

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – CAMPUS UFRJ DUQUE DE  
CAXIAS PROFESSOR GERALDO CIDADE

**MAYARA SILVA DE ALMEIDA**

**ESTUDO DE SISTEMA MULTIPROPÓSITO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS E  
BIODIESEL**

Duque de Caxias

2023

Mayara Silva de Almeida

**ESTUDO DE SISTEMA MULTIPROPÓSITO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS E  
BIODIESEL**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas  
Biotecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ.

Orientação: Dra. Elisa d'Avila Costa Cavalcanti e Msc. Sabrini Natali da S. Ávila

Duque de Caxias

2023

## CIP - Catalogação na Publicação

S467 Silva de Almeida, Mayara  
Estudo de sistema multipropósito para produção de enzimas e biodiesel. / Mayara Silva de Almeida. -- Rio de Janeiro, 2023.  
55 f.

Orientador: Elisa d'Ávila Costa Cavalcanti.  
Coorientador: Sabrini Natali da S. Ávila.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade, Bacharel em Ciências Biológicas: Biotecnologia, 2023.

1. Rhizopus oryzae. 2. Biocatálise. 3. FES. 4. Biorreatores. 5. Lipase. I. d'Ávila Costa Cavalcanti, Elisa, orient. II. Natali da S. Ávila, Sabrini, coorient. III. Título.

Mayara Silva de Almeida

ESTUDO DE SISTEMA MULTIPROPÓSITO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS E  
BIODIESEL

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas Biotecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas (Biotecnologia).

Aprovada em:

---

Elisa d'Avila Costa Cavalcanti, D.Sc, IQUFRJ

---

Mateus Gomes de Godoy, D.Sc, CCSUFRJ

---

Érika Cristina Gonçalves Aguiéiras, D.Sc,  
Campus Duque de Caxias Caxias  
Professor Geraldo Cidade-UFRJ

---

Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc,  
EQ-UFRJ

Duque de Caxias

2023

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus Orixás e guias por me darem caminho e cuidarem de mim sempre, sem eles nada disso seria possível.

Agradeço aos meus pais, Paula e Flávio, por todo o amor, apoio e esforço que fizeram e ainda fazem por mim. Só nós sabemos tudo o que precisamos enfrentar para que eu chegasse até aqui e foi o amor e apoio deles que me fortaleceu cada dia para que eu não desistisse dos meus sonhos. Além de agradecer, eu dedico à minha família essa vitória, vocês representam a minha base e inspiração para correr atrás dos meus objetivos e buscar ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu namorado Alexandre, que além de ser meu companheiro de vida, é meu melhor amigo e minha dupla ao longo de toda a graduação. Nos conhecemos no dia de matrícula e desde então tem sido uma das pessoas mais importantes na minha vida, obrigada por todo o apoio e companheirismo que tem me dado nesses 4 anos.

Aos meus sogros, Marcela e Alexandre, por todo o apoio e carinho dado nesses 4 anos. Cada ato e palavra de apoio que veio deles, principalmente em tempos de pandemia, foi essencial para que eu não desistisse dos meus objetivos, sou muito grata por abraçarem o meu sonho comigo.

Ao Kwê Bábá Omin, minha família de axé, que em pouco tempo me mostrou a importância da família espiritual, a presença de vocês na minha vida representa leveza e amor. Agradeço especialmente aos meus pais de santo, Márcia D'Oxum e Roni D'Oxalufan, que cuidam do meu Ori, que a cada dia me ensinam que ser grato a espiritualidade não tem que ser apenas nos dias bons, nos dias ruins Orixá também se faz presente, te faz ter esperança e fé para suportar esses dias até que venha a calmaria novamente Se hoje eu tenho essa visão de vida devo a vocês, muito obrigada.

Aos meus amigos Alana e José Pedro, por todo o apoio e companheirismo , nos bons e maus momentos, vocês são as amizades que quero levar por toda a vida. Além da vida acadêmica, me mostraram a importância de boas companhias para tornar a vida mais leve, agradeço todos os dias à espiritualidade por terem colocado vocês no meu caminho.

Ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBIM), por todo o suporte concedido para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também a cada membro do laboratório por cada ajuda prestada e ensinamentos passados, cada um de vocês foram essenciais para o meu crescimento acadêmico.

A minha orientadora Dra. Elisa Cavalcanti e às minhas co-orientadoras Dra. Denise Freire e Msc. Sabrini D'Ávila pela dedicação e confiança depositada em mim.

Agradeço por cada ensinamento que levarei por toda a minha carreira acadêmica.

Aos professores do curso de Biotecnologia da UFRJ- Duque de caxias por serem essenciais para a minha formação acadêmica.

## RESUMO

Almeida, Mayara Silva de. **Estudo de sistema multipropósito para produção de enzimas e biodiesel**. Duque de Caxias, 2023. Monografia (Bacharelado em Ciência Biológicas - Biotecnologia)- Campus Duque de caxias, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, 2023

A espécie *Rhizopus oryzae* é uma das produtora mais conhecidas de lipases (EC 3.1.1.3), possuindo aplicação em diversas áreas industriais, como na geração de biodiesel. Entretanto, as enzimas comercialmente disponíveis possuem alto valor de obtenção, sendo necessário o desenvolvimento de outros biocatalisadores, obtidos por tecnologia de baixo custo, como na fermentação em estado sólido (FES), que possui potencial para a geração de produtos microbianos utilizando matérias-primas residuais como substrato. Considerando tais limitações, o presente trabalho teve como objetivo o estudo de um sistema multipropósito, no qual a produção de enzimática ocorre na mesma coluna que será utilizada para as reações em leito fixo, utilizando *Rhizopus oryzae* para a produção enzimática voltada para a produção de biodiesel através da FES e matéria-prima residual de origem agroindustrial como substrato. Resultados demonstraram o potencial do uso do sistema multipropósito com o uso da torta de algodão como substrato para a produção do preparado enzimático sólido (PES) em 24 horas de fermentação, de modo que sua aplicação em reações de esterificação utilizando ácido oleico e etanol conduzidas em leito agitado obtiveram conversão de 74,0% dos ácidos graxos livres. Ensaio de determinação de parâmetros de cultivo mostraram que os esporos gerados em meio PDA suplementado com óleo vegetal ou ácido oleico não se diferenciam quanto a produção enzimática do PES. Para a cinética de secagem por aeração forçada, no biorreator utilizado, 40 horas de secagem foi suficiente para obter um PES com boa capacidade de esterificação, chegando a 68,5% de conversão. Reações conduzidas em sistema multipropósito apontam para a necessidade de aprimoramento na metodologia para que sejam obtidos resultados satisfatórios de conversão de ácidos graxos livres, tanto em reações utilizando o reagente comercial ácido oleico, quanto na utilização do hidrolisado de óleo de algodão.

**Palavras-chave:** *Rhizopus oryzae*, biocatálise, FES, biorreatores, lipase.

## ABSTRACT

Almeida, Mayara Silva de. Study of a multipurpose system for the production of enzymes and biodiesel. Duque de Caxias, 2023. Monograph (Bachelor of Biological Sciences - Biotechnology)- Campus Duque de Caxias, Federal University of Rio de Janeiro, Duque de Caxias, 2023

The species *Rhizopus oryzae* is one of the best known lipase producers (EC 3.1.1.3), having application in several industrial areas, such as in the generation of biodiesel. However, commercially available enzymes have high obtaining value, requiring the development of other biocatalysts, obtained by low-cost technology, such as solid-state fermentation (SSF), which has potential for the generation of microbial products using raw waste materials as a substrate. Considering these limitations, the present work aimed to study a multipurpose system, in which the enzymatic production occurs in the same column that will be used for the fixed bed reactions, using *Rhizopus oryzae* for the enzymatic production aimed at the production of biodiesel through FES and residual raw material of agro-industrial origin as substrate. Results demonstrated the potential of using the multipurpose system with the use of cottonseed cake as substrate for the production of solid enzymatic preparation (PES) in 24 hours of fermentation, so that its application in esterification reactions using oleic acid and ethanol conducted in agitated bed obtained conversion of 74.0% of free fatty acids. Assays for determination of culture parameters showed that spores generated in PDA medium supplemented with vegetable oil or oleic acid do not differ in terms of enzymatic production of PES. For the kinetics of drying by forced aeration, in the bioreactor used, 40 hours of drying was enough to obtain a PES with good esterification capacity, reaching 68.5% of conversion. Reactions carried out in a multipurpose system point to the need to improve the methodology so that satisfactory results are obtained in the conversion of free fatty acids, both in reactions using the commercial reagent oleic acid and in the use of hydrolyzed cottonseed oil.

**Keywords:** *Rhizopus oryzae*, biocatalysis, FES, bioreactors, lipase.



## SUMÁRIO

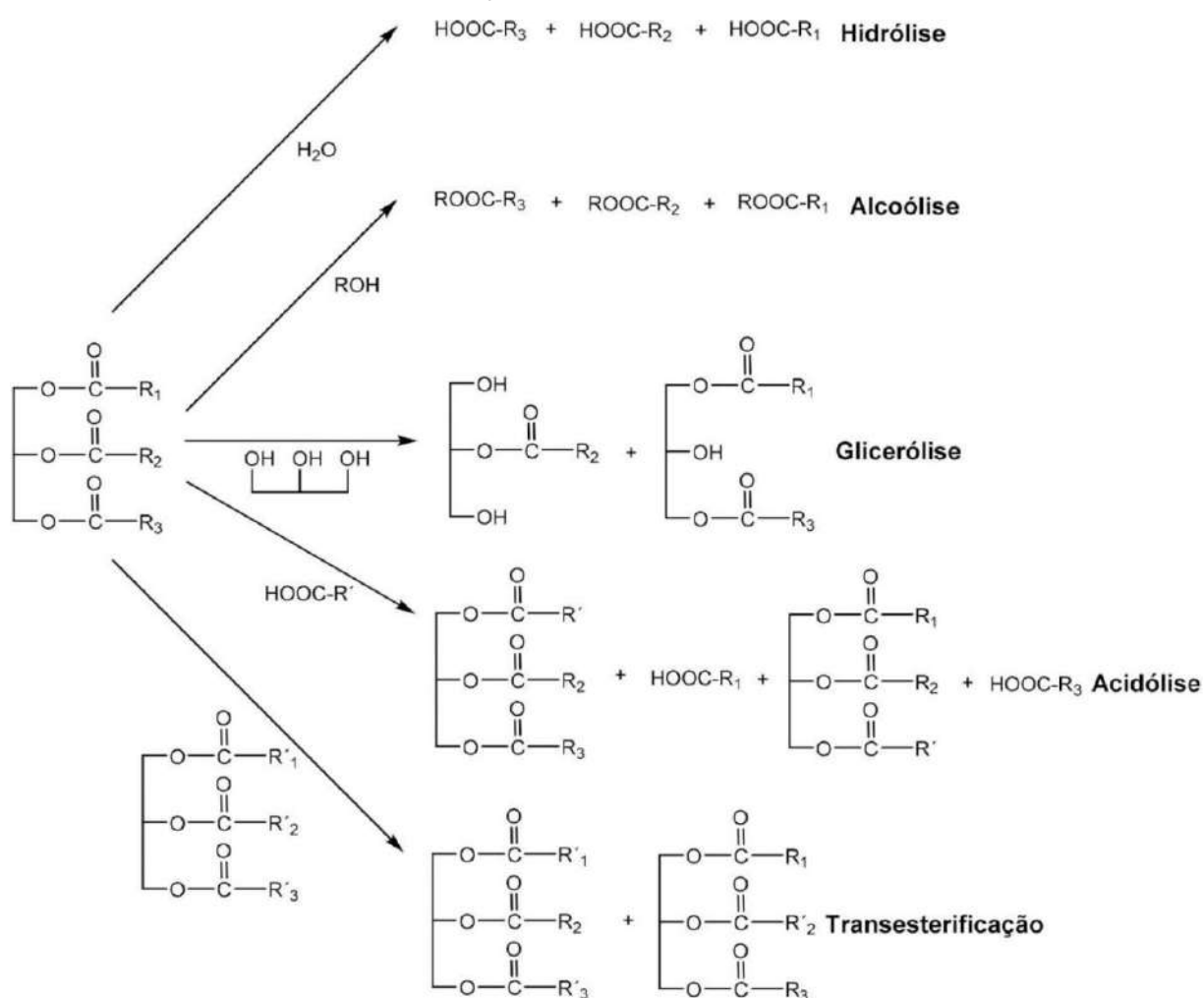
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>p. 11</b>
1.1 LIPASES.....	p. 11
1.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	p. 13
1.2.1 USO DE BIORREADORES PARA FES.....	p. 18
1.3 APLICAÇÃO DA BIOCATÁLISE NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	p. 20
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>p. 24</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	p. 24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	p. 24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>p. 25</b>
3.1 PRÉ-INÓCULO.....	p. 25
3.2 CONTAGEM DE ESPOROS.....	p. 26
3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	p. 26
3.3.1 FES EM BIORREATOR DO TIPO LEITO FIXO.....	p. 26
3.3.2 FES EM BIORREATOR DO TIPO BANDEJA.....	p. 27
3.3.3 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM REATOR DE LEITO FIXO.....	p. 28
3.4 CINÉTICA DE SECAGEM POR AERAÇÃO FORÇADA.....	p. 28
3.5 HIDRÓLISE DO ÓLEO DE ALGODÃO.....	p. 29
3.6 ANÁLISES QUANTITATIVAS .....	p. 31
3.6.1 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM LEITO AGITADO.....	p. 31
3.6.2 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM LEITO FIXO.....	p. 32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>p. 35</b>
4.1 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO DO PRÉ INÓCULO.....	p. 35
4.2 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO DA FERMENTAÇÃO.....	p. 36

4.3 RESULTADOS COMPARATIVOS.....	p. 40
4.3.1 FERMENTAÇÃO EM REATOR DO TIPO BANDEJA E EM LEITO FIXO.....	p. 40
4.3.2 CINÉTICA DE SECAGEM POR AERAÇÃO FORÇADA.....	p. 41
4.4 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM LEITO FIXO.....	p. 44
4.4.1 REAÇÃO EM LEITO FIXO COM HIDROLISADO DE ÓLEO DE ALGODÃO.....	p. 45
<b>5.CONCLUSÕES.....</b>	<b>p. 49</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>p. 51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 LIPASES

As enzimas lipolíticas ou lipases (EC 3.1.1.3) são biocatalisadores caracterizados como  $\alpha/\beta$ -hidrolases que atuam na interface orgânico-aquosa, sendo responsáveis por catalisar hidrólise de triglicerídeos liberando ácidos e álcoois orgânicos, entretanto, em meio não aquoso o equilíbrio da reação é deslocado, favorecendo a ocorrência de reações de esterificação ou transesterificação de ácidos graxos com álcoois (Figura 1) (FREIRE E CASTILHO,2008; CORTEZ, CASTRO E ANDRADE, 2017). A sua capacidade de realizar tais reações se deve a sua elevada eficiência e estabilidade, além de apresentar propriedades quimio, enantio e regioseletivas (BORNSCHEUER, 2018), o que torna tal enzima atrativa devido a sua diversidade de aplicações no mercado.



**Figura 1:** Reações catalisadas por lipases (CORTEZ, CASTRO E ANDRADE, 2017).

Diversas lipases possuem seu mecanismo de ação baseado nos sítios ativos formados pela tríade de aminoácidos serina-histidina-aspartato/glutamato e apresentam um aumento de atividade enzimática na presença de interfaces orgânico- aquosas, tal fenômeno é chamado de “ativação interfacial”, conceito que por muito tempo foi utilizado na diferenciação de esterases e lipases (BON et al., 2008; BORNSCHEUER, 2018). Em uma observação experimental realizada em 1976 (CHAPUS et al. 1976), foi verificado que quando a concentração de óleo é aumentada além de um certo limite, há um crescimento substancial da atividade enzimática ocasionado por uma alteração conformacional na lipase (CORTEZ, CASTRO E ANDRADE, 2017). Entretanto, estudos recentes apontam que nem todas as lipases possuem ativação interfacial sendo, portanto, melhor classificadas como carboxilesterases capazes de realizar a catálise da hidrólise de acilgliceróis de longa cadeia (VERGER, 1997).

As lipases podem ser produzidas em tecidos vegetais, animais ou através de microrganismos, sendo as enzimas provenientes de microrganismos as mais utilizadas industrialmente, devido a sua maior estabilidade, diversidade em propriedades catalíticas e facilidade de isolamento, quando comparado às demais formas de obtenção de lipases para utilização em larga escala (GANDRA, 2008; SAXENA, 2003). Quando essas lipases são obtidas de origem microbiana são em sua maioria por excreção extracelular, que são produzidas durante o processo de fermentação (HELAL et al., 2021).

Leveduras e fungos filamentosos são, atualmente, os mais importantes sistemas de expressão eucariótica de enzimas de interesse biotecnológico (BON et al., 2008), de modo que os fungos filamentosos se destacam por possuírem a habilidade de crescer em substratos bastante simples e de baixo custo, além da capacidade de expressar e secretar proteínas (MEYER, 2008). Dentre as espécies de microrganismos que possuem a habilidade de produzir enzimas lipolíticas, espécies do gênero *Rhizopus sp.* estão entre as produtoras de lipases mais conhecidas, sendo a mesma adequada para uso em muitas aplicações industriais (KOBBLITZ E PASTORE, 2006), inclusive

nas linhas de pesquisa relacionadas às indústrias de biocombustíveis e na geração de biodiesel. Entretanto, as maiores limitações para o uso das lipases ainda os custos para a obtenção de enzimas e a dificuldade de separá-los do meio reacional, as técnicas de imobilização continuam a ser o foco de muitos estudos (POPPE et al, 2015).

## **1,2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)**

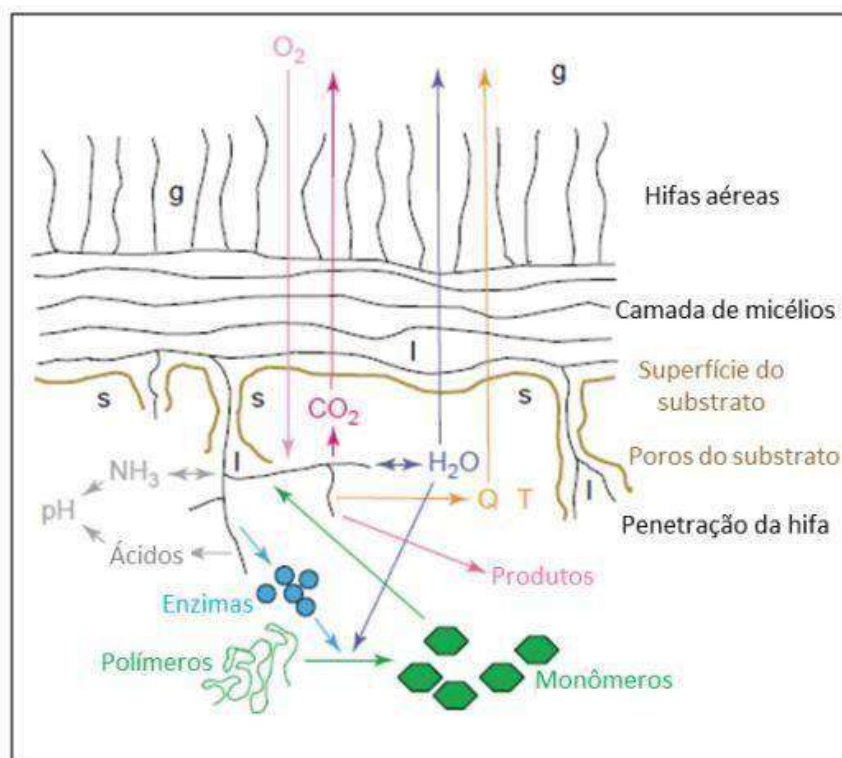
Os processos microbianos para a produção de enzimas podem ser por cultivos submersos ou cultivos em estado sólido. Apesar da fermentação submersa ser a tecnologia mais empregada na produção industrial de enzimas, a fermentação em estado sólido tem sido amplamente utilizada para a produção de biomoléculas de interesse industrial com grande potencial para a geração de produtos microbianos, entre elas as lipases (BON et al., 2008).

A fermentação em estado sólido (FES), também citada na literatura como “fermentação em substrato sólido”, “fermentação em meio semi-sólido”, “fermentação semi-sólida” ou “cultivo em estado sólido” pode ser definida como um processo em que o crescimento microbiano e a formação de produto ocorre sobre ou em meio as partículas de uma matriz sólida com pouca água livre, ou seja, a atividade de água ( $A_w$ ) é suficiente para garantir o crescimento microbiano, sem que ultrapasse a capacidade de ligação da água com o substrato sólido (SCHMIDELL et al., 2001; BON et al., 2008).

A FES apresenta uma série de vantagens em relação à fermentação submersa (FSm). Entre elas está a possibilidade de emprego de condições não assépticas, já que a FES proporciona um controle maior da contaminação devido à baixa  $A_w$  (BON et al., 2008; KRISHNA, 2005); o uso de co-produtos como matéria-prima; a ampla variedade de matrizes (que variam em composição, tamanho, resistência mecânica, porosidade e capacidade de retenção de água); baixo custo energético e de processamento *downstream*, já que o método requer menor quantidade de solvente para a extração do produto e menor custo para a obtenção do extrato bruto que a FSm; utiliza-se menos água e, conseqüentemente, há menor produção de águas residuais; maior produtividade volumétrica, já que a carga volumétrica é

superior a FSm, com maior concentração de produtos; e utilização de meios de fermentação geralmente mais simples (KRISHNA, 2005). Entretanto, devido às condições do sistema, a FES apresenta algumas desvantagens impostas por este tipo de cultivo quando comparada à fermentação submersa, entre elas a maior dificuldade no controle de parâmetros operacionais, menor rendimento, além de ser uma metodologia com baixa publicação técnica no Ocidente, sendo mais exploradas nos continentes asiáticos e africanos (SCHMIDELL et al., 2001; KRISHNA, 2005).

Os fungos filamentosos são os microrganismos melhor adaptados à FES, pois crescem na superfície da matriz sólida e suas hifas penetram através dos espaços interpartículas até a profundidade do leito; também possuem melhor tolerância à baixa  $A_w$  e à alta pressão osmótica; além do meio ser próximo ao seu habitat natural, o que melhora sua atividade (Figura 2) quando comparado à colonização de microrganismos unicelulares (SCHMIDELL et al., 2001; HÖLKER E LENZ, 2005; PANDEY, 2003). Alguns dos fungos filamentosos mais utilizados na FES e com destacada aplicação comercial são aqueles pertencentes dos gêneros *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp. (CORTEZ, CASTRO E ANDRADE, 2017).



**Figura 2:** Esquema do processo em microescala que ocorre durante a fermentação em estado sólido (FES).

Como demonstrado na figura 2, após a esporulação, as hifas fúngicas desenvolvem uma camada de micélios (em preto) que se espalham na superfície do substrato sólido (dourado), no qual estão presentes os nutrientes necessários para o seu crescimento. Enquanto algumas hifas se projetam para o espaço aéreo, onde realizam a captação gasosa (g), outras penetram no substrato através de seus poros. No interior do substrato, além das fontes de carbono e nitrogênio, há a presença de líquidos (l). Através dessas hifas ocorre o transporte de substâncias promovendo a respiração metabólica do fungo. Enzimas hidrolíticas (azul claro), produzidas pelos micélios fúngicos promovem o catabolismo das macromoléculas que compõem a superfície sólida em unidades menores (verde), que são absorvidos como nutrientes pelo fungo. O O<sub>2</sub> (rosa claro) promovido pela aeração do leito sólido é consumido, e o CO<sub>2</sub> (rosa escuro), H<sub>2</sub>O (azul escuro), calor (Q – laranja) e produtos de interesse bioquímico (rosa escuro) são produzidos durante a fermentação. O calor liberado durante o processo metabólico leva a um rápido aumento da temperatura (T), que é um sério agravante durante a FES. O pH local (cinza) é outro fator importante que pode ser alterado devido à liberação de ácidos e troca de amônia (cinza). Os produtos bioquímicos de interesse produzidos são liberados no meio sólido, e durante a fermentação podem ser absorvidos pelo substrato, necessitando etapas de extração após o processo fermentativo. (HÖLKER E LENZ, 2005 *apud* ÁVILA, 2017).

O preparado enzimático sólido (PES) resultado do processo fermentativo, que é composto pela matriz sólida, as células do microrganismo e as enzimas produzidas, pode passar pelo processo de secagem e ser utilizado diretamente em reações como um biocatalisador imobilizado (ÁVILA et al, 2018). Além disso, a FES é uma tecnologia de baixo custo, que possibilita ainda a utilização de matérias-primas residuais de produtos agroindustriais, entre elas o arroz, trigo, milho, painço, algodão, cevada, dendê e soja, por exemplo (YAFETTO, 2022; ÁVILA et al, 2018; BON et al, 2008; SCHMIDELL et al, 2001).

O dendezeiro (*Elaeis guineensis*) é uma palmeira oleaginosa é uma espécie pertencente a família *Arecaceae* com origem na África Ocidental e possui uma de

grande produtividade (SAVIN, 1965), possuindo uma produção média anual de  $2,7 \cdot 10^6$  toneladas ao ano, sendo gerado de resíduos  $1,6 \cdot 10^6$  toneladas (KUNZ et al., 2018). Seu óleo tem uma cor que vai do amarelo ao vermelho devido à presença de carotenóides, pigmentos com propriedades antioxidantes, possuindo um amplo uso comercial, na indústria de alimentos, farmacêutica e química (SANTANA et al., 2013). O processamento do seu frutos fornece, em média, os seguintes produtos e subprodutos: óleo de palma bruto, 20%; óleo de dendê, 1,5%; torta de dendê, 3,5%; engaços, 22%; fibras, 12%; cascas, 5%; e efluentes líquidos, 50%.



**Figura 3:** Palmeira com cachos de dendê (SABER HORTIFRUTI).

Já o algodão (*Gossypium spp.*) possui no Brasil uma produção média anual segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) de  $2,79 \cdot 10^6$  toneladas, na qual a sua produção nacional é concentrada no Mato Grosso e na Bahia (BASF, 2021). O cultivo do algodão é utilizado principalmente na indústria têxtil a partir da utilização da fibra (pluma), entretanto, também é utilizada a semente para a obtenção de óleo comestível, tendo como subproduto desse processo a torta de algodão, que representa cerca de 75% da massa da semente do algodão (PRIMAZ, 2018).





**Figura 4:** Algodoeiro (*Gossypium spp.*) (MAIS SOJA).

Em relação a composição dos resíduos obtidos após o processamento do fruto do dendê e da semente de algodão, a torta, possuem um grande valor nutricional (Tabela 1), que atualmente é utilizado na produção de ração para ruminantes, porém esse material possibilita a utilização desse material a partir de sua aplicação como matéria-prima para a produção de lipases através da FES.

**Tabela 1:** Composição da torta de dendê e da torta de algodão.

Componentes %(m/m)	Torta de dendê	Torta de algodão
Celulose	16,6 - 30	24,8
Hemicelulose	24	11,7
Proteínas	12 - 21	31,3
Lipídeos	5 - 10	11,9
Cinzas	3 - 6	5,1

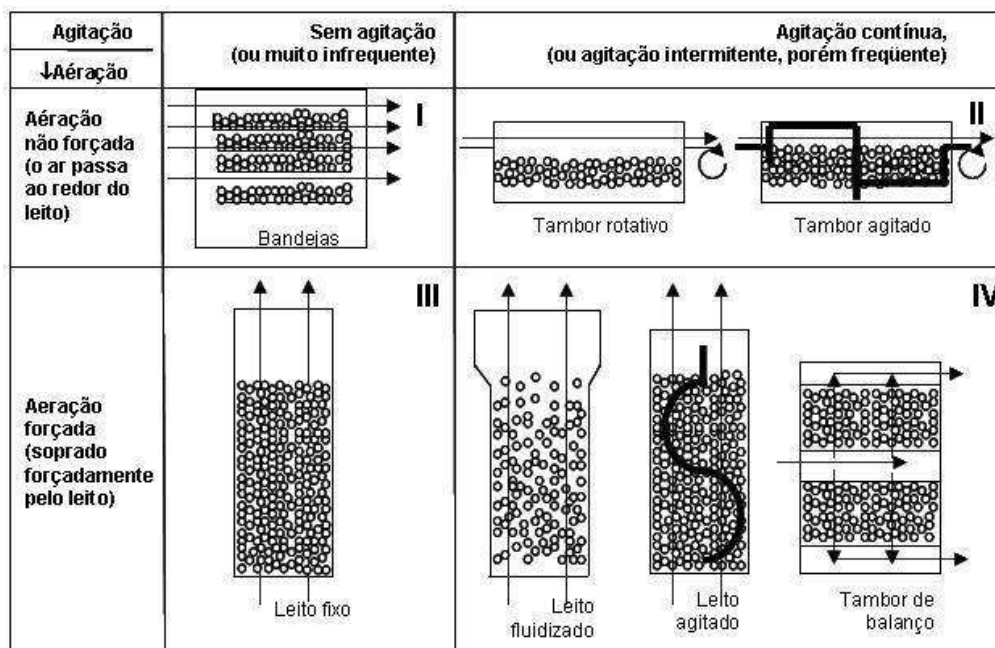
Desse modo, a FES se mostra muito vantajosa para a aplicação em biocatálise, visto que as enzimas comercialmente disponíveis apresentam um custo muito elevado, sendo necessário o desenvolvimento de uma via de produção enzimática

que sane as desvantagens presentes em tal método, o tornando economicamente competitivo, possibilitando sua aplicação em escala industrial.

### **1.1.1 USO DE BIORREATORES PARA FES**

O uso de matéria sólida como matriz para o processo fermentativo tem sérias implicações no aspecto de engenharia de projeto e operação de biorreatores, visto que houve uma melhoria significativa na compreensão de como projetar, operar e dimensionar os biorreatores para aplicação na FES. A chave para tais avanços têm sido a aplicação de técnicas de modelagem matemática para descrever vários fenômenos físico-químicos e bioquímicos, como o controle da temperatura do leite, sendo o sistema de aeração do mesmo importante para desempenhar um papel de remoção de calor do leite pela convecção e evaporação (ROBINSON E NIGAM, 2003; PANDEY, 2003; SANTOS et al, 2006). Como resultado da baixa  $A_w$  nos cultivos de FES, são necessários fermentadores menores e um produto mais concentrado é produzido, reduzindo simultaneamente a energia e os requisitos para o processamento *downstream* (KRISHNA, 2005; ROBINSON E NIGAM, 2003).

Existem quatro grupos básicos de reatores para FES, sendo possível distingui-los através do tipo de mistura e aeração empregados ao sistema, podendo não ter agitação mecânica, possuir agitação intermitente e contínua ou em colunas recheadas com circulação de ar (Figura 3) (ROBINSON E NIGAM, 2003; PANDEY, 2003; BON et al., 2008).



**Figura 3:** Tipos de biorreatores para FES. ( MICHELL; MEIEN; KRIEGER, 2003 *apud* SANTOS et al, 2006)

O reator do tipo bandeja surgiu inicialmente com estruturas de madeira, bambu alumínio entre outros, com altura variando entre 2 a 7 cm, o fundo desse tipo de pode ser impermeável ou constituído por uma tela perfurada, a fim de facilitar a difusão do ar pelo substrato, já que essa é uma grande limitação para o método que não tem uma grande eficiência na transferência de calor, além de exigir grande área operacional. Os reatores do tipo tambor, contam com agitação mecânica através da rotação do reator ou por meio de dispositivos de agitação, como pás e defletores, podendo contar ou não com um sistema de aeração forçada que garante uma transferência de calor mais adequada, entretanto, sua aplicação em larga escala é limitada pelo alto custo na manutenção do sistema. O reator de leito fixo, também denominado como “tubular vertical” ou ainda “fermentador do tipo coluna” tem sido bastante explorado em pesquisas na qual se deseja ter maior controle do processo. (ROBINSON E NIGAM, 2003; SCHMIDELL et al, 2001).

O uso do biorreator de leito fixo na produção de lipase, por exemplo, pode proporcionar um maior controle de parâmetros como aeração e umidade do leito, já que o mesmo possui em seu sistema aeração forçada, além de

contar com a utilização de colunas que possuem jaqueta d'água (Figura 4), favorecendo a transferência de calor e massa no biorreator e, conseqüentemente, o aumento de produtividade em relação a outros biorreatores utilizados na fermentação em estado sólido, além de apresentar como vantagem uma menor contaminação bacteriana por se tratar de um sistema fechado, ao contrário do biorreator do tipo bandeja, por exemplo (ROBINSON E NIGAM, 2003). Pode-se citar também como vantagem para esse tipo de reator aplicado a FES é a redução do espaço utilizado, facilidade de manuseio e uma relação volume total/volume útil próximo a 1, apesar de ainda possuir algumas limitações, como compactação da massa e, conseqüentemente, dificuldade na dissipação de calor, manutenção da umidade ao longo do sistema e no escalonamento (SCHMIDELL et al, 2001).



**Figura 4:** Sistema de biorreator de leito fixo para produção de lipase por FES utilizando o microrganismo *Rhizopus oryzae* e torta de algodão como substrato. Sistema composto por coluna com jaqueta d'água em torno do reator e aeração forçada para o controle de transferência de massa e calor ao longo do sistema.

## 1.2 APLICAÇÃO DA BIOCATÁLISE NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

O aumento da demanda por petróleo e recursos limitados de combustível fóssil têm estimulado a busca de fontes renováveis para obtenção de biocombustíveis, sendo estes ambientalmente mais aceitáveis. Nos últimos anos, o biodiesel emergiu como uma das energias renováveis com maior potencial para substituir o diesel, derivado do petróleo, tornando-se uma alta prioridade nas estratégias de política energética em uma escala global (LOPES et al, 2013; FAN et al, 2012).

O biodiesel é uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos obtidos a partir de reações de esterificação ou transesterificação de ácidos graxos ou triglicerídeos com álcoois de cadeia curta (Figura 5). Estes podem ser obtidos por catálise química (geralmente utilizando bases fortes, como NaOH e KOH) ou por biocatálise.

Entretanto, na via química a presença de água e ácido graxo livre ou ambos promovem a formação de sabão durante o processo, o que reduz o rendimento de ésteres e torna a separação dos produtos formados mais difícil, sendo necessário um processamento adicional (BON et al, 2008; FAN et al., 2012; ). Por outro lado, a biocatálise traz um conjunto de vantagens nessa direção devido a capacidade das lipases de catalisar tanto reações de transesterificação como de esterificação mesmo na presença de baixas concentrações de água. Além disso, tais reações contam ainda com processos que demandam condições mais brandas de temperatura e pressão. (POPPE et al., 2015; MATHEW et al, 2021).



(I) Reação geral de transesterificação.



(II) Reação geral de esterificação.

**Figura 5:** Mecanismo geral para a obtenção do biodiesel, sendo possível obtê-lo através de reações de (I) transesterificação e (II) esterificação. (Adaptado de FAN et al, 2012)

Apesar de haver diversas maneiras de se obter o biodiesel, a obtenção através da transesterificação é mais comumente utilizada. A reação tem como subproduto o glicerol, que, assim como o biodiesel, tem grande importância para a aplicação comercial. A sua produção através da biocatálise apresenta uma vantagem nesse caso devido a especificidade das lipases, fazendo com que a separação de glicerol e a purificação do biodiesel sejam facilmente obtidos (VASUDEVAN & BRIGGS, 2008; POPPE et al., 2015). Além disso, nas reações de transesterificação podem ser utilizadas diversas fontes lipídicas, entre elas estão os óleos vegetais, gorduras animais, óleos produzidos por algas e cianobactérias (POPPE et al., 2015). Em relação aos substratos de origem vegetal estão os óleos, como óleo de mamona, girassol, palma e soja (FREIRE & CASTILHO, p. 369-385, 2008; RAMOS et al, 2009), materiais que têm sido bem explorados nos estudos acerca da produção de biodiesel, ainda que a utilização desses substratos apresentem algumas limitações na aplicação do biodiesel produzido como um substituto ao diesel, como a viscosidade em óleos vegetais e a estabilidade oxidativa do biocombustível gerado (RAMOS et al, 2009; VASUDEVAN & BRIGGS, 2008).

Os biorreatores de leito fixo são comumente utilizados na biocatálise devido a sua eficiência e facilidade de operação (ÁVILA et al, 2019). Neste tipo de sistema as lipases são imobilizadas em suportes porosos e a solução de substrato é bombeada através da coluna contendo o biocatalisador. As reações conduzidas desse modo possuem como vantagem a obtenção de maiores taxas de conversão e produtividade, devido a alta concentração de biocatalisador e longo tempo de contato do substrato com a enzima em comparação com tanques agitados (ÁVILA et al, 2019; ROBINSON E NIGAM, 2003), além de ser minimizada a degradação do conteúdo enzimático causada pela agitação mecânica nos tanques de reação.

Geralmente, o conteúdo enzimático é produzido em um biorreator diferente do que é utilizado para a reação enzimática, como por exemplo um sólido fermentado produzidos em biorreatores do tipo bandeja, sendo necessárias etapas de manipulação para a sua remoção, moagem, secagem e imobilização do material para que este seja utilizado como biocatalisador no reator de leito fixo (AGUIEIRAS et al, 2015; ÁVILA et al, 2019). Como forma de reduzir o custo de produção de bioprodutos como o biodiesel, foi desenvolvido o sistema multipropósito, onde a produção do biocatalisador é realizada na mesma coluna que será empregada ao biorreator de leito fixo na produção de biodiesel. Tal sistema apresenta diversas vantagens como: facilidade de escalonamento, devido ao uso de um único biorreator de leito fixo; menor custo e necessidade de espaço devido a redução na demanda por equipamentos; menor risco de contaminação, por não exigir a transferência do preparado enzimático após o processo de fermentativo; e a eliminação da etapa de separação do biocatalisador do produto, etapa necessária na reação em sistema agitado (ÁVILA et al, 2019).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho teve como objetivo avaliar o sistema multipropósito para a produção de lipases por meio de fermentação em estado sólido utilizando *Rhizopus oryzae*, visando sua aplicação na produção de biodiesel.

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinação por reação de esterificação em leito agitado da cinética de produção de lipase de *R. oryzae* por FES produzido no biorreator de leito fixo, empregando as tortas de algodão e de dendê como matéria-prima;
- Comparar a capacidade de esterificação do PES produzido no FES em biorreator do tipo leito fixo e bandeja;
- Determinação do tempo de secagem por aeração forçada das colunas contendo PES para a sua aplicação na reação de produção de biodiesel em leito fixo;
- Determinação dos parâmetros reacionais da reação de esterificação no reator de leito fixo;
- Realizar reações de esterificação em leito fixo utilizando como substrato o ácido oleico e o hidrolisado de óleo de algodão.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PRÉ-INÓCULO

*Rhizopus oryzae* (cadastro SisGen n° A7A68AD) foi o microrganismo utilizado durante todo o processo experimental, sendo este pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) do Instituto de Química da UFRJ, isolado da polpa da fruta Macaúba (CAVALCANTI et al, 2015).

O fungo foi cultivado em placa de petri contendo o meio de cultura PDA (potato dextrose-agar) por 7 dias a 30 °C. Foi obtida uma suspensão de esporos a partir da raspagem destes, utilizando uma alça de platina, e colocado em um tubo contendo pérolas de vidro e uma solução de raspagem (tampão fosfato 0,1 M pH 7 e tween 80)(GUTARRA et al., 2009).

A propagação de esporos foi realizada em duplicata utilizando meio PDA (agar potatodextrose) com 1% de óleo de soja em um erlenmeyer de 500 mL, no qual foi inoculado 0,75 mL da suspensão de esporos de *Rhizopus oryzae* (Figura 6). O erlenmeyer foi incubado na estufa a 30°C por 7 dias (GUTARRA et al., 2009).

Para fins comparativos, também foi conduzida a propagação de esporos em meio PDA com 1% de ácido oleico, no qual os esporos só foram fermentados em duplicatas de fermentação no tempo de 24 horas e utilizando como substrato a torta de algodão.



**Figura 6:** Pré-inóculo de *Rhizopus oryzae* propagado em meio PDA + 1% de óleo vegetal por 7 dias a 30°C.

### 3.2 CONTAGEM DE ESPOROS

Após o período de propagação de esporos, foi realizada a raspagem dos esporos de *Rhizopus oryzae* utilizando 30 mL da solução de raspagem, composta por tampão fosfato pH 7 0,1 M com tween 80 e pérolas de vidro em cada erlenmeyer. A contagem da suspensão foi realizada na câmara de Neubauer, de modo que, para a realização desta etapa, a suspensão de esporos foi diluída 100x (GUTARRA et al., 2009). A concentração de esporos por mL de solução foi obtida pela seguinte equação:

$$N_{(\text{esporos/mL})} = (M \cdot D) / V_c \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

N = Concentração de Esporos

(esporos/mL) M = Média dos

números de esporos contados D =

Diluição ( $10^2$ )

$V_c$  = Volume da Câmara ( $10^{-4}$  mL)

### 3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

#### 3.3.1 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR DO TIPO LEITO FIXO

A etapa de fermentação em estado sólido foi conduzida em um biorreator de leito fixo (Figura 7), composto por uma coluna com 14 cm de altura e 4 cm de diâmetro, possuindo uma jaqueta d'água conectada a um banho termostático. Na coluna foi inoculada a suspensão de esporos na concentração de  $10^7$  esporos/g em 7 gramas do substrato torta e fibra de dendê (80:20), subproduto da produção do óleo de dendê, cedida pela empresa AGROPALMA S.A. com suplementação de

uréia 1,5%(m/m), umidade inicial de 65% e temperatura de 35 °C. Também foi conduzida a FES utilizando substrato composto pela torta de algodão, cedida pela Aboissa Commodity Brokers (São Paulo-SP), com umidade inicial de 60% e temperatura de 30 °C. O biorreator foi acoplado a um kitassato de 1000 mL contendo água destilada e esterilizada, além de possuir uma entrada de ar umedecido por meio de aeração com a vazão controlada por rotômetros de 0,15 L/min. O kitassato foi acomodado em um banho maria para a manutenção da temperatura da água que umedece o ar que entra no sistema (CAVALCANTI et al., 2005).



**Figura 7:** Biorreator de Leito Fixo composto por colunas de vidro acopladas a um kitassato de 1000 mL com controle de temperatura através da circulação de água através da jaqueta d'água presente nas colunas.

### 3.3.1 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR DO TIPO BANDEJA

A fim de avaliar se haveria alteração na capacidade de esterificação do PES produzido em diferentes biorreatores também foi realizada a fermentação em estado sólido em um biorreator do tipo bandeja. Em um béquer foi inoculada a suspensão de esporos na concentração de  $10^7$  esporos/g em 15 gramas do

substrato composto por torta de algodão, com umidade inicial de 60% e temperatura de 30 °C. A FES foi conduzida nos tempos de 24 e 48 horas para que tais resultados de capacidade de esterificação do PES obtido pudessem ser comparados a amostras PES obtidos por meio da FES conduzida em leito fixo.

### 3.3.3 DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM REATOR DE LEITO FIXO

A cinética de produção de lipase foi feita a partir da fermentação dos substratos pelo fungo filamentoso *Rhizopus oryzae* por 24, 48, 72 e 96 horas, à 35 °C para o substrato composto pela mistura de torta e fibra de dendê, e à 30 °C para o substrato composto por torta de algodão. Em seguida, as amostras foram liofilizadas por 24 horas para que, após secas, pudessem ser realizadas as reações de esterificação com o PES obtido.

### 3.4 CINÉTICA DE SECAGEM POR AERAÇÃO FORÇADA

A cinética de secagem por aeração forçada foi conduzida utilizando o preparado enzimático sólido obtido através da fermentação da torta de algodão por 24 horas, no reator de leito fixo. Nessa etapa, as colunas contendo o PES foram conectadas diretamente à entrada de ar comprimido (sem a passagem do ar pelo kitassato com água), e foi empregada a vazão de ar de 0,15 L/min (Figura 8) (ÁVILA et al., 2018). Foi acompanhada a umidade das colunas após os tempos de 16, 24, 40 e 48 horas de secagem, além de ser avaliada a capacidade de esterificação dessas amostras.

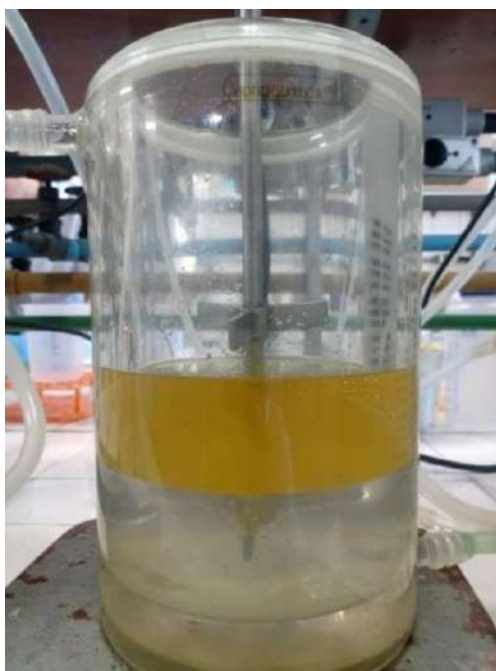


**Figura 8:** Colunas contendo PES sendo seco através da secagem por aeração forçada, na qual as colunas são ligadas por mangueiras ao compressor de ar na vazão de 0,15 L/min.

Além disso, foi realizado mais um ensaio comparativo para a cinética de secagem, onde foram avaliados os resultados de umidade em uma cinética onde não houve a troca da sílica da linha do compressor de ar, de modo que a sílica hidratada permitia a entrada do ar úmido no sistema; e uma cinética com a troca frequente da sílica, a fim de garantir que o ar do compressor entraria no sistema livre de umidade.

### **3.5 REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO ÓLEO DE ALGODÃO**

A reação de hidrólise foi conduzida sob agitação mecânica em um biorreator com jaqueta d'água (Figura 10) para o controle da temperatura da reação, e nele foi adicionada a mistura 1:1 (v/v) de óleo de algodão e tampão fosfato 0,1M pH 7,0, sendo utilizado 1% (massa em relação ao volume de óleo) da lipase comercial liofilizada de *Candida rugosa*, Lipomod™ 34MDP (CRL) obtida de Biocatalysts Ltd (Cardiff, UK) (GRECO-DUARTE et al., 2019). A reação de hidrólise foi realizada a 40 °C, com agitação de 200 rpm, por 4 horas,. A reação foi interrompida através da adição de hexano em volume igual ao volume total da reação, seguido de incubação sob a agitação de 200 rpm, por 10 minutos. Em seguida, todo o conteúdo do biorreator foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, ficando uma mistura bifásica. O sobrenadante, que contém o óleo dissolvido em hexano, foi coletado, e a fase inferior foi descartada. Para remover resíduos de água na fase do hexano, foi adicionado 10% (m/v) de fosfato de sódio anidro sob agitação mecânica por 10 minutos e, em seguida, todo o conteúdo foi filtrado. Por fim, o óleo hidrolisado foi concentrado em rotaevaporador, para a remoção do hexano utilizado (SOUSA et al., 2010).



**Figura 8:** Modelo de biorreator utilizado para a obtenção do hidrolisado de algodão, na qual a mistura de óleo de algodão (fase superior) e tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 (fase inferior) foi submetido a reação de hidrólise utilizando a enzima comercial 34MDP como biocatalisador, sob agitação de 200 rpm por 4 horas, a 40°C.

O rendimento da reação de hidrólise foi avaliado pela comparação entre a acidez do óleo de algodão inicial com a acidez do óleo de algodão hidrolisado e, para isso, foi realizada a titulação volumétrica utilizando a solução de NaOH 0,04M em 100 $\mu$ L de amostra diluído em 40 mL de uma solução 1:1 (v/v) de acetona e etanol. Os cálculos de acidez foram realizados seguindo a equação 2 (Eq. 2), apresentada posteriormente (AGUIEIRAS et al., 2014).

O óleo de algodão hidrolizado e o etanol absoluto (razão molar 1:1) foram utilizados como substratos em reações de esterificação em leito fixo a 40°C. Os substratos foram adicionados a um biorreator com jaqueta d'água e agitação magnética, e eram bombeados para a coluna contendo o PES através de uma bomba peristáltica (Figura 10), fazendo um movimento contínuo no sistema reacional (recirculação do líquido) durante o período de 24 horas. Durante o processo, foram retiradas amostras em 4 e 24 horas de reação, assim como nos ensaios de esterificação padrão realizados em leito

agitado (ÁVILA et al., 2018).

### 3.6 ANÁLISES QUANTITATIVAS

#### 3.6.1 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM LEITO AGITADO

As amostras de PES (preparado enzimático sólido), produzidas utilizando os substratos torta e fibra de dendê e o substrato torta de algodão, já liofilizadas foram empregada para catalisar a reação de esterificação utilizando como substratos o ácido oleico e o etanol absoluto, presentes em razão estequiométrica 1:1 no meio reacional, e 10% (m/m) de PES em relação à massa total de ácido oleico, a 40 °C, com agitação magnética (Figura 8). As reações foram realizadas em duplicata (ÁVILA et al.,2018).



**Figura 9:** Sistema utilizado para a reação de esterificação de ácido oleico e etanol em leito agitado, utilizando o preparado enzimático produzido pela fermentação em estado sólido de *Rhizopus oryzae* como biocatalisador, a temperatura de 40°C.

Foram retirados pontos em triplicata nos tempos de 4 e 24 horas, sendo avaliados os resultados de capacidade de esterificação por meio da titulação dos ácidos graxos livres. As amostras foram solubilizadas em 40 mL de solução acetona/etanol 1:1(v/v) foram analisadas utilizando NaOH 0,04 M, empregando o titulador automático Mettler modelo DG20. O índice de acidez das amostras e as taxas de conversão foram determinados através das seguintes equações, respectivamente:(AGUIEIRAS et al., 2014)

$$\text{Acidez (\%m/m)} = (V \times M \times AG)/(10 \times m) \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

V= volume de soda utilizado na titulação da amostra (mL); M= concentração da solução de

NaOH (mol.L<sup>-1</sup>);

AG= massa molar do ácido graxo presente em maior concentração no óleo (ácidooleico) (g);

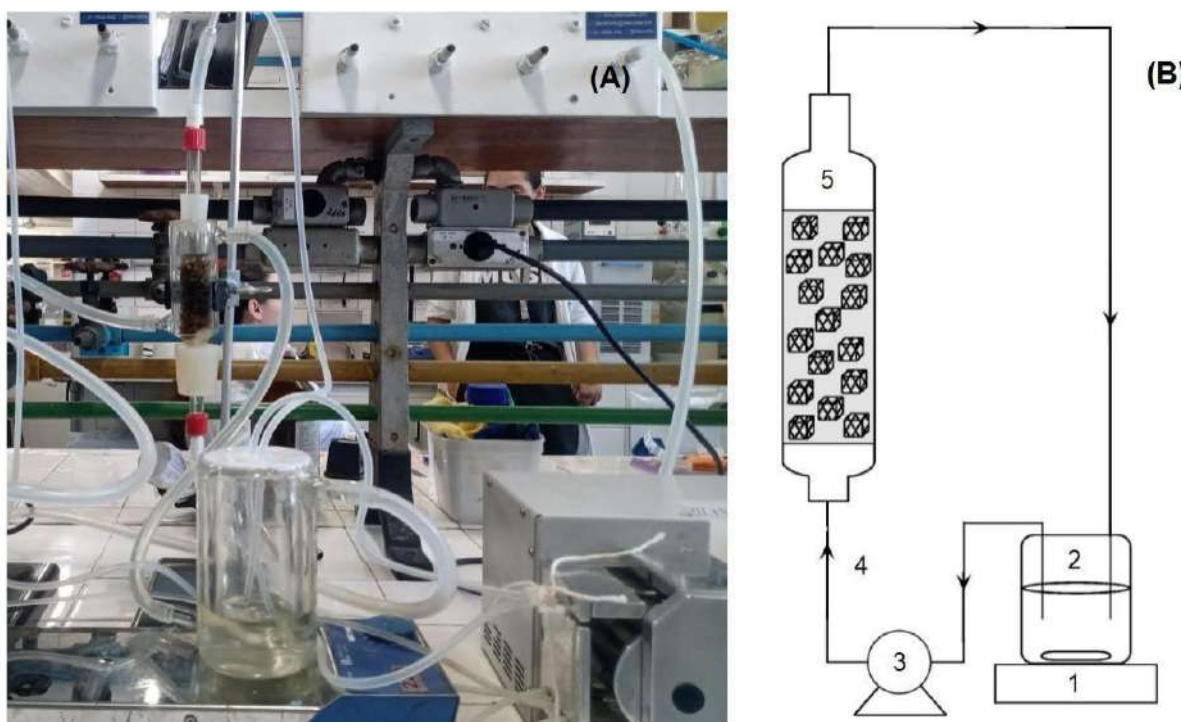
m= massa de amostra (g).

$$\text{Conversão(\%)} = 100 \times (\text{Acidez inicial}) / \text{Acidez final} \quad (\text{Eq. 3})$$

### 3.6.2 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM LEITO FIXO

Para a reação em leito fixo o PES produzido em torta de algodão foi mantido nas colunas após a fermentação e secagem por aeração forçada (vazão de ar de 0,15 L/min, sem controle de temperatura, por 48 horas). Após secas, as colunas contendo o sólido fermentado foram utilizados como biocatalisadores (10% massa por volume de ácido oleico). A reação foi conduzida utilizando como substratos o ácido oleicos e etanol absoluto (razão molar 1:1) a 40°C. Os substratos foram adicionados a um biorreator com jaqueta d'água e agitação magnética, e eram bombeados a 10 mL/min. para a coluna contendo o PES através de uma bomba peristáltica (Figura 9), fazendo um movimento contínuo no sistema reacional (recirculação do líquido) durante o período de 24 horas. Durante o processo, foram retiradas amostras em 4 e 24 horas de reação, assim como nos ensaios de esterificação padrão realizados em leito agitado (ÁVILA et al., 2018).





**Figura 10:** (A) Sistema multipropósito de reação de esterificação em leito fixo a 40°C. Neste sistema a mistura 1:1 de ácido oleico e etanol absoluto é colocada em um reator com jaqueta d'água com agitação magnética e a mistura é conduzida para as colunas contendo o PES através de bombeamento por dutos com o uso de uma bomba peristáltica. (B) Esquema de componentes de um biorreator de leito fixo: 1- placa de agitação magnética; 2 biorreator onde é colocada a mistura de reagentes; 3 - bomba peristáltica; 4 - setas que representando as mangueiras pelas quais o fluido é bombeado; 5 - coluna contendo o PES.

Os resultados de capacidade de esterificação da reação foram avaliados por meio da titulação volumétrica, na qual as amostras foram solubilizadas em 40 mL de solução acetona/etanol 1:1 e analisadas utilizando a solução de NaOH 0,04 M, empregando o titulador automático Mettler modelo DG20 e os cálculos de índice de acidez foram feitos seguindo a equação 2 (Eq. 2) apresentada no subtópico anterior (3.5.1). Além disso foi verificada a vazão de bombeamento do ácido oleico e etanol no sistema e o tempo de retenção da mistura no PES e, para isso foi cronometrado, durante o primeiro ciclo de bombeamento, o tempo que a mistura leva para passar por toda a extensão do PES presente na coluna para saber o tempo de retenção no PES e o tempo que leva para retornar 10 mL da mistura ao biorreator para saber a vazão de bombeamento da mistura (ÁVILA et al., 2018). A vazão de bombeamento foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Vazão(mL/min)} = 10/t$$

(Eq. 4)

Onde:

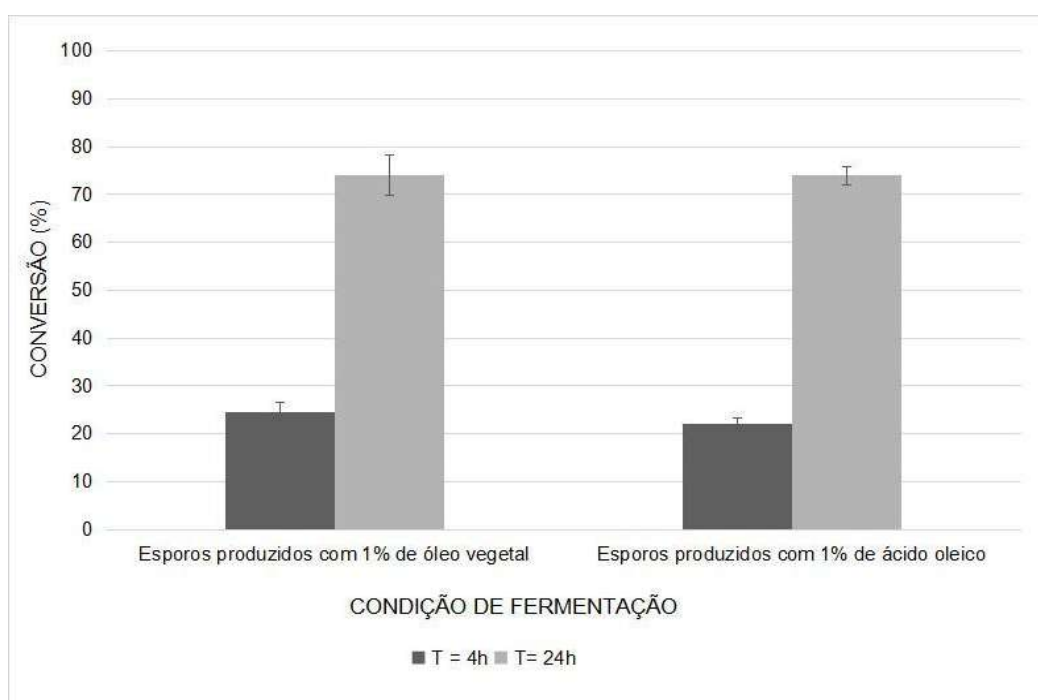
$t$  = Tempo necessário para retornar 10 mL ao biorreator (em minutos).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO DO PRÉ-INÓCULO

Foram avaliados dois meios de propagação de esporos: 1) meio PDA + 1% de óleo de soja; e 2) meio PDA + 1% de ácido oleico. Para o meio suplementado com óleo vegetal, as suspensões de esporos obtidas possuíam uma concentração de  $6.10^7$  (+/- 1,17) esporos/mL ; e de  $1.10^8$  (+/- 1,28) esporos/mL para a propagação de esporos conduzida utilizando 1% de ácido oleico.

Os esporos obtidos com ambos os meios de propagação foram empregados como inóculo da FES (24h em torta de algodão), para avaliar se haveria alguma influência sobre a produção de lipases. Os ensaios mostraram uma conversão máxima em reações de esterificação de 73,99% (+/- 4,24%) para a propagação utilizando 1% de óleo de soja e 73,91% (+/- 1,89%) para a propagação utilizando 1% de ácido oleico (Figura 11) após 24 horas de reação. Apesar de ter sido observado um aumento significativo na produção de esporos no meio contendo ácido oleico, não ocorreu uma diferença significativa na capacidade de produção de lipases pela FES.



**Figura 11:** Comparação da capacidade fermentativa dos esporos propagados em meio PDA + 1% óleo vegetal e meio PDA + 1% ácido oleico. Os esporos foram

empregados em fermentações conduzidas por 24 horas em torta de algodão, a 30 °C, por 24 horas e o biocatalisador obtido foi empregado nas reações de esterificação de ácido oleico e etanol.

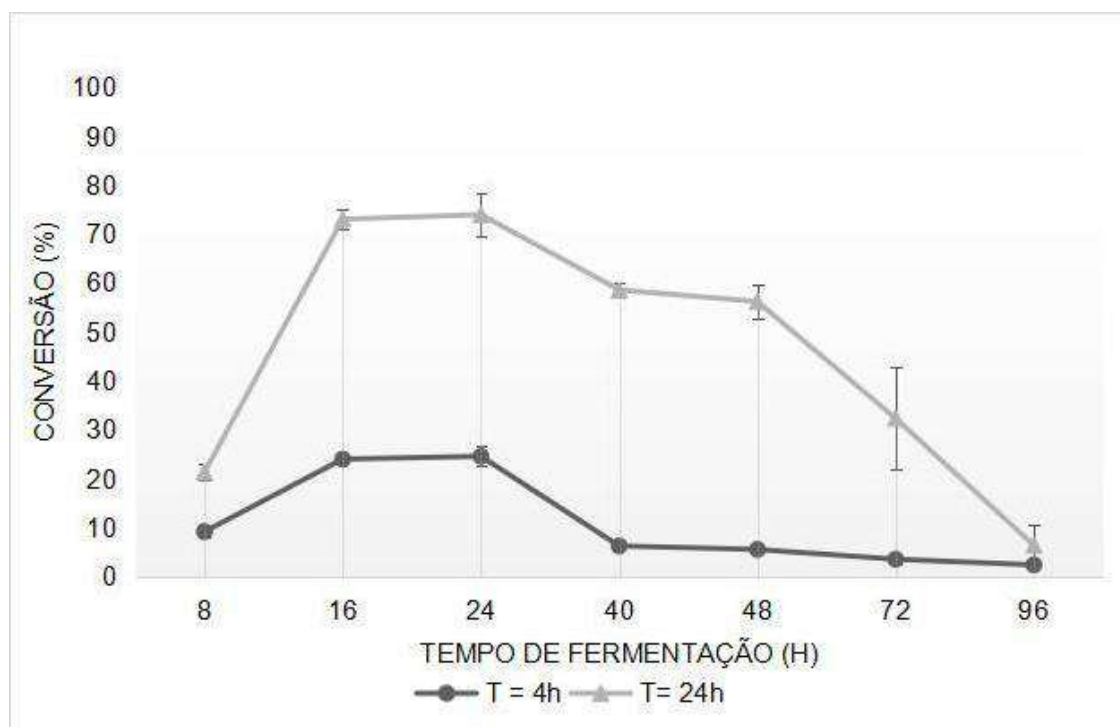
Os resultados apresentados demonstraram que o tipo de lipídeo adicionado ao meio de propagação dos esporos influencia na quantidade de esporos produzida, porém, não influenciou na capacidade de esterificação das lipases produzidas na FES. Vale ressaltar que é interessante a obtenção de uma maior concentração de esporos no pré-inóculo, entretanto, é necessário avaliar se a alteração proposta ao processo de obtenção de esporos seria vantajosa levando em consideração o custo final de obtenção do produto enzimático, já que o ácido oleico possui um valor de mercado superior ao óleo de soja. Dessa forma, optou-se pelo uso do meio suplementado com óleo de soja para a preparação do pré-inóculo de *Rhizopus oryzae* nos experimentos seguintes.

#### **4.2 INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO DA FERMENTAÇÃO**

Foram avaliados dois meios de cultivo para a FES: 1) meio composto por torta e fibra dendê (proporção 80:20); e 2) meio composto por torta de algodão. Os sólidos fermentados contendo lipase foram retirados do biorreator de leito fixo e liofilizados por 24 h, atingindo uma umidade média de 6,46%(m/m) após a liofilização. Nas figuras 12 e 13 estão representados os resultados das reações de esterificação, nos tempos de 4 e 24 horas de reação, utilizando etanol absoluto e ácido oleico como substratos (razão molar 1:1) e o PES na concentração de 10% em relação a massa total de ácido oleico.



**Figura 12:** Cinética da produção de lipase produzida por *Rhizopus oryzae* utilizando torta e fibra de dendê (80:20) como substrato. Os sólidos fermentados foram caracterizados quanto a sua capacidade de catalisar a reação de esterificação entre ácido oleico e etanol, os tempos de reação de 4 e 24 horas.



**Figura 13:** Cinética da produção de lipase produzida por *Rhizopus oryzae* utilizando torta de algodão como substrato. Os sólidos fermentados foram caracterizados quanto a sua capacidade de catalisar a reação de esterificação entre ácido oleico e etanol, os tempos de reação de 4 e 24 horas.

Pode-se observar que houve a produção de lipases nos 4 tempos de fermentação em que o *Rhizopus oryzae* foi submetido utilizando como substrato a torta e fibra de dendê (80:20) (Figura 12), sendo possível verificar uma conversão média de cerca de 10% em todas as amostras nas primeiras 4 horas da reação de esterificação, que foram analisadas em duplicatas. Em 24 horas de reação, as amostras de PES com 48 e 72 horas de fermentação foram as que obtiveram melhores resultados nas reações de esterificação, com conversão média de ácidos graxos livres de 65,7% e 58,7%, respectivamente. O preparado enzimático sólido obtido com 96 horas de fermentação mostrou uma queda em sua capacidade de esterificação, sendo este o período de fermentação que obteve a menor conversão média de ácidos graxos livres presentes na reação de esterificação entre as amostras analisadas (37,97% de conversão de ácido oleico). Em relação ao uso da torta de algodão como substrato para a fermentação do *Rhizopus oryzae* (Figura 13) em comparação ao uso da mistura de torta e fibra de dendê, pode-se notar que houve uma melhora significativa na taxa de conversão de ácido oleico durante a reação de esterificação já em 4 horas, tendo como conversão média máxima para esse período de 24,0% nas amostras de PES fermentados por 16 e 32 horas. Em 24 horas de reação de esterificação, o PES com melhor desempenho foi o fermentado por 24 horas, apresentando conversão média de ácidos graxos livres de 74,0% (+/- 4,2%) e o PES fermentado por 16 horas teve uma taxa de conversão bem semelhante, com conversão média de ácido oleico de 73,1 (+/- 2,0%). O PES obtido a partir de 32 horas de fermentação apresentou uma queda progressiva na conversão de ácido oleico quanto maior o tempo em que o *Rhizopus oryzae* foi submetido ao processo fermentativo.

Desse modo, os resultados obtidos com o uso de torta de algodão para a produção do sólido fermentado utilizado como biocatalisador das reações de esterificação mostrou ser mais vantajoso que a utilização da mistura de torta e fibra de dendê já que, além de apresentar maiores conversão de ácidos

graxos livres em reação conduzida em leite agitado, o PES obtido utilizando torta de algodão demanda um tempo menor de fermentação para atingir a sua atividade enzimática máxima, o que é economicamente favorável considerando a demanda industrial de produção. Tal diferença na produção enzimática na FES utilizando matérias-primas diferentes pode se justificada pela diferença na composição dessas matrizes (tabela 1), principalmente em sua composição de carboidratos e lipídeos, onde há uma maior concentração de lipídeos na torta de algodão em relação a torta de dendê, o que pode ter favorecido, conseqüentemente, uma maior produção de lipases durante a FES.

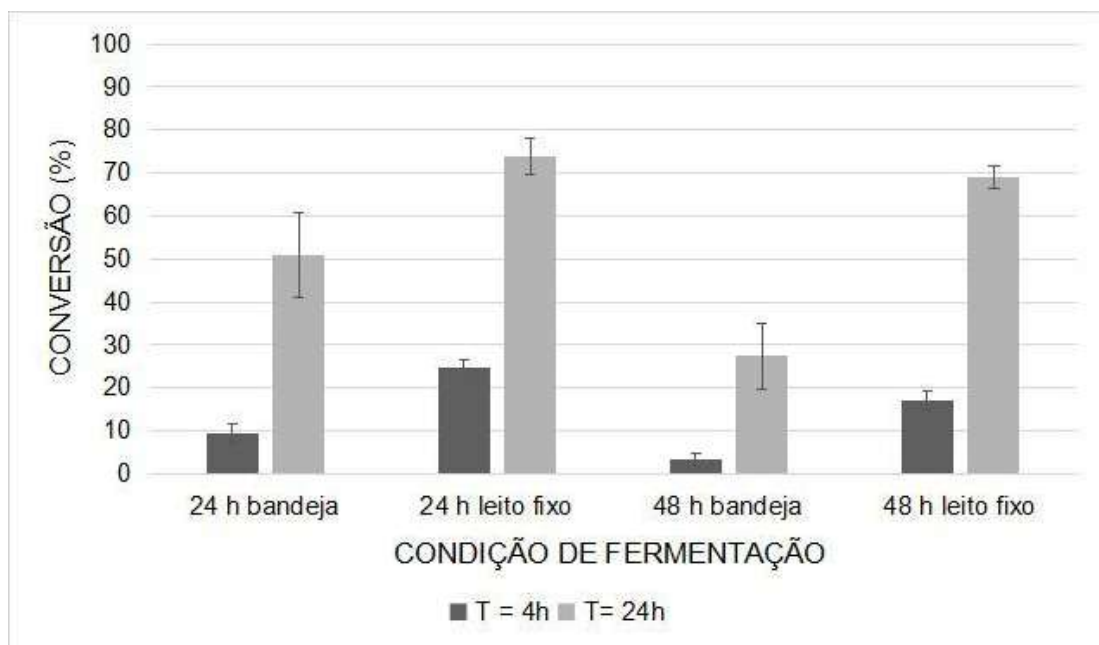
A queda observada na conversão das reações de esterificação após certo período de fermentação, pode ter como justificativa uma perda da atividade enzimática da lipase devido ao longo tempo de fermentação em que o microrganismo foi submetido, podendo os deixar mais vulneráveis a variações na umidade, transferência de calor, oxigenação do sistema e disponibilidade de substratos ao longo da fermentação já que se trata de um sistema de biorreator de leite fixo. Além disso, os substratos naturais apresentam uma grande desvantagem estrutural em sua matriz, já a fonte de carbono constitui parte de sua estrutura e, desse modo o crescimento microbiano provoca uma desintegração na matriz do substrato, causando mudanças na forma geométrica e nas características física do meio, podendo afetar a transferência de calor e massa ao longo do meio (KRISHNA, 2005). Desse modo, é possível supor que o longo tempo de fermentação do *Rhizopus oryzae* pode provocar a queda na produção de lipases; uma possível degradação e inativação das lipases já produzidas; ou até mesmo a geração de outros produtos enzimáticos como proteases e metabólitos secundários devido a sua maior propensão a variações no sistema do biorreator como a umidade, temperatura e aeração, causando mudanças estruturais no substrato, além da possibilidade de haver a presença de compostos contaminantes por se tratarem de matérias-primas residuais de origem agroindustrial que não passaram por um processo de purificação química do material, tendo como pré tratamento apenas o processo de moagem e a esterilização por meio de calor úmido, realizado

por moagem e esterilização por autoclavagem.

### 4.3 RESULTADOS COMPARATIVOS

#### 4.3.1 FERMENTAÇÃO EM REATOR DO TIPO BANDEJA E EM LEITO FIXO

A fim de verificar se a fermentação por *Rhizopus oryzae* em torta de algodão teria alguma diferença significativa em seus resultados se o processo fermentativo fosse realizado em diferentes biorreatores, foi comparada a capacidade de esterificação do PES fermentado por 24 e 48 horas em biorreator do tipo bandeja e em leito fixo do tipo tubular vertical (Figura 14), para isso foi utilizado em ambos as mesmas condições de fermentação e de reação de esterificação apresentados na metodologia de fermentação em estado sólido (3.3) e análises quantitativas (3.5).



**Figura 14:** Produção de lipase por *Rhizopus oryzae* utilizando torta de algodão como substrato utilizando dois biorreatores: bioreator do tipo bandeja; e leito fixo. Os sólidos fermentados foram caracterizados quanto a sua capacidade de catalisar a reação de esterificação entre ácido oleico e etanol, os tempos de reação de 4 e 24 horas.

Na figura 14 pode-se observar que os resultados de conversão de ácidos graxos livres em 4 e 24 horas de reação de esterificação para ambos os tempos de fermentação testados mostraram diferença na produção de lipase nos nos biorreatores utilizados para o processo, já que o PES obtido através



da fermentação em bandeja possui uma capacidade de esterificação máxima em 24 de FES (50,8% de conversão em 24 horas de reação) inferior quando comparado com a fermentação realizada em leito fixo em 24 horas de FES (74% de conversão em 24 horas de reação).

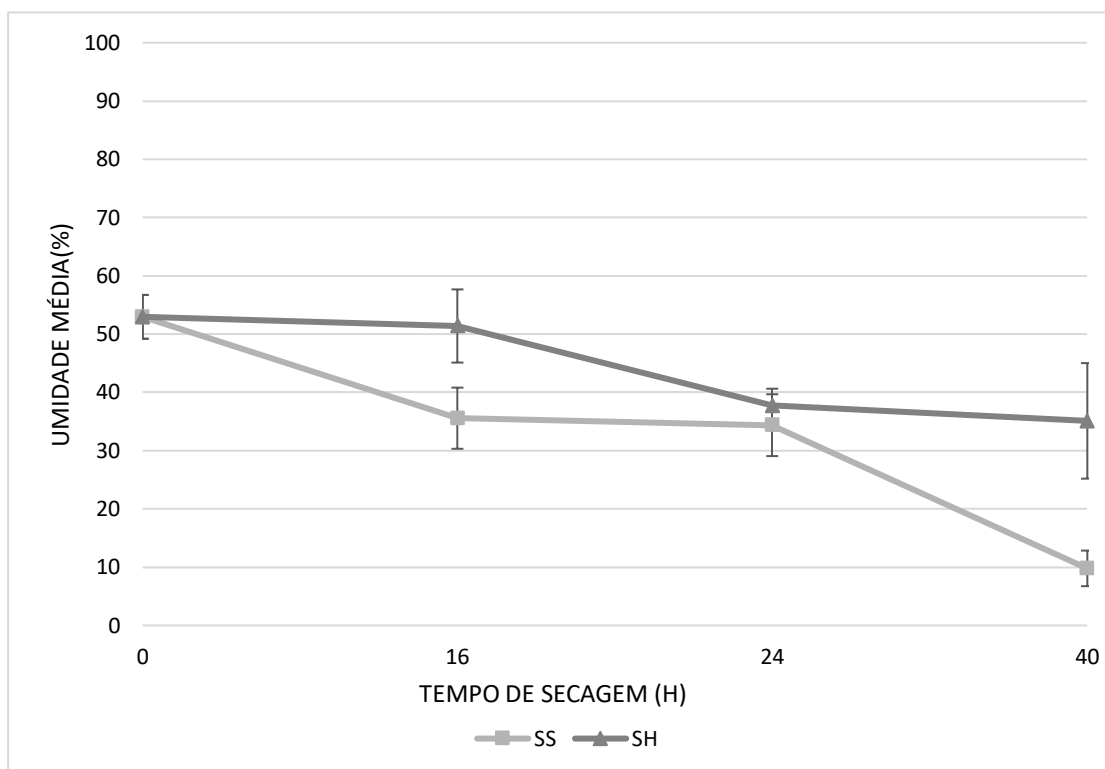
Tais resultados podem ser justificados pelo modo em que os biorreatores distribuem e mantêm suas condições ao longo do sistema. Isso se deve ao fato do biorreator do tipo bandeja ter uma série de limitações quanto a distribuição de calor e aeração, enquanto o biorreator do tipo leito fixo tubular vertical, que possui como vantagem a aeração forçada que auxilia no controle dos parâmetros do processo (ROBINSON E NIGAM, 2003). Além disso, foi analisada a umidade do PES ao fim da etapa de FES e foi observado que houve menor perda de água no PES produzido em reator de leito fixo ( umidade final de 57,7% e 55,4% em 24 e 48 horas de FES, respectivamente) quando comparado ao reator do tipo bandeja (umidade final de 54,5% e 50,2% em 24 e 48 horas de FES, respectivamente), fator que pode ter afetado a produção enzimática dos biorreatores, já que a FES é uma técnica que utiliza pouca água para o cultivo, e essa queda na umidade durante a FES pode afetar o crescimento microbiano.

#### **4.1.1 CINÉTICA DE SECAGEM POR AERAÇÃO FORÇADA**

A etapa de secagem do preparado enzimático tinha anteriormente como protocolo a secagem por aeração forçada na coluna durante um período de 48 horas (ÁVILA et al.,2019) e, ao final do processo, as amostras possuíam uma umidade média de 5,3%(m/m) e, quando utilizado como biocatalisador na reação de esterificação de ácido oleico e etanol absoluto (1:1) em leito agitado atinge uma conversão média de 64,1%. Com a finalidade de avaliar a possibilidade de otimização do tempo de secagem das colunas, foi realizada uma cinética de secagem verificando a umidade final do PES produzido com torta de algodão como substrato fermentado por 24 horas nos tempos de 16, 24 e 40 horas de aeração forçada a uma vazão de 0,15 L/min de ar natural sob duas condições: com a coluna de secagem do compressor de ar sem a troca da sílica presente no compressor (SH), de modo que ao final dos ensaios a mesma se encontrava hidratada

devido a umidade presente no ar; e com a sílica seca (SS), na qual havia uma troca periódica da sílica a fim de mantê-la seca durante todo o processo, evitando com que a umidade do ar afete a eficácia do método.

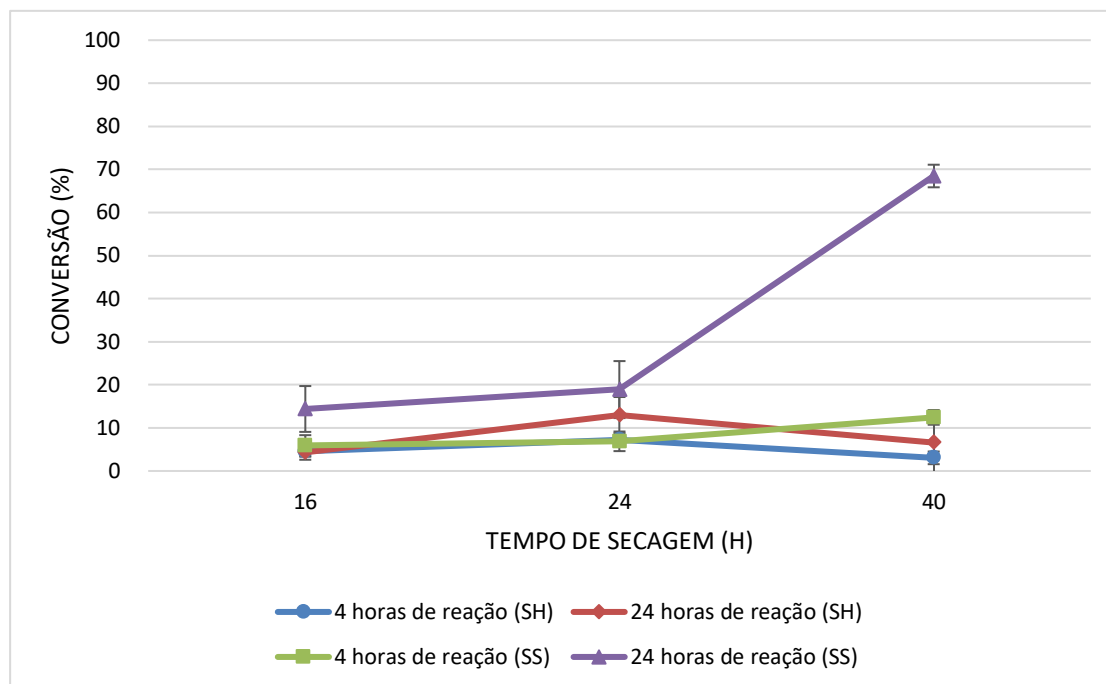
A seguir são mostrados os resultados de umidade após o processo de secagem por aeração forçada (Figura 15), no qual as amostras possuíam uma umidade inicial (T=0h) média de cerca de 53,0%(m/m) e pode-se observar que até as 24 horas de secagem, nas duas condições testadas, as amostras de PES possuíam uma umidade média consideravelmente alta, de 34,4%(m/m) na secagem SS e 37,7%(m/m) na condição de secagem SH. Já em 40 horas de secagem as colunas secas SS mostraram uma queda na umidade, chegando a 9,8%(m/m), enquanto que com as colunas secas SH não apresentou uma redução satisfatória na umidade, chegando a 35,1%(m/m).



**Figura 15:** Cinética de secagem por aeração forçada do PES produzido em torta de algodão fermentado por 24 horas a 30°C comparando resultados de umidade final na secagem com a coluna de secagem do ar do compressor com sílica hidratada (cinza escuro) e com sílica seca(cinza claro), ambos com a pressão de 0.15 L/min.

Com a finalidade de acompanhar a capacidade de esterificação durante a cinética de secagem e a influência da água no preparado enzimático, foram realizadas reações de esterificação em leito agitado (Figura 16), seguindo a metodologia de

análise quantitativa (3.5). Pode-se observar que as colunas secas por até 24 horas em ambas as condições propostas possuíram uma conversão média de ácidos graxos livres abaixo de 20% mesmo após 24 horas de reação de esterificação, sendo a maior conversão observada de 18,9% nas amostras de preparado enzimático seco por 24 horas em SS.



**Figura 16:** Comparação da capacidade de esterificação do PES produzido em torta de algodão fermentado por 24 horas a 30°C durante a cinética de secagem por aeração forçada através da reação de esterificação em leito agitado em 4 e em 24 horas de reação.

Entre amostras de PES secas por 40 horas, em 24 horas de reação de esterificação, o preparado enzimático SS possui uma conversão média máxima de 68,5%, enquanto o preparado enzimático SH apresentou uma conversão média máxima de apenas 6,6%, sendo este resultado inferior até mesmo a conversão de ácido oleico em 4 horas de reação quando utilizado o PES SS, que apresentou uma conversão de 12,4%.

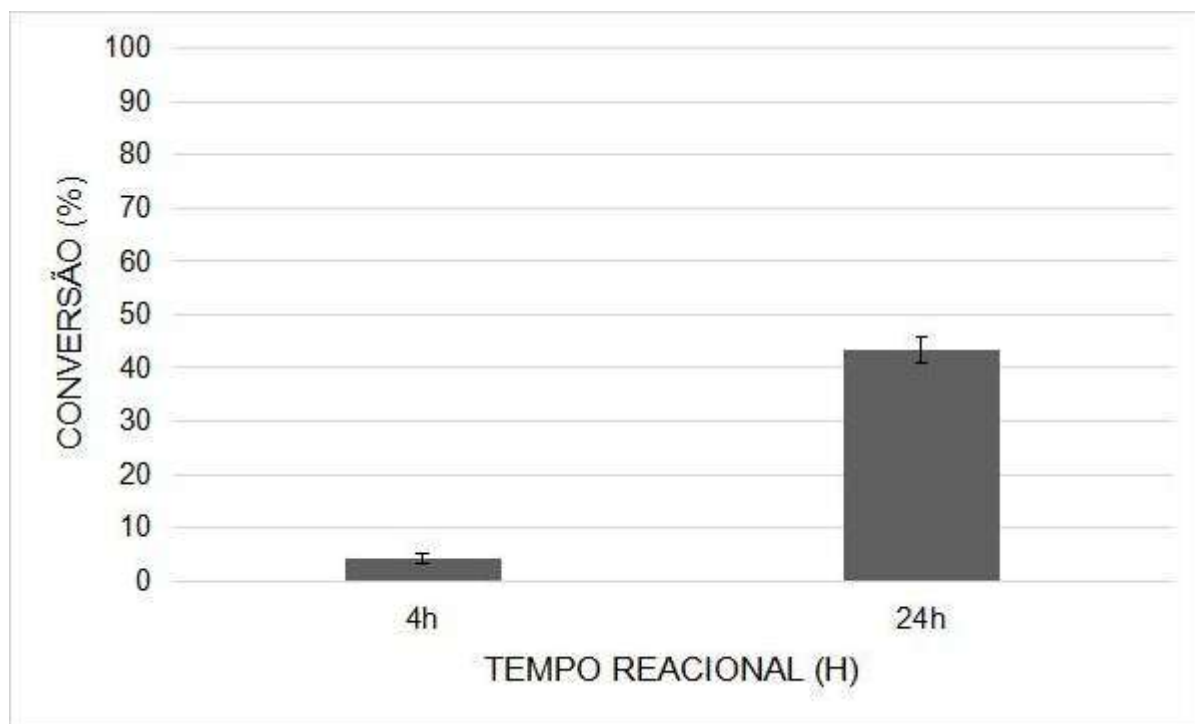
Tal comportamento observado na figura 16 é explicado pela presença de água em excesso no sistema, o que favorece o fechamento da conformação enzimática, reduzindo a sua capacidade catalítica relacionada a reações de esterificação e transesterificação e, desse modo, deslocando o equilíbrio químico para o favorecimento da reação de hidrólise e não de esterificação. (FREIRE & CASTILHO, p. 369-385; BORNSCHEUER, 2018; FAN et

al.,2012).

Os resultados obtidos demonstram a possibilidade de redução do tempo de secagem do PES mantendo bons resultados nas reações de esterificação em que o biocatalisador for submetido. Além disso, o uso da secagem realizada por meio da aeração forçada se mostra vantajoso em relação a secagem por liofilização por demandar de um gasto energético menor na aplicação da técnica em escala industrial e, como foi visto, é possível obter resultados semelhantes de produtividade nos dois métodos de secagem explorados neste trabalho, o que viabiliza o uso da secagem forçada como método a ser empregado.

#### **4.2 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM LEITO FIXO**

Para a reação de esterificação realizada em leito fixo foi utilizada a vazão média entre as duplicatas de 10 mL/min obtendo, desse modo, um tempo de retenção médio da mistura ao PES contido na coluna de 1,38 minutos, possuindo ao fim de 4 horas de reação uma conversão média de ácidos graxos livres de 4,2% e em 24 horas de reação a conversão média de 43,2% (Figura 17). Pode-se observar que a reação conduzida em leito fixo apresentou uma conversão inferior à reação conduzida em leito agitado, mostrando a necessidade de otimização nos parâmetros reacionais testados.



**Figura 17:** Reação de esterificação conduzida a 40°C de ácido oleico e etanol (1:1) com PES produzido em torta de algodão em 24 horas de fermentação a 30°C. Conversão de ácidos graxos livres em 4 e 24 horas de reação sob a vazão de 10 mL/min.

HAMA et al. (2007), durante ensaios de vazão na reação de metanólise realizada em leito fixo utilizando a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizado em biomassa, demonstrou que o aumento da vazão no sistema durante o primeiro ciclo proporcionou um aumento na produtividade da reação. Entretanto, ensaios conduzidos no LaBIM mostraram que, para colunas de dimensões maiores que as utilizadas nesse projeto a vazão ideal é de 12 ml/min, além de ser observado também que vazões muito altas ou muito baixas podem acabar afetando negativamente as conversões, já que a vazão muito baixa não permite a circulação adequada dos reagentes enquanto uma vazão muito alta pode danificar o biocatalisador, além de não haver um tempo de retenção suficiente dos reagentes no PES, não favorecendo a conversão dos ácidos graxos livres. Além disso, FENG et al (2011) e SU et al. (2007) demonstram em seus trabalhos que a produção de biodiesel através da biocatálise é aumentada quando a porção de álcool no sistema está em excesso, em ambos os casos foi utilizado o metanol, já que a maior quantidade desse reagente favorece o deslocamento do equilíbrio químico para a formação de ester.

Sendo assim, é possível supor que além de serem necessários ajustes

relacionados à vazão do sistema, é importante adequar a proporção de etanol utilizado para a reação de esterificação em leito fixo para que sejam obtidas taxas de conversão satisfatórias.

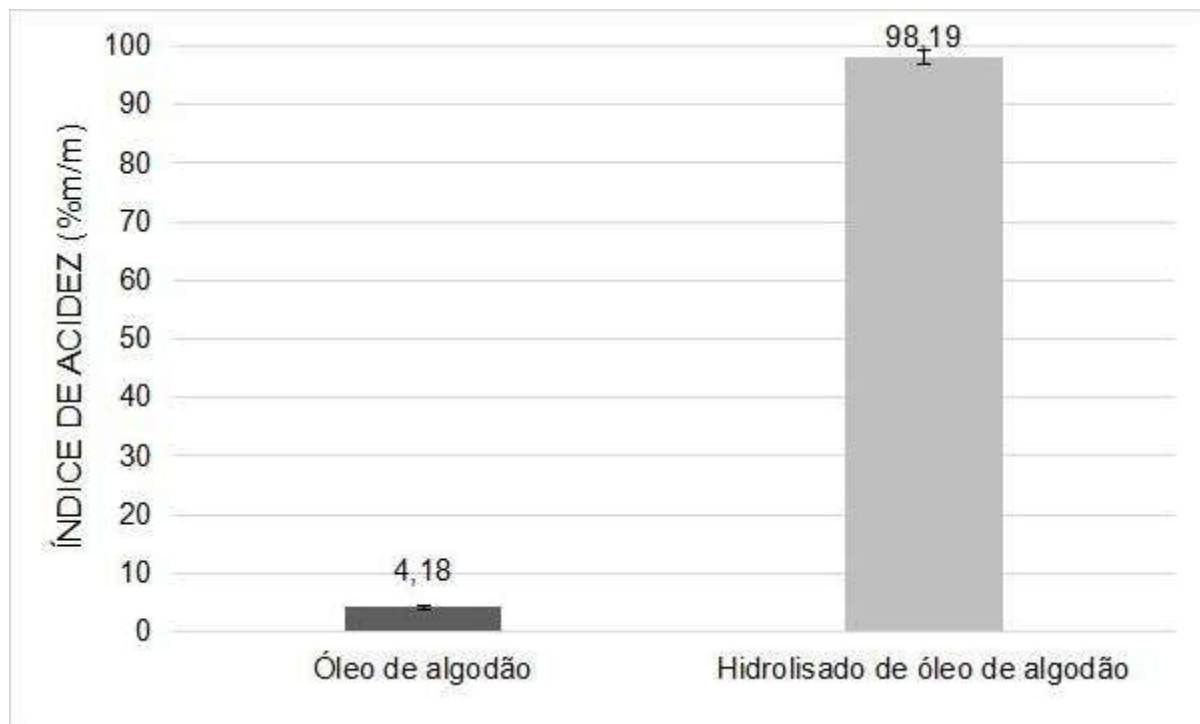
#### 4.4.1 REAÇÃO COM HIDROLISADO DE ÓLEO DE ALGODÃO

Para a reação de hidrólise, foi utilizado o óleo comercial de algodão que segundo GONDIM-TOMAZ et al. (2016) em sua avaliação da composição de ácidos graxos do óleo de algodão proveniente de 3 diferentes localidades do Brasil, foi observado que o ácido graxo presente em maior concentração no produto é o ácido linoleico, seguido pelo ácido palmítico, ácido oleico e esteárico (Tabela 2).

**Tabela 2:** Composição de ácidos graxos no óleo de algodão comercial produzido no Brasil. Fonte: GONDIM-TOMAZ et al. (2016)

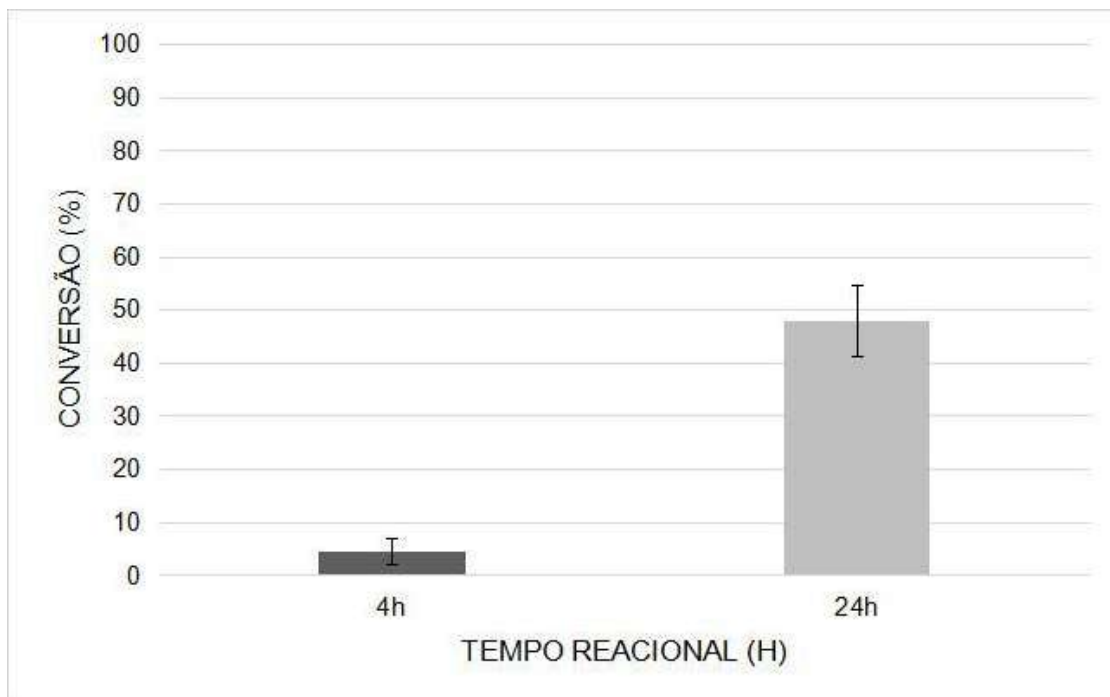
Ácido graxo	% (m/m)
Ácido linoleico	55,6 - 59
Ácido palmítico	22,7 - 24,8
Ácido oleico	13,4 - 15,8
Ácido esteárico	1,83 - 2,14

A fim de comparar a quantidade de ácidos graxos livres presentes no óleo de algodão e no óleo de algodão hidrolisado, foi feita a titulação volumétrica de ambos e realizado os cálculos de acidez (%m/m) das amostras (Figura 18). Foi observado que o óleo de algodão comercial possuía apenas 4,18% de sua composição de ácidos graxos livres, enquanto o óleo hidrolisado continha 98,19% de ácidos graxos livres em sua composição.



**Figura 18:** Reação de hidrólise do óleo de algodão realizada pela enzima comercial 34MDP a 40°C durante 4 horas. Pode ser observado o índice de acidez (%m/m) do óleo de algodão antes e após a reação de hidrólise.

Para a reação de esterificação utilizando o hidrolisado de óleo de algodão como substrato, foram utilizadas as mesmas condições de reação e proporção molar do que na reação de esterificação com os reagentes padrão ácido oleico e etanol absoluto, sendo utilizado como base para o cálculo a massa molar do ácido linoleico, já que se encontra em maior concentração no óleo de algodão (GONDIM-TOMAZ et al., 2016). Foi observado que a atividade enzimática da reação de esterificação do hidrolisado de óleo de algodão em leito fixo (Figura 19) foi semelhante aos resultados obtidos na reação realizada com ácido oleico (Figura 17), de modo que em 4 horas de reação houve a conversão de 4,5% dos ácidos graxos livres e em 24 horas a conversão de 48% dos ácidos graxos livres contidos no óleo de algodão hidrolisado. No entanto, o emprego do óleo e torta de algodão torna o processo mais interessante por serem ambos da mesma biomassa inicial.



**Gráfico 19:** Reação de esterificação conduzida a 40°C de hidrolisado de óleo de algodão e etanol (1:1) com PES produzido em torta de algodão, fermentado por 24 horas a 30°C, sendo observada a conversão de ácidos graxos livres em 4 e 24 horas de reação sob a vazão de 11 mL/min.

Assim como nos resultados observados anteriormente para a reação de esterificação em leito fixo com os reagentes padrão ácido oleico e etanol, a baixa conversão pode ser justificada pela necessidade de ajustes nos parâmetros reacionais utilizados. ROYON et al. (2007) descreve que, para a reação de metanólise do óleo de algodão em leito fixo utilizando a enzima comercial Novozyme 435 imobilizado em um suporte, foi obtida 95% de conversão dos ácidos graxos livres utilizando a proporção molar de 6:1 de álcool para o óleo em uma vazão de 9,6 mL/h. Desse modo, pode-se supor que há a necessidade de adequação dos parâmetros reacionais de proporção molar e vazão para que sejam obtidas altas conversão dos ácidos graxos livres presentes no hidrolisado de óleo de algodão.



## 5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a fermentação em estado sólido pode ocorrer através da inoculação de uma suspensão de esporos de *Rhizopus oryzae* que foi propagado em meio PDA com a suplementação de 1%(v/v) de óleo vegetal ou 1%(v/v) de ácido oleico sem que haja alteração significativa de rendimento na produção de lipases durante a FES, apesar de apresentar aumento na concentração de esporos obtidos no pré-inóculo.

Em relação à cinética de fermentação, foi demonstrado que, de modo geral, o PES produzido a partir da fermentação em estado sólido do microrganismo *Rhizopus oryzae* com a utilização da torta de algodão como substrato apresentou uma produção enzimática maior que o PES produzido utilizando como substrato a mistura de torta e fibra de dendê (80:20), de modo que o PES produzido com a torta de algodão apresentou sua conversão máxima de ácidos graxos livres de 74% para o produto enzimático gerado em 24 horas de fermentação enquanto o PES produzido com a mistura de torta e fibra de dendê apresentou uma conversão máxima de ácidos graxos de 65,7%.

Para os resultados comparativos pode-se concluir que, em relação ao tipo de biorreator utilizado para a realização da FES de *Rhizopus oryzae* em torta de algodão, o uso do leito fixo quando comparado com o reator do tipo bandeja se mostrou mais vantajoso, já que o PES produzido em leito fixo apresentou maior capacidade de esterificação nos dois tempos de fermentação propostos. Tais resultados reforçam a importância da escolha de um biorreator que seja eficiente na transferência de massa e calor pelo sistema durante o processo fermentativo.

Foi visto que na etapa de secagem do PES obtido após a fermentação, há a necessidade de realizar a troca periódica da sílica presente no filtro de secagem do compressor de ar, para melhorar a taxa de conversão de ácidos graxos livres. Tais resultados obtidos nos métodos comparativos foram essenciais para o entendimento da importância do controle dos parâmetros reacionais para a obtenção de resultados satisfatórios.

Em relação às reações de esterificação conduzidas em leito fixo, tanto utilizando o ácido oleico quanto utilizando o hidrolisado de óleo de algodão, foi possível concluir que ambas obtiveram conversão inferiores aos ensaios realizados utilizando biorreatores de leito agitado, ainda que fossem utilizadas as mesmas condições de proporção molar, concentração de PES e temperatura, podendo supor que o tipo de biorreator utilizado influencia na produtividade da reação. Desse modo, faz-se necessária a aprimoração dos parâmetros reacionais utilizados em leito fixo, como a adequação da razão molar dos reagentes e a vazão de bombeamento da mistura pelo sistema.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52–67. 2015.

ASHLEY, V. M.; MITCHELL, D. A.; HOWEA, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, n. 2, p. 141–150. 1999.

ÁVILA, S. N. S.; GUTARRA, M. L. E.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; CAVALCANTI, E. D. C.; FREIRE, D. M. G. Multipurpose fixed-bed bioreactor to simplify lipase production by solid-state fermentation and application in biocatalysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, p. 1-7. 2018.

BEN SALAH, A.; SAYARI, A.; VERGER, R.; GARGOURI, Y. Kinetic studies of *Rhizopus oryzae* lipase using monomolecular film technique. **Biochimie**, v. 83, n. 6, p.463–469. 2001.

BON, E. P. S.; JR, N. P.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506p.

BORNSCHEUER, U. T. Enzymes in Lipid Modification. **Annual Review of FoodScience and Technology**, v. 9, n. 1, p. 85–103. 2018.

CAVALCANTI, E. D'AVILA C.; GUTARRA, M. L. E., FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L.R., & SANT'ANNA JÚNIOR, G. L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. especial, p. 79–84. 2005.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D., SILVA, P. R., ROSA, T. S., MOURA, N. M. L., SANTOS, B. C. P., CARVALHO, D. B., ... FREIRE, D. M. G. Methods to prevent acidification of Macaúba ( *Acrocomia aculeata* ) fruit pulp oil: A promising oil for producing biodiesel. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 703 - 707. 2015.

CANET A.; BENAIGES, M. D.; VALERO, F.; ADLERCREUTZ, P. Exploring substrate specificities of a recombinant *Rhizopus oryzae* lipase in biodiesel synthesis. **New Biotechnology**, v. 39, p. 59–67. 2017.

FAN, X.; NIEHUS, X.; & SANDOVAL, G. Lipases as Biocatalyst for Biodiesel Production. **Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 861, n. 27, p. 471–483. 2012.

FENG, Y.; ZHANG, A.; LI, J.; HE, B. A continuous process for biodiesel production in a fixed bed reactor packed with cation-exchange resin as heterogeneous catalyst. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3607–3609. 2011.

FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L. R. (2008) Lipases em Biocatálise In: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. 1ª Ed, Rio de Janeiro: Editora Interciência, vol.1, p. 369-385.

GANDRA, K. M.; DEL BIANCHI, M.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicérido em pão de forma enriquecido com fibras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 182–192. 2008.

GONDIM-TOMAZ, R. M. A.; ERISMANN, N. M.; CIA, E.; KONDO, J. I.; FUZATTO, M. G.; CA, C. R. L. Oil content and fatty acid composition of cottonseeds from different genotypes. **Braz. J. Food Technol.**, v. 19, e2015071, 2016

GOWTHAMAN, M. K.; KRISHNA, C.; & MOO-YOUNG, M. Fungal solid state fermentation — an overview. **Applied Mycology and Biotechnology: Agriculture and Food Production**, v. 1, p. 305–352. 2001.

GRECO-DUARTE, J., COLLAÇO, A. C. A., COSTA, A. M. M., SILVA, L. O., DA SILVA, J. A. C., TORRES, A. G., ... Freire, D. M. G. Understanding the degree of estolide enzymatic polymerization and the effects on its lubricant properties. **Fuel**, v. 245, p. 286–293. 2019.

GUTARRA, M. L.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D.

M.; E CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource technology**, v. 100, n.21, p. 5249-5254. 2009.

HAMA, S. et al. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipaseproducing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 3, p. 273–278. 2007.

HELAL, S. E.; ABDELHADY, H. M.; ABOU-TALEB, K. A., HASSAN, M. G.; AMER, M. M . Lipase from *Rhizopus oryzae* R1: in-depth characterization, immobilization, and evaluation in biodiesel production. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n.1, Jan. 2021. DOI:10.1186/s43141-020-00094-y. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/348253155\\_Lipase\\_from\\_Rhizopus\\_oryzae\\_R1\\_indepth\\_characterization\\_immobilization\\_and\\_evaluation\\_in\\_biodiesel\\_production](https://www.researchgate.net/publication/348253155_Lipase_from_Rhizopus_oryzae_R1_indepth_characterization_immobilization_and_evaluation_in_biodiesel_production). Acesso em: 10 mai. 2023.

KOBLITZ, M.G.B.; PASTORE, G.M. Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase produced by a new strain of *Rhizopus* sp. **Ciênc. Agrotec.**, v. 30, n. 3, p. 494-502. 2006.

KRISHNA, C. *Solid-State Fermentation Systems—An Overview*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1–30. 2005.

LOPES D.C.; NETO A.J.S.; MENDES A.A.; PEREIRA D.T.V. Economic feasibility of biodiesel production from Macauba in Brazil. **Energy Economics**, v. 40, P. 819– 824.2013.

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

MATHEW, G. M. et al. Recent advances in biodiesel production: Challenges and solutions. **Science of The Total Environment**, v. 794, n. 148751. Jun. 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.148751. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969721038237>. Acesso em 15 mai 2023.

- MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi — Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 2, p. 177–185. 2008.
- OJEDA-HERNÁNDEZ, D. D.; COSÍO-CUADROS, R.; SANDOVAL, G.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J. A.; MATEOS-DÍAZ, J. C. Solid-State Fermentation as an Economic Production Method of Lipases. **Methods in Molecular Biology**, v.1835, n. 12, p. 217–228. 2018.
- PANDLEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81–84. 2003.
- 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, n. 5, p. 511–525. 2015.
- RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ; C. M., CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 261–268. 2009.
- ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 23, p. 197–203. 2003.
- ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; Locatelli, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 648–653. 2007.
- Santos, D.; Sarrouh, B.; Santos, J.; Perez, V.; da Silva, S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. **janus**, lorena, ano 3, nº 4, 2º semestre de 2006.
- SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*, **Process Biochemistry**, v. 39, p. 239-247, 2003.
- SOUSA, J. S.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D'AVILA; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.65, n. 1-4, p. 133–137. 2010.

SU, C. H.; FU, C. C.; GOMES, J.; CHU, I. M.; WU, W. T. A heterogeneous acidcatalyzed process for biodiesel production from enzyme hydrolyzed fatty acids. **AIChE Journal**, v. 54, n. 1, p. 327–336. 2007.

VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production—current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35. n. 5, p.421-430. 2008.

YAFETTO, L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. **Heliyon**. v. 8, n. 3 : e09173. Mar. 2022. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e09173. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8971590/>. Acesso em: 14 mai. 2023.

YU, X. W.; SHA, C.; GUO, Y. L.; XIAO, R.; XU, Y. High-level expression and characterization of a chimeric lipase from *Rhizopus oryzae* for biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, **Int J Mol Sci.**, v. 19, n. 11 : 3372. Out. 2018. DOI: 10.3390/ijms19113372. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6274836/>. Acesso em: 14 mai 2023.