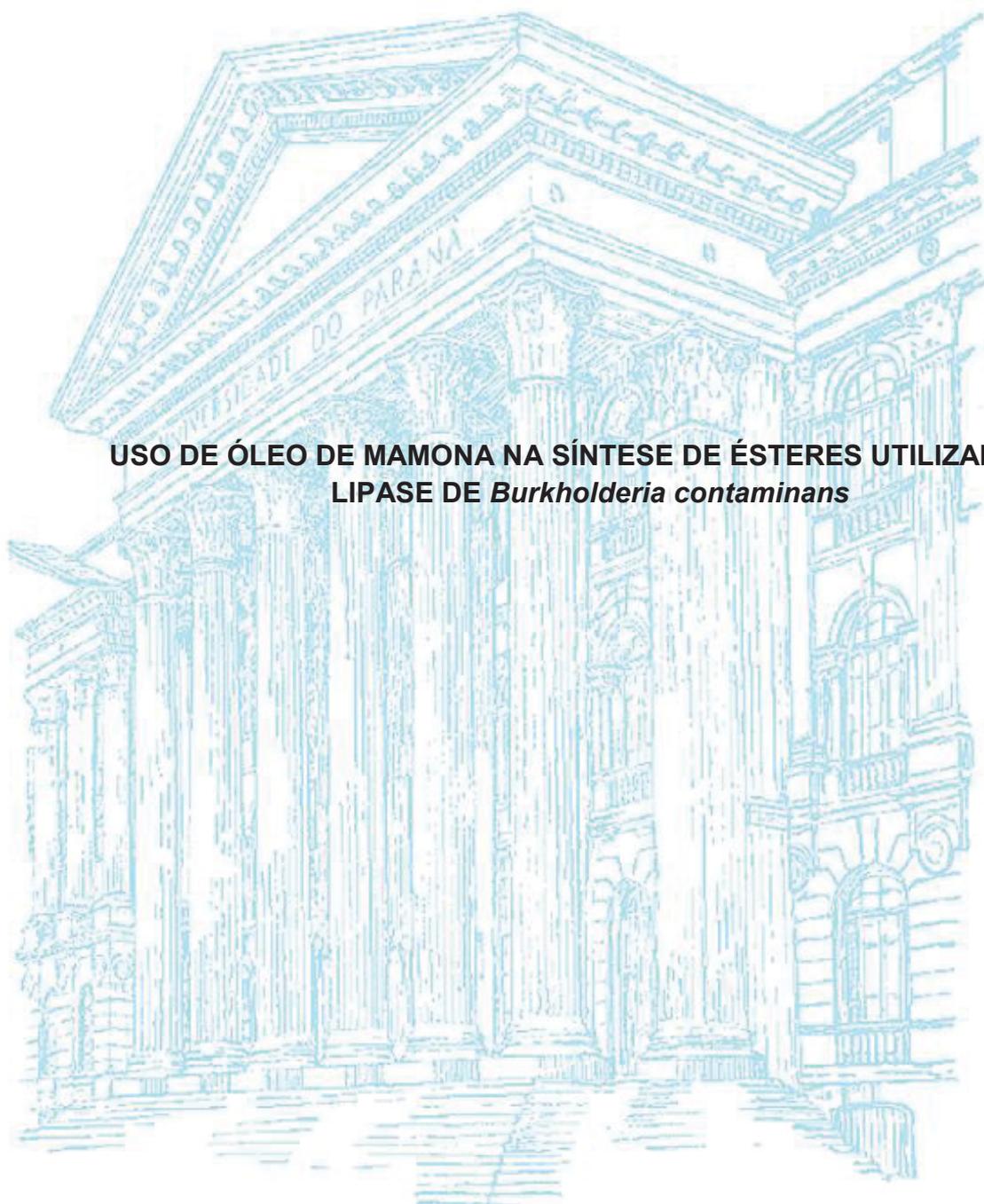


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELLE APARECIDA COELHO MOREIRA



**USO DE ÓLEO DE MAMONA NA SÍNTESE DE ÉSTERES UTILIZANDO A  
LIPASE DE *Burkholderia contaminans***

CURITIBA,  
2017

MICHELLE APARECIDA COELHO MOREIRA

**USO DE ÓLEO DE MAMONA NA SÍNTESE DE ÉSTERES UTILIZANDO A  
LIPASE DE *Burkholderia contaminans***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Nadia Krieger

CURITIBA,  
2017

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Moreira, Michelle Aparecida Coelho  
Uso de óleo de mamona na síntese de ésteres utilizando a lipase de *Burkholderia contaminans*.  
Michelle Aparecida Coelho Moreira. – Curitiba, 2017.  
122 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Nadia Krieger  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Mamona. 2. Lipase. I. Título. II. Krieger, Nadia. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.)574.192



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

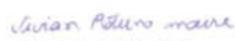
## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MICHELLE APARECIDA COELHO MOREIRA** intitulada: **Uso de óleo de mamona na síntese de ésteres utilizando a lipase de *Burkholderia contaminans***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVADA**.

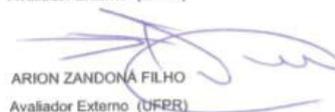
CURITIBA, 31 de Março de 2017.

  
NÁDIA KRIEGER  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
GISELA MARIA ZANIN  
Avaliador Externo (UEM)

  
VIVIAN ROTUNO MOURE  
Avaliador Externo (UFPR)

  
JAIME PABA  
Avaliador Externo (UFPR)

  
ARION ZANDONÁ FILHO  
Avaliador Externo (UFPR)

## Agradecimentos

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar todas as dificuldades;

Aos meus pais Maria Lúcia Coelho Moreira e Antônio Ivan dos Santos Moreira e toda a minha família, a qual amo muito, pelo carinho e incentivo, compreensão, força e apoio;

A todos os amigos que fizeram parte desse momento, sempre me ajudando e apoiando, em especial ao Ricardo Costa Scholz e Nanci do Rocio Freiria.

A minha orientadora, a Prof. Dra. Nadia Krieger por acreditar em mim, e por me ajudar em todas as dificuldades durante toda essa trajetória, e ao Prof. Dr. David A. Mitchell, pelo suporte no estágio em docência;

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando, da Engenharia Química da UFPR, pelas ideias, pelo suporte, pela sonda de ultrassom, por estar sempre à disposição para ajudar, e por levar meu trabalho ao congresso.

Aos professores Dr. Marcelo Muller e Dr. Jaime Paba, do PPGBq pela correção e colaboração aos meus relatórios.

Aos colegas do laboratório de tecnologia enzimática de biocatálise - LTEB, pela ajuda, incentivo e apoio, em especial a Diniara Soares, Robson Carlos Alnoch, Glauco Silva Dias, Aline Dutra, Maribel Cordeiro Villalobos, Jonathan David Agudelo Galeano e Luana Pitol, entre outros que foram essenciais no desenvolvimento desse trabalho, pela ajuda nos experimentos, equipamentos e correção dos documentos.

Aos colegas do departamento de Química da UFPR, em especial Débora Kochepka, Lais Dill e Douglas Fockink e ao prof. Dr. Luis Pereira Ramos.

Ao laboratório de biotecnologia do Núcleo de pesquisa e desenvolvimento autossustentável - NPDEAS, pela ajuda no desenvolvimento do reator, pelo conserto dos equipamentos, pela disposição dos colegas em ajudar pela divulgação do meu trabalho em congresso.

Aos alunos de iniciação científica, em especial ao Rafael Preosck, Julia Zeni e ao estagiário Diogo Fattori, agradeço a todos pela ajuda no desenvolvimento dos meus experimentos e pela organização do laboratório.

AUFPR e aos colegas e professores da Pós-Graduação em Ciências Bioquímica-PPGBq.

A CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos de coração que, de alguma forma fizeram parte nesse momento muito especial da minha vida. Muito obrigada!

"A mente que se abre a uma nova ideia nunca mais volta ao seu tamanho original."

(Albert Einstein)

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi produzir a lipase *Burkholderia contaminans* LTEB 11 e estudar a sua utilização em reação de síntese de biodiesel pela reação de transesterificação etílica do óleo de mamona (*Ricinus communis*). Foram utilizados dois tipos de preparados enzimáticos, sendo um a partir do extrato lipolítico bruto produzido por fermentação submersa e imobilizado em suporte de polipropileno (Accurel EP 100 e MP 1000) e o outro produzido por fermentação no estado sólido. Os estudos foram realizados em duas etapas. Na primeira etapa, foram comparadas lipase imobilizada em Accurel EP 100 e MP 1000. O melhor rendimento de imobilização foi observado com o Accurel MP 1000 (189%), cujo preparado imobilizado foi utilizado nas reações de transesterificação em frascos agitados. Foi estudado o efeito da concentração de lipase e a máxima conversão observada foi de 86% em 48 h com 5% de enzima (m/m) em relação à massa de óleo. A segunda etapa foi estudar a aplicação do sólido fermentado com atividade lipolítica de  $160 \text{ U g}^{-1}$  em reação de transesterificação. Foram realizados estudos de comparação entre o sólido fermentado e a lipase comercial Novozym 435 ( $343 \text{ U g}^{-1}$ ), que continha atividade de esterificação de 49 vezes maior que a do sólido fermentado ( $7 \text{ U g}^{-1}$ ). A diferença de conversão entre as duas lipases foi de 38% em 96 h. Foram avaliados os efeitos da razão molar (RM), da adição de etanol em etapas e lavagem da enzima durante a reação. O aumento da razão molar não desnaturou a lipase e a máxima conversão obtida foi de 57% em 96 h (RM 6:1); a lipase Novozym 435 proporcionou melhor rendimento com RM 3:1 em 48 h. A adição de etanol em etapas proporcionou aumento do rendimento para os dois preparados enzimáticos: de 15% (Novozym 435) e 20% (sólido fermentado). A etapa de lavagem das enzimas após 12 h de reação permitiu a remoção do glicerol adsorvido, tendo sido observado um aumento de conversão de 21% (72 h) (sólido fermentado) e 11% (72 h) (Novozym 435). Foram avaliados os efeitos da adição do *t*-butanol no meio de reação e do acetato de etila como alternativa à etapa de lavagem. As reações com o *t*-butanol não proporcionaram aumento da conversão. O acetato de etila ocasionou queda de mais 30% (em média) em 96 h de reação. Para o sólido fermentado, as condições otimizadas em reações em frascos agitados foram obtidas por estudo de planejamento fatorial  $2^2$  com três repetições no ponto central. As variáveis independentes estudadas foram: razão molar, adição de etanol em etapas e temperatura. As melhores condições obtidas foram razão molar 6:1, adição de etanol em 12 etapas e temperatura de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  com conversão máxima de 74%. Nas reações em reator de leito fixo empacotado com o sólido fermentado foram avaliadas a razão molar e a temperatura, com recirculação dos substratos. A maior conversão em ésteres foi de 73% em 72 h com RM 6:1 a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nos estudos com aplicação de ultrassom, as variáveis estudadas foram intensidade do ultrassom, razão molar, temperatura e vazão de circulação. Os melhores resultados foram de 83% de conversão em 72 h, obtidos com 75% de ultrassom, RM 3:1, a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  e vazão de  $7,4 \text{ mL min}^{-1}$ . Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que o ultrassom teve efeito positivo na reação em biorreator de leito fixo catalisada pelo sólido fermentado contendo a lipase de *B. contaminans*, sendo possível aumentar significativamente a conversão de 62% (sem US, a  $45^\circ\text{C}$  em 72 h) para 82% em 48 h (com US a  $45^\circ\text{C}$  em 48 h) e reduzir o tempo reacional. O sistema proposto nesse trabalho tem potencial para reduzir os custos do processo da transesterificação enzimática na produção do biodiesel do óleo de mamona.

Palavras-chave: Lipases, *Burkholderiacontaminans*, biodiesel, ultrassom, sólido fermentado.

## ABSTRACT

The objective of this work was to produce the lipase *Burkholderia contaminans* LTEB 11 and to study its use in reaction of biodiesel synthesis by ethyl transesterification reaction of castor oil (*Ricinus communis*). Two types of enzymes were used: a crude lipolytic extract produced by submerged fermentation and immobilized on polypropylene support (Accurel EP 100 and MP 1000) and the dry fermented solid produced by solid state fermentation. The studies were carried out in two stages. In the first stage, the lipase immobilized on Accurel EP 100 and MP 1000 was compared. The best immobilization yield was observed with Accurel MP 1000 (189%). The effect of immobilized lipase concentration was studied, and the maximum conversion observed was the 86% in 48 h with 5% of enzyme (m/m) relative to the oil mass. The second stage was to study the use of the dry fermented solid with the lipolytic activity ( $160 \text{ U g}^{-1}$ ) to catalyze the transesterification of castor oil in shake flasks. Comparative studies were performed between the fermented solid and Novozym 435 commercial lipase ( $343 \text{ U g}^{-1}$ ), which had 49% more esterification activity than the fermented solid ( $7 \text{ U g}^{-1}$ ). The difference of conversion between the two lipases was 38% in 96 h. The effects of the molar ratio, of steps of ethanol addition and the washing of the enzyme during the reaction were evaluated. The increase in molar ratio did not denature the lipase and a maximum conversion of 57% in 96 h was obtained (6:1 MR); with the lipase Novozym 435 the best MR was 3:1 MR in 48 h. The ethanol addition in steps increase the yields for the two enzyme preparations in 15% (Novozym 435) and 20% (fermented solid). The washing of the enzymes after 12 h of reaction allowed the removal of adsorbed glycerol, with an increase in the conversions of 21% (fermented solid) and 11% (72 h) (Novozym 435). The effects of the addition of *t*-butanol in the reaction medium and the ethyl acetate as an alternative to the washing step were evaluated. Reactions with *t*-butanol did not increase conversion. Ethyl acetate caused a further 30% drop in the conversion (on average) in 96 h. For the fermented solid, the reaction was optimized by factorial design  $2^2$ , with 3 replicates at the central point. The independent variables studied were: molar ratio (MR), addition of ethanol in steps and temperature. The best conditions obtained were 6:1 MR, addition of ethanol in 12 steps and temperature of 50 °C. In the reactions in a fixed bed reactor packed with the fermented solid, the molar ratio and the temperature were evaluated with recirculation of the substrates. The higher conversion was 73% in 72 h with 6:1 MR at 55 °C. In the studies with ultrasound, the variables studied were ultrasound intensity, molar ratio, temperature and flow rate. The best results were 83% conversion in 72 h, obtained with 75% of the ultrasound intensity, 3:1 MR at 45 °C and flow rate of  $7.4 \text{ mL min}^{-1}$ . The results obtained in this work showed that the ultrasound had a positive effect on the reaction in a fixed bed bioreactor catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia contaminans* containing lipase. It was possible to increase the conversion from 62% to 83% and to reduce the reaction from 48 h. The system proposed in this work has the potential to reduce the costs of the enzymatic transesterification process in the biodiesel production using castor oil as a starting material.

Keywords: Lipases, *Burkholderia contaminans*, Biodiesel, ultrasound, fermented Solid.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES.....	21
FIGURA 2.	ESTRUTURA DO DOBRAMENTO DAS ALFA/BETA HIDROLASES .....	22
FIGURA 3	REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE <i>Burkholderia cepacia</i> .....	23
FIGURA 4.	TIPOS DE FERMENTAÇÃO UTILIZADOS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES.....	21
FIGURA 5.	<i>Ricinus communis</i> (MAMONA).....	22
FIGURA 6.	ÁCIDO RICINOLEICO - 12-hidroxi-9-cis-octadecenóico .....	23
FIGURA 7.	MODELOS DE REATORES UTILIZADOS NA BIOCATÁLISE.....	29
FIGURA 8.	APARELHOS DE ULTRASSOM MAIS UTILIZADOS EM ESCALA LABORATORIAL.....	37
FIGURA 9.	ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DO EXTRATO LIPOLÍTICO DE <i>Burkholderia contaminans</i> POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	45
FIGURA 10.	ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DO BODIESEL .....	51
FIGURA 11.	SISTEMA DE SECAGEM DO SÓLIDO FERMENTADO EM COLUNA COM FLUXO DE AR SECO .....	52
FIGURA 12.	REATOR DE LEITO FIXO UTILIZADO NA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> .....	59
FIGURA 13.	VASO REACIONAL COM CONEXÕES ENTRE O REATOR DE VIDRO, A SONDA DE ULTRASSOM E A BOMBA PERISTÁLTICA	60
FIGURA 14.	REATOR DE LEITO FIXO PREENCHIDO COM O SÓLIDO FERMENTADO E COM SONDA DE ULTRASSOM ACOPLADA....	61
FIGURA 15.	CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> NO SUPORTE ACCUREL MP 1000 .....	71
FIGURA 16.	ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> DURANTE O ARMAZENAMENTO A 4 °C. ....	73

FIGURA 17.	EFEITO DA MASSA DE LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> IMOBILIZADA EM ACCUREL MP 1000 NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA .....	74
FIGURA 18.	CINÉTICA DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELA LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> IMOBILIZADA EM ACCUREL MP 1000 .....	75
FIGURA 19.	CINÉTICA DA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA, CATALISADA PELA LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> IMOBILIZADA PELOS MÉTODOS CONVENCIONAL E SPIL.....	76
FIGURA 20.	COMPARAÇÃO DA CINÉTICA DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO COM A LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> E PELA LIPASE COMERCIAL NOVOZYM 435 .....	77
FIGURA 21.	EFEITO DA RAZÃO MOLAR NA TRANSESTERIFICAÇÃO ETÍLICA DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> E PELA LIPASE NOVOZYM 435 .....	79
FIGURA 22.	EFEITO DA ADIÇÃO DE ETANOL EM ETAPAS NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> E PELA LIPASE NOVOZYM 435.....	81
FIGURA 23.	EFEITO DA LAVAGEM COM t-BUTANOL DURANTE A TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> E PELA LIPASE <i>Novozym 435</i> .....	82
FIGURA 24.	EFEITO DA PRESENÇA DE t-BUTANOL NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> E PELA LIPASE NOVOZYM 435 .....	84
FIGURA 25.	EFEITO DO ACETATO DE ETILA COMO DOADOR ACILA NA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> .....	86
FIGURA 26.	DIAGRAMA DE PARETO, COM OS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIA DO DELINEAMENTO	

	FATORIAL SOBRE A VARIÁVEL-RESPOSTA CONVERSÃO EM ÉSTER. ....	89
FIGURA 27.	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO ETÍLICA DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> .....	90
FIGURA 28.	DIAGRAMA DE PARETO, COM OS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS DO DELINEAMENTO FATORIAL DCCR SOBRE A VARIÁVEL-RESPOSTA CONVERSÃO EM ÉSTER.....	92
FIGURA 29.	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO ETÍLICA DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> .....	94
FIGURA 30.	EFEITO DA RAZÃO MOLAR NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> EM BIORREATOR DE LEITO FIXO .....	95
FIGURA 31.	EFEITO DA TEMPERATURA NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> EM BIORREATOR DE LEITO FIXO .....	97
FIGURA 32.	EFEITO DO ULTRASSOM E DA RAZÃO MOLAR NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> EM REATOR DE LEITO FIXO .....	98
FIGURA 34.	EFEITO DO ULTRASSOM E DA TEMPERATURA NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> .....	100
FIGURA 35.	EFEITO DO ULTRASSOM E DA VAZÃO DE RECIRCULAÇÃO DO MEIO REACIONAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> .....	101

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	ESTUDOS SOBRE A UTILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> NA PRODUÇÃO DE BODIESEL.....	19
TABELA 2.	TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE MAMONA .....	22
TABELA 3.	PRODUÇÃO DE BODIESEL A PARTIR DO ÓLEO DE MAMONA VIA CATÁLISE QUÍMICA .....	26
TABELA 4.	PRODUÇÃO DE BODIESEL A PARTIR DA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	27
TABELA 5.	ESTUDOS MAIS RECENTES SOBRE A UTILIZAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO NA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS COM LIPASES .....	32
TABELA 6.	ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE BODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA EM PROCESSOS ASSISTIDOS POR ULTRASSOM41	
TABELA 7.	PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS SUPORTES EMPREGADOS NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> .....	47
TABELA 8.	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE MAMONA COMERCIAL .....	54
TABELA 9.	VARIÁVEIS E NÍVEIS PARA O DELINEAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO COM 2 NÍVEIS E 2 VARIÁVEIS PARA A OTIMIZAÇÃO DA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> .....	57
TABELA 10.	VARIÁVEIS E NÍVEIS DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) COM 2 NÍVEIS E 2 VARIÁVEIS PARA A OTIMIZAÇÃO DA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> .....	58
TABELA 11.	PERFIL EM ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE MAMONA UTILIZADO NESTE TRABALHO .....	67
TABELA 12.	PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CONTENDO A LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> : ETAPA DE PRECIPITAÇÃO COM	

	SULFATO DE AMÔNIO PARA A OBTENÇÃO DO EXTRATO LIPOLÍTICO .....	69
TABELA 13.	PRINCIPAIS PARÂMETROS DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Burkholderia contaminans</i> EM DOIS TIPOS DE ACCUREL .....	70
TABELA 14	VARIÁVEIS, NÍVEIS, RESULTADOS EXPERIMENTAIS E PREDITOS PELO MODELO DO DELINEAMENTO FATORIAL 22 APLICADO NO ESTUDO DA TRANSESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> .....	87
TABELA 15.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO ETÍLICA DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> .....	88
TABELA 16.	VARIÁVEIS, NÍVEIS, RESULTADOS EXPERIMENTAIS E PREDITOS PELO MODELO DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL APLICADO NO ESTUDO DA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>Burkholderia contaminans</i> .....	91
TABELA 17.	ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA .....	93
TABELA 18.	TABELA DE COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS, EM REATOR DE LEITO FIXO COM E SEM EFEITO DO ULTRASSOM.....	103

## LISTA DE SIGLAS

AGL	Ácido graxo livre
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOCS	American Oil Chemist's society
BC	Bagaço de cana
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CSTR	<i>Continuous stirred-tank reactor</i>
DIC	Detector de ionização de chama
F	Fator de correção de solução titulante padronizada
FAO	<i>Food and Agricultural Organization of United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)
FBR	<i>Fluidized-bed reactor</i> (Reator de leito fluidizado)
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Fermentação submersa
FpH	Fator de correção da dissociação parcial dos substratos
FSG	Farelo de semente de girassol
LA	Luria Ágar
LB	Luria Bertani (meio de cultura)
LipBC	Lipase de <i>Burkholderia contaminans</i>
LTEB	Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise
MMKOH	Massa molar do hidróxido de potássio
m/m	massa/massa
m/v	massa/volume
PBR	<i>Packed-bed reactor</i> (reator de leito fixo)
PVC	Cloreto de polivinila
RM	Razão molar
SAPCANA	Sistema de Acompanhamento da Produção Canavieira
SFBC	Sólido fermentado da lipase de <i>Burkholderia contaminans</i> LTEB 11
SPIL	<i>Simultaneous production and immobilization of lipases</i> (Produção e imobilização simultânea de lipases)
U	Unidades de atividade enzimática ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )

US	Ultrassom
U mg <sup>-1</sup>	Unidade de atividade enzimática por miligrama de suporte
U mL <sup>-1</sup>	Unidade de atividade enzimática volumétrica
U g <sup>-1</sup>	Unidade de atividade enzimática por grama de suporte

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
2.1	LIPASES.....	12
2.1.1	Definição .....	12
2.1.2	Aplicação das lipases na síntese de biodiesel.....	15
2.1.3	Meios reacionais utilizados na produção de biodiesel via catálise enzimática .....	15
2.1.4	Lipase de <i>Burkholderia contaminans</i> na síntese de biodiesel .....	16
2.1.5	Produção de lipases por fermentação no estado sólido .....	19
2.1.5.1	Óleo de mamona .....	21
2.1.6	Produção de biodiesel a partir do óleo de mamona .....	24
2.2	UTILIZAÇÃO DE LIPASES EM REATORES PARA A SÍNTESE DE BIODIESEL .....	29
2.3	INFLUÊNCIA DO ULTRASSOM SOBRE AS PROPRIEDADES DE LIPASES .....	35
2.3.1	Aplicações do ultrassom.....	36
2.4	PROCESSOS DA SÍNTESE ENZIMÁTICA ASSISTIDA POR ULTRASSOM .....	39
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
4.1	REAGENTES E MATERIAIS.....	43
4.2	PRODUÇÃO DA LIPASE DE <i>BURKHOLDERIA CONTAMINANS</i> LTEB 11 .....	44
4.2.1	Cultivo da cepa e produção do pré-inóculo .....	46
4.2.2	Produção da lipase por fermentação submersa .....	46
4.2.3	IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	47
4.2.3.1	Imobilização em Accurel EP-100 e MP-1000.....	48
4.2.3.2	Cinética de imobilização.....	48
4.2.3.3	Imobilização da lipase durante o cultivo .....	49
4.2.4	Produção da lipase por fermentação no estado sólido .....	49
4.2.4.1	Secagem do sólido fermentado .....	52
4.2.4.2	Estabilidade do sólido fermentado .....	53
4.3	ESTUDOS DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA .....	53

4.3.1	Caracterização do óleo de mamona.....	53
4.3.2	Ensaio de transesterificação do óleo de mamona em frascos agitados.....	55
4.3.2.1	Transesterificação com a lipase de <i>Burkholderia contaminans</i> imobilizada no suporte .....	55
4.3.2.2	Transesterificação com o sólido fermentado de <i>Burkholderia contaminans</i> .....	55
4.3.2.3	Efeito da lavagem do biocatalisador após reações de transesterificação .....	56
4.3.2.4	Planejamento fatorial.....	56
4.3.3	Estudos de transesterificação etílica do óleo de mamona em reator de leito fixo utilizando o sólido fermentado .....	58
4.3.3.1	Estudo do efeito ultrassom acoplado ao reator de leito fixo.....	59
4.4	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	62
4.4.1	Determinação da umidade dos substratos sólidos .....	62
4.4.2	Dosagem de atividade enzimática.....	62
4.4.3	Atividade de hidrólise em meio orgânico .....	63
4.4.4	Atividade de esterificação.....	64
4.4.5	Método de <i>Lowry-Tinsley</i> .....	65
4.4.6	Determinação de proteínas .....	65
4.4.7	Cromatografia em fase gasosa .....	66
4.4.7.1	Quantificação dos ésteres etílicos .....	66
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA .....	67
5.2	OBTENÇÃO DA LIPASE DE <i>BURKHOLDERIA CONTAMINANS</i> POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	68
5.2.1	Imobilização da lipase produzida por fermentação submersa .....	70
5.2.1.1	Comparação da imobilização com Accurel EP 100 e MP 1000 .....	70
5.2.2	Efeito da carga de proteína no suporte Accurel MP 1000 .....	71
5.3	OBTENÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE <i>BURKHOLDERIA CONTAMINANS</i> .....	72
5.3.1	Estabilidade do sólido fermentado durante o armazenamento.....	72
5.4	PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÓLEO DE MAMONA EM FRASCOS AGITADOS UTILIZANDO A LIPASE DE <i>BURKHOLDERIA CONTAMINANS</i> IMOBILIZADA EM ACCUREL MP 1000 E O SÓLIDO FERMENTADO.....	73

5.4.1	Transesterificação em frascos agitados com a lipase de <i>Burkholderia contaminans</i> imobilizada em Accurel MP 1000 .....	73
5.4.2	Transesterificação do óleo de mamona em frascos agitados com o sólido fermentado contendo a lipase de <i>Burkholderia contaminans</i>	76
5.4.2.1	Comparação preliminar entre o sólido fermentado e lipase comercial Novozym 435 .....	77
5.4.2.1.1	Efeito da razão molar .....	78
5.4.2.1.2	Efeito da adição de etanol em etapas.....	79
5.4.2.1.3	Efeito da lavagem dos biocatalisadores durante a reação .....	81
5.4.2.1.4	Efeito do t-butanol como cosolvente no meio de reação .....	83
5.4.2.1.5	Efeito do acetato de etila como doador de acila .....	85
5.4.2.2	Otimização da transesterificação em frascos agitados via planejamento fatorial .....	86
5.4.2.2.1	Otimização da reação de transesterificação utilizando um delineamento composto central rotacional .....	90
5.4.2.2.2	Estudo preliminar da reação de transesterificação em reator de leito fixo utilizando o sólido fermentado de <i>Burkholderia contaminans</i> ...	94
5.4.2.2.1	Efeito da razão molar .....	95
5.4.2.2.2	Efeito da temperatura.....	96
5.4.2.3	Estudo da reação de transesterificação em reator de leito fixo com sonda de ultrassom acoplada.....	97
5.4.2.3.1	Efeito do ultrassom e da razão molar .....	97
5.4.2.3.2	Efeito do ultrassom e da temperatura.....	99
5.4.2.3.3	Efeito do ultrassom e da vazão de circulação .....	100
5.5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	102
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Obiodiesel é uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, sendo um combustível renovável e biodegradável. Este biocombustível pode ser usado puro (100% - B100) ou misturado ao diesel derivado de petróleo (5% - B5, 7% - B7, 10% - B10) em motores ciclo diesel (ANP, 2016). No Brasil, o incentivo para a produção de biodiesel ocorre por meio do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), criado pela Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. O objetivo desse programa foi introduzir o biodiesel na matriz energética do país, incentivar o desenvolvimento da agricultura familiar e econômico de regiões precárias do semiárido e diminuir o consumo de derivados fósseis. O programa incentiva o uso de matérias-primas não comestíveis, como a mamona, que, além de não ser comestível, é uma planta que se desenvolve muito bem em climas tropical e subtropical (MATTEI, 2017).

A produção industrial do biodiesel geralmente ocorre pela reação de transesterificação metílica do óleo de soja com catalisador alcalino (KOH ou NaOH), 0,5% (m/m) em relação à massa de óleo (TEBAS et al 2017). A catálise química permite uma reação eficiente em intervalo de tempo curto como 5 min (FERRARI et al 2005), no entanto, a matéria-prima deve ser de alta qualidade para não ocorrer a formação de sabão, o que contribui para a diminuição do rendimento da reação. Para assegurar a qualidade do biodiesel, o óleo deve conter menos de 0,05% de água e menos de 1% de ácidos graxos livres, segundo Regulamento Técnico ANP nº 3/2014 (ANP, 2016). Sendo assim, a escolha da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel é um fator importante e que está relacionado com o custo e a viabilidade do processo. Uma forma de deixar a produção de biodiesel menos competitiva com a indústria de alimentos em área plantada é a utilização de matérias-primas não comestíveis (MOREIRA et al 2009), como por exemplo, o óleo de macaúba e mamona (*Ricinus communis*). Outra forma de tornar o processo mais renovável é utilizar o álcool etílico ao invés de metanol, principalmente por ser uma matéria-prima não tóxica e renovável, e catalisador enzimático ao invés de catalisadores químicos (SCHUCHARDT et al 1998).

A catálise enzimática utiliza lipases (EC 3.1.1.3) e entre as vantagens do processo catalisado por lipases, pode ser citada a possibilidade de utilizar matérias-primas sem purificação, como é o caso do óleo bruto extraído de vegetais, gorduras animais e óleo residual de cozinha. Outra vantagem da catálise enzimática é que, após a reação de transesterificação, a fase éster dispensa etapas de lavagens e, portanto, não gera efluentes tóxicos, e a fase de glicerina não precisa passar por diversos processos de purificação antes

de ser comercializada (FUKUDA et al 2001). Além disso, o processo enzimático reduz o consumo de energia, pois permite trabalhar em condições brandas de temperatura e a reutilização do biocatalisador, no caso de se utilizar enzima imobilizada (CHEN et al 2011). Apesar de todas as vantagens, são poucas as indústrias que aplicam as lipases como catalisador na produção de biodiesel. Na China, as empresas Hunan Rivers Bioengineering Co, Ltd e Lvming Environmental Protection Technology Co. Ltd. utilizam as lipases comerciais Novozym 435 e de *Candidasp* na produção de biodiesel por transesterificação, em tanque agitados, com óleo de residual de fritura.

O baixo número de processos enzimáticos implantados na indústria se deve principalmente ao custo das enzimas comerciais e o tempo de reação, que são relativamente elevados em relação à catálise alcalina tradicional. Como uma alternativa para reduzir os custos do biocatalisador, está o uso de novas lipases com maior atividade e estabilidade e de suportes baratos e renováveis para a imobilização, como por exemplo, o bagaço de cana, tortas e farelos provenientes do processo de extração de óleo, que são resíduos agroindustriais (DABDOUBet al 2009). Com o uso desse tipo de matéria-prima e o processo de fermentação no estado sólido, é possível obter um sólido fermentado contendo lipases naturalmente imobilizadas, que podem ser utilizadas na síntese do biodiesel (GALEANO et al 2017; SOARES et al 2015; BOTTON et al 2014).

Apesar de haver alguns estudos de síntese de biodiesel com sólidos fermentados, não existem estudos sobre a aplicação deste biocatalisador em transesterificação de óleos alternativos aos comestíveis, como o óleo de mamona. Nesse sentido, o presente trabalho visa estudar estratégias que possibilitem altas conversões em ésteres em menor tempo de reação, utilizando o óleo de mamona em reação de transesterificação etílica catalisada pela lipase de *Burkholderia contaminans* LTEB11.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Lipases

#### 2.1.1 Definição

Lipases são definidas como triacilglicerol acil-hidrolases (E.C.3.1.1.3) e catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, com mais de 10 átomos de carbono. Estão em grande importância industrial devido à sua capacidade de utilizar uma ampla gama de substratos, de serem estáveis frente a diferentes temperaturas, pH e solventes orgânicos, por serem versáteis em reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (Figura 1), e apresentarem região e enantiosseletividade (REIS et al 2009; MAHADIK et al 2002).

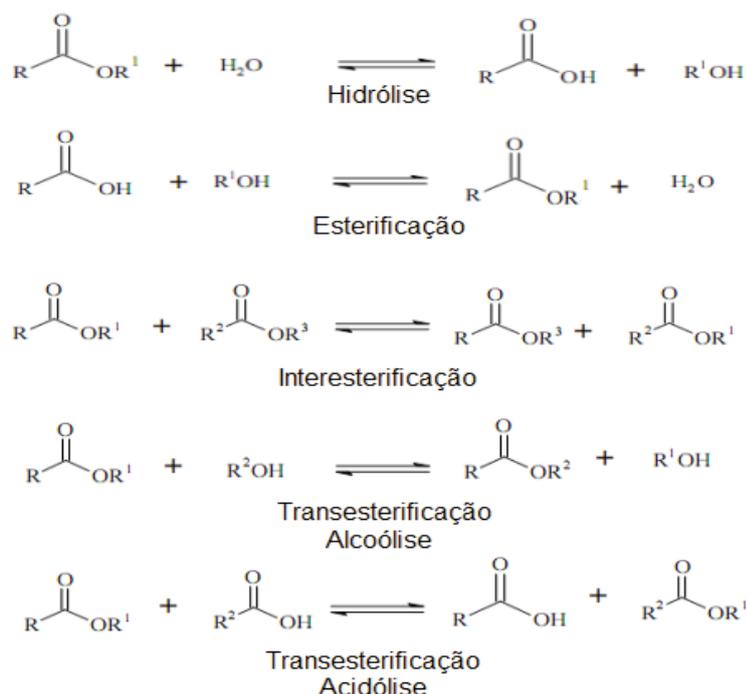


FIGURA 1. REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES

Fonte: A autora

Pode-se dizer que as lipases são enzimas especiais porque são solúveis em água, mas atuam em substratos hidrofóbicos e pouco solúveis, como o caso de óleos e gorduras (lipídeos), substratos naturais das lipases. As lipases clivam ligações éster do triglicerídeo, dando origem aos ácidos graxos livres, monoacilglicerol, diacilglicerol e glicerol. Normalmente, lipases atuam na interface lipídeo/água, local onde ocorre a hidrólise de ésteres carboxílicos agregados à fase aquosa. As lipases são similares em sua estrutura tridimensional (secundária e terciária). Apresentam em comum uma dobra padrão do tipo  $\alpha/\beta$ hidrolase em sua estrutura terciária. O núcleo central de lipases é composto por fitas  $\beta$  paralelas, rodeado por porções  $\alpha$ -hélice (Figura 2) (OLLIS et al 1992; CYCLER; SCHRAG 1997; JAEGER et al 1998).

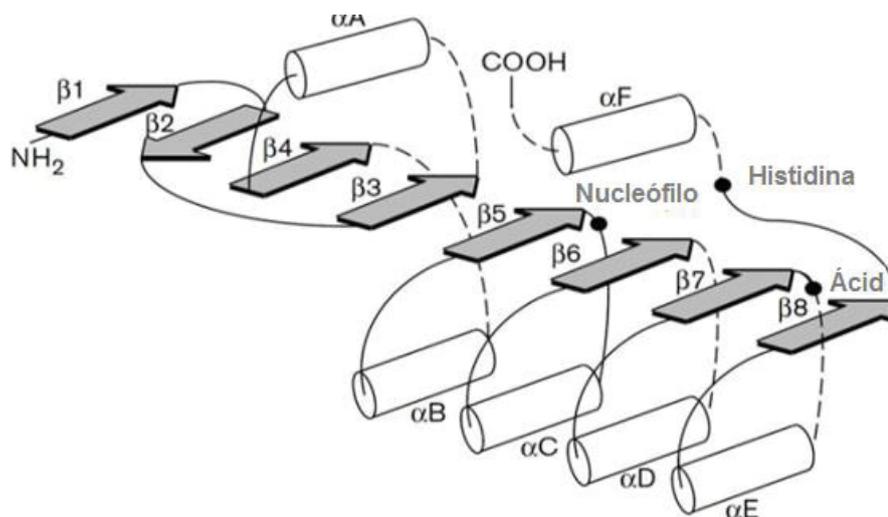


FIGURA 2. ESTRUTURA DO DOBRAMENTO DAS ALFA/BETA HIDROLASES

Os cilindros brancos estão representando a  $\alpha$ -hélices; as setas cinza as  $\beta$ -folhas e os círculos pretos a localização da tríade catalítica.

Fonte: JAEGER et al (1999).

O sítio ativo de lipases formado por uma tríade catalítica composta pelos resíduos de aminoácidos serina, cisteína ou aspartato, e está posicionado após a cadeia  $\beta$ 5, um resíduo catalítico ácido (aspartato ou glutamato) quase sempre

posicionado após a cadeia  $\beta 7$  e um resíduo de histidina altamente conservado, localizado após a última cadeia  $\beta$ .

A maioria das lipases possui uma estrutura móvel, composta por uma cadeia peptídica hidrofóbica chamada de tampa (*flap* ou *lid*). Esta estrutura recobre o sítio ativo da enzima e está presente na posição  $\beta 8$  que se estende sobre o conjunto de fita  $\beta$  e sobre o sítio catalítico (Figura 3). O contato da tampa com a interface lipídeo/água proporciona a interação entre o sítio ativo e o substrato, devido à exposição da superfície hidrofóbica da lipase. Esse contato proporciona uma alteração conformacional na enzima, deixando a tampa na forma aberta e o sítio ativo à disposição para ocorrer a catálise (OLLIS et al 1992; CYCLER; SCHRAG, 1997; VERGER, 1997; JAEGER et al 1999).

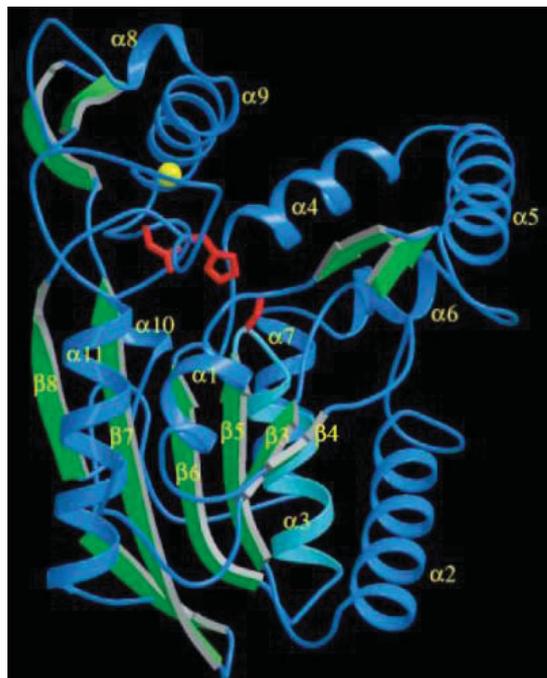


FIGURA 3 REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE *Burkholderia cepacia*.

As fitas  $\beta$  estão representadas como setas em verde e as  $\alpha$  - hélices em azul. Os resíduos da tríade catalítica estão mostrados em vermelho. FONTE: SCHRAG et al (1997).

### 2.1.2 Aplicação das lipases na síntese de biodiesel

O uso de lipases na produção do biodiesel proporciona um processo mais renovável e ambientalmente sustentável, pois possibilita utilizar materiais biodegradáveis e renováveis, além da facilidade de recuperação e reutilização do catalisador, sem gerar resíduos durante o processo. No entanto, o uso de enzimas tem sido restrito devido ao elevado custo do biocatalisador e ao tempo de reação, que ainda é superior em comparação aos processos convencionais (catalisador alcalino) (RANGANATHAN et al 2008; LI et al 2007). Como resultado destas dificuldades, muitos estudos sobre o uso de lipases na produção de biodiesel estão sendo desenvolvidos, inicialmente em escala laboratorial ou semi-industrial, visando obter processos econômicos que aumentem o rendimento da reação, que reduzam o custo do catalisador e o tempo de reação para aplicação em processos industriais (HASANet al 2006).

### 2.1.3 Meios reacionais utilizados na produção de biodiesel via catálise enzimática

Normalmente, os meios mais comuns utilizados na catálise enzimática são: (1) em presença de solventes e (2) em sistema livre de solventes, que é composto somente pelos substratos. No primeiro caso, os solventes mais utilizados são os que apresentam valores altos do parâmetro logaritmo do coeficiente de partição ( $\log P$ ), como *n*-hexano ( $\log P = 3,5$ ), *n*-heptano ( $\log P = 4,0$ ). O  $\log P$  é um parâmetro de hidrofobicidade, sendo que quanto maior esse valor, mais hidrofóbico é o solvente (ZAKS; KLIBANOV, 1988). O benefício de se utilizar um solvente hidrofóbico no meio de reação é o aumento da solubilidade dos substratos e a manutenção da camada de solvatação da enzima, essencial para manter a sua atividade catalítica (KRIEGER et al 2004).

No sistema (2), livre de solventes, a grande vantagem é a não utilização de solventes derivados do petróleo, deixando o processo mais “limpo” e mais econômico, além da possibilidade de aumentar a quantidade de substratos, o que favorece uma maior produtividade da reação. No entanto, existem várias dificuldades encontradas nesse sistema, tais como o aumento da viscosidade do meio de reação, problemas de inibição da enzima pelo excesso de substrato ou de

produto causando a instabilidade e redução do desempenho do biocatalisador (SALIS et al 2005).

#### 2.1.4 *Lipase de Burkholderia contaminans* na síntese de biodiesel

A cepa *Burkholderia contaminans* LTEB 11, utilizada neste trabalho, anteriormente denominada *B. cepacia*, é uma bactéria capaz de produzir uma lipase com massa molecular de aproximadamente 33 kDa, pertence ao gênero de *Burkholderia*, da família de *Burkholderiaceae*, fazendo parte do complexo de *B. cepacia* (BCC), descrita por Vanlaere et al (2009).

Esta cepa teve seu genoma recentemente sequenciado por Alnoch (2017) e está depositada como estirpe CPQBA 515-12 no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA - UNICAMP, São Paulo, Brasil. Essa bactéria é gram-negativa, capaz de colonizar vários ambientes naturais, sendo frequentemente isolada em plantas, solos e águas (MAHENTHIRALINGAM e URBAN, 2005; PARKE e GURIAN-SHERMAN, 2001; BURKHOLDER; HAGEMEYER, 1950). A lipase produzida por esta cepa (LipBC) é resistente a solventes orgânicos, como o *n*-hexano, *n*-heptano, tolueno, butanol e isopropanol, atua em ampla faixa de temperatura (30-65°C) e pH entre 6 a 8 (BARON et al 2011; LIMA et al 2004). Devido a essas propriedades, esta lipase tem sido bastante utilizada em estudos de imobilização e aplicação na síntese de ésteres do biodiesel (SOARES, et al 2015; BARON et al 2014; SOARES et al 2013; BARON et al 2011; SALUM et al 2008; FERNANDES et al 2007) (Tabela 1). Esses estudos mostram que LipBC pode ser produzida por fermentação submersa (FS) seguida de imobilização em suportes de polipropileno (Accurel) (BARON et al 2014) ou produzida por fermentação no estado sólido (FES) com a imobilização direta do meio de reação. A matéria-prima aplicada a esse processo pode ser de baixo custo, como o bagaço de cana, ou misturas com farelo de semente de girassol, torta desoja e milho (SOARES et al 2015; SALUM et al 2010; FERNANDES et al 2007) (Tabela 1).

Entre as dificuldades relatadas com a utilização da lipase de *B. contaminans* pode se destacar: (1) o número de reutilização da enzima. A diferença entre as duas formas de produzir a lipase está relacionada com o número de reutilização do catalisador, que é menor com o processo FES; (2) adsorção do glicerol no suporte.

Ao decorrer da reação o glicerol formado adsorve sobre o biocatalisador causando a diminuição do rendimento da reação.

TABELA 1 ESTUDOS SOBRE A UTILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia contaminans* NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Suporte	Óleo	Álcool	Razão molar	Solvente	Temperatura (°)	Tempo (h)	Conversão (%)	Tipo de fermentação	Referências
-	Milho	Etanol	5:1	n-heptano	37	120	95	FES <sup>2</sup>	Fernandes et al (2007)
-	Soja	Etanol	3:1	-	50	46	95	FES <sup>2</sup>	Salum et al (2010)
(Accurel/EP100)	Mamona	Etanol	3:1	-	45	6	90	FS <sup>3</sup>	Baron et al (2014)
-	AGLs <sup>1</sup>	Etanol	3:1	-	45	31	92	FES <sup>2</sup>	Soares et al (2013)
-	Palma	Etanol	5,5:1	-	45	30	89	FES <sup>2</sup>	Galeano et al (2017)
-	AGLs <sup>1</sup>	Etanol	5:1	-	45	24	88	FES <sup>2</sup>	Dias et al (2017)

<sup>1</sup>AGLs – Ácidos graxos livres de óleo de soja. <sup>2</sup>FES - Fermentação no estado sólido. <sup>3</sup>F.S - Fermentação submersa

### 2.1.5 Produção de lipases por fermentação no estado sólido

O processo mais conhecido industrialmente para a produção de lipases é a fermentação submersa (FS), mas a técnica de fermentação no estado sólido (FES) também tem sido muito pesquisada, pois permite produzir e imobilizar a enzima em única etapa (SOARES et al 2015, LIU et al 2013, SALUM et al 2010, ZAGO et al 2014; FERNANDES et al 2007).

No processo de FES, os micro-organismos crescem em substratos sólidos com baixa umidade, nos quais os espaços entre as partículas dos substratos são preenchidos com fase contínua gasosa, facilitando o processo de oxigenação do meio. A origem desses substratos pode ser agroindustrial ou de resíduos de processos e, devido a isso, normalmente, são de baixo custo, como tortas originadas de extração de óleo (milho, soja, girassol, amendoim, mamona, babaçu), cascas de coco, resíduos do processo de extração de amido, frutas cítricas (bagaço de laranja) e da produção de açúcar e álcool (bagaço de cana). Este último é um resíduo muito abundante, pois segundo a *Agricultural Organization of United Nations* (FAO) e o Sistema de Acompanhamento de Produção Canavieira (SAPCANA), o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com produção de cerca de 884 milhões de toneladas de cana, com previsão de aumento de 3,35% da produção até 2018/2019. A quantidade de bagaço, resultante da moagem da cana na produção de açúcar e etanol, pode variar dependendo dos cultivares e do comportamento da safra, podendo gerar entre 238,5 a 306,3 kg de bagaço por tonelada de cana-de-açúcar (RASO et al 2012).

Nos últimos anos, o bagaço de cana tem sido estudado como uma alternativa de produção de lipases, pectinases e de biossurfactantes (ZAGO et al 2014; SOARES et al 2015; KRIEGER et al 2010).

Alguns autores estudaram os principais parâmetros que influenciam no rendimento da produção de enzimas a fim de obter a melhor condição de uso do bagaço de cana. Zago et al (2014) avaliaram o efeito da moagem de diferentes substratos em FES na produção de lipases por *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07, sendo os maiores valores de atividade enzimática observados com as partículas menores (0,4-1,0 mm) e com o

sólido fermentado (SF) triturado, justificados pelo aumento da área específica após a moagem.

Alguns trabalhos relatam que os fungos são mais tolerantes aos ambientes com baixa concentração de água, como é o caso da FES, no entanto, as bactérias também vêm sendo utilizadas, particularmente, a bactéria utilizada no presente trabalho. No estudo pioneiro, Fernandes et al (2007) realizaram a produção da lipase de *B. cepacia* LTEB 11 com os substratos bagaço de cana, farelo de milho e óleo de milho e obtiveram um sólido com atividade de hidrólise em substrato trioleína de  $108 \text{ U g}^{-1}$ . Mais tarde, Soares et al (2013) estudaram o efeito do tamanho das partículas de bagaço de cana, na atividade de hidrólise do SF da mesma lipase. Nesse estudo, foram avaliadas frações de 0,85 - 2,36 mm e maiores que 2,36 mm. O melhor valor de atividade de hidrólise contra trioleína foi de  $91,6 \text{ U g}^{-1}$ , observado com frações menores que 2,36 mm.

Ambos os processos de fermentação (FS e FES) (Figura 4, A e B) possuem vantagens e desvantagens, sendo que o procedimento mais econômico é o de FES, onde a produção e imobilização da enzima ocorrem simultaneamente. Nesse caso, a FES dispensa etapas adicionais de purificação e imobilização da lipase. Além da simplicidade da fermentação, pois utiliza equipamentos baratos e baixa temperatura, a FES é um processo econômico em termos de espaço (MITCHELL et al 2006), utiliza como matéria-prima, resíduos agroindustriais, contribuindo com a redução no impacto ambiental causado por esses resíduos, proporcionando valor agregado a esse tipo de material (RIGONI et al 2003; LEAL et al 2002).

No entanto, a desvantagem da FES é a falta de homogeneização do meio, que causa problemas de transferência de massa, calor e dificuldade de controlar alguns parâmetros operacionais, como a temperatura, oxigenação e o pH no interior do leito fermentado. Já no processo de FS, o meio de fermentação é homogêneo e os parâmetros operacionais podem ser controlados mais facilmente (GONZÁLEZ et al 2002).

Entretanto, após a FS são necessárias várias etapas de recuperação, purificação parcial e imobilização da enzima, o que impacta diretamente no custo do biocatalisador, sendo essas as principais desvantagens do processo FS (SINGHANIA et al 2009). Já para a FES, após a fermentação, é

necessário apenas a secagem do sólido fermentado e controle de umidade para o armazenamento.

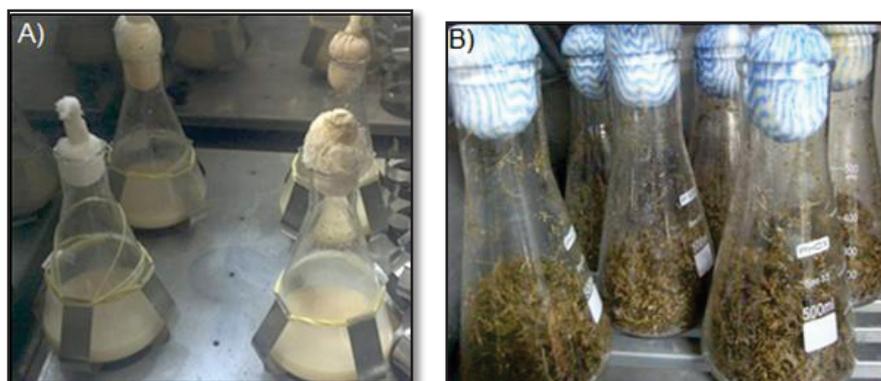


FIGURA 4. TIPOS DE FERMENTAÇÃO UTILIZADOS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASES

Fermentações realizadas com a bactéria *Burkholderia contaminans*. A) Fermentação submersa (FS) e B) Fermentação no estado sólido (FES, com bagaço de cana e óleo de soja).

Fonte: A autora.

#### 2.1.5.1 Óleo de mamona

Entre as oleaginosas não comestíveis, é possível destacar a mamona (*Ricinus communis*). Essa planta pertence à família das *Euphorbiaceae*, que engloba um amplo número de espécies nativas da região tropical, e apesar de ser originária da Ásia, é encontrada em várias regiões do Brasil. É classificada como uma planta xerófila, de clima tropical e subtropical (Figura 5, A) (SOUZA et al 2009). De acordo com WEISS (1983), a mamoneira é uma planta perene e semitropical de regiões temperadas, floresce em condições climáticas diversas, é tolerante à seca, sendo seu cultivo de importância estratégica para a economia do Nordeste, sobretudo nos ambientes do clima semiárido (MAPA 2014).



FIGURA 5. *Ricinus communis* (MAMONA)

A) Mamoneira eB) Fruto e sementes de mamona.

Fonte: <http://blognapesquisaagricola.blogspot.com.br/> (acesso 26/12/2016); <http://ciorganicos.com.br/noticia/> (acesso 26/12/2016).

Entre as vantagens da mamona citam-se a possibilidade de poder ser cultivada em grande diversidade de solo, clima e ambientes, além da sua fácil comercialização. O fruto dessa planta é uma cápsula espinhosa que contém até 3 sementes com teor de óleo entre 43% a 50%, dependendo da variedade e da região, o qual é produzido por extração das sementes à frio (Figura 5, B) (AMORIM NETO et al 2001; WEISS1983). O óleo de mamona (óleo de rícino) é composto por 85 a 90% de ácido graxo ricinoleico (Tabela2) (OGUNNIYI, 2006).

TABELA 2. TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE MAMONA

Ácidos graxos	Estrutura	Valores de referência (%)
Ácido Palmítico	C16:0	0,1 - 2,0
Ácido Esteárico	C18:0	0,9 - 1,4
Ácido Oleico	C18:1	2,9 - 3,6
Ácido Linoleico	C18:2	3,0 - 6,5
Ácido Linolênico	C18:3	0,1 - 0,5
Ácido Ricinoleico	C18:1,(9)12-OH	84 -90

FONTE: Adaptada de OGUNNIYI (2006)

O ácido ricinoleico é monoinsaturado, pertence ao grupo dos hidroxiácidos e tem massa molar de 298 g e baixo ponto de fusão (- 5 °C). É composto por uma cadeia carbônica com dezoito átomos de carbono, duas duplas ligações, grupo hidroxila e ligação éster, possibilitam diversas reações químicas que resultam em importantes derivados com diversas aplicações industriais (SAVY FILHO et al 2001). O grupo hidroxila presente no ácido ricinoleico confere ao óleo de mamona a peculiaridade de ser o único óleo vegetal solúvel em álcool (Figura 6) (WEISS 1983).

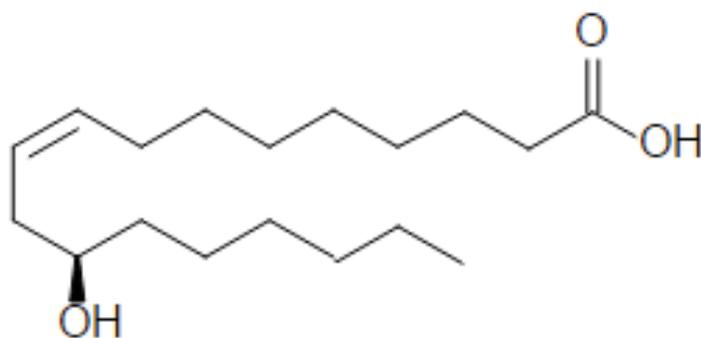


FIGURA 6. ÁCIDO RICINOLEICO - 12-hidroxi-9-cis-octadecenoico

Fonte: o autor.

A Índia é o maior produtor do óleo de mamona, com mais de 1.600.000 toneladas em 2013, bem acima da produção da China, segundo maior produtor, com 60 mil toneladas, e o Brasil com um pouco menos de 20 mil toneladas, classificado como o terceiro maior produtor (FAO, 2013).

O Brasil tem facilidade para produzir óleo de mamona, pois a mamoneira se adapta muito bem às condições climáticas da região Nordeste. Além disso, a produção do óleo de mamona promove o desenvolvimento sustentável em diversas comunidades rurais do semiárido pelo seu potencial de gerar emprego e renda, por esse motivo, esta planta foi escolhida como ideal para promover o desenvolvimento social nessa região. Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014), o cultivo da mamoneira tem se intensificado devido à sua relevante importância econômica na indústria química, e à perspectiva de utilização

como fonte de energia (SOUZA et al 2009). Na indústria, o óleo de mamona pode ser utilizado como matéria-prima na fabricação de tintas, plásticos, na perfumaria, verniz, aditivos, biodiesel, entre outros (AZEVEDO et al 2001; LIMA et al 2006).

#### 2.1.6 Produção de biodiesel a partir do óleo de mamona

O óleo de mamona é viável para a produção do biodiesel, no entanto, não é adequado o uso do B100 (biodiesel 100% puro) devido à elevada densidade e viscosidade desse combustível. Por causa disso, seu uso mais adequado é em misturas de até 30% com outros óleos, para garantir um produto com melhores propriedades, como a redução do ponto de congelamento e percentual de iodo, adequando-se às especificações da Agência Nacional do Petróleo, Gás Naturais e Combustíveis (Resolução ANP Nº 45, de 25 de agosto de 2014).

Em reações de transesterificação do óleo de mamona, observa-se que a conversão relatada pelos trabalhos que utilizaram catalisadores químicos está geralmente acima de 70%, em temperaturas variando de 40° C a 70°C, e que o tempo de reação é aproximadamente de 1 h (PERIN et al 2008; SILVA et al 2010), mas tempos curtos como de 30 min e 10 min também são relatados (Tabela 3) (SÁNCHEZ et al 2015; HAILEGIORGIS et al 2016). Os melhores rendimentos alcançados em menor tempo de reação são observados com o uso de catalisadores químicos (alcalinos e ácidos) e álcool metílico. Sánchez et al (2015) avaliaram vários catalisadores e relatam que os metóxidos ( $\text{CH}_3\text{ONa}$  e  $\text{CH}_3\text{OK}$ ) são os mais adequados devido à capacidade de se dissociar sem produção de água durante a reação de transesterificação. Segundo Meneghetti et al (2006), o uso do metanol, ao invés do etanol, proporciona menor tempo de reação.

Os trabalhos que utilizaram catalisadores enzimáticos relataram conversões elevadas, comparáveis com os resultados obtidos pela catálise química convencional (Tabela 3). No entanto, o tempo de reação ainda é prolongado, variando de 5 a 96 h (OROZCO-HERNANDEZ et al 2016; SILVA et al 2016). As enzimas mais utilizadas são as comerciais, com custo mais elevado em comparação aos catalisadores químicos. Normalmente, os estudos

utilizam metanol e diferentes solventes de origem fóssil, o que deixa o processo de produção do biodiesel inadequado ao meio ambiente.

Na produção enzimática do biodiesel de óleo de mamona (Tabela 4), são poucos os estudos que não utilizam solventes e metanol no meio de reação. Entre eles, pode-se destacar o trabalho de Baron et al (2014) que obtiveram conversões elevadas de 90% em 6 h.

Outros trabalhos relataram rendimentos superiores a 90% em várias condições. Com o uso de *n*-hexano no meio de reação, de Oliveira et al (2004) obtiveram conversões de 98% em 5 h na transesterificação do óleo de mamona com etanol e Hajar et al (2014), 99% em 24 h, com metanol. Malhotra et al (2015) relataram uma conversão de 95% em 48 h, utilizando o álcool 1-hexanol como doador de acila.

TABELA 3. PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DO ÓLEO DE MAMONA VIA CATÁLISE QUÍMICA

	Catalisador	Álcool	Temperatura (°C)	Tempo	Éster (%)	Referências
Transesterificação	SiO <sub>2</sub> /50% de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	etanol	60	6 h	95	Perin et al (2008)
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 50% de KOH	metanol	60	1 h	95	Perin et al (2008)
	KOH	etanol	50	50 min	99	Silva et al (2010)
	CH <sub>3</sub> ONa	metanol	40	30 min	99	Canoira et al (2010)
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , KOH	etanol	50	2 h	95	Hincapié et al (2011)
	KOH	metanol	65	8 h	74	Dias et al (2013)
	CH <sub>3</sub> OK	metanol	45	10 min	97	Sánchez et al (2015)
	nanocatalisador de ZnO	metanol	55	50 min	91	Mohamad et al (2016)
	NaOH	metanol	45	30 min	96	Hailegiorgis et. al. (2016)
	Fsterificação	NaHCO <sub>3</sub>	metanol	70	70 min	99
NaOH		metanol	60	90 min	97	Silitonga et al (2016)
AMBERLYST – 15 (resina catiónica)		2-methyl hexanol	80	4 h	100	Saboya et al (2017)

TABELA 4. PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA

Lipase	Álcool	Razão Molar	Temperatura (°C)	Solvente	Tempo (h)	Éster (%)	Reator	Referência
<sup>1</sup> Novozym 435	Etanol	10:1 3:1	65	<i>n</i> -hexano	7	81	Fracos (Batelada)	De Oliveira et al (2004)
<sup>2</sup> Lipozyme TL IM					5	98		
<sup>1</sup> Novozym 435	Metanol	6:1	50	Ausência	24	97	Fracos (Batelada)	Yang et al (2005)
<sup>1</sup> Novozym 435	Metanol	5:1	40	CO <sub>2</sub> - Supercrítico	8	45	Leito fixo (Batelada)	Varma e Madras (2007)
<sup>2</sup> Lipozyme TL IM	Etanol	5:1	35	<i>n</i> -hexano	7	80	Fracos (Batelada)	Delgado e Pashova (2010)
<sup>2</sup> Lipozyme TL IM	Metanol	3:1	45	Ausência	24	68	Fracos (Batelada)	Maleki et al (2013)
<sup>1</sup> Novozym 435	Metanol	3:1	40	<i>n</i> -hexano	24	99	Leito fixo (Batelada)	Hajar et al (2014)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB 11 (Accurel EP 100)	Etanol	3:1	35	Ausência	6	90	Fracos (Batelada)	Baron et al (2014)
<i>Candida rugosa</i>	Metanol	3,9:1	40	Ausência	24	95	Fracos (Batelada)	Silva(2016)

<sup>1</sup>Lipase de *Candida Antarctica* B; <sup>2</sup> Lipase de *Thermomyces lanuginosus*.

TABELA 4. PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA (continua)

Lipase	Álcool	Razão Molar	Temperatura (°C)	Solvente	Tempo (h)	Éster (%)	Reator	Referência
<sup>1</sup> Novozym 435	1-hexanol					95		
<i>Mucor miehei</i> (RMIM)	1-octanol 1-dodecanol	4:1	40	<i>n</i> -hexano	48	90	Frascos (Batelada)	Malhotra et al (2015)
<i>Bacillus aerius</i> (sílica gel)	Metanol	4:1	55	Ausência	96	78	Frascos (Batelada)	Narwalet al (2015)
<sup>1</sup> Novozym 435								
<sup>2</sup> Lipozyme TL IM	Metanol	5,6:1	60	<i>t</i> -butanol	8	88	Frascos (Batelada)	Odaneth et al (2016)
<i>Candida rugosa</i> <sup>3</sup> (MNPs)	Metanol	5:1	40	Ausência	24	87	Leito magneticamente estabilizado e fluidizado	Hajar et al (2016)
CALB <sup>1</sup>	Metano	61	40	Ausência	6	79	Frascos (Batelada)	Orozco-Hernandez et al (2016)

<sup>1</sup>Lipase de *Candida Antarctica B*; <sup>2</sup> Lipase de *Thermomyces lanuginosus*; <sup>3</sup>lipase imobilizada covalentemente em nanopartículas magnéticas (MNPs).

## 2.2 Utilização de lipases em reatores para a síntese de biodiesel

Os reatores são amplamente utilizados em nível laboratorial, devido à possibilidade de aumentar a escala de trabalho e de controlar as condições operacionais.

O desempenho de qualquer tipo de biorreator, quando se utilizam enzimas imobilizadas, depende de vários fatores, entre os quais podem ser citados: a razão enzima/meio reacional, que deve ser o suficiente para garantir o máximo rendimento, condições estéreis de operação, tensão de cisalhamento suficiente para não causar danos na enzima, intensidade e uniformidade de agitação (NAJAFPOUR, 2007; ZANIN e MORAES, 2004).

Existem vários modelos de biorreatores, sendo os mais comuns: reator de tanque agitado (*stirred tank reactor*, STR), reator de coluna de leito empacotado (*packed-bed reactor*, PBR), reator de leito fluidizado (*fluidized-bed reactor*, FBR) e reator de tanque agitado contínuo (*continuous stirred-tank reactor model*, CSTR) (Figura 7).

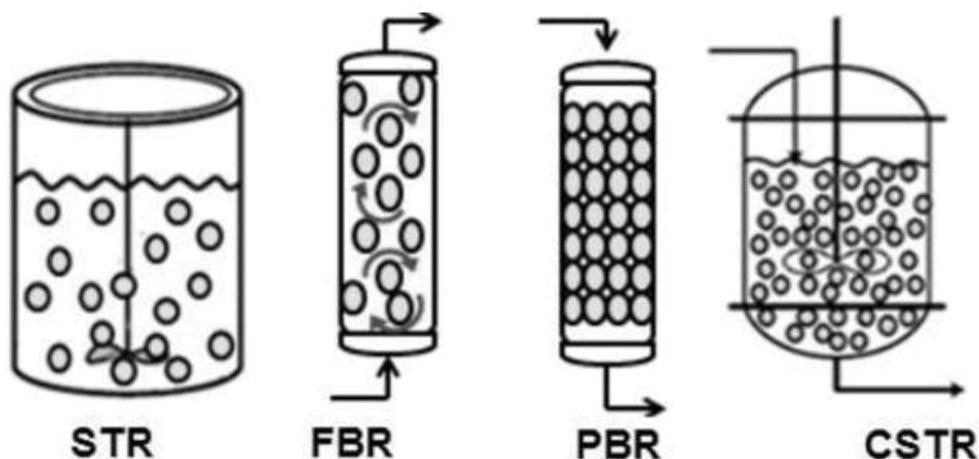


FIGURA 7. MODELOS DE REATORES UTILIZADOS NA BIOCATÁLISE

STR-*Stirred tank reactor* (reator de tanque agitado); FBR-*Fluid bed reactor* (reator de leito fluidizado); PBR-*Packed bed reactor* (reator de leito fixo) e CSTR-*Continuous stirred tank reactor* (reator de tanque agitado contínuo).

Fonte: Adaptado de Zanin; Moraes (2004).

A escolha do tipo de reator depende de algumas variáveis, tais como a forma como a enzima foi imobilizada, a natureza dos substratos, fatores operacionais (pH e temperatura), cinética da reação, superfície de contato do catalisador em relação ao volume do biorreator, transferência de massa interna e externa e principalmente o custo do biorreator (BUFFO 2016; SIMÕES et al 2015).

Entre os reatores citados, o reator de leito fixo tem sido o mais estudado (Tabela 4) em escala laboratorial. Esse tipo de reator permite acompanhar o desempenho da enzima imobilizada em diferentes condições operacionais. Esse acompanhamento é importante para desenvolver um planejamento da reação em grande escala. No entanto, na maioria dos trabalhos presentes na literatura, a produção do biodiesel é feita usando o modelo STR (reator de tanque agitado) em batelada com agitação e temperatura controladas. Nesse sistema, o biocatalisador fica disperso no meio de reação, o que dificulta a sua recuperação.

Alguns grupos têm realizado estudos em PBR (reator de leito fixo ou empacotado). Nesse tipo de reator, o biocatalisador fica fixo no interior da coluna, sendo possível controlar a temperatura e o tempo de contato do meio de reação com o biocatalisador.

Na Tabela 5, estão apresentados os trabalhos mais recentes. Esses trabalhos utilizaram, para imobilizar a enzima, vários tipos de suportes, como polímeros, resinas, nanopartículas e espumas. O biocatalisador mais utilizado é a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em resina acrílica, chamada comercialmente de Novozym 435. A maioria dos trabalhos utilizam como matéria-prima óleos vegetais comestíveis, em especial o óleo de soja e metanol, como substrato da reação (TRAN et al 2016; VENY et al 2014; TRAN et al 2014; YOSHIDA et al 2012; HAMA et al 2011).

A rota biocatalítica é ainda pouco utilizada na produção industrial do biodiesel devido ao grande gargalo da catálise enzimática, onde se destacam o elevado custo do biocatalisador e as várias etapas durante a sua produção, ao baixo rendimento causado por problemas de inibição do catalisador e ao tempo prolongado de reação.

Alguns trabalhos têm relatado baixos tempos de conversão, equivalentes aos do processo químico, em PBR utilizando a lipase Novozym 435. Hama et al (2011) e Trentin et al (2013) obtiveram 96% de conversão em 65 min e 98% em 8 min, respectivamente (Tabela 5).

Os estudos que envolvem a biocatálise na produção do biodiesel têm como objetivo principal reduzir esses gargalos. Por esse motivo, a utilização de alternativas que reduzam o custo do processo enzimático é essencial. A redução do custo do processo pode ser possível com o uso de suportes sólidos, os quais permitem o uso de matérias-primas de baixo custo e possibilitam a reutilização do biocatalisador. O processo de produção do sólido fermentado, (fermentação no estado sólido) é mais vantajoso em relação ao processo convencional (fermentação submersa), porque dispensa etapas de purificação da enzima e imobilização em suporte.

Alguns trabalhos relatam rendimentos elevados com sólidos fermentados em reações de transesterificação e esterificação com óleos comestíveis, no entanto, com maior tempo de reação em relação à lipase comercial Novozym 435.

Galeano et al (2017), Soares et al (2013) e Salum et al (2010) utilizaram o sólido fermentado da lipase de *B. cepaciae* obtiveram conversões em éster de 89% em 30 h (transesterificação do óleo de palma), 92% em 31 h (esterificação de uma mistura de ácidos graxos de borra do óleo de soja) e 95% em 46 h (transesterificação do óleo de soja), respectivamente.

Alguns trabalhos relatam o uso de sólidos fermentados e fonte de óleo não comestível. Dentre estes se destacam os trabalhos de Dias et al (2017), Botton (2014) e Soares et al (2013). Os autores utilizaram a rota etílica, matérias-primas não comestíveis como o ácido graxo de borra de soja (AGBS) e oleína, sólidos fermentados a partir de bagaço de cana, produzidos por *B. cepacia* e *Rhizopus microsporus*.

Para reduzir os custos do processo de produção de biodiesel via catálise enzimática de forma amigável ao meio ambiente é sugerido, segundo a literatura, utilizar matérias-primas não comestíveis e álcool etílico, que, além de ser renovável e biodegradável, apresenta baixa toxicidade em relação à rota metílica, e catalisador proveniente do processo de FES. Esse processo permite a produção e imobilização simultânea da lipase em suporte biodegradável de baixo custo, como o bagaço de cana e tortas obtidas do processamento de extração de óleo.

TABELA 5. ESTUDOS MAIS RECENTES SOBRE A UTILIZAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO NA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS COM LIPASES

Lipases	Preparo enzimático	Matéria-prima	Álcool	Razão Molar	Tempo	Conversão (% éster)	Operação	Referências
<i>Burkholderia cepacia</i>	<sup>3</sup> BC+ <sup>4</sup> FSG	Soja	Etanol	3:1	46 h	95	Batelada	Salum et al(2010)
<sup>1</sup> Novozym 435	Resina acrílica (macroporosa)	Soja e canola	Metanol	-	1:05 h	96	Contínuo*	Hama et al (2011)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Nanopartículas Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Soja	Metanol	4:1	2:26 h	88	Contínuo*	Wang et al (2010)
<sup>1</sup> Novozym 435	Resina acrílica (macroporosa)	Soja	Metanol	4:1	20 h	82	Contínuo*	Hama et al (2011)
<i>Burkholderia cepacia</i>	<sup>5</sup> Sílica (PVA)	Palma	Etanol	7:1	40 h	88	Contínuo*	Séverac et al (2011)
<sup>2</sup> <i>Aspergillus oryzae</i> (recombinante)	Espuma de poliuretano	Soja e canola	Metanol	4,2:1	2:33 h	96	Batelada	Yoshida et al (2012)

<sup>1</sup>Lipase B de *Candida antarctica* (Novozym 435); <sup>2</sup>*Aspergillus oryzae* expressando lipase de *Fusarium heterosporum*; <sup>3</sup>Bagaçode cana + solução nutritiva; <sup>4</sup>FSG: farelo de semente de girassol; <sup>5</sup>Acetato de poliivinila; \* Reações de modo contínuo: o tempo indicado corresponde ao tempo de residência.

TABELA 5. ESTUDOS MAIS RECENTES SOBRE A UTILIZAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO NA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS COM LIPASES (continua)

Lipases	Preparo enzimático	Matéria-prima	Álcool	Razão Molar	Tempo	Éster (%)	Operação	Referências
<i>Burkholderia sp</i>	Celite	Girassol	Metanol	4:1	60 min	67	Contínuo*	Tran et al (2014)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Resina de troca iônica (macroporosa)	Pinhão-manso	Metanol	-	-	81	Batelada	Veny et al (2014)
<sup>1</sup> Novozym 435	Resina acrílica (macroporosa)	Milho	<sup>4</sup> DMC	15:1	18 h	91	Contínuo*	Gu et al (2015)
<sup>2</sup> <i>Burkholderia lata</i>	<sup>3</sup> BC+ óleo de soja (10%)	Palma	Etanol	5,5:1	30 h	89	Batelada	Galeano et al (2017)
<i>Burkholderia sp</i>	Celite	Girassol	Metanol	4:1	40 h	85	Contínuo* 4 colunas em série	Tran et al (2016)

Transesterificação

<sup>1</sup>*Candida antarctica* (Novozym 435); <sup>2</sup>*Burkholderia lata* CPQA 515-12 DRM; <sup>3</sup>Bagaço de cana + solução nutriente; <sup>4</sup>DMCdimetilcarbonato, \* Reações de modo contínuo: tempo indicado corresponde ao tempo de residência.

TABELA 5. ESTUDOS MAIS RECENTES SOBRE A UTILIZAÇÃO DE REATOR DE LEITO FIXO NA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ALQUÍLICOS COM LIPASES (continua)

Lipases	Preparo enzimático	Matéria-prima	Álcool	Razão Molar	Tempo	Éster (%)	Operação	Referências
<sup>1</sup> Novozym 435	Resina aniônica (macroporosa)	<sup>6</sup> AGLs	Etanol	6:1	8 min	98	Contínuo*	Trentin et al (2013)
<sup>2</sup> <i>Rhizopus microsporus</i>	<sup>4</sup> BC	<sup>6</sup> AGLs	Etanol	3:1	48 h	58	Batelada	Botton (2014)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Resina aniônica	<sup>6</sup> AGLs	Etanol	6:1	8 min	50	Contínuo*	Trentin et al (2013)
<sup>1</sup> Novozym 435	Resina aniônica (macroporosa)	Soja	Etanol	6:1	1h	98	Batelada	Trentin et al (2015)
<sup>3</sup> <i>Burkholderia lata</i>	<sup>4</sup> BC+ <sup>5</sup> FSG	<sup>6</sup> AGLs	Etanol	3:1	31 h	92	Batelada	Soares et al (2013)
<sup>3</sup> <i>Burkholderia lata</i>	<sup>4</sup> BC+ <sup>5</sup> FSG	<sup>6</sup> AGLs	Etanol	5:1	24 h	88	Batelada	Dias et al (2017)

<sup>1</sup>*Candida antarctica* (Novozym 435); <sup>2</sup>*Rhizopus microsporus* CPQA 312-07 DRM; <sup>3</sup>*Burkholderia lata* CPQA 515-12 DRM; <sup>4</sup>Bagaço de cana + nutriente: mistura de bagaço de cana e solução nutriente; <sup>5</sup>FSG: farelo de semente de girassol; <sup>6</sup>AGLs: Ácidos graxos livres de óleo de soja, \* Reações de modo contínuo: tempo indicado corresponde ao tempo de residência.

## 2.3 Influência do ultrassom sobre as propriedades de lipases

O uso do ultrassom em reações catalisadas por enzimas tem se mostrado uma técnica promissora (NAKAYAMA et al 2017), vem sendo aplicado nas indústrias químicas, de biocombustíveis, farmacêuticas e de alimentos. Nos últimos anos, os estudos têm sido voltados ao uso do ultrassom no desenvolvimento de alternativas capazes de superar as limitações recorrentes da catálise enzimática (longos tempos reacionais e baixa produtividade) e diminuir os custos do processo.

O efeito do ultrassom tem as seguintes vantagens: (1) melhora a transferência de massa e o rendimento da reação, o que proporciona maior homogeneização do meio e maior acesso dos substratos ao catalisador, devido à frequência de colisões entre as moléculas de substratos e a enzima (ZHU et al 2010; LIU et al 2008), (2) favorece o aumento da atividade enzimática, (3) aumenta o desempenho catalítico, e (4) diminui a quantidade de catalisador e reagentes no meio de reação. Esses benefícios refletem diretamente no custo do processo, viabilizando a catálise enzimática. Além disso, a utilização de ultrassom é considerada uma alternativa que contribui positivamente para o meio ambiente, pois não gera resíduo, favorece a diminuição do consumo de energia e reagentes, possui alta eficiência e baixa exigência instrumental (SANTIN et al 2017; BABICZ et al 2010).

A técnica do ultrassom é baseada no fenômeno de cavitação especialmente no colapso de bolhas de cavitação, que consiste na dispersão dos reagentes do meio de reação, que ocorre principalmente pela formação, crescimento e implosão violenta de microbolhas formadas pelas ondas sonoras. Esse fenômeno atua isoladamente ou por meio da combinação de três mecanismos: (1) o efeito térmico e de pressão, gerado no microambiente durante a cavitação, (2) a formação de radicais livres, por sonólise (ultrassom em soluções aquosas) e (3) cisalhamento, causado pela força mecânica formada por ondas de choque produzidas pela cavitação (ADEWALE et al 2015; SUBHEDAR et al 2015).

O ultrassom pode aumentar a flexibilidade da enzima e com isso mudar a sua conformação ativa, mas o comportamento é peculiar para cada tipo de enzima, conforme a adaptação para as diversas condições de reação com o ultrassom, (SUBHEDAR et al 2016; ZHU et al 2010).

Para que o efeito desejado seja obtido, é necessário levar em consideração alguns fatores que podem afetar a cavitação, entre eles a solubilidade dos reagentes e substratos, a frequência, potência e intensidade do ultrassom, o tempo de exposição do ultrassom em elevada temperatura, a viscosidade, a tensão superficial, a pressão externa e a presença de partículas de reagentes e substratos, e as condições do micro-ambiente em torno da enzima (SUBHEDAR et al 2016; ZHU;RASO et al 1999).

Pesquisas feitas em sistemas reacionais homogêneos e heterogêneos indicam a existência de regiões específicas de reatividade. Em sistemas homogêneos, ocorrem dois estágios de reatividade. O primeiro ocorre no “ponto de calor”, ou seja, na fase gasosa dentro das bolhas geradas pela cavitação; o segundo estágio, ocorre na camada líquida em torno dessa bolha. Em sistemas heterogêneos, a reatividade ocorre de forma assimétrica: as bolhas, geradas na cavitação, são pulverizadas do meio líquido à superfície da fase sólida, etambém existem microfluxos do meio líquido que favorecem a maior interação entre as partículas do meio de reação (LIU et al 2008). Essa interação aumenta a transferência de massa e o desempenho do catalisador, fazendo com que as condições ideais para que ocorra a reação sejam alcançadas com menor quantidade de catalisador (CHOUDHURY et al 2014; KUMAR et al 2011; YU et al 2010). A cavitação não ocorre de forma uniforme e isso leva a atividade cavitacional próxima à superfície de irradiação e a uma grande variação na dissipação de energia, na maior parte do meio de reação. A uniformidade na distribuição da cavitação é um parâmetro importante que pode ser otimizado, e deve ser levado em consideração no momento da escolha do reator assistido por ultrassom (CHOUDHURY et al 2014; ZHU e HAN et al 2010).

### 2.3.1 Aplicações do ultrassom

Os dois tipos de aparelhos de ultrassom mais comuns são o banho (interação indireta) e a sonda (interação direta). O banho ultrassônico (Figura 8. A) é composto basicamente por três partes: gerador, transdutor e tanque. O sinal elétrico é produzido pelo gerador e o sinal é convertido em movimento. O transdutor vibra conforme a frequência do sinal que recebe, quando essa frequência é acima de 20 kHz, é chamada de ultrassom. A vibração do transdutor

passa para o fundo do tanque, sendo a energia irradiada verticalmente pelas ondas sonoras e transmitida através das paredes para o frasco reacional. O contato do ultrassom com o meio de reação é indireto. Nesse caso, grande parte dessa energia é dissipada, perdendo a influência reativa do sistema SILVA (2016).

Em aparelhos do tipo sonda de ultrassom (Figura 8 B), a sonda encontra-se fixada na extremidade do amplificador do transdutor, o contato com o ultrassom ocorre diretamente com o meio de reação. Conseqüentemente, a potência é totalmente disponível e pode ser sintonizada para oferecer diferentes intensidades, e por isso, este tipo de aparelho é mais eficiente (DA LUZ, 1998; BARBOSA e SERRA, 1992). Como desvantagem, apresenta a frequência fixa e dificuldade de controlar a temperatura em sistemas sem refrigeração.

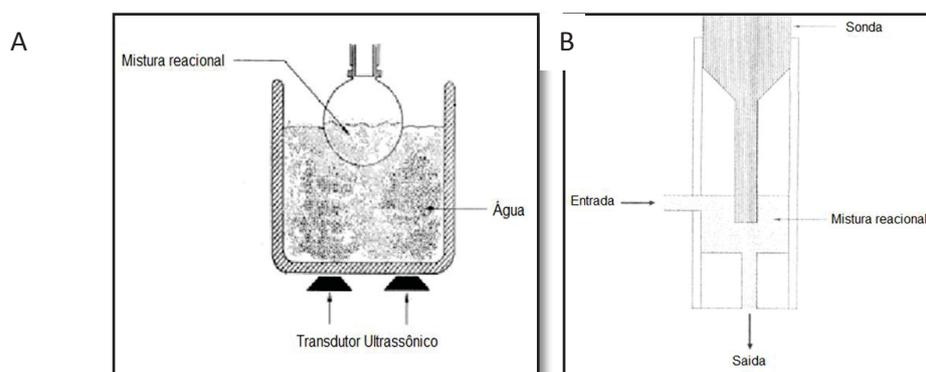


FIGURA 8. APARELHOS DE ULTRASSOM MAIS UTILIZADOS EM ESCALA LABORATORIAL

A) Banho de ultrassom, interação indireta; B) Sonda de ultrassom, interação direta.  
Fonte: Low e Ley, (1989)

Estudos relatam que o ultrassom, em biocatálise, pode ser aplicado para extrair enzimas intracelulares e no pré-tratamento da enzima, contribuindo na redução do tamanho das partículas de substrato do meio reacional, conseqüentemente, aumentando a área de contato entre a enzima e o substrato, minimizando problemas de transferência de massa, possibilitando o aumento do rendimento da reação (ZHAO et al 2014; CHOUDHURY et al 2014). Shah e Gupta, (2008) estudaram os efeitos do ultrassom na lipase de *B. cepacia* e *P. fluorescens*, por análise de dicroísmo circular, técnica utilizada para investigar a estrutura secundária de proteínas baseada na luz circularmente polarizada. Os espectros de

adsorção no UV- longínquo (far UV) de 190-24 nm com as amostras nativas da lipase tratada e não tratada com ultrassom mostraram modificações na estrutura terciária da enzima tratada com ultrassom. No entanto, quando a análise foi feita com comprimento de onda mais elevado, cerca de 250 a 300 nm (UV próximo), foi possível detectar que a pré-irradiação levou à perturbação da estrutura terciária da enzima. Os autores também analisaram os efeitos em amostras purificadas e observaram alterações morfológicas, permitindo concluir que o ultrassom tem influência tanto na morfologia quanto em nível molecular das lipases.

Zhao et al (2014) estudaram o desempenho catalítico da esterase *Aeropyrum pernix* (APE1547) na esterificação do ibuprofeno. Os autores avaliaram o efeito do ultrassom em condições ótimas (35 °C, 200 W) e obtiveram atividade aumentada em 90 vezes e enantioseletividade aumentada em 4 vezes. Segundo os autores, após análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia de infravermelho (FTIR - fourier transform infrared), foi possível concluir que o ultrassom causou alterações estruturais e morfológicas no pó enzimático estudado e a redução do tamanho das partículas desse pó contribuiu para aumentar a enantioseletividade da enzima. Os melhores desempenhos foram observados com baixa potência de ultrassom, sendo possível manter a atividade durante cinco ciclos de reutilização. O efeito positivo da diminuição das partículas de catalisador aumenta a área específica do biocatalisador, contribuindo para maior atividade da enzima. Além disso, aumenta a difusão do substrato e do produto.

A temperatura também tem influência sobre os efeitos do ultrassom: quando elevada, pode aumentar a cavitação e acelerar a reação devido ao aumento da velocidade de difusão entre os substratos e os produtos; no entanto, poderia levar à desnaturação e inativação da enzima (BHANGU et al 2017; ZHAO et al 2014; PHILLIPS et al 1996).

Outro fator com importante, que influencia diretamente o desempenho da reação catalisada por enzimas, é a intensidade da potência do ultrassom, que pode interferir nas propriedades das enzimas (WANG et al 2010). Quando a potência é adequada, a colisão entre a enzima e o substrato tem efeitos positivos. Quando a potência é elevada, causa a destruição da estrutura tridimensional da enzima levando ao baixo rendimento da reação (BARBOSA et al 2013).

## 2.4 Processos da síntese enzimática assistida por ultrassom

O uso do ultrassom para a síntese de biodiesel tem sido relatado em vários trabalhos como uma alternativa eficiente para diminuir a limitação de transferência de massa em reações com catalisadores enzimáticos (ADEWALE et al 2015), para reduzir o tempo de reação e permitir a utilização de menor concentração de catalisador (Tabela 6). Esses estudos relatam que a intensidade e o tempo de contato da enzima com o ultrassom podem suprir a necessidade de excesso de álcool (metanol ou etanol) durante a reação, tornando o processo mais rápido, econômico e “limpo”.

Alguns trabalhos relatam aumento de conversão com o uso de intensidades médias de ultrassom e possibilidade de vários ciclos de uso do biocatalisador, como a exemplo de Batistella et al(2012), que estudaram a transesterificação etílica do óleo de soja catalisada pelas lipases Lipozyme RM IM e Novozym 435 em banho de ultrassom com intensidade variada de 0% a 100% (100 W e 37 KHz) a 60 °C por 4 h. Os autores observaram resultados insignificantes sem o uso do ultrassom durante o tempo estudado (4 h) e os melhores rendimentos foram com intensidade de 50%. Os valores de conversão em éster obtidos para as duas lipases foram de 90% e 57%, com queda de 37% observada após 2 e 8 ciclos, respectivamente. Kumar et al (2011) estudaram a produção do biodiesel de óleo de sementes de *Hymenaea courbaril* (Jatobá) em reação de transesterificação metílica catalisada pela lipase de *Enterobacter aerogenes* (imobilizada em sílica) sob condições otimizadas (RM 4:1 e 45 °C). As condições de ultrassom foram avaliadas em diferentes intensidades variando de 50% a 100% (200 W, 24 kHz). A melhor conversão observada foi de 85% com 50% de ultrassom em 30 min.

São poucos os trabalhos sobre o uso de óleos não comestíveis, que relatam o uso do ultrassom, particularmente, com o óleo de mamona (Tabela 6), entre os quais se destacam o de Silva(2016), que estudaram a produção do biodiesel a partir da mistura de óleo de mamona e amendoim em sistema de ultrassom utilizaram razão mamona/amendoim de 32:67, razão molar álcool/óleo de 23:1. 40 °C e 155 W. Obtiveram 91% de conversão em 60 min, sem ultrassom o rendimento foi insignificante.

No que se refere à reutilização da enzima, um dos principais problemas relatados na literatura é a baixa solubilidade do glicerol no meio de reação de transesterificação, causando problemas de transferência de massa e a perda de atividade enzimática. Esse problema ocorre devido ao acúmulo do glicerol, formado durante a reação, na superfície da enzima (SOARES et al 2013; SHAH; GUPTA, 2008). Para minimizar esse efeito, vem sendo relatado o uso do ultrassom, pois este pode deixar mais solúvel os reagentes e produtos formados durante a reação (BUCHORI et al, 2016; SILVA et al 2004).

TABELA 6. ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATALÍSE ENZIMÁTICA EM PROCESSOS ASSISTIDOS POR ULTRASSOM

Substrato	Álcool	Catalisador	Temperatura (°C)	Tempo	Éster (%)	Condições	Tipo de reator	Referências
Soja	Etanol	<sup>1</sup> Novozym 435	60	4 h	90	37 kHz 132 W	Banho	Batistella et al (2012)
Macaúba	Etanol	<sup>1</sup> Novozym 435	65	30 min	70	40 kHz 132 W	Banho	Michelin et al (2015)
Ácido graxo vegetal	Etanol	<sup>1</sup> Novozym 435** Lipozyme TL-IM	65	1 h	95 87	40 kHz 132 k	Banho	Zenevitz et al (2015)
Soja	Etanol	<sup>1</sup> Novozym 435	65	1h	98	40 kHz 62 W	Banho	Trentin et al (2015)
Girassol	Metanol	<sup>2</sup> Lipozyme TL-IM	50	4 h	96	40 kHz 120 W	Banho	Subhedar et al (2015)
Girassol	Metanol	<sup>2</sup> Lipozyme TL-IM	40	4 h	96	20 kHz -	Banho	Subhedaret al (2015)
Lipídeos da alga <i>Batryococcus</i> ssp	Metanol	<sup>1</sup> Novozym 435 <sup>1</sup> Novozym 435	50	4 h	88	30 kHz 200 W	Banho	Sivaramakrishnan e Incharoensakdi (2017)
Soja	Etanol	<sup>1</sup> Novozym 435	63	1 h	78	40 kHz 132 W	Banho	Trentinet al (2015)
Fritura	Acetato de metila	<sup>1</sup> Novozym 435	40	3 h	96	20 kHz 120 W	Sonda	Subhedaret al (2015)
Girassol	Metanol	<sup>2</sup> Lipozyme TL-IM	50	4 h	96	40 kHz 120 W	Banho	Subhedar et al (2016)
Soja Macaúba	Etanol	<sup>1</sup> Novozym 435	60	30 min	88/ 75	132 W 40 W	Banho	Santin et al (2017)
Canola	Metanol	<sup>1</sup> Novozym 435	50	1,5 h	99	20 KHz 40 W	Sonda	Bhangu et al. (2017)

<sup>1</sup>lipase *Candida antarctica*; <sup>2</sup>lipase de *Thermomyces lanuginosus*

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi otimizar a síntese enzimática de ésteres alquílicos (biodiesel) a partir de óleo de mamona utilizando a lipase de *Burkholderia contaminans* LTEB11.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Imobilizar a lipase de *B. contaminans* em Accurel MP 1000 e comparar com os resultados obtidos por Baron et al (2014) com o EP 100 na síntese de ésteres de óleo de mamona.
- Produzir o sólido fermentado contendo a lipase de *B. contaminans* naturalmente imobilizada.
- Otimizar as condições de reação em frascos agitados por delineamento fatorial, com as variáveis: razão molar, etapas de adição de etanol e temperatura.
- Desenvolver alternativas para a remoção do glicerol adsorvido no biocatalisador.
- Otimizar a síntese de ésteres etílicos em reator de leito fixo com o sólido fermentado, avaliando os efeitos da razão molar e temperatura.
- Otimizar a síntese de ésteres etílicos com o sistema de ultrassom acoplado ao reator de leito fixo, avaliando os efeitos da intensidade do ultrassom combinados com a razão molar, temperatura e vazão de circulação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná e no Laboratório de Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Energias Autossustentável (NPDEAS).

O presente estudo foi dividido em duas partes (Figura 9 e 10). A primeira parte foi produzir a lipase por fermentação submersa, imobilizá-la em suporte Accurel MP 1000 e estudar a transesterificação do óleo de mamona em frascos agitados utilizando a lipase de *B. contaminans* (LipBC) imobilizada. A segunda parte foi produzir a lipase por fermentação no estado sólido (FES) e utilizar o sólido fermentado na produção do biodiesel de óleo de mamona.

### 4.1 Reagentes e materiais

Os biocatalisadores utilizados foram o sólido fermentado seco de *B. contaminans* (SFBC), que contém atividade lipolítica produzida através da FES (4.3.6), a lipase *B. contaminans* imobilizada nos suportes Accurel EP 100 e MP 1000 e a lipase Novozym 435, cedida pela empresa Novozymes Latin America Ltda (Araucária, Paraná, Brasil).

Os suportes Accurel EP 100 e MP 1000 foram doados pela empresa Membrana GmbH Solutions for Healthcare and Industrial Filtration (Oberburg, Alemanha). O bagaço de cana foi gentilmente doado pela companhia Melhoramentos Norte do Paraná (Jussara, Paraná, Brasil).

Os meios de cultivos utilizados para o crescimento da cepa *B. contaminans* e a produção do pré-inóculo foram os meios Luria Ágar (LA, triptona bacteriológico 10 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup>, ágar 0,450 g L<sup>-1</sup>), 29 °C, por 48 h e Luria Bertani (LB, triptona bacteriológico 10 g L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup>), a 29 °C, 200 rpm por 8 h, preparados segundo Sambrook et al (1989).

Os substratos utilizados para determinar as atividades de hidrólise e esterificação dos biocatalisadores foram azeite de oliva da marca Gallo, com acidez máxima  $\leq 0,50\%$  (Cargill Agrícola S.A, São Paulo, Brasil) e ácido oleico P.A da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil). Etanol (99,5%), *n*-hexano (99,5%), *t*-

butanol (95%) foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

Os padrões cromatográficos nonadecanoato de metila (C19)(com 99,8% de pureza), ricinoleato de metila (99,5% de pureza) com grau analítico, e albumina bovina (BSA), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), metil-ésteres Mix FAME 37 (Supelco<sup>®</sup>, Bellefonte, Pensilvânia, EUA).

Na reação de transesterificação, foi utilizado o óleo de mamona adquirido da Farmanil Quima (Curitiba, Paraná) e o óleo de soja Liza da Cargill (Mairinque, São Paulo, Brasil). Os demais reagentes tiveram grau de pureza requeridos nos ensaios.

#### **4.2 Produção da lipase de *Burkholderia contaminans* LTEB 11**

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a cepa da bactéria *Burkholderia contaminans* LTEB11, isolada no LTEB, anteriormente denominada de *B. cepacia* LTEB11. A identificação dessa cepa foi realizada através do sequenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S, pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), na UNICAMP. O estoque da cepa foi mantido em meio LB com 40% (v/v) de glicerol a -18°C. Este estoque foi renovado a cada 6 meses.

Os meios preparados para o crescimento da bactéria e fermentações, bem como, todos os materiais utilizados nos cultivos foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 20 min. Após os experimentos os materiais que estiveram em contato com o micro-organismo foram esterilizados antes de serem descartados. A primeira parte do trabalho está representada na Figura 9.

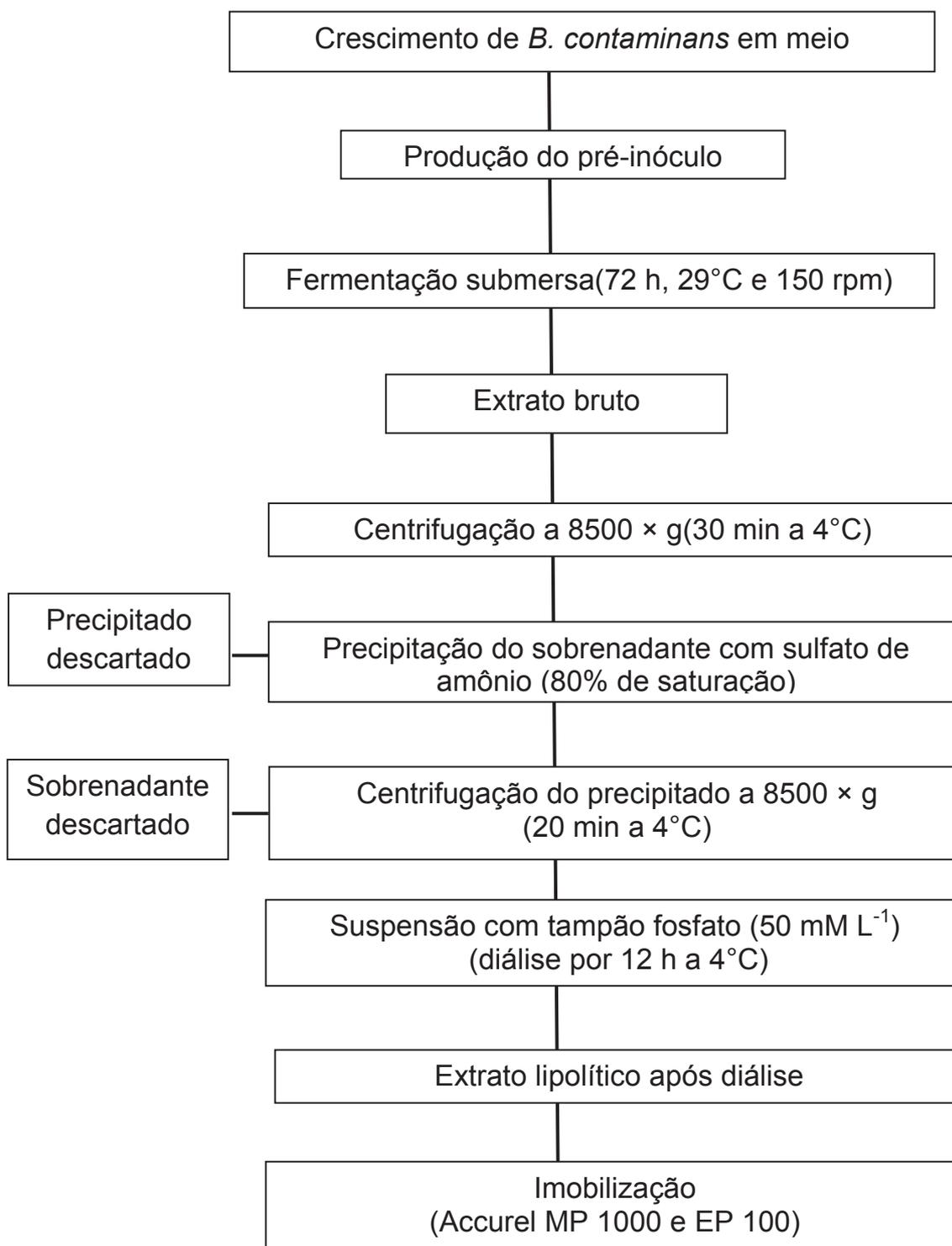


FIGURA 9. ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DO EXTRATO LIPOLÍTICO DE *Burkholderia contaminans* POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

#### 4.2.1 Cultivo da cepa e produção do pré-inóculo

Um microtubo contendo 1 mL da bactéria *B. contaminans* (estoque) foi vertido em placa contendo meio sólido LA estéril [meio LB com 1,5% (m/v) de ágar bacteriológico], que foi incubada em estufa a 29°C por 48 h. Após esse período, um disco, de 8 mm do ágar contendo a bactéria crescida foi recortado e transferido para frascos Erlenmeyer de 125 mL com 30 mL do meio LB, a 29 °C e 200 rpm por 8 h, tempo correspondente ao final da fase exponencial de crescimento. Essa cultura, denominada pré-inóculo, foi utilizada nos processos de fermentação submersa e de fermentação no estado sólido (FERNANDES, 2007).

#### 4.2.2 Produção da lipase por fermentação submersa

Após a produção do pré-inóculo, conforme descrito em 4.2.1, foi inoculado 1 mL dessa solução, correspondendo  $10^8$  células mL<sup>-1</sup>, em Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio nutritivo composto de KNO<sub>3</sub>(3,54 g L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(1,0 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O (0,5 g L<sup>-1</sup>), NaCl (0,38 g L<sup>-1</sup>), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (5 g L<sup>-1</sup>) e 1% (v/v) de óleo de oliva comercial (marca Gallo), previamente autoclavado e resfriado à temperatura ambiente. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 150 rpm por 72 h, quando a atividade lipolítica era máxima (Baron et al 2014). Os cultivos contendo atividade lipolítica foram mantidos a 4 °C por 12 h para melhor decantação das células. Em seguida, o material foi centrifugado a 8500 × g por 30 min para remoção das células, o sedimento precipitado foi descartado e o sobrenadante (extrato bruto), armazenado a 4 °C.

#### 4.2.2.1 Precipitação com sulfato de amônio

O extrato bruto, colocado em banho de gelo e agitação, foi adicionado de sulfato de amônio até 80% de saturação para precipitação e concentração de proteínas, conforme cálculo estipulado pelo Encor Biotechnology INC. Após a adição do sulfato de amônio, o extrato foi mantido a 4 °C por 12 h, com agitação branda, sendo depois centrifugado a 8500 × g por 20 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspenso em um volume mínimo de tampão fosfato 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Essa suspensão foi dialisada por 12 h contra o mesmo tampão a 4 °C, com 2 trocas. A fração dialisada denominada como “extrato lipolítico” (Figura 9), foi analisada quanto à atividade de hidrólise em meio aquoso e posteriormente utilizada nos estudos de imobilização.

#### 4.2.3 Imobilização da lipase produzida por fermentação submersa

A imobilização da lipase produzida por fermentação submersa por adsorção hidrofóbica foi feita de acordo com Baron et al (2014), que utilizaram o polipropileno comercial Accurel EP 100. Entretanto, como a empresa deixou de fornecer o Accurel EP100, foi utilizado um tipo similar do polímero, Accurel MP 1000, que difere do primeiro no tamanho da partícula, na granulometria e na área superficial (Tabela 7).

TABELA 7. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS SUPORTES EMPREGADOS NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia contaminans*

<b>Suporte</b>	<b>Características</b>
*Accurel EP-100	0,9 g cm <sup>3</sup> ; tamanho das partículas 200 – 1000 µm; porosidade das partículas 15 µm.
*Accurel MP-1000	1,9 g cm <sup>3</sup> ; tamanho das partículas > 1500 µm; porosidade das partículas 25 µm.

\*Suporte Accurel (polipropileno em pó)

Para comparação e verificação da reprodutibilidade dos experimentos em relação ao trabalho de Baron et al (2014), os ensaios de imobilização foram feitos inicialmente com os dois tipos de suporte Accurel.

#### 4.2.3.1 Imobilização em Accurel EP-100 e MP-1000

A lipase de *B. contaminans* produzida por FS (4.2.2.) foi imobilizada por adsorção nos suportes Accurel EP-100 e MP-1000, de acordo com Al-Duri e Yong (2000). O suporte foi umedecido com solução aquosa de etanol (50%, v/v) por 30 min, seguido de lavagem e filtração em peneira de 53  $\mu\text{m}$  de abertura. Esse procedimento permite retirar quaisquer impurezas e principalmente o ar contido no interior das partículas. Para a imobilização, foram adicionados em frascos Erlenmeyer de 25 mL 1 g de suporte lavado e 10 mL de solução enzimática (extrato bruto ou extrato lipolítico) com carga de proteína de 25 mg por g de suporte, conforme determinado anteriormente por Baron et al (2014) e Salum et al (2008). Essa mistura foi incubada em agitador orbital por 24 h a 150 rpm, 25 °C e acompanhada a cada 6 h, com monitoramento da atividade de hidrólise do sobrenadante. A mistura foi então filtrada em papel de filtro qualitativo, seca em dessecador a vácuo por 12 h e armazenada a 4 °C.

#### 4.2.3.2 Cinética de imobilização

A cinética de imobilização foi seguida durante 48 h. Foram retiradas alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante a fim de verificar a atividade de hidrólise, pelo método titulométrico (4.4.2) e a concentração residual de proteínas, pelo método colorimétrico de Bradford, (4.4.6.). A partir desses resultados, foram determinados os valores de eficiência da imobilização (E) e retenção da atividade (R), calculados a partir das Equações 1 e 2, respectivamente (YADAV e JADHAV, 2005):

$$E = \frac{(A_{ti} - A_{tf}) \cdot 100}{A_{ti}} \quad (1)$$

$$R = \frac{A_o \cdot 100}{A_t} \quad (2)$$

Onde:  $A_{ti}$  - Atividade inicial total de hidrólise em meio aquoso, antes da imobilização ( $\text{U mL}^{-1}$ );  $A_{tf}$  - atividade final total de hidrólise em meio aquoso do

sobrenadante, após a imobilização ( $U\ mL^{-1}$ );  $A_o$  - atividade de hidrólise em meio orgânico observada, do imobilizado ( $U\ g^{-1}$  do suporte),  $A_t$  - atividade teórica do imobilizado ( $U\ g^{-1}$  do suporte).

No cálculo da eficiência de imobilização (E), foi considerada a atividade de hidrólise, em meio aquoso, inicial e final do sobrenadante da imobilização. Os cálculos de retenção de atividade (R) foram feitos a partir da atividade de hidrólise em meio orgânico da enzima imobilizada.

#### 4.2.3.3 Imobilização da lipase durante o cultivo

Esse método de imobilização (SPIL, *Simultaneous production and immobilization of lipases*) foi proposto por Baronet al (2011) com a finalidade de diminuir etapas do processo em relação aos processos convencionais de imobilização.

Para tanto, cultivos foram iniciados conforme descrito em 4.2.2, em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 150 mL de meio. Após 16 h de cultivo, foram adicionados 3 g de Accurel MP 1000 (preparado previamente). Esta quantidade de suporte foi escolhida com base na saturação do suporte, calculados em experimentos prévios de Baron et al (2011). Adicionou-se o suporte após 16 h de cultivo, fixou-se a concentração de suporte em  $20\ g\ L^{-1}$  e a concentração de óleo de oliva em 1,0 % (v/v), sendo a fermentação acompanhada até 72 h (ponto máximo de produção da enzima). A atividade de hidrólise e o teor de proteína foram acompanhados e comparados com o método convencional de imobilização (4.2.3.1).

#### 4.2.4 Produção da lipase por fermentação no estado sólido

Foram utilizados como substratos o bagaço de cana e óleo de soja. Para preparar os substratos, com base nos estudos prévios de Salum et al (2010) e Fernandes et al (2007), o bagaço de cana foi lavado três vezes, seco em estufa a  $60^\circ C$  por 24 h e tamisado para obtenção de partículas com granulometria entre 0,85 e 2,36 mm.

Em procedimento padrão, as fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL, que continham 10 g (base seca) do bagaço de cana, 30 mL de emulsão composta por 2 g de óleo de soja (20% m/m) e 30 mL de solução nutriente (conforme metodologia estabelecida por Fernandes et al 2007) composta por: ureia ( $4,0 \text{ g L}^{-1}$ ), lactose ( $5,0 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $5,0 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$  ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e solução de oligoelementos ( $4 \text{ mL L}^{-1}$ ) e pH 7,0, para atingir 75% de umidade (fração mássica, base úmida). A solução de oligoelementos tinha a seguinte composição:  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ );  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $2,8 \text{ g L}^{-1}$ );  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $1,5 \text{ g L}^{-1}$ );  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0,2 \text{ g L}^{-1}$ );  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,3 \text{ g L}^{-1}$ ). A fim de dissolver os componentes, o pH da solução de oligoelementos foi ajustado para 4,0 com solução de HCl a 10% (v/v).

O teor de umidade foi aferido em balança de infravermelho, conforme descrito em 4.4.1. Os frascos que continham os substratos úmidos foram tampados e autoclavados, resfriados e inoculados com 2 mL de pré-inóculo já descrito em 4.3.1. Após a inoculação, os frascos foram incubados em estufa bacteriológica a  $29^\circ\text{C}$  por 72 h (SALUM et al 2010). Após o período de fermentação, o sólido fermentado foi seco em fluxo de ar, conforme proposto por Soares et al (2013) (4.2.4.1) até atingir 10% de umidade. O sólido fermentado seco (SFBC) foi colocado em sacos plásticos e armazenado a  $4^\circ\text{C}$  para utilização como catalisador em todo o trabalho (Figura 10).

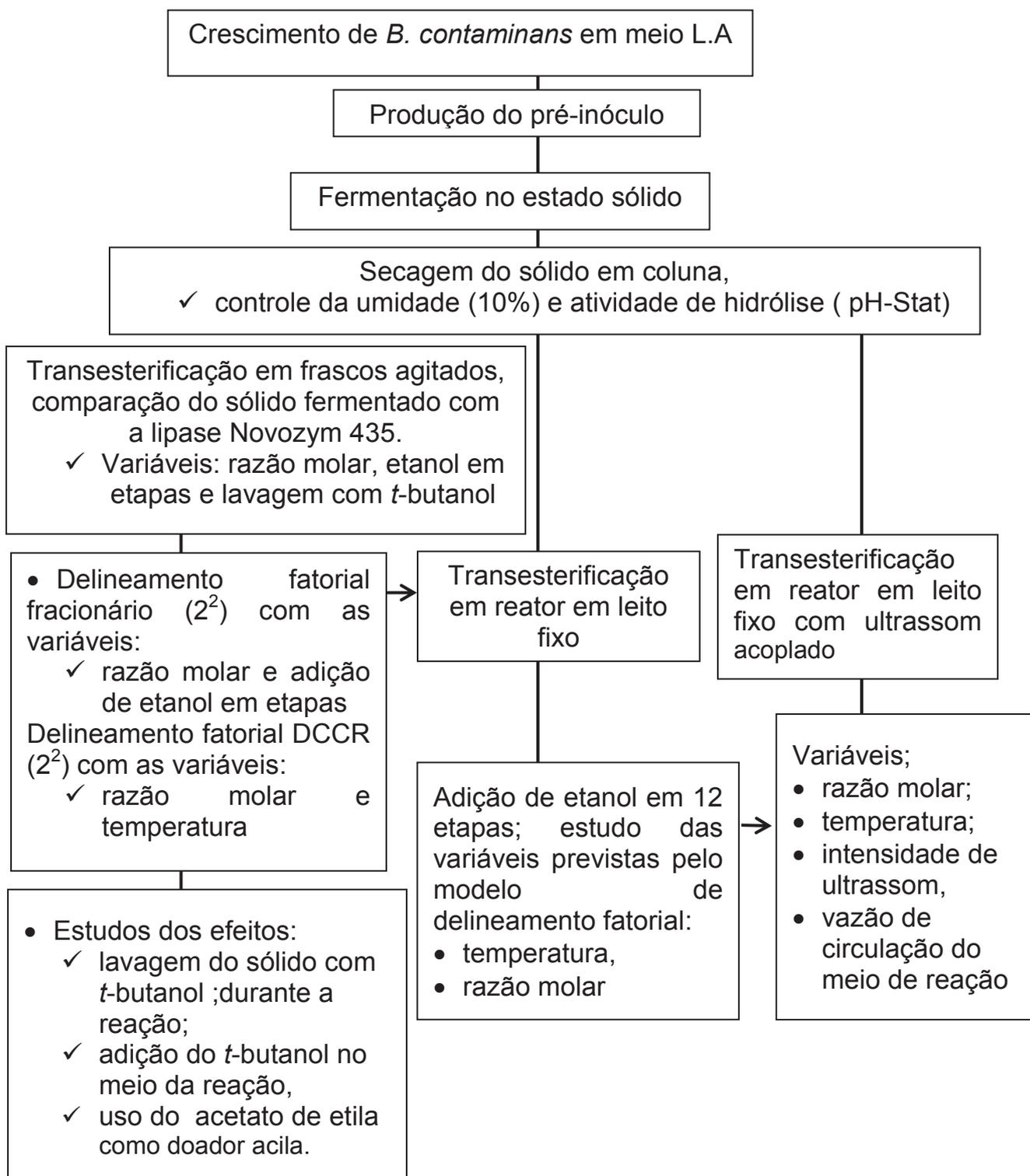


FIGURA 10. ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Burkholderia contaminans* E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DO BODIESEL

#### 4.2.4.1 Secagem do sólido fermentado

A secagem do SF ocorreu conforme metodologia proposta por Soares et al (2013). O equipamento (Figura 11) consistiu em um sistema fechado, com dois tubos de cloreto de polivinila (PVC), conectados. As medidas dos tubos eram de 4,3 cm de diâmetro, 50 cm de altura e volume de 726 mL.



FIGURA 11. SISTEMA DE SECAGEM DO SÓLIDO FERMENTADO EM COLUNA COM FLUXO DE AR SECO

(1) Entrada do cilindro de ar, com fluxo de  $20 \text{ L min}^{-1}$ ; (2) tubo preenchido com sílica ativada; (3) tubo superior preenchido com cerca de 200 g do SFBC úmido. (4) saída do ar em Erlenmeyer com solução de hipoclorito 10% (v/v).

A secagem ocorria de forma ascendente, onde o tubo inferior era conectado por uma mangueira ao cilindro de ar, com fluxo de  $20 \text{ L min}^{-1}$ , e este tubo era preenchido com sílica ativada para a desumidificação do ar. O tubo superior era preenchido com cerca de 200 g do SFBC úmido. No topo dessa coluna foi conectada uma mangueira para a saída do ar, que era borbulhado em Erlenmeyer com solução de hipoclorito 10% (v/v). Durante a secagem, o ar previamente seco que saía da coluna inferior passava pelo sólido fermentado

na coluna superior. A troca da sílica ativada era feita conforme a mudança da coloração, que indicava excesso de umidade. Durante toda a secagem era feito o acompanhamento da umidade, em intervalos de 1 h, em balança de infravermelho, até o SFBC atingir cerca de 10% de umidade.

#### 4.2.4.2 Estabilidade do sólido fermentado

Com o objetivo de utilizar um único lote de SFBC, os lotes produzidos ao longo das fermentações foram misturados para formar 1 kg, que foi armazenado em sacos plásticos e mantido a  $-4^{\circ}\text{C}$ . O lote produzido apresentou atividade de hidrólise de  $160 \text{ U g}^{-1}$ , atividade de esterificação contra trioleína de  $7 \text{ U g}^{-1}$  com 10% de umidade.

A estabilidade do SF foi acompanhada durante 12 meses pela determinação da atividade de esterificação (4.4.4).

### 4.3 Estudos de transesterificação do óleo de mamona

#### 4.3.1 Caracterização do óleo de mamona

O óleo de mamona foi caracterizado pelo fabricante e classificado como óleo industrial número 1 (Padrão) devido à sua pureza, por ser límpido e brilhante com no máximo 1% de acidez. Conforme o laudo técnico do fabricante, o óleo utilizado estava dentro dos padrões de caracterização físico-químicos para óleos, gorduras e misturas determinado pela *American Oil Chemists' Society* (AOCS). Os resultados das análises físico-químicas feitas pelo laboratório da empresa Farmanil Química, estão apresentados na Tabela 8 e estão dentro dos limites especificados pelo fabricante.

TABELA 8. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE MAMONA COMERCIAL

ANÁLISE	Unidades	ESPECIFICAÇÃO <sup>1</sup>	Laudo técnico <sup>1</sup>
<b>Viscosidade BROOKFIELD (25 °C)</b>	Pa·s <sup>-1</sup>	630-890	643
<b>Densidade (26 °C)</b>	g cm <sup>3</sup>	0,95 a 0, 96	0,95
<b>Acidez em ácido oleico</b>	%	MAX 1	0,9
<b>Umidade</b>	ppm	MAX 375	253
<b>Índice de iodo</b>	g I <sub>2</sub> g <sup>-1</sup>	81 a 88	87
<b>Índice de saponificação</b>	mg NaOH g <sup>-1</sup>	MIN 175	181
<b>Índice de hidroxila</b>	mg NaOH g <sup>-1</sup>	MIN 155	165

<sup>1</sup>Fonte: Laudo técnico fornecido pela Farmanil Quima, (2016)

#### 4.3.2 Ensaios de transesterificação do óleo de mamona em frascos agitados

##### 4.3.2.1 Transesterificação com a lipase de *Burkholderia contaminans* imobilizada no suporte Accurel

As reações de transesterificação com a lipase imobilizada ocorreram em frascos Erlenmeyer de 25 mL, contendo 10 g de óleo de mamona (10,78 mmol), 4,78 mL (32,36 mmol) de etanol (RM 3:1) e agitação de 250 rpm, em agitador orbital. Foram retiradas alíquotas de 20  $\mu$ L do meio reacional no decorrer da reação para análise de conversão em éster por cromatografia em fase gasosa (GC).

Foram realizados estudos de otimização da transesterificação do óleo de mamona (20 g) com as variáveis: concentração da enzima (5% e 8%, com atividade de hidrólise em meio orgânico de 34 U g<sup>-1</sup> de suporte) e temperatura (30 °C a 45 °C).

##### 4.3.2.2 Transesterificação com o sólido fermentado de *Burkholderia contaminans*

Os estudos preliminares da reação de transesterificação catalisada pelo SFBC ocorreram em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 g de óleo, 9% (1,8 g, correspondente a 12,6 U totais) de SFBC.

Foram avaliados os efeitos das variáveis RM (3:1 e 6:1) e adição do etanol em 2 e 12 etapas, com agitação orbital de 250 rpm a 45°C. Quando a adição ocorria em duas etapas, a primeira era no início da reação e a segunda após 4 h. No segundo caso, em 12 etapas, um equivalente de etanol era adicionado no início da reação e os demais a cada 30 min, totalizando a adição de todas as etapas em 5 h.

A fim de comparar os resultados obtidos com o SFBC aos obtidos com a lipase comercial, alguns ensaios foram feitos utilizando 5% (1g, correspondente a 343 U totais) da lipase Novozym 435.

#### 4.3.2.3 Efeito da lavagem do biocatalisador após reações de transesterificação

O estudo do efeito da lavagem do sólido fermentado foi feito com o propósito de remover o glicerol adsorvido sobre o biocatalisador. Nesse estudo, a adição do etanol ocorreu em 4 alíquotas de 1,89 mL (correspondente à 1 equivalente), sendo o primeiro equivalente adicionado no início da reação, o segundo após 4h, o terceiro e quarto, após 12 e 16 h. Em 12h a reação era interrompida, o catalisador era removido por filtração com auxílio de bomba a vácuo, lavado por 3 vezes com 15 mL de *t*-butanol. Após a lavagem, o SFBC foi seco em dessecadora vácuo por 12 h. Alipase Novozym 435 foi seca em estufa a 40 °C por 60 min e armazenada em dessecador por 12 h. Após a secagem, os biocatalisadores eram colocados novamente nos frascos de reação e o terceiro equivalente era adicionado (12 h de reação), sendo o último equivalente adicionado após 3 h (16 h de reação). As reações ocorreram a 45 °C, RM 6:1, agitação orbital de 250 rpm, por 96 h. As alíquotas eram retiradas a cada 24 h e analisadas por GC (4.4.7).

#### 4.3.2.4 Planejamento fatorial

Com o objetivo de otimizar o processo de transesterificação em frascos agitados com o SFBC, utilizou-se um delineamento fatorial  $2^2$  com ponto central em triplicata (BRUNS; SCARMINI, 2001). As variáveis independentes estudadas foram RM e etapas de adição de etanol (Tabela 9).

TABELA 9. VARIÁVEIS E NÍVEIS PARA O DELINEAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO COM 2 NÍVEIS E 2 VARIÁVEIS PARA A OTIMIZAÇÃO DA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Burkholderia contaminans*

Experimento	Variáveis independentes			
	Razão Molar	Nível	Etapas de adição do etanol	Nível
1	6:1	(+1)	12	(+1)
2	3:1	(-1)	12	(+1)
3	6:1	(+1)	4	(-1)
4	3:1	(-1)	4	(-1)
5	4,5:1	(0)	8	(0)
6	4,5:1	(0)	8	(0)
7	4,5:1	(0)	8	(0)

Após a seleção das variáveis com influência sobre as respostas, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) (RODRIGUES; LEMMA, 2009), para avaliar a influência conjunta das variáveis (1) RM e (2) temperatura. No delineamento, foi utilizado um planejamento  $2^2$  com adição de 2 pontos axiais (+1,41 e -1,41) e 3 pontos centrais (0), totalizando 11 experimentos. Para as reações do delineamento DCCR, foram utilizados 1,8 g do SFBC (base seca), que corresponde a 12,6 U totais de atividade de esterificação, nas condições definidas no planejamento (Tabela 10), em cada frasco Erlenmeyer de 50 mL.

Os resultados foram analisados pelo *software Statística* (versão 10), onde os efeitos das variáveis e os respectivos erros foram calculados a um limite de confiança de 95%. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o cálculo dos valores de F do teste de Fischer para a avaliação da significância do modelo. As curvas de contorno e as superfícies de resposta foram obtidas para a definição das faixas ótimas de cada variável.

TABELA 10. VARIÁVEIS E NÍVEIS DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) COM 2 NÍVEIS E 2 VARIÁVEIS PARA A OTIMIZAÇÃO DA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Burkholderia contaminans*

Experimento	Variáveis independentes			
	Razão Molar	Nível	Temperatura, °C	Nível
1	6:1	-1	40	-1
2	6:1	-1	50	1
3	12:1	1	40	-1
4	12:1	1	50	1
5	5:1	-1,41	45	0
6	13:1	1,41	45	0
7	9:1	0	38	-1,41
8	9:1	0	52	1,41
9	9:1	0	45	0
10	9:1	0	45	0
11	9:1	0	45	0

#### 4.3.3 Estudos de transesterificação etílica do óleo de mamona em reator de leito fixo utilizando o sólido fermentado

As reações com o SFBC foram realizadas em uma coluna de 2,7 cm de diâmetro interno e 21 cm de altura com recirculação de água (Figura 12). A coluna foi preenchida com 12 g de SFBC (base seca) com 84 U totais de atividade de esterificação, que foram colocados na coluna através de um funil, e então levemente prensados com o auxílio de um bastão de vidro (Figura 12).

O reservatório foi abastecido com 100 g de óleo de mamona e 19 mL ou 38 mL de etanol, conforme a RM utilizada (3:1 ou 6:1). Para os ensaios preliminares, a temperatura (45 °C) foi mantida constante e a mistura foi mantida no reservatório sem agitação. Essa mistura foi continuamente recirculada, conforme mencionado anteriormente. Foram testados os efeitos da RM (3:1 e 6:1) e da adição do etanol em etapas (1-12 etapas) na conversão em éster.



FIGURA12. REATOR DE LEITO FIXO UTILIZADO NATRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELOSÓLIDO FERMENTADO CONTENDO A LIPASE DE *Burkholderia contaminans*

Fonte: A autora

#### 4.3.3.1 Estudo do efeito do ultrassom acoplado ao reator de leito fixo

As reações de transesterificação em leito fixo com sistema de ultrassom acoplado foram feitas com o mesmo reator descrito em 4.3.3. A sonda de ultrassom foi acoplada em um reservatório encamisado com conexões para a coluna e bomba peristáltica (Figura 13).

O meio reacional era composto de 100 g óleo e etanol (RM 3:1 e 6:1, correspondentes a 19 mL e 38 mL de etanol). O primeiro contato do meio reacional era com o SFBC dentro do reator de vidro, de forma ascendente. Em seguida, o reservatório (Figura 13) era preenchido (1) até entrar em contato com o ultrassom (2) e o meio era recirculado novamente pela bomba peristáltica (3).

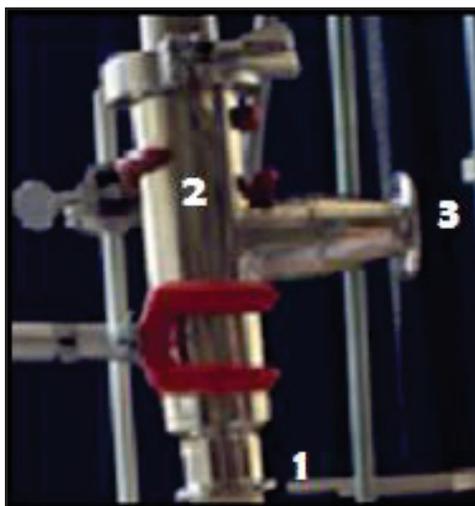


FIGURA 13. VASO REACIONAL COM CONEXÕES ENTRE O REATOR DE VIDRO, A SONDA DE ULTRASSOM E A BOMBA PERISTÁLTICA

(1) Entrada do vaso, por onde o meio de reação, após entrar em contato com o SFBC, entra ascendente em contato com o ultrassom; (2) ultrassom acoplado ao vaso, ocorre o contato do meio de reação com o ultrassom; (3) saída do vaso, o meio de reação volta a ser bombeado, seguindo o mesmo ciclo.

Fonte: A autora

O ultrassom utilizado nesse trabalho era composto por uma sonda conectada com o reator (Figura 13) com frequência de 20 KHz e potência de 500 W, com intensidade variada de 0% a 100%.

As variáveis estudadas foram: variação da amplitude da potência (500 W) do ultrassom (0% - 100%) (1) temperatura (40 °C e 50 °C), (2) vazão de recirculação de 1,45 e 7,45 mL min<sup>-1</sup> e (3) RM (etanol:óleo) 3:1 e 6:1, correspondentes a 14,90 g (19 mL) e 29,81 g (38 mL) de etanol, respectivamente. A adição do etanol ocorreu em 12 etapas com intervalo de 30 min, com base em estudos prévios de planejamento fatorial obtidos em frascos agitados. Foram retiradas alíquotas a cada 24 h durante 96 h para análise por GC.

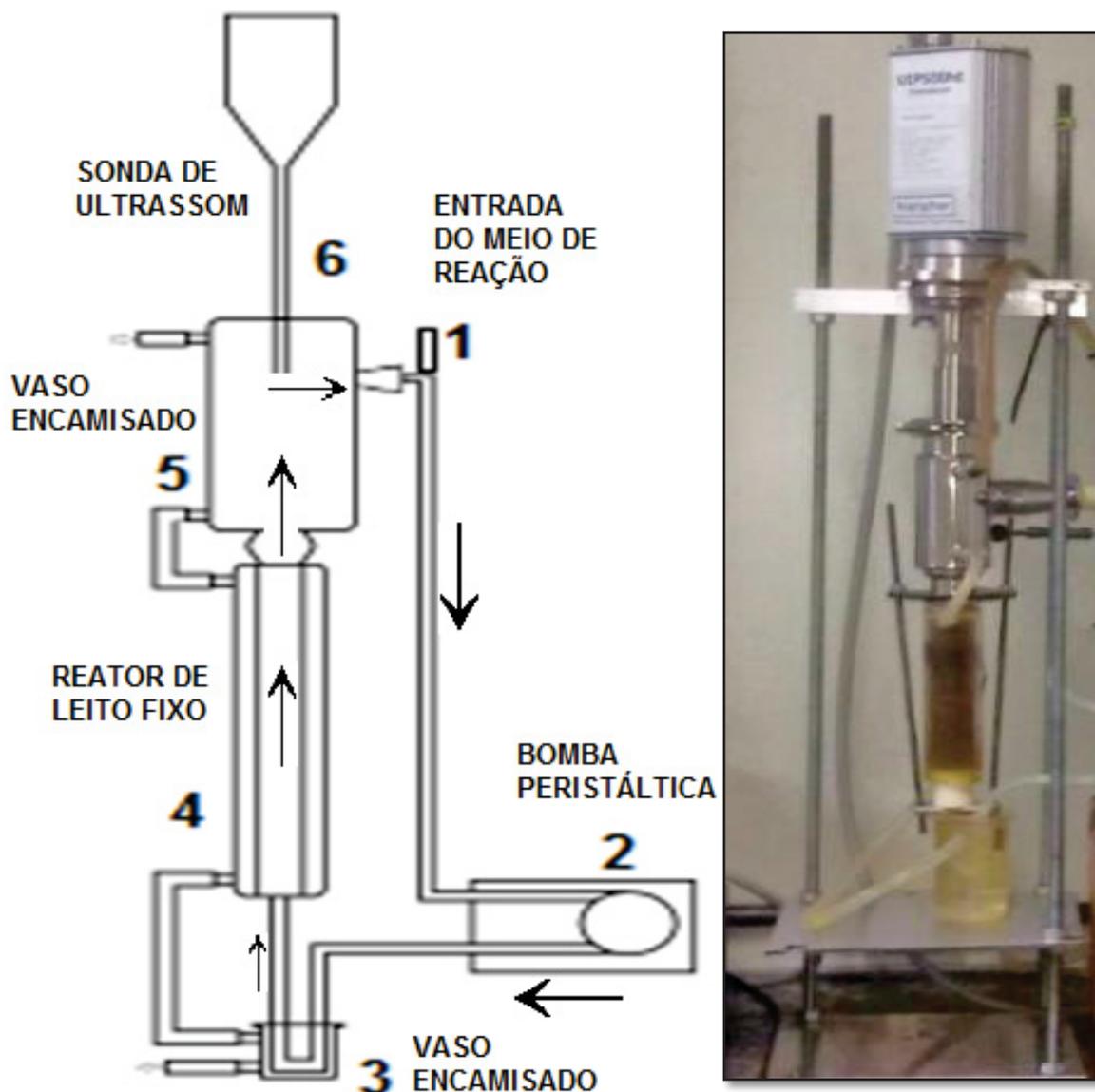


FIGURA 14. REATOR DE LEITO FIXO PREENCHIDO COM O SÓLIDO FERMENTADO E COM SONDA DE ULTRASSOM ACOPLADA

(1) Entrada do meio de reação e etanol e retirada de amostra; (2) Bomba peristáltica; (3) vaso encamisado; (4) reator de vidro com o sólido fermentado empacotado e encamisado; (5) vaso encamisado, entrada do ultrassom (superior), meio reacional (inferior) saída do meio reacional e (6) sonda de ultrassom em contato com o meio de reação.

Fonte: A autora

## 4.4 Métodos analíticos

### 4.4.1 Determinação da umidade dos substratos sólidos

O teor de umidade dos substratos sólidos foi determinado em balança de infravermelho (Gehaka IV 2000, São Paulo, Brasil). Para este ensaio, foi adicionado 1 g de amostra na balança, que foi programada com temperatura de 105 °C, em modo de auto-secagem até variação da umidade menor do que 0,05% (m/m).

### 4.4.2 Dosagem de atividade enzimática

Três tipos de atividade enzimática foram determinados nos preparados enzimáticos ao longo deste trabalho: (1) atividade de hidrólise em meio aquoso, por método titulométrico em titulador automático do tipo pH-Stat; (2) atividade de hidrólise em meio orgânico, pela determinação do teor de ácidos graxos livres da hidrólise da trioleína pelo método de Lowry e Tinsley (1976) e (3) atividade de esterificação, determinada através da reação de síntese do oleato de etila. Os métodos estão descritos a seguir.

A dosagem de atividade lipolítica de hidrólise foi feita pelo método titulométrico, conforme metodologia proposta por Stuer, Jaeger e Winkler (1986), com modificações. As emulsões empregadas nos ensaios foram preparadas com água destilada e adição de Tris-HCl (2,5 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0), CaCl<sub>2</sub> (2 mmol L<sup>-1</sup>), NaCl (150 mmol L<sup>-1</sup>), goma arábica (3%, m/v) e 67 mmol L<sup>-1</sup> de azeite de oliva (TISS; CARRIERE; VERGER, 2001). A solução foi emulsionada em um liquidificador Arno Optimix (Arno, São Paulo, Brasil) por 5 min, e por mais 1 min imediatamente antes do uso. Para cada ensaio, 20 mL de emulsão e determinada quantidade de amostra contendo a lipase (massa - base seca ou volume) foram adicionados ao vaso de reação termostatizado a 40 °C com agitação magnética. Os ácidos graxos livres (AGL) liberados pela hidrólise enzimática foram titulados em um titulador automático pH-Stat (Metrohm 718, Herisau, Suíça) durante 5 min, mantendo-se o pH em 7,0 com uma solução de NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup>, o fator de correção foi calculado conforme

Equação 4. A atividade de hidrólise (Ah) foi calculada com a Equação 3 e o fator de correção do NaOH, de acordo com a Equação 4:

$$Ah = \frac{\frac{dV}{dt} \times [NaOH] \times f \times f_{pH}}{Ma} \quad (3)$$

Onde:  $dV/dt$  é a velocidade inicial do consumo de NaOH em mL min<sup>-1</sup>; [NaOH] é a concentração de NaOH em  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ;  $f$  é o fator de correção da solução de NaOH padronizada (adimensional);  $Ma$  é a quantidade de amostra (sólido fermentado -base seca em g<sup>-1</sup> ou  $\mu\text{L}$ ).

$$F_{pH} = \frac{1 + 10^{(pH - pK_a)}}{10^{(pH - pK_a)}} \quad (4)$$

Na Equação 4,  $F_{pH}$  é o fator de correção (adimensional) relacionado à dissociação parcial dos ácidos graxos da trioleína, que possuem um valor de  $pK_a$  de 4,57, 4,89 e 6,8, respectivamente. Para cada substrato,  $F_{pH}$  foi calculado considerando o pH do ensaio (7,0).

A atividade lipolítica foi expressa como unidades de atividade por grama de sólido fermentado [ $\text{U g}^{-1}$  (base seca)] ou  $\text{U mL}^{-1}$  de extrato lipolítico, sendo uma unidade de atividade (U) equivalente à liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por min, nas condições utilizadas no ensaio.

#### 4.4.3 Atividade de hidrólise em meio orgânico

Para a determinação da atividade de hidrólise em meio orgânico, foi seguido o procedimento proposto por Gonçalves (1999), com algumas modificações. Para o ensaio, foram adicionados 5 mL de meio reacional contendo 4,9 mL de *n*-hexano, 70 mmol L<sup>-1</sup> de trioleína e 0,1 mL (2%, v/v) de

água destilada em um Erlenmeyer de 25 mL. A reação foi iniciada com a adição de 20 mg da enzima imobilizada ou de SFBC.

A reação foi realizada sob agitação de 180 rpm, a 40 °C e, em intervalos fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional e analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual através método de Lowry e Tinsley (1976) (4.4.5).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como equivalente à produção de 1 µmol de ácidos graxos por min nas condições do ensaio.

#### 4.4.4 Atividade de esterificação

As reações de síntese do oleato de etila foram realizadas com duas diferentes preparações enzimáticas: com a lipase imobilizada no suporte Accurel (EP 100 e MP 1000), e com SFBC.

O meio reacional continha 210 mmol L<sup>-1</sup> de etanol e 70 mmol L<sup>-1</sup> de ácido oleico, solubilizados em *n*-hexano. Foram utilizados 170 mg de enzima imobilizada em Accurel e 500 a 800 mg de SFBC, com 5 mL e 10 mL de meio reacional, respectivamente, a 40 °C sob agitação de 200 rpm. Alíquotas de 50 µL do meio de reação foram coletadas para determinação da concentração de ácidos graxos livres residuais pelo método colorimétrico de Lowry e Tinsley (1976) (4.4.5).

Cálculos de atividade de esterificação foram realizados com base na velocidade inicial do consumo de AGL, que corresponde ao coeficiente angular da reta da equação ajustada aos pontos iniciais (faixa de linearidade) de um gráfico de concentração de ácido graxo (µmol) em função do tempo (min) (Equação 5):

$$Ae = \frac{dAgl}{dt} \times \frac{1}{Msf} \quad (5)$$

Em que: Ae - Atividade de esterificação, expressa em unidades de atividade por grama de sólido fermentado (base seca)(U g<sup>-1</sup>) ou por grama de enzima imobilizada; dAgl/dt - é a velocidade do consumo de ácidos graxos livres (AGL) em µmol<sup>-1</sup> e Msf - é a quantidade de SFBC em gramas (base seca). Uma

unidade (U) de atividade enzimática de esterificação foi definida como o consumo de 1  $\mu$ mol de ácido graxo por min em meio orgânico, nas condições do ensaio.

#### 4.4.5 Método de Lowry-Tinsley

O método de Lowry e Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor de ácido oleico durante as reações síntese do oleato de etila e de hidrólise da trioleína em meio orgânico, e possibilitar os cálculos das atividades de esterificação e de hidrólise em meio orgânico.

A concentração de ácidos graxos livres no meio foi relacionada à absorvância pela curva de calibração feita com o ácido oleico (pureza 90%), que foi obtida nas mesmas condições do ensaio. Para cada ensaio, foram adicionados 100  $\mu$ L da amostra a ser analisada em microtubos contendo 1,15 mL de tolueno e o reagente de cor (250  $\mu$ L), que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5%) com pH (6,0-6,2) corrigido previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex durante 1 min. A absorvância da fase orgânica, que continha os ésteres, foi lida em espectrofotômetro a 715 nm.

Para a curva de calibração, foram preparadas amostras contendo entre 5 e 160 mmol de ácido oleico, pela dissolução do ácido em balões volumétricos com 10 mL de *n*-hexano. Em seguida, 100  $\mu$ L da solução do ácido foram adicionados ao reagente de Lowry e Tinsley (0,25 mL do reagente acetato cúprico + 1,15 mL de tolueno) formando duas fases que foram misturadas vigorosamente durante 60 s usando um misturador vórtex. A mistura foi centrifugada a 3000  $\times g$  por 10 min, até que a fase aquosa fosse claramente separada da fase orgânica por decantação. A curva de calibração foi determinada a partir da medida da absorvância da solução a 715 nm contra o controle.

#### 4.4.6 Determinação de proteínas

O método proposto por Bradford (1976) foi utilizado para dosagem de proteínas nas amostras provenientes da fermentação submersa. A

concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (BSA).

#### 4.4.7 Cromatografia em fase gasosa

##### 4.4.7.1 Quantificação dos ésteres etílicos

Foram retiradas alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  do meio reacional (contendo os ésteres etílicos) que foram colocadas em estufa a 60  $^{\circ}\text{C}$  por 4 h para a evaporação do etanol. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000  $\times g$  por 15 min a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Em vials de 1 mL foram adicionados 10 mg de amostra e 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de padrão nonadecanoato de metila (C19) em clorofórmio na concentração 10 mg mL<sup>-1</sup>. Foi injetado 1  $\mu\text{L}$  de amostra.

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo em fase gasosa, modelo GC-2010 (Shimadzu Co, Quioto, Japão), equipado com detector de ionização de chama (DIC), e coluna capilar HT5 poliamida-CLAD (5% fenil policarbonato siloxano), comprimento de 30 m x 0,53 mm x 0,50  $\mu\text{m}$ . O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio. A temperatura do injetor foi de 250  $^{\circ}\text{C}$ . O aquecimento da coluna foi programado com temperatura inicial de 150  $^{\circ}\text{C}$  - 330  $^{\circ}\text{C}$  a 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , seguida pela manutenção da temperatura durante 5 min. A temperatura do FID foi de 380 $^{\circ}\text{C}$ .

A identificação dos ésteres foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra com os picos de uma mistura padrão de metil-ésteres Mix FAME 37 e a identificação do ricinoleato de etila foi realizada pelo padrão ricinoleato de metila. O teor de etil-ésteres na amostra (CEE) foi calculado pela Equação 6, conforme norma EN14103(2003):

$$C_{ee} (\%) = \frac{(\sum A_{ee} - A_{pi})}{A_{pi}} \times \frac{C_{Pi} \times V_{pi}}{Ma} \times 100\% (6)$$

Em que:  $C_{ee}$  (%) é a concentração de ésteres etílicos (%);  $\sum A_{ee}$  é o somatório de todas as áreas dos picos dos etil-ésteres;  $A_{pi}$  é a área do pico do padrão interno;  $C_{Pi}$  é a concentração do padrão interno,  $Ma$  é a massa total da amostra.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram divididos em duas partes. Na primeira parte, apresenta-se a imobilização da lipase de *B. contaminans* nos suportes Accurel EP 100 e MP 1000. Em seguida, apresenta-se os resultados de otimização, em frascos agitados, da reação de transesterificação catalisada pela lipase imobilizada em Accurel MP 1000. Na segunda parte, foram feitos estudos comparativos da transesterificação catalisada pelo SFBC e Novozym 435, seguido de estudo de otimização da reação com o SFBC em frascos agitados e em reator de leito fixo, com e sem sistema de ultrassom acoplado.

### 5.1 Caracterização do óleo de mamona

O óleo de mamona foi metilado com  $\text{BF}_3$ - trifluoreto de boro metanólico, de acordo com o método de Metcalfe (1966). Em seguida, foram avaliadas a composição dos ácidos graxos por GC (4.4.7) (Tabela 11).

O ácido graxo majoritário (84%) foi o ácido ricinoleico (ácido 12 - hidróxi-9-cis-octadecenóico), com os demais ácidos graxos correspondendo a menos de 20% (Tabela 11). Esses resultados são comparáveis a outros estudos da literatura em relação a composição dos ácidos graxos (HUANG et al 2015; VENTURA et al 2010; DaCOSTA et al 2010; SAVY, 2001).

TABELA 11. PERFIL EM ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE MAMONA UTILIZADO NESTE TRABALHO

	ÁCIDO GRAXO	%
C16:0	Ácido Palmítico	1
C18:0	Ácido Estearico	1
C18:1	Ácido Oleico	3
C18:2	Ácido Linoleico	5
C18:3	Ácido Linolênico	1
C18:1(9)OH-12	Ácido Ricinoleico	84
C22:0	Ácido Behênico	2
C22:1	Ácido Erúxico	2
	Outros	1

Fonte: A autora

## **5.2 Obtenção do extrato lipolítico contendo a lipase de *Burkholderia contaminans***

Após cultivo por 72 h, o extrato lipolítico apresentou atividade de hidrólise em meio aquoso (4.4.2) de  $32 \text{ U mL}^{-1}$ , que é compatível com os trabalhos anteriores (Baron et al 2014). Após a produção da lipase, o extrato foi concentrado e parcialmente purificado por precipitação com sulfato de amônio [saturação 80% (m/v)] (MILLER, 1988), seguido de diálise (4.2.2.1), obtendo-se rendimento de 83% e fator de purificação 2 (Tabela 12).

A atividade de hidrólise do extrato após precipitação e diálise foi de  $200 \text{ U mL}^{-1}$  e atividade específica de  $154 \text{ U mg}^{-1}$ . Esse extrato foi utilizado nos ensaios de imobilização descritos a seguir. A lipase contida no extrato bruto será denominada, a partir deste ponto do trabalho, como “LipBC”.

TABELA 12. PURIFICAÇÃO DO EXTRATO CONTENDO A LIPASE DE *Burkholderia contaminans*: ETAPA DE PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO PARA A OBTENÇÃO DO EXTRATO LIPOLÍTICO

FRAÇÃO	<sup>1</sup> ATIVIDADE DE HIDRÓLISE (U mL <sup>-1</sup> )	<sup>2</sup> VOLUME (mL)	<sup>3</sup> ATIVIDADE TOTAL (U mL <sup>-1</sup> )	<sup>4</sup> CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA (mg mL <sup>-1</sup> )	<sup>5</sup> PROTEÍNA TOTAL (mg mL <sup>-1</sup> )	<sup>6</sup> ATIVIDADE ESPECÍFICA (U mg <sup>-1</sup> )	<sup>7</sup> FATOR DE PURIFICAÇÃO	<sup>8</sup> (R %)
Extrato lipolítico	32	30	960	0,4	12,0	80	1	100
Precipitado(após diálise)	200	4	800	1,3	5,2	154	2	83
Sobrenadante(após diálise)	6	26	156	0,3	7,8	20	0,2	16

<sup>1</sup>Atividade de hidrólise em meio aquoso; <sup>2</sup>volume utilizado no procedimento de precipitação; <sup>3</sup>Atividade total, em relação ao volume utilizado; <sup>4</sup>concentração de proteína; <sup>5</sup>proteína total, em relação ao volume; <sup>6</sup>atividade específica; <sup>7</sup>Fator de purificação; <sup>8</sup>rendimento de purificação; relação da atividade final contra atividade total inicial do extrato lipolítico.

## 5.2.1 Imobilização da lipase produzida por fermentação submersa

### 5.2.1.1 Comparação da imobilização com Accurel EP 100 e MP 1000

Um dos objetivos deste trabalho foi prosseguir com os estudos de Baron et al (2014) de transesterificação do óleo de mamona com LipBC imobilizada em Accurel EP 100. Como a produção deste suporte foi descontinuada pela empresa fornecedora, ensaios foram feitos para determinar se havia diferença no processo de imobilização e nos preparados enzimáticos obtidos com o novo produto fornecido pela empresa, Accurel MP1000. Conforme a Tabela 7 (4.2.3), estes suportes são diferentes em tamanho de partícula e porosidade ( $0,9 \text{ g cm}^{-3}$  e  $15 \mu\text{m}$  para Accurel EP100 e  $1,9 \text{ g cm}^{-3}$  e  $25 \mu\text{m}$  para Accurel MP 1000).

Avaliou-se inicialmente a eficiência de imobilização e a retenção de atividade de hidrólise em meios aquoso e orgânico (Tabela 13). A carga de proteínas foi de 25 mg por grama de suporte, de acordo com Baron (2011). Apesar de ter-se obtido uma eficiência de imobilização de 100% com ambos os suportes, a maior atividade ( $34 \text{ U g}^{-1}$ ) foi observada para o suporte Accurel MP 1000, provavelmente devido à maior superfície de contato e porosidade 60% maior desse suporte.

TABELA 13. PRINCIPAIS PARÂMETROS DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia contaminans* EM DOIS TIPOS DE ACCUREL

Suporte	Eficiência de imobilização (%)	$\eta$ (%)	Atividade teórica ( $\text{U g}^{-1}$ )	Atividade em meio orgânico ( $\text{U g}^{-1}$ )	R (%)
Accurel EP 100	100	50	18	16	89
Accurel MP 1000	100	50	18	34	189

Eficiência de imobilização (%) - diferença entre a atividade inicial de LipBC e a atividade final no sobrenadante após a imobilização. Rendimento em proteína ( $\eta$  %) - diferença entre concentração de proteína inicial e final do sobrenadante após a imobilização. Atividade teórica: calculada com base na proteína adsorvida sobre o suporte. Atividade observada - hidrólise da trioleína em *n*-hexano, a  $30^\circ\text{C}$ , 200 rpm. R - retenção de atividade (%) - relação entre a atividade teórica, e a atividade em meio orgânico da enzima imobilizada.

A retenção da atividade (R) de 189% para Accurel MP 1000 indica que LipBC sofreu ativação durante o processo de imobilização, o que não ocorreu quando se utilizou Accurel EP 100. Com base nesses resultados, comprovou-se que a imobilização de LipBC poderia ser feita com vantagem no Accurel MP 1000. Com este suporte foram refeitos estudos de cinética de imobilização com diferentes cargas de

proteínas para determinação da saturação do suporte e do tempo necessário para imobilização.

### 5.2.2 Efeito da carga de proteína no suporte Accurel MP 1000

A partir do extrato lipolítico precipitado com atividade de hidrólise de  $200\text{U mL}^{-1}$  e concentração de proteína equivalente a  $1,3\text{ mg mL}^{-1}$  (Tabela 11), foram estudadas várias cargas de proteína por grama de suporte a fim de determinar a melhor concentração para dar continuidade aos demais experimentos (Figura 15).

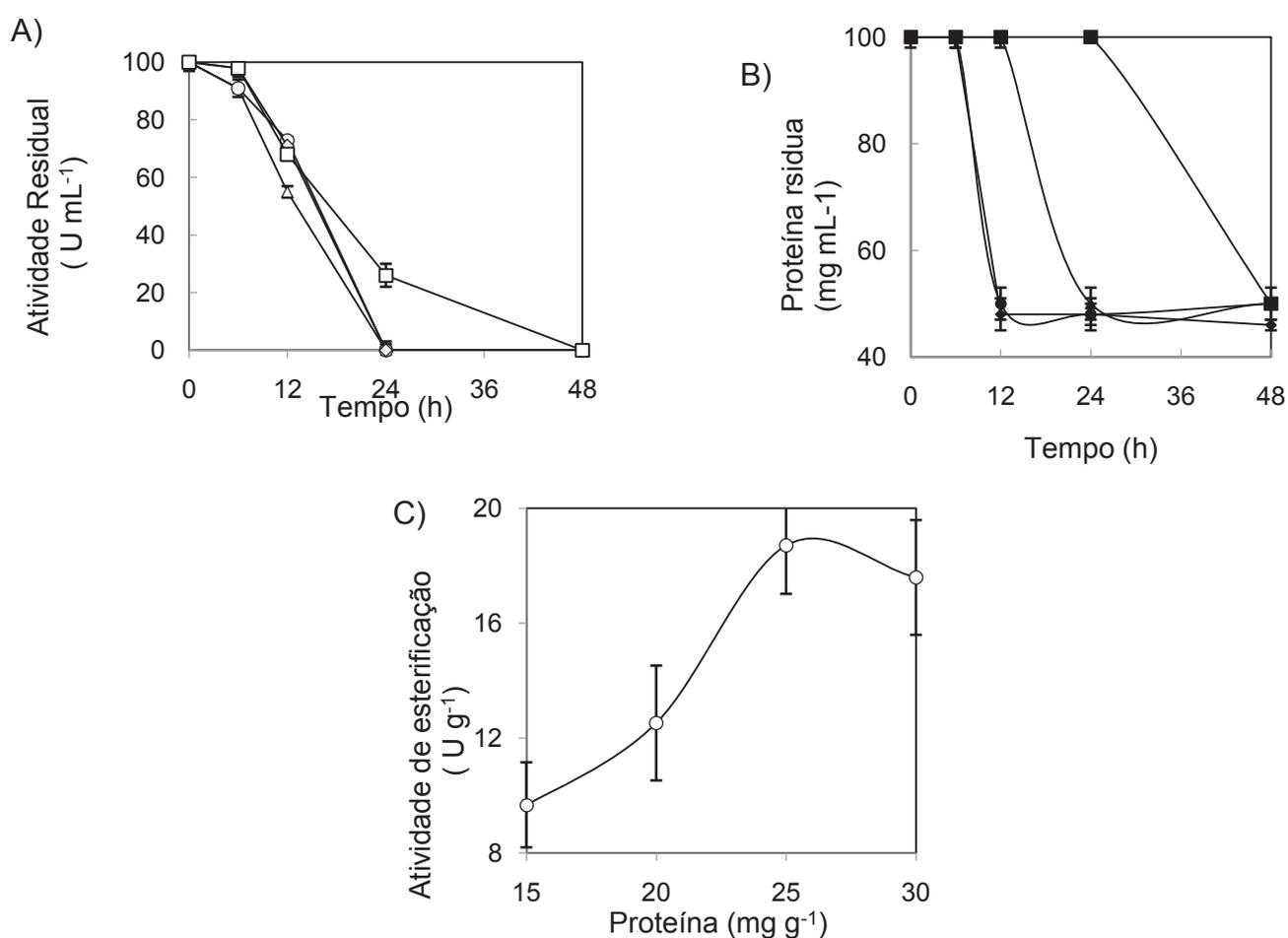


FIGURA 15. CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Burkholderia contaminans* NO SUPORTE ACCUREL MP 1000

A) Atividade residual; (Δ) 15 mg; (◐) 20 mg; (◑) 25 mg e (◒) 30 mg; B) Concentração de proteínas no sobrenadante do extrato bruto durante a imobilização (▲) 15 mg; (●) 20 mg; (▲) 25 mg e (■) 30 mg e C) Atividade de esterificação. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

Observou-se que, após 24 h de imobilização, já não havia atividade de hidrólise no sobrenadante (Figura 15 A) para as concentrações de 15, 20 e 25 mg e que a concentração de proteína (Figura 15 B) diminuiu em 50%. Isto sugere que a imobilização foi seletiva para lipase.

O mesmo resultado foi observado com a concentração de 30 mg, mas em 48 h, indicando que a saturação do suporte ocorre com a carga de 25 mg g<sup>-1</sup> de suporte. Para confirmar estes resultados, as atividades de esterificação dos preparados imobilizados foram determinadas. Para tanto, estes foram removidos do meio por filtração e secos em dessecador por 12 h. A atividade mais alta (19 U g<sup>-1</sup>) foi obtida com a carga de 25 mg g<sup>-1</sup> em 24 h (Figura 15 C), que foi utilizada nos ensaios subsequentes.

### **5.3 Obtenção do sólido fermentado contendo a lipase de *Burkholderia contaminans***

Os lotes de sólido fermentado de *B. contaminans* (SFBC) produzidos nas condições já otimizadas por Galeano et al (2017) e Soares et al (2014) foram produzidos e misturados para formação de um único lote, que foi armazenado a 4 °C e utilizado nos experimentos deste trabalho. Após secagem, a mistura de sólidos fermentados apresentou 10% de umidade, com atividade de hidrólise de 160 U g<sup>-1</sup> e 7,0 U g<sup>-1</sup> de atividade de esterificação. Esses valores são comparáveis a outros trabalhos da literatura (DIAS et al 2017; GALEANO et al 2017; SOARES et al 2014).

#### **5.3.1 Estabilidade do sólido fermentado durante o armazenamento**

A reprodutibilidade dos lotes e a estabilidade do sólido fermentado são parâmetros importantes que devem ser considerados, pois estão relacionados com o custo do processo e a qualidade do biocatalisador. No presente estudo, foi observada elevada estabilidade ao armazenamento a 4 °C (Figura 16), com a atividade mantida em 7,0 U g<sup>-1</sup> durante 12 meses, como relatado por Dias (2015) e Soares et al (2013), o que garante a esse sólido fermentado potencial aplicação industrial.

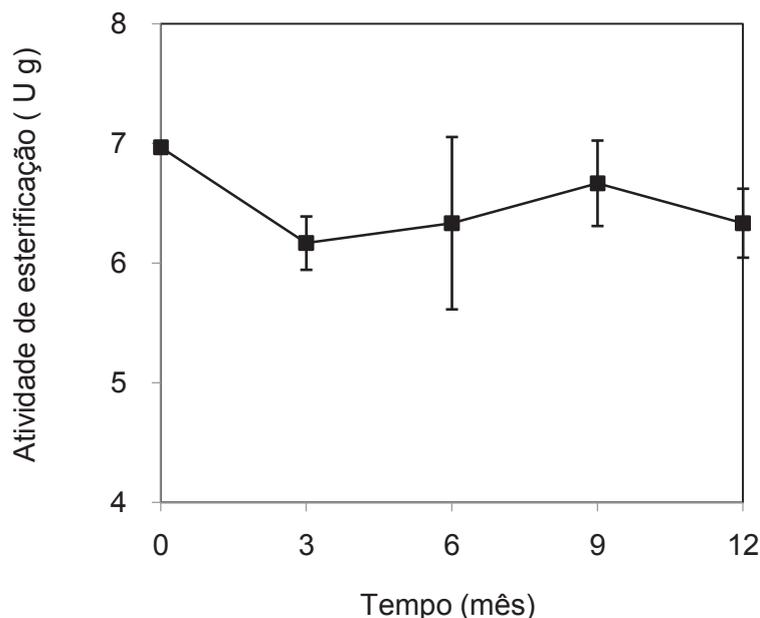


FIGURA 16. ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans* DURANTE O ARMAZENAMENTO A 4 °C.

Condições da atividade de esterificação: 800 mg de SFBC, 10 mL de meio reacional (210 mmol L<sup>-1</sup> de etanol 70 mmol L<sup>-1</sup> de ácido oleico em *n*-hexano), 45 °C e 250 rpm. Os valores apresentados são as médias em triplicata ± o erro padrão da média.

#### 5.4 Produção de ésteres etílicos de óleo de mamona em frascos agitados utilizando a lipase imobilizada em Accurel MP 1000 e o sólido fermentado de *Burkholderia contaminans*

O objetivo dessa etapa do trabalho foi determinar as melhores condições experimentais utilizando os diferentes preparados enzimáticos, a fim de obter o máximo valor de conversão em ésteres.

##### 5.4.1 Transesterificação em frascos agitados com a lipase de *Burkholderia contaminans* imobilizada em Accurel MP 1000

Os estudos de otimização em frascos agitados foram iniciados com a variação da concentração entre 5% (150 mg) a 8% (250 mg) de enzima em relação à massa de óleo (10 g), o que corresponde a 3 e 5 U totais de atividade de esterificação, respectivamente. Como já era previsto, a velocidade da reação aumentou com o aumento da concentração da lipase imobilizada no meio de reação (Figura 17). No

entanto, após 36 h, não ocorreu diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,005$ ) para as duas concentrações estudadas. Assim sendo, optou-se por padronizar a concentração de 5% de lipase no meio de reação. Os demais estudos de otimização foram acompanhados inicialmente até 96 h, visto que após 48 h a porcentagem em éster continuou aumentando (Figura 17).

Nessa etapa do trabalho foi avaliado o desempenho da lipase imobilizada pelo método de SPIL proposto por Baron et al (2011). A técnica de SPIL (*Simultaneous production and immobilization of liases*) permite reduzir as etapas de preparação da enzima imobilizada. A atividade de esterificação da enzima imobilizada foi de  $11 \text{ U g}^{-1}$ . Esses resultados foram inferiores aos obtidos com a imobilização da forma convencional, após precipitação com sulfato de amônio ( $19 \text{ U g}^{-1}$ ).

Para comparar o rendimento da reação de transesterificação entre as duas metodologias de imobilização, foram realizadas a comparação entre as cinéticas da reação de transesterificação com LipBC imobilizada de forma convencional e pelo método de SPIL (Figura 18).

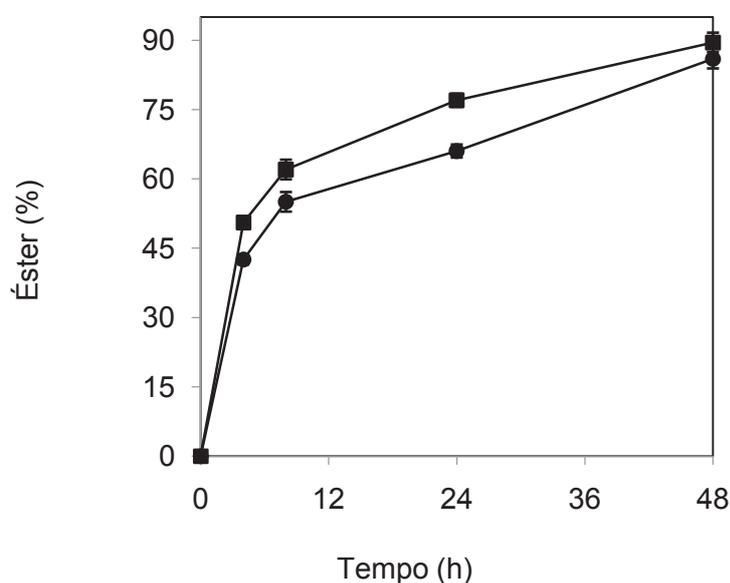


FIGURA 17. EFEITO DA MASSA DE LIPASE DE *Burkholderia contaminans* IMOBILIZADA EM ACCUREL MP 1000 NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA

(●) 150 mg (5%) e (■) 250 mg (8%). Condições da reação:  $45^\circ \text{C}$ , 250 rpm, 10 g de óleo de mamona, RM 3:1, (etanol e óleo) e adição de etanol em 1 etapa. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média ( $p > 0,005$ ), análise estatística teste t.

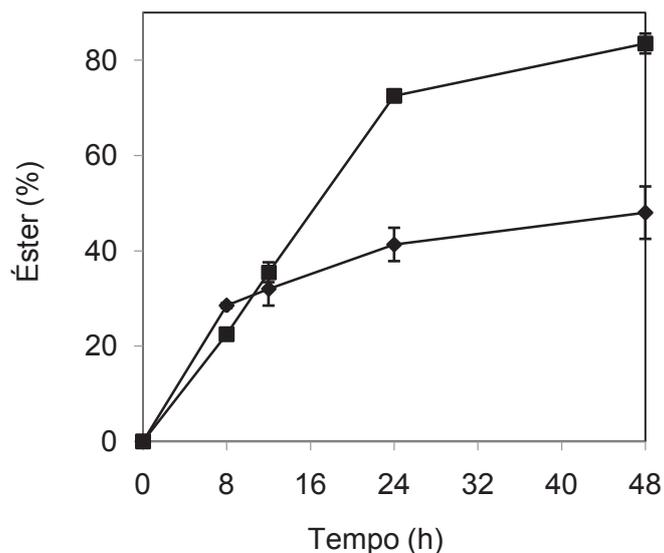


FIGURA 18. CINÉTICA DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELA LIPASE DE *Burkholderia contaminans* IMOBILIZADA EM ACCUREL MP 1000

Imobilização convencional (9,5 U totais) (■); Imobilização por SPIL (5,5 U totais) (◆). Condições da reação: RM 3:1, 45 °C, 250 rpm, 10 g de óleo de mamona 5% de enzima (m/m) em relação a massa de óleo, adição de etanol em 1 etapa. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

Os resultados obtidos nesse trabalho foram inferiores aos relatados por Baron (2011) e Baron et al (2014), que estudaram e compararam a imobilização convencional e por SPIL da lipase de *B. contaminans* imobilizada em Accurel EP 100. Em reação da síntese do oleato de etila, os autores obtiveram 99% de conversão utilizando o método de SPIL e 70% com o método convencional, em 60 min. Neste trabalho, a maior atividade de esterificação e conversão do ácido oleico (92%) foi com o método convencional em relação ao método de SPIL (26%) Figura19).

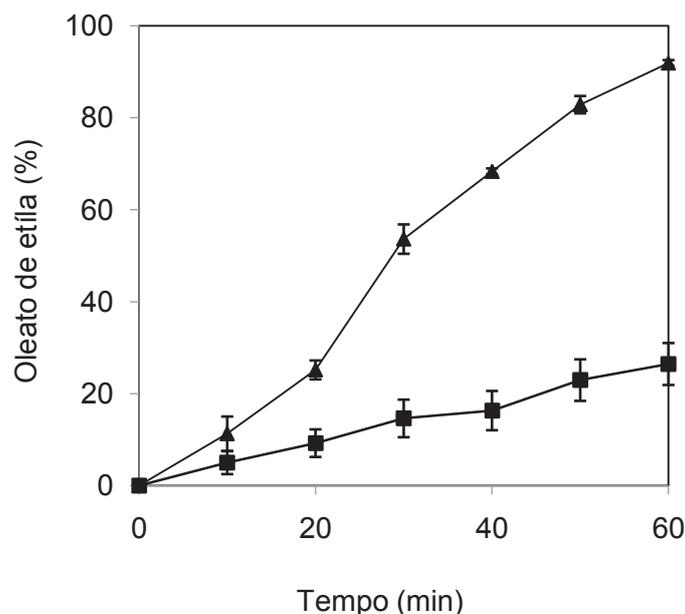


FIGURA 19. CINÉTICA DA SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA, CATALISADA PELA LIPASE DE *Burkholderia contaminans* IMOBILIZADA PELOS MÉTODOS CONVENCIONAL E SPIL

Método convencional (▲) e SPIL (■). Condições da reação: 40 °C, RM (3:1) de etanol ácido oleico, 179 mg de enzima imobilizada.

#### 5.4.2 Transesterificação do óleo de mamona em frascos agitados com o sólido fermentado contendo a lipase de *Burkholderia contaminans*

O objetivo dessa etapa do trabalho foi otimizar o processo de reação de transesterificação etílica do óleo de mamona a fim de obter elevada conversão em éster em curto tempo de reação.

Sólidos fermentados contendo lipases já vêm sendo estudados como catalisadores em reações de esterificação e transesterificação de diversas matérias-primas, como o óleo de palma, soja, ácido graxo de borra de soja e milho (GALEANO et al2017; SOARES et al2013; SALUM et al2010; FERNANDES et al2007). No entanto, a maioria dessas matérias-primas é comestível e, até o momento, existe a falta de estudos sobre a utilização de sólidos fermentados na síntese de ésteres do óleo de mamona.

#### 5.4.2.1 Comparação preliminar entre o sólido fermentado e lipase comercial Novozym 435

As reações foram realizadas, inicialmente, em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 g de óleo de mamona, 1,8 g de SFBC (9%) (12,6 U totais de atividade de esterificação), sendo essa a concentração máxima possível de SFBC dentro dos frascos. Nas mesmas condições experimentais, foi utilizada a lipase Novozym 435 (5%) (348 U totais) como enzima padrão de comparação. Essa lipase apresentou atividade de esterificação de 348 U g<sup>-1</sup>, um valor 49 vezes superior ao obtido com o SFBC (7 U g<sup>-1</sup>), nas mesmas condições de ensaio. Estes resultados indicam que a enzima comercial tem maior desempenho catalítico do que SFBC, como já era previsto. No entanto, para comparar o desempenho do SFBC em reação de síntese de ésteres do óleo de mamona, realizou-se a cinética de reação de transesterificação do óleo de mamona com os dois tipos de lipases (Figura 20).

Os resultados apresentados na Figura 20 mostram que, com a lipase comercial, em 24 h, a conversão foi de 68%, enquanto que para SFBC a conversão foi de 29%.

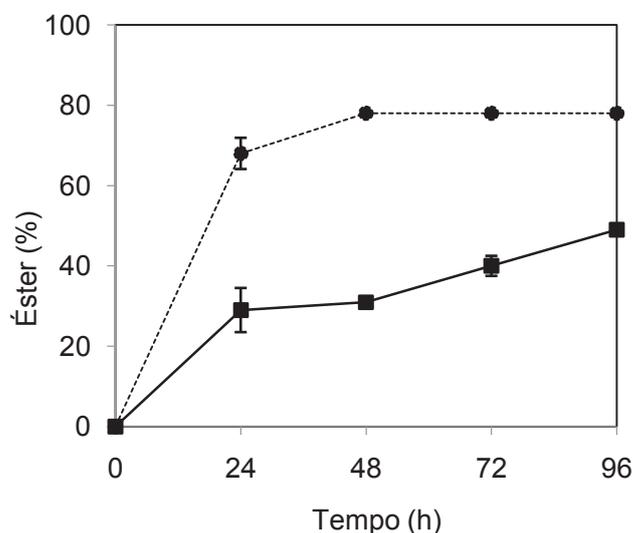


FIGURA 20. COMPARAÇÃO DA CINÉTICA DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO COM A LIPASE DE *Burkholderia contaminans* E PELA LIPASE COMERCIAL NOVOZYM 435

SFBC, 9%, (12 U totais) (■) e Novozym 435, 5%, (348 U totais) (●). Condições da reação: RM (3:1), 20 g de óleo de mamona, 2,98 g de etanol. Adição de etanol em única etapa, 250 rpm e 45 °C. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

Após 96 h, a diferença entre as duas reações foi de 38%, com conversões de 78% para Novozym 435 e 49% para SFBC. Com base nesses resultados, é possível observar que, mesmo com atividade de esterificação de 49 vezes menor que a enzima comercial, e com tempo de reação maior, SFBC pode produzir resultados equivalentes ou próximos aos obtidos com a enzima comercial, uma vez que a reação ainda progride após 96 h. Além disso, deve-se considerar que o processo de produção de lipases, proposto nesse trabalho, causa menores impactos ao meio ambiente, por utilizar matéria-prima de baixo custo, dispensar etapas de purificação da enzima e etapa adicional de imobilização, características que refletem diretamente no tempo de reação e nos custos de produção.

#### 5.4.2.1.1 Efeito da razão molar

São vários os fatores que afetam a velocidade da reação, entre eles, a quantidade de etanol. Na reação de transesterificação, o excesso de etanol favorece a reação em favor da síntese, no entanto, pode ter dois efeitos, de substrato e inibidor (FJERBAEK et al 2009). Alternativas para minimizar problemas de inibição causados pelo álcool têm sido sugeridas, entre elas, o uso de quantidade de etanol inferior ao limite de solubilidade, a adição de álcool em etapas, adição de solventes e água no meio de reação (AL-ZUHAIR 2007). Na Figura 21 está mostrado o efeito do aumento da razão molar para os dois preparados enzimáticos.

Quando foi variada a razão molar, mantendo-se a adição de etanol em uma etapa no início da reação, o rendimento de ésteres etílicos não diminuiu com o aumento da razão molar estudada para SFBC (Figura 21), sendo que as conversões foram superiores para a RM 6:1 ( $p < 0,05$ ), em todos os tempos reacionais. Em 96 h de reação, a conversão máxima obtida foi de 67% para a RM de 6:1. No entanto, com Novozym 435, o aumento da razão molar não favoreceu a reação, pois ocorreu queda em torno de 16%, em média, do rendimento para a RM de 6:1 em todos os tempos reacionais.

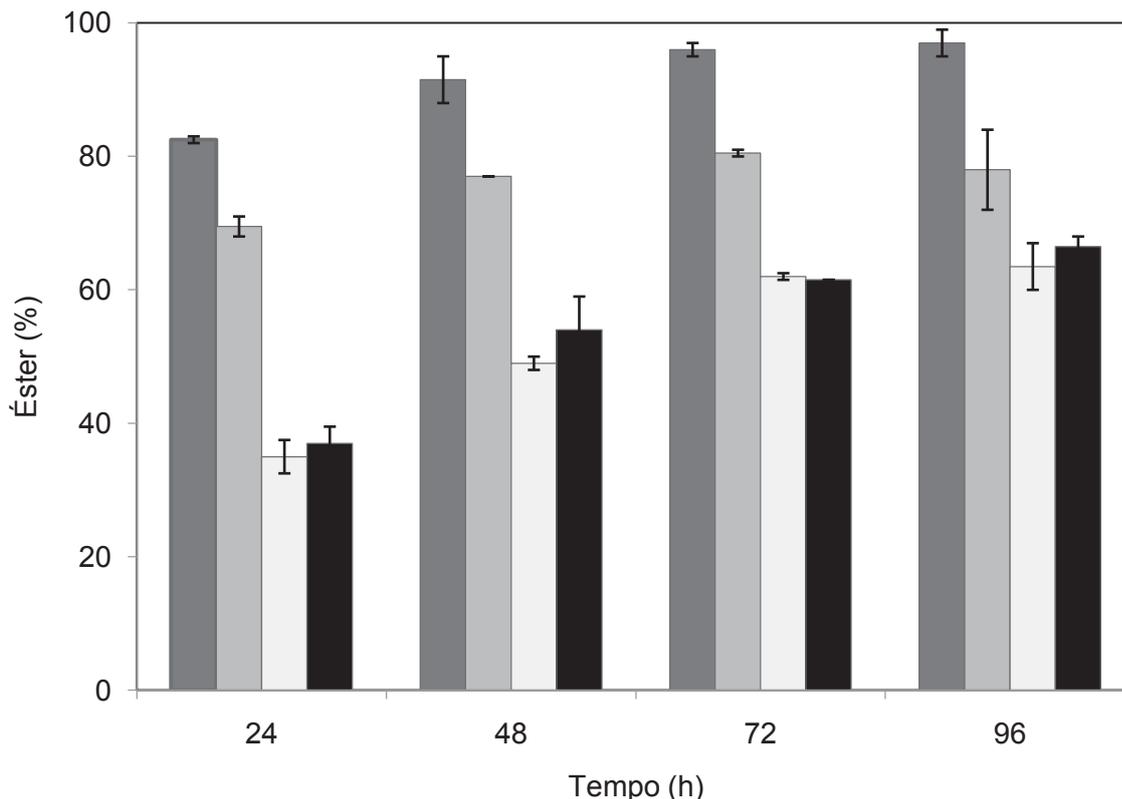


FIGURA 21. EFEITO DA RAZÃO MOLAR NA TRANSESTERIFICAÇÃO ETÍLICA DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans* PELA LIPASE NOVOZYM435

Novozym 435: 3:1 (■) e 6:1 (■); SFBC: 3:1( ) e 6:1(■). Etanol adicionado em única etapa. Condições da reação: 250 rpm, 45°C, 9% (12,6 U totais) de SFBC e 5% ( 343 U totais) de Novozym 435 em relação a massa de óleo. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4.2.1.2 Efeito da adição de etanol em etapas

A adição do etanol em etapas é um procedimento comumente relatado e sugerido na literatura para aumentar o rendimento da reação. No entanto, há poucos relatos sobre adição de etanol em várias etapas em transesterificação do óleo de mamona. A adição em várias etapas permite que o etanol seja consumido aos poucos, tendo como vantagem a diminuição dos efeitos de inibição da atividade da enzima (AL-ZUHAIR, 2007; LU et al 2007).

Neste trabalho, comparou-se a adição de etanol em 2 e 12 etapas, com o objetivo de minimizar o impacto do etanol na atividade da enzima. No primeiro caso, dividiu-se o volume total de etanol em dois, sendo o primeiro adicionado no início da

reação e o outro, após 4 h (129 mmol ou 3,8 mL). No segundo caso, o volume de etanol foi dividido em 12 frações equivalentes (10,77 mmol ou 629  $\mu$ L), sendo a primeira adicionada no início da reação e as demais a cada 30 min.

Os resultados mostraram que a adição de etanol em várias etapas (12) aumenta o rendimento (73% em 96 h com o SFBC e 97% em 72 h com Novozym 435), com aumento de cerca de 20% da conversão em 96 h, para os dois tipos de biocatalisadores (Figura 22).

Este estudo é importante, pois mostra que o etanol causa efeito negativo sobre a atividade da enzima principalmente após 24 h, e que a adição em várias etapas pode proporcionar maiores rendimentos ao longo da reação devido a menor interação do etanol, que fica em excesso no meio de reação. A maioria dos trabalhos menciona o uso de poucas etapas de adição de etanol (1 a 3) com tempos de adição variável.

Shimada et al (1999) relataram que a adição de metanol em etapas diminui a inativação da lipase Novozym 435. Os autores utilizaram a adição de metanol em 3 etapas (início, em 10 h e 24 h de reação) em reação de transesterificação de óleo de soja e obtiveram máxima conversão de 98% em 48 h. Baron et al (2014) estudaram adição de etanol em duas etapas (início e após 3 h) e observaram resultados negativos com a queda da conversão de 98% para 91% em 24 h de reação.

Aguieiras et al (2014) estudaram a transesterificação do óleo de *Acrocomia aculeata* (macaúba), catalisada com sólido fermentado de torta de babaçu com *Rhizomucor miehei* e obtiveram melhores rendimentos (85% em 96 h), com RM 6:1 e adição de etanol em 2 etapas (a cada 24 h).

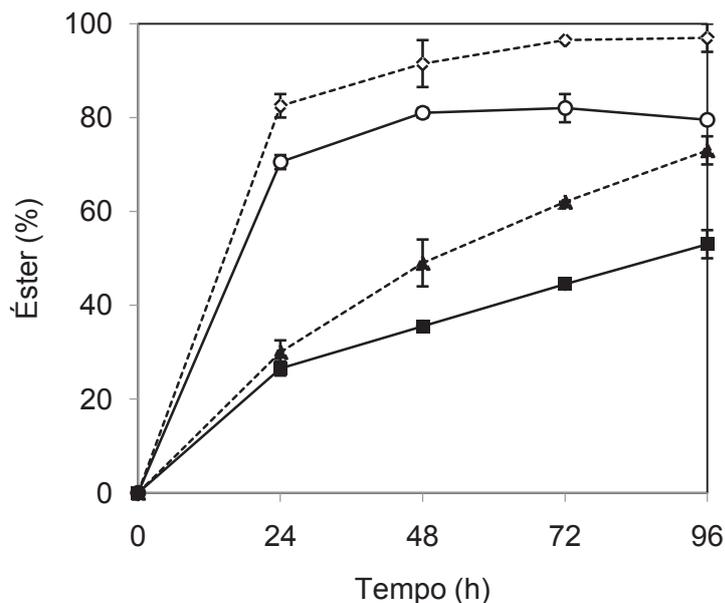


FIGURA 22. EFEITO DA ADIÇÃO DE ETANOL EM ETAPAS NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans* E PELA LIPASE NOVOZYM 435

SFBC(9%), 2 etapas (■) e 12 etapas (▲); Novozym 435(5%), 2 etapas (○) e 12 etapas(◇). Condições da reação: RM 6:1, 45°C e 250 rpm. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

#### 5.4.2.1.3 Efeito da lavagem dos biocatalisadores durante a reação

É relatado em outros estudos que o glicerol produzido durante a reação é adsorvido na enzima imobilizada, deixando o sítio catalítico indisponível e causando a diminuição do rendimento da reação (GALEANO et al 2017; SOARES et al 2013; AZÓCAR et al 2011; SALUM et al 2010). Sendo assim, foi verificado o efeito da lavagem da enzima durante a reação. Considerando a razão molar 6:1, estudou-se o efeito da lavagem da enzima em 12 h de reação.

O etanol foi adicionado em 4 etapas (4.3.2.3), sendo a primeira e a segunda etapa adicionadas no início e após 4 h de reação e as demais em 12 h e 16 h. Quando a reação chegou em 12 h, a enzima foi separada do meio reacional por filtração a vácuo e lavada. A lavagem foi padronizada com três porções de 15 mL de *t*-butanol equivalentes a 8,3 mL por grama de SFBC. Após a lavagem e a secagem do SFBC em estufa, a reação foi retomada com a adição da terceira etapa de etanol, e, após 4 h, foi adicionada a última porção de etanol. Os resultados mostram que a lavagem resultou

em aumento de 17 % de conversão em éster para as duas lipases estudadas (Figura 23).

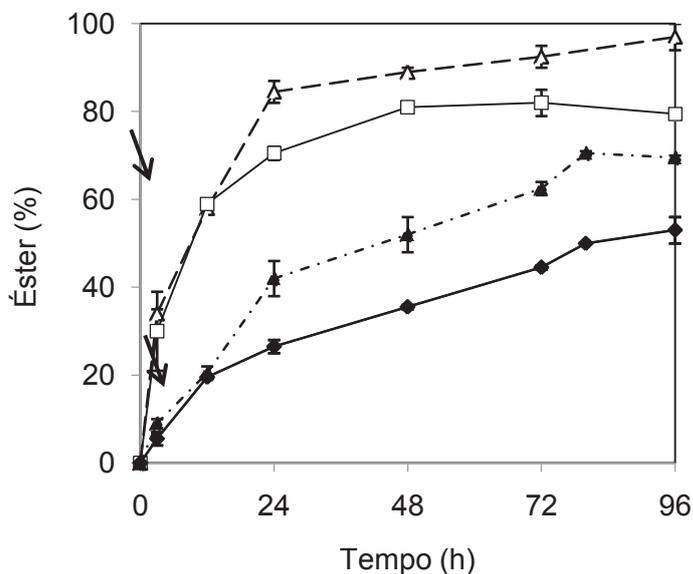


FIGURA 23. EFEITO DA LAVAGEM COM *t*-BUTANOL DURANTE A TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans*E PELA LIPASE Novozym 435

SFBC com lavagem (▲), sem lavagem (◆); Novozym 435, com lavagem (△), sem lavagem (□). Razão molar 6:1. Condições da reação: etanol adicionado em 4 etapas, 250 rpm, 45°C, 5% (Novozym 435) e 9% (SFBC) em relação a massa de óleo. As setas indicam o momento (12 h) em que o etanol foi adicionado após a lavagem. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

A etapa de lavagem pode ser uma alternativa para prolongar o desempenho do SFBC, em comparação com os resultados obtidos com a adição de etanol em 12 etapas. O processo de lavagem é difícil de ser controlado, pois envolve várias etapas (interrupção da reação, lavagem e secagem), e durante o procedimento podem ocorrer pequenas perdas do meio reacional e do biocatalisador. No entanto, esta pode ser uma alternativa nos processos que utilizam reatores de leito fixo. Nesse caso, a lavagem pode ocorrer sem remover SFBC do reator e permitir vários ciclos de reutilização (GALEANO et al 2017).

#### 5.4.2.1.4 Efeito do *t*-butanol como cossolvente no meio de reação

Para solucionar o problema da inativação da enzima pela produção do glicerol durante a reação de transesterificação enzimática, alguns autores estudaram o uso do *t*-butanol (MALEKI et al 2013; DELGADO e PASHOVA et al 2010).

O procedimento de lavagem, citado anteriormente (4.3.2.3), necessita várias etapas e a interrupção da reação pode causar a diminuição do rendimento. Sendo assim, optou-se por utilizar o *t*-butanol como uma alternativa à etapa de lavagem, sendo adicionado diretamente no meio reacional. Esse solvente não é substrato para a lipase, portanto, não interfere na reação e tem a função de deixar o meio reacional mais solúvel, pois solubiliza o álcool e o glicerol evitando sua adsorção sobre a superfície do biocatalisador (AZÓCAR et al 2011; ROYON et al 2007). Foram utilizados 20% (m/m) de *t*-butanol em relação à massa de óleo, com base em estudos prévios de Royon et al (2007).

Para comparar os resultados dos dois preparados enzimáticos, realizou-se a reação em meio livre de solvente, como nos experimentos anteriores, e com a presença do *t*-butanol. O etanol foi adicionado em 4 etapas e o *t*-butanol foi adicionado em única, no início da reação. Houve diferença nas conversões apenas para SFBC, para o qual, em 96 h, obteve-se 61% em meio sem *t*-butanol e 53% com *t*-butanol (Figura 24). Resultados semelhantes foram reportados por Maleki et al (2013), que estudaram a transesterificação metílica dos óleos de palma, soja e mamona, catalisada pela lipase Lipozyme TL IM, com 80% de *t*-butanol no meio de reação. Os autores observaram a diminuição de 30% do rendimento apenas com o óleo de mamona. Segundo OGUNNIYI et al (2006), este óleo tem solubilidade limitada em solventes alifáticos. Mukesh et al (1993) relataram que a utilização de *t*-butanol (um solvente alifático) como doador acila inibe a transesterificação do óleo de mamona catalisada por lipases. Esse fenômeno pode estar relacionado com a hidroxila presente no ácido ricinoleico que interage com o *t*-butanol causando um efeito negativo para a produção de éster.

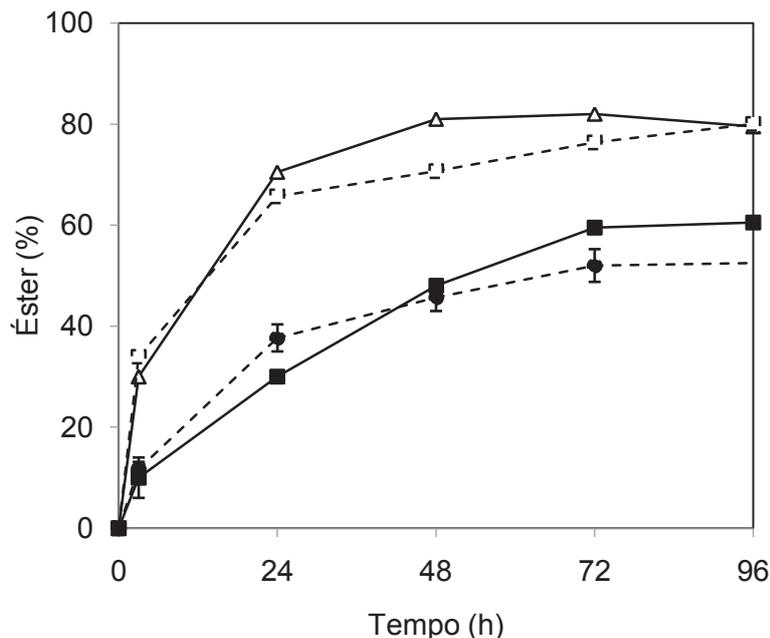


FIGURA 24. EFEITO DA PRESENÇA DE *t*-BUTANOL NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans* E PELA LIPASE NOVOZYM 435

As linhas pontilhadas representam a reação com a adição do *t*-butanol no meio de reação. SFBC sem(■), com *t*-butanol(●); Novozym 435, sem(Δ) e com *t*-butanol(◻). Condições da reação: Razão molar 6:1, 45°C, e 12 etapas de etanol, 250 rpm. Os valores plotados são as médias das análises em triplicata ± o erro padrão da média.

A adição de *t*-butanol ao processo pode eliminar os efeitos negativos do etanol e do glicerol sobre a atividade da lipase (LI et al 2010; WANG et al 2006). No entanto, quando a quantidade é excessiva, pode ocasionar problemas de rendimento (LI et al 2007).

Na literatura, os estudos que utilizam o *t*-butanol no meio de reação variam em termos de concentração, dificultando a comparação entre os resultados. Royon et al (2007) obtiveram aumento do rendimento na metanólise do óleo de algodão (RM 6:1), catalisada pela lipase Novozym 435, utilizando 32% (m/m) de *t*-butanol. Por outro lado, Azócar et al (2011) estudaram o efeito de *t*-butanol na transesterificação metílica anidra do óleo de fritura, catalisada por Novozym 435, obtendo melhores rendimentos com 0,75% de *t*-butanol no meio reacional. Maleki et al (2013) utilizaram 80% de *t*-butanol em relação a massa de óleo e obtiveram aumento do rendimento da metanólise do óleo de palma e soja, equivalentes a 20% e 25%, respectivamente.

#### 5.4.2.1.5 Efeito do acetato de etila como doador de acila

Outra maneira indicada por algumas pesquisas para solucionar problemas de inativação da enzima pela formação do glicerol é a substituição do doador de acila (metanol ou etanol) por acetato de metila ou etila (MALEKI et al 2013; LI et al 2010; XU et al 2003). Neste trabalho, optou-se por utilizar o acetato de etila como substituinte ao etanol em reação catalisada por SFBC.

O uso do acetato de etila, como doador de acila proporcionou rendimentos inferiores aos obtidos com etanol, chegando à diminuição de 50% de conversão após 24 h de reação (Figura 25). Na literatura não são mencionadas informações sobre esse fenômeno. Esse resultado pode estar relacionado com o grupamento hidroxila no carbono 12, peculiaridade do ácido ricinoleico, ácido graxo majoritário no óleo de mamona. As hidroxilas em excesso tem maior interação com outros componentes da reação em relação ao acetato de etila (Maleki et al 2013). Por outro lado, Xu et al (2003) obtiveram resultados positivos em estudo sobre o efeito de acetato de metila como substituinte ao metanol na reação de transesterificação do óleo de soja (RM acetato de metila/ óleo 12:1), catalisada pela lipase Novozym 435 (aumento de 30% em éster). Os autores obtiveram 92% de conversão em 10 h. Segundo Xu et al (2003), o acetato de metila é recomendado como um bom substituinte do metanol, não causa efeitos negativos sobre a atividade da enzima e a reação com o óleo vegetal produz, como produto principal, ésteres metílicos e, como coproduto, a triacetina ao invés de glicerol. A triacetina tem aplicação na indústria de fumo (plastificante para filtros de cigarro), e também é utilizada como aditivo no biodiesel, pois proporciona melhor viscosidade e fluidez do biocombustível.

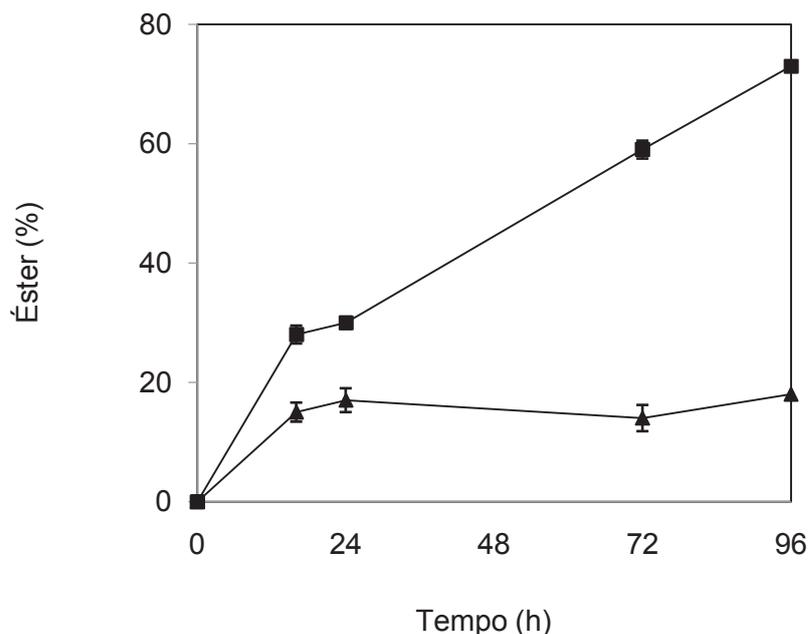


FIGURA 25. EFEITO DO ACETATO DE ETILA COMO DOADOR ACILA NA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans*

Com acetato de etila (■) e com etanol (▲). Condições da reação: Razão molar 6:1 em 12 etapas de adição de acetato de etila, 45°C, 250 rpm, 9% de SFBC.

Na literatura existem poucos trabalhos sobre o efeito da troca do doador de acila em reação com o óleo de mamona. Entre eles, destaca-se o trabalho de Maleki et al (2013), que estudaram a substituição do metanol pelo acetato de metila em reações de transesterificação dos óleos de palma, soja e mamona. Os autores notaram ligeira melhora no rendimento quando utilizaram os óleos de palma e soja, 5% e 10%, respectivamente, e nenhuma melhora de rendimento com o óleo de mamona (queda de 3% de rendimento), e atribuíram este resultado à presença do grupamento hidroxila no ácido ricinoleico.

#### 5.4.2.2 Otimização da transesterificação em frascos agitados via delineamento fatorial

Os resultados apresentados nas etapas anteriores indicaram que o aumento da razão molar (3:1 para 6:1) e adição de etanol em etapas foram os fatores que mais influenciaram na transesterificação do óleo de mamona catalisada por SFBC. Dessa forma, optou-se por utilizar um delineamento fatorial  $2^2$  (dois níveis e duas variáveis)

com pontos centrais em triplicata (BRUNS; SCARMINI, 2001). O tempo de reação avaliado foi de 96 h. As variáveis e seus níveis, assim como os resultados experimentais, estão apresentados na Tabela 14.

TABELA 14 VARIÁVEIS, NÍVEIS, RESULTADOS EXPERIMENTAIS E PREDITOS PELO MODELO DO DELINEAMENTO FATORIAL 2<sup>2</sup> APLICADO NO ESTUDO DA TRANSESTERIFICAÇÃO UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans*

Ensaio	Variáveis independentes				Conversão em éster do óleo de mamona(%)	
	RM	Nível	Etapas	Nível	Observado	Predito
					96 h	96 h
1	4,5:1	0	8	0	56	55
2	4,5:1	0	8	0	58	55
3	3:1	-1	12	1	47	46
4	4,5:1	0	8	0	56	55
5	3:1	-1	4	-1	50	51
6	6:1	1	4	-1	57	58
7	6:1	1	12	1	71	73

O desvio padrão calculado para o ponto central para foi de  $\pm 1,5$ . Conversão em éster após 96 h de reação a 250 rpm, 45°C, 20 g de óleo de mamona e 9% de SFBC (288 U totais).

A análise de variância (ANOVA) indicou que o valor da relação da média quadrática (regressão/resíduos) foi estatisticamente significativo, com F calculado maior que F tabelado, ao nível 95% (Tabela 14). Além disso, o valor da relação entre a falta de ajuste e o erro puro não foi estatisticamente significativo ( $F < F$  tabelado), ao nível de 97% e o percentual máximo de variância explicada foi de 97% e percentual máximo de variância explicável de 99%. Esses resultados indicam que o modelo é adequado para representar as relações reais entre os parâmetros selecionados da reação de transesterificação do óleo de mamona em 96 h.

TABELA 15. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO ETÍLICA DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans*

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F.calculado	F. tabelado
Regressão	342,7500	2	171,375	173,44	9,95
Resíduos	2,9643	3	0,988		
Falta de ajuste	0,2976	1	0,297	0,22	18,51
Erro puro	2,6667	2	1,333		
Total	345,7143	8	43,21429		

% de Variância explicada = 97  
% de Variância explicável = 99%

$R^2 = 97$ ; SQ: Soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática.

A equação ajustada para a conversão em éster (Equação 7) está descrita abaixo:

$$z=45+1*x-2*y+0,58*x*y(7)$$

em que: Z = é o valor previsto do teor de éster obtido (%), X e Y representam os valores codificados para as variáveis independentes.

Para determinar a importância das variáveis independentes (1) razão molar e (2) etapas de adição de etanol na resposta, a partir dos resultados obtidos para o ponto central (Tabela 12, experimentos 1, 2 e 4), calculou-se o desvio padrão para a conversão em éster ( $\pm 1,15$ ). O efeito da variável será tanto mais significativo quanto maior for a diferença entre o desvio padrão obtido e o valor encontrado para o efeito (BRUNS; SCARMINI, 2001).

Para a transesterificação do óleo de mamona, as duas variáveis (RM, etapas) apresentaram influência na conversão, pois os valores dos efeitos foram superiores ao desvio-padrão característico da correspondente variável resposta ( $\pm 1,15$ ) (Figura 26). Não houve interação entre os dois efeitos estudados, sendo o efeito mais significativo (14,72) a razão molar, que afeta positivamente a conversão. Quando a razão molar passa de 3:1 (nível menos) para 6:1 (nível mais), verifica-se um aumento de 14,72 pontos percentuais na conversão.

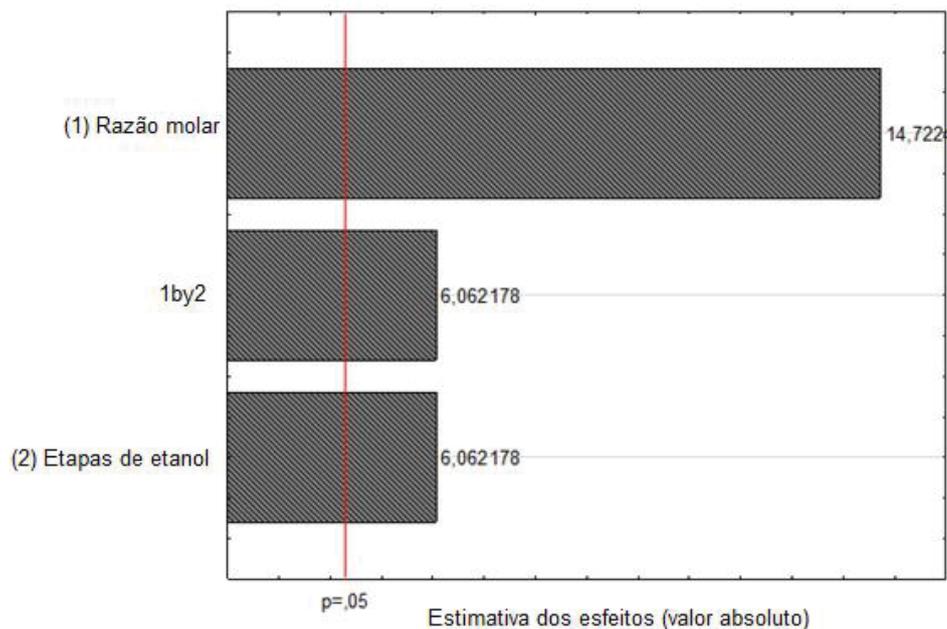


FIGURA 26. DIAGRAMA DE PARETO, COM OS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIA DO DELINEAMENTO FATORIAL SOBRE A VARIÁVEL-RESPOSTA CONVERSÃO EM ÉSTER.

Com base nos resultados obtidos, para melhor visualização dos efeitos, foi construído um gráfico de superfície de resposta (Figura 27). O maior teor de éster foi obtido com maior razão molar e maior número de etapas de adição de etanol (71% de conversão com razão molar 6:1 com adição de etanol em 12 etapas).

Observou-se que não há ponto máximo de conversão na região experimental estudada, o que indicou haver condições experimentais onde a conversão em éster poderia ser aumentada. Com base nestes resultados e devido ao fato de que uma conversão mínima de 96,5% (teor de éster para biodiesel especificado pela ANP N° 45 de 25/08/2014) não foi prevista pelo modelo, prosseguiu-se com os estudos de otimização.

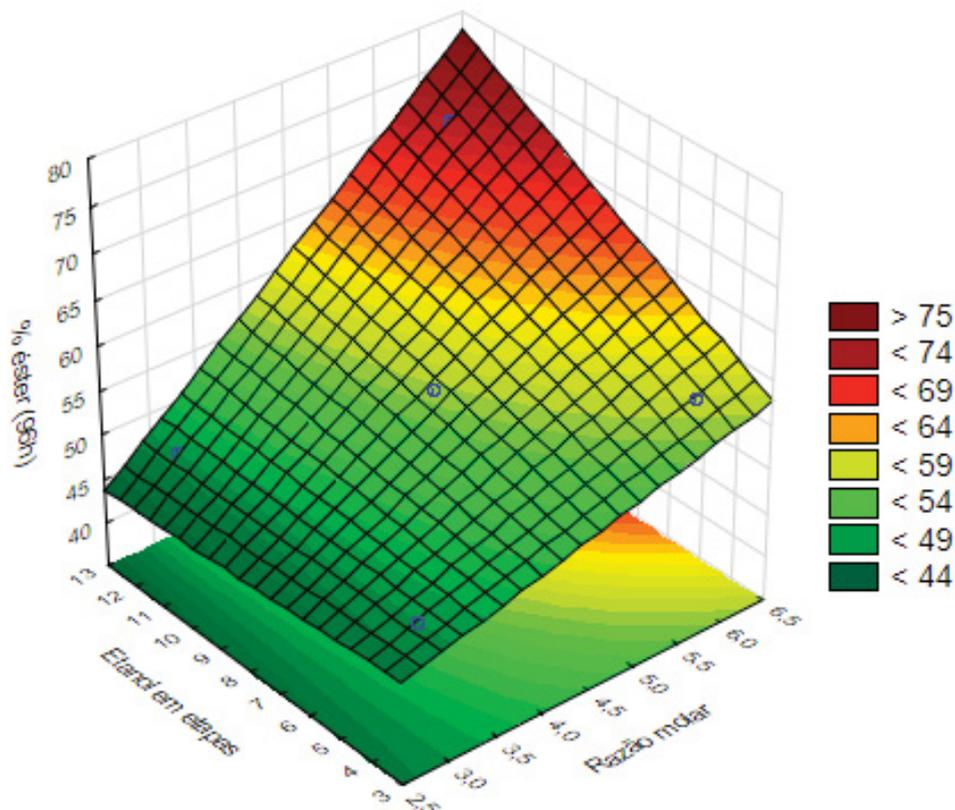


FIGURA27. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO ETÍLICA DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans*

#### 5.4.2.2.1 Otimização da reação de transesterificação utilizando um delineamento composto central rotacional

Com base nos resultados obtidos no planejamento fatorial  $2^2$ , no qual apenas a variável razão molar apresentou influência sobre a resposta conversão em éster (%), foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) (RODRIGUES, LEMMA, 2009) para a otimização das condições da reação. Além da razão molar, outra variável importante estudada foi a temperatura. No delineamento, foi utilizado um planejamento  $2^2$  com adição de 4 pontos axiais (+1,4 e -1,4) e 3 pontos centrais (0), totalizando 11 experimentos (Tabela 16).

TABELA 16. VARIÁVEIS, NÍVEIS, RESULTADOS EXPERIMENTAIS E PREDITOS PELO MODELO DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL APLICADO NO ESTUDO DA TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans*

Ensaio	Variáveis independentes					*Observado	Predito
	RM	Níveis	Temperatura (°C)	Níveis			
1	6:1	-1	40°C	-1		65	66
2	6:1	-1	50°C	1		74	72
3	12:1	1	40°C	-1		41	43
4	12:1	1	50°C	1		45	45
5	5:1	-1,4	45°C	0		71	69
6	13:1	1,4	45°C	0		36	38
7	9:1	0	38°C	-1,4		52	50
8	9:1	0	52°C	1,4		61	63
9	9:1	0	45°C	0		52	51
10	9:1	0	45°C	0		53	51
11	9:1	0	45°C	0		53	51

O desvio padrão calculado para o ponto central foi de  $\pm 0,57$ . Conversão em éster após 96 h de reação a 250 rpm, 20 g de óleo de mamona e 9% de SFBC (288 U totais).

Para os experimentos do DCCR, foram utilizados 20 g de óleo de mamona, 9% de SFBC (m/m) (base seca) em relação à massa de óleo, com 288 U totais (de atividade de hidrólise). As reações ocorreram em frascos Erlenmeyer de 50 mL, com a adição do etanol em 12 etapas, sendo essa a melhor condição prevista pelo planejamento fatorial anterior. Os resultados foram analisados usando o *Software Statistica* Versão 10 (StatsoftTM), onde os efeitos das variáveis e os erros foram calculados a um limite de confiança de 99%. Foi realizada a Análise de variância (ANOVA) (Tabela 16) e o cálculo dos valores de F do Teste de Fischer, para a avaliação da significância das faixas ótimas operacionais de cada variável.

O diagrama de Pareto (Figura 28) mostra que os efeitos temperatura (L), RM (L) e temperatura (Q) foram significativos em nível de significância 5% ( $p > 0,05$ ), exceto para o efeito de razão molar (Q). A variável que apresentou maior efeito negativo foi razão molar (L) (-62,80), as variáveis temperatura (L) (15,75) e temperatura (Q) (9,25) apresentaram efeitos positivos, ou seja, quanto maior seus níveis, maior é a concentração em éster em relação à razão molar.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, foi obtida a equação polinomial de segunda ordem que descreve a resposta(Equação 8):

$$z=253,81-6,07*x+,093*x^2-7,55*y+,090*y^2 \quad (8)$$

onde Z é a conversão em éster (%) e X e Y são os valores decodificados para as variáveis: razão molar(X) e temperatura(Y).

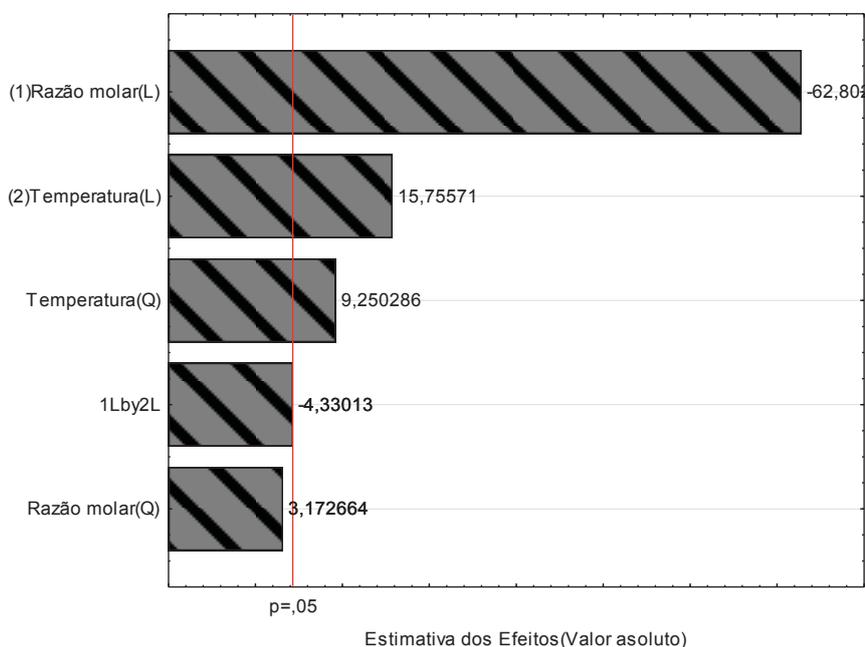


FIGURA 28. DIAGRAMA DE PARETO, COM OS EFEITOS ESTIMADOS DAS VARIÁVEIS PRINCIPAIS E SECUNDÁRIAS DO DELINEAMENTO FATORIAL DCCR SOBRE A VARIÁVEL-RESPOSTA CONVERSÃO EM ÉSTER

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 17) mostra que o modelo foi significativo a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), ou seja, F calculado foi maior que F tabelado. Além disso, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para o modelo foi de 98%.

TABELA 17. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA

Fonte	SQ	GL	MQ	F. calculado	F.tabelado
Regressão	136,7500	2	68,375	234,4286	19
Resíduos	0,5833	2	0,291667		
Falta de ajuste	0,0833	1	0,0833333	0,166667	161,45
Erro puro	0,5000	1	0,5		
Total	137,3333	6	22,88889		

% de variância Explicada = 98  
% de variância explicável 99%

$R^2 = 98$ ; SQ: Soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática.

Com base nos resultados obtidos, para melhor visualização dos efeitos, foi construído um gráfico de superfície de resposta para a conversão de ésteres em 96 h de reação (Figura 29). O maior teor de éster foi obtido na menor razão molar e maior temperatura (73% de conversão com razão molar 6:1, 50°C). Observou-se, que mesmo mudando a região experimental, não se atingiu um ponto máximo de conversão na região experimental estudada, o que indica que a conversão ainda poderiaser aumentada, prosseguiu-se com os estudos de otimização da síntese de ésteres por reações de transesterificação do óleo de mamona em reator de leito fixo, no qual a razão enzima:substrato pode ser aumentada.

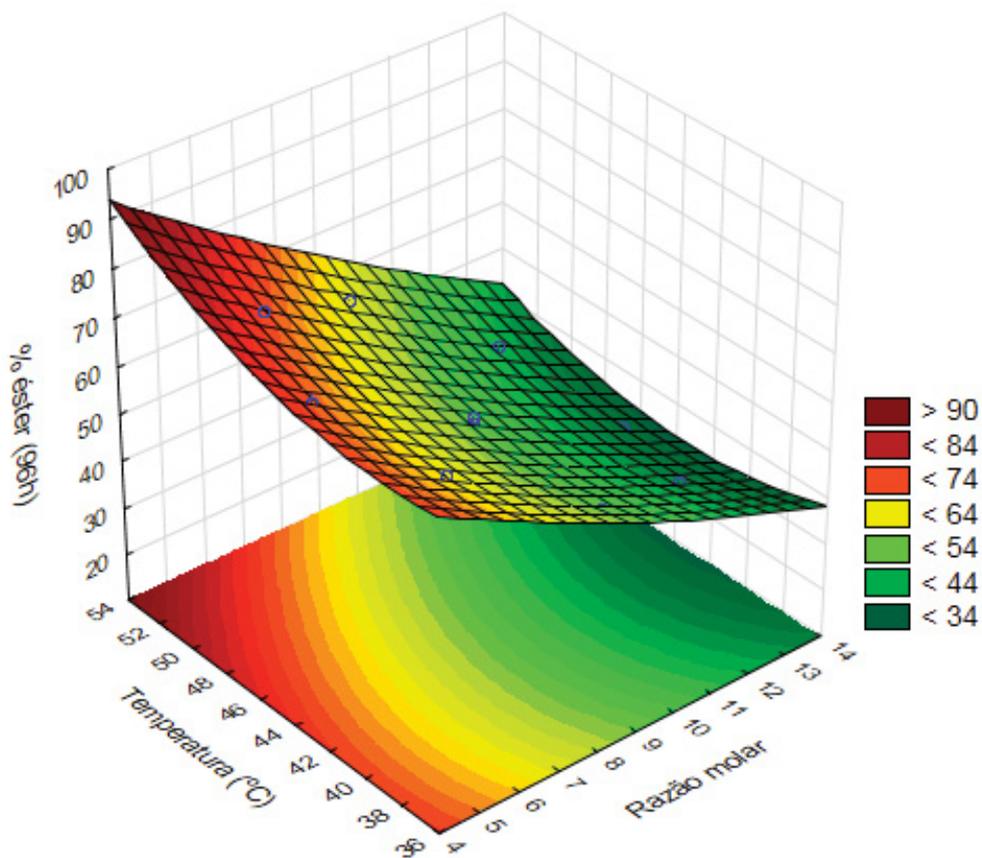


FIGURA 29. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A TRANSESTERIFICAÇÃO ETÍLICA DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans*

#### 5.4.2.2.2 Transesterificação do óleo de mamona em reator de leito fixo utilizando o sólido fermentado de *Burkholderia contaminans*

Os estudos iniciais da reação de transesterificação em frascos agitados foram feitos para determinar as variáveis com maior influência no processo de produção do biodiesel, com posterior aplicação nessa etapa do trabalho, que teve como objetivo aumentar a escala de reação utilizando um reator de leito fixo, com recirculação fechada (batelada). Nesse sistema, a escala de produção é maior, pois permite o contato controlado dos substratos da reação com a enzima empacotada dentro do leito por meio de uma bomba peristáltica. O fato de a enzima estar empacotada facilita a sua remoção do reator e sua reutilização (SOARES et al 2013; SALUM et al 2010).

#### 5.4.2.2.2.1 Efeito da razão molar

A fim de definir a melhor faixa de trabalho para o estudo da razão molar dos substratos (etanol e óleo) em reação de transesterificação em reator de leito fixo, foram avaliadas a razão molar e a temperatura. Nesse estudo, foi observado que a maior razão molar(6:1) não causou a diminuição da conversão, sendo a máxima conversão de 63% em 72 h (Figura 30).

Na literatura, alguns trabalhos relatam que parte do etanol adicionado na reação é imiscível em óleo vegetal, causando a inativação da enzima. Além disso, materiais com alta porosidade, como é o caso o bagaço de cana, podem absorver compostos polares. Assim, a difusão do óleo é reduzida e compromete a catálise enzimática (SOARES et al 2013; SALUM et al 2010). Como o óleo de mamona é solúvel em etanol, o excesso não prejudicou o rendimento da reação.

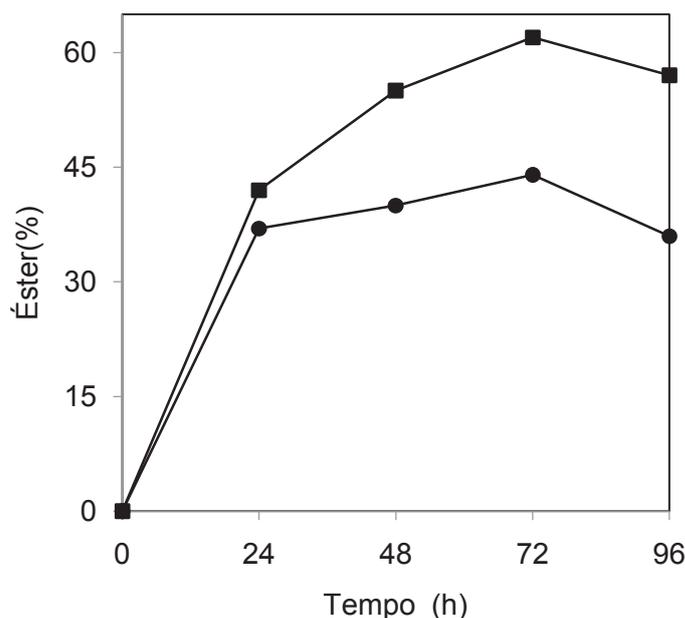


FIGURA 30. EFEITO DA RAZÃO MOLAR NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans* EM BIORREATOR DE LEITO FIXO

RM 6:1 (■) e RM 3:1 (●). Condições da reação: 45 °C, 250 rpm, 12 g de SFBC (base seca) , 12% de SFBC (em relação a massa de óleo) 100 g de óleo, 20 g e 15 g de etanol correspondentes a razão molar 6:1 e 3:1, respectivamente, adicionado em 12 etapas.

#### 5.4.2.2.2 Efeito da temperatura

Nos estudos realizados anteriormente em frascos agitados, o delineamento fatorial (5.4.2.2.1) mostrou que a faixa de temperatura ideal a ser trabalhada seria em torno de 50°C. Nessa temperatura a melhor conversão em éster foi de 74% em 72 h. Com base nesses estudos, no biorreator de leito fixo optou-se por utilizar as temperaturas de 45 °C e 55 °C (Figura 31).

Muitos trabalhos relatam o efeito da temperatura em reações de síntese de ésteres metílicos ou etílicos. Nouredini et al (2005) estudaram a transesterificação do óleo de soja utilizando a lipase de *B. cepacia* em temperatura na faixa de 25 a 60 °C. O melhor rendimento foi obtido a 35 °C, sendo que acima dessa temperatura os autores observaram a diminuição do rendimento da reação. Soares et al (2013) estudaram a esterificação da borra ácida de soja em diferentes temperaturas com SFBC, e obtiveram melhores rendimentos a 50 °C.

Os resultados mostraram que o aumento de temperatura não causou a desnaturação da enzima, pois os rendimentos foram aumentados em 11%, sendo a máxima conversão observada de 73% em 72 h de reação. Os resultados obtidos foram similares aos obtidos por Maleki et al (2013), que obtiveram 67% de conversão em 24 h na metanólise do óleo de mamona, utilizando 15% de lipase comercial Lipozyme TL IM a 45 °C.

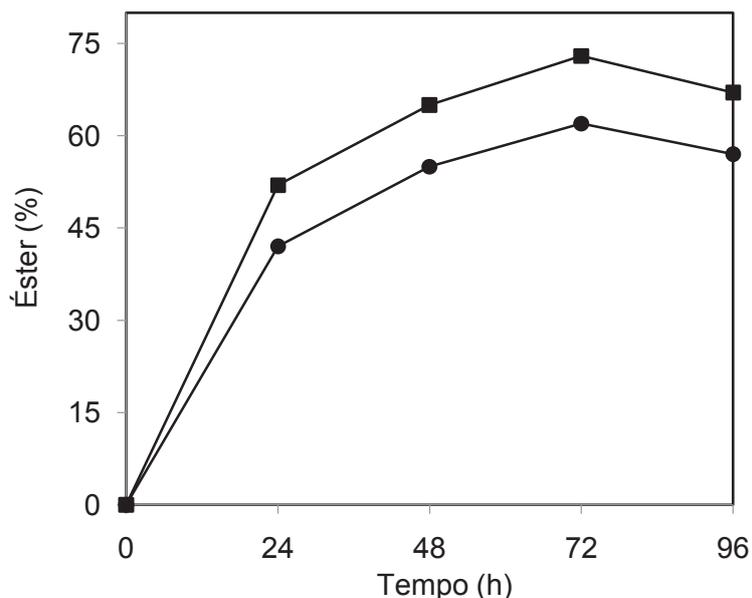


FIGURA 31. EFEITO DA TEMPERATURA NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO DE MAMONA CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans* EM BIORREATOR DE LEITO FIXO

Temperatura de 45°C (●) e 55°C (■). Condições da reação: 100 g de óleo de mamona, RM 6:1 (29,8 g de etanol), 250 rpm, 12% de SFBC (12 g), etanol adicionado em 12 etapas.

#### 5.4.2.3 Estudo da reação de transesterificação em reator de leito fixo com sonda de ultrassom acoplada

##### 5.4.2.3.1 Efeito do ultrassom e da razão molar

Um dos efeitos causados pelo ultrassom é a possibilidade de usar menor quantidade de etanol no meio de reação (BRASIL et al 2015). Isso é possível devido a cavitação, que gera microbolhas, que aumentam a área de contato dos substratos com a enzima. Outro efeito causado pela ação do ultrassom é a maior solubilidade do meio reacional, inclusive o glicerol, que pode ser menos adsorvido no bagaço de cana(OLIVEIRA et al 2016)

A fim de se determinar a melhor faixa de trabalho com o sistema de ultrassom acoplado ao biorreator, foi estudado o efeito da variação da intensidade da potência de 50%, 75% e 100% do ultrassom (500 W) com SFBC(9% m/m, em relação ao óleo)em um sistema de reator de leito fixo (atividade de hidrólise de 130 U g<sup>-1</sup>). Nessas condições, foram avaliados os efeitos do ultrassom com a variação da razão molar de 3:1 e 6:1 (Figura 32 A e B)e intensidade da potência do ultrassom de 50%, 75% e

100%. Os melhores rendimentos foram observados com a razão molar 3:1 e 75% da potência do ultrassom. Conversão máxima (68%) foi obtida em 46 h, sendo, portanto, o tempo para a máxima conversão reduzido de 72 h para 46 h em relação ao experimento anterior, sem ultrassom (Figura 32B, 72% de conversão).

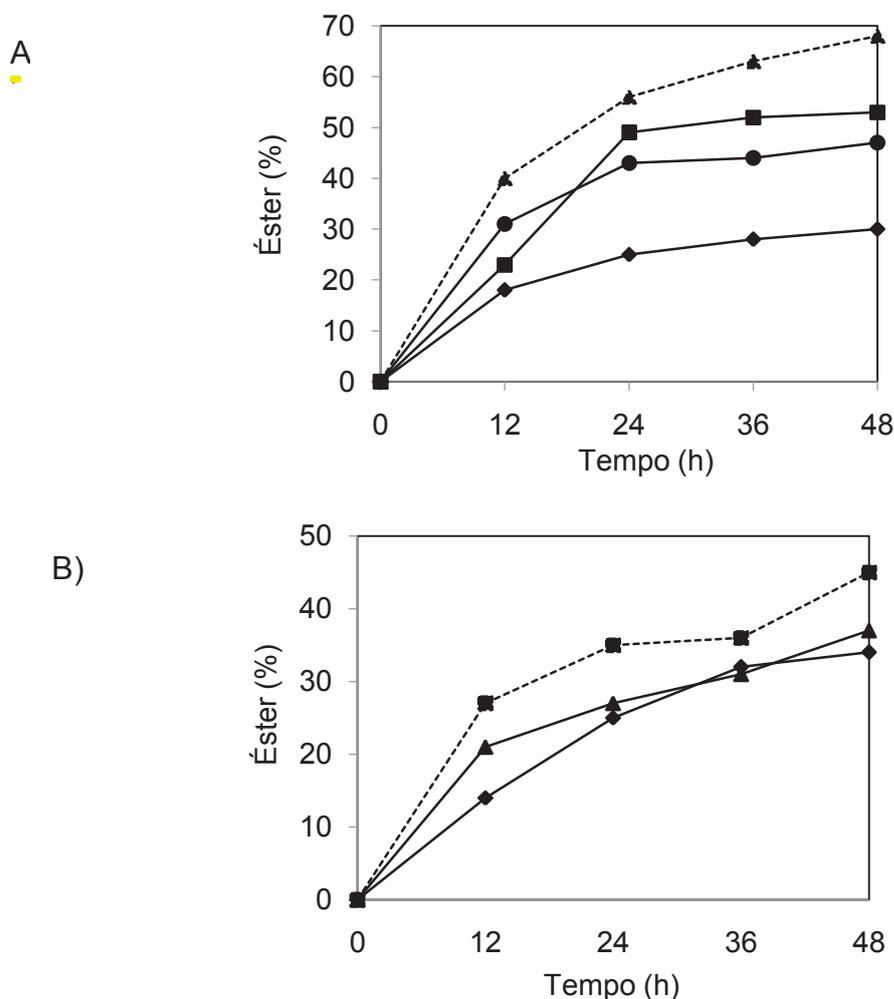


FIGURA 32. EFEITO DO ULTRASSOM E DA RAZÃO MOLAR NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans* EM REATOR DE LEITO FIXO

A: RM 3:1 - 0% (◇), 50% (■), 75% (▲) e 100% (●); B: RM 6:1 - 0% (●), 50% (■) e 100% (▲).

Condições da reação: 45 °C, 12% (m/v) do SFBC ( $130 \text{ U g}^{-1}$ ), massa de etanol, 19,33 g (3:1) e 38,7g (6:1) adicionado em 12 etapas, ultrassom com frequência de 20 kHz e potência de 500 W (75%), vazão de circulação  $7,45 \text{ mL min}^{-1}$ .

Para confirmar os resultados, o experimento para as duas razões molares foi repetido, seguindo-se a cinética da reação por 96 h. A maior conversão foi de 83% em

72 h, com razão molar (3:1) (Figura 33). A maior conversão obtida em 48 h (78%) em relação à Figura 32 (A) (68% em 46 h) provavelmente se deve à maior atividade de hidrólise do lote de SFBC(160 U g<sup>-1</sup>) utilizada neste experimento em relação ao lote anterior (130 U g<sup>-1</sup>).

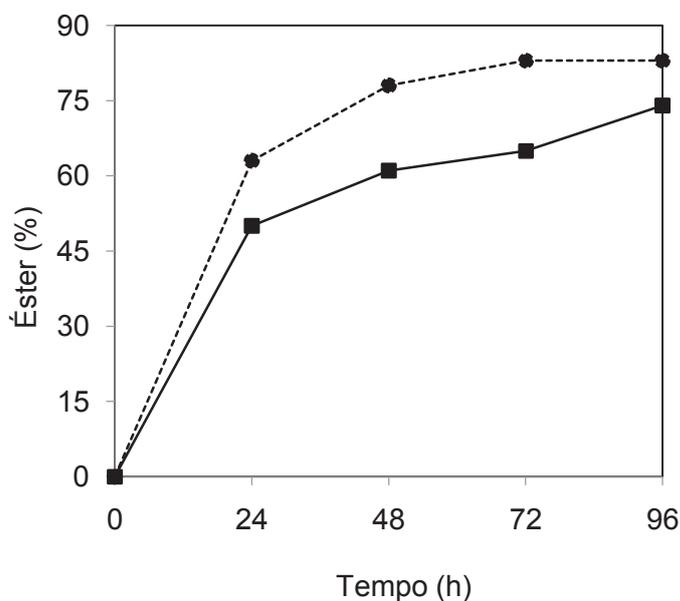


FIGURA 33. EFEITO DA RAZÃO MOLAR COM MAIOR CARGA ENZIMÁTICA DO SÓDO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans* EM REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

Razão molar 3:1 (●) e (■) 6:1. Condições da reação: 45°C, 12% (m/v) do SFBC (160 U g<sup>-1</sup>), massa de etanol, 14,9 g (3:1) e 29,8 g (6:1) adicionado em 12 etapas, ultrassom com frequência de 20 kHz e potência de 500 W (75%), vazão de circulação 7,45 mL min<sup>-1</sup>.

#### 5.4.2.3.2 Efeito do ultrassom com variação de temperatura

Nesse experimento, buscou-se avaliar o efeito do ultrassom com as temperaturas de 45 °C e 55 °C. Observou-se que a temperatura mais elevada (55°C) causou a diminuição da conversão de 83% (45°C) para 56% em 72 h. Provavelmente ocorreu a desnaturação da lipase causada pelo aquecimento no interior do vaso reacional, na conexão entre a sonda de ultrassom e o reator. A temperatura do meio de reação era controlada na entrada do reator (ascendente) e na saída (55°C). No entanto, no interior do vaso reacional não era controlada, e chegava a mais que 55°C.

Não era possível controlar a temperatura do meio de reação que entrava em contato com o ultrassom e com a fração de SFBC da superfície do reator (Figura 34).

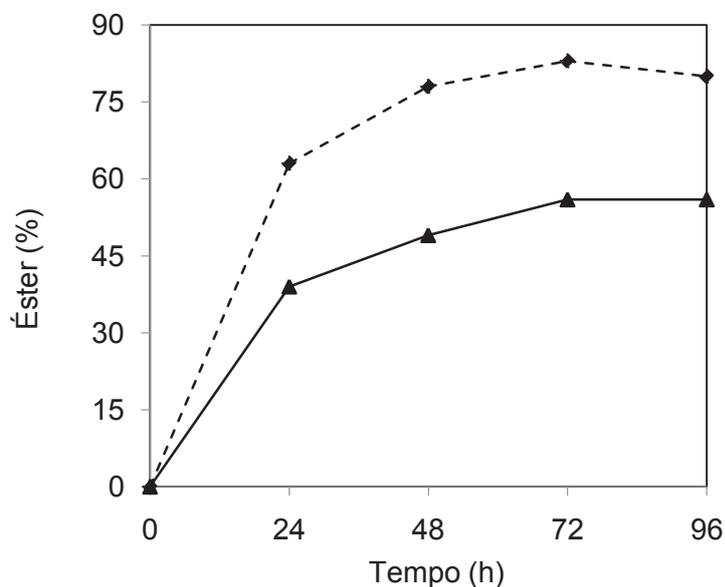


FIGURA 334. EFEITO DO ULTRASSOM E DA TEMPERATURA NA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans*

Temperatura: 45 °C (◆) e 55 °C (▲). Condições da reação: 12% (m/v) do SFBC ( $160 \text{ U g}^{-1}$ ), massa de etanol, 14,9 g (3:1) e 29,8 g (6:1) adicionado em 12 etapas, ultrassom com frequência de 20 kHz e potência de 500 W (75%), vazão de circulação  $7,45 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### 5.4.2.3.3 Efeito do ultrassom e da vazão de circulação

Levando em consideração a importância do contato entre os reagentes da reação com a lipase, foi avaliado o efeito de uma menor vazão de circulação ( $1,45 \text{ mL min}^{-1}$ ) em relação à vazão que tinha sido utilizada até o momento ( $7,45 \text{ mL min}^{-1}$ ). Os resultados obtidos estão apresentados Figura 35 e mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados (82 a 78%;  $p > 0,05$ ) em 48 h de reação, o que significa que a variação da faixa da vazão utilizada não foi suficiente para influenciar na conversão em ésteres, sendo a melhor conversão obtida nesse experimento de 82% em 48 h.

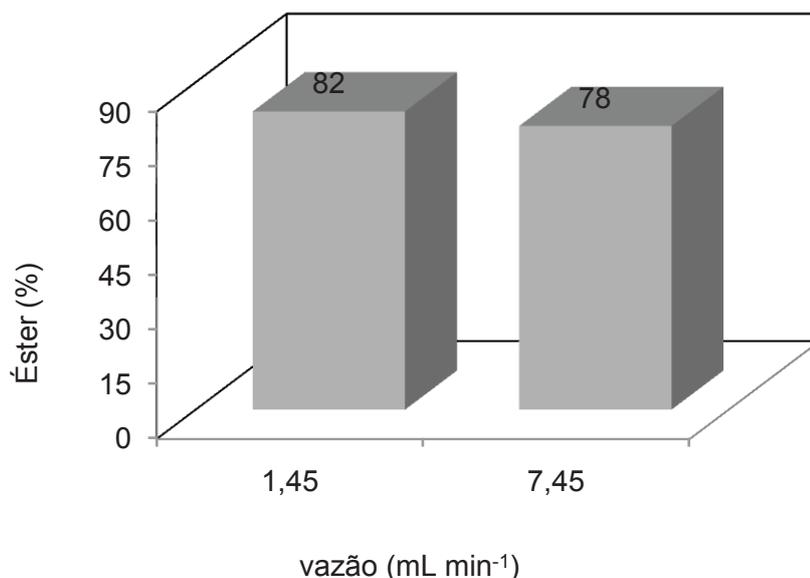


FIGURA 34. EFEITO DO ULTRASSOM E DA VAZÃO DE RECIRCULAÇÃO DO MEIO REACIONAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO DE *Burkholderia contaminans*

Condições da reação: 12% (m/v) de SFBC (160 U g<sup>-1</sup>), massa de etanol, 14,9 g (3:1) adicionado em 12 etapas, ultrassom com frequência de 20 kHz e potência de 375 W (75% de 500W), 48 h e 45°C.

Alguns estudos relatam a influência da vazão de circulação sobre a conversão em éster em reações catalisada por enzimas. Essa influência está relacionada com o tempo de contato entre os substratos da reação e o biocatalisador. Na literatura, o controle desse parâmetro é muito variável e controverso. Rico et al (2014) observaram aumento na conversão da reação de transesterificação do óleo de babaçu em baixas vazões de circulação (0,0163 – 0,0408 mL min<sup>-1</sup>) em reator de leito fixo preenchido com células íntegras de *Mucor circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano. Simões et al (2015) estudaram a variação (0,025-0,083 mL min<sup>-1</sup>) de vazão de circulação da reação de transesterificação etílica do óleo de babaçu em reator de leito fixo preenchido com a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA, obtendo melhores rendimentos com baixa vazão (vazão de 0,083 mL min<sup>-1</sup>).

Para a escolha da melhor vazão, deve-se levar em consideração o tipo da lipase e do suporte utilizados na imobilização, os reagentes, a altura e capacidade do reator (SILVA 2016; BAKKIYARAJ et al 2016; SIMÕES et al 2015).

## 5.5 Discussão dos resultados

Os resultados de transesterificação do óleo de mamona obtidos nesse trabalho devem ser comparados aos demais trabalhos na literatura com cautela, pois as condições da reação e preparados enzimáticos utilizados não são os mesmos. No entanto, algumas comparações podem ser discutidas (Tabela 18). No estudo em frascos agitados, os melhores rendimentos obtidos foram de 71% em 80 h com 9% (m/m) de SFBC (12,6 U totais de atividade de esterificação), nas condições otimizadas pelo planejamento fatorial (6:1, 12 etapas de adição de etanol, 45 °C). Esses resultados são comparáveis com os de outros trabalhos que utilizaram sólidos fermentados em reação de transesterificação em frascos agitados. Zago et al (2014) otimizaram a etanolise do óleo de milho e obtiveram rendimento de 68% em 72 h com o sólido fermentado de *Rhizopus microsporus*. Liu et al (2013) utilizaram o sólido fermentado da lipase de *Burkholderia cenocepacia* na transesterificação etílica do óleo de soja com *t*-butanol e obtiveram o máximo rendimento de 91% em 96 h, utilizando razão molar de 4,3:1. No entanto, a maioria dos trabalhos utilizam óleos comestíveis, e até o momento, não há informações na literatura sobre a utilização de sólidos fermentados na transesterificação do óleo de mamona.

Quando o processo de transesterificação foi feito em biorreator de leito fixo, foi possível aumentar a razão (%) enzima/óleo (m/m), sendo a máxima conversão obtida de 73% em menor tempo de reação (72 h) em comparação à transesterificação em frascos agitados, utilizando razão molar de 6:1, com etanol adicionado em 12 etapas, 55 °C e 84 U totais (atividade de esterificação). Esses resultados são próximos aos obtidos em outros trabalhos que utilizaram óleos comestíveis. Salum et al (2010) estudaram a transesterificação do óleo de soja catalisada por SFBC, e relataram 95% de conversão em 46 h. Galeano et al (2017) estudaram a utilização de SFBC na transesterificação etílica do óleo de palma e obtiveram 89% em 30 h de reação (RM 5,5:1).

TABELA 18. TABELA DE COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM FRASCOS AGITADOS, EM REATOR DE LEITO FIXO COM E SEM EFEITO DO ULTRASSOM

Condições da reação								
Lipase	Reator	Conversão (%)	Tempo (h)	Razão molar	Etapas de adição do etanol	Temperatura (°C)	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )	Lavagem
LipBC - (Accurel MP 1000)	Frasco agitado	86%	48 h	3:1	1	45	-	-
Novozym 435	Frasco agitado	93%	72 h	6:1	12	45	-	lavagem
SFBC	Frasco agitado	71%	80 h	6:1	12	45	-	lavagem
SFBC	Frasco agitado	73%	96 h	6:1	12	50	-	-
SFBC	Leito empacotado sem US	73%	72 h	6:1	12	55	7,45	lavagem
SFBC	Leito empacotado com US	78%	48 h	3:1 - 75% de US	12	45	7,45	-
SFBC	Leito empacotado com US	82%	48 h	3:1 - 75% de US	12	45	1,43	-

Muitos trabalhos relatam os efeitos causados pelo ultrassom em reações catalisadas por catalisadores químicos e enzimáticos (comerciais), visando diminuir o tempo de reação utilizando as variáveis: frequência, potência e intensidade do ultrassom. A maioria desses estudos relata o uso do banho de ultrassom, devido ao controle da temperatura e da agitação do sistema, a rota metálica, solventes no meio de reação e óleos provenientes de oleaginosas comestíveis (BRASIL et al 2015).

Não se sabe ao certo quais os efeitos o ultrassom tem sobre as enzimas no meio de reação. Alguns autores afirmam que o efeito da cavitação contribui positivamente para a melhor interação entre os substratos e a enzima (NAKAYAMA et al 2017; SHAH e GUPTA 2008). Essa interação permite o consumo de menores quantidades de álcool, maior conversão em éster em menor tempo de reação. Outros estudos citam que o fenômeno de cavitação pode causar a desnaturação da enzima ao longo da reação. Portanto, é necessário investigar a influência das ondas de ultrassom nas condições escolhidas para realizar a reação desejada. Dessa forma, é possível determinar as melhores condições para obter elevados rendimentos sem prejudicar a enzima.

O uso do ultrassom vem sendo relatado na literatura como uma alternativa viável em reações catalisadas por lipases, embora a maior utilização seja com catalisadores químicos. A maior vantagem desse sistema é a redução do tempo de reação, que proporciona a redução de energia e custos de produção (FAYYAZI et al 2015). Os estudos que utilizam o ultrassom variam em termos de frequência (kHz) e potência (W). Na maioria das vezes, a frequência é fixa e a potência é variável. No presente trabalho, foi utilizada uma sonda de ultrassom com 20 kHz de frequência com 500 W de potência variável (0%-100%), sendo a máxima conversão obtida de 82% em 48 h (3:1, 45 °C, 75% de potência de ultrassom e vazão 1,45 mL min<sup>-1</sup>). Em comparação com os dois sistemas (com e sem US) que utilizaram a vazão 7,45 mL min<sup>-1</sup>, a melhor conversão foi de 73% em 72 h (sem ultrassom) e 78% em 48 h (com 75% de ultrassom), em condições otimizadas (RM 3:1, a 45 °C e 75% da potência de US). Isto representa uma redução do tempo de reação, em relação ao sistema sem ultrassom, de 72 h (73%) para 48 h (78%), e da razão molar (de 6:1 para 3:1). Em relação ao sistema de frascos agitados, foi possível reduzir o tempo de reação em 48 h (73% em 96 h).

Estes resultados podem ser comparados a outros trabalhos sobre a catálise enzimática em sistemas que utilizam o ultrassom que obtiveram aumento de conversão em menor tempo de reação e menor quantidade de álcool.

Zanatta e Rosa (2014) obtiveram conversões mais elevadas, para ésteres etílicos, de até 88% para o óleo de soja e de 75% para o óleo de macaúba. Sivaramakrishnan e Incharoensakdi (2017) estudaram a transesterificação do óleo de microalgas *Batryococcus sp* catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* em condições ótimas (50 °C, 200 W e 30 kHz). O ultrassom permitiu o aumento de conversão de 78% em 36h para 88% em 4 h. Bhangu et al (2017) estudaram a reação de transesterificação metílica do óleo de canola catalisada pela lipase de *Candida rugosa* e alcançaram a redução do tempo de reação de 24 h para 1,5 h com o uso do ultrassom em condições ótimas (RM 5:1, 50 °C, 22 KHz e 40 W). Subhedar et al (2015) estudaram a transesterificação metílica do óleo de girassol catalisada pela lipase Lipozyme TL-IM em sistema reacional assistido por banho de ultrassom e obtiveram a redução de tempo da reação de transesterificação de 24 h para 4 h, e da RM de 4:1 para 3:1. Os autores obtiveram aumento de 60% em 24 h (RM 4:1) para 95% em 4 h (RM 3:1). Michelin et al (2015), estudaram os efeitos do ultrassom na transesterificação enzimática, utilizando Novozym 435, do óleo de macaúba (*Acrocomia aculeata*). Os autores acompanharam a cinética da reação com e sem ultrassom por 30 min e obtiveram aumento de 55% para 85% de conversão, com o uso do ultrassom, nas condições otimizadas (RM 9:1, 132 W e 40 kHz a 65 °C). Foi possível reutilizar o catalisador por 5 ciclos, com a perda gradativa de atividade e rendimento em éster (%) ao longo de cada ciclo devido ao efeito do ultrassom.

A imobilização de lipases é muito comum entre os trabalhos presentes na literatura. No entanto, vários critérios relacionados aos custos do processo devem ser levados em consideração, como, por exemplo, o custo e tipos dos suportes, além do processo de purificação do extrato enzimático. A utilização de sólidos fermentados contendo lipases naturalmente imobilizadas tem a vantagem de não utilizar processos com muitas etapas de purificação. Foram utilizados dois tipos de preparação de lipases: (1) lipase imobilizada em Accurel MP 1000, que consiste na produção da lipase por fermentação submersa, seguida de purificação parcial com precipitação com sulfato de amônio e posterior imobilização por adsorção (interação hidrofóbica). Este é um tipo de preparação muito utilizado e aplicado em biocatálise, principalmente por ser um

procedimento simples; (2) lipase naturalmente imobilizada no sólido fermentado, que é produzido por fermentação no estado sólido, a produção e imobilização ocorrem simultaneamente, após a secagem, pode ser utilizado diretamente no meio de reação. Este processo é pouco comum e pouco estudado em biocatálise.

Os preparados enzimáticos estudados possuem vantagens e desvantagens. Por outro lado, entre as vantagens da imobilização de lipases em suportes está a possibilidade de deixar o processo mais “puro”, pois não estão presentes células e compostos de alta massa molecular. Além disso, existe a vantagem de imobilizar maior quantidade de moléculas (lipases), o que possibilita o uso de menores quantidades do preparado enzimático.

Em termos de viabilidade econômica, a utilização de sólidos fermentados como SFBC é uma opção vantajosa, principalmente pelo baixo custo da matéria-prima principal (bagaço de cana) e pelas poucas etapas para a obtenção do produto final. Já o suporte Accurel é um material industrializado e importado e a imobilização só ocorre após etapas de purificação do extrato contendo a lipase. Os dois tipos de preparados enzimáticos utilizados proporcionaram a síntese de ésteres do óleo de mamona, mas o custo de produção de LipBC imobilizada é maior do que o custo de produção do SFBC.

## 6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho, foi estudada a otimização do processo de produção de ésteres etílicos por reação de transesterificação do óleo de mamona, catalisada pelo sólido fermentado da lipase de *Burkholderia contaminanse* pela lipase LipBC imobilizada. O trabalho foi dividido em duas etapas:

1- A primeira etapa consistiu na otimização da imobilização da lipase em suporte Accurel MP 1000 e sua aplicação em reação de transesterificação nos frascos. A melhor conversão em éster obtida foi de 86% em 48 h (Figura 36). Nessa etapa do trabalho, foi possível imobilizar a lipase em Accurel MP 1000 e obter atividade lipolítica comparável a outros trabalhos que utilizaram várias etapas de purificação.

2- A segunda etapa foi estudar a otimização da reação de transesterificação com o sólido fermentado da lipase de *B. contaminans* em frascos agitados, em reator de leito empacotado e com o efeito de ultrassom. Nessa etapa, o melhor rendimento obtido em frascos agitados foi de 73% em 96 h de reação, com a adição gradual do etanolem 12 etapas. Esse rendimento foi melhorado com a otimização em biorreator, chegando-se a 73% de conversão em 72 h. Com a finalidade de diminuir ainda mais o tempo de reação, foram estudados os efeitos do ultrassom acoplado ao reator. Nesse sistema, obteve-se a máxima conversão de 73% em 24 h e 83% e 48 h, utilizando a razão molar 3:1, a 45°C, com 75% de ultrassom e vazão de 1,45 mL min<sup>-1</sup>.

Nessa etapa, foi possível utilizar o sólido fermentado da lipase *B. contaminans* produzido em material de baixo custo, como é o caso do bagaço de cana, na otimização em reator de leito fixo com sonda de ultrassom acoplado.

Os valores de conversão observados com SFBC foram equivalentes aos obtidos com a mesma lipase imobilizada em Accurel MP 1000, e próximos aos obtidos pela lipase comercial Novozym 435. Esse estudo mostrou que o custo do processo de produção do biodiesel etílico a partir de óleo de mamona pode ser reduzido com o uso de biorreator com ultrassom acoplado, com lipase não comercial, produzida por matéria-prima renovável e biodegradável de baixo custo (bagaço de cana), em sistema livre de solvente, tornando a catálise enzimática uma alternativa economicamente viável.

## 7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesse trabalho abrem novas perspectivas para trabalhos futuros:

- Produção contínua de ésteres etílicos com sistema de ultrassom;
- Desenvolvimento de estudos sobre o efeito do ultrassom na lipase adsorvida no sólido fermentado;
- Acompanhamento da estabilidade da enzima e reutilização após contato com ultrassom;
- Desenvolvimento de métodos de lavagem do sólido fermentado no biorreator para prolongar o tempo de utilização e reutilização do biocatalisador, acompanhando a concentração de glicerol e o consumo do etanol durante a produção do biodiesel;
- Emprego de outras matérias-primas não comestíveis, como, por exemplo, o óleo de fritura, resíduos de caixa de gordura e óleo de microalgas.
- Desenvolvimento de estudos de viabilidade econômica de todas as etapas do processo até a produção do biodiesel, incluindo o custo da fermentação e das matérias-primas.
- Análise de qualidade do biodiesel de acordo com as normas estabelecidas pela ANP.

## 8 REFERÊNCIAS

ADEWALE, P.; DUMONT, M. J.; NGADI, M. Enzyme-catalyzed synthesis and kinetics of ultrasonic-assisted biodiesel production from waste tallow. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p.1-9, 2015.

AGUIEIRAS, E. C.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; DE CASTRO; A. M., LANGONE, M. A.; FREIRE, D. M. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014.

AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 207-215, 2000.

AL-ZUHAIR. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining** V.1, P. 57–66, 2007.

ALNOCK, R.C. Produção e caracterização de novas lipases imobilizadas para utilização em biocatálise. (**Tese de Doutorado**), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2017.

AMORIM N., M. DA S.; ARAÚJO, A. E.; DE, CARAMORI, P. H.; GONÇALVES, S. L.; WREGE, M.S.; LAZZAROTTO, C., LAMAS, F. M.; SANS, L. M. A. Zoneamento agroecológico e definição da época de semeadura do algodoeiro no Brasil. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 9, p. 422-428, 2001.

ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 14/12/2016.

AZEVEDO, D. D; NÓBREGA, L. D.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S.; BELTRÃO, N. D. M. Manejo cultural. O agronegócio da mamona no Brasil. **Campina Grande: Embrapa Algodão**, n. 3, p. 121-160, 2001.

AZÓCAR, L.; CIUDAD, G.; HEIPIEPER, H. J.; MUÑOZ, R.; E NAVIA, R. Lipase-catalyzed process in an anhydrous medium with enzyme reutilization to produce biodiesel with low acid value. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 112, n. 6, p. 583-589, 2011.

AZÓCAR, L.; NAVIA, R., BEROIZ, L.; JEISON, D.; CIUDAD, G. Enzymatic biodiesel production kinetics using co-solvent and an anhydrous medium: a strategy to improve lipase performance in a semi-continuous reactor. **New biotechnology**, v.31, n. 5, p. 422-429, 2014.

BABICZ I, LEITE S.G.F, DE SOUZA, R.O. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics sonochemistry**. v.17, p. 4-6, 2010.

BHANGU, S. K.; GUPTA, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic enhancement of lipase-catalysed transesterification for biodiesel synthesis. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 34, p. 305-309, 2017.

BARBOSA, J. C. S; SERRA, A. A. Ultra-som (I): influencia do ultrassom na química. *Quim Nova*, v.14, p.302–316, 1992

BARBOSA, O.; TORRES, R., ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433-2462, 2013.

BAKKIYARAJ, S.; SYED, M. B.; DEVANESAN, M. G.; THANGAVELU, V. Production and optimization of biodiesel using mixed immobilized biocatalysts in packed bed reactor. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 10, p. 9276-9283, 2016.

BARON, A. M.; BAROUH, N., BAREA, B.; VILLENEUVE, P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support. **Fuel**, v.117, p. 458-462, 2014.

BARON, A. M.; ZAGO, E. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. SPIL: Simultaneous production and immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.29, n. 1, p. 19-24, 2011.

BATISTELLA, L.; LERIN, LA, BRUGNEROTTO, P.; DANIELLI, AJ; TRENTIN, CM, POPIOLSKI, A.; DE OLIVEIRA, D. Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system. **Ultrasonics sonochemistry**, v.19, n. 3, p. 452-458, 2012.

BHANGU, S. K.; GUPTA, S. ; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonic enhancement of lipase-catalysed transesterification for biodiesel synthesis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 305-309, 2017.

BOTTON, V.; TODO BOM, M. A.; CARMO, L. C. L.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Síntese de ésteres etílicos utilizando a lipase de *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM. In: **XIX SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, X SIMPOSIO DE HIDROLISE ENZIMATICA DE BIOMASSAS**, 2013.

BOLDYREV V. V. Mechanochemistry and sonochemistry. **Ultrason. Sonochem.** v. 2, p. 143-145, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, A. N.; OLIVEIRA, L. S.; FRANCA, A. S. Circulation flow reactor with ultrasound irradiation for the transesterification of vegetable oils. **Renewable Energy**, v. 83, p.1059-1065, 2015.

BRUNS, R.E.;BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2<sup>a</sup> ed. Campinas: Unicamp, 2001.

BUCHORI, L.; ISTADI, I. PURWANTO, P. ADVANCED. CHEMICAL Reactor Technologies for Biodiesel Production from Vegetable Oils-A **Review. Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis**, v.11, n. 3, p.406-430, 2016.

BUFFO, M. M. Transferência de oxigênio e cisalhamento em biorreator convencional com diferentes combinações. Dissertação (**Mestrado em Engenharia Química**) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2016.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, v.40, n. 1,1950.

CANOIRA, L.; GALEÁN, J. G.; ALCÁNTARA, R.; LAPUERTA, M.; GARCÍA-CONTRERAS, R. Fatty acid methyl esters (FAMEs) from castor oil: Production process assessment and synergistic effects in its properties. **Renewable Energy**, v. 35, n. 1, p. 208-217, 2010.

CHOUDHURY, A. R. Sustainable textile wet processing: Applications of enzymes. In Roadmap to sustainable textiles and clothing, **Springer Singapore**, p. 24-38, 2014.

CHEN, H. C.; JU, H. Y.; WU, T. T.; LIU, Y. C.; LEE, C. C.; CHANG, C.; CHUNG, Y. L.; SHIEH, C. J. Continuous production of lipase-catalyzed biodiesel in a packed-bed reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

CYCLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology**, v. 284, n. 1992, p. 3–27, 1997.

DACOSTA B. D.; SERRA, T. M.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R. Biodiesel production by ethanolysis of mixed castor and soybean oils. **Fuel**, v. 89, n. 12, p. 3791-3794, 2010.

DA LUZ, L. P. Estudo do ultra-som como técnica de extração de carvões e caracterização dos hidrocarbonetos poliaromáticos Dissertação (**Mestrado em Química**), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

DA SILVA, J. A. C.; SOARES, V. F., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., HABERT, A. C.; FREIRE, D. M. Enzymatic production and characterization of potential biolubricants from castor bean biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p.323-329, 2015.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v.32, n. 3, p. 776-792, 2009.

DELGADO, C. E. PASHOVA, V. Produção enzimática de ésteres etílicos do óleo de ricino. **Revista Facultad de Ingeniería**, v. 53, p. 9-19, 2012.

DE OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M., FACCIU, C.; DALLA ROSA, C., BENDER, J. P., LIPKE, N.; DE OLIVEIRA, J. V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. **In Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals** v.4, n. 7, p. 771-780, 2004.

DIAS, G. S.; DE LIMA LUZ JR, L. F.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Scale-up of biodiesel synthesis in a closed-loop packed-bed bioreactor system using the fermented solid produced by *Burkholderia lata* LTEB11. **Chemical Engineering Journal**, v. 316, p. 341-349, 2017.

DIAS, J. M.; ARAÚJO, J. M.; COSTA, J. F.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M; ALMEIDA, M. F. Biodiesel production from raw castor oil. **Energy**, v. 53, p. 58-66, 2013.

Encor Biotechnology INC. <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>

FAYYAZI, E.; GHOBADIAN, B.; NAJAEI, G.; HOSSEINZADEH, B.; MAMAT, R.; HOSSEINZADEH, J. Na ultrasound-assisted system for the optimization of biodiesel production from chicken fat oil using a genetic algorithm and response surface methodology. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 26, p. 312-132, 2015.

FAO (Food and Agricultural Organization of United Nations). Disponível em: [faostat.fao.org](http://faostat.fao.org). Acesso em 10/08/2013.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; MOS, L.P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalyzed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 263, p. 8-13, 2007.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. D. S; SCABIO, A. Biodiesel de soja—taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

GALEANO, J. D., MITCHELL, D. A., KRIEGER, N. Biodiesel production by solvent-free ethanolysis of palm oil catalyzed by fermented solids containing lipases of *Burkholderia contaminans*. **Biochemical Engineering Journal**, v.127, p.77-86, 2017.

GONÇALVES, L. P. B. Sistema enzimático acoplado para produção simultânea da (S)-3 fluoroalanina e do ácido (R)-3 fluoroalático. (**Tese de Doutorado**), Instituto de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2002.

GONZÁLEZ, G. V.; TORRES, E. F.; AGUILAR, C. N.; GOMES, S. J. R.; GODÍNEZ, G. D.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3643, p. 1-11, 2002.

GU, J.; XIN, Z.; MENG, X.; SUN, S.; QIAO, Q.; DENG, H. Studies on biodiesel production from DDGS-extracted corn oil at the catalysis of Novozym 435super absorbent polymer. **Fuel**, v. 146, p.33-40, 2015.

HAJAR, M.; FARZANEH, V. "Modeling the kinetics of biolubricant production from castor oil using Novozym 435 in a fluidized-bed reactor." **Industrial Crops and Products** v. 59, p. 252-259, 2014.

HAJAR, M., e VAHABZADEH, F. Biolubricant production from castor oil in a magnetically stabilized fluidized bed reactor using lipase immobilized on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Industrial Crops and Products**, v.94, p. 544-556, 2016.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; KURATANI, N.; NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Process engineering and optimization of glycerol separation in a packed-bed reactor for enzymatic biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10419-10424, 2011.

HAILEGIORGIS, S. M.; HASRAFF, M. A.;KHAN, S. N.; AYOUB, M. Methanolysis of Castor Oil and Parametric Optimization. **Procedia Engineering**, 148, 546-552, 2016.

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

HINCAPIÉ, G., MONDRAGÓN, F; LÓPEZ, D. Conventional and in situ transesterification of castor seed oil for biodiesel production. **Fuel**, v. 90, n. 4, p. 1618-1623, 2011.

HUANG, F. L.; ZHU, G. L.; CHEN, Y. S.; MENG, F. J.; PENG, M., CHEN, X. F.; CHEN, Y. J. Seed characteristics and fatty acid composition of castor (*Ricinus communis* L.) varieties in Northeast China.**Phyton, International Journal of Experimental Botany**, v. 84, n. 1, p. 26-33, 2015.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K.; DIJKSTRA, B., W.; HERTZ, M. T Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, v.53, n.3, p. 15-351, 1999.

KRAWCZYK, T. Biodiesel Alternative fuel makes inroads but hurdles remain. **INFORM** v.7, p.801-829, 1996.

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

KRIEGER, N.; CAMILIOS NETO, D.; MITCHELL, D. A. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. **Biosurfactants**, v. 672, p. 203-210, 2010.

KUMAR G.; KUMAR D.; POONAM M.; JOHARI R, SINGH CP. Enzymatic transesterification of *Jatropha curcas* oil assisted by ultrasonication. **Ultrasonics sonochemistry** v. 18, n. 5, p. 923–927, 2011.

LI, Q.; ZHENG, J.; YAN, Y. Biodiesel preparation catalyzed by compound-lipase in co-solvent. **Fuel Processing Technology**. v. 91, n. 10, p. 1229-1234, 2010.

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

LIMA N.; A. F.; SANTOS, L. S. S.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R. Biodiesel de mamona obtido por via etílica. In **I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, v. 2, p. 96-100, 2006.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J.D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis Enzymatic**, v. 31, p. 53-61, 2004

LEAL, M.C.C.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA JR, G.L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian J. Chemical Eng.**, v. 19, n. 2, 2002.

LIU, Y.; I, C.; MENG, X.; YAN, Y. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. **Fuel processing technology**, v.106, p.303-309, 2013.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

LOW, C. M. R.; LEY, S. V.; *Ultrasound in Synthesis*, Springer-Verlag, Berlin, 1989.

LU, J.; NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125. **Process Biochemistry**. v. 42, n. 9, p. 1367-1270, 2007.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN T. A.; GOLDBERG J.B. The multifarious, multireplicon Burkholderia cepacia complex. **Nature Reviews Microbiology** v. 3, n. 2, p. 144-156, 2005.

MALEKI, E.; AROUA, M. K.; NIK, M. N. S. Castor oil - a more suitable feedstock for enzymatic production of methyl esters. **Fuel Processing Technology**. v. 112, p. 129–132, 2013.

MALHOTRA, D.; MUKHERJEE, J.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed transesterification of castor oil by straight chain higher alcohols. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 119, n. 3, p. 280-283, 2015.

MAPA. 2014. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistema Integrado de Legislação. BINAGRI SISLEGIS. Portaria 212/2014 de 24/11/2014. Disponível: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/aion/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortmapa&chave=1955156079>. Acesso: 11 de outubro de 2016.

MATTEI, L. Programa nacional para produção e uso do biodiesel no Brasil (PNPB): trajetória, situação atual e desafios. **Revista Econômica do Nordeste**, v.41, n.4, p. 731-740, 2017.

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A.; PELKA, J.R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Anal. Chem.** V.38, p.514-515. 1966.

MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R., WOLF, C. R.; SILVA, E. C., LIMA, G.; DE LIRA SILVA, L E DE OLIVEIRA, L. G. Biodiesel from castor oil: a comparison of ethanolysis versus methanolysis. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 5, p. 2262-2265, 2006.

MICHELIN, S.; PENHA, F. M.; SYCHOSKI, M. M.; SCHERER, R. P.; TREICHEL, H., VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of ultrasound-assisted enzymatic biodiesel production from Macauba coconut oil. **Renewable Energy**, v.76, p. 388-393, 2015.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Ed. Springer, Heidelberg, p.13-32, 2006.

MILLER, C. T.; WEBER, W. J. Modeling the sorption of hydrophobic contaminants by aquifer materials. Column reactor systems. **Water Research**, v.22, n. 4 p.465-474, 1988.

MOHAMAD, N. R.; BUANG, N. A.; MAHAT, N. A.; LOK, Y. Y., HUYOP, F.; ABUL-ENEIN, H. Y E WAHAB, R. A. A facile enzymatic synthesis of geranyl propionate by physically adsorbed *Candida rugosa* lipase onto multi-walled carbon nanotubes. **Enzyme and microbial technology**, v. 72, p 49-55, 2016.

MOREIRA, J.; DE SOUSA, T. C. R. Macaúba: oportunidades e desafios. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 2009.

MUKESH, R.S.; IYER, J.S.; WAGH, A.A.; MOKASHI, A.A.; BANERJI, R.V.; NEWADKAR, H.S.; BEVINAKATT. Lipase catalyzed transesterification of castor oil. **Biotechnology Letters**, v. 15, p.251-256, 1993.

NAJAFPOUR, G. D.; YOUNESI, H. Bioconversion of synthesis gas to hydrogen using a light-dependent photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 275-284, 2007.

NAKAYAMA, R. I.; IMAI, M.; WOODLEY, J. M. Ultrasound-assisted production of biodiesel FAME from rapeseed oil in a novel two-compartment reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.92, n.3, p. 657-665, 2017.

NARWAL, S. K.; SAUN, N. K.; DOGRA, P.; CHAUHAN, G.; GUPTA, R. Production and characterization of biodiesel using nonedible castor oil by immobilized lipase from *Bacillus aerius*. **BioMed research international**, 2015.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource technology**. v. 96, n. 7, p. 769-777, 2005.

ODANETH, A. A.; VADGAMA, R. N.; BHAT, A. D.; LALI, A. M. Tuning Lipase Reaction for Production of Fatty Acids from Oil. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 180, n. 3, p. 504-515, 2016.

OGUNNIYI, D. S. Castor oil: a vital industrial raw material. **Bioresource technology**, v. 97, n. 9, p. 1086-1091, 2006.

OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J.P.; LIPKE, N.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C.; OLIVEIRA, J.V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. **In Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, v. 771, p. 113-116, 2004.

OLIVEIRA, B. C.; RAMÍREZ, A. J.L.; WANDERLEI, P. DE C. C. . Efeito do Ultrassom na extração e modificação de amidos. *Ciência Rural, Sistema de Información Científica Redalyc Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal* , v.46, n.4, p.739-746, 2016.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Eng**, v. 5, n. 3, p. 197–211, 1992.

OROZCO-HEMANDEZ, J. M.; ROMERO, R., NATIVIDAD, R.; BAEZA-JIMENEZ, R. Improvement strategies for the enzymatic production of biodiesel in the presence of primary alcohols. *REVISTA MEXICANA DE INGENIERIA QUIMICA*, v. 15, n. 3, p. 935-942, 2016.

PANWAR N. L. L. Performace evaluation of a diesel engine fueled eith methyl ester of castor seed oill, **Appl Therm Eng**. v. 30, p. 245-249, 2010.

PARKE, J.L.; GURIAN-SHERMAN D. Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual review of phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 225-258, 2001.

PERIN G.; ÁLVARO G.; WESTPHAL E.; VIANA LH, JACOB RG.; LENARDÃO EJ. Transesterification of castor oil assisted by microwave irradiation. **Fuel** v.87, n.12, p. 2838-2841, 2008.

PHILLIPS, RS. Modulation of the temperature of the stereochemistry of the enzymatic catalysis: perspectives of exploration. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 13-16, 1996.

RANGANATHAN, S. V.; SRINIVASAN, L. N.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975-3981, 2008.

RASO, J.; MANAS, P.; PAGAN, R.; SALA, F. J. Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.5, n. 4, p. 157-162, 1999.

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

RIGONI, R. E.; RIGO, E.; FREIRE, D.M.G.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. Utilização de lipases como auxiliar na degradação de gordura do flotado de indústria de carnes. CD-ROM - XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES - SINAFERM, 2003, Florianópolis. Anais do Congresso, Florianópolis UFSC-Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de processos**. 2. ed. Campinas, São Paulo: Editora Cárita, 2009.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using *t*-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p.648-653. 2007.

RICO, A.; DE CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. Produção enzimática de biodiesel etílico em reator de leito fixo e fluxo contínuo utilizando células integras de *Mucor Circinelloides* imobilizadas em espuma de poliuretano. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2437-2441, 2015.

SALIS A.; PINNA M.; MONDUSSI M.; SALINAS V. Biodiesel production from triolein and short cheain alcohols though biocatalysis *Journal of Biotechnology*. V. 11, n. 3, p. 291-299, 2005.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C. I.; CÔCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor

using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1348-1354, 2010.

SALUM, T. F. C.; BARON, A. M.; ZAGO, Erika C.; TURRA, V.; BARATTI, JACQUES C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 3, p. 197-203, 2008.

SAMBROOK J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. p. 73-74, 1989.

SÁNCHEZ, N.; SÁNCHEZ, R.; ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; MARTÍNEZ, G. Complete analysis of castor oil methanolysis to obtain biodiesel. **Fuel**, v.147, p.95-99, 2015.

SANTIN, C. M.; MICHELIN, S.; SCHERER, R. P.; VALÉRIO, A.; DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Comparison of macauba and soybean oils as substrates for the enzymatic biodiesel production in ultrasound-assisted system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.35, p.525-528, 2017.

SAVY FILHO, A. Mamoneira: técnicas de cultivo. **O Agrônomo**, Campinas, v.53, n. 1, p. 16-17, 2001.

SÉVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; MONSAN, P.; E MARTY, A. Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil. **Bioresource technology**, v. 102, n. 8, p. 4954-4961, 2011.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; CYGLER, M.; LANG, D.; BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; STRICKLAND, L. C. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, v. 5, n. 2, p. 187-202, 1997.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 7, p. 789-793, 1999.

SCHUCHARDT. U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.9, n.3, p. 199 – 210, 1998.

SHAH S.; GUPTA M.N. The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media. **Chemistry Central Journal**. v.2, n. 1, p. 1–9, 2008.

SILVA K. D.; SAKA, S. Effects of water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment. **Bioresource technology**. v.91, p.289. 2004.

SILVA, A.; Enide da, Study of the enzymatic processo of biodiesel production from wast frying oils and. *Dissertação (Dissertação de mestrado)* – Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

SILVA, R. F. Otimização da síntese de misturas de biodiesel de mamona e amendoim com o uso do ultrassom. Dissertação (**Mestrado em Ciências Agrárias**), Universidade Estadual do Paraíba-Embrapa Algodão, Campina Grande -PB, área de Energias renováveis, 2016.

SIMÕES, A.; RAMOS, L.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Performance of an enzymatic packed bed reactor running on babassu oil to yield fatty ethyl esters (FAEE) in a solvent-free system. **Biofuel Research Journal**, v. 2, n. 2, p. 242-247, 2015.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R., E PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SIVARAMAKRISHNAN, R.; INCHAROENSAKDI, A. Direct transesterification of *Botryococcus* sp. catalysed by immobilized lipase: Ultrasound treatment can reduce reaction time with high yield of methyl ester. **Fuel**, v.191, p.363-370, 2017.

SOARES, D.; PINTO A. D.; GONÇALVES, D. A. ; MITCHELL, D.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering J**, v. 81, p. 15-23, 2013.

SOARES, D.; DA SILVA SERRES, J. D.; CORAZZA, M. L.; MITCHELL, D. A.; GONÇALVES, A. G., e KRIEGER, N. Analysis of multiphasic behavior during the ethyl esterification of fatty acids catalyzed by a fermented solid with lipolytic activity in a packed-bed bioreactor in a closed-loop batch system. **Fuel**, v. 159, p.364-372, 2015.

SABOYA, R. M. A.; CECILIA, J. A.; GARCÍA-SANCHO, C.; SALES, A. V.; DE LUNA, F. M. T.; Rodríguez-Castellón, E.; Cavalcante, C. L. Assessment of commercial resins in the biolubricants production from free fatty acids of castor oil. **Catalysis Today**, v.279, p.274-285, 2017.

SOUZA, K. S.; DE, OLIVEIRA, F. A.; DE, GUEDES FILHO, D. H.; BRITO NETO, J. F. Avaliação dos componentes de produção da mamoneira em função de doses de calcário e fósforo. **Revista Caatinga**. Mossoró, v. 22, p. 116-122, 2009.

SILITONGA, A. S.; MASJUKI, H. H.; ONG, H. C.; YUSAF, T.; KUSUMO, F.; MAHLIA, T. M. I. Synthesis and optimization of *Hevea brasiliensis* and *Ricinus communis* as feedstock for biodiesel production: A comparative study. **Industrial Crops and Products**, v.85, p.274-286, 2016.

SUBHEDAR, P. B.; BOTELHO, C.; RIBEIRO, A.; CASTRO, R.; PEREIRA, M. A.; GOGATE, P. R.; CAVACO-PAULO, A. Ultrasound intensification suppresses the need of methanol excess during the biodiesel production with Lipozyme TL-IM. **Ultrasonics sonochemistry**, v.27, p. 530-535, 2015.

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Ultrasound assisted intensification of biodiesel production using enzymatic interesterification. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 67-75, 2016.

SUN, S.; LI, X. Functional Ionic Liquids Catalyzed the Esterification of Ricinoleic Acid with Methanol to Prepare Biodiesel: Optimization by Response Surface Methodology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 6, p. 757-764, 2016.

STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas-aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 168, p. 1070-1074, 1986.

TISS, A.; CARRIERE, F.; VERGER, R. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, p. 36-43, 2001.

TRAN, DANG-THUAN; CHEN, CHING-LUNG; CHANG, JO-SHU. Continuous biodiesel conversion via enzymatic transesterification catalyzed by immobilized Burkholderia lipase in a packed-bed bioreactor. **Applied Energy**, v. 168, p. 340-350, 2016.

TRAN, A.D.T.; LIN, B.Y.J.; CHEN, A.C.L.; CHANG, J.S. Modeling the methanolysis of triglyceride catalyzed by immobilized lipase in a continuousflow packed-bed reactor. **Applied Energy**, v. 126, p.151-160, 2014.

TEBAS, S. O. G.; PEREIRA, A. F.; DA SILVA, P. H. A.; PINHEIRO, P. F.; PINHEIRO, C. A.; BARAÑANO, A. G. Obtenção de Biodiesel. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v.4, n. 1, p. 100-104, 2017.

TRENTIN, C. M.; POPIOLKI, A. S.; BATISTELLA, L., DALLA ROSA, C.; TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Enzyme-catalyzed production of biodiesel by ultrasound-assisted ethanolysis of soybean oil in solvent-free system. **Bioprocess and biosystems engineering**, v.38, n. 3, p. 437-448, 2015.

TRENTIN, C. M.; SCHERER, R. P.; DALLA ROSA, C.; TREICHEL, H., OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Continuous lipase-catalyzed esterification of soybean fatty acids under ultrasound irradiation. **Bioprocess and biosystemsengineering**, v. 37, n. 5, p. 841-847, 2013.

TRENTIN, C. M., POPIOLKI, A. S.; BATISTELLA, L.; DALLA ROSA, C.; TREICHEL, H..DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Enzyme-catalyzed production of biodiesel by ultrasound-assisted ethanolysis of soybean oil in solvent-free system. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 3, p. 437-448, 2015.

VANLAERE, E.; LIPUMA, J. J.; BALDWIN, A.; HENRY, D.; DE BRANDT, E.; MAHENTHIRALINGAM, E; VANDAMME, P. *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* International **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 1580-1590, 2009.

VARMA, MAHESH N.; GIRIDHAR MADRAS. "Synthesis of biodiesel from castor oil and linseed oil in supercritical fluids." **Industrial e engineering chemistry research** v. 46, n.1, p. 1-6, 2007.

VENTURA, D. A. M. F.; ALVES, K. B.; SANTOS, M. K. V. A. Análise comparativa entre o biodiesel de girassol e o biodiesel de mamona. In **IV CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA E SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS**, p. 7-12, 2010.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: fact and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v.15, n. 1, p. 32-38,1997.

VENY, H.; AROUA, M.K.; SULAIMAN, N.M. N. Kinetic study of lipase catalyzed transesterification of jatropha oil in circulated batch packed bed reactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 237, p. 123-130, 2014

XU, Y.; DU, W.; LIU, D.; ZENG, J. A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1239–1241, 2003

WANG, L.; DU, W.; LIU, D., LI, L.; DAI, N. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1, p. 29-32. 2006.

WANG, X.; HUANG, Z.; KUTI, O. A.; ZHANG, W.; NISHIDA, K. Experimental and analytical study on biodiesel and diesel spray characteristics under ultra-high injection pressure. **International journal of heat and fluid flow**, v.31, n. 4, p.659-666, 2010.

WEISS, E. A. **Oil seed crops**. London: Longman, p. 660, 1983.

YADAV, G. D.; JADHAV, S.R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous sílica and encapsulation in calcium alginate: **Transesterification in non- aqueous médium** Mat, v. 86, n. 1-3, p. 215-222, 2005.

YANG, J. S.; JEON, G.J. HUR, B.K.; YANG, J. W. Enzymatic methanolysis of castor oil for the synthesis of methyl ricinoleate in a solvent-free médium. **Journal Microbiology and Biotechnology**. v. 15, n. 6, p. 1183-1188, 2005.

YOSHIDA, A.; HAMA, S.; TAMADANI, N.; FUKUDA, H.;KONDO, A. Improved performance of a packed-bed reactor for biodiesel production through whole-cell biocatalysis employing a high-lipase-expression system. **Biochemical Engineering journal**, v. 63, p. 76-80, 2012.

YU D.; TIAN L.; WU, H.; WANG S.; WANG Y.; MA, D.; FANG, X. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. **Process Biochemical**, v.45, p. 519–525, 2010.

ZAGO, E.; BOTTON, V.; ALBERTON, D.; CÓRDOVA, J.; YAMAMOTO, C. I.; COCCO, L. C.; KRIEGER, N. Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using *Rhizopus microsporus*. **Energy & Fuels**, v. 28, n. 8, p. 5197-5203, 2014.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. **Journal of Biology Chemistry**, v. 263, p. 3194-3201, 1988.

ZANATTA, J.; ROSA, C. Produção enzimática de biodiesel utilizando diferentes óleo vegetais com substratos em sistema de ultrassom. **Vivência**, v. 1. n. 18, p. 2014.

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

ZENEVICZ, M.; SANTIN, C.; FEITEN, M.; FURIGO Jr, A.; OLIVEIRA, D. D.; OLIVEIRA, J. D. Hydrosterification of frying oil in ultrasound system using immobilized lipases. **Blucher Chemical Engineering Proceedings** , v.1, n. 2, p. 7963-7970, 2015.

ZHAO, D. Enzymatic resolution of ibuprofen in an organic solvent under ultrasound irradiation. **Biotecnologia e Bioquímica Aplicada**, v. 61, n. 6, p. 655-659, 2014.

ZHU, K.; LIU, H.; HAN, P.; WEI, P. Study of ultrasound-promoted, lipase-catalyzed synthesis of fructose ester. **Frontiers of Chemical Engineering in China**, v.4, n. 3, p. 367-371, 2010.