

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LUCAS SERRA MARTIN

Produção de ésteres de etila a partir do óleo de *Jatropha curcas* em reator de leito fixo com lipase imobilizada em suporte híbrido empregando cinza de casca de arroz como adsorvente

Maringá

2020

LUCAS SERRA MARTIN

Produção de ésteres de etila a partir do óleo de *Jatropha curcas* em reator de leito fixo com lipase imobilizada em suporte híbrido empregando cinza de casca de arroz como adsorvente

Tese de Doutorado, submetida à Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química, na área de concentração de Desenvolvimento de Processos

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Gisella Maria Zanin
Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Heizir F. de Castro

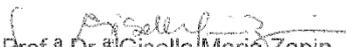
Maringá

Março, 2020

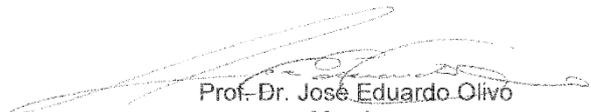
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Tese de Doutorado apresentada por Lucas Serra Martin perante a Comissão Julgadora do Curso de Doutorado em Engenharia Química em 12 de março de 2020.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a Dr.^ª Gisella Maria Zanin
Orientadora


Prof.^a Dr.^ª Cleide Mara Faria Soares
Membro


Prof. Dr. José Eduardo Olivo
Membro


Prof. Dr. Edson Antonio da Silva
Membro


Prof.^a Dr.^ª Rita de Cássia Bergamasco
Membro


Dr. João Henrique Dantas
Membro

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

M379p	<p>Martin, Lucas Serra</p> <p>Produção de ésteres de etila a partir do óleo de <i>Jatropha curcas</i> em reator de leito fixo com lipase imobilizada em suporte híbrido empregando cinza de / Lucas Serra Martin. -- Maringá, PR, 2020. 152 f.color., figs., tabs.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Gisella Maria Zanin. Coorientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2020.</p> <p>1. <i>Burkholderia cepacia</i>. 2. Beta-ciclodextrina. 3. Matriz SiO₂-CD. 4. Ésteres etílicos. 5. Cinza de casca de arroz. I. Zanin, Gisella Maria, orient. II. Castro, Heizir Ferreira de, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.</p>
	CDD 23.ed. 660.2

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, meu pai, meus irmãos e aos demais membros da minha família.

À Milena por compartilhar todos os momentos de alegria e tristeza.

As minhas orientadoras Prof^ª. Dra. Gisella Maria Zanin e Prof^ª. Dra. Heizir Ferreira de Castro, pela orientação e oportunidade concedida de desenvolver este trabalho.

Aos meus amigos.

Ao pessoal do LATI e do LCHBio que me ajudaram bastante nas análises que foram realizadas durante o trabalho.

Os autores gostariam de agradecer ao Laboratório de Adsorção e Troca Iônica pela realização das análises de fisissorção de N₂.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Química da UEM.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Produção de ésteres de etila a partir do óleo de *Jatropha curcas* em reator de leito fixo com lipase imobilizada em suporte híbrido empregando cinza de casca de arroz como adsorvente

Autor: Lucas Serra Martin

Orientador: Profa Dra Gisella Maria Zanin (DEQ/UEM)

Coorientador: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro (EEL/USP)

Tese de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, Bloco E-46, Sala 11; CEP 87020-900, Maringá-PR-Brasil, defendida em 12 de Março de 2020.

RESUMO

Diante da necessidade de diminuir a dependência dos derivados do petróleo aliada à busca de combustíveis renováveis e ambientalmente favoráveis, a produção de ésteres etílicos (biodiesel) tem se destacado como um processo alternativo e atrativo no mercado mundial. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a potencialidade da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em suporte híbrido SiO₂-β-Ciclodextrina (SiO₂-βCD) para mediar a síntese de ésteres etílicos (biodiesel) a partir do óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), pela rota etanólica em reator de leito fixo operando em fluxo contínuo na presença e ausência de material adsorvente. Especial atenção foi dada à síntese do suporte, analisando o efeito da concentração de βCD (0,5% - 4,0%) nas propriedades das matrizes resultantes. A lipase de *B. cepacia* foi imobilizada nos suportes híbridos e os biocatalisadores preparados apresentaram comportamentos muito próximos no que diz respeito à atividade hidrolítica, rendimento de imobilização e parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}). Entretanto, foram verificadas diferenças em relação ao parâmetro de estabilidade térmica e a atividade de transesterificação, medida em reações de transesterificação em regime descontínuo adotando as seguintes condições: temperatura de 45 °C, tempo de reação de 72 horas e uma proporção de catalisador de 400 unidades de atividade por grama da matéria-prima lipídica (método da hidrólise do azeite de oliva). O biocatalisador que apresentou o melhor conjunto de propriedades desejáveis para a síntese de ésteres etílicos (biodiesel) foi obtido pela imobilização da lipase *B. cepacia* em SiO₂-βCD preparado com 2 % de βCD. Este biocatalisador foi utilizado para produzir ésteres de etila em reator de leito fixo (PBR) com as seguintes dimensões (265 mm de comprimento e 11 mm de diâmetro), a 50 °C operando em fluxo contínuo por um período global de 20 dias. O efeito da razão molar óleo: etanol (1:4, 1:8 e 1:12) foi determinado na formação do produto, rendimento do processo e produtividade. Testes adicionais foram efetuados para avaliar a remoção do glicerol por adsorção em cinza de casca de arroz. A razão molar entre os materiais de partida interferiu de maneira marcante no alcance de elevadas conversões dos ácidos graxos presentes no óleo de pinhão manso em seus ésteres de etila correspondentes, sendo o sistema maximizado para substratos contendo excesso de etanol (razão molar óleo: etanol de 1:12). Nessas condições, o funcionamento do sistema foi comprovado quantitativamente, fornecendo rendimentos de transesterificação médios de $86,98 \pm 6,81\%$ e produtividade de $73,53 \pm 5,79$ mg_{éster}.g⁻¹.h⁻¹. A cinza da casca de arroz foi mais efetiva quando intercalada entre duas camadas de biocatalisador, reduzindo a limitação difusional e a inibição da enzima pela adsorção do

glicerol no suporte, proporcionando incrementos na formação de ésteres de etila em relação ao sistema isento de adsorvente. A eficiência da cinza de casca de arroz como material adsorvente do glicerol foi também comprovada pela análise de FTIR do material antes e após utilização em processo contínuo de reação de transesterificação, revelando bandas nos espectros na região característica do glicerol.

Palavras-chave: *B. cepacia*, matriz SiO₂-βCD, beta-ciclodextrina, ésteres etílicos, cinza de casca de arroz.

Production of ethyl esters from *Jatropha curcas* oil in a packed bed reactor with lipase immobilized in hybrid matrix using rice husk ash as adsorbent

Author: Lucas Serra Martin

Advisor: Prof. Dr Gisella Maria Zanin (DEQ/UEM)

Co Advisor: Prof. Dr. Heizir Ferreira de Castro (EEL/USP)

PhD Thesis; Postgraduate Program Chemical Engineering; State University of Maringa; Colombo Av., 5790, Bloco E-46, Sala 11; CEP 87020-900, Maringá-PR-Brasil, presented in March, 12 2020.

ABSTRACT

In view of the need to reduce dependence on petroleum products combined with the search for renewable and environmentally friendly fuels, ethyl esters (biodiesel) production has stood out as an alternative and attractive process in the world market. The present study aimed to investigate the potential use of lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized on the SiO₂-βCD hybrid matrix to mediate the ethyl esters (biodiesel) production by the transesterification reaction of *Jatropha curcas* oil and ethanol in a packed-bed reactor (PBR) in continuous flow. The effect of the βCD concentration in the SiO₂-βCD hybrid matrix preparation stage, varying the βCD concentration between 0.5% and 4.0%, was evaluated. Lipase from *B. cepacia* was immobilized in the produced hybrid matrices and all the prepared biocatalysts presented very close behaviors with respect to hydrolytic activity, immobilization yield and kinetic parameters (K_m and V_{max}). A difference was observed between the catalysts in relation to the thermal stability parameter and transesterification activity that were conducted under batch process adopting the following conditions: temperature of 45°C, 72 h of reaction period and biocatalyst at proportions of 400 units of activity per gram of the lipid feedstock (method of olive oil hydrolysis). The biocatalyst that displayed the best set of properties to ethyl esters (biodiesel) production was obtained by the immobilization of lipase from *B. cepacia* in SiO₂-βCD prepared with 2 % βCD. This biocatalyst was used to product ethyl esters in a packed-bed reactor (PBR) in continuous flow using the geometric relations (l = 265 mm and d = 11 mm), T = 50 °C for 20 days. The effect of the molar ratio (1:4, 1:8 and 1:12) was determined in the product formation, process yield and productivity. Tests then were carried out to evaluate the glycerol removing using rice rusk ash as adsorbent. The molar ratio between the starting materials interfered in the conversion of the fatty acids presented in the *Jatropha curcas* oil and into the correspondent ethyl esters. The system was maximized for substrates cointaining higher ethanol excess (molar ratio oil: ethanol 1:12). Under these conditions, the system operation has been quantitatively proven, providing average transesterification yields of 86.98 ± 6.81% and productivity of 73.53 ± 5.79 mg_{ester}.g⁻¹.h⁻¹. The efficiency of rice husk ash was more effective when intercalated between two biocatalyst layers, reducing diffusion limitation and enzyme inhibition by glycerol adsorption on the support, increasing the ethyl ester formation in relation to the adsorbent free system. The efficiency of rice husk ash as glycerol adsorbent material was

also proved by the FTIR analysis before and after using in a continuous transesterification reaction, revealing characteristic bands at the glycerol region.

Keywords: *B. cepacia*, SiO₂-βCD, beta-cyclodextrin, ethyl esters, rice husk ash.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIACÕES	xiv
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Lipases	5
2.2. Imobilização de lipases.....	8
2.3. Suportes	14
2.3.1. Processo sol-gel	16
2.3.2. Suporte híbrido SiO ₂ -β-Ciclodextrina (SiO ₂ -βCD).....	18
2.4. Biodiesel	20
2.5. Matérias-primas para a produção de biodiesel	25
2.6. Tecnologias de produção de ésteres de etila.....	30
2.6.1. Transesterificação	30
2.6.2. Catálise homogênea.....	33
2.6.3. Catálise heterogênea	35
2.7. Síntese de ésteres de etila por catálise enzimática.....	36
2.8. Biorreatores com lipases imobilizadas	40
2.9. Reatores de leito fixo	42
2.10. Estratégias para melhorar o processo de produção de biodiesel em um reator de leito- fixo operando de maneira contínua	46
2.10.1. Cinza de casca de arroz	47
2.11. Considerações do embasamento do projeto de pesquisa	48
CAPÍTULO 3	51
MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1. Materiais	51
3.1.1. Enzima.....	51
3.1.2. Suportes de imobilização.....	51
3.1.3. Materiais de partida	51
3.1.4. Outros reagentes	51
3.2. Procedimentos experimentais	52
3.2.1. Caracterização do óleo de pinhão-manso	52
3.2.2. Preparo do suporte híbrido de SiO ₂ -βCD	54

3.2.3.	Ativação do suporte híbrido de SiO ₂ -βCD.....	54
3.2.4.	Imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> no suporte híbrido de SiO ₂ -βCD.....	54
3.2.5.	Síntese dos ésteres de alquila.....	55
3.3.	Métodos de análise.....	59
3.3.1.	Caracterização dos suportes híbridos e da cinza de casca de arroz	59
3.3.2.	Propriedades dos biocatalisadores	60
3.3.3.	Caracterização do biodiesel	63
CAPÍTULO 4.....		65
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		65
4.1.	Caracterização físico-química do óleo de <i>Jatropha curcas L.</i> (pinhão-manso)	66
4.1.1.	Umidade.....	66
4.1.2.	Índice de acidez.....	66
4.1.3.	Determinação da composição em ácidos graxos e massa molar média do óleo de <i>Jatropha curcas L.</i>	66
4.2.	Mecanismo de formação dos biocatalisadores preparados	67
4.3.	Caracterização dos suportes e dos biocatalisadores preparados	69
4.3.1.	Adsorção/Dessorção de N ₂	69
4.3.2.	Difração de raios X (DRX)	70
4.3.3.	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	72
4.3.4.	Avaliação do potencial hidrolítico da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> no suporte SiO ₂ -βCD utilizando diferentes concentrações de βCD	74
4.3.5.	Parâmetros cinéticos dos biocatalisadores	74
4.3.6.	Estabilidade térmica da lipase de <i>B. cepacia</i> livre e imobilizada nos diferentes tipos de suporte.....	76
4.3.7.	Teste de lixiviação da lipase imobilizada	77
4.3.7.1.	Lixiviação no meio reacional.....	77
4.3.7.2.	Lixiviação em um meio contendo Triton X-100.....	78
4.3.8.	Síntese de ésteres de etila por transesterificação em processo descontínuo	79
4.4.	Síntese de ésteres de etila por transesterificação em processo contínuo.....	81
4.5.	Distribuição do tempo de residência (DTR)	89
4.5.1.	Curva de calibração.....	89
4.5.2.	Cálculo da distribuição do tempo de residência (DTR).....	90
4.6.	Caracterização da cinza de casca de arroz	93
4.7.	Considerações finais	95
CAPÍTULO 5.....		99
CONCLUSÕES		99
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS		101
REFERÊNCIAS.....		103

APÊNDICES	123
A.1 – <i>Curvas de adsorção/dessorção dos suportes preparados.</i>	123
A.2 – <i>Curvas de adsorção/dessorção dos biocatalisadores preparados.</i>	124
A.3 – <i>Perfil de formação dos ésteres de etila a partir da reação de transesterificação do óleo de pinhão-manso com etanol, catalisada pela lipase B. cepacia imobilizada em SiO₂-βCD utilizando 600 unidades de atividade hidrolítica por grama de matéria-prima lipídica em diferentes concentrações de βCD: (a) 0,5 %, (b) 1,0 %, (c) 2,0 %, (d) 3,0 %, (e) 4,0 %.</i>	125
A.4 – <i>Perfil dos ésteres de etila nas amostras obtidas por catálise utilizando 600 unidades de atividade hidrolítica por grama de matéria-prima lipídica em diferentes concentrações de βCD (48 h de reação).</i>	125
A.5 – <i>Perfil dos ésteres formados e rendimento de transesterificação das reações conduzidas em regime contínuo mantendo fixa a razão molar do meio de alimentação (óleo:etanol= 1:12) e variando o tempo espacial: (a) tempo espacial 8 h; (b) tempo espacial 14 h.....</i>	126
A.6 – <i>Dados referentes à construção da curva de calibração (Absorbância e concentração do corante).</i>	127
A.7 – <i>Concentração de corante nas amostras de acordo com a equação da reta. Aparato da figura 3.2-a.</i>	127
A.8 – <i>Concentração de corante nas amostras de acordo com a equação da reta. Aparato da figura 3.2-c.</i>	127
A.9 – <i>Tabela auxiliar contendo valores utilizados para os cálculos das equações 3.5 até 3.8 para o aparato da figura 3.2-a.</i>	128
A.10 – <i>Gráficos utilizados para os cálculos das equações 3.5 até 3.8 para o aparato da figura 3.2-a.</i>	128
A.11 – <i>Tabela auxiliar contendo valores utilizados para os cálculos das equações 3.5 até 3.8 para o aparato da figura 3.2-c.</i>	129
A.12 – <i>Gráficos utilizados para os cálculos das equações 3.5 até 3.8 para o aparato da figura 3.2-c.</i>	129
A.13 – <i>Análise de FTIR do biocatalisador de lipase SiO₂-βCD antes e após ser utilizado em uma reação de transesterificação continua com razão molar de 1:12.</i>	130
TRABALHOS PUBLICADOS	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. – Reações catalisadas por lipase	6
Figura 2.2. – Técnica de adsorção física para a imobilização de enzimas.	11
Figura 2.3. – Técnica de ligação covalente para a imobilização de enzimas.	12
Figura 2.4. – Técnica de encapsulação para a imobilização de enzima.	13
Figura 2.5. – Representação esquemática da β -ciclodextrina. (a) Molécula de β -ciclodextrina e (b) Estrutura da β -ciclodextrina.	19
Figura 2.6. – Representação esquemática das ciclodextrinas.	19
Figura 2.7. – Aparato experimental utilizado nas reações de etanolise do óleo de palmiste. .	20
Figura 2.8. – Produção mundial de biodiesel por ano (bilhões de litros).	21
Figura 2.9. – Custos gerais do processo de produção de biodiesel.	25
Figura 2.10. – Centro da origem da planta de <i>Jatropha</i> e áreas possíveis de cultivo da planta de <i>Jatropha</i> no mundo.	28
Figura 2.11. – Processo de transesterificação de um triacilglicerídeo.	32
Figura 2.12. – Processo de transesterificação de um triacilglicerol utilizando etanol por catálise enzimática.	37
Figura 2.13. – Fluxograma de produção enzimática do biodiesel.	38
Figura 2.14. Exemplos de biorreatores utilizados em processos envolvendo enzimas livres ou imobilizadas. Reatores (A) batelada tanque agitado (BSTR - Batch stirred tank reactor), (B) contínuo tanque agitado (CSTR - Continuous stirred-tank reactor), (C) Reator de leito fixo (PBR -Packed-Bed Reactor) e (D) Reator de leito fluidizado (FBR- Fluidized bed reactor). .	42
Figura 2.15. – Aparato experimental dos reatores PBR duplo estágio: 1 e 9- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Frasco de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo leito fixo, 7- Coluna extratora de glicerol; 8- Saída de produto.	47
Figura 3.1. – Fluxograma do processo de preparo do suporte híbrido de SiO_2 - β CD, ativação do suporte híbrido de SiO_2 - β CD e imobilização da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> no suporte híbrido de SiO_2 - β CD.	55
Figura 3.2. – Ilustração do aparato experimental utilizado nas reações de etanolise do óleo de pinhão-manso – processo descontínuo.	56
Figura 3.3. – Esquema experimental do reator de leito fixo: 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Frasco de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica (Gilson), 6- Coluna, 7- Saída do produto, 8- Coluna contendo cinza de casca de arroz.	57
Figura 4.1. – Mecanismo de obtenção do suporte híbrido de SiO_2 - β CD em (a) e ativação do suporte pelo glutaraldeído e imobilização da lipase no suporte ativado em (b).	68
Figura 4.2. – Difractometria de Raios X dos suportes híbridos SiO_2 - β CD utilizando diferentes concentrações de β CD.	71
Figura 4.3. – Difractometria de Raios X da lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO_2 - β CD utilizando diferentes concentrações de β CD.	71
Figura 4.4. – Espectros no infravermelho dos suportes de SiO_2 - β CD preparados utilizando diferentes concentrações de β CD.	72
Figura 4.5. – Espectros no infravermelho da lipase <i>B. cepacia</i> livre e imobilizada em SiO_2 - β CD utilizando diferentes concentrações de β CD.	73
Figura 4.6. – Perfis das curvas de velocidade de reação da lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO_2 - β CD utilizando diferentes concentrações de β CD: (a) 0,5 %, (b) 1,0 %, (c) 2,0 %, (d) 3,0 %, (e) 4,0 %.	75

Figura 4.7. – Estabilidade térmica a 60 °C da lipase <i>B. cepacia</i> livre e imobilizada em SiO ₂ -βCD utilizando diferentes concentrações de βCD: 0,5 %; 1,0 %; 2,0 %; 3,0 % e 4,0 % .	77
Figura 4.8. – Teste de lixiviação realizado em meio reacional.	78
Figura 4.9. – Teste de lixiviação realizado em meio contendo Triton X-100.	78
Figura 4.10. – Perfil de formação dos ésteres de etila a partir da reação de transesterificação do óleo de pinhão-manso com etanol, catalisada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -βCD utilizando diferentes concentrações de βCD: (a) 0,5 %, (b) 1,0 %, (c) 2,0 %, (d) 3,0 %, (e) 4,0 %.	80
Figura 4.11. – Perfil dos ésteres formados e rendimento de transesterificação das reações conduzidas em regime contínuo variando a razão molar do meio de alimentação mantendo fixo o tempo espacial em 8 h: (a) razão molar 1:4, (b) razão molar 1:8, (c) razão molar 1:12.	83
Figura 4.12. – Perfil dos ésteres formados e rendimento de transesterificação das reações conduzidas em regime contínuo utilizando reator de leito fixo acoplado a uma coluna extratora de glicerol empacotada com cinza de casca de arroz (CCA) variando a razão molar do meio de alimentação (1:8 e 1:12) mantendo fixo o tempo espacial em 8 h: (d) razão molar 1:8; (e) razão molar 1:12.	85
Figura 4.13. – Perfil de formação de ésteres e rendimentos de transesterificação para a reação conduzida em regime contínuo utilizando reator de leito fixo empacotado com duas camadas de biocatalisador intercalada com uma camada de cinza de casca de arroz: (f) razão molar 1:12.	86
Figura 4.14. – Absorbância em função da concentração do traçador em meio reacional.	90
Figura 4.15. – Concentração do corante em função do tempo para os aparatos: a) Figura 3.2-a; b) Figura 3.2-c.	91
Figura 4.16. – Distribuição do tempo de residência (DTR) para os aparatos: a) Figura 3.2-a; b) Figura 3.2-c.	91
Figura 4.17. – Difratometria de Raios X da cinza de casca de arroz.	94
Figura 4.18. – Espectros no infravermelho da cinza de casca de arroz antes e após a reação de transesterificação.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. – Comparação entre a enzima livre e a enzima imobilizada.....	10
Tabela 2.2. – Comparação dos diferentes métodos de imobilização enzimáticos.....	13
Tabela 2.3. – Matérias-primas para a produção de biodiesel.	25
Tabela 2.4. – Conteúdo de óleo e produção de sementes e de óleos não comestíveis.	26
Tabela 2.5. – Trabalhos publicados para a produção enzimática de biodiesel utilizando óleo de pinhão-manso como matéria-prima.	29
Tabela 2.6. – Comparação dos métodos de transesterificação utilizando catalisadores homogêneos.....	35
Tabela 2.7. – Comparação da produção de biodiesel por transesterificação utilizando catalisadores heterogêneos	39
Tabela 2.8. – Principais variáveis analisadas para a escolha de um reator utilizando enzimas imobilizadas.....	40
Tabela 2.9. – Trabalhos publicados referentes à produção enzimática de biodiesel em reator de leito fixo contínuo (PBR).....	43
Tabela 4.1. – Composição em ácidos graxos do óleo bruto de <i>Jatropha curcas L.</i>	67
Tabela 4.2. – Área específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para os suportes SiO ₂ -βCD utilizando diferentes concentrações de βCD.....	69
Tabela 4.3. – Área específica, volume de poros e diâmetro médio de poro da lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -βCD utilizando diferentes concentrações de βCD.....	70
Tabela 4.4. – Parâmetros obtidos da imobilização da lipase <i>B. cepacia</i> em SiO ₂ -βCD utilizando diferentes concentrações de βCD	74
Tabela 4.5. – Parâmetros cinéticos da lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -βCD utilizando diferentes concentrações de βCD	76
Tabela 4.6. – Perfil dos ésteres de etila das amostras obtidas na transesterificação do óleo de pinhão manso com etanol empregando <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -βCD utilizando diferentes concentrações de βCD (72 h de incubação).....	79
Tabela 4.7. – Resultados referentes ao processo descontínuo obtidos neste trabalho e comparados com trabalhos da literatura.	81
Tabela 4.8. – Condições experimentais adotadas nos experimentos conduzidos em regime contínuo (volume nominal do reator=25,18 mL).	82
Tabela 4.9. – Parâmetros derivados dos experimentos realizados, tempo espacial fixo em 8 h para diferentes razões molares (óleo: etanol) e diferentes configurações de reator	86
Tabela 4.10. – Resultados referentes ao processo contínuo obtidos neste trabalho e comparados com trabalhos da literatura.	88
Tabela 4.11. – Tempo médio de residência, variância e coeficiente de assimetria obtidos por meio do teste de traçador tipo pulso para os aparatos das figuras 3.2-a e 3.2-c.....	92
Tabela 4.12. – Área específica, volume de poros e diâmetro médio de poro da cinza de casca de arroz obtidos neste trabalho e comparados com o trabalho de Santos <i>et al.</i> , 2016.....	93
Tabela 4.13. – Principais resultados obtidos neste trabalho.	98

LISTA DE ABREVIACÕES

β CD	Beta-ciclodextrina
PBR	Reator de leito fixo
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
TAG	Triacilgliceróis
STR	Reator de tanque agitado
FBR	Reator de leito fluidizado
DRX	Difraco de raios X
DTR	Distribuio do tempo de residência
FFA	cido graxo livre
n	Número de reatores CSTR em série

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Problemas com a matriz energética global se intensificaram devido ao crescimento populacional, redução das reservas de combustíveis fósseis e à destruição dos recursos naturais (PATEL *et al.*, 2017). Neste contexto, se fez necessário buscar novas fontes de energia renováveis, como é o caso do biodiesel, que apresenta a capacidade de ser usado em motores diesel sem modificações além de menores emissões de gases de efeito estufa. A produção mundial de biodiesel aumentou de 2,4 bilhões de litros/ano em 2004 para 45 bilhões de litros/ano em 2019, tendo a expectativa de que os volumes de produção aumentem ainda mais, proporcionando ao biodiesel um futuro promissor (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017; ILMI *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2010; BOCKEY, 2019).

O biodiesel é uma mistura de ácidos graxos e ésteres de álcoois de cadeia curta, normalmente produzido pela reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo (de origem animal ou vegetal) com um álcool na presença de um catalisador ácido, alcalino ou enzimático (ALI *et al.*, 2017; HAMDAN *et al.*, 2017; URBAN; SVEE; FRÉCHET, 2012). Em razão das limitações associadas aos catalisadores homogêneos (possibilidade de formação de sabão e corrosão dos equipamentos), os catalisadores heterogêneos sólidos para a reação de transesterificação são preferíveis devido à sua natureza ecológica e à possibilidade de se produzir um biodiesel mais purificado (PATEL *et al.*, 2017).

Diversos catalisadores heterogêneos já foram utilizados para a produção de biodiesel, a partir da transesterificação de triacilgliceróis, como por exemplo zeólitas, óxidos, resinas e enzimas (lipases) (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017). A utilização de lipases como biocatalisador é uma contribuição crescente, no meio acadêmico, para a produção de biodiesel. Os catalisadores enzimáticos apresentam como vantagens: alta seletividade/especificidade e alta eficiência catalítica. No entanto, o alto custo do catalisador dificulta o desenvolvimento e a utilização de enzimas no processo de produção industrial (YING *et al.*, 2017; ALI *et al.*, 2017; BADGUJAR; BHANAGE, 2017). Visando reverter esse problema, tem-se o processo de imobilização enzimática, que permite a reutilização da enzima além de, em alguns casos, aumentar a sua estabilidade (SELVAKUMAR; SIVASHANMUGAM, 2017; KUAN *et al.*, 2013).

Na literatura reporta-se a utilização de diversos materiais e métodos para a imobilização de enzimas (KUAN *et al.*, 2013). Para a escolha do melhor método de imobilização, deve ser levado em conta determinadas considerações como a atividade global do biocatalisador, a regeneração e inativação do suporte, os custos com o procedimento de imobilização, a toxicidade dos reagentes a serem utilizados na etapa de imobilização e as propriedades finais do biocatalisador (ZANIN; MORAES, 2014).

Além disso, é importante escolher o suporte (matriz) mais apropriado para a imobilização enzimática. Em função das vantagens oferecidas pelos suportes híbridos que conseguem combinar atributos físico-químicos dos materiais inorgânicos e orgânicos, o suporte híbrido sílica- β -ciclodextrina (SiO_2 - β CD) foi utilizado com sucesso em reações de biotransformação com lipases, em regime descontínuo, obtendo produtos de interesse industrial como biodiesel (MARTIN *et al.*, 2018).

Os processos comerciais atuais de produção de biodiesel ainda são tipicamente realizados em reatores batelada (processo descontínuo). No entanto, existe um incentivo para usar configurações de produção contínua, pois permitem obter produtividades mais elevadas e melhor consistência do produto. Dentre esses, destaca-se o reator de leito-fixado (PBR), que apresenta como vantagens simplicidade em relação à separação do produto/catalisador e elevada superfície de contato entre o substrato e o catalisador além da vantagem de diminuir o esforço de cisalhamento em enzimas imobilizadas, geralmente levando a estabilidade em longo prazo da enzima (ILMI *et al.*, 2017; AMINI *et al.*, 2017).

Durante a transesterificação do óleo vegetal, o efeito do coproduto glicerol na eficiência da reação deve ser cuidadosamente observado. O glicerol é geralmente adsorvido nos suportes da imobilização de enzimas formando uma camada hidrofílica, o que torna as lipases inacessíveis aos substratos hidrofóbicos (tais como triacilgliceróis residuais, diacilgliceróis, monoacilgliceróis), podendo atingir assim, um patamar de baixa conversão devido ao acúmulo de glicerol, acarretando aumento da resistência à transferência de massa (AMINI *et al.*, 2017; TRAN; CHEN; CHANG, 2016; HAMA *et al.*, 2013; HAMA *et al.*, 2011b).

Várias abordagens foram propostas para superar esses problemas, como o uso de compostos para remoção de glicerol por adsorção, tais como resinas poliméricas e materiais alternativos, como cinza de casca de arroz (RAMOS *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2016). A utilização da cinza de casca de arroz, como material adsorvente na etapa de purificação do biodiesel, já foi reportada na literatura, mostrando resultados promissores (SANTOS *et al.*,

2016). Entretanto a utilização da cinza de casca de arroz como material adsorvente do glicerol acoplado em um reator de leito fixo é pouco reportada na literatura.

O presente trabalho tem, portanto, como objetivo geral avaliar a potencialidade do biocatalisador de lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-βCD. Os objetivos específicos são: preparar e caracterizar diferentes catalisadores enzimáticos, a partir da imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* no suporte híbrido de SiO₂-βCD, pelo método sol-gel, variando a concentração de βCD na obtenção da matriz; verificar a potencialidade do biocatalisador na produção de ésteres de etila pela rota etílica (utilizando óleo de *Jatropha curcas L.*) operando em forma descontínua (reator de tanque agitado) e contínua em reator de coluna (reator de leito fixo - PBR) e avaliar a utilização da cinza de casca de arroz como material adsorvente do glicerol formado na síntese dos ésteres etílicos (biodiesel) em fluxo contínuo.

O objetivo geral foi verificar a potencialidade da matriz de lipase-SiO₂-βCD para a produção de ésteres de etila em reator de coluna operando em fluxo contínuo. Como objetivos específicos temos:

- Preparação e caracterização de diferentes catalisadores enzimáticos, variando a concentração de βCD na elaboração do suporte (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0%);
- Avaliação dos catalisadores desenvolvidos na produção de ésteres etílicos (biodiesel) pela rota etílica operando de forma descontínua;
- Avaliação dos catalisadores desenvolvidos na produção de ésteres etílicos (biodiesel) pela rota etílica operando de forma contínua, em um biorreator tipo leito fixo;
- Avaliação da utilização da cinza de casca de arroz como material adsorvente do glicerol formado na síntese dos ésteres etílicos (biodiesel) em fluxo contínuo.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são abordados os principais temas relacionados ao desenvolvimento do trabalho experimental, incluindo informações sobre lipase, técnicas de imobilização de enzimas e utilização de suportes híbridos na etapa de imobilização. São também descritas as etapas que englobam a síntese de biodiesel, as matérias-primas envolvidas, tipos de biorreatores utilizados, reator de leito fixo (PBR) e estratégias para melhorar o processo de produção contínua de biodiesel.

2.1. Lipases

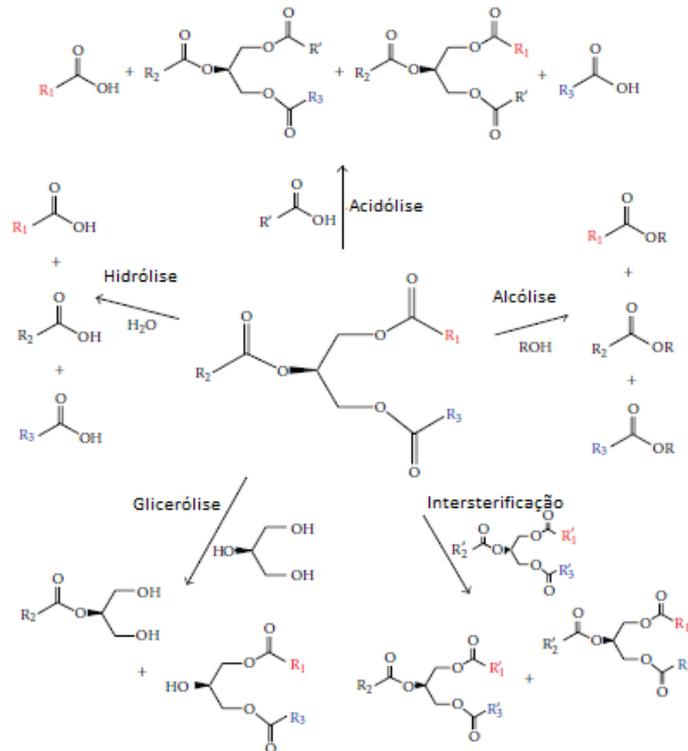
As lipases (glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas amplamente utilizadas industrialmente e capazes de catalisar uma variedade de reações (Figura 2.1), como hidrólise, esterificação, acidólise, glicerólise e interesterificação (GRECO-DUARTE *et al.*, 2017; KUAN *et al.*, 2013; MUKHTAR *et al.*, 2016). Isso se deve ao fato das lipases apresentarem ampla atividade hidrolítica e sintética, estabilidade em meios não aquosos e a capacidade de reconhecer vários substratos (TAN *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2011; SKORONSKI *et al.*, 2014).

As fontes das lipases são de origem animais, plantas e microrganismos. Podem ser intracelulares ou extracelulares por natureza, podendo ser purificadas a partir de recursos de fungos, bactérias, algas e leveduras. Em animais, as lipases obtidas a partir de pâncreas de porco são as mais conhecidas e investigadas. Nestes organismos, elas estão envolvidas em várias etapas de metabolismo lipídico, incluindo digestão de gordura, adsorção, reconstituição e metabolismo de lipoproteínas. Nas plantas, as lipases estão presentes em sementes de plantas, como mamona e canola (*Brassica napus*) e também são encontradas em tecidos de reserva de energia de várias plantas.

No entanto, para a produção de enzimas industriais, os microrganismos são mais interessantes devido ao pequeno tempo de geração, alto rendimento de conversão do substrato em produto, grande versatilidade em condições ambientais e simplicidade em manipulação genética e condições de cultivo. Devido à multiplicidade dos habitats, os microrganismos geralmente produzem vários tipos de lipases, com especificidade distinta quanto à utilização do substrato e também ao ótimo pH e faixa de temperatura. As lipases podem ser produzidas por

bactérias, fungos filamentosos e leveduras, permitindo que esses microrganismos usem lipídios de origem animal ou vegetal como fontes de carbono e energia para o seu crescimento (RIBEIRO *et al.*, 2011; NARWAL; GUPTA, 2013; AMINI *et al.*, 2017).

Figura 2.1. – Reações catalisadas por lipase



Fonte: Adaptado de Ribeiro *et al.*, (2011).

As lipases microbianas são principalmente extracelulares e tem massa molar entre 30 e 50 kDa e sua faixa de pH ideal é de 7,5-9. As lipases originam-se principalmente de microrganismos mesófilos e termófilos e têm atividade ótima a 35-50 °C e 60-80 °C, respectivamente. A maioria das lipases mesófilas é instável em temperaturas acima de 70 °C, enquanto as lipases termoestáveis mostram atividade em até 100 °C. Assim como qualquer outra enzima, as lipases microbianas são classificadas em extracelulares que podem ser purificadas a partir do meio do caldo de um determinado organismo, como *Mucor miehei*, *Candida antarctica*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* e lipases intracelular que não podem ser coletadas do meio reacional, mas permanecem dentro ou na célula tais como *Mucor circinelloides* (AMINI *et al.*, 2017; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014; CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017).

Entre as purificadas e disponíveis comercialmente, a lipase de *Burkholderia cepacia* (BCL, também designada sob o nome comercial lipase PS) se distingue pela sua capacidade de realizar a síntese orgânica e tem sido amplamente utilizada para reações de transformação biológica em fases aquosas e não aquosas, isto é, reações enantiosseletivas de transferência do grupo acila (CHEN; TAN; HUANG, 2010), resolução cinética (ANDRADE *et al.*, 2010), produção de monoacilgliceróis (FREITAS *et al.*, 2010) e síntese de biocombustíveis (DA RÓS *et al.*, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2011).

Lipases são enzimas que apresentam capacidade de atuar na interface óleo/água. As reações hidrolíticas por lipases são geralmente reversíveis e o potencial dessas enzimas em síntese orgânica tem sido bem estudado. Lipases de diferentes fontes possuem propriedades e eficiência catalíticas diferentes. A principal característica da lipase é a sua especificidade. As especificações da lipase foram classificadas em cinco tipos principais: (i) classe de lipídios, (ii) posicional, (iii) ácidos graxos, (iv) estereoquímicos e (v) combinações destes. Regioespecificidade da enzima é a especificidade associada ao tamanho da cadeia do hidrocarboneto de ácido graxo. No que diz respeito à regioespecificidade, por exemplo, a posição da ligação éster, as lipases são classificadas em três classes; sn-1,3-específico (hidrolisam as ligações éster nas posições R1 ou R3 do triacilglicerol (TAG)), sn-2-específico (hidrolisam a ligação éster na posição R2 do TAG) e não específico (não distingue entre as posições das ligações éster a serem clivadas). Como lipases não-específicas tem-se a lipase de *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* (*Burkholderia cepacia*) e *Pseudomonas fluorescens* e 1,3-lipases específicas a lipase de *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* e *Rhizomucor miehei* (AMINI *et al.*, 2017; GULDHE *et al.*, 2015).

A atividade catalítica de diferentes lipases é dependente das características estruturais das cadeias dos ácidos graxos, tais como a natureza da cadeia de ácido graxo (ácido graxo livre, alquil éster ou glicerol éster), comprimento da cadeia, posição das duplas ligações, configuração das duplas ligações e presença de grupos ramificados. Essa versatilidade da lipase como catalisador também é evidente pelo número de processos implementados nas indústrias (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017).

As lipases são utilizadas como catalisadores em indústrias de processamento de alimentos, detergentes, produtos farmacêuticos, papel, têxteis, indústria de cosméticos, síntese de produtos químicos finos, agroquímicos e novos materiais poliméricos. A razão para o

enorme potencial biotecnológico das lipases microbianas é que elas são estáveis em solventes orgânicos, não requerem cofatores, possuem ampla especificidade de substrato e também apresentam alta enantio-seletividade. Uma das aplicações industriais mais interessantes das lipases é o processo sintético de ésteres de metila e etila de ácidos graxos de cadeia longa (biodiesel) a partir de óleos e metanol/etanol (BOSCOLO; TROTTA; GHIBAUDI, 2010; NARWAL; GUPTA, 2013; GULDHE *et al.*, 2015).

As aplicações de lipases em modificações de óleo e gordura são promissoras em muitos aspectos, incluindo: (1) a eficácia das lipases em condições de reação mais brandas (temperatura e pressão); (2) a catálise de reações específicas; (3) a sua utilidade em sistemas e produtos de reação “natural”; (4) capacidade de redução da poluição ambiental; (5) a disponibilidade de lipases proveniente de uma ampla gama de fontes, (6) a capacidade de melhorar as lipases pela engenharia genética; (7) o uso de lipases para a produção de biomoléculas particulares. Além disso, no caso da síntese de biodiesel à base de lipase, a separação de glicerol gerado como subproduto e a purificação dos ésteres produzidos são facilmente realizadas (XU; FOMUSO; AKOH, 2000; POPPE *et al.*, 2015).

No entanto, as desvantagens, incluindo a menor estabilidade operacional, a recuperação diferencial e a reutilização da enzima, muitas vezes fazem esta rota atualmente inviável para a produção industrial de biodiesel. Muitos estudos estão sendo realizados para otimizar as limitações como o alto custo da enzima, baixo rendimento, alto tempo de reação, necessidade de solventes orgânicos e necessidade de água na mistura de reação. Para tanto, diversas estratégias são testadas visando melhorar a estabilidade da enzima, estudos cinéticos, modificações e desenvolvimento de biorreatores (MA *et al.*, 2017; BAJAJ *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2017).

2.2. Imobilização de lipases

Para explorar as vantagens técnicas e econômicas da enzima na biocatálise podem ser aplicadas várias estratégias, como engenharia de enzimas/proteínas, uso de aditivos e imobilização de enzimas para aumentar a estabilidade enzimática. Considerando o ponto de vista da aplicação industrial, a imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma técnica atrativa e mais confiável, que pode funcionar como uma ferramenta versátil para melhorar suas atividades biocatalíticas em meios orgânicos, aumentar a estabilidade térmica e operacional e reduzir o custo total de processamento (BADGUJAR; BHANAGE, 2017).

As lipases têm duas conformações diferentes: forma fechada inativa e forma aberta ativa. Elas diferem com base na posição de uma cadeia polipeptídica chamada “tampa” que abrange o local ativo em um ambiente aquoso e abre na interface óleo-água, podendo bloquear ou expor o local ativo da lipase o que permite que os substratos se aproximem do sítio ativo. Devido à extrema flexibilidade do centro ativo das lipases, suas propriedades catalíticas podem ser facilmente alteradas sem inativar a enzima. Assim, as propriedades da lipase podem ser fortemente moduladas por pequenas mudanças nas condições da reação, assim como mudanças dramáticas nas propriedades da enzima que podem ser alcançadas usando diferentes protocolos de imobilização ou por modificação físico/química. Portanto, é necessário fornecer abordagens de imobilização para lipase visando melhorar a atividade enzimática (MA *et al.*, 2017; AMINI *et al.*, 2017; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A imobilização de uma enzima em suporte sólido representa uma maneira atrativa de reduzir o consumo de lipase resultando na sua capacidade de reutilização durante vários ciclos no processo de aplicação contribuindo para o desenvolvimento de processos sustentáveis e econômicos em biotecnologia (URBAN; SVEE; FRÉCHET, 2012; BUDZAKI *et al.*, 2017; BAGHBAN *et al.*, 2017).

Além disso, a tecnologia de imobilização de enzimas ajuda a superar algumas desvantagens, tornando a enzima mais estável e resistente a condições severas, como grandes faixas de pH e temperatura e aumentando a estabilidade da enzima em relação à desnaturação química e ao cisalhamento e diminuindo a taxa de inibição, protegendo seu estado nativo. Isso permite o fácil manuseio, recuperação e reciclagem do biocatalisador e, portanto, pode levar à redução do custo (SELVAKUMAR; SIVASHANMUGAM, 2017; BAJAJ *et al.*, 2010; TACIAS-PASCAIO *et al.*, 2017; SKORONSKI *et al.*, 2014; CIPOLATTI *et al.*, 2014; PARAWIRA, 2009; MUKHTAR *et al.*, 2016). A estabilidade é considerada uma limitação crítica, especialmente quando o meio é predominantemente não aquoso. Em meios aquosos, nos quais as enzimas são livremente solúveis, a imobilização proporciona um método para recuperar o biocatalisador por centrifugação ou filtração (TEO *et al.*, 2014). No entanto, a imobilização não é apenas uma maneira simples de separar a enzima dos produtos da reação. Muitas vezes, o processo de imobilização altera propriedades enzimáticas, produzindo biocatalisador com atividade, especificidade e estabilidade aprimorada (POPPE *et al.*, 2015). A Tabela 2.1 mostra um comparativo entre a enzima livre e a enzima imobilizada. A imobilização de lipases por várias técnicas em suporte sólido é uma tecnologia bem documentada que permite

a aplicação dessas enzimas em vários processos industriais, incluindo a síntese de biodiesel (SOUZA; MENDES; DE CASTRO, 2016).

Tabela 2.1. – Comparação entre a enzima livre e a enzima imobilizada.

Características	Enzima livre	Enzima imobilizada
Preço	Alto	Baixo
Eficiência	Baixa	Alta
Atividade	Instável	Estável
Recuperação e reutilização	Não é possível	É possível
Tolerância à temperatura e pH	Baixa	Alta
Separação do substrato	Difícil	Fácil
Separação do produto	Difícil	Fácil

Fonte: Adaptado de Noraini *et al.*, (2014).

Na produção de biodiesel, empregando biocatalisadores, uma área chave é a tecnologia de imobilização enzimática, que basicamente é desenvolvida para melhorar a reutilização e a estabilidade da enzima. Além disso, as enzimas são aplicadas em forma imobilizada para tolerar solventes orgânicos, calor e força de cisalhamento e obter um processo de recuperação mais fácil. Para a produção em larga escala, a imobilização de biocatalisadores é um método essencial para permitir a produção contínua de biodiesel com o auxílio de um projeto apropriado de biorreator, como um reator de leito fixo (TRAN *et al.*, 2014; AMINI *et al.*, 2017).

Em comparação com os métodos químicos, a utilização de lipase imobilizada como catalisador, para a produção de biodiesel, tem grande potencial por permitir trabalhar em condições operacionais mais amenas e apresentar alta seletividade gerando produtos de alta pureza. Além disso, as lipases imobilizadas são facilmente recuperáveis e não há contaminação do produto final, economizando tempo e custo na fase de purificação (LV *et al.*, 2017; BOUAID *et al.*, 2017). Portanto, as matrizes e métodos de imobilização mais efetivos poderiam tornar a produção de biodiesel por via enzimática competitiva em relação aos processos químicos (NARWAL; GUPTA, 2013).

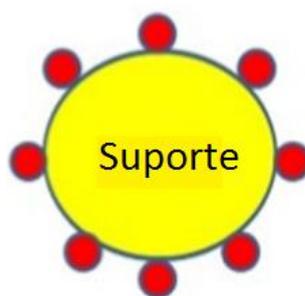
Existem extensos estudos sobre o uso de lipase imobilizada como catalisador para a produção de biodiesel devido às suas vantagens bem reconhecidas, como boa estabilidade térmica e facilidade de reutilização da lipase (TIAN *et al.*, 2017). As lipases não específicas de *Candida antarctica*, *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) e *Pseudomonas fluorescens* e lipases 1,3-específicas de *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* e *Rhizomucor miehei* são comumente usadas como catalisadores para a

produção de biodiesel (GULDHE *et al.*, 2015). Entre estes, a lipase de *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) tem demonstrado resultados promissores (ABDULLA; RAVINDRA, 2013; DA RÓS *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2017).

A imobilização é o método mais utilizado para alcançar a estabilidade das lipases e torná-las mais atraentes para uso industrial. As técnicas comuns de imobilização incluem a adsorção física sobre um suporte sólido, ligação covalente a um suporte sólido e encapsulação em matriz polimérica (MA *et al.*, 2017; MORENO-PIRAJÀN; GIRALDO, 2011).

A adsorção é o método mais simples e tradicional para imobilização de enzimas em suportes (Figura 2.2). A imobilização por adsorção baseia-se em fracas interações físicas entre a enzima e o suporte (van der Waals, ligações de hidrogênio). A adsorção pode ser preparada em condições suaves sem grande perda de atividade e o processo associado é relativamente fácil e de baixo custo. Além disso, o suporte pode ser facilmente recuperado possibilitando a reutilização da matriz. Com estas vantagens, a adsorção ainda é o método mais utilizado para a imobilização da lipase (TAN *et al.*, 2010; POPPE *et al.*, 2015; NARWAL; GUPTA, 2013; NORAINI *et al.*, 2014). Embora a adsorção tenha suas vantagens comerciais especiais por sua alta atividade em direção à produção de biodiesel a baixo custo, a lipase pode ser desorvida do suporte devido às fracas forças de adesão entre a enzima e o suporte, isto é, a lipase imobilizada pode não ser suficientemente estável para evitar que seja desorvida durante o processo catalítico (TAN *et al.*, 2010). Celite, polipropileno de celulose, terra de diatomáceas, polipropileno, membrana têxtil, sílica-gel e resina acrílica são suportes comumente usados na técnica de adsorção (GULDHE *et al.*, 2015).

Figura 2.2. –Técnica de adsorção física para a imobilização de enzimas.

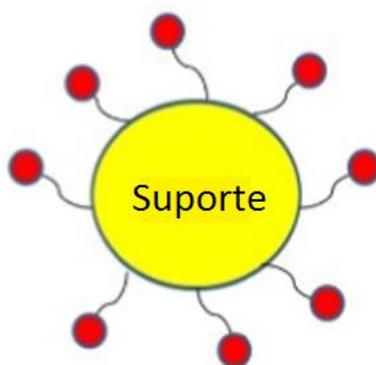


Fonte: Adaptado de Amini *et al.*, (2017).

Na imobilização por ligações covalentes (Figura 2.3), as enzimas são ligadas covalentemente ao suporte por grupos funcionais disponíveis na superfície da enzima (TAN *et al.*, 2010; POPPE *et al.*, 2015). Esse processo tem a vantagem esperada de ligação irreversível

da lipase à matriz de suporte. Com o método da ligação covalente, as interações fortes entre a lipase e o suporte tornam a lixiviação enzimática difícilmente ocorre durante o processo catalítico, proporcionando uma alta estabilidade de ligação e fácil manuseio do biocatalisador (TAN *et al.*, 2010). As ligações covalentes formadas entre os grupos aldeídos da superfície e os resíduos ativos de aminoácidos na superfície da enzima podem promover a estabilidade de suas estruturas tridimensionais, reduzindo assim as possíveis mudanças conformacionais induzidas por solventes e temperatura (SOUZA; MENDES; DE CASTRO, 2016; NORAINI *et al.*, 2014). Para permitir a imobilização covalente, a ativação química do suporte deve ser realizada pela adição de grupos como o glicidol ou epícloridrina que reagem preferencialmente com os grupos hidroxila do suporte. O glutaraldeído é um agente bifuncional usado como agente de ativação em técnicas de imobilização, que reage com os grupos amino do suporte. Outra característica importante do glutaraldeído é a sua capacidade de adsorver corantes hidrofóbicos (como a rosa bengala) mostrando o caráter hidrofóbico do suporte (TAN *et al.*, 2010). A imobilização covalente de uma enzima resulta em biocatalisadores mais estáveis geralmente com atividade enzimática reduzida, uma vez que a ligação ao suporte gera mudanças conformacionais da proteína (BENCZE *et al.*, 2016).

Figura 2.3. –Técnica de ligação covalente para a imobilização de enzimas.

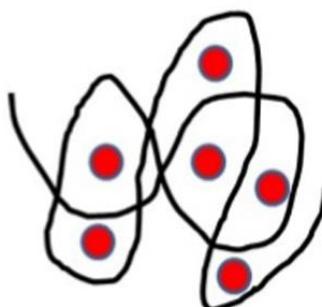


Fonte: Adaptado de Amini *et al.*, (2017).

O método de imobilização via encapsulamento (Figura 2.4) de uma lipase envolve a polimerização de materiais orgânicos em torno da proteína, resultando em confinamento da lipase dentro de uma matriz polimérica (material poroso). Em teoria, a enzima aprisionada não está ligada ao polímero, ou seja, a sua livre difusão é meramente retida. Como vantagens do método de encapsulação para imobilizar lipase podem ser citadas a rapidez, custo, facilidade e condições suaves. A conversão catalisada pela lipase aprisionada, até o momento, tem demonstrado baixo desempenho em função da difusão precária do substrato através dos poros

da matriz de suporte, limitações da transferência de massa, permeabilidade limitada e ao entupimento dos poros (TAN *et al.*, 2010; POPPE *et al.*, 2015; GULDHE *et al.*, 2015).

Figura 2.4. –Técnica de encapsulação para a imobilização de enzima.



Fonte: Adaptado de Amini *et al.*, (2017).

A Tabela 2.2 mostra uma comparação entre os diferentes métodos de imobilização enzimáticos.

Tabela 2.2. – Comparação dos diferentes métodos de imobilização enzimáticos.

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	Condições de preparo são fáceis, amenas e de baixo custo. O suporte pode ser regenerado e reutilizado.	A interação entre a lipase e o suporte é fraca, a capacidade de adsorção é pequena e a proteína pode ser removida do suporte.
Ligação covalente	A lipase imobilizada é bastante estável devido às forças de ligação entre a proteína e o suporte.	As condições de preparo são rigorosas, então a lipase pode ocasionar perda de atividade durante o processo de imobilização.
Encapsulamento	As condições de encapsulamento são moderadas e o método de imobilização é aplicado a uma gama de suportes e lipases.	A lipase imobilizada sempre apresenta restrição de transferência de massa durante o processo catalítico, então a lipase só é efetiva para substratos de baixa massa molecular.

Fonte: Adaptado de Tan *et al.*, (2010).

Estudos comparativos indicaram que a mesma molécula de lipase pode apresentar propriedades catalíticas muito diferentes após a imobilização em diferentes suportes. O desafio é, portanto, selecionar uma técnica de imobilização que permita obter atividade máxima de lipase, retenção e estabilidade no substrato de óleo (DA RÓS *et al.*, 2014).

2.3. Suportes

A seleção do suporte/matriz depende de vários fatores, como estabilidade térmica, durabilidade química, força mecânica, tipo de lipase e tipo de sistema de reação, facilidade de regeneração, capacidade de carga e seu custo (NARWAL; GUPTA, 2013). É importante escolher o suporte apropriado para a imobilização enzimática para que este possa interagir com as moléculas enzimáticas. As propriedades físicas e químicas bem como suas características para uma possível regeneração devem ser cuidadosamente analisadas. Sendo assim, o suporte deve ser escolhido de tal forma a promover fácil transferência de massa, melhor compatibilidade com o meio reacional, seja inerte com os reagentes, natureza mais ecológica e, o mais importante, que não bloqueie os sítios ativos da enzima (BADGUJAR; BHANAGE, 2017; POPPE *et al.*, 2015).

Um requisito importante para a imobilização de enzimas é que a matriz deve proporcionar uma área específica adequada além de fornecer um ambiente inerte e biocompatível, ou seja, não deve interferir na estrutura nativa da proteína. Os suportes para imobilização enzimática são geralmente selecionados com base em sua resistência mecânica, resistência microbiana, estabilidade térmica e química, polaridade, facilidade de regeneração, capacidade de carga e custo, sendo este último particularmente importante em aplicações industriais. Em geral, os suportes selecionados possuem boa estabilidade e uma grande variedade de substâncias químicas estão disponíveis. Eles também estão disponíveis em vários formatos, como grânulos porosos e monólitos, com o último apresentando uma excelente transferência de massa devido à sua estrutura porosa altamente permeável (URBAN; SVEE; FRÉCHET, 2012; CIPOLATTI *et al.*, 2014; KARIMI, 2016).

Vários materiais inorgânicos/orgânicos, sintéticos e naturais, com características diferentes como tamanho, forma, porosidade, hidrofobicidade e densidade, são utilizados como suportes na imobilização de lipases, tais como resinas poliméricas, sílica, cerâmica, nanotubos de carbono, partículas magnéticas e microesferas. A superfície do suporte deve ser projetada de forma a permitir que a lipase seja inserida dentro da estrutura interna do suporte e, portanto, materiais porosos são favoráveis. Além disso, os poros do suporte devem ser suficientemente grandes para auxiliar o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima e facilitar a saída dos produtos (AMINI *et al.*, 2017; POPPE *et al.*, 2015). Suportes com um diâmetro de poro muito pequeno podem ter seus poros bloqueados pela enzima após a imobilização, deixando uma grande porcentagem de suas superfícies internas inacessíveis ao substrato. Isso pode ocasionar menor eficiência de imobilização, reduzindo a capacidade da ação catalítica da enzima.

Portanto, os suportes porosos são geralmente preferidos devido à sua extensa área específica que permite maior carga de enzimas e melhor proteção da enzima imobilizada do meio ambiente (POPPE *et al.*, 2015).

Apesar de muitas vantagens de suportes inorgânicos (por exemplo, alta estabilidade contra degradação física, química e microbiana), a maioria das aplicações industriais é formada por matrizes orgânicas. A estrutura rígida tem a vantagem de não sofrer deformação da matriz quando comprimida em reatores do tipo coluna, proteção da enzima contra forças de cisalhamento e colaboração na manutenção da estrutura terciária da proteína. Além disso, uma variedade de grupos funcionais reativos pode ser "introduzido" em suportes orgânicos usando modificações químicas melhorando as características finais da enzima (POPPE *et al.*, 2015).

A imobilização pode reduzir o custo do biodiesel e aumentar a estabilidade da lipase. O tipo adequado de suporte é um fator chave na imobilização enzimática. Os suportes de enzimas são compostos de polímeros macroporosos e microporosos, matrizes de sílica sol-gel, sílica mesoporosa e outras cerâmicas porosas (YOU *et al.*, 2013). Os critérios para selecionar a técnica de imobilização e o suporte dependem da fonte de lipase, do tipo de sistema de reação (solvente orgânico ou sistema de duas fases) e as condições do processo (pH, temperatura e pressão) (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Vários trabalhos são encontrados na literatura que tratam das diferentes técnicas de imobilização de lipases, caracterização dos complexos ativados e aplicações em reações que se processam em meio aquoso ou não aquoso (SCHMID *et al.*, 2002; SALIS; MONDUZZI; SOLINAS, 2007). Entretanto, as mais recentes tecnologias de imobilização de enzimas requerem materiais com propriedades multifuncionais que não são encontradas nos materiais convencionais. Materiais híbridos orgânico-inorgânico constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações. Esses materiais apresentam como vantagens o fato de serem acessíveis e reutilizáveis. A síntese desses materiais híbridos pode ser alcançada por modificação da estrutura inorgânica com os componentes orgânicos, obtendo um sistema que consegue combinar a durabilidade e a estabilidade inorgânica com a plasticidade e as propriedades específicas normalmente associadas aos materiais orgânicos.

Dentre os materiais híbridos orgânico-inorgânicos podem ser citados os biocompósitos que são produzidos por meio da biomineralização natural. Nestes materiais, os minerais inorgânicos são depositados e crescem *in situ* na matriz polimérica orgânica em condições

moderadas, que controlam o processo de biomineralização envolvendo as etapas de nucleação, seleção polimorfa, direção do crescimento cristalino e orientação cristalográfica dos minerais.

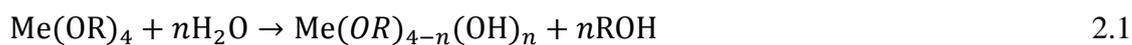
Um sistema usado para estudar a deposição dos minerais inorgânicos *in situ* em uma matriz polimérica orgânica é o processo sol-gel, sendo este, o mais empregado. Os materiais de partida utilizados no processo sol-gel incluem alcóxidos metálicos, Me(OR)_n , e uma pequena porção de ácidos ou bases como catalisador (JOSÉ; PRADO, 2005; TODOROVA; CHERNEV; DJAMBAZOV, 2014; YANO; IWATA; KURITA, 1998).

2.3.1. Processo sol-gel

O processo sol-gel é o nome dado a uma série de processos em que uma solução, ou sol, sofre transição sol-gel que envolve um sistema de um "sol" líquido (principalmente coloidal) para uma fase sólida de "gel". Ao aplicar esta metodologia, é possível fabricar materiais cerâmicos ou de vidro em uma ampla variedade de formas: pós em formas ultrafinas ou esféricas, revestimentos de película fina, fibras cerâmicas, membranas inorgânicas microporosas, cerâmicas monolíticas e materiais porosos de aerogel (SOARES *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2008). Este método tem sido amplamente investigado por ser um processo de baixo custo, apresentar fácil manipulação das amostras, baixa temperatura do processo, simplicidade do sistema e operação, bom controle da composição do filme e a viabilidade de fabricar filmes em pequenas e grandes áreas para aplicações industriais (LIN; TSAI; CHANG, 2017; LI *et al.*, 2012; PÉREZ-GONZALEZ *et al.*, 2015).

Na metodologia sol-gel, é essencial preparar uma solução homogênea contendo o precursor catalítico para coagular uniformemente a solução. Uma vez que a taxa de polimerização de diferentes precursores varia consideravelmente, é necessário testá-los em relação aos seus níveis reativos em solventes polares para formar a matriz, ou para aumentar a sua taxa de condensação, com a adição de um ácido ou base (SOARES *et al.*, 2004). A técnica sol-gel também é um excelente método para preparar material híbrido. A síntese a baixa temperatura permite que materiais orgânicos ou inorgânicos sejam incorporados em matrizes rígidas de óxido de silício sem degradação. O composto resultante combina as propriedades químicas e físicas do material com a ótima estabilidade ótica, térmica e química das matrizes de óxido de silício o que leva a melhorias significativas na homogeneidade química, estequiometria, pureza de fase e maior área específica (SANTOS *et al.*, 2008; BHOSALE; SHENDE; PUSZYNSKI, 2012).

Em um processo típico sol-gel, o precursor é convertido em material vítreo por meio de uma série de reações de “polimerização” inorgânica que envolve duas etapas. Na primeira (equação 2.1), a hidrólise do precursor alcóxido de um metal ou de um semimetal leva à formação de um produto hidroxilado e o álcool correspondente (MENDES *et al.*, 2011; PURCAR *et al.*, 2012):



Em que:



Em seguida, ocorre uma condensação entre um grupamento não hidrolisado do alcóxido e uma hidroxila (equação 2.2) ou entre duas hidroxilas (equação 2.3) com formação de uma mistura coloidal chamada de “sol”:



Os híbridos de epóxi-sílica são conhecidos como materiais eficientes na aplicação de alto desempenho por apresentarem melhor resistência mecânica e estabilidade térmica. O processo de sol-gel envolve principalmente hidrólise e policondensação de precursores de alcóxidos metálicos, sendo o tetraetilortosilicato (TEOS) o mais utilizado (MENDES *et al.*, 2011; PONYRKO *et al.*, 2013). Sua compatibilidade com diferentes biopolímeros como celulose, álcool polivinílico, β -Ciclodextrina, carragenana e quitosana é amplamente reportada na literatura (MENDES *et al.*, 2011; MARTIN *et al.*, 2018).

O processo sol-gel tem sido um método atraente para imobilização de enzimas, pois permite o encapsulamento enzimático dentro da matriz inorgânica à temperatura ambiente, permitindo a estabilização das proteínas e evitando assim sua desativação (SOARES *et al.*, 2004; MÓDOLO *et al.*, 2013). Além disso, a inserção fácil de grupos substituintes na matriz de silicato pode proporcionar às enzimas aprisionadas um microambiente benéfico. Portanto, não é surpreendente que um grande esforço tenha sido dedicado ao desenvolvimento de processos de encapsulamento para aumentar a atividade enzimática, especialmente aquelas com lipases que apresentam aplicação potencial em vários processos industriais (SOARES *et al.*, 2004). Para expandir ainda mais a sua utilidade sintética, são necessários métodos eficientes para

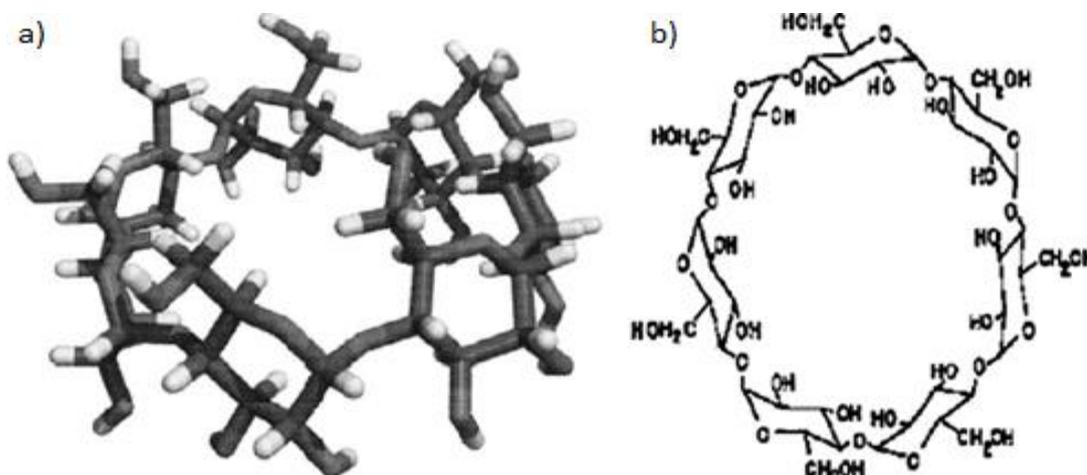
imobilizar lipases, uma vez que a imobilização permite a reutilização enzimática e, assim, reduzindo os custos gerais do processo (SANTOS *et al.*, 2008).

No presente trabalho, foi utilizado a matriz SiO₂-βCD como suporte híbrido, obtida pela técnica sol-gel, a partir do componente de tetraetilortossilicato (TEOS) e β-ciclodextrina (βCD). O composto orgânico de β-Ciclodextrina já foi reportado, na literatura, para obtenção do híbrido SiO₂-β-Ciclodextrina (SiO₂-βCD) e utilizado como suporte para imobilizar a lipase *Burkholderia cepacia* (MARTIN *et al.*, 2018).

2.3.2. Suporte híbrido SiO₂-β-Ciclodextrina (SiO₂-βCD)

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, de 1→4 monómeros de α-D-glicose ligados, que apresentam uma superfície externa hidrofílica e uma cavidade central hidrofóbica relativamente menor (em comparação com a água) que são capazes de encapsular uma ampla gama de compostos orgânicos e inorgânicos (NAVARRO *et al.*, 2016; CHAUDHURI; CHAKRABORTY; SENGUPTA, 2010; MANUNZA *et al.*, 1997; OZMEN; YILMAZ, 2009). As ciclodextrinas são nomeadas em: alfa (α), beta (β) e gama (γ), compostas por 6, 7 e 8 unidades de D-glicose, respectivamente. Dentre as três ciclodextrinas (CDs) a β-ciclodextrina (β-CD) é a mais utilizada porque está prontamente disponível além de possuir um tamanho de cavidade adequado (CHAUDHURI; CHAKRABORTY; SENGUPTA, 2010; GIDWANI; VYAS, 2014). Muito interesse na ciclodextrina se deve à sua capacidade de encapsular moléculas hidrofóbicas com tamanho adequado para formar complexos de inclusão e, em seguida, alterar propriedades físicas, químicas e biológicas das moléculas encapsuladas. A Figura 2.5 mostra a representação esquemática da β-Ciclodextrina (CHAUDHURI; CHAKRABORTY; SENGUPTA, 2010; MANUNZA *et al.*, 1997). Outra vantagem de se utilizar a ciclodextrina é a presença de diversos grupos OH, isto porque o glutaraldeído (agente de ativação do suporte) é capaz de reagir com os grupos OH da superfície do suporte e com os grupos amina da enzima, resultando em bandas semelhantes às da proteína livre (PAULA *et al.*, 2008).

Figura 2.5. – Representação esquemática da β -ciclodextrina. (a) Molécula de β -ciclodextrina e (b) Estrutura da β -ciclodextrina.



Fonte: Adaptado de Chakraborty *et al.*, (2010); Manunza *et al.*, (1997).

As ciclodextrinas são moléculas toroidais com uma conformação semelhante a um cilindro cônico. Suas estruturas cilíndricas com cavidades de aproximadamente 0,7 nm de profundidade e 0,5-0,8 nm de diâmetro interno produzem vários tipos de propriedades únicas. A propriedade atraente da ciclodextrina é a presença de muitos grupos hidroxila em unidades de glicose, isto é, 18, 21 e 24 para α , β e γ -CD (Figura 2.6) (BOSCOLO; TROTTA; GHIBAUDI, 2010; GIDWANI; VYAS, 2014; NGIM; GU; CATALANO, 2009). Este vazio central de baixa polaridade é capaz de encapsular (parcial ou totalmente) uma grande variedade de moléculas de tamanho, forma, estrutura e dimensões adequadas, resultando em uma associação estável sem formação de ligação covalente (GIDWANI; VYAS, 2014).

Figura 2.6. – Representação esquemática das ciclodextrinas.



Fonte: Adaptado de Gidwani; Vyas, (2014).

As ciclodextrinas (CDs) foram amplamente utilizadas como aditivos para aumentar a solubilidade de compostos orgânicos pouco solúveis em água, pela formação de um complexo de inclusão entre a molécula hospedeira de ciclodextrina e a molécula hóspede

(CHAKRACORTY *et al.*, 2010). São frequentemente utilizadas para solubilizar moléculas orgânicas em meios aquosos, uma vez que podem alojar porções hidrofóbicas dentro da sua cavidade, enquanto a superfície externa é solvatada. As ciclodextrinas podem ser reticuladas por reação entre grupos OH e um ligante químico para formar um material insolúvel em água. Sua interação com enzimas já foi reportada na literatura, resultando em aumento na estabilidade enzimática e velocidade de reação em reações catalisadas por enzimas em solventes orgânicos (BOSCOLO; TROTTA; GHIBAUDI, 2010; OZMEN; YILMAZ, 2009).

Na literatura, a eficiência do biocatalisador de lipase-SiO₂-β-Ciclodextrina foi testada com sucesso na síntese de biodiesel a partir do óleo de palmiste em processo descontínuo. As reações foram efetuadas em reatores de vidro cilíndrico encamisados com capacidade para 70 mL, acoplados com condensador de refluxo (Figura 2.7) nas seguintes condições: 20 gramas de meio reacional na razão molar óleo/etanol de 1:8 incubados com uma quantidade de biocatalisador para satisfazer a relação previamente estabelecida de 600 unidades de atividade por grama de matéria-prima lipídica. As sínteses foram efetuadas a 45 °C por um período total de 72 h e agitação magnética de 150 rpm, fornecendo rendimentos praticamente totais ($\cong 97\%$) (MARTIN *et al.*, 2018).

Figura 2.7. – Aparato experimental utilizado nas reações de etanólise do óleo de palmiste.



Fonte: Adaptado de Martin *et al.*, (2018).

2.4. Biodiesel

Devido à diminuição das reservas de petróleo assim como seus preços oscilantes, aliado ao consumo excessivo de combustíveis líquidos e às preocupações ambientais para reduzir a poluição devido às emissões aumentadas de gases de efeito estufa associadas ao consumo excessivo de produtos à base de petróleo, especialmente para fins de transporte, fizeram do biodiesel, que é derivado total ou parcialmente da biomassa, uma alternativa à crise energética.

Isso é devido às vantagens de sustentabilidade, biodegradabilidade e alta combustão eficiência, além da sua capacidade de ser usado em motores existentes sem modificações substanciais independentemente da sua origem e matérias-primas a partir das quais é derivado (YING *et al.*, 2017; TIAN *et al.*, 2017; ILMI *et al.*, 2017; PATEL *et al.*, 2017; BAJAJ *et al.*, 2010; KUEPETHKAEW *et al.*, 2017). Vários países estabeleceram metas para substituir uma parte da energia necessária que deverá ser produzida a partir de recursos renováveis, sendo assim, o diesel não é exceção, e deverá ser substituído por biodiesel para determinados usos (ALI *et al.*, 2017). A produção mundial de biodiesel cresceu muito nos últimos anos saltando de 2,4 bilhões de litros por ano em 2004 para 45 bilhões de litros por ano em 2019. A Figura 2.8 mostra a evolução da produção de biodiesel no decorrer dos últimos 13 anos (BOCKEY, 2019).

Figura 2.8. – Produção mundial de biodiesel por ano (bilhões de litros).



Fonte: Adaptado de Bockey, (2019).

Cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos no Brasil são renováveis. Em todo o mundo, 86% da energia vêm de fontes de energia não renováveis. Pioneiro no uso de biocombustíveis, o Brasil alcançou uma posição desejada por muitos países na busca de fontes renováveis de energia como alternativas estratégicas ao petróleo (DE ARAÚJO *et al.*, 2013). De acordo com a Resolução da Agência Brasileira de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP o biodiesel (B100) é definido como um combustível composto de ésteres de alquila de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos ou gorduras. A mistura de óleos diesel e biodiesel, denominada BX, é um combustível comercial composto por (100 - X)% em volume de óleo diesel e X% em volume de biodiesel (KUSS *et al.*, 2015). Em 2004, o governo brasileiro iniciou o Programa Nacional de Produção de Biodiesel (PNPB - Programa

Nacional de Produção e Uso do Biodiesel), com a intenção de usar biodiesel para substituir, em partes ou totalmente, o diesel do petróleo para veículos leves, caminhões, tratores e geradores (mistura de 2-5%). Em 2008, a mistura de biodiesel no Brasil foi legalmente estabelecida. Iniciando a obrigação de adicionar 2% de biodiesel ao diesel, esta taxa foi elevada para 5% em 2010 e o uso obrigatório de B11 a partir de 2019 com a expectativa de chegar em 15% no ano de 2023 (ANP, 2019). Na última década (2005 - 2015), a produção brasileira de biodiesel aumentou rapidamente de 0,736 milhões de litros para 3,9 bilhões de litros, fazendo do Brasil um dos principais produtores mundiais de biodiesel. Entre todos os insumos, a soja é a matéria-prima predominante para a produção de biodiesel, com contribuição de 77% para a produção total de biodiesel em 2014 no Brasil (KUSS *et al.*, 2015; CERRI *et al.*, 2017).

O biodiesel é produzido, principalmente, a partir da transesterificação de gorduras animais ou vegetais e um álcool de cadeia curta (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017; TIAN *et al.*, 2017; ALI *et al.*, 2017; BUDZAKI *et al.*, 2017; SAKAI *et al.*, 2010). O processo requer uma simples reação global envolvendo como materiais de partida triacilgliceróis e álcool que reagem em temperaturas suficientes com a ajuda de catalisadores homogêneos (NaOH, KOH), heterogêneos (BaO, MgO / SiO₂, SrO / SiO₂) ou biocatalisadores (lipases). A reação também pode ser realizada sem catalisadores sob condições supercríticas. A reação produzirá ésteres de metila ou etila de ácidos graxos (biodiesel) e como coproduto o glicerol bruto. A possibilidade de usar qualquer combinação de triacilgliceróis e álcoois significa que o biodiesel pode ter uma gama de propriedades físicas e composições químicas (HAMDAN *et al.*, 2017; SALES; GHIRARDI; JORQUERA, 2017; MA *et al.*, 2017; SALUM *et al.*, 2010; TRAN *et al.*, 2014). São utilizados triacilgliceróis de várias fontes, incluindo óleo vegetal, gordura animal, óleo residual ou óleo microbiano (SALUM *et al.*, 2010; ARUMUGAN; PONNUSAMI, 2014; YAN *et al.*, 2014).

O biodiesel possui propriedades semelhantes ao combustível fóssil, como densidade, viscosidade cinemática, ponto de inflamação, ponto de fluidez, número de cetano, teor de cinzas, teor de água e maior valor de aquecimento. Nos motores de combustão interna, pode ser usado como biodiesel puro (100% de biodiesel, denominado B100) ou misturado com diesel de petróleo convencional como B5 (5% de mistura de biodiesel), B10 (10% de biodiesel), B20 (20% de biodiesel) e assim por diante. A combustão do biodiesel é mais completa em comparação com o diesel fóssil porque o biodiesel contém mais oxigênio em sua estrutura (BUDZAKI *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2017). O número de cetano do biodiesel, o conteúdo energético, a viscosidade e outras características do biodiesel também são semelhantes aos do

combustível diesel baseado em petróleo. Além disso, o biodiesel é essencialmente isento de enxofre e compostos aromáticos e os motores a diesel alimentados por biodiesel emitem significativamente menos partículas, hidrocarbonetos, monóxido de carbono e dióxido de carbono do que aqueles operados por diesel fóssil (MORENO-PIRAJÀN; GIRALDO, 2011; NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005; SAEIDI *et al.*, 2016; MACARIO; GIORDANO, 2013; TAN *et al.*, 2017). O biodiesel também possui propriedades de lubrificação superiores e, assim, aumenta a eficiência e a vida útil do motor. Finalmente, o biodiesel não produz vapores explosivos e tem um ponto de fulgor relativamente alto. Conseqüentemente, as características de transporte, manuseio e armazenamento do biodiesel são mais seguras do que as propriedades correspondentes do combustível diesel convencional (CHOI *et al.*, 2016; BUASRI *et al.*, 2012).

No entanto, a produção em escala industrial de biodiesel é limitada devido aos subprodutos indesejáveis, à recuperação de glicerol, à remoção de sais inorgânicos e água, ao tratamento de águas residuais e à exigência de alta energia (CHEN *et al.*, 2011). Além disso, o biodiesel apresenta menor poder calorífico e as emissões de NOx também são ligeiramente superiores às dos motores diesel que operam em combustíveis diesel convencionais (MORENO-PIRAJÀN; GIRALDO, 2011; NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005).

O biodiesel tem muitos benefícios, assim como algumas limitações como já explicado. Os principais benefícios do uso de biodiesel como combustível são (MAHMUDUL *et al.*, 2017):

- O biodiesel emite menos emissões, como CO₂, CO e SO₂ em comparação com o diesel;
- Produzir biodiesel é mais fácil que o diesel e é menos demorado;
- O biodiesel pode fazer o veículo funcionar melhor, pois tem maior índice de cetano;
- O biodiesel prolonga a vida do motor e reduz a necessidade de manutenção;
- Pode ser usado sem adicionar lubrificante adicional, ao contrário do motor diesel;
- O biodiesel possui grande potencial para estimular o desenvolvimento rural sustentável e é uma solução para a questão da segurança energética;
- O biodiesel é mais eficiente do que o diesel porque é produzido localmente;
- O biodiesel não precisa ser perfurado, transportado ou refinado como diesel;
- O biodiesel é melhor que o petrodiesel em relação ao teor de enxofre, ponto de fulgor, conteúdo aromático e biodegradabilidade;
- É mais seguro manipular, por ser menos tóxico, biodegradável e ter ponto de fulgor mais alto;

- Não inflamável e não tóxico, reduz emissões de escape, fumaça visível e odores nocivos;
- Nenhuma modificação necessária do motor até B20;
- Maior eficiência de combustão, portabilidade, disponibilidade e renovabilidade do biodiesel.

O biodiesel também possui algumas desvantagens que são dadas da seguinte forma:

- Emite emissões de NOx mais elevadas que o diesel;
- O biodiesel tem uma natureza corrosiva em contato com o cobre e o bronze;
- Maior viscosidade devido à elevada massa molecular e estrutura química dos óleos vegetais leva a um problema no bombeamento, combustão e atomização no sistema de injeção de um motor a diesel;
- Biodiesel leva a uma menor velocidade e potência do motor.
- Degradação do biodiesel sob armazenamento por períodos prolongados.
- O biodiesel causa desgaste excessivo do motor.

Os biocombustíveis de primeira geração são derivados principalmente de culturas comestíveis usando tecnologias convencionais, entretanto, o óleo derivado de fontes comestíveis não pode satisfazer o requisito de produção de biodiesel em grande escala e é necessário pesquisar novos recursos renováveis não comestíveis (PATEL *et al.*, 2017; TRAN; CHEN; CHANG, 2013). A Tabela 2.3 mostra as principais matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel.

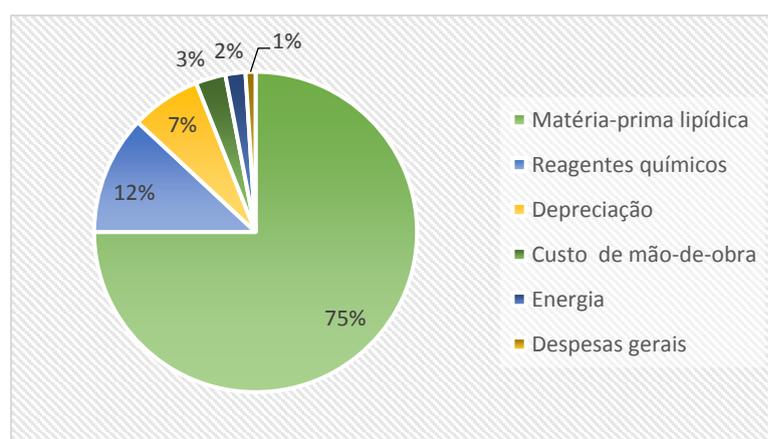
O custo do biodiesel é baseado nas matérias-primas e no processamento necessário, sendo assim, o alto custo dos óleos vegetais virgens torna o biodiesel incapaz de competir comercialmente com o petrodiesel. O biodiesel tem mais do dobro do preço do petrodiesel e a matéria-prima é responsável por cerca de 60-90% do custo operacional total (KUAN *et al.*, 2013; TRAN *et al.*, 2012; DE ARAÚJO *et al.*, 2013; RAKKAN *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2015).

Tabela 2.3. – Matérias-primas para a produção de biodiesel.

Matéria-prima	Exemplo	Explicação
Óleo vegetal	Comestível: colza, soja, coco, palma, girassol, oliva, amendoim e gergelim. Não comestível: Algas, algodão, <i>Jatropha curcas</i> e <i>Pongamia</i> .	Compete com os alimentos para ser utilizado como substituto do diesel. Matéria-prima de 2ª geração irá substituir os óleos comestíveis.
Gordura animal	Gordura de frango, graxa amarela e óleo de peixe.	Fonte de TAG, DAG e MAG
Óleo de cozinha usado	Óleos utilizados no processamento de alimentos.	Recicla produtos e previne problemas com depósitos de lixo.

Fonte: Adaptado de Zaharin *et al.*, (2017).

Desta forma, fontes não comestíveis são investigadas como sendo uma fonte potencial de produção de biodiesel (TONGROON *et al.*, 2017). A Figura 2.9 apresenta os custos gerais para a produção de biodiesel.

Figura 2.9. – Custos gerais do processo de produção de biodiesel.

Fonte: Adaptado de Koh; Ghazi, (2011).

2.5. Matérias-primas para a produção de biodiesel

No Brasil, muitas sementes oleaginosas são utilizadas, embora a soja seja a principal matéria-prima para a produção de biodiesel no Brasil, existe um potencial de cultivo de outras oleaginosas com melhores rendimentos de óleo por hectare e também cultivares específicas para cada região do país, como algodão, amendoim, girassol, óleo de palma, mamona, canola e *Jatropha curcas* ("pinhão manso") (KUSS *et al.*, 2015).

Atualmente, cerca de 350 culturas de óleo vegetal foram identificadas em todo o mundo para a produção de biodiesel, que é dividida em óleo comestível e óleo não comestível. As fontes de óleo comestíveis mais comuns são: óleo de amendoim, óleo de soja, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de farelo de arroz, óleo de palma, óleo de coco e óleo de canola. As fontes comuns de óleo não comestíveis são: *Jatropha curcas*, *Pongamia pinnata*, óleo de semente de algodão, óleo de peixe, óleo de semente de damasco, óleo de mamona, óleo de linhaça, *Mahua longifolia* e *Moringa oleífera*. Além das culturas oleaginosas, óleos microbianos, terpenos, resíduos de óleo de cozinha e gorduras animais também são utilizados para a produção de biodiesel (MAHMUDUL *et al.*, 2017; PARAWIRA, 2009; POPPE *et al.*, 2015; ARUMUGAN; PONNUSAMI, 2014; BRASK *et al.*, 2011; KOH; GHAZI, 2011). A escolha da matéria-prima depende da sua disponibilidade com respeito à área geográfica (BUDZAKI *et al.*, 2017). A Tabela 2.4 apresenta o conteúdo de óleo e a produção de sementes e de óleos não comestíveis.

Tabela 2.4. – Conteúdo de óleo e produção de sementes e de óleos não comestíveis.

Espécie	Conteúdo de óleo (%)	Produção de semente (x 10 ⁶ toneladas/ano)	Produção de óleo (toneladas/hectare/ano)
<i>Jatropha</i>	50-60	0,20	2,0-3,0
<i>Mahua</i>	35-40	0,20	1,0-4,0
<i>Pongamia</i>	30-40	0,06	2,0-4,0
Mamona	45-50	0,25	0,5-1,0
Linhaça	35-45	0,15	0,5-1,0
Outros	10-50	0,50	0,5-2,0

Fonte: Adaptado de Koh; Ghazi, 2011.

Aproximadamente 95% do biodiesel no mundo é produzido a partir de óleos vegetais comestíveis. Um dos parâmetros mais importantes para a síntese comercial e a utilização do biodiesel é a seleção de uma matéria-prima de baixo custo. O uso de óleo vegetal comestível para a produção de biodiesel tem impacto social e econômico adverso na população global aumentando seu custo, bem como o custo dos alimentos devido à menor disponibilidade de óleos vegetais. Portanto, o uso de óleo não comestível para a produção de biodiesel pode reduzir a inflação dos preços dos alimentos. As culturas não comestíveis podem ser plantadas em muitas partes do mundo, que têm enormes extensões de terras. Isso reduzirá a taxa de desmatamento e evitará a concorrência com as culturas alimentares. Além disso, as culturas e árvores de óleo vegetais não comestíveis são mais eficientes e amigáveis com o meio ambiente. Os biocombustíveis gerados a partir de sementes oleaginosas não comestíveis ignoram o dilema de "alimento versus combustível" (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017; NARAYANAN; DE,

2015; PARAWIRA, 2009; KOH; GHAZI, 2011). Entre os óleos não comestíveis, o proveniente de *Jatropha curcas* possui grande potencial para a produção de biodiesel (KAWAKAMI; ODA; TAKAHASHI, 2011).

Há aproximadamente cerca de 170 espécies de plantas, arbustos e árvores. A maioria dessas espécies nativas pertence à América e pertence à família Euphorbiaceae. *Jatropha curcas* é uma das principais espécies utilizadas para a produção de óleos (Biodiesel), e sua torta também pode ser usada como alimento para peixes e animais assim como fertilizantes orgânicos. O custo de produção da *Jatropha curcas* é baixo devido à sua rusticidade e facilidade de cultivo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (temperaturas entre 16,5-32,5 °C) com diferentes regimes pluviométricos (entre 944 e 3121 mm/ano) sem irrigação e em solos com baixa fertilidade, o que reduz a concorrência de terras agrícolas, e diminui o preço do biodiesel. A produção de sementes em cultivo é de cerca de 1,5-2,5 t por hectare, correspondendo a rendimentos de óleo de 500-720 litros por hectare. Possui período de gestação mais curto e produz sementes por 50 anos. Óleo de *Jatropha curcas* não é comestível devido à presença dos ésteres de forbol tóxicos. É uma árvore perene resistente à seca e à praga, cultivada na América Central e do Sul, no Sudeste Asiático, na Índia e na África (TAMILSELVAN; NALLUSAMY; RAJKUMAR, 2017; LAVIOLA *et al.*, 2017; KUMAR; SINGH; KUMAR, 2017; YAAKOB *et al.*, 2012; QIAN; SHI; YUN, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2014). Este tipo de condição é encontrado no nordeste do Brasil, onde há grande área árida que precisa de desenvolvimento (ARAÚJO *et al.*, 2014). A Figura 2.10 mostra a origem da planta de *Jatropha* e as possíveis áreas de cultivo da planta no mundo.

O óleo de *Jatropha curcas* é uma matéria-prima potencial na produção de biodiesel devido às suas excelentes propriedades como baixa acidez, boa estabilidade à oxidação e baixa viscosidade. Além disso, a *Jatropha* é uma planta resistente à seca que pode crescer em terras de resíduos com uma demanda mínima de água e fertilizantes (TAN *et al.*, 2010; TAPANES *et al.*, 2017; KOH; GHAZI, 2011; FARFAN-CABRERA; GALLARDO-HERNÁNDEZ; PÉREZ-GONZÁLEZ, 2017; SOUZA; MENDES; DE CASTRO, 2016).

Figura 2.10. – Centro da origem da planta de *Jatropha* e áreas possíveis de cultivo da planta de *Jatropha* no mundo.



Fonte: Adaptado de Laviola *et al.*, (2017).

As sementes da *J. curcas* contêm entre 40,0-60% de óleo, 4,0-4,7% de cinzas, 3,7-10,1% de fibra, 17,8-28,9% de proteína e 4,4-5,5% de umidade. A composição do óleo das sementes inclui os ácidos cáprico (0,0-0,1%), mirístico (0,0-1,4%), palmítico (10,5-19,5%), palmitoleico (0,8-1,4%), esteárico (2,3-9,7%), oleico (34,3-53,0%), linoleico (20,0-44,4%), linolênico (0,0-3,0%), araquidônico (0,0-0,4%) e beénico (0-0,02%) (ARAÚJO *et al.*, 2014; ABDULLA; RAVINDRA, 2013). Uma vez que o óleo de *Jatropha curcas* consiste principalmente em ácidos oleicos e linoleicos que são ácidos graxos não saturados, o biodiesel produzido tem boas propriedades (KOH; GHAZI, 2011).

Dentre as possibilidades de se produzir biodiesel utilizando óleos vegetais, a utilização do óleo de pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) como matéria-prima é bastante reportada na literatura. Os trabalhos científicos publicados para a reação de transesterificação enzimática de biodiesel empregando óleo de pinhão-mansão apresentam resultados semelhantes aos demais óleos vegetais mostrando o seu potencial nessa área. A Tabela 2.5 apresenta exemplos de trabalhos publicados utilizando o óleo de pinhão-mansão como matéria-prima para produção enzimática de biodiesel.

Ma *et al.* (2017) estudaram a produção de biodiesel por transesterificação enzimática a partir do óleo de pinhão-mansão com etanol utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em microesferas de silicone como catalisador. As condições da reação foram: temperatura de 50 °C; 200 rpm de agitação; razão molar óleo/álcool 1:5; tempo de reação de 30 horas. Foi utilizado um reator de tanque agitado (STR) (15 mL) e ao final do processo foi alcançada uma conversão em ésteres de 96,10%.

Tabela 2.5. – Trabalhos publicados para a produção enzimática de biodiesel utilizando óleo de pinhão-mansão como matéria-prima.

Biocatalisador	Razão molar óleo/álcool	Condições operacionais	Rendimento (%)	Referência
<i>B. cepacia</i> em esferas de silicone	1:5	STR, 30 h, 50°C	96,10	MA <i>et al.</i> , 2017.
<i>B. cepacia</i> em silicatos hidrofóbicos	1:3	STR, 12 h, 40°C PBR, 49 dias vazão = 0,06mL/h	90 60-70	KAWAKAMI, ODA, AKAHASHI, 2011.
<i>B. cepacia</i> em atapulgita modificada	1:6.6	STR, 24 h, 35°C	94	YOU <i>et al.</i> , 2013.
<i>B. cepacia</i> em SiO ₂ -PVA	1:7	STR, 48 h, 45°C	98,90	CARVALHO <i>et al.</i> , 2013.
<i>T. lanuginosus</i> em partículas magnéticas	1:3	STR, 48 h, 40°C	88	ZHANG <i>et al.</i> , 2015.
<i>B. cepacia</i> em celite	1:4	Vial, 8 h, 50°C	98	SHAH; GUPTA, 2007.
<i>B. cepacia</i> em alginato/ κ -carragenina	1:10	STR, 24 h, 35°C	100	ABDULLA; RAVINDRA, 2013.

Fonte: o autor.

Kawakami, Oda; Takahashi (2011) avaliaram a produção de biodiesel por transesterificação enzimática operando de maneira descontínua e contínua a partir do óleo de pinhão-mansão com metanol e utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em silicatos hidrofóbicos como catalisador. As condições da reação descontínua foram: temperatura de 40 °C; razão molar óleo/álcool 1:3; tempo de reação de 12 h. Foi utilizado um reator de tanque agitado (STR) (20 mL) e ao final do processo foi alcançada uma conversão em ésteres de 90%. Para o processo contínuo as condições foram: temperatura de 40 °C; razão molar óleo/álcool 1:3; a uma vazão de 0,06 mLh⁻¹; reator de leito fixo (PBR) com coluna (0,01 cm x 10 cm) empacotada com 1,87 gramas de biocatalisador. O rendimento foi da ordem de 60-70% durante 49 dias de operação.

You *et al.* (2013) avaliaram a produção de biodiesel por transesterificação enzimática a partir do óleo de pinhão-mansão com etanol utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em atapulgita modificada como catalisador. As condições da reação foram: temperatura de 35 °C; 150 rpm de agitação; razão molar óleo/álcool 1:6,6; tempo de reação 24

h. Foi utilizado um reator de tanque agitado (STR) (25 mL) e ao final do processo foi alcançada uma conversão em ésteres de 94%.

Carvalho *et al.* (2013) estudaram a produção de biodiesel por transesterificação enzimática a partir do óleo de pinhão-manso com etanol utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA como catalisador. As condições da reação foram: temperatura de 45°C; 150 rpm de agitação; razão molar óleo/álcool 1:7 ou 1:9; tempo de reação de 48 horas. Foi utilizado um reator de tanque agitado (STR) (50 mL) e ao final do processo foi alcançada uma conversão em ésteres de 98,90%.

Zhang *et al.* (2015) avaliaram a produção de biodiesel por transesterificação enzimática a partir do óleo de pinhão-manso com metanol utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em partículas magnéticas ativadas. As condições da reação foram: temperatura de 40 °C; 220 rpm de agitação; razão molar óleo/álcool 1:3; tempo de reação de 48 horas. Foi utilizado um reator de tanque agitado (STR) (25 mL) e ao final do processo foi alcançada uma conversão em ésteres de 88%.

Shah e Gupta (2007) estudaram a produção de biodiesel por transesterificação enzimática a partir do óleo de pinhão-manso com etanol utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em celite como catalisador. As condições da reação foram: temperatura de 50 °C; 200 rpm de agitação; razão molar óleo/álcool 1:4; tempo de reação de 8 horas. A reação ocorreu em um vial e ao final do processo foi alcançada uma conversão em ésteres de 98%.

Abdulla e Ravindra (2013) avaliaram a produção de biodiesel por transesterificação enzimática a partir do óleo de pinhão-manso com etanol utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em alginato/ κ -carragenina como catalisador. As condições da reação foram: temperatura de 35°C; razão molar óleo/álcool 1:10; tempo de reação de 24 horas. Foi utilizado um reator de tanque agitado (STR) (50 mL) e ao final do processo foi alcançada uma conversão em ésteres de 100%.

2.6. Tecnologias de produção de ésteres de etila

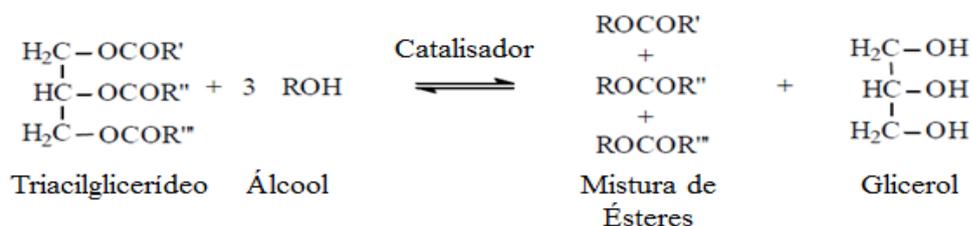
2.6.1. Transesterificação

A principal tecnologia para produzir biodiesel é a transesterificação de triacilgliceróis, presentes em óleos vegetais e gorduras animais, com alcoóis mediados por catalisadores químicos ou enzimáticos (lipases). A escolha do catalisador é crítica para projetar um processo eficiente, capaz de maximizar o valor dos produtos, minimizando a geração de resíduos e o

consumo de energia. A transesterificação também pode ser realizada por processos supercríticos a altas temperaturas e pressões sem usar qualquer catalisador. No entanto, a exigência de temperaturas mais elevadas (400 ° C) e pressão (450-650 bar) tornam a implementação industrial desse processo bastante desafiadora e dispendiosa. O tipo de catalisador (alcalino, ácido ou enzimático), concentração de catalisador, relação molar de álcool/óleo vegetal, temperatura de reação, teor de umidade e conteúdo de ácidos graxos livres (FFA) do óleo vegetal afetam o rendimento de ésteres no processo de transesterificação. A limitação mais importante na produção de biodiesel é a transferência de massa que depende da intensidade da mistura durante o processo de transesterificação entre o álcool e os triacilgliceróis. Isso porque esses reagentes não são miscíveis, formando duas camadas separadas devido à diferentes densidades e características de mistura incompatíveis. Portanto, é vital misturar os reagentes de forma que seja criada uma área interfacial alta aumentando assim a área de contato entre esses dois reagentes e aprimorando a transferência de massa (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017; ILMU *et al.*, 2017; VERDUGO *et al.*, 2011; AMINI *et al.*, 2017; TRAN *et al.*, 2012; SOUFI *et al.*, 2017).

A transesterificação é composta por três reações reversíveis sucessivas nas quais os triacilgliceróis e álcool na presença de catalisadores é convertido em diacilgliceróis que depois são convertidos em monoacilgliceróis que irão ser convertidos em ésteres de alquila de ácido graxo gerando o glicerol como coproduto. Uma quantidade de álcool superior à estequiométrica é utilizada para forçar o equilíbrio da reação em direção ao lado da formação de produto. Os alcoóis que podem ser utilizados no processo de transesterificação são metanol, etanol, propanol e butanol, sendo o metanol e o etanol usados com frequência. As misturas obtidas após a transesterificação são compostas por monoésteres de alquila de ácido graxo e classificadas como "biodiesel". Os monoésteres de alquila de ácido graxo podem ser ésteres de metila ou etila, respectivamente, se o álcool utilizado for metanol ou etanol (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017; BUDZAKI *et al.*, 2017; KUEPETHKAEW *et al.*, 2017; MANUNZA *et al.*, 1997; KARIMI, 2016). A Figura 2.11 mostra o processo de transesterificação global de um triglicerídeo.

Figura 2.11. – Processo de transesterificação de um triacilglicerídeo.



Fonte: Adaptado de Bajaj *et al.*, (2010).

O metanol é o álcool mais utilizado em reações de transesterificação devido ao seu baixo custo e suas vantagens químicas (composto polar e álcool de cadeia de carbono mais curta) e físicas. No entanto, o metanol é altamente tóxico (pode ser absorvido pela pele após a exposição), apresenta maior risco de explosão e é produzido principalmente a partir do petróleo, um combustível fóssil não renovável.

Por outro lado, o etanol é mais higroscópico do que o metanol e apresenta como vantagens uma maior afinidade em relação à umidade e uma toxicidade significativamente inferior. A utilização do etanol em um processo de produção de biodiesel utilizando enzimas como catalisador é vantajoso porque as propriedades da água resultam em forças atrativas fortes (as pontes de hidrogênio) que existem entre as suas moléculas. A molécula de água e seus produtos de ionização, H^+ e OH^- , influenciam profundamente a estrutura, a automontagem e as propriedades das enzimas. Enzimas possuem regiões superficiais polares e não-polares. Em um ambiente aquoso, essas duas regiões da molécula experimentam tendências conflitantes; a região hidrofílica interage favoravelmente com a água enquanto a região hidrofóbica tem a tendência de evitar o contato com a água. A quantidade de água ligada a enzima é fundamental para a atividade catalítica em meio não aquoso. Lipases são altamente ativas quando poucas moléculas de água estão associadas com a molécula protéica. Algumas enzimas necessitam menos de 50 moléculas de água por molécula de enzima para exibir sua atividade mínima (LIMA; ANGNES, 1999).

Além disso, o etanol é uma matéria-prima renovável e produz biodiesel com maior índice de cetano e estabilidade oxidativa, menor valor de iodo e melhor lubricidade e outras propriedades. A produção industrial atual de etanol é a partir de produtos agrícolas, portanto, a utilização de etanol para a produção de biodiesel, o torna um combustível completamente renovável (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017; ALI *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2010; POPPE *et al.*, 2015; SIMÕES *et al.*, 2015).

No Brasil, o etanol é produzido em larga escala e é mais rentável, os ésteres de etila de ácidos graxos (FAEEs) devem ser produzidos em vez de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs). O fornecimento de bioetanol para a produção industrial de biodiesel pode ser facilmente alcançado (SALES; GHIRARDI; JORQUERA, 2017).

2.6.2. Catálise homogênea

A conversão de triacilgliceróis em ésteres de alquila de ácido graxo pode ser eficientemente executada usando diferentes catalisadores. Os catalisadores homogêneos alcalinos e ácidos são os catalisadores mais utilizados (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017; PATEL *et al.*, 2017).

A transesterificação catalítica alcalina é um método de produção muito mais rápido e eficiente do que a transesterificação catalisada por ácido para a produção de biodiesel. Também é menos corrosiva para os equipamentos industriais, consequentemente, é o processo mais usado no mercado comercialmente. Os hidróxidos de sódio e potássio (KOH/NaOH) são os catalisadores alcalinos mais utilizados para converter o óleo em ésteres etílicos/metílicos de ácidos graxos (FAME/FAEE). Os catalisadores homogêneos também são muito sensíveis aos ácidos graxos livres (FFA) e aos teores de água presentes no óleo. Os altos conteúdos de FFA presentes nas matérias-primas são responsáveis pela formação de sabão quando catalisados com NaOH/KOH. A utilização de catalisadores homogêneos alcalinos adiciona etapas de separação e purificação ao processo de produção de biodiesel para garantir o cumprimento das especificações de biodiesel. A contaminação de glicerol produzida na transesterificação catalisada homogênea pelo catalisador afeta negativamente a qualidade do glicerol, o que reduz o valor do glicerol produzido. Durante a produção de biodiesel em escala industrial, grandes quantidades de águas residuais contaminadas também são geradas porque são necessárias várias etapas de lavagem do biodiesel com água para remover o catalisador. É muito difícil recuperar e reutilizar o catalisador homogêneo desse processo. Existe uma queda significativa na conversão de éster, quando o teor de FFA aumenta além de 2% (4 mg KOH /g) na matéria-prima. Tendo isso em mente os autores recomendam um limite de 1% de conteúdo FFA para o uso de catalisadores alcalinos (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017; PATEL *et al.*, 2017; AMINI *et al.*, 2017; DE; SIKDER; NARAYANAN, 2017; PARAWIRA, 2009).

No processo de transesterificação mediada por ácido, o catalisador não é afetado pela presença de FFAs. Os catalisadores ácidos são normalmente utilizados para converter FFAs em

ésteres de alquila para óleos com alto conteúdo de FFA, especialmente óleos de cozinha não comestíveis e com resíduos. Os ácidos fortes como o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido clorídrico (HCl) são os catalisadores ácidos mais utilizados no processo de transesterificação catalisada por ácido. No entanto, devido à maior corrosividade, o HCl não é preferido para a produção comercial de biodiesel. Para a conversão eficiente de triacilgliceróis usando catalisadores ácidos, o teor de umidade da matéria-prima deve ser inferior a 0,5% para atingir um rendimento de biodiesel superior a 90%. Com maior concentração de catalisador ácido, pode ser utilizada uma proporção menor de álcool para óleo. Para acelerar a taxa de reação, podem ser utilizadas temperaturas mais elevadas (90-95°C) no caso de catalisadores ácidos. Isto sugere que são necessárias condições de reação mais severas para as reações de transesterificação catalisadas por ácido em comparação com as reações de transesterificação catalisadas por base. O requisito de maiores quantidades de alcoóis e catalisadores, a duração da reação mais longa e a corrosão dos equipamentos por ácidos fortes, aliada à dificuldade de separar o biodiesel do excesso de álcool utilizado no processo, tornam o processo de transesterificação catalisado por ácido inadequado para a produção de biodiesel em escala industrial (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017; AMINI *et al.*, 2017; PARAWIRA, 2009; MACARIO; GIORDANO, 2013).

Estes processos têm várias desvantagens, tais como: consumo de energia, dificuldade de recuperação do catalisador, produção de grande quantidade de águas residuais altamente alcalinas ou ácidas e causa problemas de corrosão no equipamento. Essas desvantagens restringem seriamente o desenvolvimento de caminhos químicos convencionais para o biodiesel (MA *et al.*, 2017). A Tabela 2.6 mostra a comparação dos métodos de transesterificação homogênea.

Tabela 2.6. – Comparação dos métodos de transesterificação utilizando catalisadores homogêneos.

	Catálise alcalina	Catálise ácida
Temperatura de reação (°C)	60-70	55-80
FFA na matéria-prima	Produtos saponificados	Ésteres
Água na matéria-prima	Interfere na reação	Interfere na reação
Rendimento de ésteres	Alto	Alto
Purificação do glicerol	Difícil	Difícil
Purificação dos ésteres	Lavagens repetidas	Lavagens repetidas
Avaria dos equipamentos	Baixo	Alto
Custo do catalisador	Barato	Barato
Tempo de reação	Curto	Curto

Fonte: Adaptado de Parawira, (2009); Guldhe *et al.*, (2015).

Os problemas relacionados com a eliminação de águas residuais contaminadas, a perda de catalisador e a redução do rendimento do processo podem ser eliminados até certo ponto, utilizando catalisadores heterogêneos.

2.6.3. Catálise heterogênea

O catalisador heterogêneo elimina os custos adicionais associados com a remoção do catalisador após a transesterificação. No entanto, estes catalisadores dão menores rendimentos de biodiesel a um custo significativamente maior em comparação com catalisadores homogêneos. O requisito de maiores quantidades de alcoóis e a duração da reação mais longa limitam a opção do processo de transesterificação heterogênea para a produção de biodiesel em escala industrial, no entanto, esse processo possui um grande potencial para melhorias no rendimento e pode surgir como o mais barato processo para produção de biodiesel em escala comercial no futuro (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017; PARAWIRA, 2009; HAMA *et al.*, 2011a; ENDALEW; KIROS; ZANZI, 2011; GOHAIN; DEVI; DEKA, 2017).

As principais características de catalisadores heterogêneos referem-se à sua capacidade de catalisar a transesterificação e a reação de esterificação ao mesmo tempo. Os catalisadores heterogêneos ácidos são classificados como resinas de permuta catiônica, sais minerais, sólidos suportados e catalisadores de heteropoliácidos. O óxido de zircônio, óxido de titânio, óxido de estanho, zeólitas, catalisador à base de carbono sulfonado e os heteropoliácidos (HPAs) estão entre os principais catalisadores ácidos heterogêneos. Os catalisadores heterogêneos básicos são classificados como óxidos metálicos, óxidos metálicos mistos, zeólitas, metais alcalino-

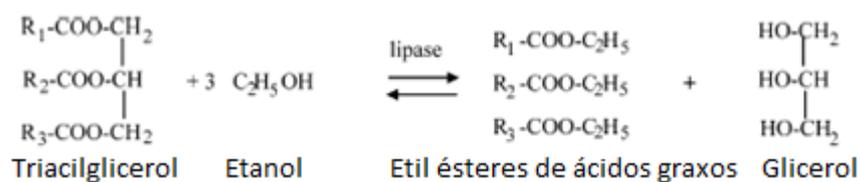
terrosos suportados. O óxido de cálcio (CaO), óxido de magnésio (MgO), óxido de estrôncio (SrO) e os óxidos mistos são os principais catalisadores heterogêneos básicos. Um ponto chave para reduzir o custo total do sistema é o uso de óleos não comestíveis de baixo custo, que tipicamente contêm FFA elevado. Foi relatado que o catalisador heterogêneo também pode ser reutilizável durante várias vezes antes que a sua atividade catalítica comece a cair (AMINI *et al.*, 2017; BUASRI *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2017). Assim, o desenvolvimento de um catalisador heterogêneo com uma alta estabilidade e a capacidade de produzir FAME/FAEE sob temperatura suave e pressão atmosférica são de grande interesse para as escalas industriais (ALSHARIFI *et al.*, 2017).

O grande desafio no que diz respeito à substituição dos catalisadores homogêneos tradicionalmente aplicados na trans/esterificação de ácidos graxos é desenvolver catalisadores heterogêneos estáveis com fortes sítios ácidos e alta reatividade, fácil separação dos produtos e que não sejam corrosivos. O desenvolvimento de catalisadores ativos para reações de trans/esterificação de ácidos graxos possibilita tornar o biodiesel um combustível mais competitivo, tanto no que diz respeito a seu custo de produção quanto a questões ambientais envolvidas no processo de produção (CHEN *et al.*, 2015; BASSAN *et al.*, 2013; SILVA; CARDOSO, 2013).

2.7. Síntese de ésteres de etila por catálise enzimática

Muitos pesquisadores investigaram o uso de enzimas como catalisadores para a transesterificação de triacilgliceróis para a produção de biodiesel. Existem três componentes principais no processo catalisado por lipase: lipase, que serve como catalisador, e óleo e álcool (etanol ou metanol), que em conjunto servem como substrato (figura 2.12). O uso de microrganismos como fonte de lipase é vantajoso, já que a maioria deles é capaz de produzir enzimas com alta taxa de produção e custo relativamente baixo. Atualmente, Novozym 435, que é isolada e purificada a partir de recursos fúngicos de *Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae*, é a preparação enzimática mais empregada para catalisar a transesterificação enzimática com elevada e consistente eficiência (acima de 90%) (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017; YING *et al.*, 2017; AMINI *et al.*, 2017; KO *et al.*, 2012).

Figura 2.12. – Processo de transesterificação de um triacilglicerol utilizando etanol por catálise enzimática.

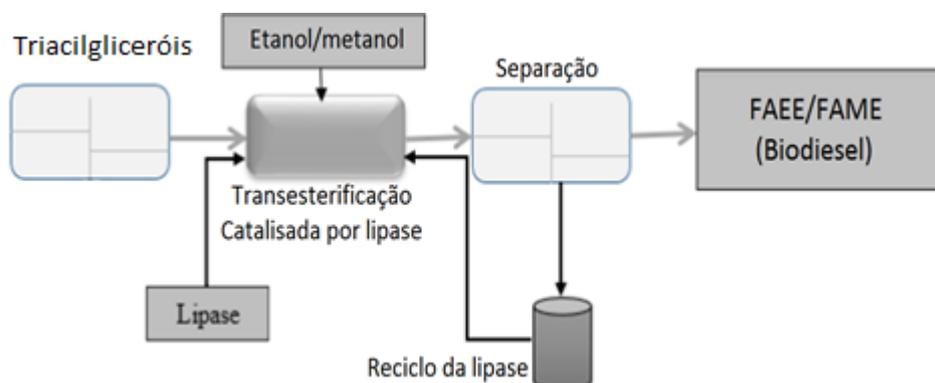


Fonte: Adaptado de Karout; Pierre, (2009).

Os catalisadores enzimáticos superam as principais desvantagens dos catalisadores químicos e mostram maior tolerância aos ácidos graxos e à água nas matérias-primas sendo preferível pelas seguintes características: baixa temperatura de reação (25-65 °C), pressão e resíduos, subproduto de glicerol de qualidade e fácil remoção de catalisador. No entanto, o alto custo, tempos de reação relativamente longos e a reutilização precária são os problemas comuns do biocatalisador, que dificultam o desenvolvimento do processo enzimático em escala industrial. O futuro desta rota é essencialmente dependente da redução do custo de produção dos catalisadores enzimáticos, o que pode proporcionar maior rendimento de biodiesel (AGARWAL; GUPTA; DHAR, 2017; YING *et al.*, 2017; ALI *et al.*, 2017; ILMI *et al.*, 2017; DIAS *et al.*, 2017; TRAN *et al.*, 2012).

Além disso, podem ser citados como principais limitações do uso industrial das enzimas: menor estabilidade térmica, maior susceptibilidade à desnaturação e falta de estabilidade ótima de operação. Para explorar as vantagens técnicas e econômicas da enzima na biocatálise, foram aplicadas várias estratégias, como engenharia de enzimas/proteínas, uso de aditivos (solventes) e imobilização de enzimas para aumentar a estabilidade da atividade. Entretanto, com o uso de enzimas imobilizadas, a recuperação da lipase não é um problema. Existem estudos extensivos sobre o uso de lipase imobilizada como catalisador para a produção de biodiesel por suas vantagens bem reconhecidas, como boa estabilidade térmica, facilidade de reutilização da lipase, permitem trabalhar sob condições operacionais suaves, apresentam alta seletividade, sem reações secundárias significativas e levar a produtos de alta pureza (BADGUJAR; BHANAGE, 2017; LIU *et al.*, 2012; DE; SIKDER; NARAYANAN, 2017; MORENO-PIRAJÀN; GIRALDO, 2011; KUAN *et al.*, 2013; BOUAID *et al.*, 2017). A Figura 2.13 mostra o fluxograma de um processo de produção enzimática de biodiesel.

Figura 2.13. – Fluxograma de produção enzimática do biodiesel.



Fonte: Adaptado de Amini *et al.*, (2017).

Assim, o biodiesel produzido por reações de transesterificação usando lipase oferece as seguintes vantagens ambientais e econômicas sobre a rota química (NARWAL; GUPTA, 2013; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014):

- Requer menor quantidade de álcool e não resulta em reações secundárias.
- Etapa de purificação simplificada;
- Menor consumo de energia;
- Maior pureza de subproduto de glicerol;
- Nenhuma formação de sabão no sistema;
- Uso de temperaturas de reação mais amenas;
- Alta seletividade e especificidade da trans/esterificação em relação aos substratos;
- Eliminação dos custos de tratamento associados à recuperação de catalisadores químicos;
- Biodegradabilidade de enzimas e aceitabilidade ambiental;
- Oportunidade para reutilização enzimática e estabilidade melhorada pela imobilização enzimática.

Entretanto, também foi demonstrado que alguns problemas de difusão podem reduzir a atividade de enzimas imobilizadas nessas reações. O acúmulo de subprodutos de reação (água e glicerol) é o principal motivo para a inativação de lipase durante a operação, além do efeito negativo de alcoóis (principalmente metanol) na estabilidade enzimática (TIAN *et al.*, 2017; TACIAS-PASCAIO *et al.*, 2017; TRAN; CHEN; CHANG, 2016).

O desenvolvimento do sistema operacional empregando enzimas imobilizadas envolve um grande número de decisões e ajustes de parâmetros, como escolha adequada de suporte para imobilização de enzimas, configuração de reator apropriada e modo de operação. Somado a isso, a compreensão da cinética da reação é necessária para estabelecer um sistema operacional estável para produzir uma grande quantidade de produto ao menor custo, mantendo uma produtividade constante ao longo do tempo (COSTA-SILVA *et al.*, 2014). Tanto o processo contínuo como descontínuo podem ser usados para a conversão de óleo em biodiesel por transesterificação catalisada por lipase. No entanto, o processo contínuo é comparativamente mais atraente (GULDHE *et al.*, 2015).

A Tabela 2.7 mostra um comparativo entre a produção de biodiesel por transesterificação utilizando os diversos catalisadores heterogêneos: ácidos, básicos e as lipases imobilizadas.

Tabela 2.7. – Comparação da produção de biodiesel por transesterificação utilizando catalisadores heterogêneos

	Ácido sólido	Base sólida	Lipase imobilizada
Consumo de energia	Alto	Relativamente baixo	Moderado
Taxa de reação	Menor que o básico	Rápido	Relativamente baixo
Temperatura de reação	Alto	Média	Média
Influência da H ₂ O	Não	Sim	Não
Influência dos FFA	Não	Sim	Não
Pré-tratamento dos FFA	Não	Sim	Não
Formação de sabão	Não	Sim	Não
Recuperação do produto	Simples	Simples	Simples
Lixiviação dos sítios ativos	Sim	Sim	Tipicamente não
Inibição do catalisador	Não	Sim	Não
Reutilização do catalisador	Sim	Sim	Sim
Rendimento	Alto	Alto	Alto

Fonte: Adaptado de Amini *et al.*, 2017.

A Tabela 2.7 mostra que as principais vantagens em se utilizar a lipase imobilizada, em comparação ao catalisador ácido, como catalisador para a produção de biodiesel são o consumo de energia que é moderado, a temperatura da reação ser menor e o fato de não apresentar a lixiviação dos sítios ativados para o meio reacional. Em comparação com o catalisador básico,

a via enzimática não apresenta influência em relação a presença de água, dos ácidos graxos livres (FFA) além de não gerar a formação de sabão.

2.8. Biorreatores com lipases imobilizadas

Os processos comerciais atuais de produção de biodiesel ainda são tipicamente realizados em reatores de batelada ou alimentados. No entanto, há um incentivo para usar configurações de produção contínua, pois permitem melhor consistência do produto e menores tempos de indisponibilidade (tempo morto). A produção enzimática de biodiesel é realizada em sistema batelada ou contínuo.

Até a presente data, houve vários avanços no design do biorreator, sendo o reator de tanque agitado (STR), o reator de leito fixo (PBR) e o reator de leito fluidizado (FBR) comumente aplicados na produção de biodiesel utilizando catalisadores enzimáticos. Geralmente referidos como reatores eficientes para reações enzimáticas descritas na literatura, especialmente os tipos contínuos. Para evitar a perda de produtividade, a operação é realizada em um período mais longo, de modo que as variáveis de estado permanecem constante (ILMI *et al.*, 2017; AMINI *et al.*, 2017; ARUMUGAN; PONNUSAMI, 2014). A Tabela 2.8 mostra as principais variáveis para a escolha do biorreator.

Tabela 2.8. – Principais variáveis analisadas para a escolha de um reator utilizando enzimas imobilizadas.

Fatores	Características
Forma da enzima imobilizada	Partículas, membranas ou fibras.
Natureza do substrato	Sólido, suspenso ou coloide.
Condições reacionais	Controle de temperatura e do fluxo reacional.
Parâmetros cinéticos	Inibição pelo substrato, produto ou ambos.
Superfície catalítica por unidade de volume do reator	Tamanho do suporte e presença de poros
Transferência de massa	Efeitos difusionais internos e externos ao biocatalisador
Possibilidade de substituição e regeneração do biocatalisador	Tempo morto operacional
Construção do biorreator	Geometria, características hidrodinâmicas do fluido e condições operacionais.
Custo operacional do biorreator	Energia e manutenção
Modo de operação	Descontínuo ou contínuo

Fonte: Adaptado de Poppe *et al.*, (2015).

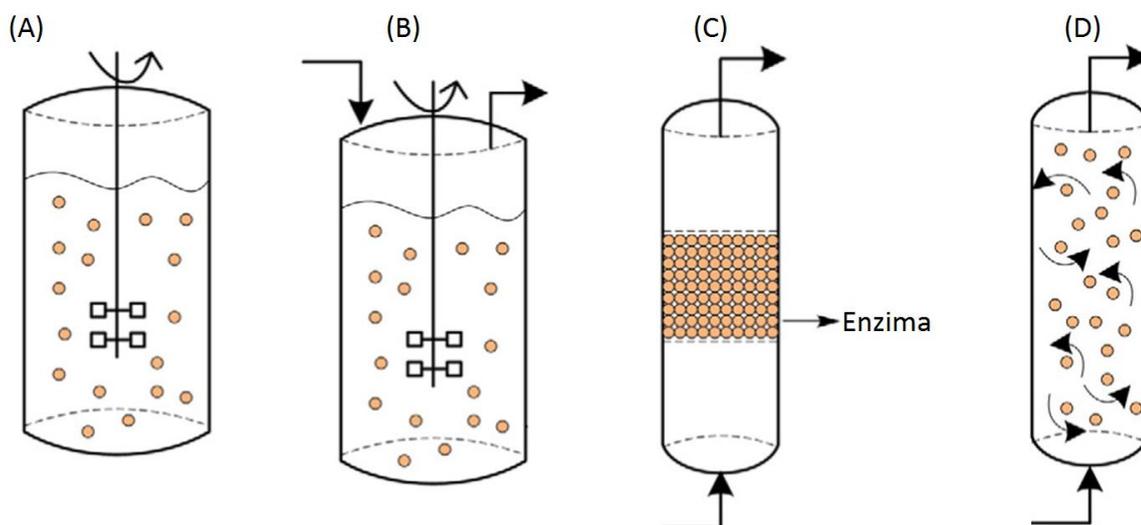
O reator de tanque agitado (STR) pode ser usado de maneira descontínua (BSTR) ou contínua (CSTR). O STR é amplamente utilizado em escala de laboratório, enquanto para processos contínuos, PBR e FBR são mais propensos a serem aplicados em escala industrial. O reator tipo STR contém um agitador tanto em batelada quanto em modelo contínuo. A agitação vigorosa fornece um contato eficiente entre a enzima e o substrato. Apesar do STR ser vantajoso, por sua fácil construção, operação e manutenção, esse sistema apresenta algumas desvantagens devido ao fato de que os sistemas imobilizados não podem suportar cargas pesadas no reator. Além disso, são suscetíveis a quebras devido ao alto risco de cisalhamento impostas pela agitação mecânica, reduzindo assim a possibilidade de reutilização da enzima imobilizada e prejudicando a viabilidade econômica do processo. Em um FBR a enzima imobilizada é mantida suspensa por meio da recirculação da solução de substrato bombeada através do sistema. Em comparação com os PBRs, os FBRs apresentam menor queda de pressão, fluxo mais uniforme e menor formação de canais preferenciais. Embora os FBRs tenham algumas vantagens em relação aos reatores de leito fixo e agitado, poucos exemplos de produção de biodiesel catalisada por enzimas em FBR contínuo foram relatados. Fácil de operar e com menos complicações, em relação à separação catalítica do produto, favorecem o uso de reatores de leito fixo (PBR). Em geral, o reator de leito fixo (PBR) permite o uso repetido de enzimas uma vez que as tensões de cisalhamento são menores quando comparadas aos biorreatores agitados (STR), tornando os reatores PBR mais atraentes devido à sua alta eficiência, baixo custo e comparativamente mais fácil construção, operação, escala e controle automático. No entanto, o PBR pode ser limitado por uma alta queda de pressão ao longo do leito ou obstrução do leito de catalisador por acumulação de componentes insolúveis da mistura reacional (ILMI *et al.*, 2017; AMINI *et al.*, 2017; HAJAR *et al.*, 2009; XU; NORDBLAD; WOODLEY, 2012; ITABAIANA; MIRANDA; DE SOUZA, 2013; RAMOS *et al.*, 2017).

A Figura 2.14 ilustra exemplos de biorreatores empregados em processos envolvendo enzimas livres ou imobilizadas.

Apesar de numerosos estudos focados em vários parâmetros de reação, as informações publicadas sobre configurações de reator são relativamente escassas. Para minimizar as limitações tecnológicas para a produção de biodiesel pelo método enzimático, são necessários mais estudos sobre o desenho do biorreator e a ampliação de escala do processo. O projeto do reator enzimático precisa de conhecimento suficiente da cinética da reação, da hidrodinâmica do sistema, dos mecanismos de transferência de massa, da escolha adequada do suporte para

imobilização e o método de operação do biorreator (AMINI *et al.*, 2017; HAMA *et al.*, 2013; HAMA *et al.*, 2011a; COSTA-SILVA *et al.*, 2014).

Figura 2.14. Exemplos de biorreatores utilizados em processos envolvendo enzimas livres ou imobilizadas. Reactores (A) batelada tanque agitado (BSTR - Batch stirred tank reactor), (B) contínuo tanque agitado (CSTR - Continuous stirred-tank reactor), (C) Reator de leito fixo (PBR -Packed-Bed Reactor) e (D) Reator de leito fluidizado (FBR- Fluidized bed reactor).



Fonte: Adaptado de Amini *et al.*, (2017).

2.9. Reactores de leito fixo

O reator de leito fixo (PBR) é basicamente uma coluna cilíndrica que contém um leito fixo no qual o biocatalisador é empacotado e a solução reagente é bombeada a uma taxa de fluxo desejada. Isso resulta em maior desempenho de reação. Nos sistemas PBR, a superfície de contato do substrato e do catalisador é elevada, pois o substrato passa diretamente na camada de catalisadores. O PBR facilita a operação, tornando-a adequada para um eventual aumento de escala, além de diminuir o esforço de cisalhamento em enzimas imobilizadas, levando geralmente à estabilidade de enzimas por longo prazo. Contudo, algumas desvantagens deste sistema podem ser citadas, como a facilidade de obstrução do leito, o aparecimento de caminhos de fluxo preferencial e ineficiências de transferência de calor e massa (TAN *et al.*, 2010; AMINI *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2011; SKORONSKI *et al.*, 2014; CHAE *et al.*, 2011; POPPE *et al.*, 2015; TRAN *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2017).

Trabalhos recentes estudaram o potencial do uso de enzimas imobilizadas em biorreatores de leitos fixos empacotados para uma variedade de processos, incluindo a síntese de ésteres (biodiesel) a partir de diversas matérias-primas, como óleo de soja, óleo de pinhão-

manso e óleo de palma, embora as limitações de transferência de massa tenham sido geralmente relatadas. A Tabela 2.9 mostra um resumo de alguns trabalhos publicados na literatura que relatam a produção enzimática de biodiesel utilizando reator de leito fixo (PBR).

Tabela 2.9. – Trabalhos publicados referentes à produção enzimática de biodiesel em reator de leito fixo contínuo (PBR)

Biocatalisador	Sistema e dimensões	Condições e resultados	Referência
Lipase <i>B. cepacia</i> em filossilicato	Único estágio: $l=135$ mm, $d=25$ mm	Fluxo: 30 mL min^{-1} ; T: 50°C ; Conversão: 97 %	HSU <i>et al.</i> , 2004.
Novozym 435	Único estágio: $l=250$ mm, $d=46$ mm	Fluxo: $0,1 \text{ mL min}^{-1}$; T: $52,1^\circ\text{C}$; Conversão: 82,8 %	CHEN <i>et al.</i> , 2011.
Lipase <i>P. cepacia</i> em Fe_3O_4	Único estágio; $l=135$ mm, $d=25$ mm	Fluxo: $0,25 \text{ mL min}^{-1}$; T: 40°C ; Conversão: 75 %	WANG <i>et al.</i> , 2009.
Lipases co-imobilizadas	Único estágio; $l=130$, $d=25$ mm Duplo estágio: $l=130$ mm $d=25$ mm	Fluxo: $0,8 \text{ mL min}^{-1}$; T: 45°C ; Conversão: 75 % Fluxo duplo estágio: $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ T: 45°C ; Conversão duplo estágio: 90 %	LEE <i>et al.</i> , 2012.
Novozym 435	Duplo estágio: $l=180$ mm, $d=10$ mm	Fluxo: $0,57 \text{ mL min}^{-1}$; T: 40°C ; Conversão: 79,1 %	HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009.

Fonte: o autor; l = comprimento, d = diâmetro.

Hsu *et al.* (2004) investigaram a produção contínua de ésteres etílicos de ácidos graxos, utilizando lipase imobilizada de *Burkholderia cepacia* (IM BS-30) em filossilicato como catalisador, em reator PBR (135 mm de altura e 25 mm de diâmetro interno) operando em regime contínuo. Cada ciclo experimental de reação teve 18 horas de duração, sendo a transesterificação realizada com etanol e óleo residual em razão molar de 4:1, respectivamente, em meio isento de solvente. Para rendimentos de 97% em massa, a vazão de fluxo foi determinada em $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, a temperatura, em 50°C e o tempo espacial em 48 horas.

Chen *et al.* (2011) estudaram a produção contínua de ésteres pela metanólise do óleo de soja em um reator de leito fixo (PBR) (Único estágio: $l=250$ mm, $d=46$ mm), utilizando a lipase imobilizada (Novozym 435) como catalisador em um sistema contendo terc-butanol como solvente. Utilizaram a metodologia de superfície de resposta para avaliar efeitos, como a temperatura reacional, a taxa de fluxo, e a concentração molar do substrato na conversão molar do biodiesel. Os resultados mostraram que a taxa de fluxo e a temperatura apresentaram um efeito significativo no percentual de conversão molar. As condições ótimas encontradas foram de: taxa de fluxo de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de $52,1 \text{ }^\circ\text{C}$ e a razão molar de 1:4 (óleo de soja/metanol). A conversão atingida foi de 82,81%.

Wang *et al.* (2009) realizaram a metanólise do óleo de soja usando lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em nanopartículas de Fe_3O_4 numa matriz de algodão. O meio reacional foi composto de uma mistura de óleo de soja, água destilada, metanol, e *n*-hexano, numa razão volumétrica de 6:3:1:0,2, respectivamente, a taxa de fluxo adequada foi de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ e a temperatura, de 40°C . Utilizando um PBR simples de um estágio (raio interno do reator = 16 mm e a altura = 200 mm) os autores reportaram conversão de 75% após 12 horas de operação, sendo este valor mantido por 132 horas. Após 240 horas, a taxa de conversão decaiu para 45%.

Lee *et al.* (2012) investigaram a produção contínua de ésteres metílicos de ácidos graxos pela metanólise do óleo de pinhão-mansão, utilizando lipases coimobilizadas como catalisadores, em PBR de único estágio (130 mm de altura e 25 mm de diâmetro interno) operando em regime contínuo. Rendimentos de 80% em massa utilizando fluxo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, em uma temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$ e o tempo espacial de 24 h foram reportados. Os autores também avaliaram o potencial da utilização de um PBR duplo estágio, e alcançaram conversão de 90% utilizando tempo espacial de 72 horas e fluxo de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$.

Halim; Hamaruddin e Fernando (2009) estudaram a produção contínua de ésteres pela metanólise do óleo residual de palma em um reator de leito fixo (PBR) (Duplo estágio: $l=180$ mm, $d=10$ mm), utilizando Lipase Novozym 435 (*C. antarctica*) como catalisador em um sistema contendo terc-butanol como solvente. Empregaram a metodologia de superfície de resposta para avaliar o fluxo (mL.min^{-1}) e a altura do leito (cm). As melhores condições da reação de transesterificação foram as seguintes: altura do leito de 105,3 mm e fluxo de $0,57 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e a razão molar de 1:4 (óleo residual de palma/metanol). A conversão atingida foi de 79%.

O PBR pode operar em modo descontínuo ou contínuo pela recirculação da mistura reacional. Para aplicações de ensaio industrial, o fluxo de substrato ascendente é geralmente preferido sobre o fluxo descendente porque não comprime o leito enzimático resultando em bloqueios com baixa transferência de oxigênio e queda de pressão. Em um PBR contínuo, a mistura reacional é continuamente bombeada através da coluna e a enzima pode ser efetivamente reutilizada sem separação prévia. O PBR contínuo é superior ao PBR operando em batelada devido ao controle e operação automatizados, custos trabalhistas reduzidos, condições operacionais estáveis e fácil controle da qualidade dos produtos (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

O PBR é indicado para converter reagentes em produtos em apenas um ciclo, evitando trabalhar em condições de reciclo. Os suportes utilizados para imobilizar as enzimas não devem ter tamanhos menores que 0,05 mm, de modo a manter a queda de pressão dentro de limites razoáveis. O PBR pode atingir uma grande área específica de reação por unidade de volume e alta produtividade volumétrica em operação contínua. A vazão é o fator mais crucial na operação PBR, pois controla o tempo de retenção do reagente em contato com os sítios ativos do biocatalisador dentro do reator. Uma baixa vazão resulta em longo tempo de retenção e alta conversão de biodiesel. No entanto, o longo tempo de operação causaria a acumulação de glicerol que, por sua vez, limita notavelmente a transferência de massa dos reagentes com o biocatalisador reduzindo assim a conversão de biodiesel. Sendo assim, o intervalo de taxas de fluxo (vazões) utilizado deve ser suficiente para proporcionar um compromisso entre uma queda de pressão razoável, uma camada de difusão mínima e um alto rendimento de conversão.

Em geral, embora a transesterificação enzimática de fluxo contínuo de óleo vegetal com álcool seja uma rota potencial para a produção industrial de biodiesel, o custo de produção dessa abordagem é ainda maior do que o processo catalisado por agentes químicos. Assim, deve-se fazer determinadas ponderações relacionadas à imobilização enzimática, o desenvolvimento de reatores, otimização e simulação de processos e a avaliação técnica e econômica. Esses parâmetros precisam ser investigados em conjunto para avaliar e decidir se o processo catalisado por biocatalisador pode ser economicamente viável (TRAN; CHANG; LEE, 2017; POPPE *et al.*, 2015).

Durante a transesterificação do óleo vegetal, o efeito do coproduto glicerol na eficiência da reação deve ser cuidadosamente monitorado. O glicerol é normalmente adsorvido no suporte de imobilização e formando uma camada hidrofílica, o que torna as lipases inacessíveis aos

substratos hidrofóbicos (tais como triacilgliceróis residuais, diacilgliceróis, monoacilgliceróis), podendo atingir assim, um patamar de baixa conversão devido ao acúmulo de glicerol, ocasionando aumento da resistência à transferência de massa. O acúmulo de glicerol também poderá causar obstrução da coluna e assim aumentar a queda de pressão dentro do PBR.

Outro problema é referente ao álcool não reagido que pode migrar da mistura reacional para a camada de glicerol cobrindo as lipases imobilizadas, resultando em inativação da lipase pela concentração de álcool localmente alta. Além disso, do ponto de vista do projeto e operação da planta, a eficiência de remoção de glicerol pode ser um obstáculo crucial porque, em um sistema PBR, o acúmulo de um líquido altamente viscoso pode levar o entupimento das colunas (AMINI *et al.*, 2017; TRAN; CHEN; CHANG, 2016; HAMA *et al.*, 2013; HAMA *et al.*, 2011b). Uma vez que o glicerol é uma fonte de carbono atraente para a produção de combustíveis e produtos químicos, sua recuperação pode contribuir para a viabilidade econômica da produção enzimática de biodiesel (HAMA *et al.*, 2011a).

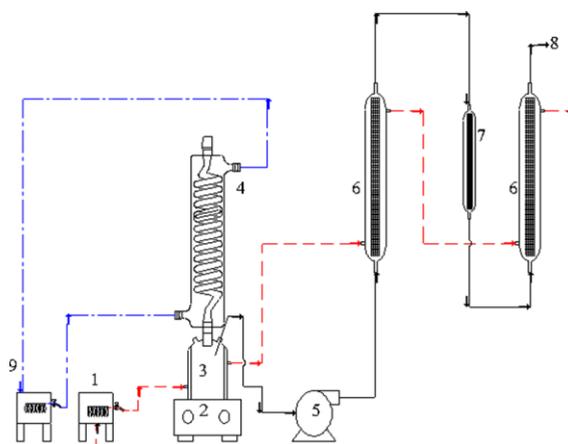
2.10. Estratégias para melhorar o processo de produção de biodiesel em um reator de leito-fixado operando de maneira contínua

À medida que o glicerol acumula em um PBR, o rendimento de conversão diminui. Várias abordagens têm sido propostas para superar essa limitação, como a eliminação de glicerol por diálise, extração usando um solvente polar, adição de solventes orgânicos (n-hexano ou terc-butanol) para tornar a mistura reacional mais homogênea e menos viscosa e remoção de glicerol pela separação em membrana cerâmica (AMINI *et al.*, 2017). No entanto, isso requer investimento extra para a purificação de biodiesel, levando a custos de funcionamento mais elevados do que os do processo convencional. Portanto, uma planta de PBR precisa atender aos requisitos para uma reação eficiente e a separação de glicerol com instalações simples, como é o caso da utilização de materiais sorventes para remoção de glicerol por adsorção (AMINI *et al.*, 2017; TRAN; CHEN; CHANG, 2016; HAMA *et al.*, 2011b; COSTA-SILVA *et al.*, 2016).

Em um estudo Ramos *et al.* (2017) propuseram a redução da adsorção de compostos polares, pelo suporte de imobilização, com remoção do glicerol formado como subproduto pela adsorção com a resina comercial Lewatit GF 202. Esta resina foi escolhida com base na sua alta capacidade de adsorção de glicerol (250 g glicero L⁻¹) e resultados satisfatórios que já foram demonstrados na síntese de biodiesel a partir de óleos láuricos, como óleo de coco e óleo de babaçu. A configuração do reator consistiu em leito duplo em que a saída do primeiro estágio foi conectada a uma coluna preenchida com Lewatit GF 202, permitindo que o substrato livre

de glicerol alimentasse o segundo estágio, reduzindo a limitação do biocatalisador e favorecendo a conversão total do óleo nos ésteres correspondentes (Figura 2.15).

Figura 2.15. – Aparato experimental dos reatores PBR duplo estágio: 1 e 9- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Frasco de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica, 6- Reator tipo leito fixo, 7- Coluna extratora de glicerol; 8- Saída de produto.



Fonte: Adaptado de Ramos *et al.*, 2017.

Vários materiais comerciais desessorvente desenvolvidos especificamente para o tratamento de biodiesel bruto, tais como Magnesol (silicato de magnésio) e resinas de troca iônica (Purolite PD206, Amberlite Dry BD10 e Lewatit GF 202) estão comercialmente disponíveis (COSTA-SILVA *et al.*, 2016). No entanto, essa aplicação em escala industrial ainda é limitada devido ao seu alto custo, sendo assim, tem-se buscado a utilização de adsorventes alternativos dentre os quais os derivados de celulose e derivados de sílica, como é o caso da cinza de casca de arroz. A utilização da cinza de casca de arroz como material adsorvente na etapa de purificação do biodiesel já foi reportada na literatura, mostrando resultados promissores (SANTOS *et al.*, 2016).

2.10.1. Cinza de casca de arroz

A casca de arroz é um resíduo industrial muito utilizado na geração de energia a partir de sua combustão, gerando cinzas. Sua produção anual é estimada em 70 milhões de toneladas no mundo, tornando necessário seu aproveitamento devido ao seu lento processo de degradação. A temperatura de queima da casca de arroz é o fator determinante na estrutura das cinzas produzidas. Cinzas produzidas por incineração na faixa de 500-700 °C são ricas em sílica

amorfa. Em temperaturas acima de 800 °C a sílica é encontrada na forma cristalina. A composição química das cinzas depende da origem do arroz que o originou, sendo essencialmente constituído por sílica (90 - 95%) e outros componentes inorgânicos, tais como: óxido de potássio, óxido de cálcio e pentóxido de fósforo (CHEN et al., 2015; BENASSI et al., 2015; FERNANDES et al, 2016).

2.11. Considerações do embasamento do projeto de pesquisa

Lipases são enzimas que apresentam alta eficiência catalítica e possuem diversas aplicações, dentre as quais podem ser citadas sua utilização como catalisador para a produção de ésteres de etila de ácidos graxos (biodiesel). Devido ao seu alto custo (lipase de *Burkholderia cepacia* = 26 mil R\$/kg), diversas técnicas são empregadas visando otimizar esse processo, sendo a principal delas a imobilização de enzimas.

A produção do biodiesel já está presente em diversos países assim como no Brasil, e sua utilização como fonte de energia renovável aumenta com o passar dos anos. Entretanto, ainda existem determinadas desvantagens, dentre as quais pode-se citar o custo deste biocombustível em relação ao diesel de petróleo. Sendo assim, a busca por matérias-primas alternativas tem gerado muitas pesquisas nesta área. A utilização de um óleo vegetal não comestível como fonte lipídica para a produção de biodiesel apresenta como principal vantagem o fato de não competir com a cadeia alimentícia já estabelecida, possibilitando a redução do custo total do processo. Dentre esses óleos, o óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) se mostra como uma alternativa viável, devido ao seu alto rendimento de óleo na semente e sua alta produtividade por hectare.

Na literatura existem diversos trabalhos que reportam a produção enzimática de biodiesel utilizando processos descontínuos. Entretanto, os processos contínuos ainda são escassos, apesar das vantagens oferecidas tais como: possibilidade de obter maior produtividade volumétrica e atingir com um eventual aumento de escala de produção industrial. Dentre os possíveis reatores a serem utilizados para essa produção contínua, o reator de leito fixo (PBR) tem se mostrado eficiente apresentando resultados satisfatórios na literatura nos processos enzimáticos de produção do biodiesel.

Durante a transesterificação do óleo vegetal o glicerol formado como coproduto é adsorvido nos suportes da imobilização de enzimas podendo reduzir a atividade catalítica do biocatalisador e provocar queda do patamar de conversão. Sendo assim, tem-se buscado a utilização de adsorventes alternativos como é o caso da cinza de casca de arroz para remover o glicerol.

Dessa forma, a pesquisa buscou desenvolver um processo de imobilização da enzima lipase em matriz híbrida SiO_2 - β CD, obtida pela técnica sol-gel, com foco na produção de ésteres etílicos a partir do óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas*), em reator batelada e contínuo (PBR), empregando a cinza de casca de arroz como material adsorvente de glicerol.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são abordados os principais materiais e métodos analíticos empregados no desenvolvimento do trabalho.

3.1. Materiais

3.1.1. Enzima

Neste trabalho todos os experimentos foram realizados utilizando a lipase microbiana comercial de *Burkholderia cepacia* (Lipase PS) manufaturada pela Amano Enzyme Inc (Nagoya, Japão) e adquirida da Sigma-Aldrich.

3.1.2. Suportes de imobilização

Na síntese dos suportes híbridos foi utilizado como composto orgânico: β -ciclodextrina (β CD, 97%) adquirido da Sigma-Aldrich, empregando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich (98%, Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, EUA). Álcool etílico (96%, Biotec) e ácido clorídrico (mín. 36%, Anidrol).

3.1.3. Materiais de partida

Como materiais de partida da reação de transesterificação foram utilizados: etanol anidro (99%, Anidrol) e óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas L.*) obtido a partir da extração de sementes adquiridas em uma fazenda em Lins-SP.

3.1.4. Outros reagentes

Os outros reagentes utilizados foram: hexano (Anidrol), polietilenoglicol (MM 1450, Sigma), goma arábica em pó pura (Biotec), glutaraldeído (25%, Riedel-de Haen), fosfato de sódio bibásico (Casa da química), fosfato de sódio monobásico anidro (Synth), hidróxido de potássio (Biotec). Azeite de oliva com baixa acidez (Galo, adquirido em mercado local). A cinza de casca de arroz utilizada foi adquirida da empresa Cotrisel. Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

3.2. Procedimentos experimentais

3.2.1. Caracterização do óleo de pinhão-manso

O óleo de pinhão-manso foi caracterizado pela determinação do índice de acidez, umidade e composição em ácidos graxos.

3.2.1.1. Índice de acidez e umidade

O índice de acidez foi determinado em triplicata, com base no método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Assim, cerca de 2 g de óleo foram aferidas em um Erlenmeyer de 125 mL. Em seguida, foram adicionados 25 mL de solução éter: etanol (2:1 v:v) e duas gotas de indicador fenolftaleína. Essa mistura foi, por fim, titulada com solução padrão de hidróxido de potássio 0,1 mol L⁻¹ até a mudança para coloração rósea.

O cálculo do índice de acidez foi efetuado a partir da seguinte relação:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{5,61 * f * v}{p} \quad (3.1)$$

em que: v é o volume (mL) da solução de hidróxido de potássio gasto, f é o fator de correção da solução de hidróxido de potássio padronizada e p é a massa (g) da amostra.

A umidade do óleo de pinhão-manso foi determinada, também em triplicata, mediante análise em titulador automático Karl Fischer, marca Metrohm, modelo 899 Coulometer.

3.2.1.2. Composição em ácidos graxos e determinação da massa molar média do óleo por cromatografia em fase gasosa

Para determinar a composição em ácidos graxos do óleo de pinhão-manso, foi empregado o método de derivatização de Hartman e Lago (1973), em triplicata. Desse modo, 100 mg do óleo de pinhão-manso foi aferido e transferido a um tubo de ensaio. Feito isso, adiciona-se 4 mL de solução de hidróxido de sódio em metanol 0,5 mol L⁻¹.

O frasco foi levado ao banho, sob temperatura próxima de 80 °C com o intuito de dissolver as bolhas de óleo. Depois, foi resfriado em água corrente e acrescentou-se 5 mL de reagente esterificante, o qual foi preparado mediante a dissolução de 2 g de cloreto de amônio em 60 mL de metanol e 3 mL de ácido sulfúrico.

O sistema foi novamente aquecido por 2 minutos, resfriado em água corrente e adicionadas 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio e então, o frasco foi agitado manualmente, por 30 segundos.

Em seguida, 5 mL de hexano foram adicionados ao tubo, que foi mantido em repouso em um refrigerador por duas horas. Após esse período, foram preparadas amostras diluindo-se aproximadamente 1 mg do sobrenadante em 0,8 mL de hexano.

Das amostras preparadas, alíquotas de 1 μL foram utilizadas para determinação da composição em ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa. Esse procedimento foi efetuado em Cromatógrafo Shimadzu, modelo CG – 2010PLUS, equipado com ionizador de chama (DIC), coluna Agilent Technologies, modelo DB-23 de dimensões de 30 m (comprimento) x 0,25 mm (diâmetro) x 0,25 μm (filme).

A coluna foi programada para temperatura inicial de 140 $^{\circ}\text{C}$ chegando em 250 $^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. No detector, a temperatura foi 220 $^{\circ}\text{C}$, no injetor, 260 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente, foram comparados os cromatogramas fornecidos com padrão de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (Fatty Acid Methyl Esters, SUPELCO), a fim de identificar e quantificar os ácidos graxos do óleo de pinhão-manso.

A composição em ácidos graxos foi calculada de acordo com:

$$\text{Ácido graxo (X\%)} = \frac{A_x}{A_T} \quad (3.2)$$

em que: A_x é a área do pico que representa o ácido graxo x e A_T é a soma de todas as áreas obtidas no cromatograma.

O cálculo da massa molar média dos ácidos graxos presentes no óleo de pinhão-manso foi realizado utilizando-se a relação:

$$\overline{MM}_{ag} = \sum MM_{xag} * (\%)Y_{ag} \quad (3.3)$$

em que: MM_{xag} representa a massa molar do ácido graxo x no óleo e $(\%)Y_{ag}$ é sua porcentagem, a qual foi determinada a partir da composição em ácidos graxos.

A massa molar do óleo de pinhão-manso foi determinada a partir da composição em ácidos graxos por meio da Equação 3.4, com base no trabalho de Fillières *et al.* (1995):

$$MM_{\text{óleo}} = \{3 * [\sum_i (MM_{agi}) * Y_{agi}] + MM_{\text{glicerol}} - 3 * MM_{\text{H}_2\text{O}}\} \quad (3.4)$$

em que: MM_{agi} é a massa molar média do ácido graxo i presente no óleo, Y_{agi} é a porcentagem de ácido graxo i na amostra, $MM_{glicerol}$ é a massa molar do glicerol (92 g mol^{-1}) e MM_{H_2O} , a massa molar da água (18 g mol^{-1}).

3.2.2. Preparo do suporte híbrido de SiO_2 - β CD

O composto híbrido constituído de polissiloxano (SiO_2) e β -ciclodextrina (β CD) foi sintetizado, pela mistura de 50 mL de tetraetilortossilicato (TEOS), 50 mL de etanol 95% e 60 mL de solução do composto orgânico (β CD) (0,5-4) % (m v^{-1}). As misturas foram aquecidas a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação, com adição de 1,0 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. Após um período de incubação de 40 min, a preparação foi vertida em moldes de acetato e mantida a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h até completa solidificação. Os compostos híbridos foram triturados e classificados, utilizando-se peneiras de análises granulométricas com 42 e 60 mesh, sendo utilizado na etapa de ativação, as partículas retidas na peneira com malha de 60 mesh (SANTOS *et al.*, 2008).

3.2.3. Ativação do suporte híbrido de SiO_2 - β CD

O suporte foi ativado com uma solução de glutaraldeído 2,5% (v v^{-1}) em tampão fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,5), na proporção 1g de suporte para 10 mL de solução. Após a homogeneização, as misturas foram mantidas sob agitação por 1 h à temperatura ambiente, sendo em seguida submetidas à filtração a vácuo em um funil de Buchner, contendo papel de filtro para retirar o excesso de umidade. Durante a filtração os suportes foram lavados exaustivamente com água destilada e solução tampão de fosfato, e em seguida levados à estufa ($60 \text{ }^\circ\text{C}$) por 24 h (SANTOS *et al.*, 2008).

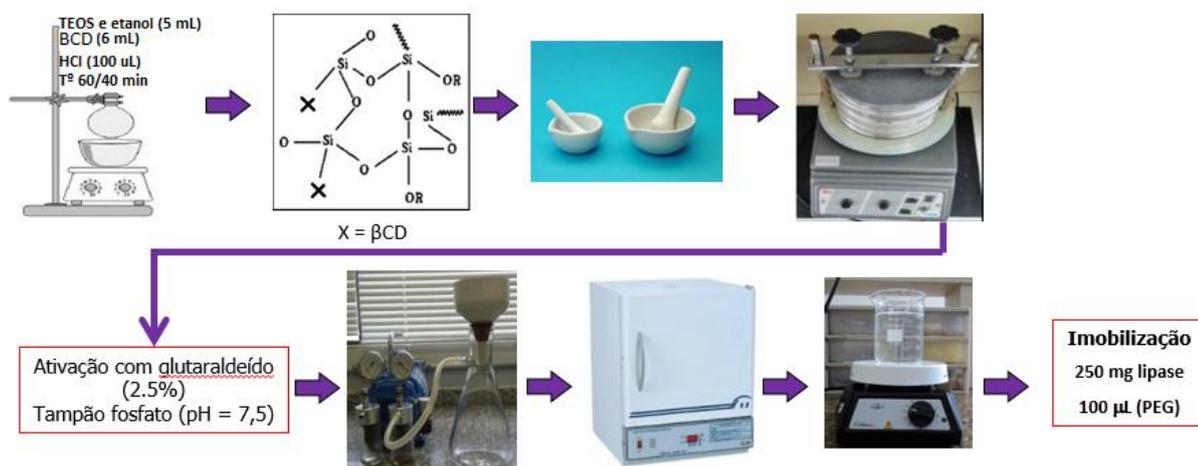
3.2.4. Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* no suporte híbrido de SiO_2 - β CD

O suporte ativado (SiO_2 - β CD) foi embebido em hexano numa relação sólido: líquido de 1:10 e mantido sob agitação branda por 2 h. Após este período, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 250 mg de lipase na sua forma livre, empregando como agente estabilizante da enzima 100 μL de solução aquosa contendo 5 mg mL^{-1} de polietilenoglicol (massa molecular 1450). As suspensões contendo enzima e suporte foram mantidas sob agitação a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A recuperação dos biocatalisadores foi efetuada por filtração a vácuo, com lavagens sucessivas com hexano até a redução da umidade dos biocatalisadores para valores inferiores a 10% (SANTOS *et al.*, 2008).

O preparo do suporte, a ativação do suporte e a imobilização da enzima no suporte são

mostrados na Figura 3.1.

Figura 3.1. – Fluxograma do processo de preparo do suporte híbrido de SiO₂-βCD, ativação do suporte híbrido de SiO₂-βCD e imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* no suporte híbrido de SiO₂-βCD.



Fonte: o autor

3.2.5. Síntese dos ésteres de alquila

3.2.5.1. Síntese dos ésteres de alquila em processo descontínuo

As reações foram efetuadas em reatores de vidro cilíndrico encamisados com capacidade para 50 mL, acoplados com condensador de refluxo (Figura 3.2) e nas seguintes condições fixas: 20 gramas de meio reacional na razão molar óleo:etanol de 1:8. Foi utilizada uma quantidade de biocatalisador para satisfazer a relação previamente estabelecida de 400 unidades de atividade para cada grama de matéria-prima lipídica. As sínteses catalisadas pelas lipases imobilizadas foram efetuadas a 45 °C por um período total de 72 h e agitação magnética de 150 rpm. As concentrações de ésteres de etila foram quantificadas por cromatografia em fase gasosa.

Figura 3.2. – Ilustração do aparato experimental utilizado nas reações de etanólise do óleo de pinhão-mansão – processo descontínuo.



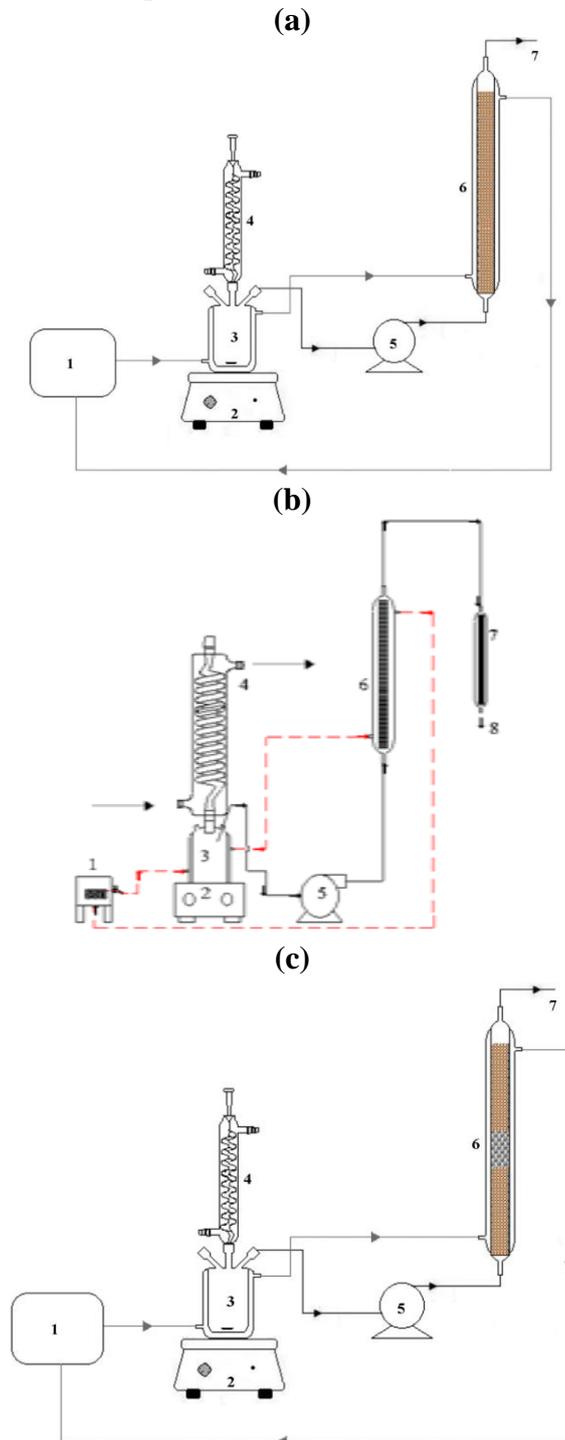
Fonte: o autor

3.2.5.2. Síntese dos ésteres de alquila em processo contínuo

As reações de transesterificação em reator de leito fixo foram conduzidas em três diferentes aparatos experimentais, conforme ilustrado na figura 3.3 (a, b, c). Na configuração 3.3-a a coluna (265 mm de comprimento e 11 mm de diâmetro) foi empacotada com 20 gramas de biocatalisador. Na configuração 3.3-b foi acoplada à configuração 3.3-a uma coluna extratora de glicerol contendo (2 gramas) de cinza de casca de arroz. Na configuração 3.3-c a coluna foi empacotada com duas camadas do biocatalisador (cada camada pesando 8,75 g) intercalada com uma camada de 2 gramas de cinza de casca de arroz.

O substrato foi alimentado por meio de uma bomba peristáltica (Gilson), com fluxo ascendente na vazão estabelecida. A temperatura do sistema foi mantida constante (50 °C) e controlada por banho termostático. Para evitar perda de etanol no sistema, foi acoplado um condensador de refluxo ao vaso de alimentação. As concentrações de ésteres de etila foram quantificadas por cromatografia em fase gasosa. Na reação utilizando o aparato 3.3-b amostras foram retiradas antes e após passarem pela coluna de adsorção de glicerol.

Figura 3.3. – Esquema experimental do reator de leito fixo: 1- Banho termostático, 2- Agitador magnético, 3- Frasco de alimentação, 4- Condensador de refluxo, 5- Bomba peristáltica (Gilson), 6- Coluna, 7- Saída do produto, 8- Coluna contendo cinza de casca de arroz.



Fonte: Adaptado de Costa-Silva *et al.*, (2014).

3.2.5.2.1. Distribuição do tempo de residência (DTR) no reator de leito fixo

Para o cálculo da DTR no reator de leito fixo, foi realizado teste traçador (corante lipossolúvel (anilina solúvel em óleo)) tipo pulso. Inicialmente, foi efetuada uma varredura de

frequências em espectrofotômetro na faixa da luz visível (UV-Visível Varian modelo Cary 50), empregando-se uma concentração de traçador (15%) diluída no meio reacional óleo de pinhão-mansão e etanol (razão molar óleo: etanol de 1:12), visando determinar o comprimento de onda no qual a absorbância era máxima. Em seguida, empregando-se o comprimento de onda determinado (637 nm), foi construída a curva de calibração “absorbância em função da concentração de traçador”, para determinar a concentração do traçador na saída do reator.

No ensaio de distribuição do tempo de residência foram utilizados 2 aparatos (figura 3.2-a e figura 3.2-c). O 1º contendo 20 gramas de biocatalisador inativado e o 2º contendo 17,5 gramas de biocatalisador inativado e 2 gramas de cinza de casca de arroz (inserida entre as duas camadas do biocatalisador). O biocatalisador foi previamente inativado por aquecimento em estufa a 100 °C por 2 horas. O traçador (corante lipossolúvel) na concentração de 15% em meio reacional foi injetado com auxílio de uma seringa de 5,0 mL. Foram retiradas amostras na saída da coluna a cada 10 minutos por um período total de 2-2,5 horas, considerando-se como tempo inicial do ensaio o momento da injeção do traçador.

Os valores de concentração do corante na saída do reator foram calculados segundo equação obtida na curva de calibração. Por meio dos valores determinados, foi plotado um gráfico de concentração do corante ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em função do tempo e um modelo matemático exponencial foi ajustado aos pontos obtidos. A função da DTR, $E(t)$ foi calculada pela equação 3.5, considerando a constante de vazão volumétrica utilizada (FOGLER, 2009).

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad (3.5)$$

Em que: $C(t)$ = concentração do corante no tempo t ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e t = tempo (h). Para determinar o valor do denominador da equação 3.5, foi construído um gráfico de $C(t)$ em função de t e com o auxílio do software OriginPro 8, a função da DTR, $E(t)$, foi determinada e o tempo médio de residência, t_m , que corresponde ao tempo espacial τ , foi calculado pela equação 3.6.

$$\tau = t_m = \int_0^{\infty} t \cdot E(t) dt \quad (3.6)$$

É muito comum comparar-se as DTRs usando os seus momentos em vez de tentar comparar as distribuições em sua totalidade. O primeiro momento é o tempo médio de residência. O segundo momento comumente usado é relacionado a média e é denominado de

variância (ou quadrado do desvio-padrão), σ^2 , sendo definido pela equação 3.7 (FOGLER, 2009).

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - tm)^2 \cdot E(t) dt \quad (3.7)$$

A magnitude desse momento é um indicativo do alargamento da distribuição de forma que, quanto maior seu valor, maior foi o alargamento da distribuição. O terceiro momento é também tomado em torno da média e é denominado coeficiente de assimetria (s^3) sendo definido pela equação 3.8.

$$s^3 = \frac{1}{\sigma^{\frac{3}{2}}} \cdot \int_0^{\infty} (t - tm)^3 \cdot E(t) \cdot dt \quad (3.8)$$

A magnitude desse momento mede a extensão em que a distribuição é assimétrica em uma ou outra direção em relação à média. Para esse modelo, analisa-se a DTR para determinar o número de tanques ideais, n , em série que corresponderá aproximadamente à mesma DTR do reator não ideal utilizado. De posse dos dois primeiros momentos da DTR, pode-se determinar o parâmetro n pela equação 3.9 (FOGLER, 2009).

$$n = \frac{\tau^2}{\sigma_2} \quad (3.9)$$

3.3. Métodos de análise

3.3.1. Caracterização dos suportes híbridos e da cinza de casca de arroz

3.3.1.1. Adsorção/Dessorção de N_2

Área específica e volume de poros foram determinados pela análise de fisissorção de nitrogênio (Linde, pureza > 99.999%) a 77 K e pressões de 1.2×10^{-3} a 0.092 MPa utilizando o analisador Micromeritics ASAP 2020. Anteriormente à análise, a amostra foi desgaseificada a 1.3×10^{-4} MPa e 300 °C por 3 h. A área específica foi determinada utilizando a equação de BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938) e o volume de poros foi calculado utilizando a adsorção de ponto único a $P/P_0 = 1$.

3.3.1.2. Difração de Raios X (DRX)

As análises de DRX foram realizadas no Laboratório de Adsorção e Troca Iônica (LATI), do Departamento de Engenharia Química (DEQ/UEM).

Foi utilizado um difratômetro Shimadzu XRD6000 com tubo de cobre e filtro de níquel, radiação Cu-K α (1,54 Å), velocidade de varredura de 0,5° min⁻¹ de 5 a 80°, 40 kV e 30 mA, cujas fendas empregadas foram de 0,5° (divergência), 0,5° (espalhamento) e de 0,30 mm (recepção). Com isso, os picos foram identificados por comparação com fichas PCPDFWIN, com o auxílio do pacote computacional PCPDFWIN v. 2.3 e, também, com fichas JCPDS, com o auxílio do pacote computacional X'Pert HighScore 2.1b (PANalytical B.V.) (RAIA *et al.*, 2017). A cristalinidade relativa das amostras foi calculada considerando os picos característicos da ZSM-5 de partida como 100 % de cristalinidade.

3.3.1.3. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de EITF foram realizadas no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP/UEM), em espectrofotômetro Thermo Nicolet 360. Para a preparação das pastilhas, em primeiro lugar, em um almofariz foram misturados 199 mg de KBr com aproximadamente 1 mg de cada amostra. Em seguida, o pó foi pressurizado em uma mini prensa hidráulica Pike até a formação de pastilhas translúcidas, sendo que os espectros foram obtidos na região de 4000 a 400 cm⁻¹ (RAIA *et al.*, 2017).

3.3.2. Propriedades dos biocatalisadores

3.3.2.1 Dosagem de atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada e rendimento de imobilização

A atividade enzimática da lipase na forma livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Soares *et al.* (1999). Foram misturados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva (50 % azeite: água) e 4 mL de tampão fosfato (pH 7,0; 0,1 mol L⁻¹). A fim de garantir a homogeneização do meio, o sistema reacional foi mantido sob agitação prévia, a 37 °C por 10 min. Em seguida, foi adicionado a massa conhecida da preparação de lipase (cerca de 5 mg da lipase livre ou 500 mg do derivado imobilizado), mantendo-se o sistema reacional sob agitação a 37 °C, por 5 min. Após o período de incubação, foram adicionados 10 mL de uma mistura de etanol e acetona (1:1) para interromper a reação. Os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de KOH previamente padronizada (0,02 mol L⁻¹) utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram calculadas segundo a equação 3.10 e expressas em μ mol/g.min (Ug⁻¹).

$$\text{Atividade hidrolítica} (\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}) = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot m} \quad (3.10)$$

Em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra, V_B = volume do KOH gasto na titulação do branco, M = molaridade da solução de KOH, t = tempo de reação em min, m = massa em gramas de biocatalisador.

O rendimento de imobilização foi calculado a partir do valor obtido da atividade hidrolítica do biocatalisador vezes a massa de biocatalisador obtida no processo de imobilização dividida sobre a atividade total adicionada ao processo de imobilização, e pode ser expressa pela equação 3.11.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Atividade biocatalisador} \cdot \text{massa biocatalisador}}{\text{atividade enzima livre} \cdot \text{massa enzima livre}} \quad (3.11)$$

3.3.2.2. Estabilidade térmica da lipase livre e dos biocatalisadores

As lipases livre e imobilizada foram incubadas a 50 °C em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹ e pH 7,0) por 180 min. Em intervalos pré-determinados, as amostras foram retiradas, resfriadas em banho de gelo para interromper o processo de inativação e em seguida as atividades hidrolíticas residuais foram determinadas empregando o método de hidrólise do azeite de oliva, conforme a metodologia descrita no item 3.3.2.1.

3.3.2.3. Determinação dos parâmetros cinéticos da lipase imobilizada

No cálculo da constante de Michaelis-Mentem (K_m), foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variando entre 372 – 1860 mM, obtidos a partir de emulsões preparadas com diferentes proporções de azeite de oliva (10 – 50 %) e solução aquosa de goma arábica (7 % mv⁻¹). As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisadas pela lipase na forma imobilizada foram determinadas de acordo com a metodologia de hidrólise do azeite de oliva descrita anteriormente no item 3.3.2.1. As constantes cinéticas (K_m e V_{max}) foram determinadas pelo software Origin 8.

3.3.2.4. Teste de lixiviação da lipase imobilizada

3.3.2.4.1. Lixiviação no meio reacional

O teste de lixiviação foi efetuado, utilizando o biocatalisador de lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-βCD contendo 2% de βCD, monitorando a formação de ésteres a partir da reação de transesterificação em modo batelada descrita na metodologia do item 3.2.5.1. Ao se atingir 24 horas de reação, o meio reacional foi centrifugado e o biocatalisador foi removido. A

reação foi continuada até completar 72 horas, com retirada de amostras nos tempos de 24/48/72 horas.

3.3.2.4.2. Lixiviação em um meio contendo Triton X-100

O teste de lixiviação foi feito seguindo a metodologia descrita por Fernandez-Lopez *et al.* (2017). Foram adicionados 0,10 gramas do biocatalisador, de lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-βCD contendo 2% de βCD, em Erlenmeyer de 125 mL e em seguida adicionou-se 10 mL de uma solução contendo tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹ e pH = 7,0) na ausência e presença de Triton X-100 1 % v v⁻¹. O procedimento foi feito baseado na metodologia 3.3.2.1 e foi quantificado a atividade hidrolítica da solução com/sem Triton-X com o decorrer do tempo.

3.3.2.5. Densidade cristalina do biocatalisador

A densidade do biocatalisador foi determinada em balão volumétrico previamente aferido com água à temperatura ambiente. Adicionou-se uma massa conhecida do biocatalisador no interior do balão, a mesma foi imersa em água destilada sob vácuo para eliminar o ar contido nos espaços intra e interpartículas. O balão volumétrico foi aferido com água, determinando o volume ocupado pelo sólido por diferença de massa após preencher o balão. A densidade foi calculada como a relação entre a massa e o volume ocupado pelos sólidos (SIMÕES *et al.*, 2015).

3.3.2.6. Determinação do tempo espacial (τ) para o processo contínuo

O tempo espacial foi calculado de acordo com Levenspiel (2000), conforme as equações 3.12 (a,b,c):

$$\tau = \frac{V}{v_0} \quad (3.12a)$$

$$V = V_{reator} - V_{catalisador} \quad (3.12b)$$

$$V_{catalisador} = \frac{m}{\rho} \quad (3.12c)$$

Em que: τ = é o tempo espacial (h), V = volume útil do reator (mL), v₀ = vazão volumétrica sobre a seção da coluna (mL h⁻¹), V_{reator} = volume total do reator, V_{catalisador} = volume ocupado pelo catalisador no interior do reator, m = massa do catalisador (g), ρ = densidade do biocatalisador (g cm⁻³)

3.3.3. Caracterização do biodiesel

3.3.3.1. Determinação dos ésteres de etila

Os ésteres etílicos resultantes das reações de transesterificação do óleo de pinhão-mansão foram analisados em Cromatógrafo Shimadzu, modelo GC – 2010PLUS, com ionizador de chama (DIC), coluna Agilent Technologies, modelo DB-23 (dimensões de 30 m (comprimento) x 0,25 mm (diâmetro) x 0,25 µm (filme)).

Mediante metodologia proposta por Visentainer (2012), o éster metílico tricosanóico (99 %, Sigma) foi adotado como padrão interno. Assim, as massas de ésteres presentes nas amostras ($m_{\text{éster}}/g_{\text{óleo}}$) foram calculadas de acordo com:

$$m_{\text{éster}} = \frac{m_p * A_{\text{éster}} * F_{ct}}{A_p} \quad (3.13)$$

em que: $m_{\text{éster}}$ é a massa do éster identificada pelo cromatograma (g), m_p é a massa do padrão (g), $A_{\text{éster}}$ é a área do pico relativo ao éster, F_{ct} é o fator de correção teórico e A_p , a área do pico do padrão interno.

3.3.3.2. Cálculo do rendimento em ésteres

O rendimento em éster nas amostras foi calculado como descrito na equação 3.14, em que mol dos componentes i formados é o número de mols de ésteres formados no meio reacional até o momento da retirada da amostra. Mol dos componentes i possíveis de serem formados é a quantidade máxima possível de ser obtida, calculada partindo da quantidade de triacilgliceróis presentes no meio reacional no início do ensaio (FOGLER, 2009).

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{mol dos componentes } i \text{ formados}}{\text{mol dos componentes } i \text{ possíveis de serem formados}} \times 100 \quad (3.14)$$

3.3.3.3. Conversão de triacilgliceróis

A conversão dos triacilgliceróis foi calculada como descrito na equação 3.15. A conversão dos triacilgliceróis é determinada pela quantidade de triacilgliceróis consumidos do meio reacional até o momento da retirada da amostra, dividido pela quantidade de triacilgliceróis presentes no início da reação (FOGLER, 2009).

$$\% \text{ Conversão} = \left[1 - \left(\frac{\text{mol de triacilgliceróis consumidos}}{\text{mol de triacilgliceróis alimentados}} \right) \right] \times 100 \quad (3.15)$$

3.3.3.4. Produtividade em ésteres de etila

A produtividade foi calculada de acordo com a equação 3.16:

$$P = \frac{C}{\tau} \quad (3.16)$$

Em que: P = produtividade ($\text{mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); C = concentração de ésteres etílicos na saída do reator ($\text{mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1}$); τ = é o tempo espacial (h), calculado pela equação 3.6.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar a eficiência da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada no suporte de SiO₂-βCD foram realizadas reações de transesterificação, utilizando o óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) e etanol visando à produção de biodiesel (ésteres de etila). As reações foram realizadas, inicialmente, em modo descontínuo (batelada) e na sequência em modo contínuo (reator de leito fixo – PBR). Também foi avaliado o potencial do material de cinza de casca de arroz como adsorvente para o glicerol, que é o principal coproduto da reação de transesterificação.

Os resultados e discussão do trabalho estão divididos em duas partes: a 1ª parte são descritos os resultados referentes à caracterização da matéria-prima lipídica, o mecanismo de formação do biocatalisador, caracterização dos suportes de SiO₂-βCD preparados utilizando diferentes concentrações de βCD e dos biocatalisadores preparados (rendimento de imobilização, atividade hidrolítica, propriedades texturais e morfológicas, estabilidade térmica), os parâmetros cinéticos dos biocatalisadores preparados (K_m e V_{max}), testes de lixiviação realizados com os biocatalisadores e o potencial catalítico na reação de transesterificação do óleo de pinhão-manso com etanol.

Com os resultados obtidos na 1ª parte foi selecionado como o biocatalisador mais efetivo a lipase imobilizada em SiO₂-βCD preparado com 2 % de βCD, para ser utilizado na 2ª parte do trabalho.

Na 2ª parte do trabalho foram efetuadas as reações de transesterificação para a produção de biodiesel operando de maneira contínua em um reator de leito fixo (PBR). Para tanto, foram determinados e avaliados diversos parâmetros como: densidade do biocatalisador, volume útil do reator, vazão teórica do sistema, tempo espacial e distribuição do tempo de residência. Também foi feita a caracterização da cinza de casca de arroz (propriedades texturais e morfológicas).

O potencial catalítico das reações de transesterificação foi medido a partir do teor de éster e do rendimento das reações. Os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento dos ensaios realizados são descritos e discutidos neste capítulo.

4.1. Caracterização físico-química do óleo de *Jatropha curcas L.* (pinhão-manso)

4.1.1. Umidade

O teor de umidade do óleo bruto de *Jatropha curcas L.* foi de $0,095 \pm 0,005$ %. Na literatura foi reportado um valor similar ao obtido neste trabalho. Raia *et al.* (2017) obtiveram teor de umidade de $0,253 \pm 0,019$ %. Os lipídios são hidrolisados por enzimas (lipases) em ácidos graxos livres e glicerol durante o armazenamento, quando a temperatura e o teor de água no fruto e sementes são elevados. Porém, o baixo valor apresentado pelo óleo analisado é considerado desprezível e pode contribuir de forma não significativa no processo de degradação (RAIA *et al.*, 2017).

4.1.2. Índice de acidez

O índice de acidez determinado para o óleo bruto de *Jatropha curcas L.* foi de $12,73 \pm 0,18$ mg KOH g⁻¹, valor muito próximo ao obtido por Raia *et al.* (2017) da ordem de $13,99 \pm 0,04$ mg KOH g⁻¹.

A acidez nos óleos pode variar de forma significativa e está relacionada com a natureza e o tipo de processamento das sementes, dentre outros fatores. Além disso, a acidez em óleos vegetais também decorre da hidrólise dos acilgliceróis, provocada pela ação da enzima lipase existente nos grãos. Conseqüentemente, as condições de armazenamento e qualidade da matéria-prima exercem influência significativa sobre a acidez dos óleos (RAIA *et al.*, 2017).

4.1.3. Determinação da composição em ácidos graxos e massa molar média do óleo de *Jatropha curcas L.*

A composição em ácidos graxos do óleo bruto de *Jatropha curcas L.* é apresentada na Tabela 4.1 e comparada com resultados obtidos na literatura (RAIA *et al.*, 2017; JONAS; KETLOGETSWE; GANDURE, 2020).

Jonas; Ketlogetswe e Gandure avaliaram o teor de óleo de *Jatropha curcas L.* plantado em diferentes regiões e avaliaram o teor em ácidos graxos em diferentes estágios de maturação do fruto. Em todos os casos a composição em ácidos graxos era constituída pelos ácidos linoleico, oleico, palmítico, esteárico e palmitoleico.

Raia *et al.* (2017) determinaram um valor de 41,71% para o ácido oleico, 36,42% para o linoleico, 13,37% para o palmítico, 6,10% para o esteárico e 0,82% para o palmitoleico.

Tabela 4.1. – Composição em ácidos graxos do óleo bruto de *Jatropha curcas L.*

Ácido graxo	C16:0 (Palmítico)	C16:1 (Palmitoleico)	C18:0 (Esteárico)	C18:1 (Oleico)	C18:2 (Linoleico)	Fonte
% m m ⁻¹	16,06	0,95	5,34	42,72	39,80	Este trabalho
	13,37	0,82	6,10	41,71	36,42	Raia <i>et al.</i> , 2017.
	16,0	1,25	5,89	37,09	39,77	Jonas; Ketlogetswe; Gandure, 2020.

Como pode ser verificado na Tabela 4.1, há predominância dos ácidos oleico e linoleico na composição (82,52% m m⁻¹) do óleo bruto analisado. Os resultados estão de acordo com as composições relatadas na literatura.

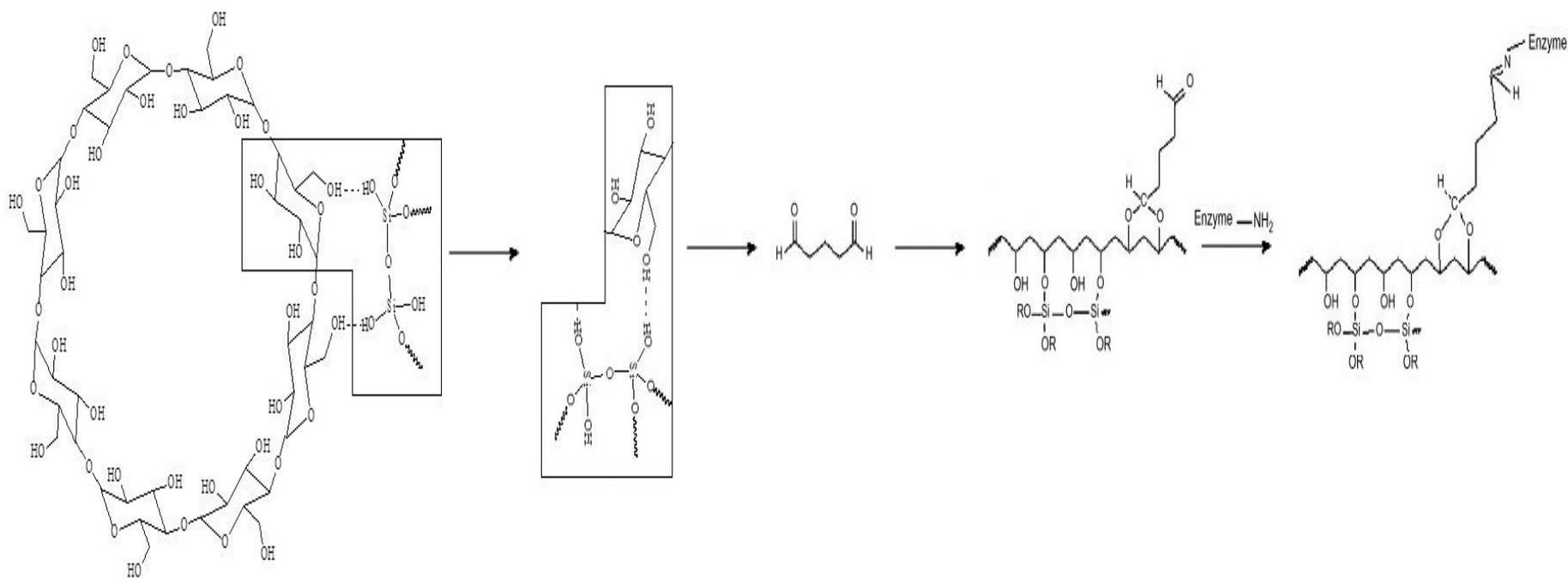
Deve-se levar em conta que a qualidade final do óleo extraído depende de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos à planta, tais como características do local (regularidade pluviométrica, tipo e fertilidade do solo), genética, idade e manejo da planta (método de propagação, espaçamento, poda, adubação, irrigação etc.), o que explica as diferenças nas composições em ácidos graxos observadas na literatura (RAIA *et al.*, 2017).

A partir da composição média em ácidos graxos e com a utilização da equação 3.3 foi possível calcular a massa molar média do óleo de *Jatropha curcas L.* em 870,25 g mol⁻¹, resultado este próximo com as informações descritas na literatura (MU'AZU *et al.*, 2013).

4.2. Mecanismo de formação dos biocatalisadores preparados

O mecanismo de obtenção da lipase imobilizada no suporte híbrido de SiO₂-βCD tem duas etapas, a obtenção da matriz e ativação com glutaraldeído e depois a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* no suporte híbrido conforme demonstrado no esquema descrito na Figura 4.1.

Figura 4.1. – Mecanismo de obtenção do suporte híbrido de SiO_2 - β CD em (a) e ativação do suporte pelo glutaraldeído e imobilização da lipase no suporte ativado em (b).



Na etapa (a), ocorre a transição do sol-gel a partir da ligação cruzada entre as partículas sol. O produto da policondensação é um material inorgânico com grupos hidroxila na sua superfície. Na etapa (b), o suporte de SiO₂-βCD é ativado pela aminação para ancorar a molécula do glutaraldeído. Os grupos de amina primária na superfície do suporte são substituídos por uma ou duas moléculas de glutaraldeído. O resultado é um suporte com “braços” que carregam grupos amino, aonde a enzima será ligada, (grupos catiônicos que funcionam como trocadores de ânion), uma parte moderadamente hidrofóbica formada pela cadeia do glutaraldeído, e um grupo covalente reativo.

A reação mais provável ocorre via formação de acetal entre a extremidade do aldeído do glutaraldeído e os grupos hidroxila da βCD. A extremidade livre do glutaraldeído se liga então ao grupo NH₂ da enzima (MARTIN *et al.*, 2019).

4.3. Caracterização dos suportes e dos biocatalisadores preparados

4.3.1. Adsorção/Dessorção de N₂

As características texturais derivadas dos experimentos de adsorção/dessorção dos suportes SiO₂-βCD e dos biocatalisadores preparados, pelo método BET estão apresentadas nas Tabelas 4.2 e 4.3. As curvas de adsorção/dessorção dos suportes e dos biocatalisadores são mostradas, respectivamente nos Apêndice A.1 e Apêndice A.2.

Tabela 4.2. – Área específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para os suportes SiO₂-βCD utilizando diferentes concentrações de βCD.

Concentração βCD (%)	Área específica (m ² .g ⁻¹)	Volume específico dos poros (cm ³ .g ⁻¹)	Diâmetro médio dos poros (Å)
0,5	430,6	0,3867	35,920
1,0	385,9	0,3322	34,442
2,0	474,2	0,3577	30,172
3,0	557,1	0,2851	20,470
4,0	520,5	0,3095	23,787

Observa-se que para os suportes preparados utilizando diferentes concentrações de βCD os valores obtidos de área específica, volumes específicos dos poros e diâmetro médio dos poros apresentaram valores próximos entre si.

Os valores encontrados neste trabalho estão de acordo com dados reportados na literatura. Martin *et al.* (2018) reportaram valores de área específica que variaram entre 353,5 a 525,2 m².g⁻¹, volume específico dos poros entre 0,28 a 0,42 cm³.g⁻¹ e o diâmetro médio dos poros entre 27,7 e 32 Å para diferentes materiais híbridos preparados a base de sílica (SiO₂-PVA, SiO₂-CMC e SiO₂-HEC).

Todos os materiais obtidos foram classificados como sendo mesoporosos, pois apresentaram diâmetro médio de poros entre 20 e 500 Å.

Tabela 4.3. – Área específica, volume de poros e diâmetro médio de poro da lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-βCD utilizando diferentes concentrações de βCD

Concentração βCD (%)	Área específica (m ² g ⁻¹)	Volume específico dos poros (cm ³ g ⁻¹)	Diâmetro médio dos poros (Å)
0,5	289,7	0,2602	35,929
1,0	235,3	0,1922	32,678
2,0	325,5	0,1855	22,799
3,0	321,5	0,1871	23,283
4,0	363,4	0,2131	23,462

Como pode ser observado na Tabela 4.3, os biocatalisadores apresentam valores próximos de área específica, volumes específicos dos poros e diâmetro médio dos poros. Todos os materiais obtidos foram classificados como sendo mesoporosos.

4.3.2. Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas ilustrados nas Figuras 4.2 e 4.3 são referentes aos suportes SiO₂-βCD e aos biocatalisadores obtidos. A caracterização estrutural foi realizada a partir da difração de raios-X. Nesta técnica uma frente de ondas passa através de fendas cuja separação é comparável ao comprimento de onda λ da radiação. A técnica de medida difração de raios-X é baseada na interação da radiação eletromagnética de comprimento de onda λ ($\approx 0,1$ nm) com planos de átomos do sólido cristalino. Os materiais com arranjo cristalino e repetitivo apresentam difratogramas contendo picos e reflexões bem definidas. Por outro lado, os materiais amorfos não possuem um arranjo cristalino regular e, portanto, não apresentam difratogramas com reflexões definidas (CULLITY, 2001).

Figura 4.2. – Difratometria de Raios X dos suportes híbridos SiO_2 - β CD utilizando diferentes concentrações de β CD.

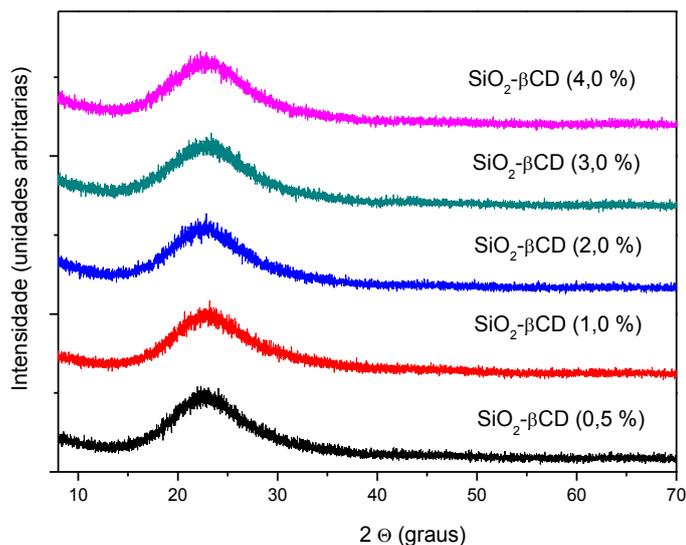
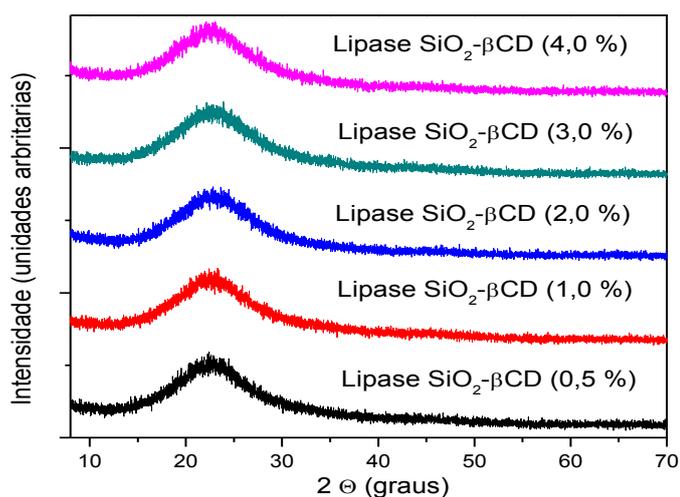


Figura 4.3. – Difratometria de Raios X da lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO_2 - β CD utilizando diferentes concentrações de β CD.



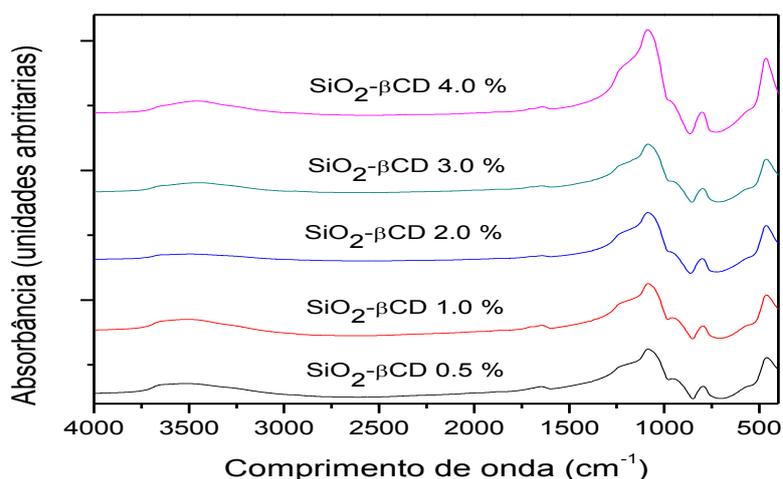
Os difratogramas referentes aos suportes SiO_2 - β CD e aos biocatalisadores obtidos apresentaram o mesmo perfil resultando em uma expressiva largura em 23° (2θ), indicando formação de estruturas, predominantemente, amorfas pela presença da sílica (PINGAN *et al.*, 2017).

A formação de um microambiente amorfo mostra que os suportes são formados por uma rede não uniforme e com um número considerável de interstícios, ideal para o processo de imobilização de enzimas (FAN *et al.*, 2006). Uma distribuição homogênea do componente orgânico na matriz inorgânica evita a formação de agregados de enzima, conforme constatado por Abbehausen *et al.*, 2010.

4.3.3. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

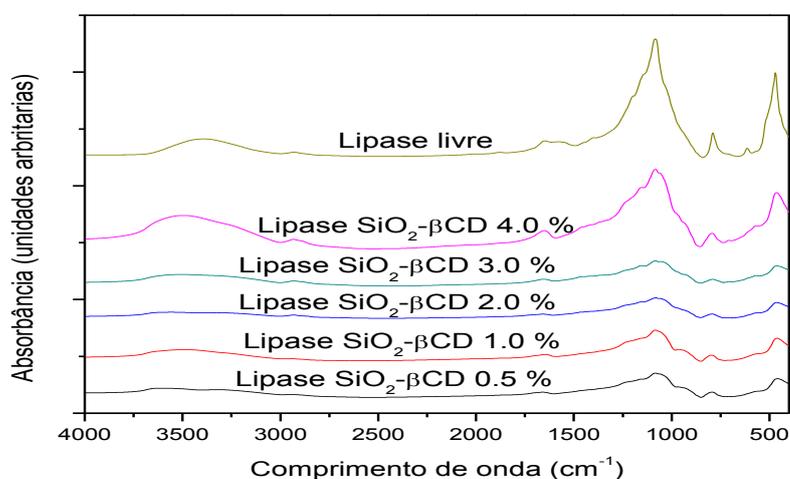
Os espectros no infravermelho obtidos para os suportes preparados, a lipase *B. cepacia* livre e os biocatalisadores são mostrados nas Figuras 4.4 e 4.5.

Figura 4.4. – Espectros no infravermelho dos suportes de SiO₂-βCD preparados utilizando diferentes concentrações de βCD.



Os espectros dos suportes SiO₂-βCD preparados utilizando diferentes concentrações de βCD apresentaram um perfil semelhante para todos os casos. Apenas o suporte preparado contendo 4,0 % de βCD apresentou um perfil diferente, com picos mais intensos que os demais. Os espectros apresentam uma banda larga na região de 3500 cm⁻¹ com um ombro em 3250 cm⁻¹ que foi atribuída ao grupamento O-H de hidroxilas ligadas às cadeias poliméricas dos suportes. O grupamento O-H é proveniente da água de hidratação e de cristalização. Outros picos intensos em 450 cm⁻¹, assim como em 1090 cm⁻¹ estão associados com as vibrações de estiramento simétricas e assimétricas da sílica, respectivamente. A presença das ligações características de Si-O-Si mostraram a formação bem-sucedida do material híbrido a base de sílica. A existência de grupos livres de Si-OH associados com o pico 950 cm⁻¹ são devidos à reação incompleta de condensação das unidades disponíveis de silanol. Esses grupos de hidroxila livres atuam de maneira efetiva na funcionalidade do material híbrido preparado a base de sílica (MARTIN *et al.*, 2018).

Figura 4.5. – Espectros no infravermelho da lipase *B. cepacia* livre e imobilizada em SiO₂-βCD utilizando diferentes concentrações de βCD.



Os picos encontrados estão de acordo com a literatura (HATAMI, AHMADIPOUR, ASGHARI, 2017), destacando a presença de três perfis distintos. O biocatalisador preparado utilizando 4 % de βCD apresentou um perfil muito semelhante ao da lipase livre, mostrando que neste caso a imobilização pode não ter ocorrido de maneira satisfatória. Para os biocatalisadores preparados utilizando 0,5 e 1,0 % foi verificado um comportamento semelhante, observando a ocorrência de um leve decaimento nos picos de 480 cm⁻¹ e 1090 cm⁻¹ em relação à lipase *B. cepacia* livre, indicando que nesses casos a imobilização pode ter ocorrido de maneira moderada. Para os biocatalisadores preparados utilizando 2,0 e 3,0 % de ciclodextrina foi verificada mudança mais expressiva nos picos, quando comparado a lipase livre, indicando que para esses casos a conformação estrutural após a etapa de imobilização foi bastante diferente da conformação presente na lipase livre, sugerindo uma imobilização mais eficiente (MARTIN *et al.*, 2019).

4.3.4. Avaliação do potencial hidrolítico da lipase de *Burkholderia cepacia* no suporte SiO₂-βCD utilizando diferentes concentrações de βCD

A Tabela 4.4 apresenta os resultados de atividade hidrolítica dos biocatalisadores obtidos, bem como os valores de rendimento de imobilização.

Tabela 4.4. – Parâmetros obtidos da imobilização da lipase *B. cepacia* em SiO₂-βCD utilizando diferentes concentrações de βCD

Concentração de βCD (%)	Atividade hidrolítica (U g ⁻¹)	Rendimento imobilização (%)
0,5	1985,34 ± 110,12	43,21 ± 3,39
1,0	1870,60 ± 8,98	41,16 ± 0,51
2,0	1937,74 ± 81,12	40,31 ± 1,29
3,0	1862,56 ± 50,69	41,71 ± 1,86
4,0	1846,65 ± 5,47	41,51 ± 1,53

Atividade da lipase livre 18978 ± 51,5 U g⁻¹

Nas condições adotadas verifica-se uma variação entre a interação da enzima de *B. cepacia* e os suportes testados, devido, provavelmente, à diferença da conformação estrutural de cada suporte. Os valores de atividade hidrolítica variaram entre 1846,65 e 1985,34 U g⁻¹, correspondendo a rendimentos de imobilização entre 40,31 a 43,21%.

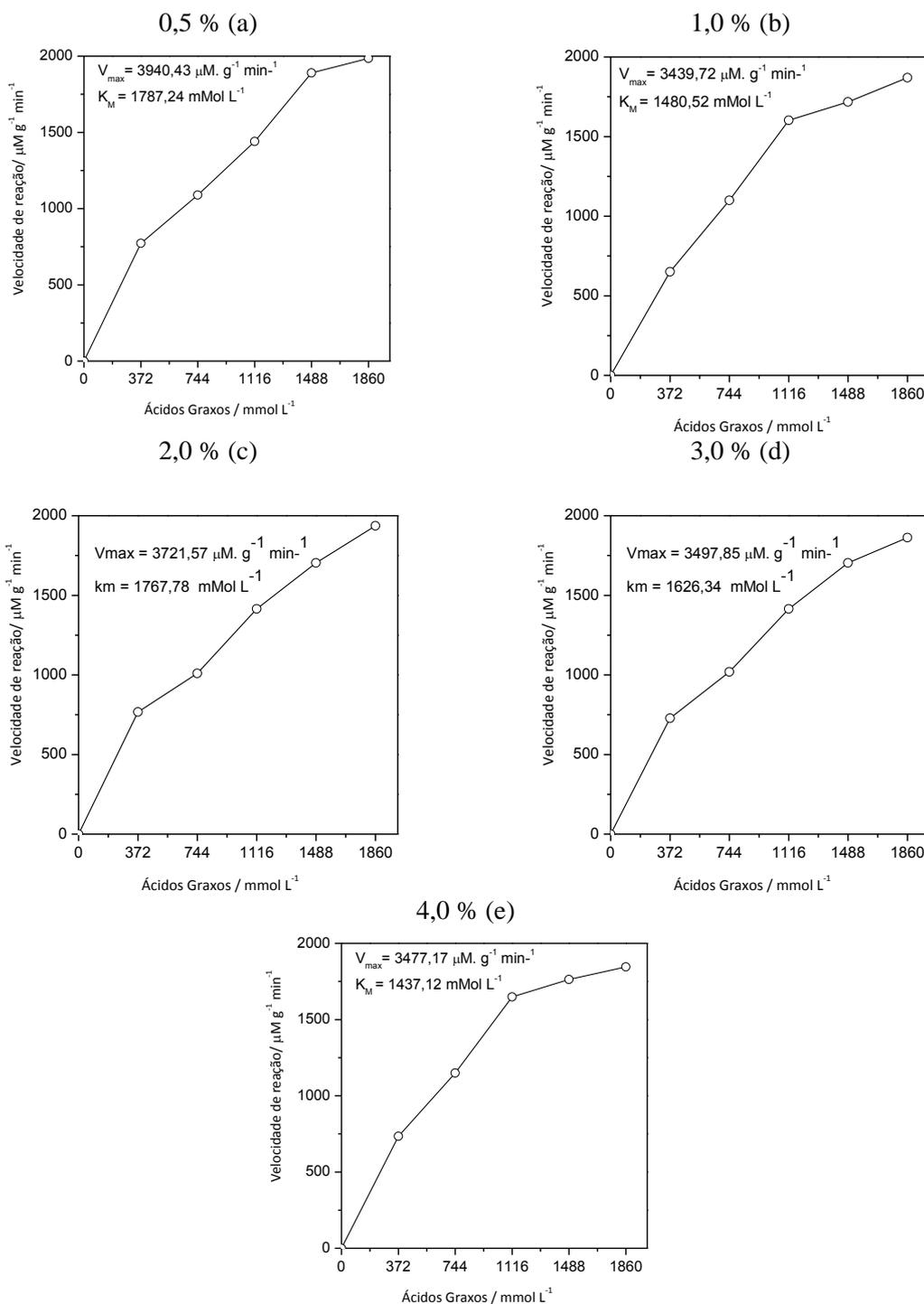
Os valores de atividade encontrados neste trabalho estão de acordo com os dados reportados na literatura para derivados imobilizados de *B. cepacia* em diferentes matrizes híbridas (RAMOS *et al.*, 2017; MARTIN *et al.*, 2018; CERON *et al.*, 2018). Ramos *et al.* (2017) encontraram valores que variaram entre 1655 e 2155 U g⁻¹ para o derivado imobilizado em SiO₂-PVA (silica-polivinilalcool). Ceron *et al.* (2018) descreveram valor de atividade de 2300 U g⁻¹ utilizando a matriz SiO₂-HEC (silica-hidroxiethylcelulose). Martin *et al.* (2018) reportaram valores de atividade que variaram entre 1451 a 1661 U g⁻¹ utilizando 4 diferentes suportes híbridos: SiO₂-PVA, SiO₂-CMC (sílica carboximetilcelulose), SiO₂-HEC e SiO₂-βCD ativadas com epicloridrina.

4.3.5. Parâmetros cinéticos dos biocatalisadores

O efeito da concentração do substrato sobre a atividade das preparações de lipase imobilizada foi investigado empregando emulsões de azeite de oliva em diferentes proporções (10-50 % m v⁻¹), correspondendo a concentrações em ácidos graxos variando entre 372 a 1860 mmol L⁻¹. Os perfis das curvas de velocidade de reação das preparações de lipase imobilizada em função da concentração de ácido graxo são apresentados na Figura 4.6. Os ensaios foram

realizados em pH 7,0 e temperatura de 37 °C. Os valores de K_m e V_{max} aparentes foram calculados com o auxílio do programa Origin 8 (Tabela 4.5).

Figura 4.6. – Perfis das curvas de velocidade de reação da lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO_2 - β CD utilizando diferentes concentrações de β CD: (a) 0,5 %, (b) 1,0 %, (c) 2,0 %, (d) 3,0 %, (e) 4,0 %.



Na cinética de Michaelis-Menten, K_m determina a afinidade da enzima em relação a um substrato particular e a V_{max} (velocidade máxima) determina a taxa máxima de reação do sistema na concentração de saturação do substrato, ou seja, concentração na qual toda a enzima participa do complexo enzima-substrato [ES]. A afinidade de uma enzima para o substrato é alta se o valor do K_m for baixo. O aumento no valor de K_m é principalmente devido à menor acessibilidade do substrato aos sítios ativos de enzima imobilizada causada pelo aumento da limitação difusional (YING *et al.*, 2017; SELVAKUMAR; SIVASHANMUGAM, 2017; GULDHE *et al.*, 2015).

Tabela 4.5. – Parâmetros cinéticos da lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO_2 - β CD utilizando diferentes concentrações de β CD

Concentração β CD (%)	K_m (mmol.L ⁻¹)	V_{max} U g ⁻¹
0,5	1787	3940
1,0	1480	3439
2,0	1767	3721
3,0	1624	3497
4,0	1437	3477

Pela Figura 4.6 pode-se observar que os perfis das curvas de velocidade de reação da lipase imobilizada em SiO_2 - β CD utilizando diferentes concentrações de β CD foram semelhantes. Pela Tabela 4.5 verifica-se que os menores valores de K_m foram observados para lipase imobilizada em SiO_2 - β CD utilizando concentrações de 1,0 %, 3 % e 4 % de β CD (1400-1630 mmol L⁻¹), enquanto para as concentrações de 0,5 % e 2,0 % os valores de K_m foram superiores a 1700 mmol L⁻¹.

Na literatura Martin *et al.* (2018) reportaram valores de K_m variando entre 859 e 1133 mmol L⁻¹ e valores de V_{max} variando entre 2239 e 2502 U g⁻¹ para a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em diferentes suportes híbridos.

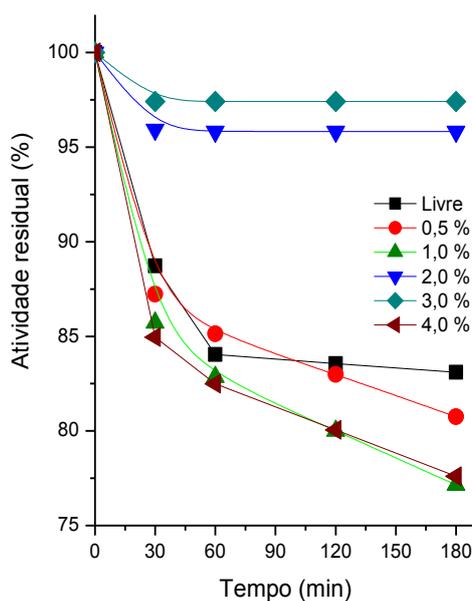
4.3.6. Estabilidade térmica da lipase de *B. cepacia* livre e imobilizada nos diferentes tipos de suporte

Experimentos foram ainda efetuados para determinar a estabilidade térmica da *B. cepacia* livre e imobilizada nos diversos suportes híbridos. Os testes de estabilidade térmica foram efetuados conforme a metodologia descrita no item 3.3.2.2. Os perfis das curvas de estabilidade térmica das preparações de lipase livre e imobilizada estão ilustrados na Figura 4.7.

Verifica-se pelo perfil das curvas, a presença de dois patamares distintos. A lipase

imobilizada em SiO₂-βCD utilizando concentrações de 2,0 % e 3 % de βCD conseguiu manter mais de 95 % da sua atividade residual após 3 horas de tratamento térmico, enquanto para a lipase livre e imobilizada em SiO₂-βCD utilizando as concentrações de 0,5 %; 1,0 % e 4,0 % observou-se uma queda de atividade residual na ordem de 20 % devido provavelmente à diferença da conformação estrutural do biocatalisador após a etapa de imobilização (MARTIN *et al.*, 2019).

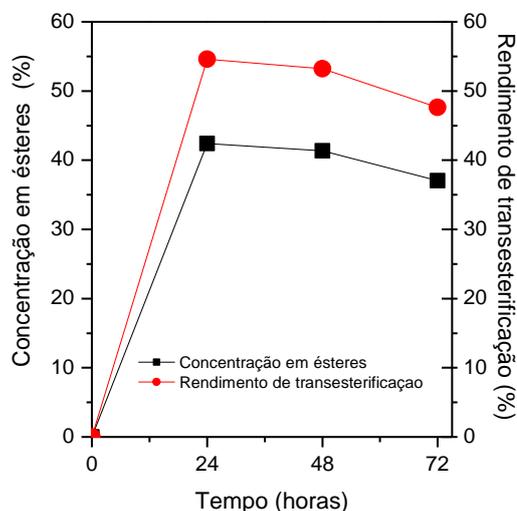
Figura 4.7. – Estabilidade térmica a 60 °C da lipase *B. cepacia* livre e imobilizada em SiO₂-βCD utilizando diferentes concentrações de βCD: 0,5 %; 1,0 %; 2,0 %; 3,0 % e 4,0 %.



4.3.7. Teste de lixiviação da lipase imobilizada

4.3.7.1. Lixiviação no meio reacional

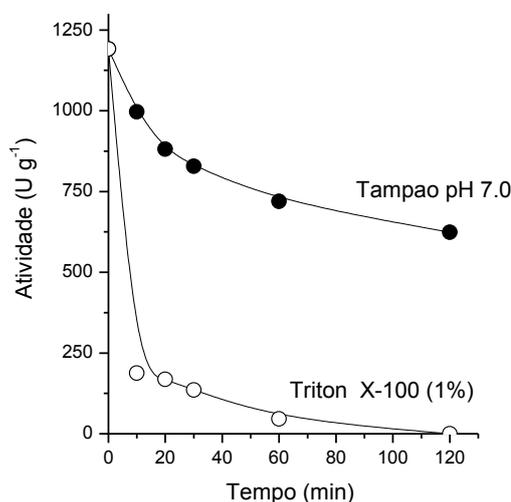
O teste de lixiviação do biocatalisador no meio reacional foi realizado conforme a metodologia descrita no item 3.3.2.4.1 e os resultados obtidos estão mostrados na Figura 4.8.

Figura 4.8. – Teste de lixiviação realizado em meio reacional

Verifica-se pela Figura 4.8 que o rendimento alcançado em 24 h foi mantido após a remoção do biocatalisador do meio reacional, sendo até possível perceber uma oscilação para menores valores de rendimento com a continuidade da incubação da mistura reacional até 72 h. Este comportamento indica que o processo de imobilização foi satisfatório e que o biocatalisador não foi lixiviado para o meio reacional.

4.3.7.2. Lixiviação em um meio contendo Triton X-100

O teste de lixiviação em um meio contendo Triton X-100 foi realizado conforme a metodologia descrita no item 3.3.2.4.2 e os resultados estão mostrados na Figura 4.9.

Figura 4.9. – Teste de lixiviação realizado em meio contendo Triton X-100.

Conforme mostrado na figura 4.9 o biocatalisador em meio tampão fosfato conseguiu manter até 60 % da sua atividade após 2 horas de tratamento. Entretanto o biocatalisador que esteve em contato com a solução contendo Triton x-100 rapidamente perdeu atividade hidrolítica chegando até um valor próximo a 0. Este resultado indica que a lipase foi imobilizada por adsorção física na superfície do suporte.

Normalmente, quando uma enzima imobilizada é utilizada para catalisar uma reação em um meio orgânico não é necessária forte interação da enzima com o suporte devido à insolubilidade da enzima em meios apolares. Assim sendo, o método de adsorção física se torna um método de imobilização satisfatório para aplicações de lipase em síntese orgânica (MARTIN *et al.*, 2018). Além disso, destaca-se como vantagem a possibilidade de regeneração do suporte para nova imobilização da enzima.

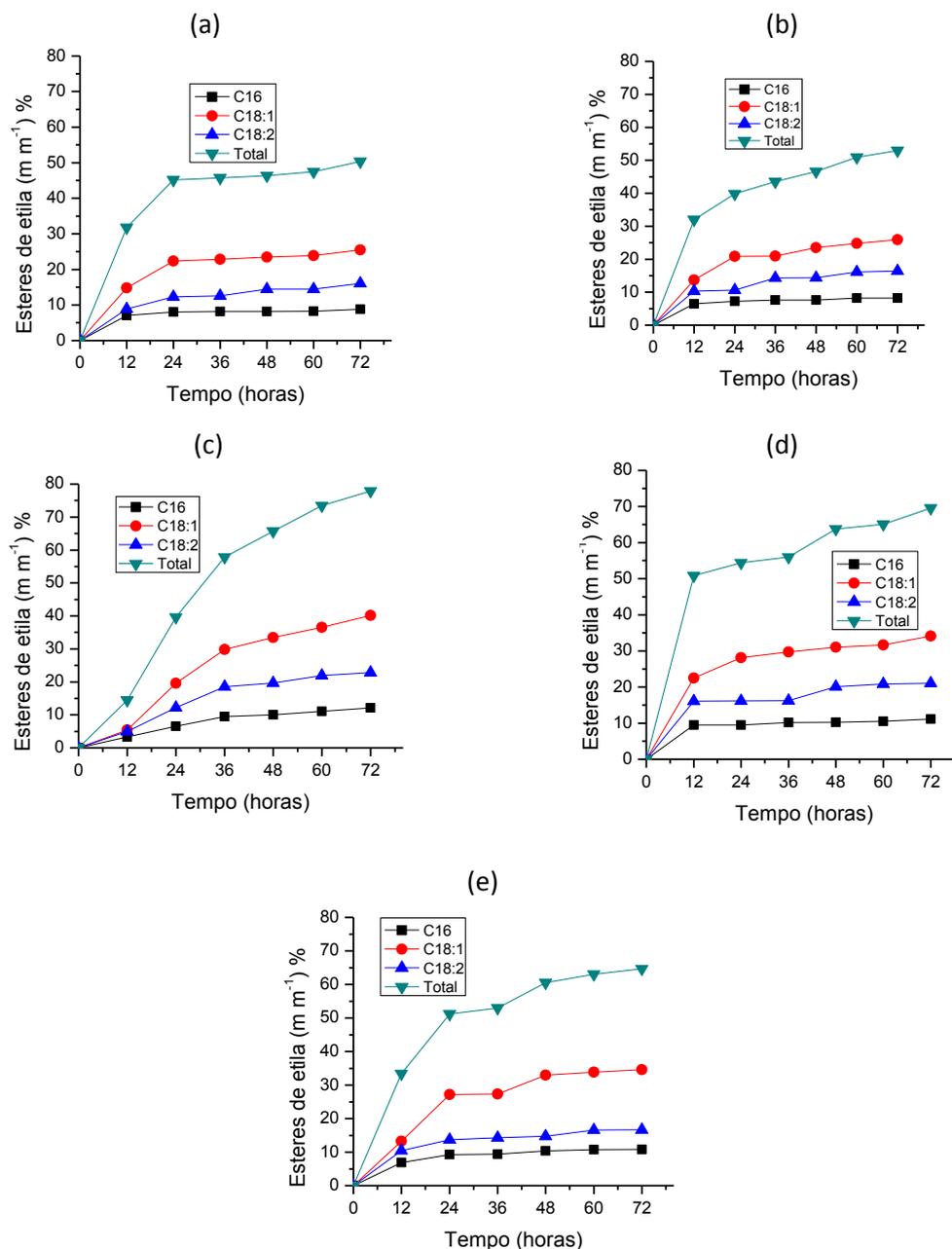
4.3.8. Síntese de ésteres de etila por transesterificação em processo descontínuo

Os ensaios de transesterificação foram efetuados utilizando as preparações de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-βCD utilizando diferentes concentrações de βCD. O perfil de formação dos ésteres de etila é mostrado na Figura 4.10 (a-e) e Tabela 4.6.

Tabela 4.6. – Perfil dos ésteres de etila das amostras obtidas na transesterificação do óleo de pinhão manso com etanol empregando *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-βCD utilizando diferentes concentrações de βCD (72 h de incubação)

Concentração βCD (%)	Concentração individual em ésteres (%)			Concentração total (géster g _{amostra} ⁻¹) (%)	Rendimento de transesterificação (%)
	C16	C18:1	C18:2		
0,5	8,83	25,48	16,04	50,34	64,60
1,0	8,12	25,91	16,41	52,93	67,93
2,0	12,15	40,18	22,81	77,92	100,00
3,0	11,11	34,15	21,05	69,53	89,23
4,0	10,38	32,56	18,65	64,67	83,00

Figura 4.10. – Perfil de formação dos ésteres de etila a partir da reação de transesterificação do óleo de pinhão-mansó com etanol, catalisada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO_2 - β CD utilizando diferentes concentrações de β CD: (a) 0,5 %, (b) 1,0 %, (c) 2,0 %, (d) 3,0 %, (e) 4,0 %.



Pelos resultados descritos na Figura 4.10 e Tabela 4.6 verifica-se que, de modo geral, todas as reações confirmaram a eficiência dos biocatalisadores preparados. Os biocatalisadores imobilizados em suportes contendo 0,5 % e 1,0 % de β CD apresentaram desempenho inferior aos demais. Com base nesses resultados verifica-se que os derivados imobilizados em suportes contendo concentrações de 2,0, 3,0 e 4,0 % de β CD foram os mais ativos, atingindo concentrações elevadas em ésteres de etila (>60 %). Nesta série de ensaios, o equilíbrio das

reações foi alcançado em 72 h, o aumento do carregamento da lipase imobilizada, como esperado, aumenta a velocidade de reação e reduz o ponto de equilíbrio para 48 h, como pode ser verificado nos experimentos descritos nos Apêndices A.3 e A.4. A concentração de éster encontrada neste trabalho está de acordo com a reportada na literatura para processos de transesterificação similares, como mostrado na Tabela 4.7 (TIOSSO *et al.*, 2014; SOUZA, MENDES, DE CASTRO, 2016).

Tabela 4.7. – Resultados referentes ao processo descontínuo obtidos neste trabalho e comparados com trabalhos da literatura.

Biocatalisador	Razão molar óleo/álcool	Condições operacionais	Concentração de éster de etila (%)	Referência
Lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -βCD	1:8	STR, 72 h, 45°C	77,72	Este trabalho
Lipase PS Amano IM	1:9	STR, 48 h, 50°C	74,92	Tiosso <i>et al.</i> , 2014.
Lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA	1:9	STR, 72 h, 45°C	73,65	Souza, Mendes e De Castro, 2016.

Tiosso *et al.* (2014) estudaram a transesterificação do óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) utilizando a lipase PS Amano IM como catalisador e substrato numa razão molar de 1:9 (óleo: etanol) e alcançaram rendimentos da ordem de 99,8 % o que corresponde a uma concentração de éster de etila de 74,92 % ($\text{g}_{\text{éster}} \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}$).

Souza, Mendes e De Castro (2016) avaliaram a transesterificação do óleo de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA como catalisador e uma razão molar de 1:9 (óleo: etanol) e alcançaram rendimentos da ordem de 98,3 % o que corresponde a uma concentração de éster de etila de 73,65 % ($\text{g}_{\text{éster}} \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}$).

4.4. Síntese de ésteres de etila por transesterificação em processo contínuo

Tomando por base os dados descritos na seção 4.3, verifica-se que o suporte preparado com 2 % de β-Ciclodextrina foi o que forneceu o derivado imobilizado mais ativo e estável termicamente, sendo portanto, selecionado para imobilizar a lipase de *B. cepacia* para posterior aplicação em reações de transesterificação do óleo de pinhão manso com etanol em fluxo contínuo.

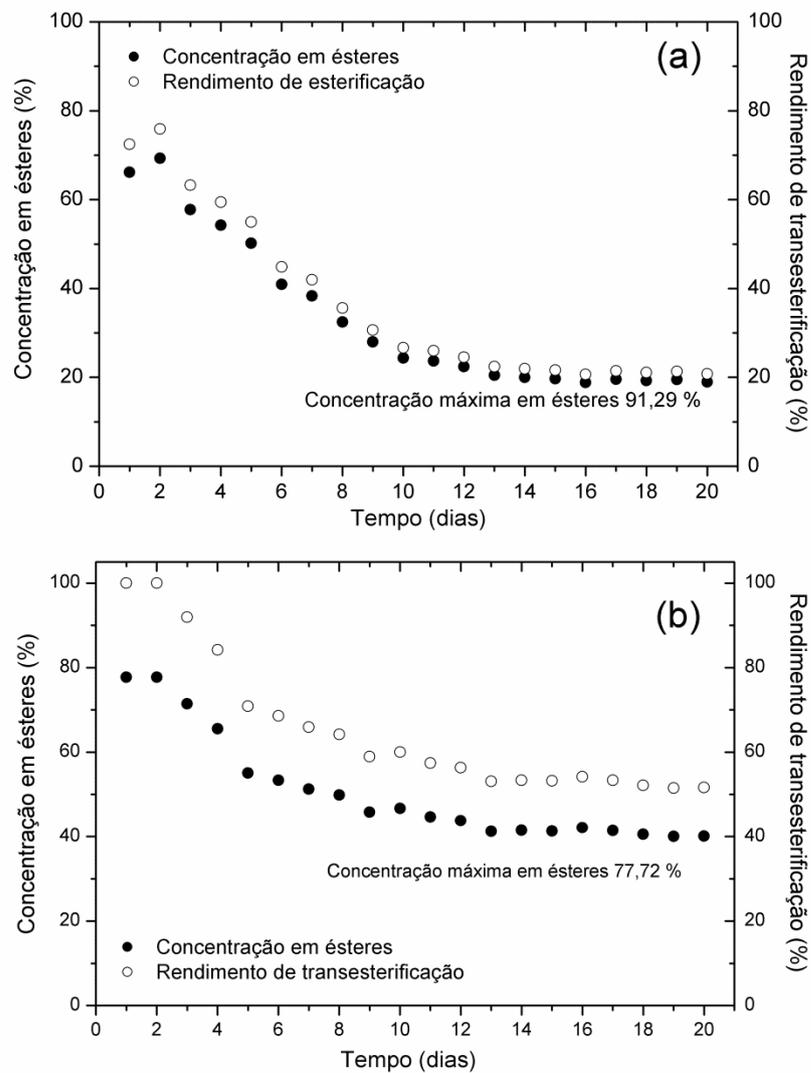
Nesta série de testes foram efetuados seis experimentos (a-f) de acordo com as condições estabelecidas por Ceron *et al.*, (2018) e descritas na Tabela 4.7. Todos os experimentos foram realizados a 50 °C numa vazão fixa de 1,90 mL h⁻¹, correspondendo a um tempo espacial de 8 h. Nos experimentos **a-c** foi verificado o efeito da razão molar óleo: etanol na concentração de ésteres formados e rendimento de transesterificação. Os experimentos (**d**; **e**) foram efetuados para verificar a eficiência da cinza de casca de arroz como material adsorvente na remoção do glicerol acoplado uma coluna extratora na saída do leito catalítico, nestes experimentos foram retiradas amostras antes e após passagem pela coluna extratora. No experimento **f** foi verificada a eficiência da cinza de casca de arroz como material adsorvente quando uma camada de cinza de casca de arroz foi intercalada entre duas camadas de biocatalisador.

O volume útil do reator e a vazão teórica (Tabela 4.8) foram calculados considerando a densidade cristalina do biocatalisador ($\rho = 1,99 \text{ g.cm}^{-3}$) medida conforme a metodologia descrita no item 3.3.2.5. As Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 mostram os rendimentos alcançados nestes seis experimentos e a Tabela 4.9 mostra um resumo dos parâmetros obtidos.

Tabela 4.8. – Condições experimentais adotadas nos experimentos conduzidos em regime contínuo (volume nominal do reator=25,18 mL).

Teste	Reator	Razão molar óleo:álcool	Volume da enzima (mL)	Volume útil do leito (mL)	Vazão teórica (mL.h ⁻¹)	Tempo espacial (h)	Objetivo
A	Figura 3.2 ^a	1:4	10,05	15,13	1,90	8	Avaliar a influência da razão molar
B		1:8					
C		1:12					
D	Figura 3.2 ^b	1:12	8,79	16,39	2,04	8	Avaliar a influência da cinza de casca de arroz
E		1:8					
F	Figura 3.2 ^c	1:12					Confirmar a eficiência da cinza de casca de arroz

Figura 4.11. – Perfil dos ésteres formados e rendimento de transesterificação das reações conduzidas em regime contínuo variando a razão molar do meio de alimentação mantendo fixo o tempo espacial em 8 h: (a) razão molar 1:4, (b) razão molar 1:8, (c) razão molar 1:12.



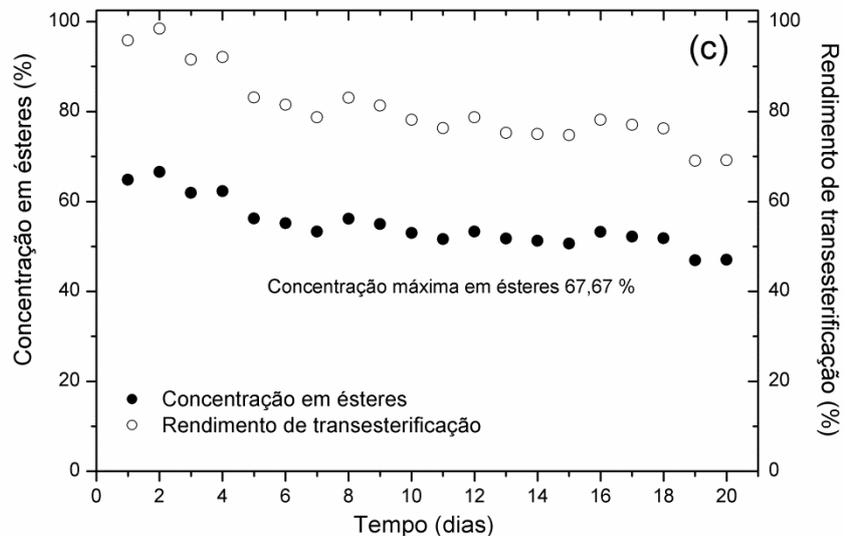


Figura 4.12. –Perfil dos ésteres formados e rendimento de transesterificação das reações conduzidas em regime contínuo utilizando reator de leito fixo acoplado a uma coluna extratora de glicerol empacotada com cinza de casca de arroz (CCA) variando a razão molar do meio de alimentação (1:8 e 1:12) mantendo fixo o tempo espacial em 8 h: (d) razão molar 1:8; (e) razão molar 1:12.

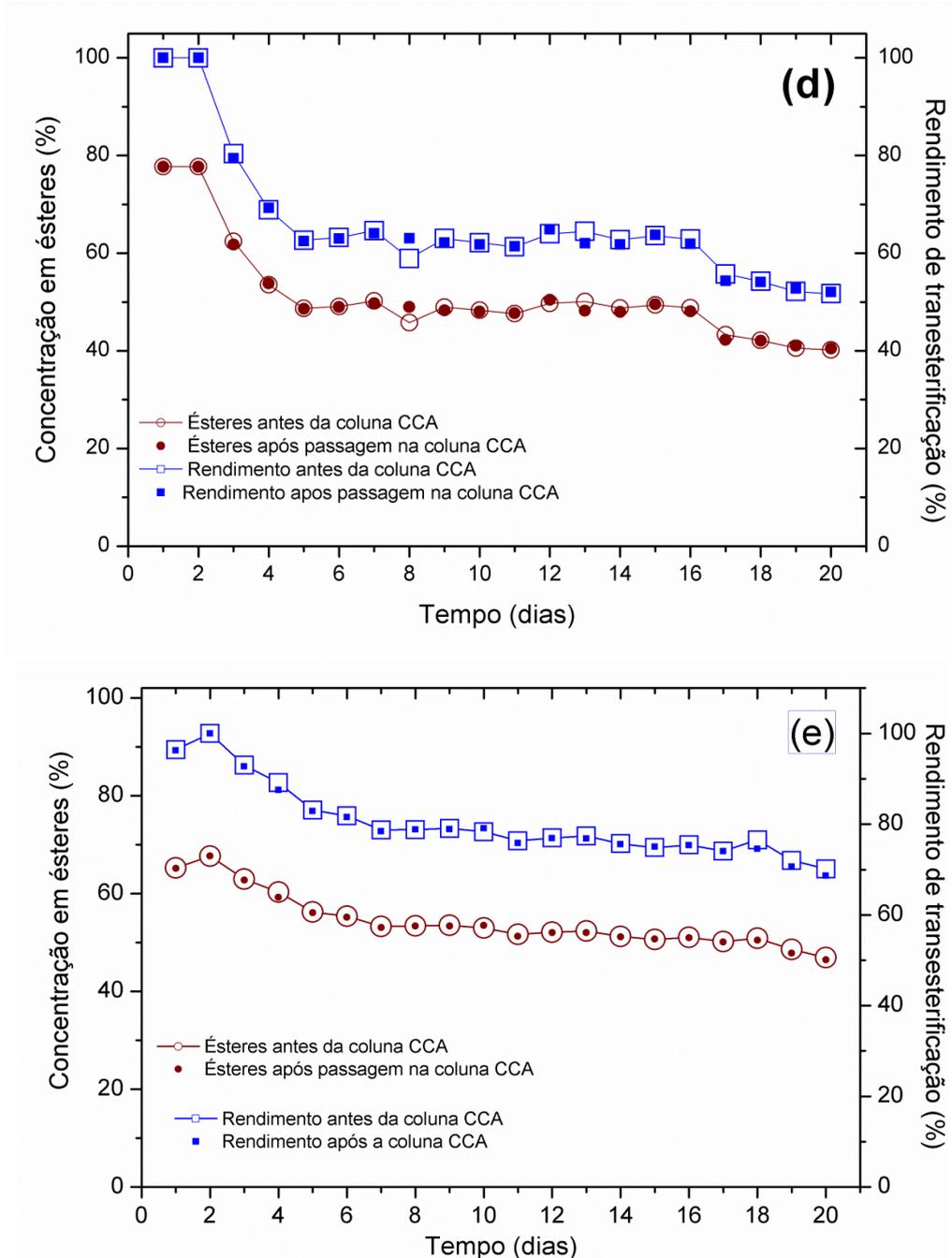


Figura 4.13. – Perfil de formação de ésteres e rendimentos de transesterificação para a reação conduzida em regime contínuo utilizando reator de leito fixo empacotado com duas camadas de biocatalisador intercalada com uma camada de cinza de casca de arroz: (f) razão molar 1:12

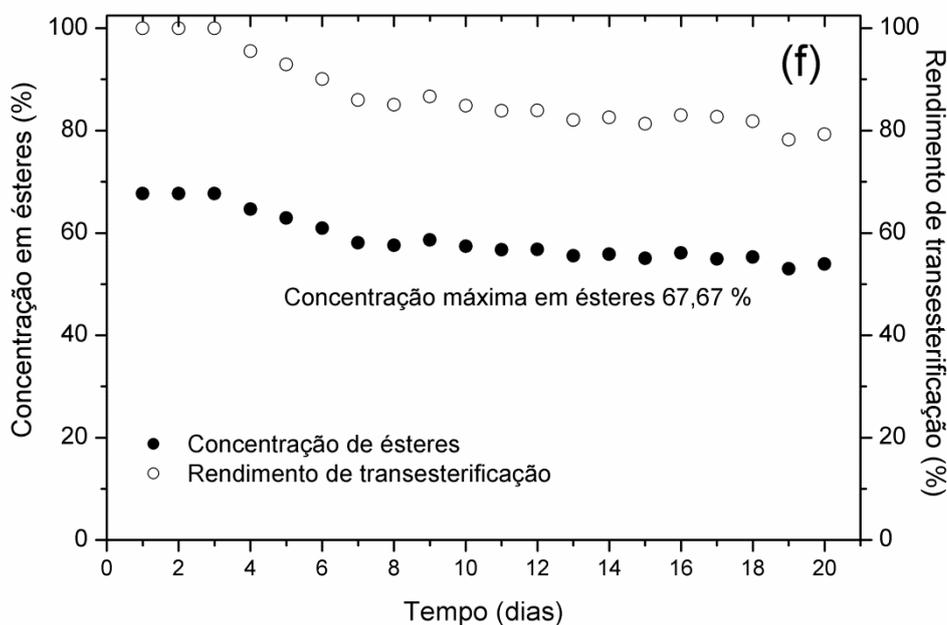


Tabela 4.9. – Parâmetros derivados dos experimentos realizados, tempo espacial fixo em 8 h para diferentes razões molares (óleo: etanol) e diferentes configurações de reator

Parâmetro	Codificação do experimento					
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)
Configuração de reator	Figura 3.2 ^a			Figura 3.2b		Figura 3.2c
Cinza de casca de arroz	Ausente			Coluna de adsorção de glicerol		Intercalada com biocatalisador
Razão molar óleo:etanol	1:4	1:8	1:12	1:8	1:12	1:12
Concentração de ésteres (%) (média)	33,21	50,55	54,72	51,17	54,27	58,82
Rendimento de transesterificação (%) (médio)	36,37	65,04	80,67	65,84	80,20	86,98
Produtividade (mg éster·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	41,51	63,19	68,65	63,96	67,84	73,53

Em todos os experimentos efetuados verificou-se um comportamento similar no perfil de formação de ésteres, alcançando valores máximos nas primeiras 48 h de reação seguida de queda acentuada e manutenção desse valor até a paralização do experimento, sugerindo que a operação do reator pode estar limitada pela presença de caminhos preferenciais. Esta hipótese foi confirmada efetuando um experimento no qual a vazão do fluxo do meio de alimentação foi reduzida (tempo espacial = 14 h) e apesar dessa variação não foi constatada nenhuma alteração do teor de ésteres e rendimento médio (Apêndice A.5).

Apesar dessa limitação, os experimentos a, b, c (Figura 4.11) utilizando a configuração de reator 3.2a indicaram de maneira clara que a razão molar entre os materiais de partida interferiu de maneira marcante no alcance de elevadas conversões dos ácidos graxos presentes no óleo de pinhão manso em seus ésteres de etila correspondentes, sendo o sistema maximizado para substratos contendo maior excesso de etanol (razão molar óleo: etanol de 1:12). Nessas condições, o funcionamento do sistema foi comprovado quantitativamente, fornecendo rendimentos de transesterificação médios de $80,67 \pm 4,68 \%$ e produtividade de $68,65 \pm 2,70 \text{ mg}_{\text{éster}} \cdot \text{g}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Os resultados dos experimentos d, e (Figura 4.12) sugerem que a coluna extratora de glicerol empacotada com cinza de casca arroz acoplada ao reator de leito fixo (configuração de reator 3.2 b) pode ser usada para facilitar a etapa de purificação do biodiesel produzido continuamente, tendo em vista que a cinza de casca de arroz foi seletiva e não adsorveu os ésteres etílicos apenas removeu o glicerol do meio reacional. A aplicação desta estratégia é bem interessante pois elimina a necessidade de efetuar lavagens com água do meio reacional para remoção do glicerol, possibilitando a transferência direta do meio reacional isento de glicerol para etapa de purificação dos ésteres de etila (eliminação do etanol residual).

Destaca-se ainda que o uso de cinza de casca de arroz foi mais efetivo em termos de desempenho global quando usada intercalada entre duas camadas de biocatalisador (configuração de reator 3.2 c) promovendo adsorção do glicerol e aumentando o rendimento de transesterificação para 86,98%, como ilustrado na Figura 4.13 (experimento f) e na Tabela 4.9. Os resultados encontrados estão abaixo dos limites estabelecidos pela ANP que exige um teor de éster mínimo de 96,5% (em massa).

Apesar das diferentes condições utilizadas, os resultados obtidos neste trabalho são similares aos reportados na literatura utilizando lipase de *B. cepacia* imobilizada em matriz híbrida, como mostrado na Tabela 4.10 (COSTA-SILVA *et al.*, 2016; SIMÕES *et al.*, 2015).

Tabela 4.10. – Resultados referentes ao processo contínuo obtidos neste trabalho e comparados com trabalhos da literatura.

Biocatalisador	Sistema e dimensões	Condições e resultados	Referência
Lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -βCD	Único estágio: <i>l</i> = 265 mm, <i>d</i> = 11 mm	Fluxo: 2,04 mL.h ⁻¹ T: 50°C Conversão: 86,98 %	Este trabalho
Lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA	Duplo estágio: <i>l</i> = 55 mm, <i>d</i> = 15 mm	Fluxo: 0,78 mL.h ⁻¹ T: 50°C Conversão: 97,3 %	Costa-Silva <i>et al.</i> , 2016.
Lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA	Único estágio: <i>l</i> = 210 mm, <i>d</i> = 14 mm	Fluxo: 1,73 mL.h ⁻¹ T: 50°C Conversão: 96 %	Simões <i>et al.</i> , 2015

Costa-Silva *et al.* (2016) avaliaram a produção contínua de ésteres pela etanolise do óleo de coco em reator de leito fixo (PBR) (Duplo estágio: diâmetro interno = 15 mm, comprimento = 55 mm e volume = 11 mL), incorporando uma coluna extratora de glicerol contendo Lewatit GF 202, operando em regime contínuo. A reação ocorreu em meio isento de solvente a 50 °C empregando como biocatalisador lipase de *B. cepacia* imobilizada em suporte híbrido sílica-PVA. O rendimento alcançado foi de 88,1 % para o primeiro estágio o que correspondeu uma concentração de ésteres de 50,6 % (g_{éster} g_{amostra}⁻¹) e um rendimento de 97,3 % para o segundo estágio o que correspondeu a uma concentração de ésteres de 58,5 % (g_{éster} g_{amostra}⁻¹) utilizando uma razão molar óleo de coco: etanol de 1:12, na vazão volumétrica de 0,78 mL.h⁻¹ correspondendo a um tempo espacial de 14 h.

Simões *et al.* (2015) estudaram a produção de biodiesel a partir da reação de transesterificação utilizando uma razão molar de 1:12 (óleo de babaçu: etanol) operando em regime contínuo em um reator (diâmetro interno de 14 mm e comprimento de 210 mm). A reação ocorreu a 50 °C empregando como biocatalisador lipase de *B. cepacia* imobilizada em suporte híbrido sílica-PVA. O rendimento obtido foi de 96 % o que corresponde a uma

concentração de ésteres de 60,9 % ($\text{g}_{\text{éster}} \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}$) em tempo espacial de 11 h e vazão volumétrica de $1,73 \text{ mL.h}^{-1}$.

4.5. Distribuição do tempo de residência (DTR)

A Distribuição do Tempo de Residência (DTR) é uma informação importante na operação de reatores que permite diagnosticar problemas de escoamento, entre os quais se destacam: i) existência de zonas de estagnação do fluido ou zonas mortas; ii) curto-circuitagem extrema e subpassagem do fluido; iii) existência de canalização, especialmente em operações em contracorrente; iv) dispersão axial em reatores tubulares e v) segregação, resultante das condições de mistura no reator (FOGLER, 2009).

DTR é determinada experimentalmente injetando no reator uma concentração conhecida de um traçador no tempo zero e medindo a concentração do mesmo no efluente do reator em função do tempo. Os dois métodos mais utilizados para injeção são o de entrada do tipo degrau e do tipo pulso, sendo que neste trabalho, empregou-se o tipo pulso. Em reatores tubulares ideais todos os componentes que saem do reator permanecem exatamente o mesmo tempo em seu interior e, neste caso a DTR é um pico de altura infinita e largura zero, cuja área é igual a 1 (FOGLER, 2009).

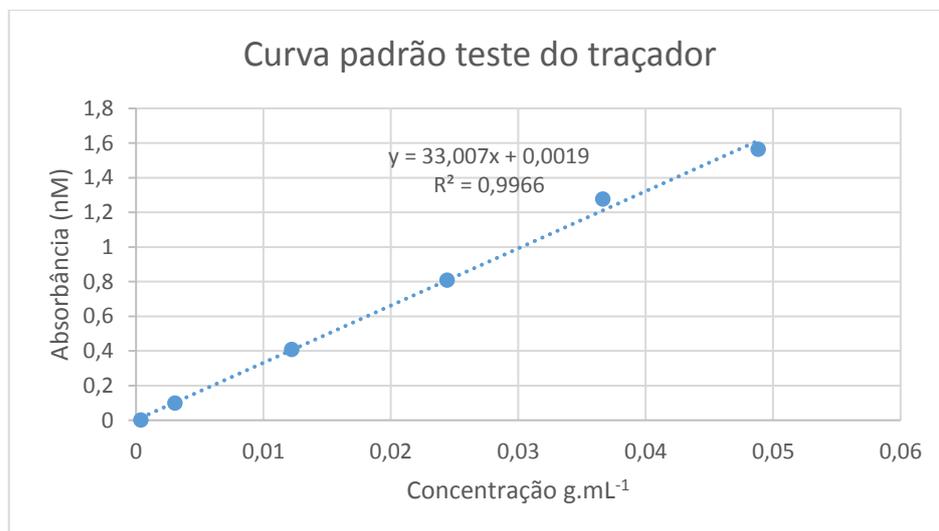
Em reatores ideais, sem caminhos preferenciais ou zonas mortas, o tempo médio de residência (t_m), calculado em função da distribuição do tempo de residência, deve coincidir com o tempo espacial (τ - tempo necessário para se processar um volume de reator), calculado conforme equação 3.6. Quanto maior for o número de caminhos preferenciais e de zonas mortas no empacotamento maior será a diferença entre os valores de tempo médio de residência (t_m) e o tempo espacial (τ) (CERON *et al.*, 2018).

4.5.1. Curva de calibração

A construção da curva de calibração “absorbância em função da concentração de traçador”, para determinar a concentração de traçador na saída do reator foi realizada com o corante lipossolúvel (anilina solúvel em óleo) na concentração de 15 % em meio reacional óleo de pinhão-manso e etanol na razão molar 1:12, adotando a metodologia descrita em 3.2.5.2.1. A varredura inicial feita no espectrofotômetro na faixa da luz visível mostrou que a maior absorbância para esse corante foi observada no comprimento de onda de 637 nm. Desta forma, neste comprimento de onda, foram feitas as leituras subsequentes para diferentes concentrações de solução de traçador em meio reacional empregando como solvente terc-butanol.

Na Figura 4.14 é mostrado o comportamento da absorvância em função da concentração do traçador, tomando por base os dados apresentados no Apêndice A.6.

Figura 4.14. – Absorvância em função da concentração do traçador em meio reacional.



4.5.2. Cálculo da distribuição do tempo de residência (DTR)

No presente trabalho, a função de Distribuição do Tempo de Residência (DTR) foi efetuada utilizando dois aparatos (Figura 3.2-a e Figura 3.2-c) em ambas as dimensões da coluna foram: 265 mm de comprimento de 11 mm de diâmetro. O 1º aparato foi empacotado com 20 gramas de biocatalisador e o 2º com duas camadas de biocatalisador (8,75 g) intercaladas com 2 gramas de cinza de casca de arroz.

No 1º caso foram injetados 0,1488 g da solução de corante lipossolúvel azul (15 %) e no 2º caso foram injetados 0,1693 g da solução de corante lipossolúvel azul (15 %) em meio reacional (óleo de pinhão-manso: etanol na proporção molar de 1:12) no tempo $t = 0$ e, medindo-se a concentração, C , do traçador na saída do reator em função do tempo. O teste foi realizado por 2-2,5 h, efetuando amostragens a cada 10 min.

Os valores de absorvância das amostras previamente diluídas em terc-butanol apresentados nos Apêndices A.7 e A.8 serviram de base para calcular a concentração do corante na saída do reator por meio da equação obtida na curva de calibração (Figura 4.14). As concentrações do traçador na saída do reator foram plotadas em função do tempo (Figura 4.15 a-b) e para cada valor de tempo, a função da DTR, $E(t)$ foi determinada, conforme dados apresentados na Figura 4.16 a-b.

Figura 4.15. – Concentração do corante em função do tempo para os aparatos: a) Figura 3.2-a; b) Figura 3.2-c.

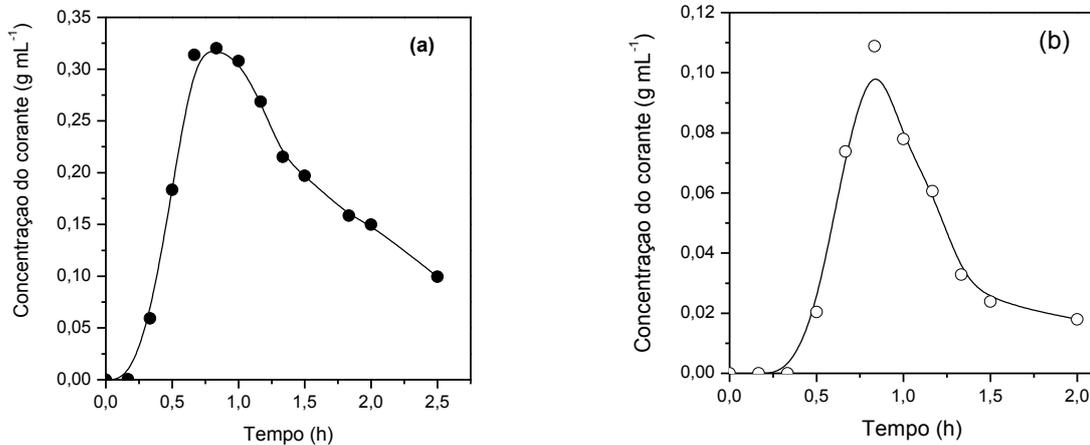
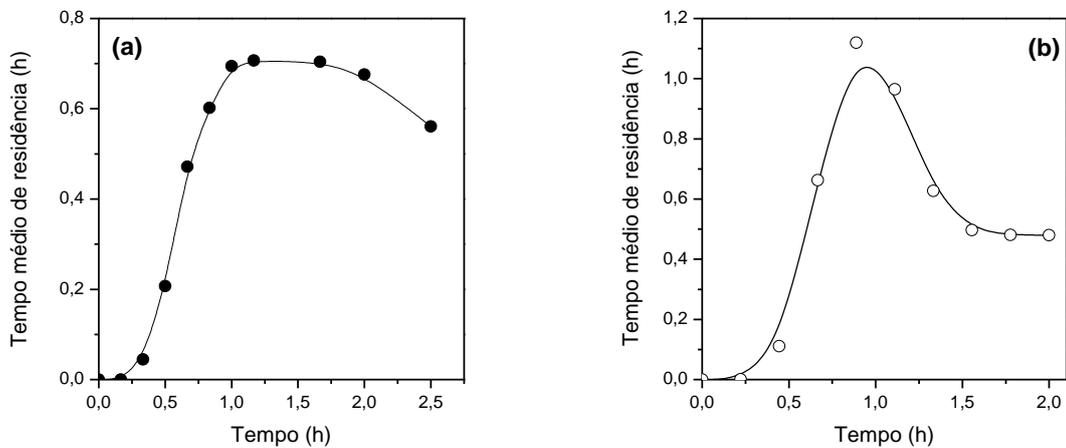


Figura 4.16. – Distribuição do tempo de residência (DTR) para os aparatos: a) Figura 3.2-a; b) Figura 3.2-c.



O tempo espacial calculado foi de 1,26 h para o aparato da Figura 3.2-a e de 1,04 h para o aparato da Figura 3.2-c. Conhecendo-se o volume de líquido do reator, obtido por meio da diferença entre o volume total e o ocupado pelo biocatalisador e pela cinza de casca de arroz no empacotamento, e a vazão volumétrica empregada de 0,35 mL min⁻¹ e de 0,40 mLmin⁻¹ respectivamente, obteve-se tempo espacial de 0,72 h para o aparato da Figura 3.2-a e de 0,67 h para o aparato da Figura 3.2-c.

Comparando-se os tempos espaciais teóricos (0,72h e 0,67 h) com os correspondentes

tempos espaciais calculados (1,26 h e 1,04h), tem-se uma diferença de 0,54 h (32,4 min) para o aparato da Figura 3.2-a e de 0,37 h (22,2 min) para o aparato da Figura 3.2-c. Esses valores são elevados (75 % e 55 %) e indicam forte limitação de transferência de massa do fluido através do reator, refletida, por exemplo, pela relação geométrica do reator. Segundo Damstrup *et al.*, (2007), verifica-se maior resistência à transferência de massa em reatores de coluna que apresentam maior relação altura/diâmetro (l/d), sendo o limite recomendado da ordem de 15. Considerando que no caso do reator usado no presente trabalho esta razão é da ordem de 24 é provável que os desempenhos limitados nos experimentos conduzidos em regime contínuos (seção 4.4) sejam decorrentes dos problemas de escoamento no leito catalítico, como identificado pela função DTR. O espalhamento da curva de DTR apresentado na Figura 4.14 mostra o desvio do comportamento do reator utilizado em relação ao reator tubular ideal.

O valor determinado experimentalmente para a variância, σ^2 , foi 0,32 h² para o aparato da Figura 3.2-a e de 0,16 h² para o aparato da Figura 3.2-c, correspondendo a um desvio-padrão de 0,56 h e de 0,40 h respectivamente. Para o coeficiente de assimetria, s^3 , o valor obtido foi de 0,30 h^{3/2} e de -0,09 h^{3/2}, respectivamente. O número de tanques ideais (n) foi igual a 5,04 e 6,67 respectivamente (Tabela 4.11). Os valores utilizados para os cálculos dos parâmetros assim como os gráficos que auxiliaram nestes cálculos são demonstrados nos Apêndices A.9 até A.12.

Tabela 4.11. – Tempo médio de residência, variância e coeficiente de assimetria obtidos por meio do teste de traçador tipo pulso para os aparatos das figuras 3.2-a e 3.2-c.

Parâmetro	Figura 3.2-a	Figura 3.2-c
Tempo médio de residência, t_m (h)	1,26	1,04
Variância σ^2 (h ²)	0,32	0,16
Coeficiente de assimetria s^3 (h ^{3/2})	0,30	-0,09
n	5,04	6,67

Os resultados obtidos neste trabalho, são similares aos descritos na literatura (SANTANA *et al.*, 2018; SIMÕES *et al.*, 2015; RAMOS *et al.*, 2017; CERON *et al.*, 2018).

Santana *et al.* (2018) encontraram um valor de 29,73 minutos de tempo de residência calculado enquanto o valor teórico foi de 45,90 minutos para a sílica modificada com LIP (líquidos iônicos próticos) indicando variação de 54 %. O valor da variância encontrado foi de 230,68 min² (15,16 h²) e o valor do coeficiente de assimetria foi de 53,56 min^{3/2} (0,12 h^{3/2}).

Simões et al. (2015) avaliaram o teste do traçador tipo pulso em uma coluna contendo 210 mm de comprimento e 14 mm de diâmetro interno empacotada com lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA e obtiveram um valor de variância de 0,6 h² e um coeficiente de assimetria de -0,032 h^{3/2}.

Ramos et al. (2017) realizaram o teste do traçador tipo pulso em um reator de leito fixo contendo dois estágios (diâmetro interno de 14 mm e comprimento de 210 mm) empacotada com lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA e alcançaram valores de variância de 0,79 h² e um coeficiente de assimetria de 0,58 h^{3/2}.

Ceron et al. (2018) calcularam o número de tanques ideais (n) e obtiveram um valor de 7 para o teste feito utilizando óleo de palmiste e óleo fusel como materiais de partida e 12 para o teste feito utilizando óleo de palmiste e álcool isoamila.

4.6. Caracterização da cinza de casca de arroz

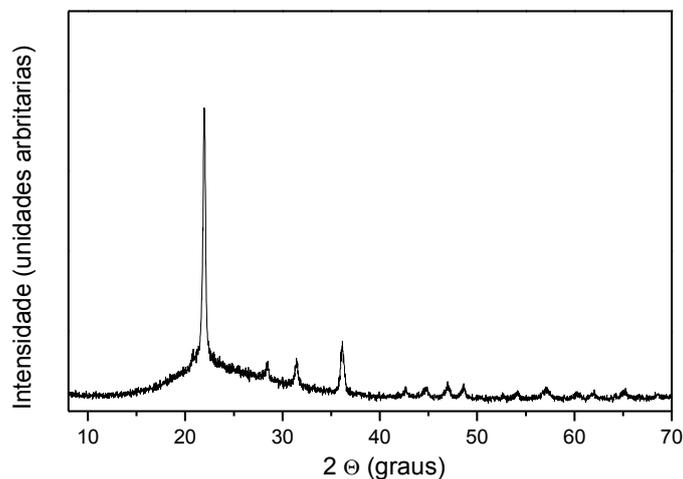
As propriedades texturais e morfológicas (BET, DRX e FTIR) da cinza de casca de arroz são mostradas nas Figuras 4.17, 4.18 e na Tabela 4.12.

Tabela 4.12. – Área específica, volume de poros e diâmetro médio de poro da cinza de casca de arroz obtidos neste trabalho e comparados com o trabalho de Santos et al., 2016.

Área específica (m ² g ⁻¹)	Volume específico dos poros (cm ³ g ⁻¹)	Diâmetro médio dos poros (Å)	Fonte
24,1	0,0216	35,814	Este trabalho
12,0	0,0220	36,500	Santos et al., 2016.

Os valores encontrados estão bem próximos dos dados reportados na literatura. O diâmetro médio dos poros encontrado de 35,8 Å permite caracterizar o material cinza de casca de arroz como mesoporoso, sendo assim, improvável de ocorrer limitações por difusões por conta do glicerol (SANTOS et al., 2016).

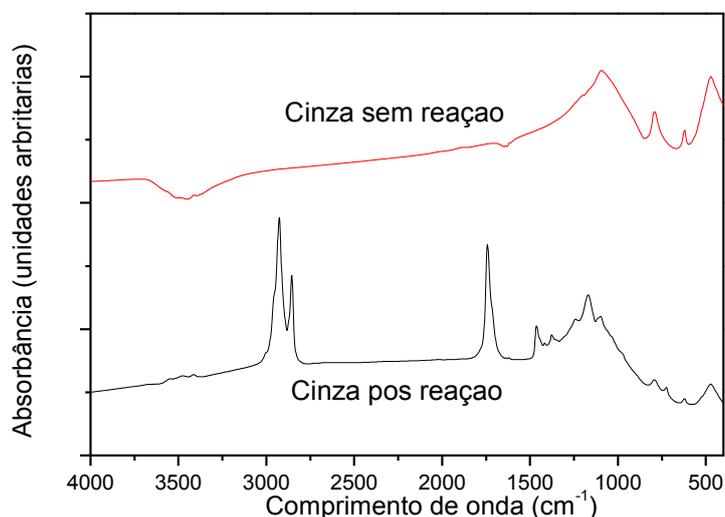
Figura 4.17. – Difratometria de Raios X da cinza de casca de arroz.



O difratograma de raio X da cinza de casca de arroz mostrou a presença de sílica cristalina na forma de cristobalito (SiO_2). A estrutura da sílica (amorfa e/ou cristalina) depende predominantemente da temperatura da calcinação da casca de arroz. A cinza produzida pela combustão em uma temperatura entre 500-600 °C contém estrutura de sílica amorfa. A formação do pico do cristobalito ocorre a 700 °C e a partir de temperaturas acima de 800 °C este pico se torna cada vez mais intenso. O difratograma obtido neste trabalho é similar ao reportado na literatura (SANTOS *et al.*, 2016).

À análise de FTIR para a cinza de casca de arroz *in natura* (antes da reação) e após utilização como material adsorvente na reação de transesterificação contínua de produção de biodiesel é mostrada na Figura 4.18. Verifica-se pelo espectro que após a reação ocorreu o aparecimento de picos em 2920 e 2850 cm^{-1} , que correspondem a vibrações simétricas e assimétricas de grupos CH_2 . Essas bandas confirmam a afinidade da cinza de casca de arroz pelo glicerol devido ao seu alto teor de sílica (SANTOS *et al.*, 2017). Essa análise de FTIR também foi efetuada para o biocatalisador antes e após ser utilizado em uma reação de transesterificação contínua e o gráfico está mostrado no Apêndice A.13.

Figura 4.18. – Espectros no infravermelho da cinza de casca de arroz antes e após a reação de transesterificação.



4.7. Considerações finais

Com a realização desta pesquisa foi possível produzir ésteres etílicos a partir da reação de transesterificação do óleo de pinhão-manso empregando a lipase de *B. cepacia* imobilizada em matriz híbrida de SiO₂-βCD.

Os testes iniciais foram feitos a partir da imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em um suporte híbrido de SiO₂-βCD utilizando diferentes concentrações de βCD na etapa de elaboração do suporte híbrido (variando de 0,5% até 4,0%). Estes testes revelaram valores e comportamentos muito próximos em relação aos rendimentos de imobilização, atividades hidrolíticas (método de hidrólise do azeite de oliva), conversões em ésteres de etila e parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}), comprovando a eficiência deste biocatalisador para mediar reações de transesterificação operando de maneira descontínua.

Uma diferença foi observada no teste de estabilidade térmica realizado com os diferentes biocatalisadores, apresentando 2 patamares distintos: o primeiro patamar mostrou que 2 catalisadores (2 e 3% de βCD) conseguiram reter maior atividade catalítica ao longo da análise de estabilidade térmica e o segundo patamar (0,5; 1,0 e 4,0% de βCD) que revelou menor eficiência para aumentar a estabilidade térmica da lipase livre. Essa avaliação foi muito

importante para selecionar o biocatalisador mais adequado para aplicação no processo de produção contínua de biodiesel, que no caso deste trabalho, teve uma duração de 20 dias.

Outra diferença observada foi na análise de FTIR tanto para os suportes quanto para os biocatalisadores. Para os suportes foi observado diferença no suporte híbrido preparado com 4% de β CD, que apresentou picos mais elevados que os demais suportes, indicando menor eficiência no preparo do material a base de sílica. Os biocatalisadores preparados com 2 e 3 % de β CD revelaram um perfil mais satisfatório a partir dos picos observados indicando uma imobilização mais eficiente.

Testes de lixiviação também foram efetuados visando avaliar a ocorrência de dessorção da enzima para o meio reacional o que provocaria redução do rendimento do processo. O teste de lixiviação realizado em meio reacional revelou que a lipase durante o processo não desprendia do suporte. O teste de lixiviação utilizando material detergente como Triton x-100 mostrou queda brusca da atividade do biocatalisador em função do tempo de incubação, mostrando que a imobilização da lipase no suporte ocorreu por adsorção.

A maior concentração mássica de ésteres etílicos obtida na reação em reator batelada foi igual a 77,92 % ($\text{g}_{\text{éster}} \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}$) representando um rendimento de transesterificação de 100 % utilizando uma razão molar de 1:8 após 72 h de reação. Esse resultado encontrado para o processo em batelada está em um patamar superior aos trabalhos utilizados da literatura, para fins de comparação, mostrando que o biocatalisador preparado tem potencial para mediar essa reação de transesterificação e obter o produto de interesse do trabalho que são os ésteres etílicos (biodiesel).

Com base nos resultados obtidos para as reações de transesterificação operando de maneira descontínua e nos resultados obtidos das caracterizações dos suportes e dos biocatalisadores, o biocatalisador preparado a partir da imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO_2 - β CD contendo 2% de β CD foi escolhido para a realização dos testes de transesterificação operando de maneira contínua.

Para os testes de transesterificação operando de maneira contínua foi avaliada a influência da razão molar na formação de ésteres e rendimento de transesterificação. Foi também testado a potencialidade da cinza de casca de arroz como material adsorvente do glicerol, coproduto da reação de transesterificação que tende adsorver no suporte de imobilização reduzindo o rendimento do processo. A razão molar entre óleo de pinhão manso e etanol foi um parâmetro crítico para obtenção de elevados rendimentos, sendo o desempenho

mais elevado constatado para substratos contendo excesso de etanol, ou seja, razão molar óleo e etanol de 1:12.

Para o processo contínuo a maior concentração mássica (média nos 20 dias de reação) de ésteres etílicos obtida foi de 58,82 % ($\text{g}_{\text{éster}} \text{g}_{\text{amostra}}^{-1}$) alcançando um rendimento de transesterificação de 86,98 %, utilizando uma razão molar de 1:12 e com o material adsorvente de glicerol (cinza de casca de arroz) colocado intercalado com o biocatalisador no reator. Este resultado obtido para o processo contínuo está no mesmo patamar aos trabalhos utilizados da literatura, para fins de comparação, mostrando que o biocatalisador preparado também tem potencial para mediar a reação de transesterificação operando em um reator de leito fixo, de maneira contínua, e obtendo o produto de interesse do trabalho que são os ésteres etílicos (biodiesel).

A eficiência da cinza da casca de arroz foi testada em duas configurações diferentes e foi mais efetiva quando intercalada entre duas camadas de biocatalisador, reduzindo a limitação difusional e a inibição da enzima pela adsorção do glicerol no suporte, proporcionando incrementos na formação de ésteres de etila em relação ao sistema isento de adsorvente. A eficiência da cinza de casca de arroz como material adsorvente do glicerol foi também comprovada pela análise de FTIR do material antes e após utilização em processo contínuo de reação de transesterificação, revelando bandas nos espectros na região característica do glicerol.

Os resultados obtidos comprovaram a eficiência do biocatalisador de lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO_2 - β CD para mediar reações de transesterificação operando em modo descontínuo e contínuo, entretanto melhoramentos são ainda requeridos, principalmente no estudo de determinadas variáveis como é o caso da configuração do reator (relação altura/diâmetro), para se obter o produto alvo com propriedades que atendem os limites exigidos pelas normas brasileiras (Regulamento Técnico ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - nº4/2012), para utilização como combustível. A Tabela 4.13 mostra um resumo dos principais resultados obtidos na realização deste trabalho.

Tabela 4.13. – Principais resultados obtidos neste trabalho.

Biocatalisador	Parâmetro	Valor
Lipase SiO₂- βCD (2 % βCD)	Área específica (m ² g ⁻¹)	325,5
	Volume específico dos poros (cm ³ g ⁻¹)	0,1855
	Diâmetro médio dos poros (Å)	22,799
	Atividade hidrolítica (Ug ⁻¹)	1937,74
	Km (mmol.L ⁻¹)	1767
	Vmax (Ug ⁻¹)	3721
	Lixiviação em meio reacional (%)	0
	Lixiviação em meio com Triton X-100 (%)	100
	Concentração de ésteres (descontínuo) (%)	77,92
	Rendimento de transesterificação (descontínuo) (%)	100
	Razão molar (contínuo)	1:12
	Concentração de ésteres (contínuo) (%)	58,82
	Rendimento de transesterificação (contínuo) (%)	86,98
	Produtividade (contínuo) (mg éster.g ⁻¹ .h ⁻¹)	73,53

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

No presente trabalho foi avaliado a potencialidade da lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em suporte híbrido de SiO₂-βCD obtido pela técnica sol-gel para sintetizar biodiesel a partir da reação de transesterificação do óleo de pinhão manso e etanol. Este biocatalisador foi testado em reações de transesterificação operando de maneira descontínua e contínua. Também foi avaliado a eficiência de um material adsorvente de glicerol (cinza de casca de arroz) nos processos de transesterificação operando de maneira contínua. A partir dos testes realizados foi possível concluir que:

Foi possível imobilizar a lipase de *Burkholderia cepacia* em um suporte híbrido de SiO₂-βCD utilizando diferentes concentrações de βCD (variando de 0,5 % até 4,0 %). Os valores de rendimentos de imobilização, atividades hidrolíticas, conversões em ésteres de etila e parâmetros cinéticos obtidos foram muitos próximos.

Uma diferença foi observada no teste de estabilidade térmica e na análise de FTIR realizado com os diferentes biocatalisadores. Os biocatalisadores preparados com 2 e 3% de βCD conseguiram reter maior atividade catalítica ao longo da análise de estabilidade térmica além de apresentarem um perfil mais satisfatório na análise de FTIR a partir dos picos observados indicando uma imobilização mais eficiente.

O teste de lixiviação realizado em meio reacional revelou que a lipase durante o processo não desprendia do suporte. O teste de lixiviação utilizando material detergente como Triton x-100 mostrou queda brusca da atividade do biocatalisador em função do tempo de incubação, mostrando que a imobilização da lipase no suporte ocorreu por adsorção.

Com base nos resultados obtidos na 1ª parte do trabalho, o biocatalisador preparado a partir da imobilização da lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-βCD contendo 2% de βCD foi escolhido para a realização dos testes de transesterificação operando de maneira contínua.

Para os testes de transesterificação operando de maneira contínua a razão molar 1:12 óleo de pinhão-manso:etanol obteve o desempenho mais elevado. Também foi avaliada a potencialidade do material adsorvente de cinza de casca de arroz e sua eficiência foi comprovada quando intercalada com o biocatalisador.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Outros testes conduzidos em fluxo contínuo são sugeridos como trabalho futuro para comprovação da eficiência deste aparato experimental. Como principais sugestões temos:

- Avaliar outras configurações de reator, com relação ao comprimento (l) e diâmetros internos (d) diferentes. Avaliar se a relação l/d influencia no rendimento do processo;
- Avaliar a utilização da cinza de casca de arroz misturada com o biocatalisador no processo de transesterificação;
- Realizar outros testes contendo outros tipos de materiais adsorventes e compará-los com os resultados já obtidos utilizando cinza de casca de arroz;
- Avaliar a utilização do mesmo aparato experimental, porém utilizando diferentes óleos vegetais;
- Avaliar a possibilidade de se utilizar outro suporte na etapa de imobilização assim como diferentes fontes de lipase.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS

ABBEHAUSEN C.; FORMIGA A. L. B.; SABADINI E.; YOSHIDA I. V. P. A β -Cyclodextrin/ siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and inclusion complexes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, p.1867-1876, 2010.

ABDULLA, R.; RAVINDRA, P. Immobilized *Burkholderia cepacia* lipase for biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 8-13, 2013.

AGARWAL, A. K.; GUPTA, J. G.; DHAR, A. Potential and challenges for large-scale application of biodiesel in automotive sector. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 61, p.113-149, 2017.

ALI, C. H.; QURESHI, A. S.; MBADINGA, S. M.; LIU, J.; YANG, S.; UM, B. Biodiesel production from waste cooking oil using onsite produced purified lipase from *Pseudomonas aeruginosa* FW_SH-1: Central composite design approach. **Renewable Energy**, v. 109, p. 93-100, 2017.

ALSHARIFI, M.; ZNAD, H.; HENA, S.; ANG, M. Biodiesel production from canola oil using novel Li/TiO₂ as a heterogeneous catalyst prepared via impregnation method. **Renewable Energy**, v. 114, p. 1077-1089, 2017.

AMINI, Z.; ILHAM, Z.; ONG, H. C.; MAZAHARI, H.; CHEN, W. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 141, p. 339-353, 2017.

ANDRADE, L.H., REBELO, L.P., NETTO, C.G.C.M., TOMA, H.E. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 55–62, 2010.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <www.anp.gov.br> Acesso em 30 de Dezembro de 2019.

ARAÚJO, F. D. S.; ARAÚJO, I. C.; COSTA, I. C. G.; DE MOURA, C. V. R.; CHAVES, M. H.; ARAÚJO, E. C. E. Study of degumming process and evaluation of oxidative stability of methyl and ethyl biodiesel of *Jatropha curcas* L. oil from three different Brazilian states. **Renewable Energy**, v. 71, p. 495-501, 2014.

ARUMUGAN, A.; PONNUSAMI, V. Biodiesel production from *Calophyllum inophyllum* oil lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within reticulated foams. **Renewable Energy**, v. 64, p. 276-282, 2014.

BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Investigation of deactivation thermodynamics of lipase immobilized on polymeric carrier. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, 741-757, 2017.

BAGHBAN, A.; HEIDARIZADEH, M.; DOUSTKHAH, E.; ROSTAMMIA, S.; REZAEI, P. F. Covalently bonded pancreatic lipase onto the dithiocarbamate/chitosan-based magnetite: stepwise fabrication of Fe₃O₄@CS/NHCS-Lip as a novel and promising nanobiocatalyst. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1194-1200, 2017.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14, 2010.

BASSAN, I. A. L.; NASCIMENTO, D. R.; GIL, R. A. S. S.; DA SILVA, M. I. P.; MOREIRA, C. R.; GONZALEZ, W. A.; FARO JR, A. C.; ONFROY, T.; LACHTER, E. R. Esterification of fatty acids with alcohols over niobium phosphate. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 619-624, 2013.

BENASSI, L.; BOSIO, A.; DALIPI, R.; BORGESSE, L., RODELLA, N.; PASQUALI, M.; DEPERO, L. E.; BERGESSE, P.; BOMTEMPI, E. Comparison between rice husk ash grown in different regions for stabilizing fly ash from a solid waste incinerator. **Journal of Environmental Management**, v. 159, p. 128 -134, 2015.

BENCZE, L. C.; BARTHA-VÁRI, J. H.; KATONA, G.; TOSA, M. I.; PAIZS, C. Nanobioconjugates of *Candida antartica* lipase B and single-walled carbon nanotubes in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 853-860, 2016.

BHOSALE, R. R.; SHENDE, R. V.; PUSZYNSKI, J. A. Thermochemical water-splitting for H₂ generation using sol-gel derived Mn-ferrite in a packed bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 2924-2934, 2012.

BOCKEY, D. The significance and perspective of biodiesel production – A European and global view. **Oilseeds & Fats Crops and Lipids**, v. 26, n. 40, p. 1-8, 2019.

BOSCOLO, B.; TROTTA, F.; GHIBAUDI, E. High catalytic performances of *Pseudomonas fluorescens* lipase adsorbed on a new type of cyclodextrin-based nanosponges. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 155-161, 2010.

BOUAID, A.; ACHERKI, H.; GARCIA, A.; MARTINEZ, M.; AEACIL, J. Enzymatic butanolysis of coconut oil. Biorefinery approach. **Fuel**, v. 209, p. 141-149, 2017.

BRASK, J.; DAMSTRUP, M. L.; NIELSEN, P. M.; HOLM, H. C.; MAES, J.; GREYT, W. Combining enzymatic esterification with conventional alkaline transesterification in an integrated biodiesel process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 918-927, 2011.

BUASRI, A.; CHAIYUT, N.; LORYUENYONG, V.; RODKLUM, C.; CHAIKWAN, T.; KUMPHAN, N. Continuous process for biodiesel production in packed bed reactor from waste frying oil using potassium hydroxide supported on *Jatropha curcas* fruit shell as solid catalyst. **Applied Sciences**, v. 2, p. 641-653, 2012.

BUDZAKI, S.; MILIJĆ, G.; TISMA, M.; SUNDARAM, S.; HESSEL, V. Is there a future for enzymatic biodiesel industrial production in microreactors ? **Applied Energy**, v. 201, p. 124-134, 2017.

CARVALHO, A. K. F.; DA RÓS, P. C. M.; TEIXEIRA, L. F. ANDRADE, G. S. S.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Assessing the potential of non-edible oils and residual fat to be used as a feedstock source in the enzymatic ethanolysis reaction. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 485-493, 2013.

CERON, A. A.; VILAS BOAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, H. F. Synthesis of biolubrificant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous process. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 166-172, 2018.

CERRI, C. E. P.; YOU, X.; CHERUBIN, M. R.; MOREIRA, C. S.; RAUCCI, G. S.; CASTIGIONI, B. A.; ALVES, P. A.; CERRI, D. G. P.; MELLO, D. F. C.; CERRI, C. C. Assessing the greenhouse gas emissions of Brazilian soybean biodiesel production. **PLOS ONE**, p. 1-14, 2017.

CHAE, M.; PARK, H.; KWON, K.; KIM, J.; HONG, S. I.; KIM, Y.; KIM, B. H.; KIM, I. Lipase-catalyzed interesterification in packed bed reactor using 2 different temperatures. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 4, 2011.

CHAKRACORTY, S.; BASU, S.; LAHIRI, A.; BASAK, S. Inclusion of chrysin in β -cyclodextrin nanocavity and its effect on antioxidante potential of chrysin: a spectroscopic and molecular modeling approach. **Journal of Molecular Structure**, v. 977, p. 180-188, 2010.

CHAUDHURI, S.; CHAKRABORTY, S.; SENGUPTA, P. K. Encapsulation of serotonin in β -cyclodextrin nano-cavities: Fluorescence spectroscopic and molecular modeling studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 975, p. 160-165, 2010.

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.

CHEN, G. Y.; SHANA, R.; SHI, J. F.; YAN, B. Transesterification of palm oil to biodiesel using rice husk ash-based catalysts. **Fuel Processing Technology**, v. 133, p. 8– 13, 2015.

CHEN, Y.; CAO, Y.; SUO, Y.; ZHENG, G.; GUAN, X.; ZHENG, X. Mesoporous solid acid catalysts of 12-tungstosilic acid anchored to SBA-15: Characterization and catalytic properties for esterification of oleic acid with metanol. **Journal of the Taiwan Insitute of Chemical Engineers**, v. 51, p. 186-192, 2015.

CHEN, Z.G., TAN, R.X., HUANG, M. Efficient regioselective acylation of andrographolide catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 415–418, 2010.

CHOI, N.; KIM, Y.; LEE, J.; KWAK, J.; LEE, J.; KIM, I. Synthesis of fatty acid ethyl ester from acid oil in a continuous reactor via an enzymatic transesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, p. 311-318, 2016.

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

CIPOLATTI, E. P.; SILVA, M. J. A.; KLEIN, M.; FEDDERN, V.; FELTES, M, M, C.; OLIVEIRA, J. V.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56-67, 2014.

CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, p.85-96, 2017.

COSTA-SILVA, W.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Continuous enzymatic biodiesel production from coconut oil in two-stage packed-bed reactor incorporating an extracting column to remove glycerol formed as by-product. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 1611-1617, 2016.

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

CULLITY, B. D.; STOCK, S.R., STOCK, S. **Elements of X ray Diffraction**. 3rd Ed. New York: Prantice Hall: 2001.664 p. ISBN 10: 0201610914, ISBN-139780201610918.

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

DA RÓS, P. C. M.; COSTA-SILVA, W.; GRABAUSKAS, D.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Biodiesel from babassu oil: Characterization of the product obtained by enzymatic route accelerated by microwave irradiation. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 313-320, 2014.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5508–5516, 2010.

DE, T.; SIKDER, J.; NARAYANAN, C. M. Biodiesel synthesis using immobilised lipase enzyme in semi-fluidised bed bioreactors – bioreactor design and performance analysis. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 36, n. 5, p. 1537-1545, 2017.

DE ARAÚJO, C. D. M.; DE ANDRADE, C. C.; SILVA, E. S.; DUPAS, F. A. Biodiesel production from used cooking oil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 445-452, 2013.

DE SOUZA, R. L.; DE FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L. S.; IGLESIAS, M.; MATTEDI, S.; ZANIN, G. M.; DOS SANTOS, O. A. A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using silica sol-gel. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, p.141-150, 2013.

DIAS, G. S.; LUZ, L. F. L.; 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.

ENDALEW, A. K.; KIROS, Y.; ZANZI, R. Heterogeneous catalysis for biodiesel production from *Jatropha curcas* oil (JCO). **Energy**, v. 36, p. 2693-2700, 2011.

FAN, L.; DU, Y.; ZHANG, B.; YANG, J.; ZHOU, J.; KENNEDY, J. F. Preparation and properties of alginate/carboxymethyl chitosan blend fibers. **Carbohydrate Polymers**, v.65, p. 447–452, 2006.

FARFAN-CABRERA, L. I.; GALLARDO-HERNÁNDEZ, E. A.; PÉREZ-GONZÁLEZ, J. Compatibility study of common sealing elastomers with a biolubricant (*Jatropha* oil). **Tribology International**, v. 116, p. 1-8, 2017.

FERNANDES, I. J.; CAVALHEIRO, D.; KIELING, A. G.; MORAES, C. A. M.; ROCHA, T. L. A. C.; BREHN, F. A.; MODOLO, R. C. E. Characterization of rice husk ash produced using different biomass combustion techniques for energy. **Fuel**, v. 165, p. 351–359, 2016.

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; LOPEZ-CARROBLES, N.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; GORINES, B. C.; OTERO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Physical crosslinking of lipase from *Rhizomucor miehei* immobilized on octyl agarose *via* coating with ionic polymers: Avoiding enzyme release from the support. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 81-88, 2017.

FILLIÈRES, R.; BENJELLOUN-MLAYAH, B.; DELMAS, M. Ethanolysis of rapeseed oil: Quantitation of ethyl esters, mono-, di-, and triglycerides and glycerol by high-performance size-exclusion chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 4, p. 427–432, 1995.

FOGLER, H.S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**, 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2009.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interstification of babassu oil (*Orbinya* sp). **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1068-1074, 2009.

FREITAS, L.; PAULA, A. V.; SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO₂-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 78-90, 2010.

GIDWANI, B.; VYAS, A. Synthesis, characterization and application of Epichlorohydrin- β -cyclodextrin polymer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 130-137, 2014.

GOHAIN, M.; DEVI, A.; DEKA, D. *Musa balbisiana* Colla peel as highly effective renewable heterogeneous base catalyst for biodiesel production. **Industrial Crops & Products**, v. 109, p. 8-18, 2017.

GRECO-DUARTE, J.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; DA SILVA, J. A. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D. M. G. Two-step enzymatic production of environmentally friendly biolubricants using castor oil: enzyme selection and product characterization. **Fuel**, v. 202, 196-205, 2017.

GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1447-1464, 2015.

HAJAR, M.; SHOKROLLAHZADEH, S.; VAHABZADEH, F.; MONAZZAMI, A. Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 188-194, 2009.

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

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, 2011a.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; KURATANI, N.; NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, p. 66-71, 2011b.

HAMA, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; NODA, H.; KONDO, A. Enzymatic production of biodiesel from waste cooking oil in a packed-bed reactor: An engineering approach to separation of hydrophilic impurities. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 417-421, 2013.

HAMDAN, S. H.; CHONG, W. W. F.; NG, J. GHAZALI, M. J.; WOOD, R. J. K. Influence of fatty acid methyl ester composition on tribological properties of vegetable oils and duck fat derived biodiesel. **Tribology International**, v. 113, p. 76-82, 2017.

HARTMANN, L., LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, v. 22, n. 6, p. 475-477, 1973.

HATAMI, M.; AHMADIPOUR, M.; ASGHARI, S. Heterocyclic grafting functionalization of silica nanoparticles: fabrication, morphological investigation and application for PVA nanocomposites. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 27, p. 1072-1083, 2017.

HE, B.; SHAO, Y.; REN, Y.; LI, J.; CHENG, Y. Continuous biodiesel production from acidic oil using a combination of cation- and anion-exchange resins. **Fuel Processing Technology**, v. 130, p. 1-6, 2015.

HSU, A.; JONES, K. C.; FOGLIA, T. A.; WILLIAM, N. M. Continuous production of ethyl esters of grease using an immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 8, p. 749-752, 2004.

ILMI, M.; KLOEKHORST, A.; WINKELMAN, J. G. M.; EUVERINK, G. J. W.; HIDAYAT, C.; HEERES, H. J. Process intensification of catalytic liquid-liquid solid processes: continuous biodiesel production using an immobilized lipase in a centrifugal contactor separator. **Chemical Engineering Journal**, v. 321, p. 76-85, 2017.

INSTITUO ALDOFO LUTZ. **Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Aldofo Lutz, 2008.

ITABAIANA, I.; MIRANDA, L. S. M.; DE SOUZA, R. O. M. A. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 1-9, 2013.

JONAS, M.; KETLOGETSWE, C.; GANDURE, J. Variation of *Jatropha curcas* seed oil content and fatty acid composition with fruit maturity stage. **Heliyon**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2020.

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.

KARIMI, M.; Immobilization of lipase onto mesoporous magnetic nanoparticles for enzymatic synthesis of biodiesel. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 182-188, 2016.

KAROUT, A.; PIERRE, A. C. Partial transesterification of sunflower oil with ethanol by a silica fiber reinforced aero gel encapsulated lipase. **Journal of Sol-gel Science and Technology**, v. 52, p. 276-286, 2009.

KAWAKAMI, K.; ODA, Y.; TAKAHASHI, R. Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized sílica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of metanol and crude *Jatropha* oil. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 42, p. 1-11, 2011.

KO, M. J.; PARK, H. J.; HONG, S. Y.; YOO, Y, J. Continuous biodiesel production using *in situ* glycerol separation by membrane bioreactor system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 69-75, 2012.

KOH, M. Y.; GHAZI, T. I. M. A review of biodiesel production from *Jatropha curcas L.* oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 2240-2251, 2011.

KUAN, I.; LEE, C.; TSAI, B.; LEE, S.; LEE, W.; YU, C. Optimizing the production of biodiesel using lipase entrapped in biomimetic silica. **Energies**, v. 6, p. 2052-2064, 2013.

KUEPETHKAEW, S.; SANGKHARAK, K.; BENJAKUL, S.; KLOMKLAO, S. Optimized synthesis of biodiesel using lipase from Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas. **Renewable Energy**, v. 104, p. 139-147, 2017.

KUMAR, G.; SINGH, V.; KUMAR, D. Ultrasonic-assisted continuous methanolysis of *Jatropha curcas* oil in the appearance of biodiesel used as an intermediate solvent. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v. 39, p. 384-391, 2017.

KUSS, V. V.; KUSS, A. V.; DA ROSA, R. G.; ARANDA, D. A. G.; CRUZ, Y. R.; Potential of biodiesel production from palm oil at Brazilian Amazon. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 1013-1020, 2015.

LAVIOLA, B. G.; RODRIGUES, E. V.; TEODORO, P. E.; PEIXOTO, L. A.; BHERING, L. L. Biometric and biotechnology strategies in *Jatropha* genetic breeding for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 894-904, 2017.

LEE, J. H.; YOO, H. Y.; SUH, Y. J.; HAN, S. O.; PARK, C.; KIM, S. W. Process development using co-immobilized lipases for biodiesel production. **International Conference on Future Environment and Energy**, v. 28, p. 171-174, 2012.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. 3^a ed. São Paulo: Editora Edgard. 2000.

LI, J.; XU, J.; XU, Q.; FANG, G. Preparation and characterization of Al doped ZnO thin films by sol-gel process. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 542, p. 151-156, 2012.

LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. *Química Nova*, v. 22, n. 2, p. 229-245, 1999.

LIN, C.; TSAI, S.; CHANG, M. Spontaneous growth by sol-gel process of low temperature ZnO as cathode buffer layer in flexible inverted organic solar cells. **Organic Electronics**, v. 46, p. 218-225, 2017.

LIU, Y.; CHEN, D.; YAN, Y.; PENG, C.; XU, L. Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10414-10418, 2011.

LIU, C.; ZHANG, S.; SU, Z.; WANG, P. LiCl-induced improvement of multilayer nanofibrous lipase for biodiesel synthesis. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 266-272, 2012.

LV, L.; DAI, L.; DU, W.; LIU, D. Effect of water on lipase NS81006-catalyzed alcoholysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 239-244, 2017.

MA, L.; ZHOU, L.; JIANG, Y.; HE, Y.; WANG, L.; GAO, J. Lipase based static emulsions as efficient biocatalysts for biodiesel production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, p. 1248-1255, 2017.

MACARIO, A.; GIORDANO, G. Catalytic conversion of renewable sources for biodiesel production: a comparison between biocatalysts and inorganic catalysts. **Catalysis Letters**, v. 143, p. 159-168, 2013.

MAHMUDUL, H. M.; HAGOS, F. Y.; MAMAT, R.; ADAM, A. A.; ISHAK, W. F. W.; ALENEZI, R. Production, characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 497-509, 2017.

MANUNZA, B.; DEIANA, S.; PINTORE, M.; GESSA, C. Structure and internal motion of solvated beta-Cyclodextrin: a molecular dynamics study. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 419, p. 133-137, 1997.

MARTIN, L. S, CERON, A, OLIVEIRA, P. C, ZANIN, G. M, DE CASTRO, H. F. Different organic components on silica hybrid matrices modulate the lipase inhibition by the glycerol formed in continuous transesterification reactions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 62, p. 462-470, 2018.

MARTIN, L. S, CERON, A, MOLINARI, D, DE MORAES, F. F, ARROYO, P. A, DE CASTRO, H. F, ZANIN, G. M. Enhancement of lipase transesterification activity by immobilization on β -cyclodextrin-based polymer, **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 91, p. 92-100, 2019.

MENDES, A. A. DE OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MÓDOLO, M. L.; VALANDRO, S. R.; PESSOA, C. A.; FUJIWARA, S. T. Carbon ceramic electrodes obtained by basic catalysis of sol-gel. **Electrochimica Acta**, v. 112, p. 783-790, 2013.

MORENO-PIRAJÀN, J. C.; GIRALDO, L. Study of immobilized *Candida rugosa* lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 4, p. 55-62, 2011.

MU'AZU, K.; MOHAMMED-DABO, I. A.; WAZIRI, S. M.; AHMED, A. S.; BUGAJE, I. M.; AHMAD, A. S. Development of a mathematical model for the esterification of *Jatropha curcas* seed oil. **Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels**, v. 4, n. 3, p. 44-52, 2013.

MUKHTAR, H.; KHURSHEED, S.; HAQ, I. U.; MUMTAZ, M. W.; RASHID, U.; AL-RESAYES, S. I. Optimization of lipase biosynthesis from *Rhizopus oryzae* for biodiesel production using multiple oils. **Chemical Engineering Technology**, v. 39, n. 9, p. 1707-1715, 2016.

NARAYANAN, C. M.; DE, T. Studies on synthesis of biodiesel from microalgae oil in immobilized lipase fluidized bed bioreactor. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 5, p. 33-42, 2015.

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

NAVARRO, R.; ARANCIBIA, C.; HERRERA, M. L.; MATIACEVICH, S. Effect of type of encapsulating agent on physical properties of edible films based on alginate and thyme oil. **Food and Bioproducts Processing**, v. 97, p. 63-75, 2016.

NGIM, K. K.; GU, Z.; CATALANO, T. Characterization and resolution of reversed phase HPLC chromatography failure attributed to sulfobutylether- β -cyclodextrin in a pharmaceutical sample preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 660-669, 2009.

NORAINI, M. Y.; ONG, H. C.; BADRUL, M. J.; CHONG, W. T. A review on potential enzymatic reaction for biofuel production from algae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 24-34, 2014.

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

OZMEN, E. Y.; YILMAZ, M. Pretreatment of *Candida rugosa* lipase with soybean oil before immobilization on β -cyclodextrin-based polymer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, p. 58-62, 2009.

PARAWIRA, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 82-93, 2009.

PATEL, A.; ARORA, N.; MEHTAMI, J.; PRUTHI, V.; PRUTHI, P. A. Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 77, p. 604-616, 2017.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; DE CASTRO, H. F. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 35-40, 2008.

PÉREZ-GONZALEZ, M.; TOMÁS, S. S.; MORALES-LUNA, M.; ARVIZU, M. A.; TELLEZ-CRUZ, M. M. Optical, structural, and morphological properties of photocatalytic TiO₂-ZnO thin films synthesized by the sol-gel process. **Thin Solid Films**, v. 594, p. 304-309, 2015.

PINGAN, H.; MENGJUN, J.; YANYAN, Z.; LING, H. A silica/PVA adhesive hybrid material with high transparency, thermostability and mechanical strength. **RSC Advances**, v. 7, p. 2450-2459, 2017.

PONYRKO, S.; KOBERA, L.; BRUS, J.; MATEJKA, L. Epoxy-silica hybrids by nonaqueous sol-gel process. **Polymer**, v. 54, p. 6271-6282, 2013.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 511-525, 2015.

PURCAR, V.; STAMANTIN, I.; CINTEZA, O.; PETCU, C.; RADITOIU, V.; GHIUREA, M.; MICLAUS, T.; ANDRONIE, A. Fabrication of hydrophobic and antireflective coatings based on hybrid silica films by sol-gel process. **Surface & Coatings Technology**, v. 206, p. 4449-4454, 2012.

QIAN, J.; SHI, H.; YUN, Z. Preparation of biodiesel from *Jatropha curcas* L. oil produced by two-phase solvent extraction. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7025-7031, 2010.

RAIA, R. Z, DA SILVA, L. S, MARCUCCI, S. M. P, ARROYO, P. A. Biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil by simultaneous esterification and transesterification using sulphated zirconium. **Catalysis Today**, v. 289, p. 105-114, 2017.

RAKKAN, T.; SUWANNO, S.; PAICHID, N.; YUNU, T.; KLOMKLAO, S.; SANGKHARAK, K. Optimized synthesis method for transesterification of residual oil from palm oil mill effluent and lipase from Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas to environmentally friendly biodiesel. **Fuel**, v. 209, p. 309-314, 2017.

RAMOS, L.; MARTIN, L. S.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Combined use of a two-stage packed bed reactor with glycerol extraction column for enzymatic biodiesel synthesis from macaw palm oil. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, p. 1-7, 2017.

RIBEIRO, B. D.; DE CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-16, 2011.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 1-22, 2010.

SAEIDI, S.; JOUYBANPOUR, P.; MIRVAKILLI, A.; IRANSHADI, D.; KLEMES, J. J. A comparative study between modified data envelopment analysis and response surface methodology for optimisation of heterogeneous biodiesel production from waste cooking palm oil. **Journal of Cleaner Production**, v. 136, p. 23-30, 2016.

SAKAI, S.; LIU, Y.; YAMAGUCHI, T.; WATANABE, R.; KAWABE, M.; KAWAKAMI, K. Production of butyl-biodiesel using lipase physically-adsorbed onto electrospun polyacrylonitrile fibers. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7344-7349, 2010.

SALES, E. A.; GHIRARDI, M. L.; JORQUERA, O. Subcritical ethylic biodiesel production from wet animal fat and vegetable oils: a net energy ratio analysis. **Energy Conversion and Management**, v. 141, p. 216-223, 2017.

SALIS, A.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. **Use of lipases for the production of biodiesel**. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial enzymes: structure, function and application**. Valencia: Springer, 2007, cap. 19, p. 317-339.

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, p. 1348-1354, 2010.

SANTANA, J. L.; DE OLIVEIRA, J. M.; CARVALHO, N. B.; OSÓRIO, N. M. F. M.; MATTEDI, S.; FREITAS, L. S.; CAVALCANTI, E. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Analysis of the performance of a packed bed reactor to production ethyl esters from crude vegetable oil using lipase immobilized in sílica modified with protic ionic liquid. **Química Nova**, v. 41, n. 8, p. 891-898, 2018.

SANTOS, F. D, CONCEIÇÃO, L. R. V, GIORDANI, D. S, DE CASTRO, H. F. Glycerol sorbent selection and optimized conditions for ethyl biodiesel purification by response surface methodology. **International Journal of Engineering Research & Science**, v. 2, n. 11, p. 34-42, 2016.

SANTOS, F. D, CONCEIÇÃO, L. R. V, CERON, A, DE CASTRO, H. F. Chamotte clay as potential low cost adsorbent to be used in the biodiesel purification. **Applied Clay Science**, v. 149, p. 41-50, 2017.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 49-57, 2008.

SCHMID, A.; HOLLMAN, F.; PARK, J. B.; BUHLER, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 359-366, 2002.

SELVAKUMAR, P.; SIVASHANMUGAM P. Optimization of lipase production from organic solid waste by anaerobic digestion and its application in biodiesel production. **Fuel Processing Technology**, v. 165, p. 1-8, 2017.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, p. 409-414, 2007.

SILVA, M. J.; CARDOSO, A. L. Heterogeneous tin catalysts applied to the esterification and transesterification reactions. **Journal of Catalysis**, v. 2013, p. 01-11, 2013.

SIMÕES, A. S.; 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. 6, p. 242-247, 2015.

SKORONSKI, E.; PADOIN, N.; SOARES, C.; FURIGO, A. Stability of immobilized *Rhizomucor miehei* lipase for the synthesis of pentyl octanoate in a continuous packed bed bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 3, p. 633-641, 2014.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-9, p. 745-757, 1999.

SOARES, C. M. F.; DOS SANTOS, O. A.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Studies on immobilized lipase in hydrophobic sol-gel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 307-319, 2004.

SOUFI, M. D.; GHOBADIAN, B.; NAJAFI, G.; MOUSAVI, S. M.; AUBIN, J. Optimization of methyl ester production from waste cooking oil in a batch tri-orifice oscillatory baffled reactor. **Fuel Processing Technology**, v. 167, p. 641-647, 2017.

SOUZA, L. T. A.; MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F. Selection of lipases for the synthesis of biodiesel from *Jatropha* oil and the potential of microwave irradiation to enhance the reaction rate. **Biomed Research International**, v. 2016, p. 1-13, 2016.

TACIAS-PASCAIO, V. G.; VIRGEN-ORTIZ, J. J.; JIMÉNEZ-PÉREZ, M.; YATES, M.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; ROSALES-QUINTERO, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. **Fuel**, v. 200, p. 1-10, 2017.

TAMILSELVAN, P.; NALLUSAMY, N.; RAJKUMAR, S. A comprehensive review on performance, combustion and emission characteristics of biodiesel filled diesel engines. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1134-1159, 2017.

TAN, Y. H.; ABDULLAH, M. O.; NOLASCO-HIPOLITO, C.; ZAUZI, N. S. A. Application of RSM and Taguchi methods for optimizing the transesterification of waste cooking oil catalyzed by solid ostrich and chicken-eggshell derived CaO. **Renewable Energy**, v. 114, p. 437-447, 2017.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628-634, 2010.

TAPANES, N. C.; ARANDA, D. A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; PEREZ, R. S.; TEIXEIRA, K. C. Mg-Al hydrotalcite as heterogeneous catalyst for transesterification of *Jatropha curcas* oil: theoretical and experimental analysis. **Letters in Organic Chemistry**, v. 14, p. 525-537, 2017.

TEO, C. L.; JAMALUDDIN, H.; ZAIN, N. A. M.; IDRIS, A. Biodiesel production via lipase catalysed transesterification of microalgae lipids from *Tetraselmis* sp. **Renewable Energy**, v. 68, p. 1-5, 2014.

TIAN X.; CHEN, X.; DAI, L.; DU, W.; LIU, D. A novel process of lipase-mediated biodiesel production by the introduction of dimethyl carbonate. **Catalysis Communications**, v. 101, p. 89-92, 2017.

TIOSSO, P. C.; CARVALHO, A. K. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Utilization of immobilized lipases as catalysts in the transesterification of non-edible vegetable oils with ethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 4, p. 839-847, 2014.

TODOROVA, E. V.; CHERNEV, G. E.; DJAMBAZOV, S. T. Structure and properties of functionalized porous silica hybrid materials. **Open Journal of Inorganic Non-Metallic Materials**, v. 4, p. 35-43, 2014.

TONGROON, M.; SUEBWONG, A.; KANANONT, M.; AUNCHAISRI, J. CHOLLACOOP, N. High quality *Jatropha* biodiesel (H-FAME) and its application in a common rail diesel engine. **Renewable Energy**, v. 113, p. 660-668, 2017.

TRAN, D.; CHANG, J.; LEE, D. Recent insights into continuous-flow biodiesel production via catalytic and non-catalytic transesterification process. **Applied Energy**, v. 185, p. 376-409, 2017.

TRAN, D.; CHEN, C.; CHANG, J. Effect of solvents and oil content on direct transesterification of wet oil-bearing microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized lipase as the biocatalyst. **Bioresource Technology**. V. 135, p. 213-221, 2013.

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

TRAN, D.; YEH, K.; CHEN, C.; CHANG, J. Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized *Burkholderia* lipase. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 119-127, 2012.

URBAN, J.; SVEE, F.; FRÉCHET, J. M. J. A monolithic lipase reactor for biodiesel production by transesterification of triacylglycerides into fatty acid methyl esters. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 371-380, 2012.

VERDUGO, C.; LUNA, D.; POSADILLO, A.; SANCHO, E. D.; RODRÍGUEZ, S.; BAUTISTA, F.; LUQUE, R.; MARINAS, J. M.; ROMERO, A. A. Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. **Catalysis Today**, v. 167, p. 107-112, 2011.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v. 35, p. 274-279, 2012.

WANG, X.; DOU, P.; ZHAO, P.; ZHAO, C.; DING, Y.; XU, P. Immobilisation of lipases onto magnetic Fe₃O₄ nanoparticles for application in biodiesel production. **ChemSusChem**, v. 2, p. 947-950, 2009.

XU, X.; FOMUSO, L. B.; AKOH, C. C. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3-10, 2000.

XU, Y.; NORDBLAD, M.; WOODLEY, J. M. A two-stage enzymatic ethanol-based biodiesel production in a packed bed reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 407-414, 2012.

YAAKOB, Z.; SUKARMAN, I. S. B.; NARAYANAN, B.; ABDULLAH, S. R. S.; ISMAIL, M. Utilization of palm empty fruit bunch for the production of biodiesel from *Jatropha curcas* oil. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 695-700, 2012.

YAN, Y.; WANG, G.; GUI, X.; LI, G.; SU, F.; WANG, X.; LIU, T. Biotechnological preparations of biodiesel and its high-valued derivatives: a review. **Applied Energy**, v. 113, p. 1614-1631, 2014.

YANO, S.; IWATA, K.; KURITA, K. Physical properties and structure of organic-inorganic hybrid materials produced by sol-gel process. **Materials Science and Engineering: C**, v. 6, n. 2-3, p. 75-90, 1998.

YING, H.; ZHANG, L.; WU, D.; LEI, Q.; GUO, Y.; FANG, W. Ionic strength-response hyperbranched polyglycerol/polyacrylic acid hydrogel for the reversible immobilization of enzyme and the synthesis of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 144, p. 303-311, 2017.

YOU, Q.; YIN, X.; ZHAO, Y.; ZHANG. Biodiesel production from *Jatropha* oil catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase on modified attapulgite. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 202-207, 2013.

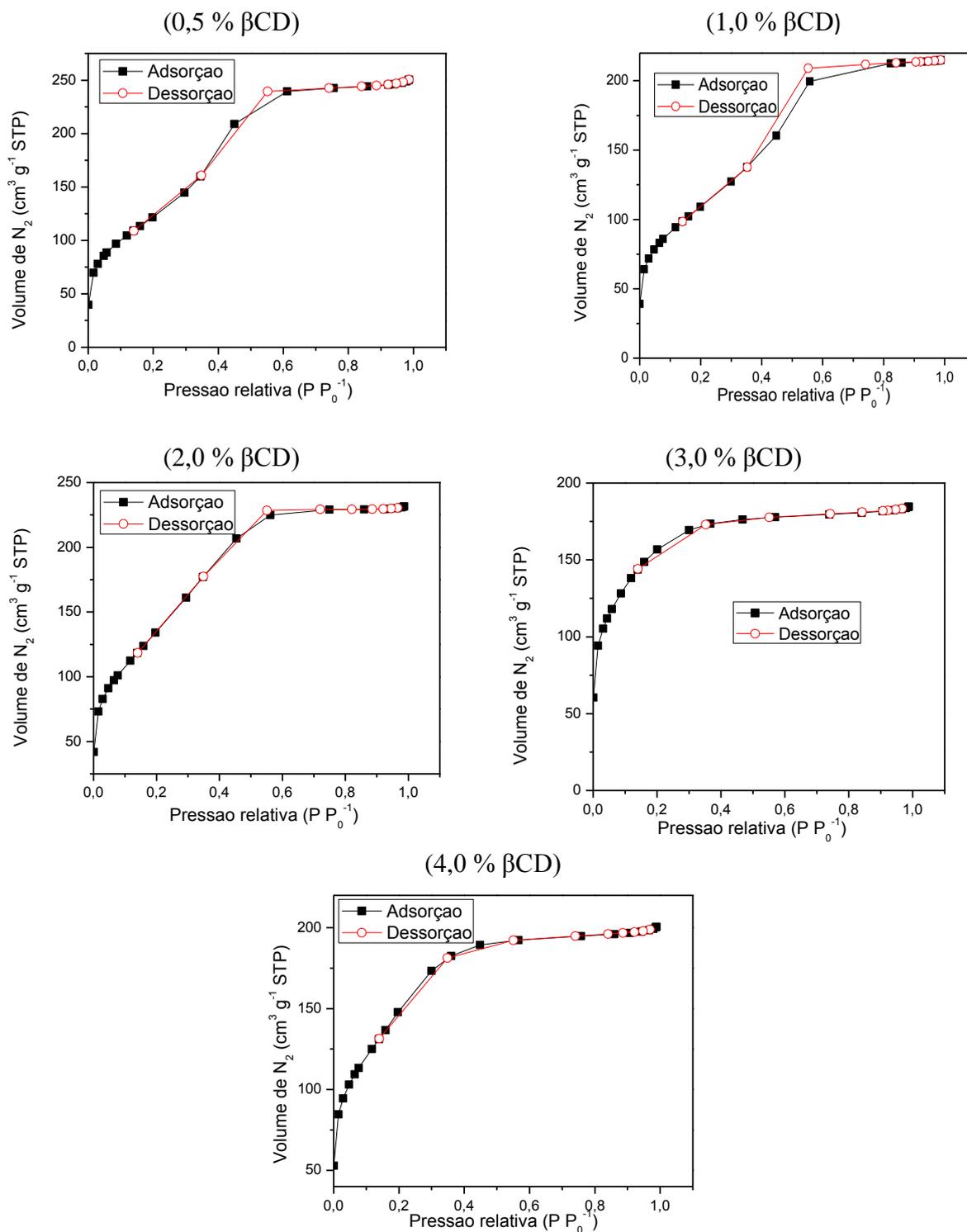
ZAHARIN, M. S. M.; ABDULLAH, N. R.; NAJAFI, G.; SHARUDIN, H.; YUSAF, T. Effects of physicochemical properties of biodiesel fuel blends with alcohol on diesel engine performance and exhaust emissions: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 475-493, 2017.

ZANIN, G. M.; MORAES, F.F. Enzimas imobilizadas. In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, 2^a ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2014, v. 1, p. 41-84.

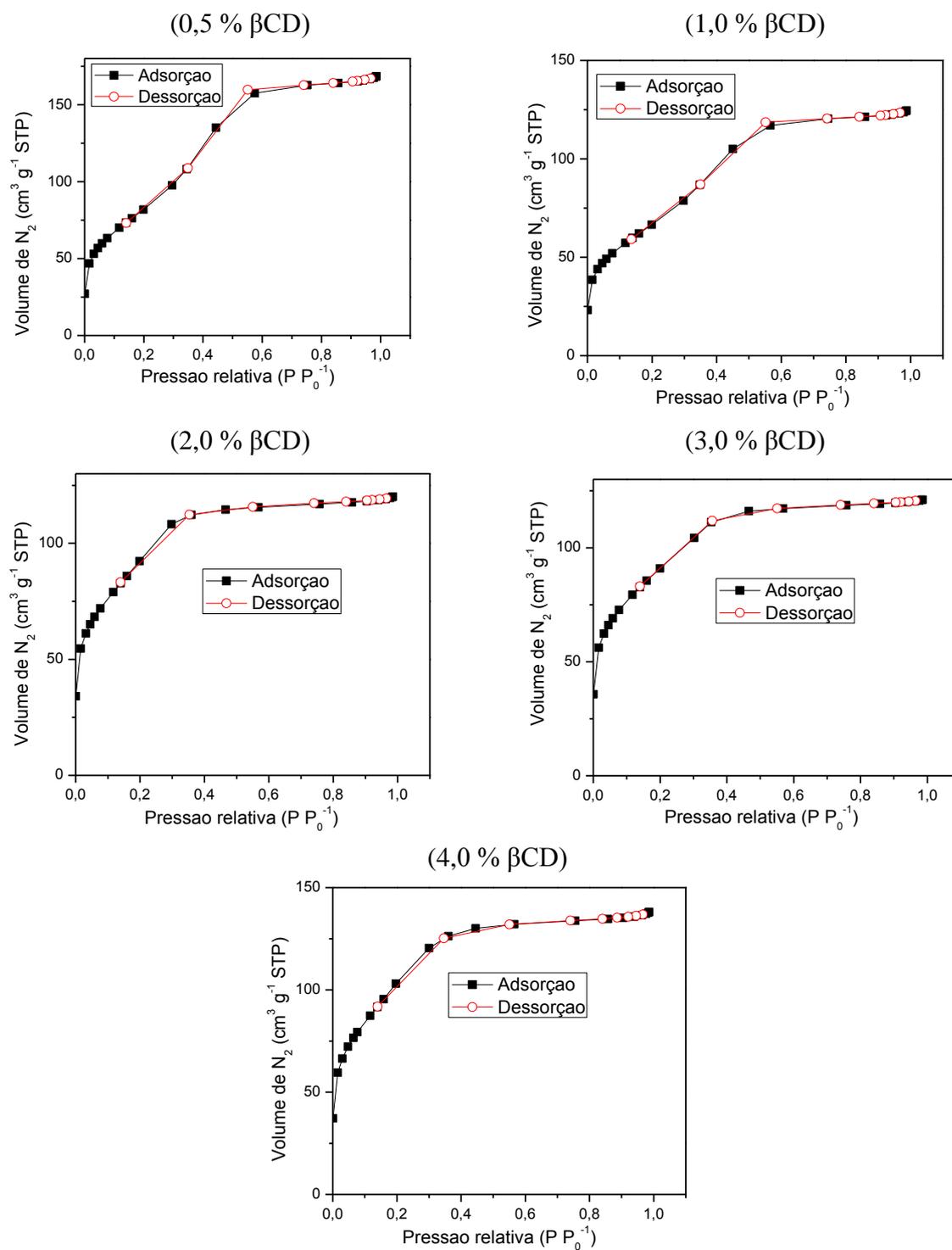
ZHANG, W.; YANG, X.; JIA, J.; WANG, N.; HU, C.; YU, X. Surfactant-activated magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 83-89, 2015.

APÊNDICES

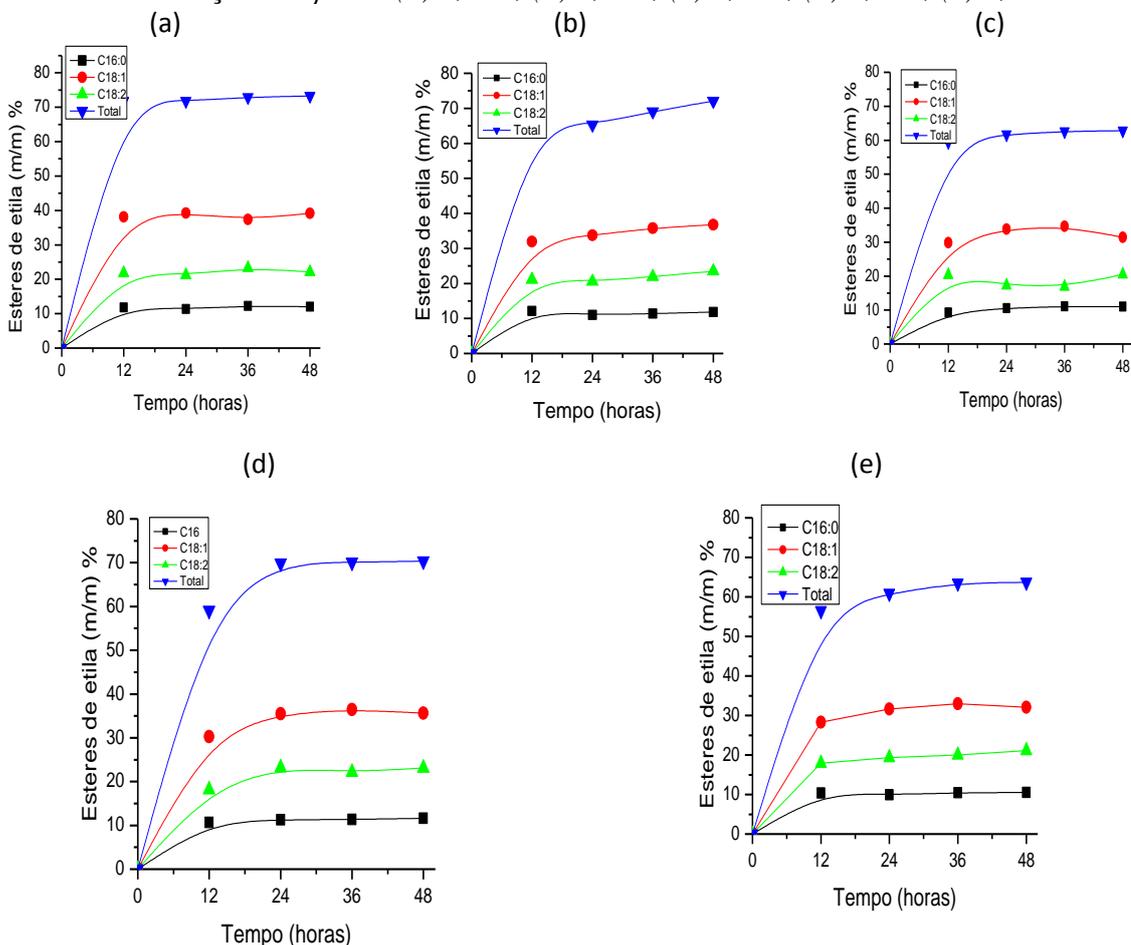
A.1 – Curvas de adsorção/dessorção dos suportes preparados.



A.2 – Curvas de adsorção/dessorção dos biocatalisadores preparados.



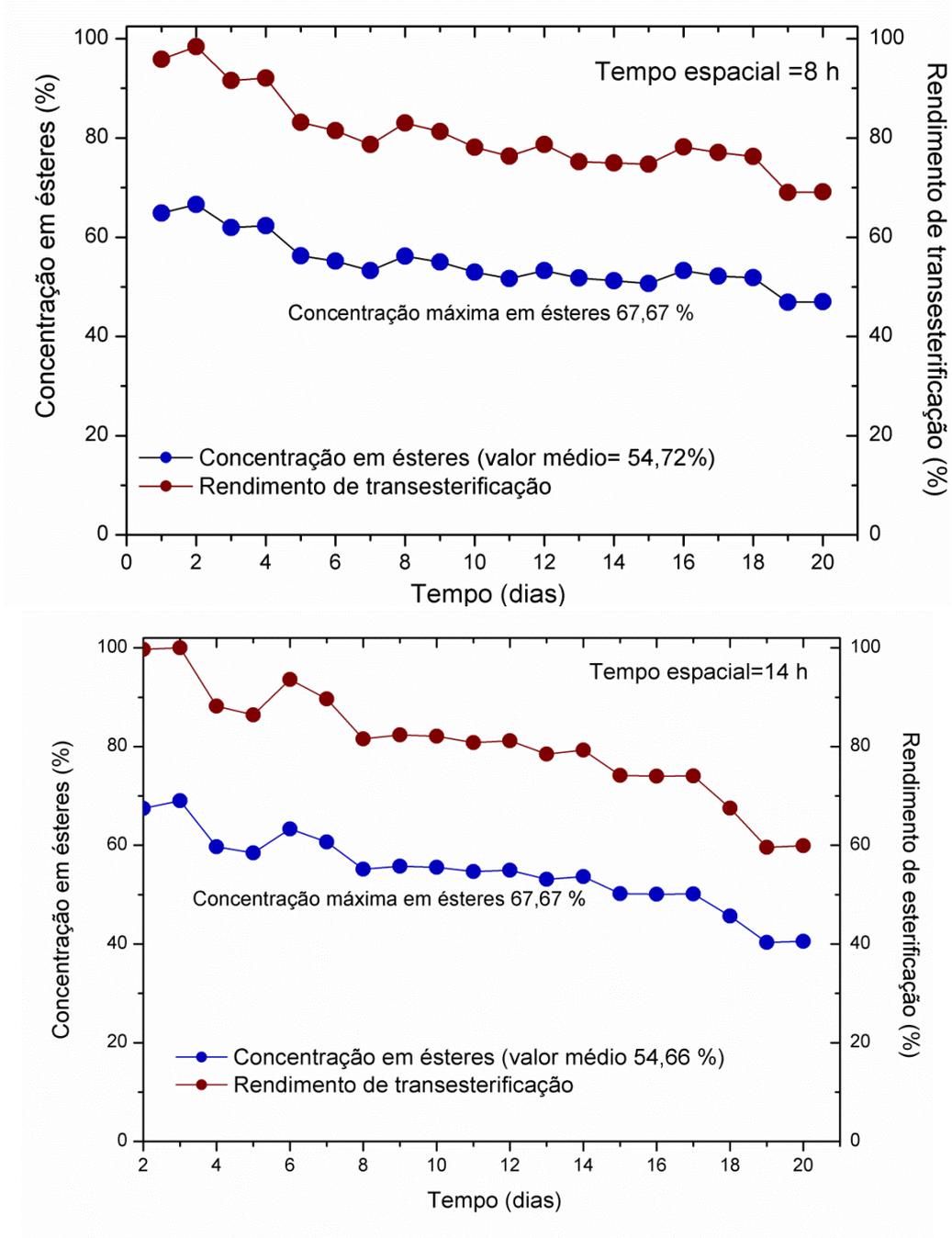
A.3 – Perfil de formação dos ésteres de etila a partir da reação de transesterificação do óleo de pinhão-manso com etanol, catalisada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO_2 - β CD utilizando 600 unidades de atividade hidrolítica por grama de matéria-prima lipídica em diferentes concentrações de β CD: (a) 0,5 %, (b) 1,0 %, (c) 2,0 %, (d) 3,0 %, (e) 4,0 %.



A.4 – Perfil dos ésteres de etila nas amostras obtidas por catálise utilizando 600 unidades de atividade hidrolítica por grama de matéria-prima lipídica em diferentes concentrações de β CD (48 h de reação).

Concentração β CD (%)	m m ⁻¹ éster (%)			
	C16	C18:1	C18:2	(%)
0,5	12,04	39,18	22,14	73,26
1,0	12,14	36,72	24,43	73,29
2,0	11,62	33,66	20,40	64,12
3,0	11,46	36,69	23,14	71,29
4,0	10,71	33,83	22,45	66,98

A.5 – Perfil dos ésteres formados e rendimento de transesterificação das reações conduzidas em regime contínuo mantendo fixa a razão molar do meio de alimentação (óleo:etanol= 1:12) e variando o tempo espacial: (a) tempo espacial 8 h; (b) tempo espacial 14 h



A.6 – Dados referentes à construção da curva de calibração (Absorbância e concentração do corante).

Absorbância	Concentração (g.mL ⁻¹)
0	0,00038
0,098	0,00305
0,408	0,01221
0,808	0,02441
1,276	0,03663
1,564	0,04882

A.7 – Concentração de corante nas amostras de acordo com a equação da reta. Aparato da figura 3.2-a.

Tempo	Absorbância	Diluição	Concentração (g.mL ⁻¹)
0	0	4	0
10	0,050	4	3,76E-04
20	0,490	4	0,05916
30	1,515	4	0,18336
40	1,296	8	0,31368
50	1,323	8	0,32016
60	1,272	8	0,30784
70	1,110	8	0,26856
80	0,890	8	0,2152
90	0,815	8	0,19704
100	0,775	8	0,18736
110	0,656	8	0,15856
120	0,620	8	0,14984
150	0,413	8	0,09944

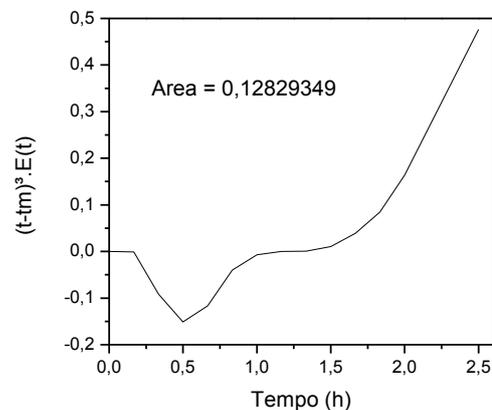
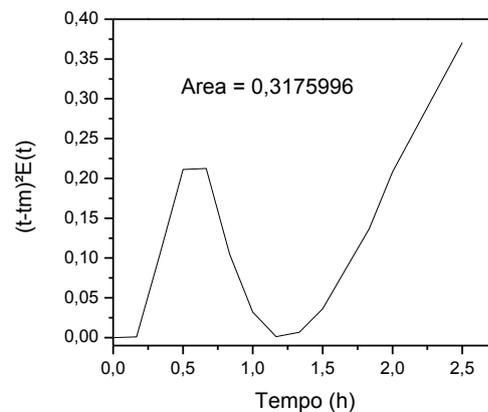
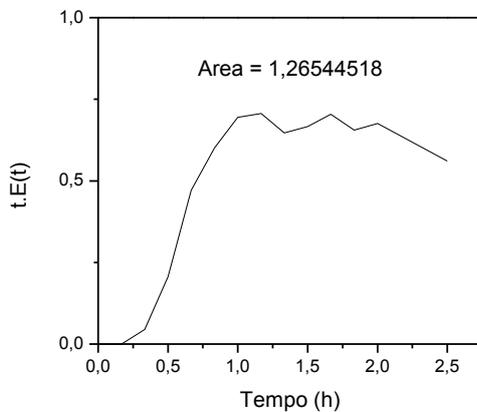
A.8 – Concentração de corante nas amostras de acordo com a equação da reta. Aparato da figura 3.2-c.

Tempo	Absorbância	Diluição	Concentração (g.mL ⁻¹)
0	0	4	0
10	0	4	0
20	0	4	0
30	0,170	4	0,020371
40	0,611	4	0,073815
50	0,900	4	0,108837
60	0,645	4	0,077935
70	0,502	4	0,060605
80	0,273	4	0,032853
90	0,199	4	0,023885
120	0,150	4	0,017947

A.9 – Tabela auxiliar contendo valores utilizados para os cálculos das equações 3.5 até 3.8 para o aparato da figura 3.2-a.

Tempo (h)	Conc (g.mL ⁻¹)	E(t)	t.E(t)	(t-t _m) ²	(t-t _m) ² E(t)	(t - t _m) ³	(t-t _m) ³ E(t)
0	0	0	0	1,475	0	-1,792	0
0,16	3,76E-04	8,47E-04	0,00014	1,098	0,000	-1,151	-0,00097
0,33	0,05916	1,33E-01	0,04447	0,776	0,103	-0,684	-0,09135
0,5	0,18336	4,14E-01	0,20678	0,510	0,211	-0,365	-0,15098
0,66	0,31368	7,08E-01	0,47167	0,300	0,212	-0,164	-0,11645
0,83	0,32016	7,22E-01	0,60177	0,145	0,105	-0,055	-0,04005
1	0,30784	6,94E-01	0,69434	0,046	0,032	-0,009	-0,0068
1,16	0,26856	6,06E-01	0,70670	0,002	0,001	-0,0001	-6,711E-05
1,33	0,2152	4,85E-01	0,64718	0,014	0,006	0,0016	0,0008
1,5	0,19704	4,44E-01	0,66664	0,081	0,036	0,023	0,0103
1,66	0,18736	4,23E-01	0,70432	0,204	0,086	0,092	0,0390
1,83	0,15856	3,58E-01	0,65566	0,382	0,136	0,236	0,0846
2	0,14984	3,38E-01	0,67593	0,616	0,208	0,484	0,1636
2,5	0,09944	2,24E-01	0,56072	1,651	0,370	2,123	0,4762

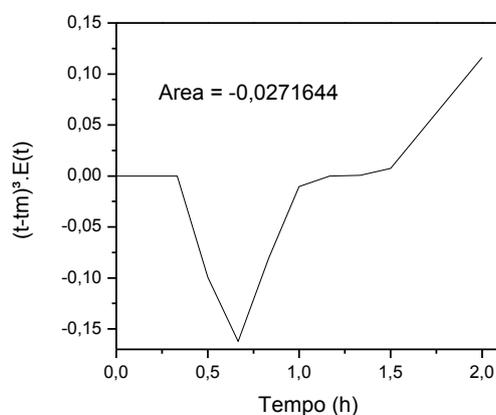
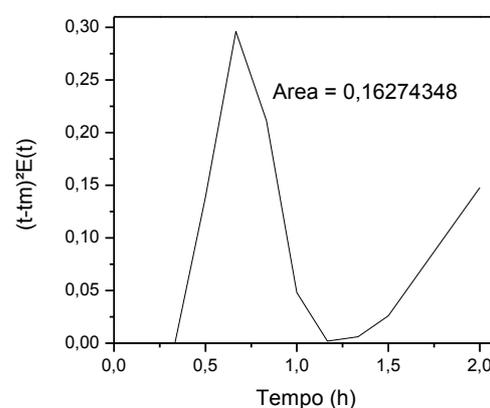
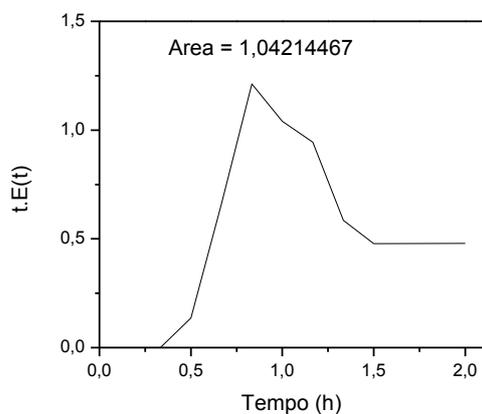
A.10 – Gráficos utilizados para os cálculos das equações 3.5 até 3.8 para o aparato da figura 3.2-a.



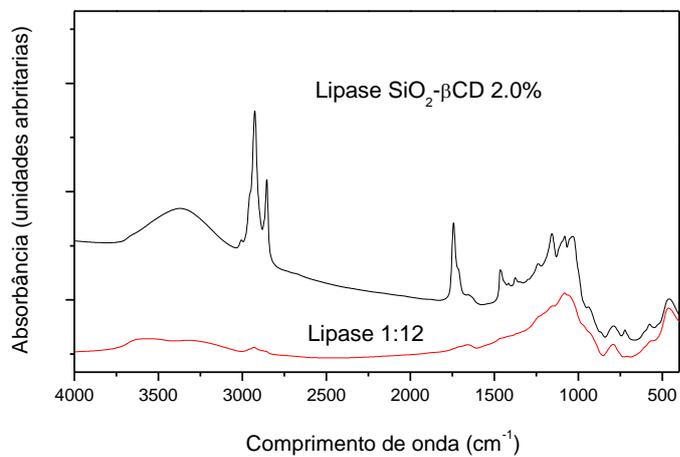
A.11 – Tabela auxiliar contendo valores utilizados para os cálculos das equações 3.5 até 3.8 para o aparato da figura 3.2-c.

Tempo (h)	Conc (g.mL ⁻¹)	E(t)	t.E(t)	(t-t _m) ²	(t-t _m) ² E(t)	(t - t _m) ³	(t-t _m) ³ E(t)
0	0	0	0	1,475496	0	-1,79229	0
0,16667	0	0	0	1,098367	0	-1,15112	0
0,33333	0	0	0	0,776813	0	-0,68466	0
0,5	0,020371	0,27216	0,13608	0,510796	0,139018	-0,36507	-0,09936
0,66667	0,073815	0,986154	0,657439	0,300337	0,296178	-0,16459	-0,16231
0,83333	0,108837	1,454048	1,211702	0,145443	0,211481	-0,05547	-0,08065
1	0,077935	1,041201	1,041201	0,046096	0,047995	-0,0099	-0,0103
1,16667	0,060605	0,809679	0,944628	0,002307	0,001868	-0,00011	-9E-05
1,33333	0,032853	0,438912	0,585214	0,014073	0,006177	0,001669	0,000733
1,5	0,023885	0,3191	0,478651	0,081396	0,025974	0,023222	0,00741
2	0,017947	0,23977	0,479539	0,616696	0,147865	0,484291	0,116118

A.12 – Gráficos utilizados para os cálculos das equações 3.5 até 3.8 para o aparato da figura 3.2-c.



A.13 – Análise de FTIR do biocatalisador de lipase SiO_2 - β CD antes e após ser utilizado em uma reação de transesterificação contínua com razão molar de 1:12.



TRABALHOS PUBLICADOS

Artigos completos publicados em periodicos

1. MARTIN, L. S, CERON, A, OLIVEIRA, P. C, ZANIN, G. M, DE CASTRO, H. F. Different organic components on silica hybrid matrices modulate the lipase inhibition by the glycerol formed in continuous transesterification reactions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 62, p. 462-470, 2018.

OBS: Artigo referente ao meu trabalho de mestrado. O resultado do teste de lixiviação em meio contendo Triton X-100 foi utilizado na discussão do artigo.

2. MARTIN, L. S, CERON, A, MOLINARI, D, DE MORAES, F. F, ARROYO, P. A, DE CASTRO, H. F, ZANIN, G. M. Enhancement of lipase transesterification activity by immobilization on β -cyclodextrin-based polymer, **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 91, p. 92-100, 2019.

Trabalhos completos publicados em anais de congresso

1. Molinari, D.; **MARTIN, L. S.**; Silva, E. A.; ZANIN, GISELLA M. OPTIMIZATION OF IMMOBILIZATION OF *Burkholderia cepacia* LIPASE BY COVALENT BINDING USING EXPERIMENT PLANNING. In: XXII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XIII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 2019, Uberlândia - MG. Anais XXII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XIII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 2019.
2. **MARTIN, L. S.**; Molinari, D.; Arroyo, P. A.; CASTRO, H. F.; ZANIN, GISELLA M. BIODIESEL PURIFICATION USING DRY WASHING PROCEDURE APPLYING RICE HUSK ASH AS A POTENTIAL ADSORBENT. In: XXII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XIII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 2019, Uberlândia - MG. Anais XXII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS XIII SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 2019.

3. Molinari, D.; **MARTIN, L. S.**; ZANIN, GISELLA M.; Silva, E. A. Imobilização de enzima lipase de *Burkholderia cepacia* em argila por adsorção para aplicação como biocatalisador. In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2018, 2018, São Paulo-SP. Anais XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2018, 2018.
4. **MARTIN, L. S.**; Araki, C.; Arroyo, P. A.; CASTRO, H. F.; ZANIN, GISELLA M. PRODUÇÃO DE ÉSTERES DE ETILA EM REATOR DE COLUNA OPERANDO EM FLUXO CONTÍNUO UTILIZANDO LIPASE IMOBILIZADA EM β -CICLODEXTRINA. In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2018, 2018, São Paulo-SP. Anais XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2018, 2018.
5. Diório, A.; Molinari, D.; **MARTIN, L. S.**; ZANIN, GISELLA M.; Silva, E. A. *Burkholderia cepacia* immobilization over Bentonite clays Spectrogel Type C and Atalpigite for Biocatalysis. In: XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - Enzitec 2018, 2018, Florianópolis - SC. Anais XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2018, 2018.
6. Diório, A.; **MARTIN, L. S.**; Molinari, D.; Arroyo, P. A.; CASTRO, H. F.; ZANIN, GISELLA M. Production of Ethyl Esters Using Lipase Immobilized in SiO₂- β -Ciclodextrin. In: XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - Enzitec 2018, 2018, Florianópolis - SC. Anais XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2018, 2018.
7. **MARTIN, L. S.**; Molinari, D.; Arroyo, P. A.; CASTRO, H. F.; ZANIN, GISELLA M. Avaliação da matriz de SiO₂- β -Ciclodextrina e sua aplicação na imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia*. In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2018, 2018, São Paulo-SP. Anais XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2018, 2018.