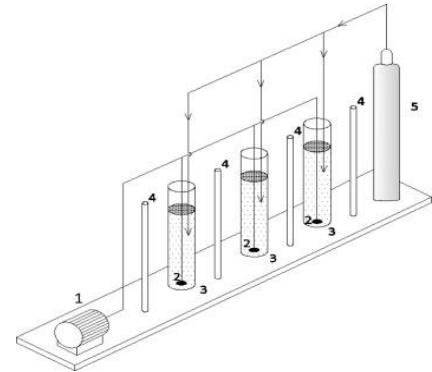
Nesse trabalho, os cultivos foram feitos em fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas, confeccionados com tubos de acrílico (CARVALHO et al., 2014; LOURES et al., 2018).

**Figura 4** - Imagens ilustrando: (a) "racewaypond" e os fotobiorreatores: (b) coluna de bolhas; (c) tubular e (d) placas planas.

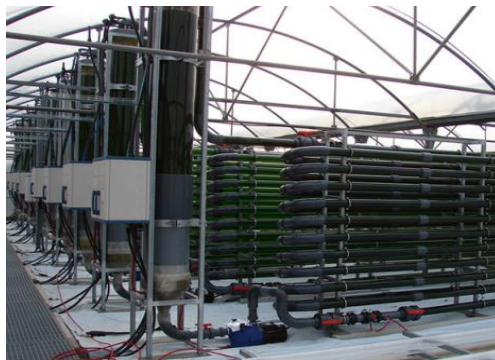
(a)



(b)



(c)



(d)



Fonte: (a) (KOLLER, 2015); (b) (LOURES et al., 2018); (c) (TORZILLO; ZITTELLI, 2015); (d) (AL HATTAB; GHALY, 2015).

### 3.2.1 Meio de cultivo

A composição do meio de cultivo também é de suma importância para o acúmulo de lipídeos por microalgas. Dentre os nutrientes adicionados, destaca-se a importância da fonte de nitrogênio, que pode ser na forma do sal nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ). Sabe-se que o acúmulo de lipídeos no interior das células das microalgas pode ser favorecido em ambientes de cultivo com escassez de nitrato (ABEDINI-NAJAFABADI et al., 2015; LI et al., 2014; SAN PEDRO et al., 2014; SUNG et al., 2017).

Alguns autores demonstram que a relação de nitrato e fosfato (N: P) tem forte influência na taxa de crescimento das microalgas, no teor de lipídeos acumulado pelas células, bem como no tipo específico de ácido graxo produzido (RASDI; QIN, 2014).

Além da fonte de nitrogênio, também existe a necessidade da escolha da fonte de carbono, assim como a determinação da quantidade desta fonte a ser disponibilizada.

Conforme a natureza da fonte de carbono empregada, o cultivo da microalga é classificado como: autotrófico, mixotrófico ou heterotrófico.

O cultivo heterotrófico ocorre quando apenas fontes inorgânicas de carbono (especialmente CO<sub>2</sub>) são empregadas, sob iluminação constante ou não, de modo que a microalga obtém energia através da luz e faz fotossíntese. O bicarbonato também é uma fonte de carbono empregada em regimes autotróficos, uma vez que existem enzimas que transformam bicarbonato em CO<sub>2</sub>, e vice versa (JEON et al., 2016). No cultivo mixotrófico, por sua vez, ocorre a fotossíntese, visto que é fornecido CO<sub>2</sub> e iluminação, porém também é fornecida uma fonte orgânica de carbono (glicose, acetato, melão e glicerina, por exemplo). Por fim, no cultivo heterotrófico é fornecida a fonte de carbono, porém não ocorre fotossíntese, pois o cultivo é realizado no escuro (GROBBELAAR, 2004).

Desta forma, a escolha da fonte de carbono, bem como o regime de cultivo selecionado é de extrema relevância, pois tem profundo impacto sobre o comportamento da microalga, em especial no seu crescimento celular, acúmulo de lipídeos e na produção de ácidos graxos essenciais (ABEDINI-NAJAFABADI et al., 2015; SELVAKUMAR; UMADEVI, 2014; WOODWORTH et al., 2014).

No trabalho realizado por Abedini-Najafabadi et al. (2015) foram avaliados o efeito do uso de diversos tipos de fontes de carbono (orgânicas e inorgânicas) na produção celular, acúmulo de lipídeos e produção de ácidos graxos da microalga *Chlorella vulgaris*. Dentre as fontes de carbono testadas, o uso de acetato de sódio, em um cultivo com baixa concentração de nitrato, foi o que apresentou o maior teor de lipídeos. Além disso, foi observado que o acetato de sódio, o bicarbonato de sódio e o melão são fontes de carbono que propiciaram altos teores de ácido  $\alpha$ -linoleico (um dos ácidos graxos poli-insaturados do tipo  $\omega$ 3). Outros pesquisadores obtiveram bons resultados com a microalga *Dunaliella salina* usando bicarbonato como fonte de carbono (HOU et al., 2016), inclusive, elucidaram a vantagem do uso do bicarbonato em relação ao CO<sub>2</sub>. Isto faz com que o uso do NaHCO<sub>3</sub> torne-se mais conveniente em relação ao suprimento de CO<sub>2</sub> gasoso (HOU et al., 2016). As mesmas vantagens do uso do NaHCO<sub>3</sub>, em termos de crescimento celular e produção de carotenoides, foram ressaltadas por Kim et al. (2017).

Além dos fatores já apresentados, a iluminação dos fotobiorreatores também tem grande influência sobre a produtividade celular do cultivo. O uso de iluminação com lâmpadas de LED é vantajoso devido ao seu baixo consumo energético e a possibilidade de uso de luz em diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ). Diversos autores relatam estudos

concluídos com êxito quando empregaram lâmpadas de LEDs como fonte de luz em fotobiorreatores para o cultivo de microalgas (FULKE et al., 2015; LUCKER et al., 2014; OKUMURA et al., 2014; TEO et al., 2014; YAN; ZHENG, 2014).

Após a etapa de cultivo, se faz necessária a recuperação ou colheita da biomassa. A colheita é o processo que visa à remoção da água de cultivo para a obtenção da biomassa em concentração alta o suficiente para que seja processada. Este procedimento pode ser feito de diversas formas, dentre as mais convencionais estão filtração e centrifugação. O processo de colheita pode também contar com uma etapa de floculação (prévia a centrifugação ou filtração). A seguir são apresentados os principais métodos empregados para esta finalidade, bem como suas vantagens e desvantagens.

Floculação química: As células das microalgas apresentam naturalmente carga elétrica negativa, oriunda de terminais orgânicos desprotonados, tais como carboxilatos, fosfatos, etc. Esta carga eletrostática auxilia na manutenção das células das microalgas em suspensão no meio de cultivo. O processo de floculação visa, basicamente, neutralizar esta carga elétrica, com a adição de um floculante, possibilitando que as células se arranjam em flocos e decantem. Este processo se dá com a doação de cátions metálicos por parte dos floculantes (AL HATTAB; GHALY, 2015; PIRWITZ; RIHKO-STRUCKMANN; SUNDMACHER, 2015). Dentre os principais floculantes os mais utilizados são o sulfato de alumínio,  $Al_2(SO_4)_3$ , e cloreto férrico,  $FeCl_3$ . Em geral, a floculação é uma técnica que é aplicada como um primeiro estágio da colheita, precedendo filtração ou centrifugação, para finalizar o processo (AL HATTAB; GHALY, 2015; PIRWITZ; RIHKO-STRUCKMANN; SUNDMACHER, 2015).

Flotação: Funciona com a geração de microbolhas que se prendem às células da microalga fazendo com que estas flutuem e sejam obtidas mais facilmente. Embora tenha a vantagem de não haver a adição de um produto químico, como é o caso da floculação química, o processo da geração das bolhas é custoso e não se tem evidências da viabilidade deste processo, especialmente para grandes escalas (AL HATTAB; GHALY, 2015; BRENNAN; OWENDE, 2010).

Centrifugação: Método físico que vêm se provando muito eficiente na colheita de microalgas no decorrer do tempo. Sua principal desvantagem envolve elevados custos, especialmente para cultivos de grandes volumes, devido ao gasto energético (AL

HATTAB; GHALY, 2015; BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016; BRENNAN; OWENDE, 2010).

Filtração: Em geral, usa-se filtração a vácuo para se acelerar o processo de colheita. Uma desvantagem é que nem sempre esse tipo de filtração consegue reter as células da microalga, devido ao seu tamanho reduzido, tendo que recorrer a processos como filtração por membrana ou ultrafiltração (AL HATTAB; GHALY, 2015; BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016; BRENNAN; OWENDE, 2010). A etapa de filtração auxilia na redução de custos energéticos e evita o rompimento da membrana celular durante a colheita (MONTE et al., 2018).

### 3.2.3 Extração de lipídeos

Uma vez obtida à biomassa, a partir da colheita do cultivo, a etapa seguinte é a extração dos lipídeos. Existem diversas formas de se obter o óleo microalgal e estes processos, de um modo geral, podem ser divididos em extrações físicas (ultrassom, micro-ondas, etc.) ou químicas (extração por solvente). Embora exista esta classificação, muitas vezes, para se obter maiores rendimentos de extração, é comum o uso combinado de processos físicos com químicos. Desta forma, os processos físicos atuam rompendo as células das microalgas, aumentando o contato dos lipídeos com o solvente e, com isto, facilitando a extração e melhorando o rendimento (BRENNAN; OWENDE, 2010; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2014).

A técnica de extração por solvente é realizada pela adição de solventes, como clorofórmio, etanol, hexano, dentre outros, sobre a biomassa, para a remoção dos lipídeos por difusão através da membrana celular. Quando se adiciona um solvente apolar sobre a biomassa, em princípio, forma-se um filme estático de solvente ao redor da microalga. O solvente, então, penetra a membrana celular e interage com o lipídeo apolar que está aglomerado em “gotas” no citoplasma. Esta mistura de solvente e lipídeos, por difusão, sai da célula da microalga (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; KANNAN; PATTARKINE, 2014).

Entretanto, os lipídeos apolares podem estar formando complexos com lipídeos polares. Estes complexos estão fortemente ligados, por ligação de hidrogênio, à membrana celular. Apenas o uso de solventes apolares não é suficiente para romper estas ligações. Isto ocorre, pois os solventes polares fazem apenas ligações do tipo Van Der Waals, mais



fracas que as ligações de hidrogênio. Para se extrair estes lipídeos ligados à parede celular, melhorando o rendimento da extração, utiliza-se um solvente polar juntamente com o apolar. O solvente polar é útil nesta combinação, pois se liga fortemente aos lipídeos polares do complexo de lipídeos, rompendo a ligação deste com a membrana celular. Este novo complexo que conta com os lipídeos apolares e polares, além de ambos os solventes empregados, sai da célula por difusão.

Embora o uso da mistura de solventes polar com apolar auxilie no rendimento da extração, ele faz com que sejam arrastados também os lipídeos polares, além dos apolares. Dentre os solventes possíveis para o uso nas extrações de lipídeo de microalga a mistura clorofórmio (apolar) com metanol (polar) é a mais largamente empregada, com a vantagem de não necessitar da completa secagem da biomassa (processo energeticamente elevado) para o lipídeo ser extraído (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2014).

A extração por solventes pode, para aumento de eficiência, ser realizada com o auxílio de processos físicos de extração, como é o caso das micro-ondas e do ultrassom. No caso das micro-ondas, mistura-se o solvente à biomassa e incidem-se as micro-ondas. As micro-ondas, ondas eletromagnéticas com frequência entre 0,3 e 300 GHz, atuam sobre a água da biomassa (além de outras moléculas polares) gerando aquecimento concentrado e abrupto sem contato direto com o material. Este aquecimento sobre a biomassa provoca aumento de pressão interna às células levando à ruptura das mesmas, facilitando a extração dos lipídeos. O método usando ultrassom, por outro lado, aplica ondas sonoras sobre a mistura solvente/biomassa, que gera ciclos de alta e baixa pressão ao longo de seu percurso. Os ciclos de baixa pressão geram bolhas por evaporação que são comprimidas e implodem no ciclo de alta pressão, num fenômeno denominado cavitação. A cavitação provoca o rompimento das células, facilitando desta forma, o processo de extração. Em ambos os casos, o rompimento celular libera os lipídeos que se encontravam no interior das células ampliando seu contato com o solvente orgânico e, por isto, melhorando o rendimento do processo de extração (AL HATTAB; GHALY, 2015; HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; KANNAN; PATTARKINE, 2014; MUBARAK; SHAIJA; SUCHITHRA, 2014).

### 3.3 Precursor da reação de transesterificação: óleo fúsel

O óleo fúsel é um resíduo gerado na coluna de destilação do processo de obtenção do álcool pelas usinas sucroalcooleiras e explorado por indústrias químicas (AZANIA et al., 2010). O subproduto é um líquido levemente amarelo de odor desagradável formado pela transformação de aminoácidos pelas leveduras durante a fermentação alcoólica e seus componentes são conhecidos como alcoóis superiores (AZANIA et al., 2008; PIZZO et al., 2010).

Com relação ao volume gerado no processo, são estimadas proporções entre 0,5 a 1 % de óleo fúsel para cada litro de álcool produzido. Considerando que, a produção de álcool no país é da ordem de 12 bilhões de litros por ano, o volume de óleo fúsel gerado é de aproximadamente 120 milhões de litros (CALAM et al., 2015; VILAS BOAS et al., 2017). Apesar de sua composição rica em alcoóis superiores, apenas 25 % desse valor gerado é aproveitado pelo mercado nacional (FERREIRA; MEIRELLES; BATISTA, 2013).

Possíveis alternativas para a aplicação deste resíduo incluem a produção de alcoóis superiores como etanol, butanol e álcool isoamílico por destilação fracionada simples ou dupla (BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, 2011) e a síntese de ésteres por via química ou biotecnológica.

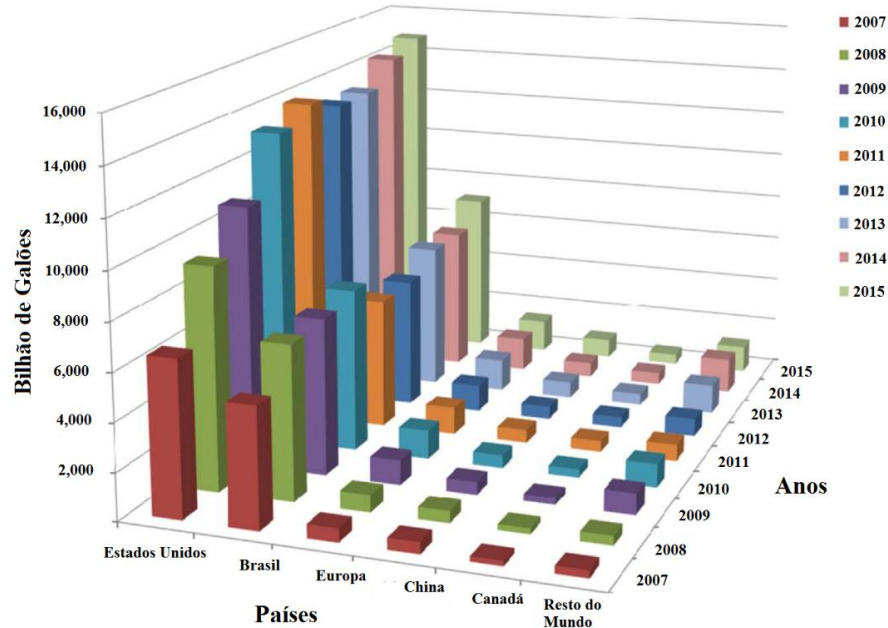
A composição e a quantidade de óleo fúsel dependem do tipo de carbono usado no processo de produção de álcool através da fermentação, do método de preparação e do método usado para separar o óleo fúsel da mistura de fermentação (CALAM et al., 2015). Os principais componentes do óleo fúsel são o etanol (13 %), butanol (15 %), álcool isoamílico (51 %) e pequenas proporções de outros alcoóis secundários e água (15 %). Entretanto, o principal constituinte deste resíduo é o álcool isoamílico, que provém da decomposição de iso-leucina, aminoácido proveniente da hidrólise de proteínas da levedura (AZANIA et al., 2010).

O teor de água ou concentração tem grande influência nas propriedades físico-químicas de combustíveis alcoólicos. As propriedades físicas do óleo fúsel são quase semelhantes às propriedades de combustíveis alcoólicos, tais como metanol e etanol (AWAD et al., 2017).

Em 2014, os Estados Unidos da América (EUA) foi o maior produtor de etanol combustível do mundo, correspondendo a aproximadamente 60 % da produção mundial desse combustível, enquanto 23,47 bilhões de litros foram produzidos pelo Brasil, o que

representa 25 % da produção mundial. Por outro lado, a União Europeia produziu apenas 6 % da produção global. China e Canadá foram os outros líderes produtores (AWAD et al., 2018). A Figura 5 mostra a produção mundial de etanol por país, entre 2007 a 2015.

**Figura 5** - Produção global de etanol por país entre os anos de 2007 a 2015.



Fonte: AWAD et al., 2018.

Conforme pode ser observado na Figura 5, a produção aumentou drasticamente entre os anos de 2007 até 2010, enquanto a maior produção ocorreu em 2015.

Awad et al. (2017), relatam várias aplicações do óleo fúsel como biolubrificantes, herbicida, queima para a demanda de energia nas destilarias, entre outros. Outras aplicações alternativas para o óleo fúsel incluem os ésteres aromáticos, especialmente o butirato de etila que está em alta demanda como um componente de sabores abacaxi-banana na indústria de alimentos. O óleo fúsel também é utilizado como aditivo de combustível da mistura etanol-gasolina para melhorar o desempenho do motor e os níveis de emissões (AWAD et al., 2018).

### 3.4 Catalisadores

Na catálise homogênea, reagentes e catalisador encontram-se na mesma fase, proporcionando melhor interação e superfície de contato, e, conseqüentemente, resultando em melhor rendimento de reação (DIAS; FERREIRA; CUNHA, 2012). Os catalisadores

mais empregados nesse tipo de catálise são os de caráter básico (KOH e NaOH) ou ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  e HCl) (CHOUHAN; SARMA, 2011; RAMOS et al., 2017).

Embora a transesterificação, empregando catálise homogênea alcalina, resulte em altas taxas de conversão de triglicerídeos em seus respectivos ésteres, existem alguns inconvenientes que devem ser considerados: elevados gastos energéticos, difícil recuperação do glicerol, necessidade de remoção do catalisador do meio reacional, além de requerer o tratamento da água alcalina residual e o emprego de substratos e reagentes com baixa concentração de água e ácidos graxos livres (MIRANDA et al., 2011). Adicionalmente, o uso dos catalisadores alcalinos homogêneos gera problemas ao meio ambiente, exigindo inúmeras etapas de recuperação e purificação do produto final (AKOH et al., 2007; CHOUHAN; SARMA, 2011; TAN et al., 2010).

Vale ressaltar que o óleo extraído de microrganismos (microalgas, cianobactérias e fungo filamentosos) apresenta elevado índice de acidez, e conseqüentemente, teor elevado de ácidos graxos livres, indicando nesse caso a catálise homogênea ácida ou catálise heterogênea (ácida ou enzimática) como rotas mais apropriadas para a obtenção dos produtos de interesse. Diversos trabalhos reportados na literatura mostram a aplicação de óleos microbianos para obtenção de biodiesel empregando catalisadores heterogêneos (ácidos ou lipases imobilizadas) (CARVALHO et al., 2018a; DA RÓS et al., 2017; LOURES et al., 2018; RAMOS et al., 2017; SILVA et al., 2014). Desta forma, para a obtenção de biolubrificantes a partir do óleo da microalga *Dunaliella salina* foi empregada a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em óxido de nióbio como biocatalisador da reação, de acordo com trabalhos previamente realizados pelo grupo de pesquisa (DA RÓS et al., 2010; MIRANDA; DA SILVA; DE CASTRO, 2006). Para a reação empregando a biomassa direta sem extração prévia dos lipídeos foi utilizado o catalisador heterogêneo  $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$  de caráter ácido, conforme resultados obtidos anteriormente (CARVALHO et al., 2018a; DA CONCEIÇÃO et al., 2017).

Dentre as principais vantagens que os processos heterogêneos oferecem sobre os homogêneos clássicos, podem ser destacadas: pouca ou nenhuma corrosão dos equipamentos; fácil separação dos produtos; poucos problemas com rejeitos; fácil manuseio e possibilidade de reutilização. Além disso, o uso de catalisador heterogêneo minimiza os problemas relativos às etapas finais de purificação dos biolubrificantes e permite uma simplificação e redução dos custos dos processos pela diminuição do número de operações associadas (ATADASHI; AROUA; AZIZ, 2011; CHOUHAN; SARMA, 2011; RAMOS et al., 2017).

### 3.4.1 Lipases

Pertencente à classe dos biocatalisadores, as lipases (triacilglicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol e sob condições de umidade baixa, catalisam a reação inversa (CORTEZ et al., 2018; DE CASTRO et al., 2004; MIRANDA et al., 2011; RATHI; SAXENA; GUPTA, 2001). As lipases podem ser isoladas de várias fontes (animais, plantas e microrganismos), particularmente de algumas bactérias *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia cepacia* e espécies de fungos como *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus* e *Candida antarctica* (CORTEZ et al., 2018; LOURINHO; BRITO, 2015; SÁNCHEZ; TONETTO; FERREIRA, 2017). Os microrganismos são as fontes preferidas, uma vez que possuem alta velocidade de síntese, alto rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva (ILLANES, 2011).

Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 a 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica. Em geral, lipases são ativas em uma ampla faixa de pH (4 a 9) e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C (CORTEZ et al., 2018; DE CASTRO et al., 2004) e apresentam a capacidade única de atuar na interface óleo/água de emulsões (SÁNCHEZ; TONETTO; FERREIRA, 2017; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Com relação à especificidade enzima-substrato, as lipases podem ser classificadas de acordo com sua especificidade posicional (inespecíficas ou 1,3-específicas) ou quanto à especificidade por ácidos graxos (CORTEZ et al., 2018; SÁNCHEZ; TONETTO; FERREIRA, 2017), conforme descritas a seguir:

- *Lipases ácido graxo específicas*: atuam especificamente ou preferencialmente na hidrólise de ésteres de determinados ácidos graxos, em função de seu tamanho de cadeia ou instauração (DE CASTRO et al., 2004; GUPTA; RATHI; BRADDOO, 2003);

- *Lipases inespecíficas*: atuam em todos os ácidos graxos, independentemente da posição que ocupam na molécula de glicerol. Nesse caso, o hidrolisado apresenta uma mistura de ácidos graxos livres e glicerol, sendo que, os monoacilgliceróis e diacilgliceróis são produtos intermediários da reação de hidrólise (DE CASTRO et al., 2004; SÁNCHEZ; TONETTO; FERREIRA, 2017);.
- *Lipases 1,3 específicas*: liberam ácidos graxos somente das posições 1 e 3 dos triacilgliceróis (DE CASTRO et al., 2004; FREITAS et al., 2006).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, esterificação, síntese e interesterificação de lipídeos e transesterificação (CORTEZ et al., 2018; SÁNCHEZ; TONETTO; FERREIRA, 2017). As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; ii) não requerem a presença de cofatores; iii) possuem uma larga especificidade pelo substrato e, iv) exibem uma alta enantiosseletividade (CORTEZ et al., 2018; DE CASTRO et al., 2004; SÁNCHEZ; TONETTO; FERREIRA, 2017).

As lipases têm sido amplamente empregadas na produção de fármacos, emulsificantes, alimentos, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, produção de aromas e fragrâncias, modificações de lipídeos para a produção de biodiesel e no pré-tratamento de efluentes com elevado teor de lipídeos gerados pelas indústrias de alimentos (CORTEZ et al., 2018; MENDES; DE CASTRO; GIORDANO, 2013; SÁNCHEZ; TONETTO; FERREIRA, 2017).

Entre as lipases disponíveis comercialmente, foi selecionada para o desenvolvimento do presente trabalho a lipase de *Burkholderia cepacia*- LBC, tomando por base trabalhos desenvolvidos anteriormente (CERON, 2017; DA RÓS et al., 2010; SILVA et al., 2012; SÁNCHEZ; TONETTO; FERREIRA, 2017).

LBC é uma preparação enzimática lipolítica desenvolvida pela Amano Enzyme Inc, obtida por fermentação submersa de uma linhagem selecionada proveniente de *Burkholderia cepacia*, e posteriormente purificada por precipitação com etanol. Contém

cerca de 25 % de proteína e alguns aditivos ou estabilizantes como diatomáceas, dextrinas e  $\text{CaCl}_2$  e possui elevada atividade lipolítica (AMANO ENZYME, 2018).

### 3.5 Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas desempenha um papel importante na biotecnologia. A principal razão para imobilizar enzimas é a capacidade de isolar o biocatalisador do produto de reação e reutilizá-lo para aumentar a produtividade do processo (CORTEZ et al., 2018; DA RÓS et al., 2010; MENDES; DE CASTRO; GIORDANO, 2013; MIRANDA et al., 2011; RAMOS et al., 2017; SÁNCHEZ; TONETTO; FERREIRA, 2017). Diferentes técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar a sua recuperação e reutilização (CORTEZ et al., 2018; RAMOS et al., 2017). A seleção do melhor método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do imobilizado, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada (CORTEZ et al., 2018; MENDES; DE CASTRO; GIORDANO, 2013; MIRANDA et al., 2011).

A seleção do suporte para imobilização é um fator importante que pode influenciar nas propriedades da enzima ao longo da reação (DA RÓS et al., 2010; SÁNCHEZ; TONETTO; FERREIRA, 2017). Em trabalhos anteriores (MIRANDA; DA SILVA; DE CASTRO, 2006; MIRANDA et al., 2011), entre as matrizes testadas como suporte para imobilização de lipase, resultados promissores têm sido alcançado por uma matriz inorgânica (óxido de nióbio,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ). Este suporte tem várias vantagens, como o baixo custo e a ausência de toxicidade, além de não alterar as propriedades catalíticas da enzima. Desta forma,  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  foi selecionado como suporte de imobilização da LBC nesse trabalho.

#### 3.5.1 Catalisador químico $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$

A utilização de heteropoliácidos (HPA) como catalisadores tem atraído interesse de ambos os ambientes, acadêmico e industrial, devido à sua versatilidade e facilidade de uso em catálise ácida. HPA, como  $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ,  $\text{H}_4\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}$ ,  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  e  $\text{H}_4\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40}$ , foram descritos como sendo eficientemente usados em reações de esterificação e transesterificação, devido à sua tolerância à água e ácidos graxos livres. A versatilidade de HPA é consideravelmente aumentada quando catalisadores são suportados em matrizes

sólidas, tais como alumina, nióbio, carbono e zircônia (DA CONCEIÇÃO et al., 2019; DA CONCEIÇÃO et al., 2017; FERREIRA et al., 2011; SHEIKH et al., 2013; ZHU et al., 2013).

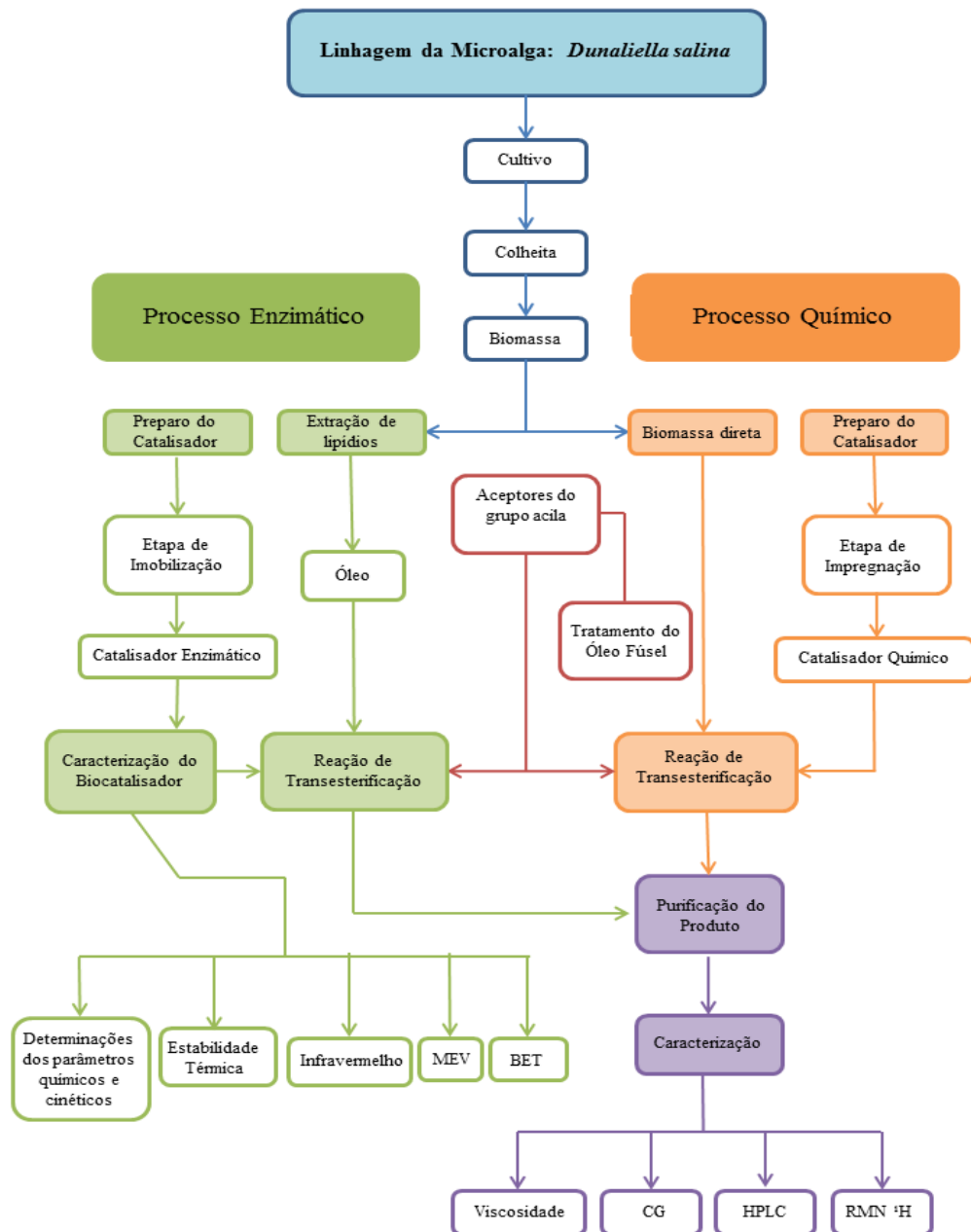
As características do suporte têm algumas implicações diretas sobre o desempenho do catalisador HPA. Enquanto zircônia e os óxidos à base de titânio demonstram ser excelentes suportes para HPA (SHEIKH et al., 2013), a utilização de tais catalisadores é dificultada pelos custos associados a essas matrizes, que afetam a economia do produto final. Trabalhos reportados na literatura utilizam nióbio como suporte sólido para o HPA, a fim de diminuir os custos associados à preparação do catalisador. Além disso, o uso do  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  impregnado em nióbio foi testado em reações com óleos vegetais de elevada acidez, como o óleo da macaúba, fornecendo rendimentos de reação superiores a 98 % (DA CONCEIÇÃO et al., 2017).



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos empregados para o desenvolvimento do trabalho. Os experimentos foram realizados de acordo com o esquema da Figura 6.

**Figura 6** - Esquema das etapas envolvidas no desenvolvimento do trabalho experimental.



Fonte: Autoria própria.

## 4.1 Materiais

### 4.1.1 Linhagem de microalga

A linhagem utilizada neste trabalho foi a microalga marinha *Dunaliella salina* (BMAK 116), pertencente ao Banco de Algas Marinhas do Instituto Oceanográfico da USP, gentilmente doada pelo Departamento de Oceanografia Biológica do Instituto Oceanográfico da USP (São Paulo).

### 4.1.2 Catalisadores

Os experimentos foram efetuados empregando catalisadores heterogêneos químico (óxido de nióbio impregnado com  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) e bioquímico (preparação comercial de lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* - LBC) manufaturada pela Amano Pharmaceuticals (Nagoya-Japão), adquirida comercialmente da Sigma Co. (St. Louis, MO, EUA) e posteriormente imobilizada em óxido de nióbio, de acordo com metodologia descrita por Da Rós et al. (2010) e Miranda; da Silva; de Castro (2006). O óxido de nióbio hidratado HY340 (amorfo), com área superficial de aproximadamente  $42,15 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  e contendo 80 % de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  foi gentilmente cedido pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração-CBMM. Para a catálise heterogênea química, foi utilizado o óxido de nióbio como matriz impregnada de  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  preparado pelo método *Incipient Wetness Impregnation* de acordo com metodologia descrita por da Conceição et al. (2017) e Enriquez et al. (2013).

### 4.1.3 Materiais de partida

As matérias-primas lipídicas empregadas na síntese de biolubrificante foram: material lipídico extraído da biomassa de *Dunaliella salina* obtido em escala de laboratório seguindo procedimentos previamente estabelecidos (DA RÓS et al., 2017; MENEZES et al., 2018; SILVA et al., 2017) e óleo de polpa de macaúba fornecido pela Associação de pequenos produtores rurais de Riacho D'Antas (Montes Claros, MG). Como aceptores do grupo acila foram utilizados: álcool etílico anidro Cromoline 99 %, álcool butílico Merck 99,5 %, álcool isoamílico Cromoline 99 % e o óleo fúsel, gentilmente fornecido pela destilaria (São Martinho S/A - Unidade Iracema, localizada em Iracemápolis - São Paulo)

com composição aproximada de 65 % de isopentanol, 8 % de isobutanol, 0,4 % de butanol, 1,5 % de propanol, 10 % de etanol e 15 % de água.

#### 4.1.4 Outros Reagentes

Todos os reagentes utilizados na execução do experimento deste trabalho estão apresentados no Quadro 2.

**Quadro 2** - Reagentes utilizados na execução da metodologia experimental.

Reagente	Pureza	Fornecedor
Acetona	Min. 99 %	Cromoline
Ácido nítrico	65 %	Fmaia
Álcool butílico terciário	PA	Cromoline
Álcool etílico	98 %	Cromoline
Álcool isoamílico	PA	Cromoline
Álcool isobutílico	99 %	Synth
Álcool metílico	Grau HPLC (99,95 %)	J. T. Baker
Azeite de oliva	Comercial	Carbonell
Biftalato de potássio	99,5 %	Cromoline
Clorofórmio	PA	Synth
Fenolftaleína	PA	Dinâmica
Fosfato de potássio monobásico	min. 99 %	Synth
Fosfato de sódio monobásico anidro	min. 99 %	Synth
Goma arábica em pó	100 %	Synth
Glutaraldeído	25 %	Cromoline
Heptano	95 %	Cromoline
Hexano	65 %	Cromoline
Hexanol	98 %	Merck
Isoctano	PA	Synth
Polietilenoglicol (PEG)	1500 U.S. P	Synth
$\gamma$ aminopropiltrióxido (APTS)	98 %	Sigma-Aldrich

Fonte: Autoria própria.

#### 4.2 Equipamentos

As especificações dos equipamentos usados estão descritas nos Quadros 3 e 4.

**Quadro 3 - Principais equipamentos utilizados.**

<b>Tipo de Análise e/ou ensaio</b>	<b>Equipamento</b>	<b>Modelo/fabricante</b>
Dosagem de ésteres	Cromatógrafo de fase gasosa	Modelo GC-3800, Varian
Dosagem de MAG e DAG	Cromatógrafo de fase líquida (CLAE)	Modelo Agilent 1200, Agilent Technologies
Espectroscopia	RMN	Modelo Mercury 300MHz, Varian
Análise do perfil de ácidos graxos	Cromatógrafo de fase gasosa	Perkin Elmer®, Clarus 580
Medidas de absorbância	Espectrofotômetro UV-Visível	Modelo 800XI, Femto
Medida de pH	Potenciômetro	Modelo TEC2, Tecnal
Purificação de ésteres	Rotaevaporador	Modelo 801, Fisatom
Secagem de suporte	Estufa de secagem	Modelo TE-393/2, Tecnal
Teor de água	Titulador automático Karl Fischer	Modelo AKF 5000, Koehler Instrument Company, Inc.
Teor de umidade	Balança analítica acoplada com infravermelho	Modelo ID 50, Marte®
Viscosidade dos ésteres obtidos	Viscosímetro	Modelo LVDVIIIICP-CP 520, Brookfield
Análise texturais	BET	NOVA-2200e, Quantachrome
Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	Espectrômetro	Modelo Spectrum GX, Perkin Elmer

Fonte: Aatoria própria.

**Quadro 4 - Outros equipamentos usados.**

<b>Equipamento</b>	<b>Modelo/fabricante</b>
Balança analítica	Modelo Shimadzu
Banho mariadubnoff	Marconi
Banho termostatizado	Modelo-UP200S/UP400S, Hielscher-Ultrasound Technology
Bomba de vácuo	Modelo RV3, BOC Edwards
Centrífuga	Modelo 206 BL, Excelsa® II
Placa de agitação	Modelo SL 152/18

Fonte: Aatoria própria.

### 4.3 Metodologia experimental

#### 4.3.1 Cultivo da microalga

Os cultivos foram realizados no Laboratório de Engenharia de Microalgas do Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena da USP (EEL-USP), empregando-se fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas (Figura 7), de formato cilíndrico com diâmetro de 15 cm, altura de 1 m e capacidade útil de 10 L. Os fotobiorreatores foram mantidos a 25 °C, empregando 10 % de inóculo e compressor de ar (potência 75 W, capacidade 100 L min<sup>-1</sup> (Boyu ACQ 007) conectado por tubos de látex para promover a aeração do sistema.

**Figura 7** - Fotobiorreator do tipo coluna de bolhas, de formato cilíndrico com diâmetro de 15 cm, altura de 1 m e capacidade útil de 10 L.



Fonte: Autoria própria.

Todas as etapas do cultivo, incluindo a preparação do inóculo, foram conduzidas utilizando-se o meio de cultivo Guillard f/2 suplementado com 150 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio e 4 g L<sup>-1</sup> de acetato de sódio, adotando condições estabelecidas anteriormente (BREDDA et al., 2019).

#### 4.3.2 Colheita e recuperação da biomassa

Ao final da etapa de cultivo, a biomassa foi recuperada por coagulação com  $\text{FeCl}_3$  ( $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) e submetida a filtração. Posteriormente, a biomassa recuperada foi submetida a lavagem com água destilada para remover o excesso de sal.

#### 4.3.3 Extração de lipídeos

Os lipídeos foram extraídos da biomassa da microalga úmida empregando-se a metodologia de Folch; Lees; Stanley (1956) com algumas modificações. As extrações foram realizadas em Ultrassom (Modelo-UP200S/UP400S, Hielscher-Ultrasound Technology) com processadores ultrassônicos que emitem potência entre 200 W e 400 W, de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2014). O extrato lipídico obtido foi seco em rota-evaporador para remoção do solvente e em seguida transferido para estufa ( $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) até obtenção de massa constante.

#### 4.3.4 Preparo do catalisador químico

O suporte utilizado para impregnação do catalisador heteropoliácido ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) foi o óxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_3$ ) preparado segundo a metodologia descrita por Conceição et al. (2017). O catalisador ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}/\text{Nb}_2\text{O}_3$ ) foi preparado usando 30 % em massa  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  relativo ao suporte. O catalisador heteropoliácido ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) foi diluído numa solução alcoólica a 70 % à temperatura ambiente, transferido para um cadinho de cerâmica contendo o suporte ( $\text{Nb}_2\text{O}_3$ ). O sólido formado foi então seco a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min, seguido de calcinação a  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 h em mufla. Essa etapa foi repetida duas vezes com uma calcinação final a  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 3 h.

#### 4.3.5 Preparo do catalisador bioquímico

##### 4.3.5.1 Preparo do suporte

Como suporte para imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* foi utilizado óxido de nióbio comercial ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ) preparado segundo a metodologia descrita por Miranda; da Silva; de Castro (2006) com pequenas modificações. O óxido de nióbio foi pré-tratado por

imersão em solução de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$  a 1 %) e aquecido a 75 °C sob agitação durante 1 h. Posteriormente, o material foi filtrado em funil de Buchner e lavado com água destilada até a obtenção de filtrados com pH neutro. O suporte foi levado à secagem em estufa numa temperatura de 105 °C por 24 h. Em seguida o óxido de nióbio pré-tratado foi ativado envolvendo duas etapas: silanização do suporte com solução de  $\gamma$ -aminopropil trietoxissilano ( $\gamma$ -APTS a 0,5 % v/v) e ativação do suporte com solução de glutaraldeído (GA a 2,5 % em tampão hidrogenofosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e pH 8).

#### 4.3.5.2 Imobilização da lipase

O suporte ativado foi imerso em hexano numa relação sólido:líquido de 1:10 e mantido sob agitação branda por 2 h. Em seguida, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução aquosa contendo 5 mg mL<sup>-1</sup> de polietilenoglicol (PEG-1500) e 250 mg de LBC na sua forma livre. As suspensões contendo enzima e suporte foram mantidas sob suave agitação por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a 4 °C. Em seguida, a lipase imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo. A lipase imobilizada foi submetida à secagem em dessecador até atingir umidade inferior a 10 %. A atividade hidrolítica dos derivados imobilizados foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (DA RÓS et al., 2010).

#### 4.3.5.3 Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas

Para analisar a influência das variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da LBC na forma livre e imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , foram realizados experimentos utilizando a metodologia da hidrólise do azeite de oliva descrita por Da Rós et al. (2010), em diferentes faixas de pH e temperatura visando estabelecer as condições ótimas. Para verificar a influência do pH (6 a 8) a temperatura foi mantida fixa à 40 °C. Após ter sido estabelecido a melhor condição de pH (6,5) tanto para a lipase na sua forma livre quanto imobilizada, verificou-se a influência da temperatura (40 à 60 °C) mantendo o pH fixo em 6,5.

Para verificar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial da reação hidrolítica da lipase livre e imobilizada no suporte  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e a ocorrência de algum tipo de inibição, a porcentagem de azeite de oliva na emulsão óleo e água foram variadas entre 20 a 70 % (m/v). Os ensaios foram conduzidos em pH 6,5 e temperatura de 55 °C. Os

resultados permitiram determinar os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) a partir do modelo cinético de *Michaelis-Menten*, seguindo o cálculo do método de linearização de *Lineweaver-Burke*.

#### 4.3.5.4 Testes de estabilidade térmica do biocatalisador

O efeito da temperatura na estabilidade da LBC na forma livre e imobilizada em  $Nb_2O_5$  foi determinado por meio da incubação de amostras da lipase livre (1 mL, 5 mg mL<sup>-1</sup>) e imobilizada (0,05 g) na temperatura de 45 °C (na qual foram conduzidas as reações de síntese dos biolubrificantes) em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,5.

Para a lipase livre retiram-se amostras nos tempos de 15, 30, 60, 120 e 180 min, e para a lipase imobilizada retiram-se amostras nos intervalos de 30, 60, 120, 180 e 240 min. Após tratamento térmico, as amostras de lipase (livre e imobilizada) foram imediatamente resfriadas e a atividade residual determinada a 37 °C, pela adição de 5 mL de substrato preparado (emulsão do azeite de oliva/água), conforme metodologia descrita por Da Rós et al. (2010). As constantes de desativação ( $k_d$ , h<sup>-1</sup>), foram calculadas pela Equação 1.

$$\ln A = \ln A_0 - K_d * t \quad \text{Equação 1}$$

Em que:  $A_0$  = atividade enzimática inicial;  $A$  = atividade residual após tratamento térmico durante um certo período de incubação ( $t$ )

#### 4.3.6 Síntese dos ésteres biolubrificantes

##### 4.3.6.1 Síntese de biolubrificantes via transesterificação do óleo microalgal empregando lipase imobilizada como biocatalisador

As reações de transesterificação empregando óleo de microalga foram realizadas de acordo com a metodologia previamente estabelecida por Ceron (2017), empregando LBC imobilizada em  $Nb_2O_5$  como biocatalisador.

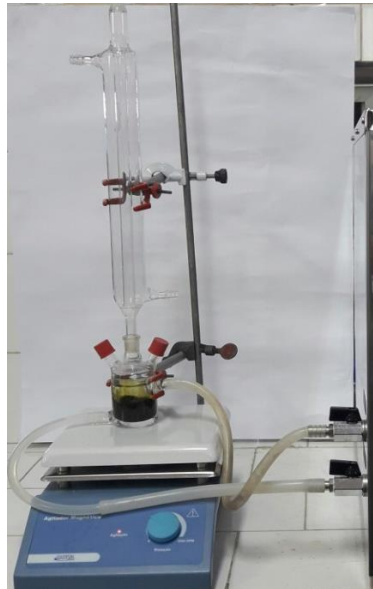
As reações foram conduzidas em reatores de vidro com capacidade de 50 mL, contendo 10 gramas de meio reacional (óleo microalga e aceptor do grupo acila) à temperatura de 45 °C, por meio de um banho termostatizado e agitação magnética (150 rpm) conforme apresentada no sistema da Figura 8, durante um período máximo de 120 h.



Iso-octano foi usado como solvente das reações, numa proporção de 40 % em relação ao meio reacional. Foram avaliadas diferentes razões molares, de acordo com o tipo de acceptor do grupo acila: 1:8 para o etanol, 1:4, 1:6 e 1:8 para butanol, 1:6 e 1:8 para o álcool isoamílico.

Depois de selecionada a razão molar mais adequada, o óleo fúsel simulado (mistura contendo os alcoóis mais representativos e em proporções semelhantes do óleo fúsel: 10 % álcool butílico, 78,2 % álcool isoamílico e 11,2 % álcool etílico) e óleo fúsel, foram avaliados como aceptores do grupo acila da reação.

**Figura 8** - Sistema utilizado nas reações de transesterificação do óleo microalgal.



Fonte: Autoria própria.

Com a finalidade de ter um parâmetro comparativo da reação, foram conduzidas reações de síntese dos biolubrificantes empregando óleo de macaúba nas mesmas condições reacionais (reação controle), tendo em vista que o óleo de macaúba apresenta índice de acidez e composição em ácidos graxos similares ao óleo da microalga em estudo.

#### 4.3.6.2 Produção de ésteres lubrificantes a partir da biomassa de *D. salina* por catálise heterogênea química empregando $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ impregnado em $\text{Nb}_2\text{O}_5$ como catalisador

As reações de transesterificação empregando a biomassa direta de microalga foram realizadas sem a prévia extração de lipídeos, empregando  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  impregnado em

$\text{Nb}_2\text{O}_5$  como catalisador químico heterogêneo previamente sintetizado e ativado em mufla a  $150\text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h.

As reações foram conduzidas em reator pressurizado (Parr Série 5500), contendo como meio reacional biomassa microalgal (20 % de lipídeos): álcool (99 %). O sistema foi incubado com 10 % de catalisador em relação à massa de material lipídico presente na biomassa à temperatura de  $250\text{ }^\circ\text{C}$  e agitação de 300 rpm, conforme mostra a Figura 9, durante um período de 6 h. Hexano foi usado como solvente das reações, numa proporção de 40 % em relação ao meio reacional, e a razão molar usada de óleo/aceptor do grupo acila (etanol, butanol, álcool isoamílico, óleo fúsel simulado e óleo fúsel) foi 1:180.

**Figura 9** - Sistema utilizado nas reações de transesterificação direta da biomassa microalgal.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.3.7 Purificação dos biolubrificantes

Os biolubrificantes obtidos ao final das reações foram purificados de acordo com a metodologia desenvolvida por Santos (2015), empregando o adsorvente Amberlite BD10DRY. Em tubos Falcon foi adicionado o produto formado juntamente com o adsorvente, e os tubos foram colocados em banho ultrassom por 2 h. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 10 min e em seguida colocados em rota-evaporador para a

retirada dos álcoois. A amostra de biolubrificante purificada foi caracterizada quanto aos parâmetros de viscosidade e teores de mono e diacilgliceróis.

#### **4.4 Metodologia analítica**

##### 4.4.1 Caracterização dos catalisadores

###### 4.4.1.1 Análise de área superficial (B.E.T.)

Os valores de área superficial específica do suporte empregado para imobilização da lipase foram obtidos pelo método B.E.T. (Brunauer, Emmett e Teller) empregando a técnica de adsorção/dessorção física de nitrogênio a 77,3 K. As amostras foram previamente submetidas a aquecimento de 100 °C por 3 horas sob vácuo. O equipamento utilizado foi Quantachrome (modelo NOVA 2200E).

###### 4.4.1.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi obtida a partir do acúmulo de um total de 32 varreduras na faixa de onda de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , e o brometo de potássio (KBr) foi usado como matriz medindo a transmitância para investigar a composição química do suporte e biocatalisador. Os espectros foram registrados num espectrômetro modelo GX, Perkin Elmer. 4.7.

###### 4.4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As mudanças conformacionais, tais como cavidades nas superfícies do suporte, definidas pela inserção de agentes de ativação e a presença da enzima no suporte foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias da superfície do suporte foram obtidas utilizando microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO MA 10 com EDS acoplado (Oxford Instruments Inca Penta FEET x3), operando a uma voltagem de aceleração de 20 kV.

#### 4.4.2 Tratamento do óleo fúsel

O elevado teor de água originalmente presente no óleo fúsel foi reduzido por meio de peneiras moleculares de 0,32 Å (Silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X-BHD Chemicals. A concentração de água presente no óleo fúsel foi reduzida de 15 % para 1 %, quantificando o teor de água em titulador automático Karl Fisher (Modelo Koehler AKF5000).

#### 4.4.3 Caracterização das propriedades das matérias-primas lipídicas e biolubrificantes

##### 4.4.3.2 Análise do perfil de ácidos graxos

A composição em ácidos graxos do óleo microalgal foi determinada por cromatografia gasosa, em cromatógrafo à gás PerkinElmer® - Modelo Clarus 580, equipado com uma coluna capilar com recheio composto de 5 % difenilo e 95 % dimetilpolisiloxano, revestida por fibra de vidro e detector de ionização de chama (FID). Nitrogênio foi usado como gás de arraste. Os padrões de ácidos graxos utilizados foram MIX Supelco® 37 de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma-Aldrich®), C4-C24.

##### 4.4.3.2 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 52 para o óleo microalgal e o cone CP 42 para os produtos resultantes das reações de transesterificação. As medidas foram feitas a 40 °C, empregando 0,5 mL de fluido. A viscosidade cinemática ( $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ ) é a razão entre a viscosidade absoluta (cP) e a densidade dos ésteres lubrificantes ( $\text{g mL}^{-1}$ ).

#### 4.4.4 Quantificação dos ésteres lubrificantes

##### 4.4.4.1 Caracterização dos monoésteres de ácidos graxos por RMN $^1\text{H}$

As estruturas dos ésteres obtidos tanto por via química quanto pela rota enzimática foram confirmadas pela análise de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN  $^1\text{H}$ ).

Os espectros foram obtidos no aparelho Varian modelo Mercury 300 MHz, de acordo com metodologia descrita por Carvalho et al., 2018a e Ceron et al., 2018.

#### 4.4.4.2 Quantificação de mono e diacilgliceróis

Mono e diacilgliceróis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), 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 por 4,6 mm) (Allcrom, Ltd., SP, Brasil), nas seguintes condições: temperatura da coluna de 40 °C e do detector de 70 °C.

As fases móveis utilizadas foram: acetonitrila e álcool metílico numa proporção de 80 % e 20 %. A taxa de fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> foi mantida durante os 6 primeiros minutos; 1,5 mL min<sup>-1</sup> durante os 24 minutos seguintes e 3,0 mL min<sup>-1</sup> durante os 5 minutos restantes para um tempo total de análise de 35 min. As amostras purificadas foram dissolvidas em acetato de etila-hexano (1:1, v/v) e os teores de mono e diacilgliceróis calculados.

#### 4.4.4.3 Quantificação dos ésteres lubrificantes por cromatografia gasosa

Os ésteres formados foram quantificados em cromatógrafo a gás (Modelo Varian CG 3800, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, USA) equipado com detector de chama ionizante e coluna empacotada de aço inoxidável do tipo 5% DEGS CHR-WHP 80-100 mesh 6ft 2.0 mm ID e 1/8" OD (Restek, FrankelCommerceofAnalyticInstrumentsLtda, SP, Brasil). As condições de operação do cromatógrafo foram estabelecidas para quantificação dos teores individuais de cada éster formado nas reações de transesterificação, conforme apresentado no Quadro 5, de acordo com a metodologia desenvolvida por Ceron (2017) e os padrões cromatográficos foram sintetizados por rota química.

**Quadro 5** - Condições de operação do cromatógrafo e parâmetros dos métodos de quantificação dos ésteres.

CONDIÇÃO	ÉSTERES DE ETILA	ÉSTERES DE BUTILA	ÉSTERES DE ISOAMILA
<b>Padrão interno</b>	Hexanol (10 g.L <sup>-1</sup> )		
<b>Rampa de temperaturas</b>	90 °C (3 min), 120 °C (10 min) e 170 °C (15 min)	90 °C (2 min), 150 °C (11 min) e 180 °C (9 min)	90 °C (2 min), 150 °C (5 min) e 180 °C (15 min)
<b>Taxa de aquecimento</b>	25 °C min <sup>-1</sup>	30 °C min <sup>-1</sup>	30 °C min <sup>-1</sup>
<b>Gás de arraste</b>	Nitrogênio (25 mL min <sup>-1</sup> )		
<b>Diluição da amostra</b>	1:3 (amostra - hexano)		
<b>Injeção da amostra diluída</b>	1:1 (amostra - padrão interno)		
<b>Tempo total de análise</b>	25 min		
	Tempos de retenção (minutos)		
<b>PI</b>	1,38	1,37	1,48
<b>C8:0</b>	3,28	3,39	3,77
<b>C10:0</b>	4,26	4,37	4,75
<b>C12:0</b>	6,56	5,91	7,00
<b>C14:0</b>	12,06	9,04	9,89
<b>C16:0</b>	13,96	15,59	12,19
<b>C18:0</b>	17,10	18,40	15,54
<b>C18:1</b>	17,81	18,74	15,60
<b>C18:2</b>	18,03	18,97	15,86

Fonte: CERON, 2017.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Valores obtidos de biomassa microalgal e lipídica após a etapa de cultivo da linhagem

Visando obter biomassa celular suficiente para realização dos ensaios de síntese dos biolubrificantes foram realizados 15 cultivos nos fotobiorreatores de coluna de bolhas, obtendo-se um volume total de meio reacional equivalente a 150 L. A quantidade de biomassa total obtida foi 172,50 g, correspondente a aproximadamente 32,76 g de material lipídico, o qual foi previamente caracterizado antes de ser empregado como substrato lipídico nas reações de síntese de biolubrificantes. A biomassa obtida ao final da etapa de cultivo foi submetida ao processo de extração de lipídeos e os resultados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Resultados obtidos para a biomassa celular oriunda da linhagem *Dunaliella salina* cultivada no fotobiorreator tipo coluna de bolhas.

Parâmetro	Valor
Biomassa (X)	1,15 g L <sup>-1</sup>
Concentração de lipídeo (P)	219 mg L <sup>-1</sup>
Rendimento específico de lipídeos (Y <sub>P/X</sub> )	0,19 mg lipídeo mg biomassa <sup>-1</sup>
Taxa de produção de lipídeos volumétrica (Q <sub>P</sub> )	31,28 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>
Taxa de produção de biomassa volumétrica (Q <sub>X</sub> )	164,28 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>
Taxa específica de produção de lipídeos (q <sub>P</sub> )	0,027 mg lipídeo mg biomassa <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>

Fonte: Autoria própria.

### 5.2 Propriedades das matérias-primas lipídicas

O material lipídico resultante do cultivo da linhagem *Dunaliella salina* foi caracterizado quanto ao perfil de ácidos graxos, apresentando a composição dos principais ácidos graxos na Tabela 2. De uma maneira geral foram identificados 11 ácidos graxos com tamanho de cadeia variando entre C10:0 a C18:3 com diferentes graus de insaturação. A porcentagem de ácidos graxos não identificados foi da ordem de 6,74 %. A Tabela 2 mostra também as propriedades físico-químicas do óleo microalgal, bem como do óleo de macaúba, empregado como controle nas reações de síntese de biolubrificantes.

**Tabela 2** - Composição em ácidos graxos e propriedades físico-químicas do óleo microalgal da linhagem *D. salina* e macaúba.

<b>Ácido graxo</b>	<b>Óleo microalgal Concentração (%)</b>	<b>Óleo de macaúba Concentração (%)</b>
Ácido Palmítico (C16:0)	15,37	18,7
Ácido Palmitoléico (C16:1)	3,80	4,0
Ácido Esteárico (C18:0)	7,15	2,8
Ácido Oleico (C18:1)	37,48	53,4
Ácido Linoléico (C18:2)	15,40	17,7
Ácido Linolênico (C18:3)	2,31	1,5
Total de Saturados	31,96	21,5
Total de Insaturados	61,30	78,5
<b>Propriedades</b>		
Índice de acidez (mg KOH g <sup>-1</sup> )	43,27	39,0
Umidade (%)	1,60	1,25
Viscosidade cinemática (mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	60,10	44,5
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	0,89	0,90

Fonte: Autoria própria.

O óleo de macaúba apresentou a composição de ácidos graxos saturados e insaturados de 21,5 % e 78,5 % respectivamente, enquanto que, para o óleo microalgal a composição em ácidos graxos foi de aproximadamente 31,96 % para saturados e 61,30 % de insaturados. Dentre os ácidos graxos presentes nas matérias-primas lipídicas destacam-se em maiores quantidades o oleico, 53,4 % para o óleo de macaúba e 37,48 % para o óleo de microalga, seguido pelos ácidos palmítico (C16:0) e linoleico (C18:2), que apresentaram praticamente a mesma quantidade, 18,7 % e 17,2 % para o óleo de macaúba e 15,37 % e 15,40 % para o óleo microalgal, respectivamente.

O valor de índice de acidez para o óleo de macaúba foi de 39,0 mg KOH g<sup>-1</sup> e 43,27 mg KOH g<sup>-1</sup> para o óleo de microalga e o teor de umidade da ordem de 1,25 % e 1,60 %, para o óleo de macaúba e microalga, respectivamente. Estes valores são preponderantes na escolha da rota catalítica ácida ou enzimática, pois, é recomendada, a utilização de catalisadores alcalinos somente para óleos com teores em ácidos graxos livres menores que 3 % e teor de umidade inferior a 1 %, uma vez que a reação de saponificação compromete a eficiência da reação de transesterificação e dificulta a separação das fases ésteres e glicerol.



### 5.3 Atividade dos catalisadores

#### 5.3.1 Atividade enzimática do biocatalisador

Para a realização dos experimentos, a lipase *Burkholderia cepacia* (LBC) foi imobilizada em óxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ) resultando em derivados imobilizados com atividades hidrolíticas de aproximadamente  $1400 \text{ U g}^{-1}$ . A umidade dos derivados imobilizados foi mantida em 7 % sendo este valor o mínimo recomendado para garantir atividade da enzima no meio orgânico e evitar o favorecimento da reação inversa (DENG et al., 2005). O suporte empregado para imobilização da lipase, bem como o derivado imobilizado foram caracterizados quanto à morfologia (MEV e BET) e espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

#### 5.3.2 Acidez do catalisador químico

Uma das propriedades mais importantes nos catalisadores para aplicação em reações de transesterificação trata-se da acidez. Neste caso, essa propriedade também é um indicativo do sucesso da impregnação do  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  na estrutura do suporte  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ . O catalisador  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}/\text{Nb}_2\text{O}_5$  apresentou acidez superficial de  $5,644 \text{ mmol H}^+ \text{ g}^{-1}$ , valor bastante elevado quando comparado ao valor de acidez superficial do  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  ( $0,041 \text{ mmol H}^+ \text{ g}^{-1}$ ) usado como suporte, estes dados confirmam a impregnação do  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ .

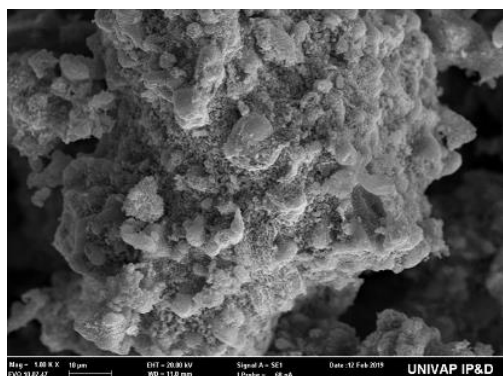
Vale ressaltar que o catalisador químico já foi previamente caracterizado, e os resultados podem ser visualizados no Anexo 1 (DA CONCEIÇÃO et al., 2017).

### 5.4 Caracterização das propriedades do suporte $\text{Nb}_2\text{O}_5$ e biocatalisador

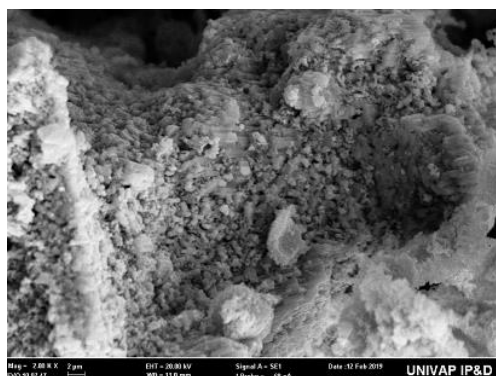
#### 5.4.1 Caracterização morfológica

A morfologia, distribuição e tamanho das partículas do óxido de nióbio ativado, derivado imobilizado e derivado imobilizado recuperado após reação foram caracterizados empregando a técnica de microscopia eletrônica de varredura, e as micrografias obtidas podem ser visualizadas na Figura 10.

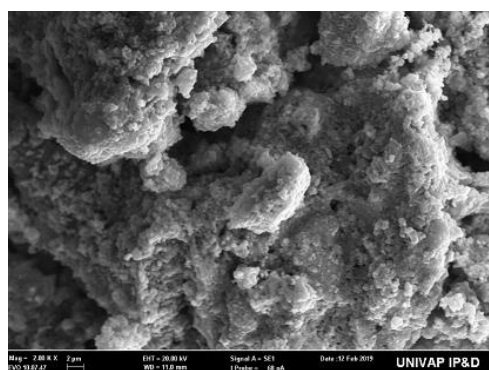
**Figura 10** - Micrografia eletrônica do óxido de nióbio silanizado, ativado, derivado, derivado imobilizado e derivado imobilizado recuperado após reação.



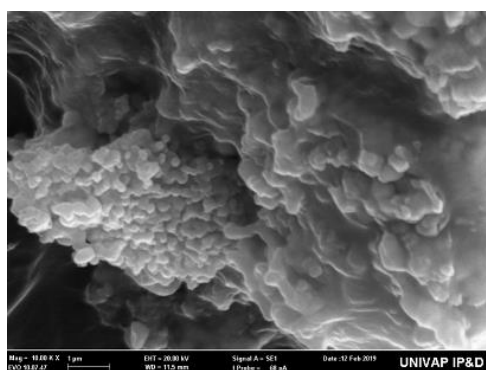
(a) Óxido de nióbio silanizado (2000x)



(b) Óxido de nióbio ativado (2000x)



(c) Derivado imobilizado (2000x)



(d) Derivado imobilizado recuperado após reação (10000x)

Fonte: Autoria própria.

O método de B.E.T foi também usado como uma ferramenta auxiliar para avaliação da área superficial específica, tamanho e volume médio dos poros das amostras do suporte puro, silanizado ( $\gamma$ -APTS) e ativado com glutaraldeído (Tabela 3).

**Tabela 3** - Análise de área superficial específica, volume e tamanho dos poros pelo método B.E.T, das amostras do suporte puro, silanizado e ativado com glutaraldeído.

Amostra	Área superficial ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )	Volume de poros ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )	Tamanho dos poros ( $\text{Å}$ )
$\text{Nb}_2\text{O}_5$ puro	42,15	0,0291	17,93
$\text{Nb}_2\text{O}_5$ silanizado	31,89	0,0240	17,95
$\text{Nb}_2\text{O}_5$ ativado	33,57	0,0265	17,98

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 3 mostra que o óxido de nióbio puro é formado por partículas com área superficial específica de  $42,15 \text{ m}^2 \text{g}^{-1}$  e volume de poros de  $0,0291 \text{ cm}^3 \text{g}^{-1}$ . Para óxido de nióbio silanizado pode ser observado uma redução nos valores de área superficial

específica e volume de poros que pode ser comprovado pela incorporação do grupo silano na superfície do suporte e no interior dos poros, visto que a área superficial específica foi reduzida para  $31,89 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  e volume de poros para  $0,024 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .

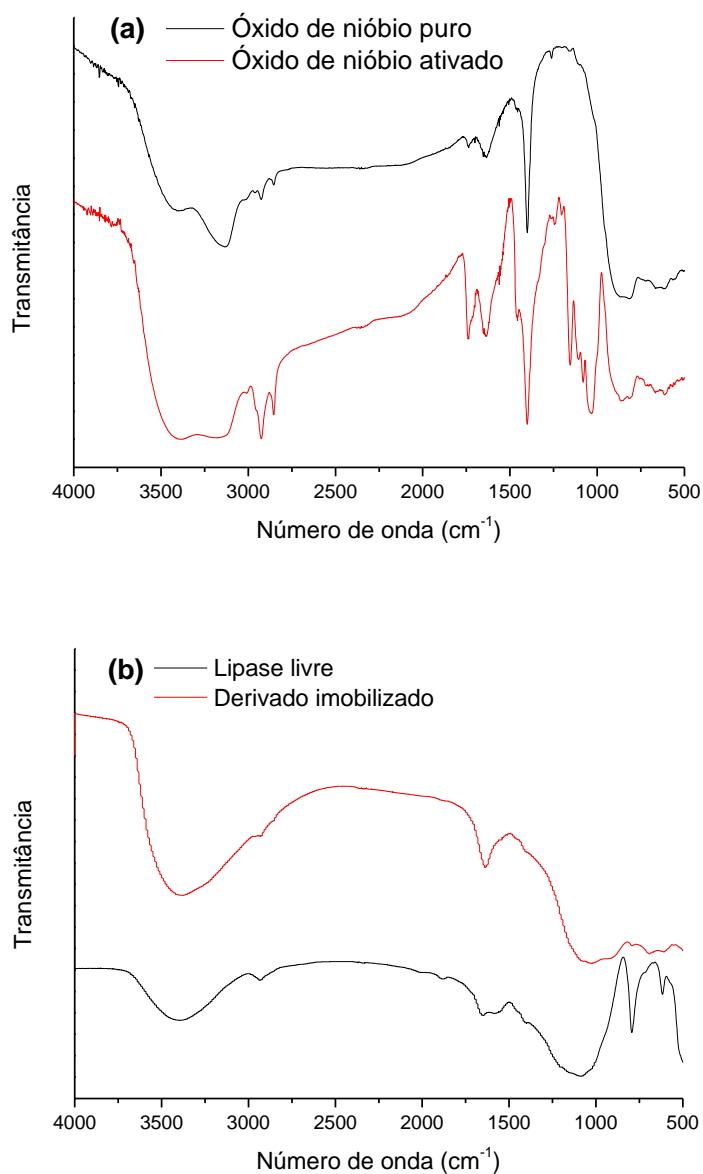
Pela análise das micrografias do óxido de nióbio silanizado (Figura 10-a) e ativado (Figura 10-b) não foram constatadas mudanças visuais do tamanho e forma das partículas, apresentando valores muito similares para a área superficial específica e volume de poros.

Quando se observa a micrografia da lipase imobilizada em óxido de nióbio ativado (Figura 10-c), verifica-se que as partículas foram recobertas pela enzima, não se visualizando mais as partículas do suporte individualmente o que pode ser comprovada pela atividade hidrolítica da LBC imobilizada, fornecendo valores da ordem de  $1400 \text{ U g}^{-1}$  aproximadamente.

#### 5.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Foram analisadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR) as amostras do suporte ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ) puro e ativado com glutaraldeído, bem como o derivado imobilizado e a LBC livre, conforme mostra os espectros da Figura 11 (a) (b). Essa análise teve como finalidade comprovar a eficiência do método de ativação do suporte e imobilização da lipase no suporte ativado. A Figura 11 (a) compara os espectros no infravermelho do suporte puro e após a ativação com glutaraldeído. A análise para a amostra de suporte ativado mostra o aparecimento da banda característica pertencente a ligação Si-O no comprimento de onda  $830\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$  (STUART, 1996), revelando a eficiência na etapa de ativação do suporte para a imobilização do lipase.

**Figura 11** - Espectros de FTIR das amostras de óxido de nióbio puro e óxido de nióbio ativado (a), lipase LBC livre e imobilizada em óxido de nióbio (b).



Fonte: Autoria própria.

A fim de verificar as modificações químicas provocadas pelo procedimento de imobilização, para a LBC foram feitos gráficos com os espectros de infravermelho da enzima livre e do derivado imobilizado obtido. Estes resultados são apresentados na Figura 11 (b). A lipase livre apresentou espectro típico de proteínas com bandas associadas ao grupo amida (CONH), na faixa de comprimento de onda característico que está situado entre 1600-1700 cm<sup>-1</sup>, devido ao estiramento da dupla ligação CO e da ligação CN, além da flexão da ligação NH (STUART, 1996). Com relação ao derivado imobilizado, foram apresentados picos dentro da mesma banda existente pela lipase livre. Outra característica

importante nos espectros da Figura 11 (b) foi à presença de bandas intensas na região 3100-3500  $\text{cm}^{-1}$ , relacionado às características de deformação axial dos grupamentos OH.

## 5.5 Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas do biocatalisador

### 5.5.1 Estudo da influência do pH e temperatura

Para analisar a influência das variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da LBC na forma livre e imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , foram realizados experimentos utilizando a metodologia da hidrólise do azeite de oliva descrita por Da Rós et al. (2010), em diferentes faixas de pH e temperatura visando estabelecer as condições ótimas. Para verificar a influência do pH (6 a 8) a temperatura foi mantida fixa à 40 °C. Após ter sido estabelecido a melhor condição de pH (6,5) tanto para a lipase na sua forma livre quanto imobilizada, verificou-se a influência da temperatura (40 à 60 °C) mantendo o pH fixo em 6,5.

Os resultados obtidos, em função da atividade hidrolítica para cada condição estudada, estão apresentados na Tabela 4. A influência das variáveis estudadas na atividade hidrolítica da LBC foi diferente para as formas livre e imobilizada. Para a lipase na sua forma livre, quando se manteve a temperatura fixa a 40 °C os valores de atividade em função da mudança do pH no meio variaram entre 3628,15 a 8377,69  $\text{U g}^{-1}$ , sendo que o maior valor foi obtido no pH 6,5. Por outro lado, quando se manteve o pH fixo em 6,5 e alterou-se as condições de temperatura, os valores de atividade hidrolítica aumentaram significativamente, variando entre 8377,69 à 11025,77  $\text{U g}^{-1}$ , visto que o valor mais elevado foi obtido na temperatura de 55 °C. Os resultados obtidos para LBC em sua forma livre são similares aos descritos na literatura para outras fontes de lipase: 10597  $\text{U g}^{-1}$  para a lipase de *Candida rugosa* (BENTO et al., 2017) e 10290  $\text{U g}^{-1}$  para lipase de *Pseudomonas fluorescens* (SANTOS et al., 2008).

**Tabela 4** - Resultados obtidos avaliando a influência das variáveis pH e temperatura na atividade hidrolítica da LBC na forma livre e imobilizada em Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Ensaio	Variáveis		Atividade hidrolítica (U g <sup>-1</sup> )	
	pH	T (°C)	Lipase Livre	Imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
1	6.0	40	5619,71	999,21
2	6.5		8377,69	1166,17
3	7.0		3628,15	843,64
4	7.5		6235,02	933,94
5	8.0		5905,52	872,32
6	6.5	40	8377,69	1166,17
7		45	8799,70	1565,66
8		50	10102,76	1682,22
9		55	11025,77	1827,6
10		60	10172,47	1761,16

Fonte: Autoria própria.

Para a lipase imobilizada em Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, as atividades hidrolíticas determinadas em função da variação do pH variaram entre 843,64 a 1166,17 U g<sup>-1</sup>, sendo que o valor mais elevado foi atingido no pH 6,5. No entanto, quando se manteve o pH fixo em 6,5 e considerou-se apenas a variação de temperatura, os valores de atividade permaneceram entre 1166,17 a 1827,6 U g<sup>-1</sup>, sendo que o valor mais elevado foi obtido na temperatura de 55 °C, admitindo assim que o pH e temperatura ótimo para ambos os ensaios foi o mesmo.

Conforme pode ser observado, a lipase na sua forma livre sofreu maior influência do pH e temperatura, enquanto que o procedimento de imobilização resultou em um sistema enzimático mais estável na faixa entre 40 a 60 °C sem mudanças significativas em sua atividade. Os resultados obtidos para LBC imobilizada em Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> são similares aos descritos na literatura por Da Rós et al. (2010) utilizando o mesmo sistema imobilizado com atividade hidrolítica de 2033 U g<sup>-1</sup> para pH 6,5 na temperatura de 60 °C.

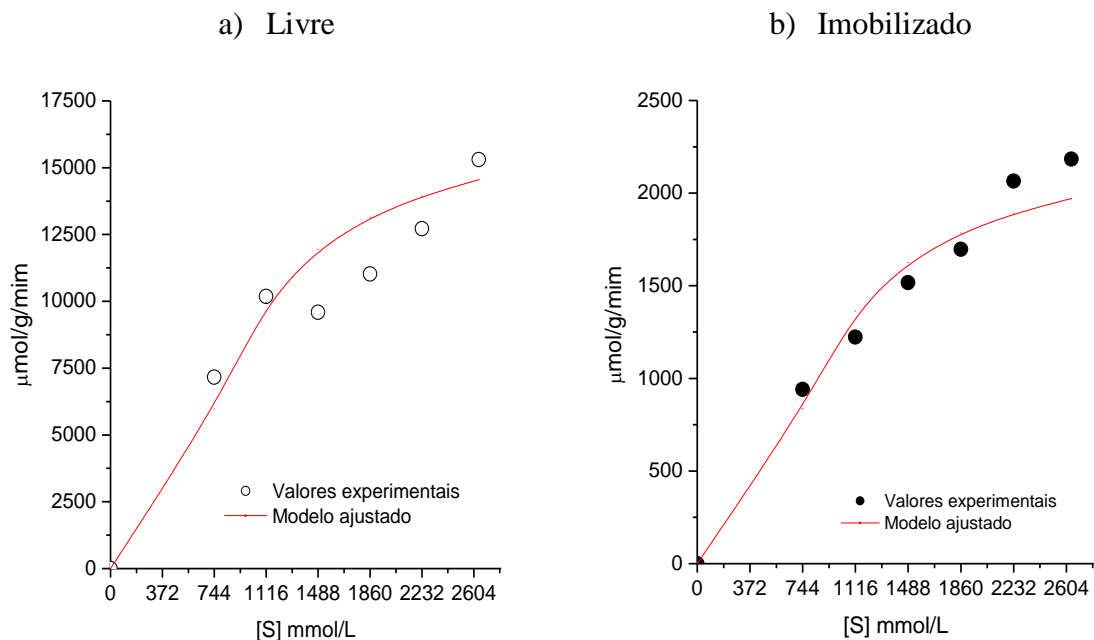
### 5.5.2 Determinação dos parâmetros cinéticos

Para verificar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial da reação hidrolítica da lipase livre e imobilizada no suporte Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e a ocorrência de algum tipo de inibição, a porcentagem de azeite de oliva na emulsão óleo e água foi variada entre 20 a 70 % (m/v). Os ensaios foram conduzidos em pH 6,5 e temperatura de 55 °C. Os

resultados permitiram determinar os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) a partir do modelo cinético de *Michaelis-Menten*, seguindo o cálculo do método de linearização de *Lineweaver-Burke*.

A Figura 12 apresenta as atividades hidrolíticas da LBC em sua forma livre e imobilizada ( $Nb_2O_5$ ) em função de diferentes concentrações do substrato (em ácidos graxos), na qual os gráficos de concentração do substrato ( $mmol L^{-1}$ ) versus velocidade de reação ( $U g^{-1}$ ) estão relacionados com o modelo cinético de *Michaelis-Menten*.

**Figura 12** - Gráficos da relação das atividades hidrolíticas da LBC livre (a), imobilizada no suporte inorgânico  $Nb_2O_5$  (b), em função de diferentes concentrações do substrato, e ajuste ao modelo de *Michaelis-Menten*.



Fonte: Autoria própria.

Conforme pode ser observado (Figura 12, a) a velocidade da reação de hidrólise para a lipase livre aumentou significativamente nos 2 primeiros pontos até atingir a concentração de substrato de  $10182 mmol L^{-1}$  (30 %). Após esse valor a atividade enzimática demonstrou pouca influência em decorrência do aumento da concentração do substrato, como prevê a cinética de *Michaelis-Menten*. Por outro lado, para a lipase imobilizada, Figura 12 (b) observa-se uma cinética com crescimento gradual atingindo uma concentração de substrato de  $2640 mmol L^{-1}$  (70 %).

Os resultados obtidos sugerem que a atividade de ambas as formas de lipase (livre e imobilizada), em função da concentração de ácidos graxos, segue uma cinética do tipo

*Michaelis-Menten*, indicando que na faixa de concentração estudada e no tempo de reação hidrolítica (5 min), não se detectou uma possível inibição no sítio ativo da enzima.

A partir das curvas da atividade hidrolítica em função da concentração de substrato, foram obtidos os parâmetros cinéticos  $K_m$  (mM) e  $V_{max}$  ( $U\ g^{-1}$ ) para a lipase na sua forma livre e imobilizada em  $Nb_2O_5$ , bem como o coeficiente de correlação da linearização. Esses resultados são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  obtidos para lipase de diferentes fontes a partir das curvas da atividade hidrolítica em função da concentração de substrato.

Lipase	$V_{max}$ ( $U\ g^{-1}$ )	$K_m$ ( $mmol\ L^{-1}$ )	Referência
LBC - Livre	20690	1387	Este trabalho
LBC imobilizada em $Nb_2O_5$	4411	2796	
<i>Candida rugosa</i> - Livre	22575	626	Bento et al. (2017)
<i>Candida rugosa</i> imobilizada em Poli (estireno-co-divinilbenzeno)	3699	781	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> - Livre	26965	329	Santos et al. (2008)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizada em POS-PVA	633	401	

Fonte: Autoria própria.

Os valores de  $K_m$  estão relacionados com a afinidade do biocatalisador pelo substrato. Para a enzima imobilizada em óxido de nióbio o valor de  $K_m$  foi de 2796  $mmol\ L^{-1}$  e para enzima em sua forma livre o  $K_m$  foi 1387  $mmol\ L^{-1}$ . O processo de imobilização geralmente diminui a afinidade da enzima pelo substrato, indicando dificuldade de difusão do substrato ao biocatalisador (PEREIRA; ZANIN; CASTRO, 2003), o que corrobora os resultados obtidos neste trabalho. Por outro lado, para a lipase em sua forma livre não há dificuldade de difusão, o que resulta em valores mais baixos de  $K_m$ , conforme mostra os resultados nesse trabalho e também outros estudos reportados na literatura para as lipases de *Candida rugosa* (626  $mmol\ L^{-1}$ ) e *Pseudomonas fluorescens* (329  $mmol\ L^{-1}$ ) (BENTO et al., 2017; SANTOS et al., 2008).

O valor de  $K_m$  para enzima imobilizada é maior em relação à enzima em sua forma livre, conforme pode ser visualizado na Tabela 5. No trabalho de Bento et al. (2017) o valor de  $k_m$  para a lipase *Candida rugosa* em sua forma livre foi 640  $mmolL^{-1}$ ,



aumentando para  $1766 \text{ mmol L}^{-1}$  quando a lipase foi imobilizada em polímero magnetizado. No trabalho de Santos et al., 2008, os estudos mostraram que para a lipase de *Pseudomonas fluorescens* em sua forma livre o valor de  $K_m$  foi  $329 \text{ mmol L}^{-1}$  e imobilizada em POS PVA foi  $401 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Os valores de  $V_{max}$  foram  $20690 \text{ U g}^{-1}$  e  $4411 \text{ U g}^{-1}$  para a LBC em sua forma livre e imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , respectivamente. Os valores obtidos são similares aos resultados apresentados na literatura para a lipase de *Candida rugosa*,  $22575 \text{ U g}^{-1}$  para lipase em sua forma livre e  $3699 \text{ U g}^{-1}$  para lipase imobilizada em Poli (estireno-co-divinilbenzeno), conforme pode ser visualizado na Tabela 5 (BENTO et al., 2017). No trabalho de Santos et al. (2008) o valor de  $V_{max}$  reportado para a lipase de *Pseudomonas fluorescens* ( $26965 \text{ U g}^{-1}$ ) também foi similar ao obtido neste trabalho. Entretanto, o valor obtido para o sistema imobilizado se mostrou inferior, da ordem de  $633 \text{ U g}^{-1}$ .

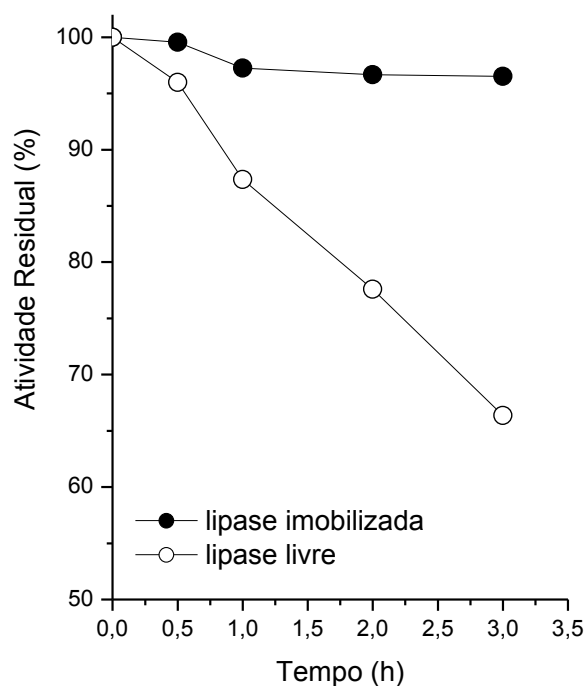
### 5.5.3 Estabilidade térmica

Um aumento de temperatura, geralmente corresponde a um aumento na taxa de reação por unidade de enzima imobilizada. Entretanto, um aumento de temperatura também pode promover aumento na taxa de desnaturação térmica da lipase, portanto, reduzindo a taxa de formação de produto.

Com base nesse contexto, experimentos foram realizados para determinar as constantes de desativação térmica ( $k_d$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) para a lipase livre e imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ . O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50 % da atividade inicial da enzima.

A estabilidade térmica foi verificada na temperatura em que foram conduzidas as reações de síntese dos biolubrificantes ( $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ) empregando como biocatalisador o derivado imobilizado em estudo. Esses resultados estão plotados na Figura 13.

**Figura 13** - Desativação térmica da LBC livre e imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  (experimentos conduzidos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,5 sob temperatura de  $45^\circ\text{C}$ ).



Fonte: Autoria própria.

Observa-se na Figura 13 que a enzima livre apresentou uma perda na atividade catalítica significativa nos seus valores de atividade hidrolítica após 1 hora de incubação e demonstrou atividade residual em torno de 65 % após 3 horas. Por outro lado, para a enzima imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  essa perda foi muito menos acentuada durante o período estudado, visto que, após 4 horas de incubação, sua atividade residual foi de aproximadamente 95 %, apresentando uma perda de somente 5 % em relação ao valor inicial. A Tabela 6 mostra os parâmetros de coeficiente de desativação térmica ( $k_d$ ) e tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ).

**Tabela 6** - Constantes de inativação térmica da LBC livre e imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e seus respectivos tempos de meia-vida.

Lipase	$k_d$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Tempo de meia-vida (h)
LBC livre	0,1411	4,91
LBC imobilizada em $\text{Nb}_2\text{O}_5$	0,0185	53,92

Fonte: Autoria própria.

Verifica-se na Tabela 6 que a constante de desativação térmica ( $K_d$ ) para a lipase em sua forma livre foi de  $0,1411 \text{ h}^{-1}$  e para lipase imobilizada o  $k_d$  foi  $0,0185 \text{ h}^{-1}$ . O tempo

de meia-vida é inversamente proporcional à constante de desativação térmica (Kd), conforme mostra a Tabela 6, 4,91 e 53,92 h para a LBC livre e imobilizada, respectivamente. Verifica-se que o processo de imobilização forneceu maior estabilidade térmica à enzima quando exposta à temperatura de 45 °C, revelando um tempo de meia-vida para o sistema imobilizado da ordem de 11 vezes maior em relação a lipase livre. Da Rós et al. (2010) estudaram a estabilidade térmica dessa mesma lipase a uma temperatura mais elevada (60 °C) e os resultados revelaram uma estabilidade menor, com respectivos tempos de meia-vida para a lipase livre e imobilizada de 0,36 h e 2,77 h.

Os estudos de estabilidade térmica para a lipase de *Candida rugosa* realizados à 60 °C também revelaram tempos de meia-vida menores, da ordem de 0,2 e 10,2 h para a lipase livre e imobilizada em Poliestireno-*co*-divinilbenzeno, respectivamente (BENTO et al., 2017).

## 5.6 Síntese dos ésteres biolubrificantes via catálise enzimática

O efeito do tamanho da cadeia do álcool na formação dos ésteres, bem como influência da razão molar óleo para álcool foi investigada em ensaios conduzidos em reator de tanque agitado operando em regime descontínuo, como descrito no item 4.3.6.1. Como aceptores do grupo acila foram usados os alcoóis (etanol, butanol e álcool isoamílico) e as reações foram mediadas pela LBC imobilizada em Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

O monitoramento das reações foi efetuado em termos de ésteres formados em função do tempo de reação. O produto obtido foi purificado e submetido às análises de viscosidade e teor de MAG (monoacilglicerol) e DAG (diacilglicerol). As reações foram conduzidas empregando óleo de macaúba como controle, tendo em vista que essa matéria-prima lipídica apresenta características similares ao óleo microalgal em estudo, em especial pela sua acidez, 43,27 mg KOH g<sup>-1</sup> e 39 mg KOH g<sup>-1</sup>, respectivamente para óleo microalgal e óleo de macaúba.

É importante destacar que estudos anteriores já foram efetuados visando determinar as condições adequadas para síntese de biolubrificantes a partir do óleo de palmiste catalisada pela lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-HEC (CERON, 2017). Entretanto, as características da matéria-prima (diferente composição em ácidos graxos e elevada acidez) e do derivado imobilizado (diferente suporte de imobilização) empregados no presente estudo justificam os experimentos exploratórios aqui descritos.

### 5.6.1 Síntese de ésteres empregando óleo de macaúba como substrato lipídico

Foram conduzidas reações de transesterificação do óleo de macaúba com diferentes aceptores do grupo acila, avaliando diferentes razões molares óleo/álcool, 1:6 e 1:8, tomando por base dados descritos na literatura para diferentes óleos vegetais usando LBC imobilizada em diferentes suportes.

A Tabela 7 mostra os teores de glicerídeos (monoacilgliceróis - MAGs e diacilgliceróis - DAGs) quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência, bem como as viscosidades dos produtos obtidos em cada reação.

**Tabela 7** - Desempenho da LBC imobilizada em Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, na transesterificação do óleo de macaúba com diferentes aceptores do grupo acila e razões molares para 120 h de reação.

Aceptor do grupo acila	RM	Conversão (%)	*Teor de éster (m/m%)	**MAG (m/m%)	**DAG (m/m%)	Viscosidade (mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
Etanol	1:8	99,90	74,86	0,32	0,19	5,00
Butanol	1:6	97,02	81,73	0,78	0,15	5,7
	1:8	95,20	80,39	4,05	0,75	6,6
Álcool isoamílico	1:6	99,04	72,37	2,77	1,73	6,6
	1:8	99,13	66,86	2,14	1,23	6,2

Fonte: Autoria própria.

\*Teor analisado nas amostras sem purificar % (massa de éster/massa de meio reacional).

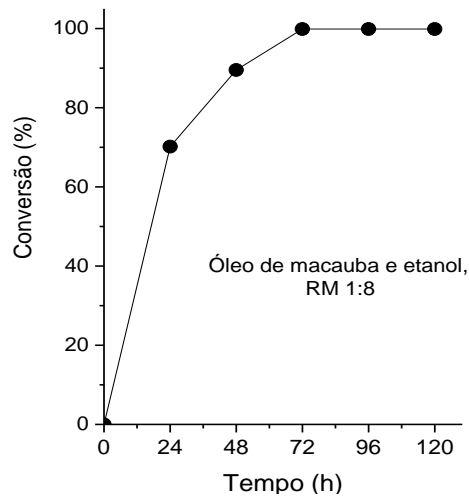
\*\*Teores de MAG e DAG foram analisados nas amostras purificadas % (massa de éster/massa de amostra purificada).

O progresso de todas as reações foi monitorado pela formação dos ésteres com base nos dados obtidos por cromatografia em fase gasosa (Figuras 14 e 15).

A Figura 14 mostra os resultados obtidos para a reação em que foi empregado etanol como aceptor do grupo acila. Observa-se que em 24 h a conversão molar era da ordem de 70,2 %, aumentou para 89 % em 48 h e alcançou conversão máxima em 72 h (99,9 %). A partir desse ponto, o equilíbrio da reação foi atingido, mantendo esse desempenho por 48 h adicionais.

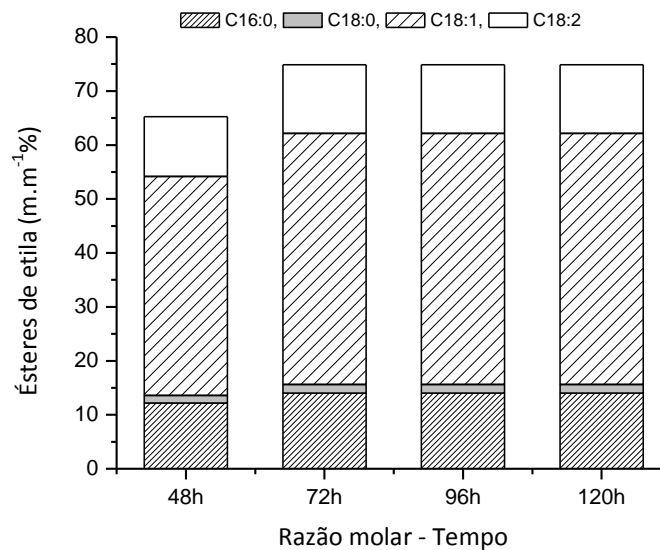
Com relação à formação dos ésteres de etila, verifica-se que foram formados os ésteres correspondentes aos ácidos graxos presentes no óleo de macaúba, principalmente para os ésteres de oleato, palmitato e linoleato de etila, que são os ácidos graxos presentes em maior proporção (Figura 15).

**Figura 14** - Conversão do óleo de macaúba em ésteres de etila empregando razão molar óleo/etanol de 1:8 catalisada pela LBC imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ .



Fonte: Autoria própria.

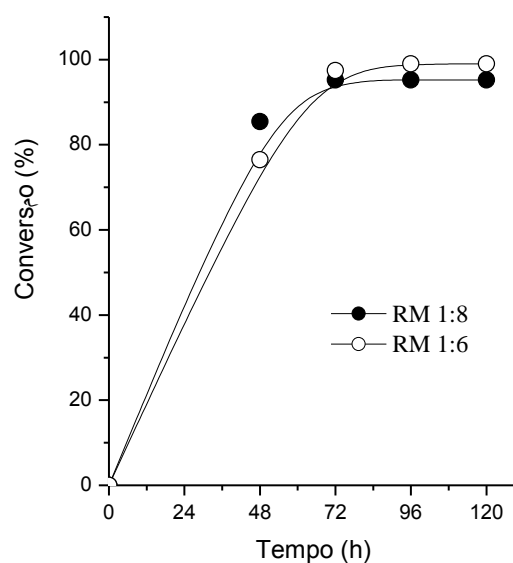
**Figura 15** - Perfil dos ésteres formados na transesterificação do óleo de macaúba com etanol na razão molar 1:8 usando a LBC imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  para 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de reação.



Fonte: Autoria própria.

Na sequência foram efetuadas as reações de transesterificação do óleo de macaúba com butanol, testando nesse caso além da razão molar padrão 1:8, substratos contendo menor excesso de álcool, ou seja, razão molar óleo/álcool: 1:6, tendo em vista a menor polaridade do butanol em relação ao etanol. O progresso das reações pode ser visualizado na Figura 16.

**Figura 16** - Influência da razão molar na conversão do óleo em ésteres de butila utilizando LBC immobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ .

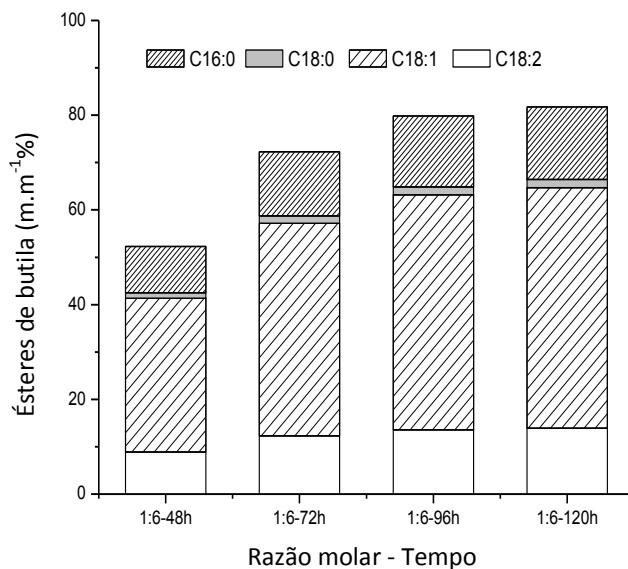


Fonte: Autoria própria.

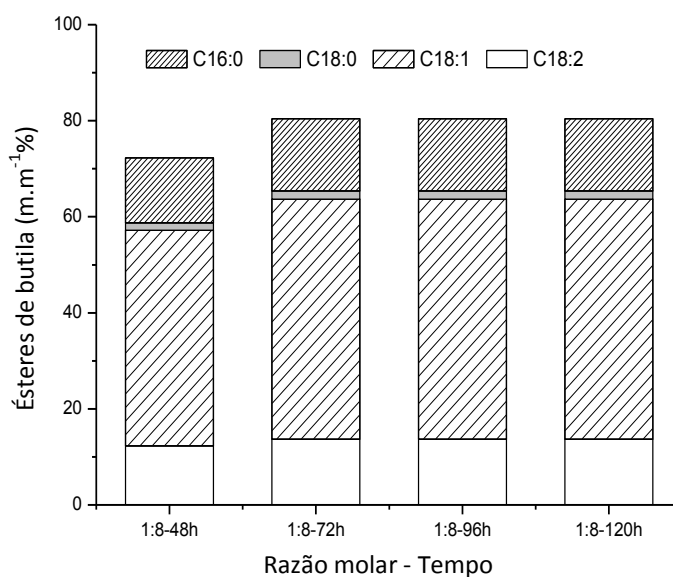
As razões molares 1:6 e 1:8 óleo/butanol forneceram resultados similares, alcançando conversões de 97,02 e 95,20 %, respectivamente, em 72 h, mantendo-se constante até o final da reação. Com relação à formação dos ésteres de butila, verifica-se que foram formados os ésteres correspondentes aos ácidos graxos presentes no óleo de macaúba independente da razão molar empregada na reação, a exemplo dos experimentos conduzidos com etanol (Figura 17, a, b).

Pela análise da Figura 17 pode-se observar que todos os ácidos graxos foram convertidos na mesma proporção, sem mostrar especificidade, o que pode ser explicado pelo caráter não específico da enzima testada. Desta forma, as razões molares 1:6 e 1:8 também foram empregadas nas reações envolvendo álcool isoamílico como acceptor do grupo acila.

**Figura 17** - Perfil de formação dos ésteres na transesterificação do óleo de macaúba com butanol em diferentes razões molares: 1:6 (a) e 1:8 (b), usando LBC imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  para 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de reação.



(a)

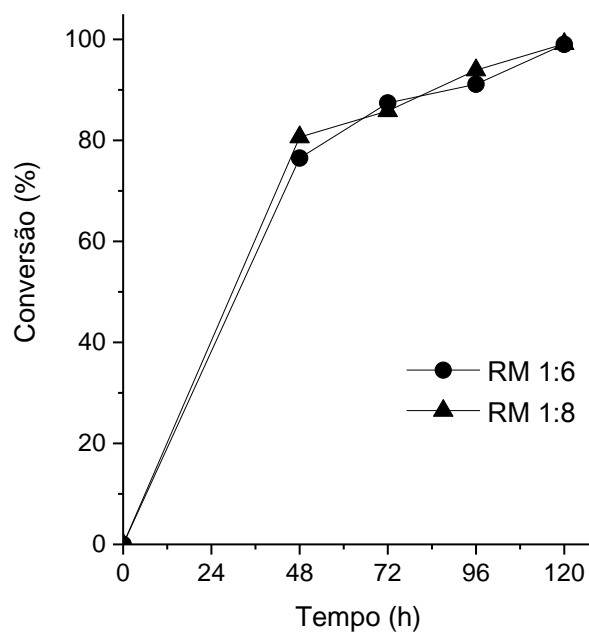


(b)

Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos para as reações com álcool isoamílico como aceptor de grupo acila são apresentados na Figura 18 e independente da razão molar empregada, o perfil cinético das reações foi muito similar. As conversões obtidas foram praticamente as mesmas para todas as amostras quantificadas durante o progresso das reações, alcançando conversões da ordem de 99,04 e 99,13 %, respectivamente, para 1:6 e 1:8 em 120 h.

**Figura 18** - Influência da razão molar na formação de ésteres de isoamila utilizando lipase *B. cepacia* immobilizada em  $Nb_2O_5$ .

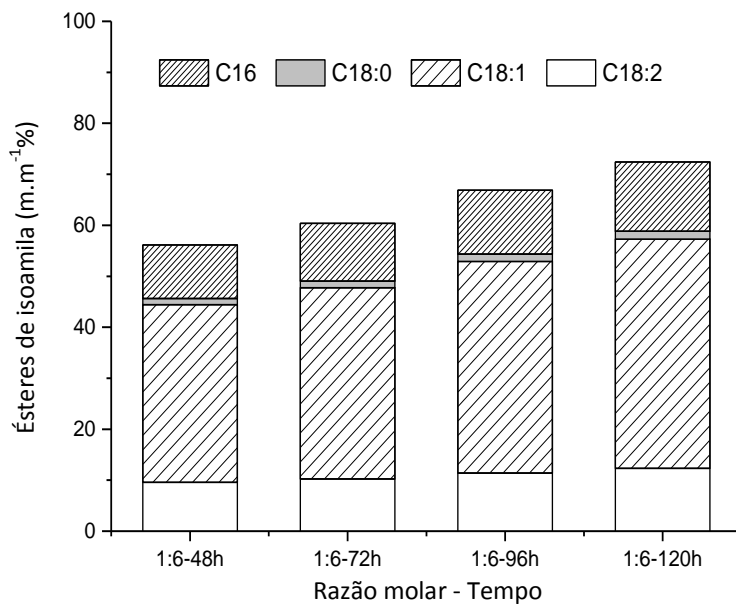


Fonte: Aatoria própria.

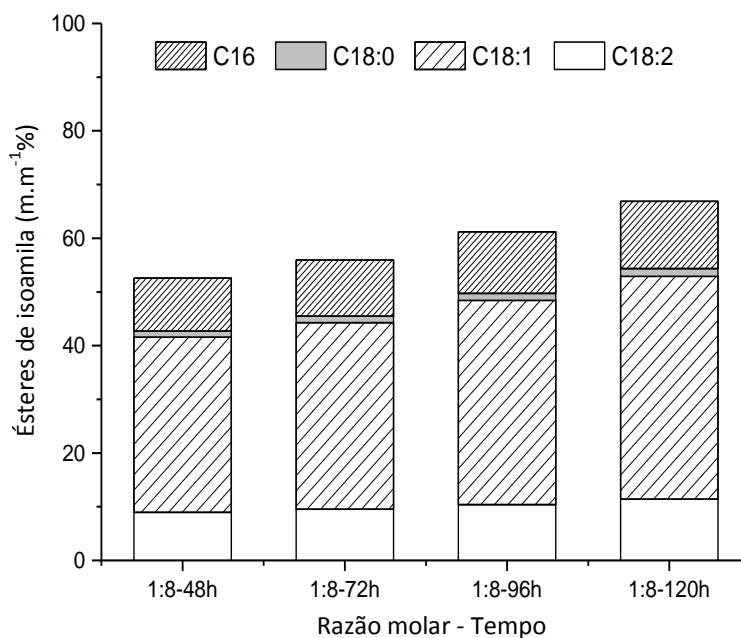
Com relação à formação dos ésteres de isoamila verifica-se que foram formados os ésteres correspondentes aos ácidos graxos presentes no óleo de macaúba, principalmente para os ésteres de oleato, palmitato e linoleato de isoamila, que são os ácidos graxos presentes em maior proporção, independente da razão molar empregada na reação (Figura 19, a, b). Todos os ácidos graxos foram convertidos na mesma proporção, sem mostrar especificidade, o que pode ser explicado pelo caráter não específico da enzima testada.



**Figura 19** - Perfil de formação dos ésteres na transesterificação do óleo de macaúba com álcool isoamílico em diferentes razões molares usando LBC imobilizada em  $Nb_2O_5$  para 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de reação.



(a)



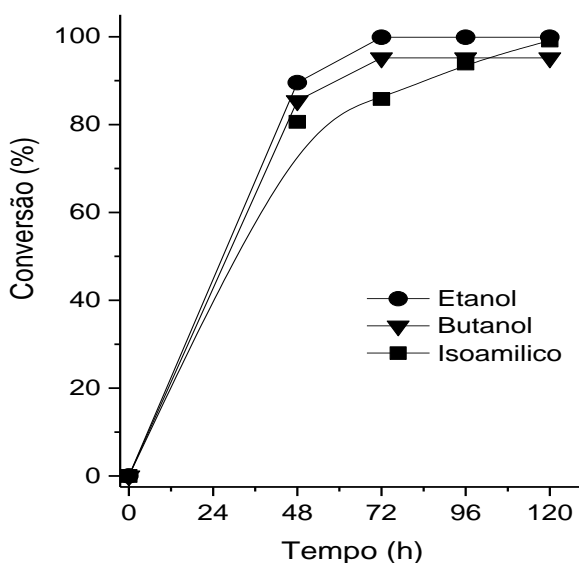
(b)

Fonte: Autoria própria.

5.6.2 Comparação do desempenho catalítico da LBC imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  nas reações de transesterificação do óleo de macaúba com diferentes aceptores do grupo acila utilizando a razão molar 1:8

Independente do aceptor do grupo acila empregado (etanol, butanol e isoamílico) para a mesma razão molar (1:8), os dados comparativos de conversão do óleo de macaúba em ésteres foram muito similar, conforme mostrado na Figura 20. Entretanto, nota-se uma pequena redução na velocidade da reação nas primeiras 72 h quando se utilizou o álcool isoamílico. Para as reações com butanol e etanol a conversão máxima foi alcançada em 72 h, 95,2 e 99,9 %, respectivamente, mantendo-se constante por 48 h adicionais (120 h). Por outro lado, a reação com álcool isoamílico apresentou cinética progressiva ao longo do tempo, obtendo-se conversão de 99,13 % em 120 h do processo.

**Figura 20** - Influência do tipo de aceptor do grupo acila na formação de ésteres de macaúba utilizando razão molar 1:8 óleo/álcool e LBC imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  como biocatalisador.



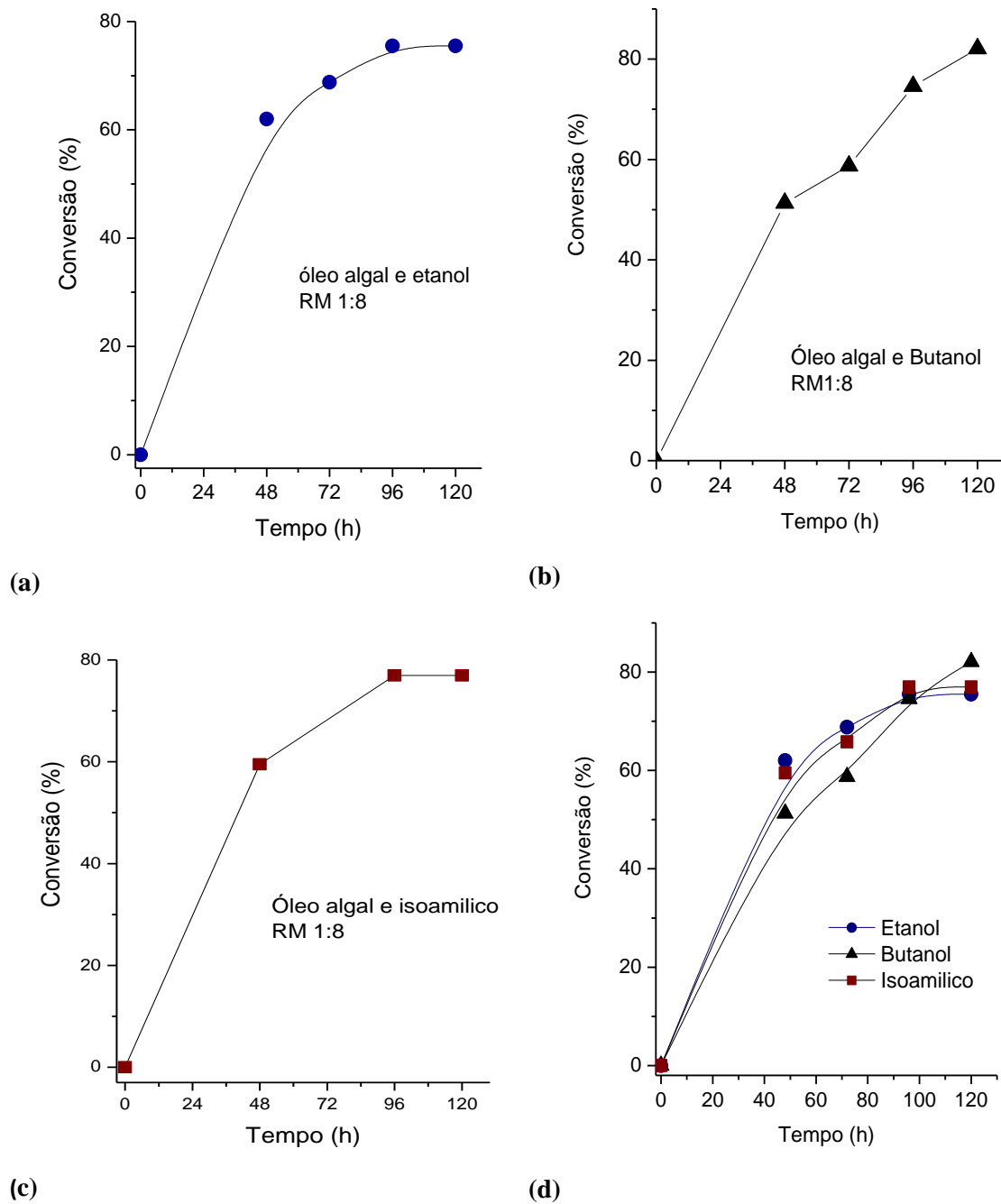
Fonte: Autoria própria.

5.6.3 Síntese de ésteres empregando óleo da microalga *Dunaliella salina* como substrato lipídico das reações

O conjunto de experimentos para óleo microalgal foi efetuado mantendo fixa a razão molar de óleo para álcool em 1:8, para o etanol, butanol e isoamílico.

A Figura 21 mostra o acompanhamento da reação de transesterificação do óleo microalgal com diferentes aceptores do grupo acila monitorado pela formação dos ésteres com base nos dados obtidos por cromatografia em fase gasosa.

**Figura 21** - Formação de ésteres empregando óleo microalgal e diferentes aceptores do grupo acila na razão molar fixa 1:8 óleo/álcool catalisada pela LBC imobilizada em  $Nb_2O_5$  (a-etanol, b-butanol, c-isoamílico, d-comparação).



Fonte: Autoria própria.

O perfil cinético da reação de transesterificação do óleo microalgal com etanol (Figura 21 a) foi bastante similar aos outros perfis utilizando butanol e álcool isoamílico, entretanto, apresentou velocidade de reação inicial discretamente mais elevada. Nesse caso, uma conversão de 62 % foi alcançada nas primeiras 48 h e em 96 h observa-se que a reação atingiu seu equilíbrio estequiométrico, com conversão máxima de 75,5 %. No caso do butanol uma conversão de 51,29 % foi obtida em 48 h, e 82,10 % foi obtido ao final da reação (120 h). Com relação ao álcool isoamílico, foi obtida uma conversão de aproximadamente 59 % em 48 h e o equilíbrio estequiométrico foi alcançado em 96 h, com produção de 77 % de ésteres isoamílicos.

A Figura 22 mostra a formação dos ésteres ao longo de cada tempo reacional, ressaltando para a formação daqueles presentes em maiores quantidade na matéria-prima lipídica da microalga estudada, ou seja, ésteres oleato, palmitato e linoleato.

A Tabela 8 mostra os teores de glicerídeos (monoacilgliceróis - MAGs e diacilgliceróis - DAGs) quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência, bem como a viscosidade dos produtos purificados.

**Tabela 8** - Desempenho da LBC imobilizada em Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, na transesterificação do óleo microalgal com diferentes aceptores do grupo acila na razão molar 1:8 óleo/álcool para 120 h de reação.

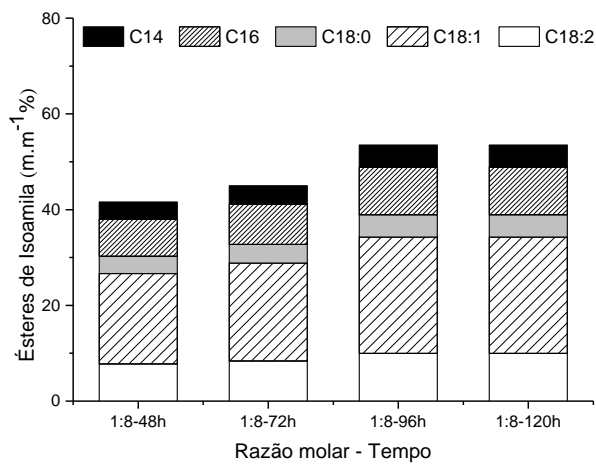
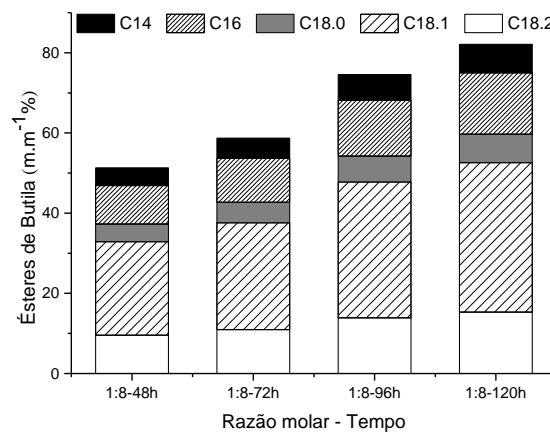
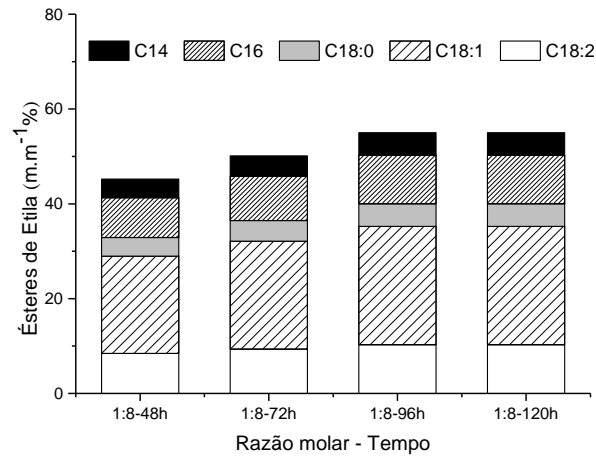
Álcool	Conversão (%)	*Teor de éster (m/m%)	**MAG (m/m%)	**DAG (m/m%)	Viscosidade (mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
Etanol	75,5	55	16,9	4,6	11,3
Butanol	82,1	58,9	14,2	2,4	8,9
Isoamílico	77,0	53,5	15,3	4,3	10,7

Fonte: Autoria própria.

\*Teor analisado nas amostras sem purificar % (massa de éster/massa de meio reacional).

\*\*Teores de MAG e DAG foram analisados nas amostras purificadas % (massa de éster/massa de amostra purificada).

**Figura 22** - Perfil de formação dos ésteres na transesterificação do óleo microalgal com diferentes aceptores do grupo acila na razão molar 1:8 usando LBC immobilizada em  $Nb_2O_5$  para 48 h, 72 h, 96 h e 120 h de reação.



Fonte: Autoria própria.

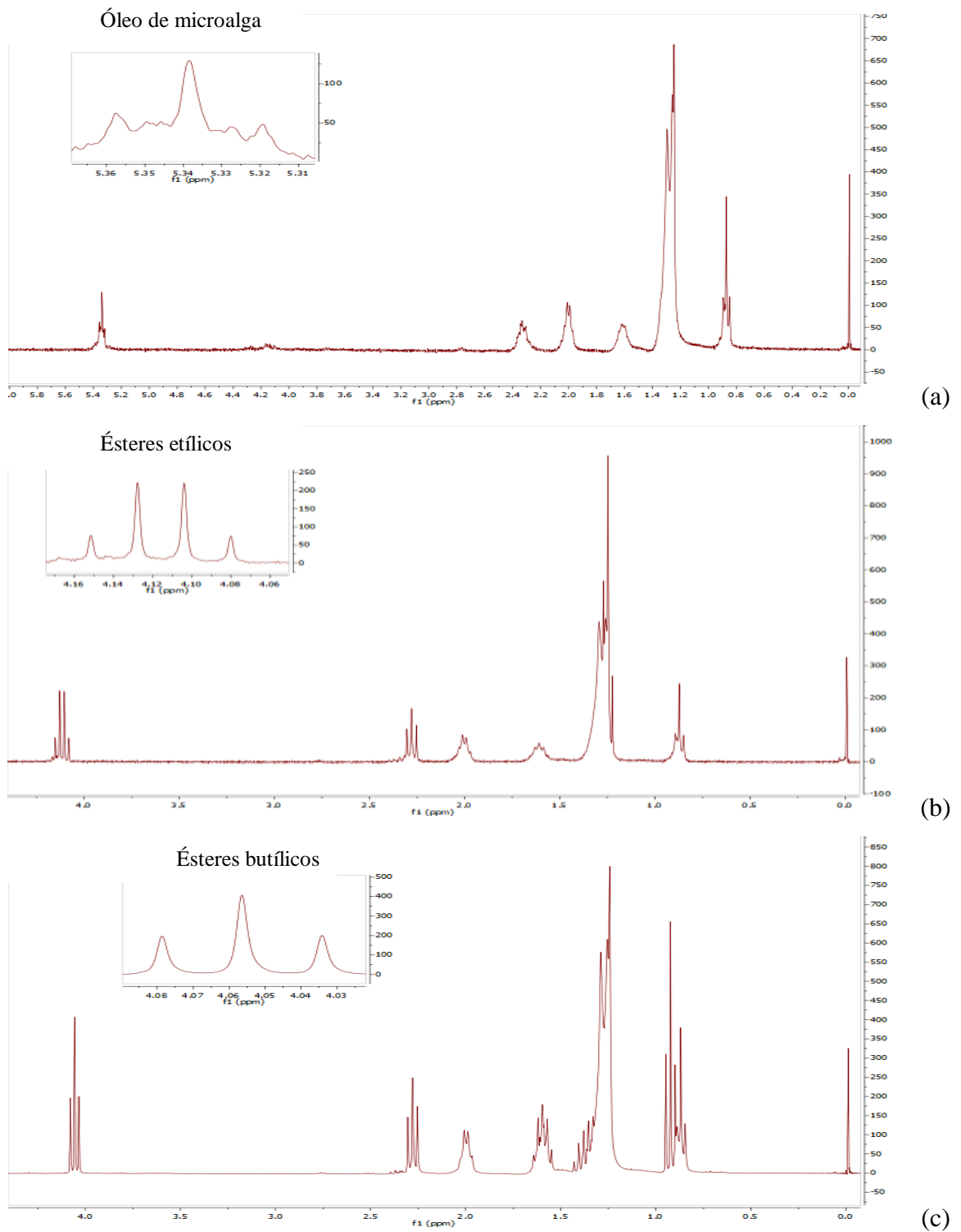
#### 5.6.4 Síntese de ésteres lubrificantes usando óleo fúsel simulado e óleo fúsel como acceptor do grupo acila

Nesta série de ensaios foi verificada a viabilidade de utilizar uma mistura dos álcoois anteriormente testados em proporção simulando óleo fúsel como acceptor do grupo acila. Para essa finalidade foi preparado uma mistura de alcoóis contendo: 11,2 % etanol, 10,6 % butanol e 78,2 % álcool isoamílico, denominada neste trabalho de óleo fúsel simulado. As reações de transesterificação foram catalisadas pela LBC imobilizada em  $Nb_2O_5$  mantendo fixa a razão molar de 1:8 (material lipídico/óleo fúsel simulado) por um período máximo de 120 h, tempo considerado adequado com base nos experimentos efetuados anteriormente. Óleo fúsel tratado, conforme descrito no item 4.4.2 também foi avaliado como acceptor do grupo acila nas mesmas condições reacionais.

A formação dos ésteres resultantes da transesterificação de óleo microalgal com os diferentes aceptores do grupo acila (etanol, butanol e álcool isoamílico), óleo fúsel simulado e óleo fúsel foram avaliados qualitativamente usando a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN  $^1H$ ), por meio do consumo de triacilgliceróis e o aparecimento de um quarteto para ésteres etílicos (Figura 23, b) e tripleto correspondente aos ésteres butílicos e isoamílicos (Figura 23, c, d) a 4,0-4,5 ppm. A presença dos ésteres etílicos, butílicos e isoamílico foram evidenciadas qualitativamente no espectro dos ésteres alquílicos do óleo fúsel pela superposição do quarteto com baixa intensidade e tripletos dos ésteres butílicos e isoamílicos (Figura 23, e, f).

Vale ressaltar que não foi possível efetuar a análise do produto final por cromatografia gasosa, tendo em vista que o produto formado é constituído por vinte e quatro ésteres (24) de características similares restringindo a separação e quantificação individual desses ésteres. A técnica adequada para execução desta análise complexa seria um GC massa, não disponível na instituição. Desta forma, os produtos resultantes das reações de transesterificação com óleo fúsel simulado e óleo fúsel foram purificados e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, para determinar os teores residuais de MAGs e DAGs, bem como os valores de viscosidade, como apresentado na Tabela 9.

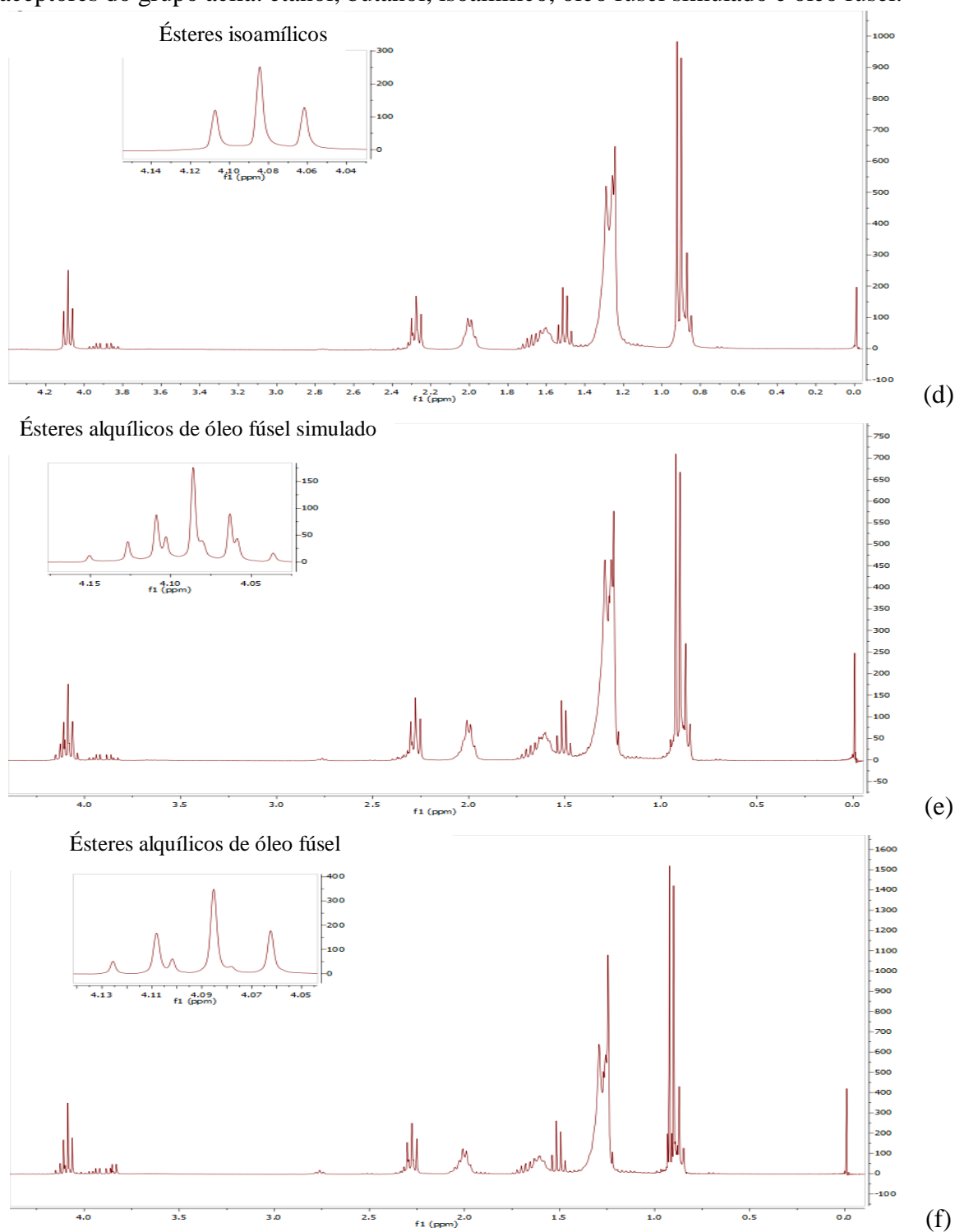
**Figura 23** - RMN  $^1\text{H}$  do óleo microalgal e ésteres obtidos pelas reações com os respectivos aceptores do grupo acila: etanol, butanol, isoamílico, óleo fúsel simulado e óleo fúsel.



(continua)

(conclusão)

**Figura 23** - RMN  $^1\text{H}$  do óleo microalgal e ésteres obtidos pelas reações com os respectivos aceptores do grupo acila: etanol, butanol, isoamílico, óleo fúsel simulado e óleo fúsel.



Fonte: Autoria própria.



**Tabela 9** - Desempenho da LBC imobilizada em Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, na transesterificação do óleo microalgal com óleo fúsel simulado e óleo fúsel como aceptores do grupo acila na razão molar 1:8 óleo/álcool para 120 h de reação.

Álcool	Conversão (%)	*MAG (m/m%)	*DAG (m/m%)	Viscosidade (mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
Óleo fúsel simulado	90,0	7,8	2,2	8,6
Óleo fúsel	91,5	8,5	**nd	7,8

Fonte: Autoria própria.

\*Teores de MAG e DAG foram analisados nas amostras purificadas % (massa de éster/massa de amostra purificada).

\*\*nd: não detectado.

Verifica-se na Tabela 9, que a viscosidade do produto da reação de transesterificação do óleo microalgal utilizando como acceptor do grupo acila o óleo fúsel simulado e óleo fúsel foram de 8,6 e 7,8 respectivamente. Esses resultados indicam uma redução bastante significativa em comparação à viscosidade do óleo microalgal inicial, da ordem de 60,1 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>. Quanto aos teores residuais de MAGs e DAGs os valores confirmam as conversões obtidas responsáveis pelos baixos valores de viscosidade.

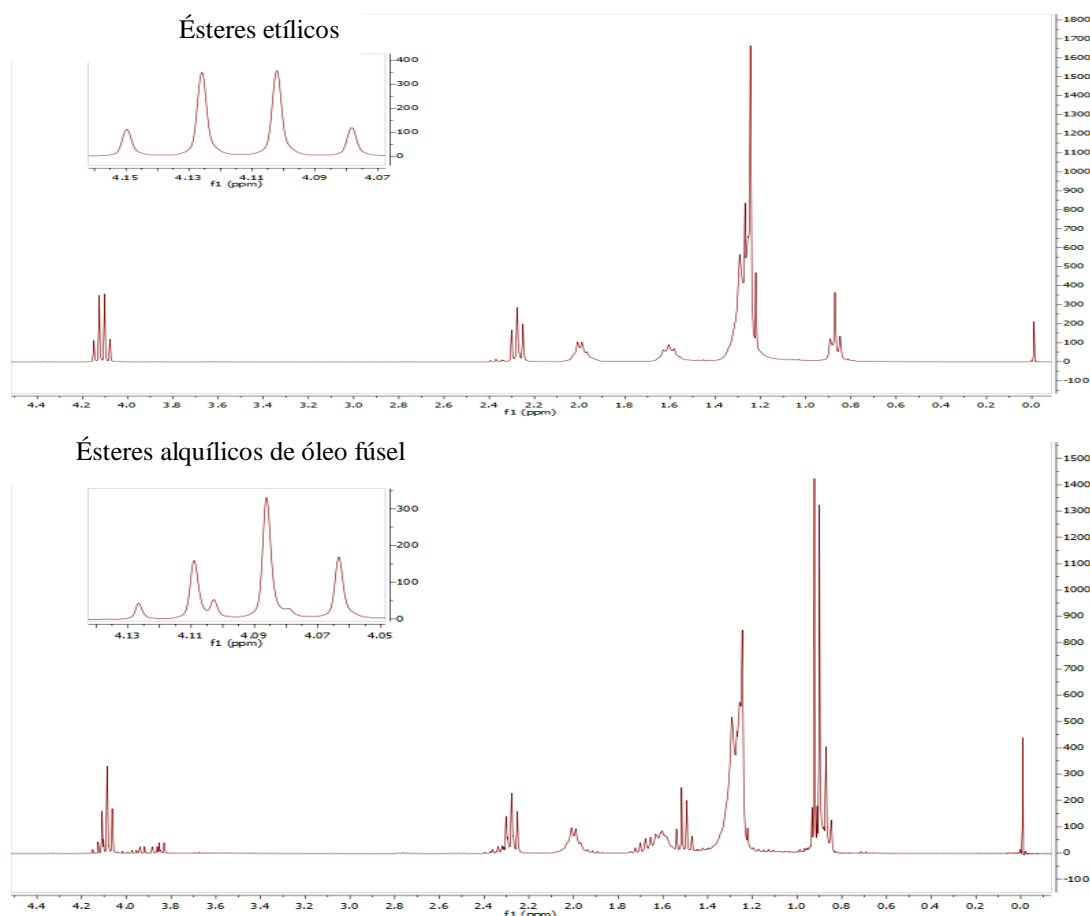
Desta forma, os dados comprovam a eficácia do processo de transesterificação empregando óleo fúsel como acceptor do grupo acila, e permitindo assim, potencial aplicação para esse subproduto proveniente da indústria sucroalcooleira.

## 5.7 Síntese dos ésteres biolubrificantes via catálise química

### 5.7.1 Síntese de ésteres empregando óleo de macaúba como substrato lipídico

Para verificar o desempenho do catalisador químico H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub> impregnado em óxido de nióbio (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), inicialmente as reações foram conduzidas empregando o óleo de macaúba como substrato lipídico e como aceptores do grupo acila etanol e óleo fúsel foram utilizados, empregando a razão molar de 1:180 (óleo/álcool) por um período de 6 h, de acordo com condições previamente estabelecidas para esse catalisador (CARVALHO et al., 2018a; DA CONCEIÇÃO et al., 2017). A Figura 24 apresenta os resultados qualitativos do produto resultante das reações de transesterificação obtidos por RMN <sup>1</sup>H.

**Figura 24** - RMN  $^1\text{H}$  do produto resultante da transesterificação do óleo de macaúba com diferentes aceptores do grupo acila: etanol e óleo fúsel na razão molar 1:180 óleo/álcool para 6 h de reação.



Fonte: Autoria própria.

A Tabela 10 mostra os teores de glicerídeos (monoacilgliceróis - MAGs e diacilgliceróis - DAGs) quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência, bem como a viscosidade dos produtos purificados.

**Tabela 10** - Desempenho do catalisador químico  $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$  impregnado em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , na transesterificação do óleo de macaúba com etanol e óleo fúsel como aceptores do grupo acila na razão molar 1:180 óleo/álcool para 6 h de reação.

Álcool	Conversão (%)	*MAG (m/m%)	*DAG (m/m%)	Viscosidade ( $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ )
Etanol	98,14	1,86	**nd	4,9
Óleo fúsel	99,1	0,81	**nd	5,5

Fonte: Autoria própria.

\*Teores de MAG e DAG foram analisados nas amostras purificadas % (massa de éster/massa de amostra purificada).

\*\*nd: não detectado.

Verifica-se na Tabela 10, que as viscosidades dos produtos das reações de transesterificação do óleo de macaúba utilizando como aceptores do grupo acila o etanol e o óleo fúsel foram de  $4,9 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$  e  $5,5 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. As elevadas conversões obtidas são confirmadas pelos baixos teores residuais de MAGs de 1,86 m/m % para a reação com etanol e 0,81 m/m % para a reação com óleo fúsel, além da ausência de DAGs em ambos os produtos. Além disso, os baixos valores de viscosidade corroboram os dados obtidos para o teor de MAGs, comprovando assim a eficácia do catalisador químico para o processo de transesterificação.

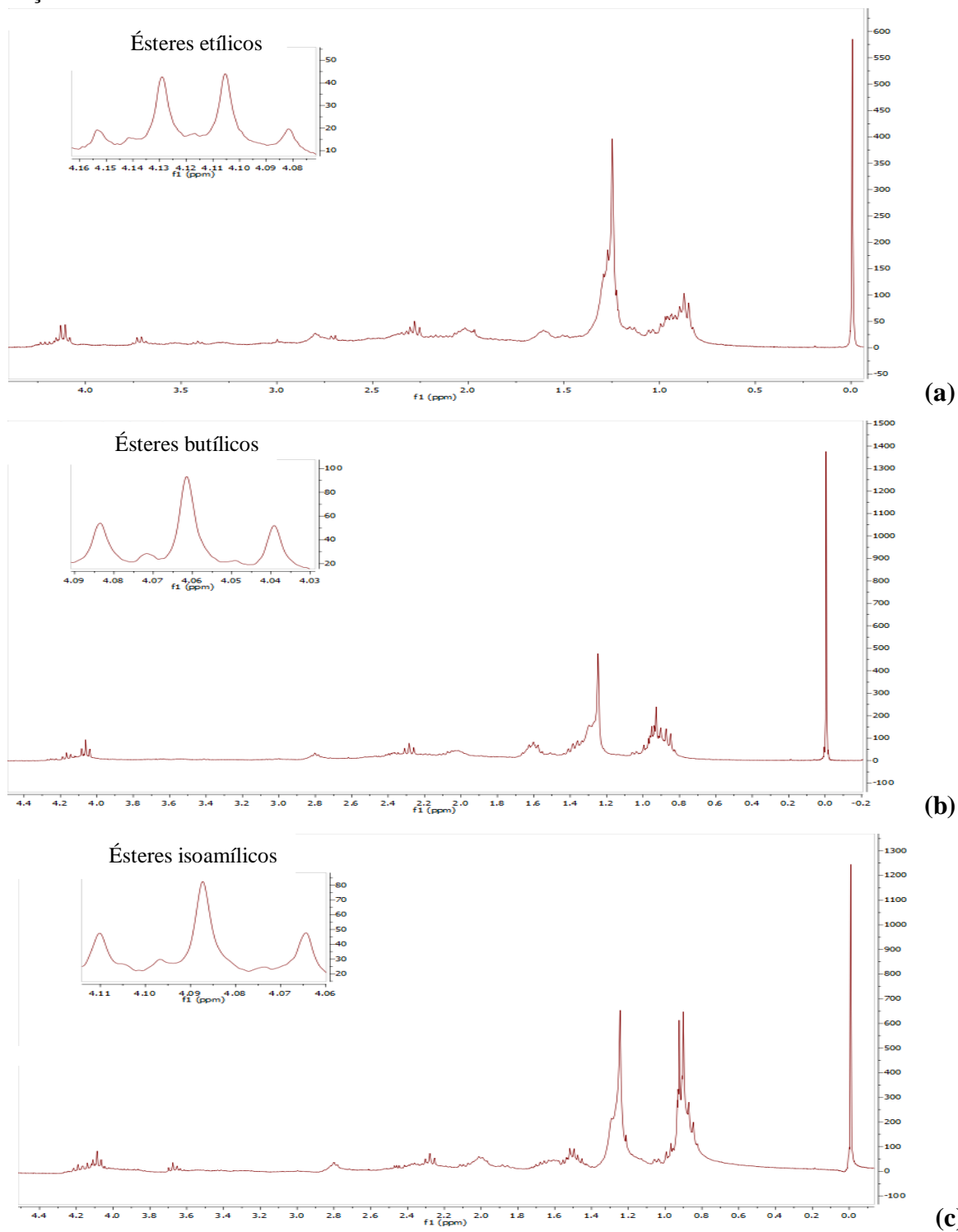
#### 5.7.2 Síntese de ésteres empregando a biomassa da microalga *Dunaliella salina* como substrato lipídico das reações

Após ter sido verificado o potencial do catalisador químico nas reações com óleo de macaúba (controle), a etapa seguinte do trabalho teve como finalidade avaliar o desempenho da biomassa direta da microalga como substrato lipídico da reação, sem extração prévia dos lipídeos.

Como aceptores do grupo acila foram usados os alcoóis (etanol, butanol, isoamílico), óleo fúsel simulado e óleo fúsel e como catalisador  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  impregnado em óxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ). O produto obtido foi purificado e submetido às análises de viscosidade e teores de glicérides, além de ter sido verificado a formação dos ésteres qualitativamente.

A Figura 25 apresenta os espectros obtidos por RMN  $^1\text{H}$  para o produto resultante das reações de transesterificação direta da biomassa com os diferentes aceptores do grupo acila, confirmando o aparecimento de um quarteto para ésteres etílicos e tripleto correspondente aos ésteres butílicos e isoamílicos. A presença de ésteres etílicos, butílicos e isoamílico foram confirmadas qualitativamente no espectro dos ésteres alquílicos do óleo fúsel simulado e óleo fúsel pela superposição do quarteto com baixa intensidade e tripletos dos ésteres butílicos e isoamílicos (Figura 25, d, e).

**Figura 25** - RMN  $^1\text{H}$  da reação de transesterificação empregando a biomassa direta da microalga *D. salina* com diferentes aceptores do grupo acila: etanol, butanol, álcool isoamílico, óleo fúsel simulado e óleo fúsel na razão molar 1:180 óleo/álcool para 6 h de reação.

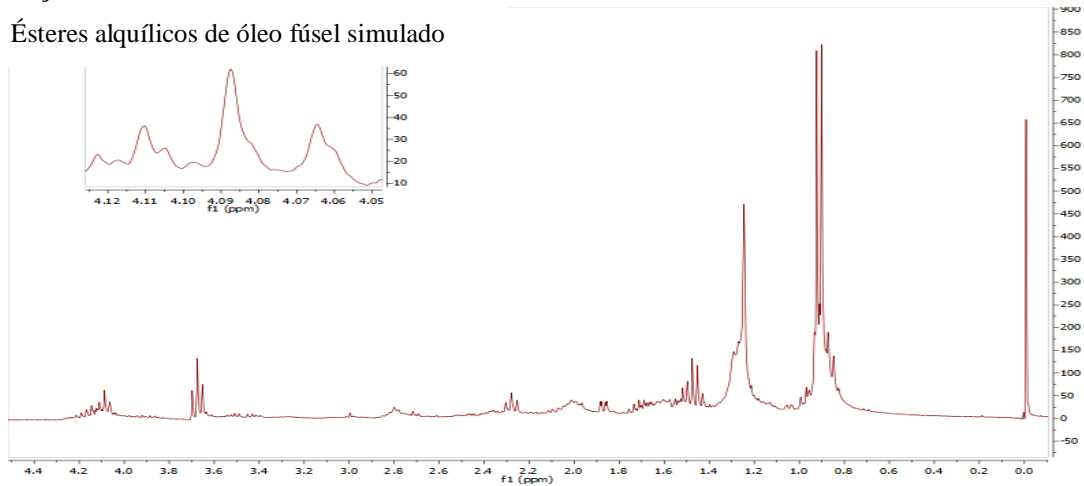


(continua)

(conclusão)

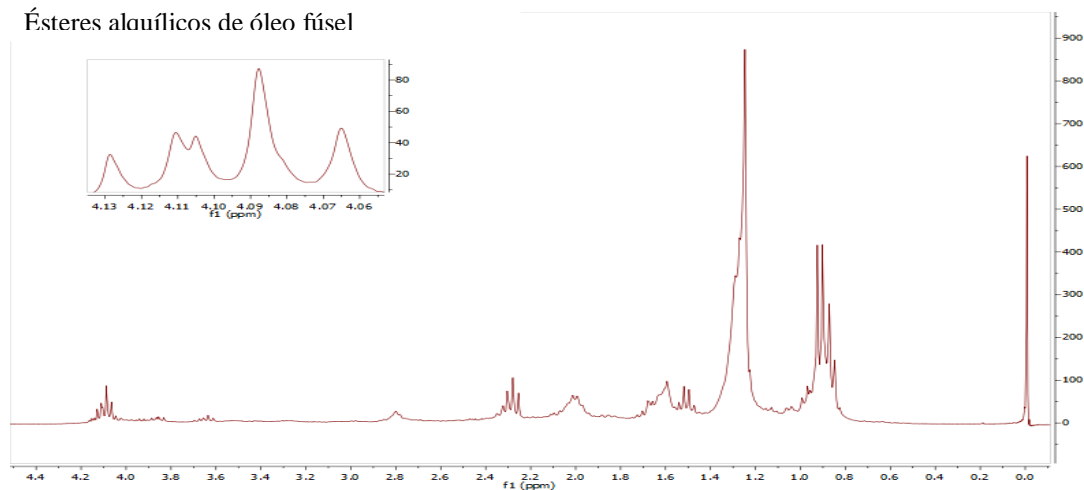
**Figura 25** - RMN  $^1\text{H}$  da reação de transesterificação empregando a biomassa direta da microalga *D. salina* com diferentes aceptores do grupo acila: etanol, butanol, álcool isoamílico, óleo fúsel simulado e óleo fúsel na razão molar 1:180 óleo/álcool para 6 h de reação.

Ésteres alquílicos de óleo fúsel simulado



(d)

Ésteres alquílicos de óleo fúsel



(e)

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 11 mostra os teores de glicerídeos (monoacilgliceróis - MAGs e diacilgliceróis - DAGs) quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência, bem como a viscosidade dos produtos purificados.

**Tabela 11** - Desempenho do catalisador químico  $H_3PMo_{12}O_{40}$  impregnado em  $Nb_2O_5$ , na transesterificação da biomassa direta da microalga *D. salina* com etanol, butanol, álcool isoamílico, óleo fúsel simulado e óleo fúsel como aceptores do grupo acila na razão molar 1:180 óleo/álcool para 6 h de reação.

Álcool	Conversão (%)	*MAG (m/m%)	*DAG (m/m%)	Viscosidade ( $mm^2 s^{-1}$ )
Etanol	92,94	1,55	5,51	6,2
Butanol	97,60	1,14	1,26	4,8
Isoamílico	97,40	2,60	**nd	4,9
Óleo fúsel simulado	97,58	2,42	**nd	5,0
Óleo fúsel	98,68	1,32	**nd	4,6

Fonte: Autoria própria.

\*Teores de MAG e DAG foram analisados nas amostras purificadas % (massa de éster/massa de amostra purificada).

\*\*nd: não detectado.

Verifica-se na Tabela 11 que os valores de viscosidade dos produtos purificados, obtidos após a reação de transesterificação da biomassa direta variaram entre 4,5 a 6,2  $mm^2 s^{-1}$  dependendo do aceptor do grupo acila empregado. Os valores de viscosidade obtidos em decorrência do tipo de agente acilante foram de 6,2  $mm^2 s^{-1}$  para os ésteres de etila, 4,6  $mm^2 s^{-1}$  para os ésteres de butila, 4,9  $mm^2 s^{-1}$  para os ésteres de isoamila. As viscosidades corroboram a conversão alcançada por cada reação, em decorrência da redução da viscosidade do óleo da microalga (60,1  $mm^2 s^{-1}$ ), antes de ser submetido à reação de transesterificação. As elevadas conversões obtidas também são confirmadas pelos teores residuais de MAGs e DAGs, comprovando assim a eficácia do processo.

Os resultados sugerem que a produção de biolubrificantes por transformação direta da biomassa microalgal sem a etapa intermediária de extração de lipídeos é tecnicamente viável. Além disso, o processo proposto é economicamente benéfico, uma vez que têm algumas vantagens em relação ao método convencional, que utiliza o óleo extraído da microalga, reduzindo alguns parâmetros, tais como o tempo de operação, solventes empregados na etapa de extração dos lipídeos e gastos energéticos.

Na literatura podem ser encontrados diversos trabalhos que elucidam o uso da transformação direta da biomassa de microrganismos oleaginosos em biodiesel alcançando elevados rendimentos de reação (CUI; LIANG, 2014; MARWAN; SUHENDRAYATNA; INDART, 2015). Carvalho et al. (2018a) estudaram a produção de biodiesel por transformação direta de biomassa *M. circinelloides* sem a prévia extração de lipídeos utilizando o mesmo catalisador avaliado nesse trabalho,  $H_3PMo_{12}O_{40}$  impregnado em

Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Foram obtidos rendimentos variando de 96,1 a 98,5 % em ésteres alquílicos, e baixos valores de MAG e DAG (<4 %).

Outro trabalho reportado na literatura que utilizou como catalisador H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub> impregnado em Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na reação de transesterificação direta da biomassa de *Mucor circinelloides* com etanol revelou conversão de 97,7 % e valores inferiores a 1 % de MAG e DAG (CARVALHO et al., 2018b). Esses resultados comprovam a eficiência do catalisador químico em reações que se utilizam a biomassa direta tanto de microalgas como estudado nesse trabalho, quanto de fungo filamentosos, conforme reportado na literatura.

### 5.8 Comparação do desempenho de catalisadores heterogêneos na síntese de ésteres biolubrificantes a partir da biomassa microalgal de *Dunaliella salina*

Um estudo comparativo do desempenho dos catalisadores heterogêneos foi efetuado, tomando por base os dados alcançados na transesterificação da matéria-prima lipídica oriunda da biomassa de *Dunaliella salina*. As conversões obtidas pela atuação de cada catalisador em função do tempo reacional e tipo de acceptor do grupo acila empregado na reação são apresentadas na Tabela 12.

**Tabela 12** - Comparação do desempenho dos catalisadores heterogêneos na síntese de biolubrificantes a partir do material lipídico da microalga *D. salina* com diferentes aceptores do grupo acila.

Catalisador	Matéria-prima lipídica	Acceptor do grupo acila	Tempo (h)	Conversão (%)
LBC imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Óleo microalgal	Etanol	96	75,5
		Butanol	120	82,1
		Isoamílico	96	77,0
		Óleo fúsel simulado	120	90,0
		Óleo fúsel	120	91,5
H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub> impregnado em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Biomassa microalgal	Etanol	6	92,94
		Butanol	6	97,60
		Isoamílico	6	97,40
		Óleo fúsel simulado	6	97,58
		Óleo fúsel	6	98,68

Fonte: Autoria própria.

Conforme pode ser observado, o tipo de catalisador afetou acentuadamente a velocidade de reação. O catalisador bioquímico (LBC imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ) promoveu conversões mais elevadas em maior tempo reacional: 96 h para catalisar 75,5 e 77,0 % respectivamente para os aceptores do grupo acila etanol e álcool isoamílico. No entanto, quando se utilizou os aceptores butanol, óleo fúsel simulado e óleo fúsel, foi necessário um tempo maior de reação, da ordem de 120 h, conforme mostra a Tabela 12. Por outro lado, o catalisador químico forneceu conversões superiores a 92 % a partir da biomassa microalgal em apenas 6 h de reação. Desta forma, a via química foi superior em termos de produtividade em relação à via bioquímica, além de dispensar o processo de extração do óleo a partir da biomassa, reduzindo o tempo global do processo.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovaram a eficiência desses dois sistemas de catalisadores heterogêneos testados, ressaltando que eles podem substituir com sucesso os catalisadores homogêneos convencionais geralmente empregados na síntese de ésteres com propriedades lubrificantes. Além do mais, eles apresentam vantagens adicionais como a possibilidade de recuperação ao final do processo e reutilização em bateladas consecutivas e a redução do número de etapas de purificação do produto final, reduzindo o custo operacional.



## 6 CONCLUSÕES

O principal objetivo deste trabalho foi a obtenção de ésteres com propriedades lubrificantes a partir de matérias-primas renováveis, como a biomassa microbiana, e um subproduto da indústria sucroalcooleira (óleo fúsel), avaliando a eficiência de catalisadores heterogêneos (bioquímicos e químicos). Os resultados obtidos foram altamente satisfatórios e nesse conjunto de dados pôde-se concluir que:

- O cultivo da microalga *Dunaliella salina* realizado no fotobiorreator de coluna de bolhas forneceu os seguintes valores: concentração de biomassa (X) de  $1,15 \text{ g L}^{-1}$ ; concentração de lipídeo (P) de  $219 \text{ mg L}^{-1}$ ; rendimento específico de lipídeos ( $Y_{P/X}$ ) de  $0,19 \text{ mg lipídeo mg biomassa}^{-1}$ ; taxa de produção de lipídeos volumétrica ( $Q_P$ ) de  $31,28 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ; taxa de produção de biomassa volumétrica ( $Q_X$ ) de  $164,28 \text{ mg biomassa L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  e taxa específica de produção de lipídeos ( $q_P$ ) de  $0,027 \text{ mg lipídeo mg biomassa}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ .
- O perfil de ácidos graxos obtido a partir do material lipídico da linhagem *Dunaliella salina* apresentou em sua composição aproximadamente 31,96 % de ácidos graxos saturados (S), 43,59 % de ácidos graxos monoinsaturados (MS) e 17,71 % de ácidos graxos poli-insaturados (PS), dentre os quais se destacam em maior quantidade os ácidos graxos: oleico (37,48 %), seguido pelos ácidos palmítico (C16:0) e linoleico (C18:2), que apresentaram praticamente a mesma quantidade, 15,37 e 15,40 %, respectivamente.
- Os catalisadores usados para as reações de transesterificação foram a LBC imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  impregnado em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ . Ambos os catalisadores mostraram elevado potencial catalítico, visto que a lipase imobilizada revelou atividade hidrolítica de aproximadamente  $1400 \text{ U g}^{-1}$ , além de uma elevada estabilidade térmica (tempo de meia-vida de 53,9 h a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e o catalisador  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}/\text{Nb}_2\text{O}_5$  apresentou acidez superficial de  $5,644 \text{ mmol H}^+ \text{ g}^{-1}$ .
- Independente do catalisador utilizado, a síntese de ésteres lubrificantes a partir do material lipídico da biomassa de *Dunaliella salina* apresentou resultados promissores e conversões superiores a 75,5 %. Entretanto, foi possível observar claramente o efeito do

tipo de acceptor do grupo acila empregado na reação no desempenho dos catalisadores avaliados.

- Para as reações de transesterificação conduzidas pela rota bioquímica, em que foi utilizada a LBC imobilizada em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  como biocatalisador, foram obtidas conversões entre 75,5 a 91,5 % quando se utilizou óleo da microalga *Dunaliella salina* como substrato lipídico da reação, indicando que o tipo de acceptor do grupo acila influenciou de forma significativa o rendimento da reação. A reação controle (transesterificação do óleo de macaúba) forneceu conversões mais elevadas ( $\geq 95\%$ ) nas mesmas condições reacionais.
- Na transesterificação direta da biomassa de *D. salina* mediado pelo catalisador químico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  impregnado em  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ), o produto obtido apresentou elevado teor de conversão do óleo microbiano em ésteres lubrificantes ( $\geq 92\%$ ) em 6 h de reação. Os resultados sugerem que a produção de ésteres com propriedades lubrificantes por transformação direta da biomassa microalgal sem a etapa intermediária de extração de lipídeos é tecnicamente viável, visto que reduz significativamente o tempo do processo, além de evitar o uso de solventes na etapa de extração dos lipídeos.
- Quanto a qualidade dos produtos obtidos, constatou-se que para as reações que forneceram elevadas conversões ( $\geq 95\%$ ) foram obtidos baixos teores de monoacilgliceróis ( $\leq 4\%$ ) e diacilgliceróis ( $\leq 1,73\%$ ). As viscosidades dos ésteres lubrificantes confirmaram o elevado grau de transesterificação do óleo de microalga modificando a viscosidade inicial do óleo de  $60,1 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$  para valores na faixa entre 4,6 a  $11,3 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ .
- Os resultados obtidos neste estudo foram promissores e permitiram estabelecer condições reacionais para a produção de ésteres com propriedades lubrificantes a partir da biomassa microalgal de *D. salina* e óleo fúsel por meio de duas rotas catalíticas, dentre as quais a rota química forneceu elevadas conversões em menor tempo reacional além de dispensar o processo de extração do óleo a partir da biomassa, reduzindo o tempo global do processo.

## REFERÊNCIAS

- ABEDINI-NAJAFABADI, H. et al. Effect of various carbon sources on biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* during nutrient sufficient and nitrogen starvation conditions. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 311–317, 2015.
- ÅKERMAN, C. O. et al. Clean synthesis of biolubricants for low temperature applications using heterogeneous catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3–4, p. 263–269, 2011.
- AKOH, C. C. et al. Enzymatic approach to biodiesel production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 22, p. 8995–9005, 2007.
- AL HATTAB, M.; GHALY, A. Production of Biodiesel from Marine and Freshwater Microalgae: A Review. **Advances in Research Italy**, v. 3, n. 24, p. 107–155, 2015.
- AMANO ENZYME Inc. Disponível em: [www.amano-enzyme.com](http://www.amano-enzyme.com). Acesso em: 12 fev. 2018.
- ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; AZIZ, A. A. Biodiesel separation and purification: a review. **Renewable Energy**, v. 36, p. 437–443, 2011.
- AWAD, O. I. et al. Using fusel oil as a blend in gasoline to improve SI engine efficiencies: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 69, p. 1232–1242, 2017.
- AWAD, O. I. et al. Alcohol and ether as alternative fuels in spark ignition engine: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2586–2605, 2018.
- AZANIA, A. A. P. M. et al. Fusel oil as herbicide at late weed postemergence. **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p. 231–236, 2008.
- AZANIA, C. A. M. et al. Aplicação de óleo fúsel na erradicação química da cana-de-açúcar e seu efeito na cultura do girassol em sucessão. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 581–590, 2010.
- BASSI, J. J. et al. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 900–909, 2016.
- BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M.A.S. (Ed.) **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. Rijeka: Intech, 2011.p.85-100.
- BENTO, H. B. S. et al. Magnetized poly (STY-*co*-DVB) as a matrix for immobilizing microbial lipase to be used in biotransformation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 426, p. 95–101, 2017.
- BHUVANESHWARI, M. et al. Toxicity and trophic transfer of P25 TiO<sub>2</sub>NPs from *Dunaliella salina* to *Artemia salina*: Effect of dietary and waterborne exposure. **Environmental Research**, v. 160, p. 39–46, 2018.

- BOZELL, J. J.; PATEL, M. K. **Feedstocks for the future: renewables for the production of chemicals and materials**. Washington: American Chemical Society, 2006.p. 378.
- BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 39, p. 90–98, 2017.
- BREDDA, E. H. et al. Microalgae as a source of functional PUFAs: A green low-cost pathway via enzymatic hydrolysis. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 20, p. 1-13, 2019.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- BRESSANI, A. P. P. et al. Production of alkyl esters from macaw palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using heterogeneous biocatalysts: Optimization by response surface methodology. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 2, p. 287–297, 2015.
- CALAM, A. et al. Investigation of usability of the fusel oil in a single cylinder spark ignition engine. **Journal of the Energy Institute**, v. 88, n. 3, p. 258–265, 2015.
- CARVALHO, J. C. M. et al. Algal Biorefineries. In: BAJPAI, R.; PROKOP, A.; ZAPPI, M. (Ed.).**Algal Biorefineries**. New York: Springer, 2014. p. 83–126.
- CARVALHO, A. K. F. et al. Direct transesterification of *Mucor circinelloides* biomass for biodiesel production: Effect of carbon sources on the accumulation of fungal lipids and biofuel properties. **Fuel**, v. 234, p. 789-796, 2018a.
- CARVALHO, A. K. F. et al. Approaches to convert *Mucor circinelloides* lipid into biodiesel by enzymatic synthesis assisted by microwave irradiations. **Renewable Energy**, v. 125, p. 747-754, 2018b.
- CERON, A. A. S. **Produção de ésteres alquílicos com potencial lubrificante por transesterificação enzimática do óleo de palmiste e álcoois superiores**. 2017. 152p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.
- CERON, A. A. S. et al. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass Bioenergy**, v. 119, p. 166-172, 2018.
- CHEN, X. et al. *Dunaliella salina* Hsp90 is halotolerant. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 418–425, 2015a.
- CHEN, Y. et al. Influence of nutrient status on the accumulation of biomass and lipid in *Nannochloropsis salina* and *Dunaliella salina*. **Energy Conversion and Management**, v. 106, p. 61–72, 2015b.
- CHO, K. et al. Enhanced biomass and lipid production by supplement of myo-inositol with oceanic microalga *Dunaliella salina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 72, p. 1–7, 2015a.

CHO, K. et al. Bioflocculation of the oceanic microalga *Dunaliella salina* by the bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*, and its effect on biodiesel properties of the biomass. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 257–261, 2015b.

CHO, K. et al. Use of phenol-induced oxidative stress acclimation to stimulate cell growth and biodiesel production by the oceanic microalga *Dunaliella salina*. **Algal**, v. 17, p. 61–66, 2016.

CHOWDHURY, A. et al. Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physico-chemical characterization of the product. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 783–789, 2014.

CHOUHAN, A. P. S.; SARMA, A. K. Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4378-4399, 2011.

CUI, Y.; LIANG, Y. Direct transesterification of wet *Cryptococcus curvatus* cells to biodiesel through use of microwave irradiation. **Applied energy**, v. 119, p. 438-444, 2014.

CORTEZ, D. V. et al., 2018. The realm of lipases in biodiesel production. **Sustainable Biotechnology- Enzymatic resources of Renewable Energy**. Cham: Springer, 2018. p. 247-288.

DA CONCEIÇÃO, L. R. V. et al. Solid acid as catalyst for biodiesel production via simultaneous esterification and transesterification of macaw palm oil. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 416-424, 2016.

DA RÓS, P. C. M. et al. 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 CONCEIÇÃO, L. R. V. et al. Synthesis of biodiesel from macaw palm oil using mesoporous solid catalyst comprising 12-molybdophosphoric acid and niobia. **Renewable Energy**, v. 113, p. 119-128, 2017.

DA CONCEIÇÃO, L. R. V. et al. Keggin-structure heteropolyacid supported on alumina to be used in trans/esterification of high-acid feedstocks. **RSC Advances**, v. 9, n. 41, p. 23450-23458, 2019.

DA RÓS, P. C. M. et al. Microbial oil derived from filamentous cyanobacterium *Trichormus* sp. as feedstock to yield fatty acid ethyl esters by enzymatic synthesis. **Journal of Advances in Biology and Biotechnology**, v. 12, p. 1-14, 2017.

DA RÓS, P. C. M. et al. 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.

DE CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.

DEGENS, B. P. et al. Net acidity indicates the whole effluent toxicity of pH and dissolved metals in metalliferous saline waters. **Chemosphere**, v. 198, p. 492–500, 2018.

DENG, L. et al. Enzymatic production of alkyl esters through alcoholysis: A critical evaluation of lipases and alcohols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 5, p. 341–347, 2005.

DIAS, F. R. F.; FERREIRA, V. F.; CUNHA, A. C. Uma visão geral dos diferentes tipos de catálise em síntese orgânica. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 840–871, 2012.

DÖRMO, N. et al. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 3, p. 229–234, 2004.

ENRIQUEZ, J. M. H. et al. Effect of the addition of phosphotungstic acid on the thermal stability of zirconium oxide. **Dyna**, v. 81, p.107-114, 2013.

FACHET, M. et al. Flow cytometry enables dynamic tracking of algal stress response : A case study using carotenogenesis in *Dunaliella salina*. **ALGAL**, v. 13, p. 227–234, 2016.

FERREIRA, M. et al. Effect of nutritional status and concentration of *Nannochloropsis gaditana* as enrichment diet for the marine rotifer *Brachionus* sp. **Aquaculture**, v. 491, p. 351-357, 2018.

FERREIRA, M. C.; MEIRELLES, A. J. A.; BATISTA, E. A. C. Study of the fusel oil distillation process. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 6, p. 2336–2351, 2013.

FERREIRA, P. et al. Acetylation of glycerol over heteropolyacids supported on activated carbon. **Catalysis Communications**, v. 12, n. 7, p. 573-576, 2011.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497–509, 1956.

FREITAS, L. et al. Produção de ácidos graxos poliinsaturados por via enzimática: revisão dos princípios tecnológicos do processo. Parte 2: Importantes aspectos da alternativa biotecnológica. **Ciência e Cultura**, v. 1, n. 1, p. 50- 60, 2006.

FULKE, A. B. et al. Biosequestration of carbon dioxide, biomass, calorific value and biodiesel precursors production using a novel flask culture photobioreactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 72, p. 136–142, 2015.

GAO, Y.; YANG, M.; WANG, C. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 484–491, 2013.

GONÇALVES, B. C. M; SILVA, M. B. Green.Microalgae as Substrate for Producing Biofuels and Chlorophyll in Biorefineries. **Sustainable Biotechnology-Enzymatic Resources of Renewable Energy**. Cham:Springer, 2018. p. 439-461.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic algal nutrition – Mineral Nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Iowa: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 97–115.

GUPTA, R.; RATHI, P.; BRADDOO, S. Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 6, p. 635-644, 2003.

- GRYGLEWICZ, S.; MUSZYŃSKI, M.; NOWICKI, J. Enzymatic synthesis of rapeseed oil-based lubricants. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 25–29, 2013.
- HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709–732, 2012.
- HASHEM, A. I. et al. Conversion of some vegetable oils into synthetic lubricants via two successive transesterifications. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects**, v. 35, n. 10, p. 909–912, 2013.
- HOSSEIN, M.; GHASEMI, Y. Culture medium optimization for enhanced  $\beta$ -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 217–223, 2016.
- HOU, Y. et al. CAH1 and CAH2 as key enzymes required for high bicarbonate tolerance of a novel microalga *Dunaliella salina* HTBS. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 87, p. 17–23, 2016.
- ILLANES, A. Immobilized Biocatalysts. In: **Comprehensive Biotechnology**. 2nd ed. Elsevier B.V., 2011. Cap. 1, p. 25 - 38.
- JAYAPPRIYAN, K. R. et al. In vitro anticancer activity of natural  $\beta$ -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n. 2, p. 99–105, 2013.
- JEON, H. et al. Identification of the carbonic anhydrases from the unicellular green alga *Dunaliella salina* strain CCAP 19/18. **Algal**, v. 19, p. 12–20, 2016.
- KANNAN, D. C.; PATTARKINE, V. M. Algal Biorefineries. In: BAJPAI, R.; PROKOP, A.; ZAPPI, M. (Ed.). **Algal Biorefineries**. New York: Springer, 2014. p. 296–310.
- KEERTHI, S.; DEVI, U.; SARMA, S. The heterotrophic eubacterial and archaeal co-inhabitants of the halophilic *Dunaliella salina* in solar salterns fed by Bay of Bengal along south eastern coast of India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, p. 411-1419, 2015.
- KIM, G. Y. et al. Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency. **Bioresource Technology**, v. 237, p. 72–77, 2017.
- KNOTHE, G. et al. Determination of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1059-1070, 2005.
- LAGE, F. A. P. et al. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56–67, 2016.
- LI, C. et al. Combined effects of carbon, phosphorus and nitrogen on lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 680-684, 2014.
- LIN, H. et al. Regulation of virus-induced inflammatory response by *Dunaliella salina* alga extract in macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 71, p. 159–165, 2014.

LOURES, C. C. A. et al. Simultaneous esterification and transesterification of microbial oil from *Chlorella minutissima* by acid catalysis route: A comparison between homogeneous and heterogeneous catalysts. **Fuel**, v. 211, p. 261–268, 2018.

LOURINHO, G.; BRITO, P. Advanced biodiesel production technologies: novel developments. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 287–316, 2015.

LUCKER, B. F. et al. The environmental photobioreactor (ePBR): An algal culturing platform for simulating dynamic natural environments. **Algal Research**, v. 6, p. 242–249, 2014.

MADANKAR, C. S.; PRADHAN, S.; NAIK, S. N. Parametric study of reactive extraction of castor seed (*Ricinus communis* L.) for methyl ester production and its potential use as bio lubricant. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 283–290, 2013.

MARWAN; SUHENDRAYATNA; INDARTI. Preparation of biodiesel from microalgae and palm oil by direct transesterification in a batch microwave reactor. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 622, n. 1, p. 12040, 2015.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245–251, 2013.

MENEZES, T. K. et al. Triagem da fonte de lipase para hidrólise de óleo microalgal visando a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA - COBEQ,22., 2018. **Anais...** São Paulo, SP. 2018.

MIRANDA, M.; DA SILVA, M. L. C. P.; DE CASTRO, H. F. Optimised immobilisation of microbial lipase on hydrous niobium oxide. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 566–572, 2006.

MIRANDA, M. et al. Assessment of the morphological, biochemical, and kinetic properties for *Candida rugosa* lipase immobilized on hydrous niobium oxide to be used in the biodiesel synthesis. **Enzyme research**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

MOBARAK, H. M. et al. The prospects of biolubricants as alternatives in automotive applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 34–43, 2014.

MONTE, J. et al. Harvesting of *Dunaliella salina* by membrane filtration at pilot scale. **Separation and Purification Technology**, v. 190, p. 252–260, 2018.

MORTIER, R.M.; FOX, M.F.; ORSZULIK, S.T. **Chemistry and Technology of Lubricants**. Nova York: Springer, 2010, p. 533.

MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T. V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**, v. 7, p. 117–123, 2014.

OKUMURA, C. et al. Economic efficiency of different light wavelengths and intensities using LEDs for the cultivation of green microalga *Botryococcus braunii* (NIES-836) for Biofuel Production. **Environmental Progress**, v. 28, n. 1, p. 404–409, 2014.



PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 4, p. 343-355, 2003.

PIRWITZ, K.; RIHKO-STRUCKMANN, L.; SUNDMACHER, K. Comparison of flocculation methods for harvesting *Dunaliella*. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 145–152, 2015.

PIZZO, I. et al. Selectivity and weed control efficacy of fusel oil and herbicide association in sugarcane. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 347–357, 2010.

RAMOS, Luiz P. et al. Biodiesel: Matérias-primas, tecnologias de produção e propriedades combustíveis. **Virtual Quim**, v. 9, n. 1, p. 317-369, 2017.

RASDI, N. W.; QIN, J. G. Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 6, p. 2221-2230, 2015.

RATHI, P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 187–192, 2001.

RIZVI, S. Q. A. **A comprehensive review of lubricant chemistry, technology, selection, and design**. West Conshohocken:ASTM International, 2009. p. 657.

SALIMON, J.; SALIH, N.; YOUSIF, E. Biolubricants: Raw materials, chemical modifications and environmental benefits. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 5, p. 519–530, 2010.

SAN PEDRO, A. et al. Outdoor pilot-scale production of *Nannochloropsis gaditana*: influence of culture parameters and lipid production rates in tubular photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 667–676, 2014.

SÁNCHEZ, D. A.; TONETTO, G. M.; FERREIRA, M. L. *Burkholderia cepacia* lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 1, p. 6-24, 2017.

SANTOS, F. D. **Avaliação do potencial de adsorventes de baixo custo para purificação de biodiesel etílico e estabelecimento das condições operacionais por metodologia de superfície de resposta**. 2015. 104p. Dissertação (Mestrado em Processos Catalíticos e Biocatalíticos) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

SANTOS, J. C. et al. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52, p. 49–57, 2008.

SHEIKH, R. et al. Study on the solid acid catalysts in biodiesel production from high acid value oil. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 1413-1419, 2013.

SELVAKUMAR, P.; UMADEVI, K. Enhanced lipid and fatty acid content under photoheterotrophic condition in the mass cultures of *Tetraselmis gracilis* and *Platymonas convolutae*. **Algal Research**, v. 6, p. 180–185, 2014.

SENDRA, M. et al. Effects of TiO<sub>2</sub>nanoparticles and sunscreens on coastal marine microalgae: Ultraviolet radiation is key variable for toxicity assessment. **Environment International**, v. 98, p. 62–68, 2016.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**,v. 19, p. 627-662, 2001.

SILVA, G. A. M. et al. Physico-chemical, spectroscopical and thermal characterization of biodiesel obtained by enzymatic route as a tool to select the most efficient immobilized lipase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, p. 39-47, 2012.

SILVA, J. A. C.; HABERT, A. C.; FREIRE, D. M. G. A potential biodegradable lubricant from castor biodiesel esters. **Lubrication Science**, v.25, p.53-61, 2012.

SILVA, J. A. C.; FREIRE, D. M. G. Produção de biolubrificantes catalisada por lipases: fundamentos e aplicações. In: SOCCOL C. R. (Ed.) **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**.São Paulo: Edgard BlücherLtda, 2016. v. 4. p. 471-502.

SILVA, C. S. P. et al. Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942 (Cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. **Algal Research**, v. 3, p. 1-7, 2014.

SILVA, G. C. et al.Otimização das condições de cultivo da microalga *Nannochloropsis gaditana* e caracterização do óleo obtido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA - COBEQ,12., 2017.**Anais...** São Carlos, SP. 2017.

SRIVASTAVA, A.; SAHAI, P. Vegetable oils as lube basestocks: A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 9, p. 880–891, 2013.

STUART, B.In: ANDO, D. J. (Ed.)**Modern Infrared Spectroscopy**. Chichester: John Wiley & SonsLtda, 1996. p. 117-119.

SUNG, M. et al. Enhancement of lipid productivity by adopting multi-stage continuous cultivation strategy in *Nannochloropsis gaditana*.**Bioresource Technology**, v. 229, p. 20–25, 2017.

TALEBIAN-KIAKALAEH, A.; AMIN, N. A. S.; MAZAHERI, H. A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. **Applied Energy**, v. 104, p. 683–710, 2013.

TAN, T.et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

TEO, C. L. et al. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 38–44, 2014.

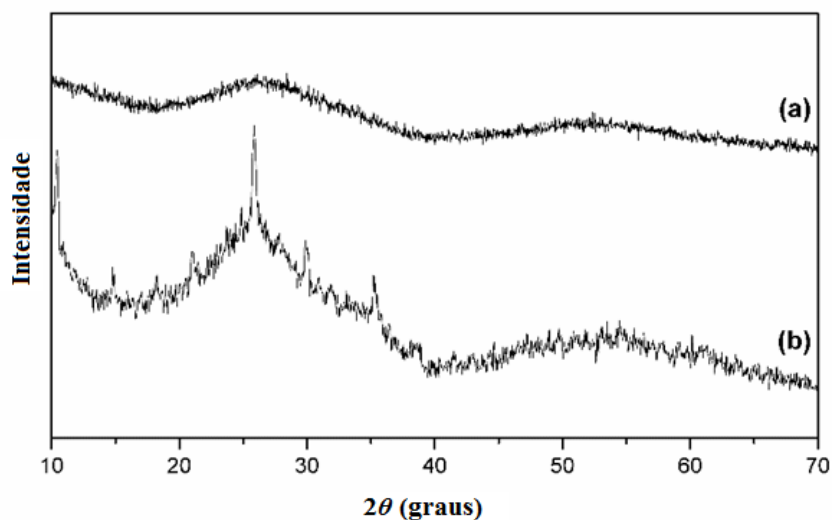
TEULING, E. et al. Effect of cell wall characteristics on algae nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarus gariepinus*). **Aquaculture**, v. 479, p. 490–500, 2017.

- TOMASELLI, L. The Microalgae: with reference to mass-cultivation. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture : Biotechnology and Applied Phycology**. Iowa: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 3–19.
- TORZILLO, G.; ZITTELLI, G. C. Tubular photobioreactors. In: PROKOP, A.; BAJPAI R. K.; ZAPPI M. E. **Algal Biorefineries**. Cham: Springer, 2015. p. 187-212.
- WOODWORTH, B. D. et al. Photosynthetic light reactions increase total lipid accumulation in carbon-supplemented batch cultures of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 159–164, 2014.
- VILAS BOAS, R. et al. Síntese enzimática do caprilato de isopentila utilizando óleo fúsel como matéria-prima. **Química Nova**, v. 40, p. 541-547, 2017.
- XIE, W.; HUANG, X.; LI, H. Soybean oil methyl esters preparation using NaX zeolites loaded with KOH as a heterogeneous catalyst. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 4, p. 936–939, 2007.
- YAN, C.; ZHENG, Z. Performance of mixed LED light wavelengths on biogas upgrade and biogas fluid removal by microalga *Chlorella* sp. **Applied Energy**, v. 113, p. 1008–1014, 2014.
- ZHU, S. et al. Production of bioadditives from glycerol esterification over zirconia supported heteropolyacids. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 45-51, 2013.

## ANEXOS

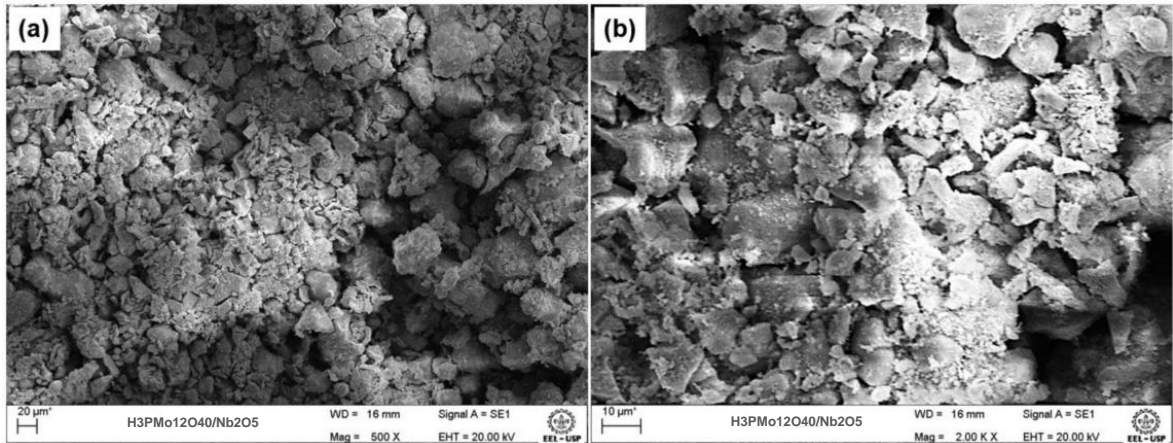
## Anexo 1 – Características do catalisador químico

Propriedades do catalisador químico foram determinadas por Difração de raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Adsorção-dessorção de  $N_2$  e Acidez superficial, de acordo com o trabalho realizado por Da Conceição et al. (2017). Os difratogramas de raios-x do suporte  $Nb_2O_5$  e do catalisador  $H_3PMo_{12}O_{40}/Nb_2O_5$  são mostrados na Figura A1. No difratograma do suporte  $Nb_2O_5$  (Figura A1 a) não foi observada fases cristalinas, apresentando somente a formação de um halo amorfo característico do  $Nb_2O_5$  calcinado à temperatura inferior de  $450\text{ }^\circ\text{C}$ . Em contrapartida, ao se analisar o difratograma do catalisador  $H_3PMo_{12}O_{40}/Nb_2O_5$  (Figura A1 b) é notório o aparecimento de reflexões típicas de heteropoliácido pela presença dos picos em cerca de  $2\theta = 10,5^\circ$  e  $26^\circ$ , que são característicos do  $H_3PMo_{12}O_{40}$ . Os resultados de DRX confirmam a presença de íons Keggin do  $H_3PMo_{12}O_{40}$  no suporte  $Nb_2O_5$ .



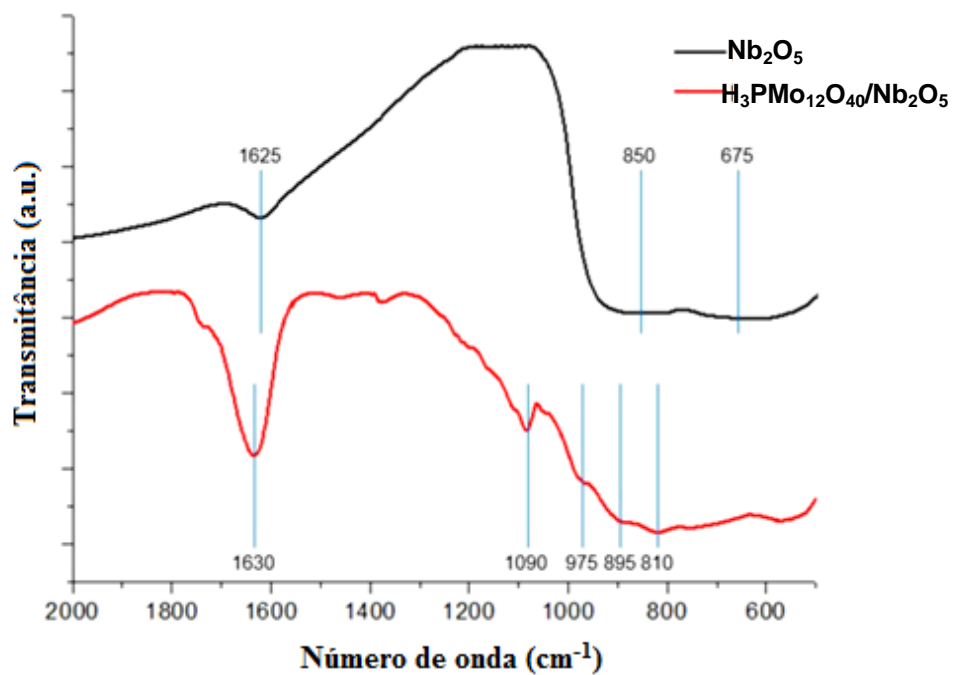
**Figura A1** - Difratogramas de raios-x a) suporte  $Nb_2O_5$  e b) catalisador  $H_3PMo_{12}O_{40}/Nb_2O_5$

As micrografias (MEV) do catalisador  $H_3PMo_{12}O_{40}/Nb_2O_5$ , são mostradas nas Figuras A2 e A2. As micrografias indicam que as distribuições dos cristalitos apresentam diversos tamanhos, sendo assim, não uniformes.



**Figura A2** - Micrografias do catalisador  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}\text{Nb}_2\text{O}_5$ .

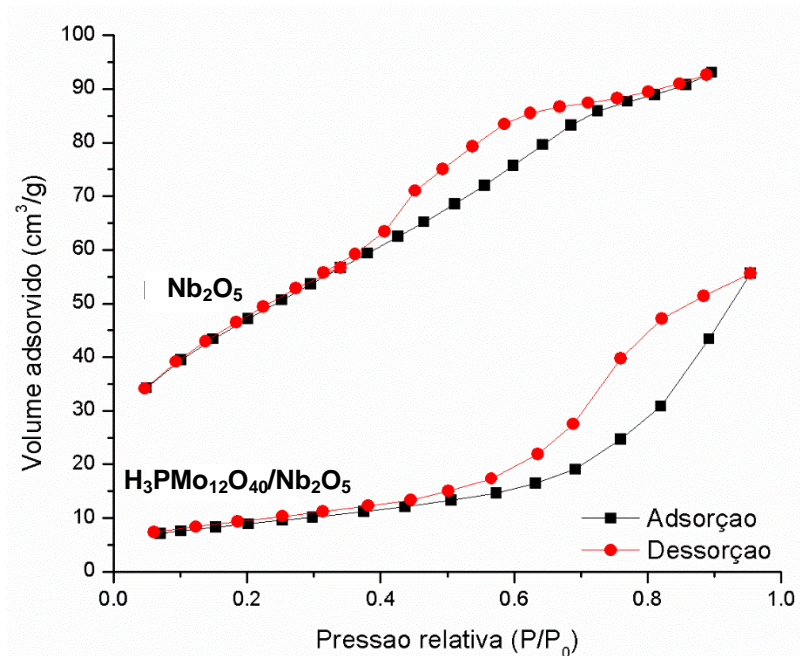
A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) é uma técnica útil para elucidar estruturas Keggin presentes no HPAs. A Figura A3 mostra os espectros de FTIR do suporte  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e do catalisador  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}/\text{Nb}_2\text{O}_5$  na região de  $2000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ . As principais bandas características do suporte  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  foram observados à  $675\text{ cm}^{-1}$ , que são atribuídas às vibrações Nb-O-Nb da estrutura octaédrica  $\text{NbO}_6$  levemente distorcida e em  $850\text{ cm}^{-1}$ , atribuído ao modo de estiramento simétrico de espécies superficiais Nb=O, presentes em estruturas octaédricas  $\text{NbO}_6$  altamente distorcida.



**Figura A3** - Espectros de FTIR do suporte  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e catalisador  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}/\text{Nb}_2\text{O}_5$ .

A estrutura primária (estrutura de Keggin) do  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  pode ser identificada por quatro bandas características que variam entre  $800\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ . As bandas de absorção em  $1090\text{ cm}^{-1}$  (P- $\text{O}_a$ ),  $975\text{ cm}^{-1}$  (Mo= $\text{O}_d$ ),  $895\text{ cm}^{-1}$  (Mo- $\text{O}_b$ -Mo) e  $787\text{ cm}^{-1}$  (Mo- $\text{O}_c$ -Mo), em que ( $\text{O}_a$ , átomo de oxigênio ligado a três átomos de molibdênio e P, átomo de fósforo central;  $\text{O}_b$ , ligação entre dois ou três átomos de molibdênio;  $\text{O}_c$ , átomo de oxigênio coordenado a um átomo de molibdênio central e  $\text{O}_d$ , átomo de oxigênio terminal) são observados no espectro do catalisador  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}/\text{Nb}_2\text{O}_5$ , características consistentes com dados da literatura. Na região próxima à  $1625\text{ cm}^{-1}$ , ocorre uma banda atribuída às moléculas de água adsorvidas na superfície dos materiais.

As isotermas de adsorção-dessorção de  $\text{N}_2$  para o suporte  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e catalisador  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}/\text{Nb}_2\text{O}_5$  são mostradas na Figura A4.



**Figura A4** - Isotermas de adsorção-dessorção de  $\text{N}_2$  para o suporte  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e catalisador  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}/\text{Nb}_2\text{O}_5$ .