



UFRJ

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ/UFRJ**

Daniele Saluti Nunes de Barros



instituto de química
Universidade Federal do Rio de Janeiro

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO LIPASES PRODUZIDAS
POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM FARELO DE
ALGODÃO COMO CATALISADORES**

Rio de Janeiro

2018

FOLHA DE ROSTO

Daniele Saluti Nunes de Barros

PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO LIPASES PRODUZIDAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM FARELO DE ALGODÃO COMO CATALISADORES

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de bacharel em
química com atribuições tecnológicas.

Orientadoras: Erika Cristina Gonçalves Aguiaras e Denise Maria Guimarães Freire

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para chegar até aqui.

À minha família, em especial à minha mãe por todo o apoio e amor incondicional, mesmo que ela também tenha passado por momentos muito difíceis durante a minha graduação, e por ter sempre sido meu maior exemplo de ser humano e mulher forte; ao meu irmão, que foi provavelmente a pessoa mais compreensiva e encorajadora que esteve ao meu lado, e à minha cunhada Juliana por fazer dele uma pessoa mais feliz.

À Carol e tia Evelise, assim como Denise, Bruno e Rafa, por terem me acolhido e sido minha segunda família nos últimos anos.

Às minhas orientadoras, Erika e Denise, pela orientação competente, carinhosa e paciente e por terem me motivado à pesquisa. E aos colegas e amigos do LaBim por estarem sempre prontos para ajudar.

Aos meus amigos de Brasília, em especial à Marcella e Izabela que estiveram presentes em todos os momentos importante da minha vida desde sempre. E também aos amigos do IQ, Coral do CT, Coral Prisma e Teatro. Vocês são maravilhosos!

Aos meus professores da UFRJ e da Escola SESC de Ensino Médio, que fizeram despertar em mim a vontade de estudar e fazer ciência. Agradecimento especial aqui à Bete Rovari: professora, orientadora, amiga e mãe.

À Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível (ANP), à Fundação COPPETC e ao Programa Químico do Petróleo (PRH 01) pela bolsa concedida e fomento da pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

EPÍGRAFE

Na vida nada deve ser temido, apenas compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.

Marie Curie

RESUMO

DE BARROS, Daniele Saluti Nunes. **Produção de Biodiesel utilizando lipases produzidas por fermentação em estado sólido em farelo de algodão como catalisadores.** Rio de Janeiro, 2018. Monografia (Graduação em Química com atribuições tecnológicas) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O biodiesel é um combustível renovável e menos poluente que pode ser utilizado como substituto ou aditivo ao diesel de petróleo. No entanto, não é economicamente competitivo com o combustível fóssil. A principal rota usada industrialmente para a produção de biodiesel, a transesterificação com catálise homogênea básica, possui desvantagens como a necessidade de matérias-primas de baixa acidez e alto custo, necessidade de várias etapas de lavagem para purificação do produto e a formação de resíduos básicos. A utilização de lipases como catalisadores representa uma alternativa às desvantagens encontradas na catálise alcalina. Entre as principais vantagens da catálise enzimática estão sua seletividade, especificidade, pureza dos produtos obtidos e a possibilidade de recuperação e reutilização, quando enzimas imobilizadas são empregadas. Porém, seu alto custo e baixas taxas de reação dificultam sua implementação industrial. Desta forma, a produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES), que utiliza coprodutos agrícolas como suporte e fonte de nutrientes para micro-organismos, representa uma forma de diminuir os custos de catalisadores enzimáticos. O objetivo deste trabalho foi produzir lipases por FES em farelo de algodão e utilizar o preparado enzimático sólido (PES) obtido como catalisador direto em reações de esterificação e transesterificação de óleos ácidos para produção de ésteres metílicos ou etílicos. Conversões superiores a 80% foram obtidas em reações de esterificação de ácido oleico com etanol após 4 h de reação. Em reações de transesterificação (etanólise) utilizando óleo ácido de macaúba, teores de ésteres superiores a 80% foram obtidos em 96 h de reação utilizando etanol hidratado (95%). E teores próximos a 80% utilizando tanto etanol anidro quanto metanol. Foi possível reutilizar o PES em até quatro reações consecutivas em reações de esterificação antes de ser observada perda de atividade do catalisador.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	BIODIESEL	10
2.2	MATÉRIAS-PRIMAS	11
2.3	REAÇÕES DE SÍNTESE DE BIODIESEL	14
2.3.1	Esterificação	14
2.3.2	Transesterificação	14
2.4	ROTAS CATALÍTICAS	15
2.4.1	Catálise Química Homogênea	15
2.4.1.1	Catálise Química Homogênea Básica	15
2.4.1.2	Catálise Química Homogênea Ácida	16
2.4.2	Catálise Química Heterogênea	16
2.4.3	Catálise Enzimática - Lipases	17
2.5	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	20
2.6	ALGODÃO	21
3	OBJETIVOS	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	FARELO DE ALGODÃO	26
4.2	ÓLEO ÁCIDO DE MACAÚBA	26
4.3	BIOCATALISADOR	26
4.3.1	Produção do biocatalisador	26
4.3.2	Cinética de Fermentação de farelo de algodão	27
4.4	REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO COM PES DE ALGODÃO	27
4.4.1	Reações preliminares de esterificação do ácido oleico	27
4.4.2	Reações com etanol	28
4.4.2.1	Influência da razão molar etanol:ácido oleico	28
4.4.2.2	Comparação entre PES triturado e não triturado	28
4.4.2.3	Influência da adição escalonada de etanol	28
4.4.2.4	Batelada alimentada de PES	28
4.4.2.5	Reuso de PES sem lavagem	29
4.4.2.6	Reuso de PES lavado com etanol	29
4.4.2.7	Branco de reação	29
4.4.3	Reações de transesterificação com óleo ácido de macaúba	29
4.4.3.1	Influência do tipo de álcool (metanol e etanol)	29
4.5	MÉTODOS ANALÍTICOS	30
4.5.1	Determinação de acidez	30
4.5.2	Determinação de conversão de ácido oleico – titulometria	30
4.5.3	Atividade hidrolítica – método espectrofotométrico	30
4.5.4	Atividade hidrolítica – método titulométrico	31
4.5.5	Determinação de teores de ésteres – cromatografia gasosa	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33

5.1	ÓLEO ÁCIDO DE MACAÚBA	33
5.2	BIOCATALISADOR	33
5.2.1	Produção do biocatalisador	33
5.2.2	Cinética de fermentação de farelo de algodão	34
5.3	REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO COM PES DE ALGODÃO	37
5.3.1	Reações com etanol	37
5.3.1.1	Influência da razão molar etanol:ácido oleico	37
5.3.1.2	Comparação entre PES triturado e não triturado	39
5.3.1.3	Influência da adição escalonada de etanol	41
5.3.1.4	Batelada alimentada de PES	42
5.3.1.5	Reuso de PES sem lavagem	44
5.3.1.6	Reuso de PES lavado com etanol	45
5.3.1.7	Branco de reação	46
5.3.2	Reações com metanol	47
5.3.2.1	Reações preliminares de esterificação de ácido oleico	47
5.3.2.2	Influência da adição escalonada de metanol	48
5.3.3	Reações de esterificação com óleo ácido de macaúba	50
6	CONCLUSÕES	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

Os esforços para diversificar a matriz energética tem estimulado vários países a investir em combustíveis renováveis como o etanol e o biodiesel como substituto ou complemento a gasolina e ao diesel de petróleo, respectivamente (ALVES et al., 2017). O biodiesel é constituído por uma mistura de ésteres monoalquílicos obtida a partir de óleos vegetais ou gordura animal e é caracterizado por ser um biocombustível atóxico e biodegradável (TAN et al., 2010; ANP, 2014). As propriedades físicas e químicas do biodiesel são similares às do diesel de petróleo, porém possui maiores ponto de fulgor e lubricidade e sua queima resulta em menor emissão de materiais particulados, CO, hidrocarbonetos aromáticos e SO_x (ROBLES-MEDINA et al., 2009; BASKAR; AISWARYA, 2016).

A rota convencional de produção de biodiesel consiste na transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com metanol ou etanol por catálise homogênea básica (NaOH ou KOH), com geração de glicerol como subproduto (JEGANNATHAN et al., 2011). Esse processo, entretanto, apresenta algumas desvantagens tais como: dificuldades de recuperação do glicerol, necessidade de tratamento dos efluentes alcalinos gerados e grande quantidade de água requerida nas etapas de purificação do produto. Além disso, os óleos vegetais utilizados devem conter baixos teores de ácidos graxos livres (< 0,5%), para evitar a formação de sabões de difícil separação. Desta forma, o custo associado aos óleos refinados utilizados no processo é relativamente alto, respondendo pela maior parte do preço final do biodiesel, o que dificulta sua competitividade no mercado frente ao diesel fóssil (TALUKDER et al., 2009; ROBLES-MEDINA et al., 2009; GULDHE et al., 2015).

Como alternativa aos problemas relacionados ao processo convencional de produção de biodiesel, lipases podem ser utilizadas, em substituição aos catalisadores usuais. As principais vantagens da utilização desses biocatalisadores na produção de biodiesel são: a alta seletividade das lipases, o que resulta em menor geração de produtos secundários, a geração de glicerol com alta pureza e a facilidade de recuperação do biodiesel, do glicerol e do biocatalisador quando lipases imobilizadas são empregadas. Adicionalmente,

como essas enzimas são capazes de catalisar tanto reações de transesterificação como de esterificação, elas são ideais para a conversão de óleos parcialmente hidrolisados (de baixo valor de mercado) em biodiesel (RANGANATHAN et al., 2008; ROBLES-MEDINA et al., 2009), o que contribui para a redução dos custos e diversificação de matérias-primas que podem ser empregadas na síntese de biodiesel (ULIANA et al., 2017).

Entretanto, alguns desafios à implementação de enzimas na produção desse biocombustível devem ser superados para que essa rota possa competir economicamente frente à rota convencional. Dentre eles destacam-se: a obtenção de lipases a partir da utilização de substratos derivados de matérias-primas de baixo custo e a escolha de metodologias de imobilização que melhorem a estabilidade da enzima e permitam a sua reutilização (TAN et al., 2010). Neste contexto, a utilização da fermentação em estado sólido (FES) para obtenção de lipases microbianas merece destaque, pois possibilita a utilização de co-produtos agroindustriais para o crescimento dos micro-organismos produtores de lipases. Desta forma, resíduos como farelos, tortas, cascas, bagaço e sementes de frutas podem ser utilizados como matérias-primas potenciais, uma vez que atuam como excelentes suportes e oferecem nutrientes como carbono e nitrogênio para o crescimento do micro-organismo, além de serem de grande abundância no Brasil (GUTARRA et al., 2009; RAMACHANDRAM, 2007). A utilização desses co-produtos como meios de cultivo para o crescimento de micro-organismos também possibilita agregar valor a esses resíduos, a partir da produção de enzimas comercialmente importantes. Ademais a utilização do preparado enzimático sólido (PES) obtido após a FES como biocatalisador direto nas reações reduz os custos com extração, purificação e imobilização enzimática.

Entre os co-produtos que podem ser utilizados para produção de lipases por fermentação em estado sólido este trabalho destaca o farelo de algodão, co-produto da indústria algodoeira e de biodiesel, tendo em vista que o óleo de algodão é uma das matérias-primas utilizadas para a produção deste biocombustível. No Brasil, sua utilização vem crescendo desde junho 2018, principalmente na região nordeste, na qual atualmente o óleo de algodão representa aproximadamente 11% da matéria-prima utilizada para produção de biodiesel (ANP, 2018).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIODIESEL

Biodiesel, segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), é definido como um combustível produzido por reação de esterificação e/ou transesterificação a partir de óleo vegetal ou gordura animal, composto por alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, que atendam à especificação contida no Regulamento Técnico nº3/2014 (ANP, 2014).

O diesel de petróleo é o principal combustível utilizado no setor de transporte no mundo (LI et al., 2013). No entanto, por ser um combustível fóssil, suas emissões estão associadas a problemas ambientais, como o efeito estufa. O biodiesel, por outro lado, é renovável, biodegradável e não tóxico. É essencialmente livre de enxofre, de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e metais. Sua queima libera três vezes menos gases de efeito estufa e 85% menos compostos carcinogênicos que o diesel de petróleo, apesar de sua emissão de NOx ser superior. Propriedades do biodiesel como número de cetano, viscosidade, mudança de fase e capacidade energética são similares às do diesel fóssil, podendo assim ser utilizado nos mesmos motores do ciclo Diesel (CHRISTOPHER et al., 2014). Além disso, é seguro para armazenamento e transporte, por ter alto ponto de fulgor, e possui maior lubrificidade (GULDHE et al., 2015; BARKAR; AISWARYA, 2016). Também possui um excelente balanço energético: contém 3,2 vezes a quantidade de energia necessária para produzi-lo (CHRISTOPHER et al., 2014).

Industrialmente, o biodiesel é produzido a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com metanol ou etanol por catálise homogênea básica (NaOH ou KOH), com geração de glicerol como subproduto (JEGANNATHAN et al., 2011). Pelo fato do preço do biodiesel depender principalmente do valor de sua matéria-prima, que é relativamente alto, como o óleo de soja refinado que custa em média R\$ 3000/ton (BIOMERCADO, 2018), este biocombustível não é economicamente competitivo com o diesel de petróleo (CHRISTOPHER et al., 2014; SOARES et al., 2013; REHAN et al., 2018).

Em diversos países os esforços para conciliar desenvolvimento econômico e questões ambientais, a chamada “economia verde”, vem crescendo nas últimas décadas. Estes esforços incluem a produção e uso de energias renováveis, com principal objetivo de reduzir a utilização de combustíveis fósseis e, conseqüentemente, a diminuição na produção de gases do efeito estufa (ALVES et al., 2017). Tendo isso em vista, países como Estados Unidos, Brasil, Japão, Malásia, Índia, Alemanha, França e Itália implementaram misturas de biodiesel ao diesel de petróleo para abastecimento veicular (GULDHE et al., 2015). No Brasil, foi criado pelo governo federal em 2004 o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), com o objetivo de incluir o biodiesel na matriz energética brasileira. As principais diretrizes do programa são: implementar um programa sustentável, promovendo inclusão social; garantir preços competitivos, qualidade e fornecimento; e produzir biodiesel a partir de várias oleaginosas, fortalecendo potenciais regionais de produção de matéria-prima. Para favorecer a agricultura familiar e a diversificação de matéria-prima o Programa garante incentivo fiscal e subsídios aos produtores. Em 2014 existiam 73479 famílias envolvidas em produção de biomassa para biodiesel (ANP, 2015; ALVES et al., 2017). A partir de janeiro de 2008, tornou-se obrigatório o acréscimo de 2% de biodiesel no diesel de petróleo comercializado em todo o território nacional. Este percentual vem sendo aumentado gradativamente, permitindo a adaptação do mercado brasileiro (ANP, 2016). Atualmente o percentual utilizado é de 10% (ANP, 2018). Em 2015, o Brasil foi o segundo maior produtor de biodiesel no mundo com 3,94 bilhões de litros produzidos, atrás apenas dos EUA, com 4,80 bilhões de litros; e economizou 5,3 bilhões de dólares em importação de óleo diesel (ALVES et al., 2017). A produção atual de biodiesel em território nacional é de, aproximadamente, 480 mil m³/ mês (ANP, 2018).

2.2. MATÉRIAS-PRIMAS

O biodiesel pode ser produzido a partir de óleos vegetais ou gordura animal, constituídos de triacilgliceróis. A maior parte dos óleos vegetais é composta pelos seguintes ácidos graxos: palmítico (hexadecanóico), esteárico (octadecanóico), oleico (9(Z)-octadecenóico), linoleico (9(Z),12(Z)-octadecadienóico) e linolênico (9(Z),12(Z),15(Z)-octadecatrienóico). As

concentrações destes ácidos graxos varia entre os óleos, que apresentam propriedades diferentes (KNOTHE; RAZON, 2017). Assim, propriedades como estabilidade oxidativa e entupimento de filtro a frio dependem da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel (GULDHE et al., 2015).

O custo da matéria-prima é uma das principais barreiras para viabilizar economicamente o biodiesel. A maior parte do biodiesel produzido utiliza óleos refinados produzidos a partir de plantas utilizadas na alimentação (humana ou animal), tais como soja, girassol, amendoim e coco (BASKAR; AISWARYA, 2016). Além de serem matérias de alto custo, geram preocupação quanto ao fornecimento de alimentos no futuro. Estima-se que em 2012, 12% dos óleos comestíveis produzidos no mundo tenham sido usados na produção de biodiesel e que o custo de produção do biocombustível a partir destas matérias-primas seja de 1,5 a 3 vezes maior que o do diesel de petróleo (REHAN et al., 2018). Óleos residuais e óleos ácidos que não sejam de interesse nutricional são matérias-primas viáveis (biodiesel de segunda geração) e vem sendo amplamente estudadas, pois são mais baratas e contribuiriam para viabilidade econômica do produto (KNOTHE; RAZON, 2017). Um exemplo é o óleo ácido de macaúba, oleaginosa amplamente produzida no Brasil, principalmente no cerrado e no pantanal. Sua produtividade em óleo varia de 1500 a 5000 kg por hectare (AGUIEIRAS, 2015) e foi apontada pela Embrapa em 2012 como potencial matéria-prima para produção de biodiesel (EMBRAPA, 2012). Entretanto, este tipo de matéria-prima encontra entraves nas rotas utilizadas industrialmente, que necessitam de óleos com baixa acidez e baixo teor de umidade (BASKAR; AISWARYA, 2016).

A escolha da matéria-prima utilizada depende principalmente das condições climáticas e ambientais, características geográficas, viabilidade de solo e práticas agrícolas utilizadas, condições que variam de país para país, além da própria estratégia de mercado (REHAN et al., 2018). No Brasil as principais matérias-primas são óleo de soja, gordura bovina, gordura de porco, óleo de palma e óleo de algodão, entre outros materiais graxos (ANP, 2018). Apesar de o PNPB garantir incentivos fiscais e subsídios para impulsionar a diversificação de matéria-prima, isto teve muito pouco impacto prático. Como mostrado nas Figuras 2.1 e 2.2, a maior parte do biodiesel no Brasil é produzido a partir de

óleo de soja que possui disponibilidade de cadeia produtora e distribuidora ao longo de todo ano no país (ALVES et al., 2017; ANP, 2018).

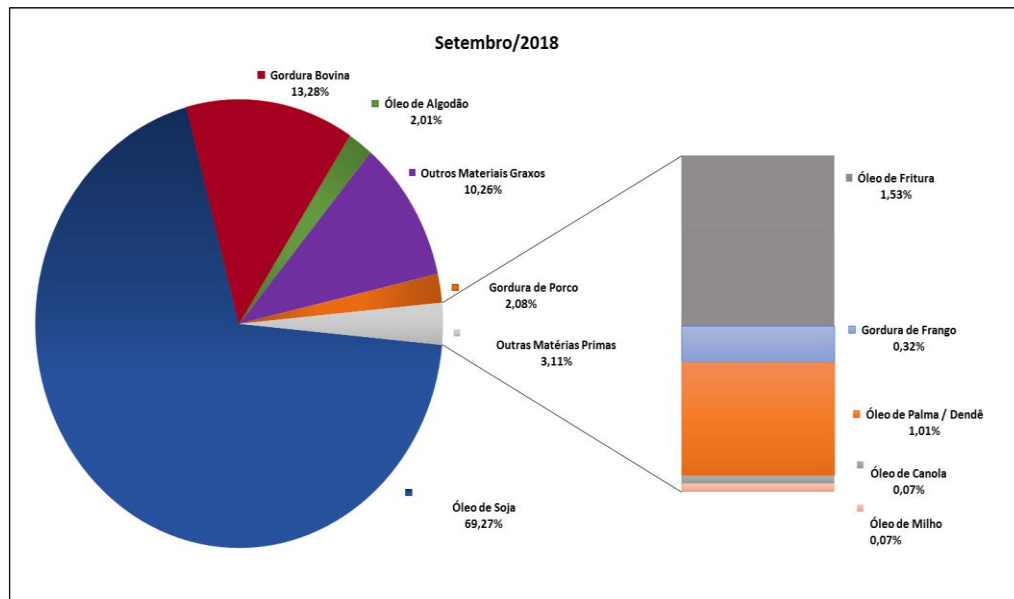


Figura 2.1: Matérias-primas utilizadas no Brasil para produção de biodiesel.
Fonte: ANP, 2018

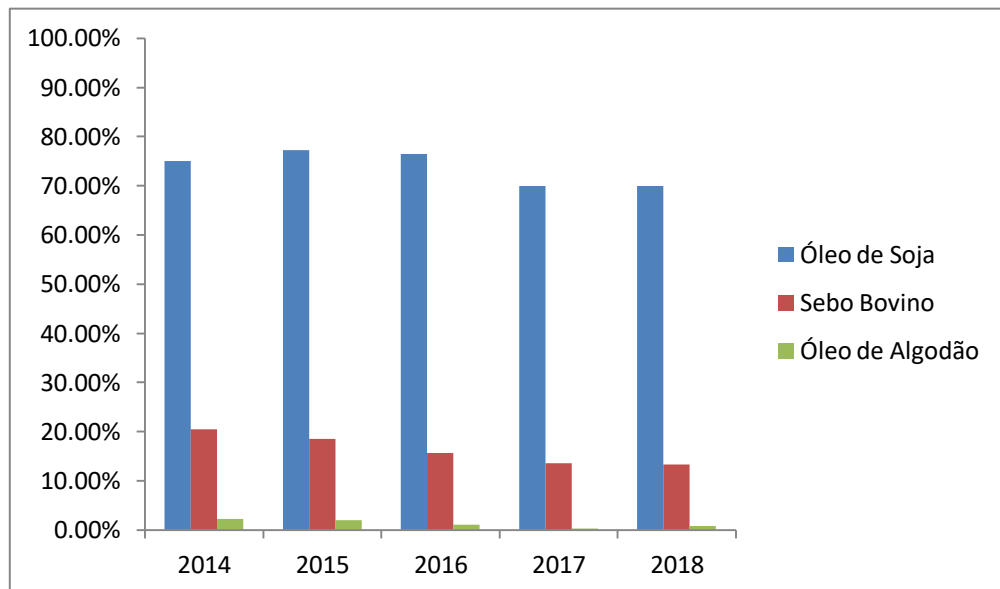


Figura 2.2: Levantamento histórico de utilização das principais matérias-primas utilizadas no Brasil para a produção de biodiesel e óleo de algodão.
Fonte: ANP, 2018.

2.3. REAÇÕES DE SÍNTESE DE BODIESEL

2.3.1. Esterificação

A esterificação é um dos métodos que podem ser utilizados para produção de biodiesel. Nesta reação ocorre a conversão de um ácido graxo em éster a partir da reação desse com um álcool, seguida pela liberação de uma molécula de água, como esquematizado na Figura 2.3. É útil em matérias-primas com alto teor de ácidos graxos. Pode ser conduzida utilizando catálise química ácida, homogênea ou heterogênea, bem como catálise enzimática, que vem sendo reportada há algumas décadas, utilizando lipases de vários micro-organismos (WANG; FANG; ZHANG, 2019; STERGIOU et al., 2013).

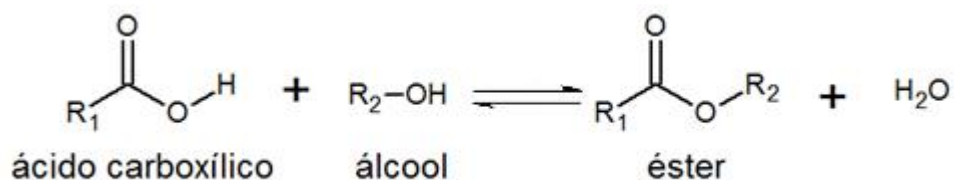


Figura 2.3: Esquema de reação de esterificação

2.3.2. Transesterificação

A transesterificação é o método mais utilizado industrialmente para a produção de biodiesel. Consiste na reação entre triacilglicerol e um álcool de cadeia curta, na presença de um catalisador, produzindo um éster (biodiesel) e glicerol (NASARUDDIN et al., 2014; GULDHE et al., 2015). A reação encontra-se esquematizada na Figura 2.4. O álcool mais utilizado nesta rota é o metanol. Durante o processo de transesterificação de triacilgliceróis, três reações reversíveis ocorrem formando como intermediários digliceróis e monogliceróis. A razão estequiométrica álcool/óleo nesta reação é 3:1, no entanto, excesso de álcool é necessário para deslocar o equilíbrio favorecendo a formação de ésteres (BASKAR; AISWARYA, 2016). A reação pode utilizar catálise química homogênea (ácidos ou bases), heterogênea ou enzimática. Todavia, a catálise homogênea básica é considerada mais rápida. Para utilização deste tipo de catálise para produção de biodiesel, o óleo utilizado deve possuir acidez inferior a 0,5% e o sistema reacional deve ser livre de umidade (KNOTHE; RAZON, 2017).

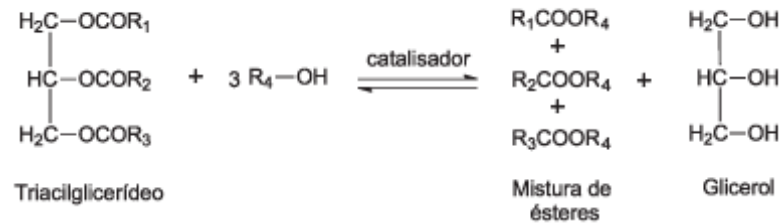


Figura 2.4: Esquema de reação de transesterificação
Fonte: GERIS et al., 2007

2.4. ROTAS CATALÍTICAS

2.4.1. Catálise Química Homogênea

2.4.1.1. Catálise Homogênea Básica

A catálise homogênea básica é mais usada na produção de biodiesel em escala industrial (BASKAR; AISWARYA, 2016), principalmente por ser rápida (estima-se que quatro mil vezes mais rápida que a catálise ácida (BASKAR; AISWARYA, 2016)), pouco corrosiva e bastante eficiente. Hidróxido de Sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH) e seus metóxidos são os catalisadores básicos mais utilizados para produção de biodiesel (ULLAH et al., 2016). A catálise alcalina demanda o uso de matérias-primas com baixa acidez e baixo teor de água, pois os ácidos graxos livres presentes no óleo podem reagir com a base formando sabão (reação de saponificação), que diminui as taxas de conversão e forma emulsões de difícil separação (GULDHE et al., 2015). O alto teor de água pode favorecer a hidrólise do óleo ao invés de sua transesterificação. Além disso, a base utilizada contamina o glicerol formado e sua eliminação demanda lavagens, grandes gastos de água e de energia e geração de resíduos, o que reduz as vantagens do biodiesel sobre combustíveis fósseis, visto que a energia consumida pode ser oriunda de uma fonte não renovável. Ademais, os resíduos produzidos devem ser tratados antes de descartados para evitar a contaminação de corpos de água e o grande consumo de água representa uma desvantagem do ponto de vista ambiental e econômico (SOARES et al., 2013; NASARUDDIN et al., 2014).

2.4.1.2. Catálise Homogênea Ácida

A catálise homogênea ácida é mais adequada para produção do biodiesel utilizando óleos com alto teor de ácidos graxos livres, quando comparada à catálise homogênea básica, pois catalisadores ácidos podem catalisar tanto reações de esterificação quanto de transesterificação. Porém, as reações ocorrem em condições de temperatura e pressão mais altas. A reação catalisada por ácido também é mais lenta, principalmente pelo fato de a reação ter várias etapas de formação de intermediários moleculares (GULDHE et al., 2015; ULLAH, 2016); os ácidos usados são altamente corrosivos aos equipamentos (SOARES et. al., 2013) e grandes quantidades de álcool são necessárias para se obter altos teores de éster. Presença de água no meio reacional também é um problema para uma reação conduzida por catálise ácida, pois provoca a desativação dos catalisadores (BASKAR; AISWARYA, 2016). Entre os ácidos mais utilizados como catalisadores para produção de biodiesel se encontram HCl, BF₃, H₂SO₄, H₃PO₄ e FeSO₄ (ULLAH et al., 2016).

2.4.2. Catálise Química Heterogênea

O uso de um catalisador heterogêneo é interessante, pois ele pode ser utilizado repetidas vezes, sem a necessidade de um catalisador novo a cada batelada, como ocorre na catálise homogênea. Sua separação do meio também é mais simples, além de diminuir a necessidade de lavagem e possibilitar operação contínua (KNOTHE; RAZON, 2017). Esses catalisadores toleram bem reações utilizando óleos ácidos ou com presença de água (BASKAR, AISWARYA, 2016). A maior parte dos catalisadores heterogêneos é sólida e a reação, normalmente, ocorre na superfície dos catalisadores. Apesar de ser interessante para a produção de biodiesel por sua fácil separação e pouca geração de resíduos, a catálise heterogênea possui menor taxa de conversão, quando comparada à catálise homogênea básica e existe também a possibilidade de desativação do catalisador por motivos como envenenamento, entupimento e formação de coque (ULLAH et. al., 2016).

2.4.3. Catálise Enzimática - Lipases

A catálise química apresenta desvantagens como o alto consumo de energia, a exigência com relação à matéria-prima, o processamento *downstream* precisa separar sais inorgânicos e água, utilizados em processos de purificação e lavagem, e geração de resíduos básicos ou ácidos que requerem mais etapas de tratamento, além de causarem corrosão em equipamento e tubulações (GULDHE et al., 2015). Como alternativa catalisadores enzimáticos (lipases) podem ser utilizados.

Lipases (triacilglicerol éster hidrolases - EC 3.1.1.3) são hidrolases que atuam nas ligações carboxílicas dos ésteres presentes em triacilgliceróis, catalisando a formação de ácidos graxos livres e glicerol. Essas enzimas são encontradas em animais, plantas e micro-organismos e tem papel fundamental no metabolismo de óleos e gorduras. Possuem atividade hidrolítica e sintética (quando em condições micro-aquosas), tendo assim utilidade em várias aplicações industriais, incluindo indústria farmacêutica, de produtos de limpeza, alimentícia, química fina e em reações de esterificação e transesterificação. Representam 5% da demanda mundial de enzimas. (GULDHE et al., 2015; CASTILLO et al., 2015).

Lipases podem catalisar tanto reações de esterificação dos ácidos graxos quanto de transesterificação dos triacilgliceróis (SOARES et al., 2013). Ao contrário dos catalisadores básicos, podem ser usadas com matérias-primas com alto teor de ácidos graxos livres, o que possibilita a utilização de óleos ácidos ou residuais (NASARUDDIN et. al., 2014; GULDHE et al., 2015). Estudos afirmam que a utilização deste tipo de matéria-prima reduziria os custos de produção de biodiesel em 60 a 90% (BASKAR; AISWARYA, 2016).

Entre as vantagens da catálise enzimática estão a alta especificidade, alta seletividade, condições reacionais mais brandas, o que acarreta em menor gasto energético; pureza dos produtos obtidos e menores gastos de água, por demandar menos etapas de purificação e lavagem (FERNANDES et al., 2007; GULDHE et al., 2015). Além disso, são biodegradáveis, facilmente recuperáveis (quando utilizadas na forma imobilizada), podendo ser usada em alguns ciclos sem perda de atividade catalítica; não tóxicas e contribuem para a fácil

recuperação do biodiesel e do glicerol (NASARUDDIN et. al., 2014; BASKAR; AISWARYA, 2016). Porém sua aplicação industrial ainda é restrita devido ao seu alto custo e baixas taxas de reação (LIU et. al., 2014).

A reação de transesterificação catalisada por lipases segue o mecanismo de ping-pong bi-bi, no qual dois substratos reagem formando dois produtos através de intermediários enzima-substrato. O mecanismo catalítico de transesterificação de um monoéster envolve a hidrólise de uma ligação éster formando um ácido graxo, seguido pela esterificação deste ácido graxo e um álcool formando um alquil éster (GULDHE et al., 2015). Este mecanismo é explicado esquematicamente na Figura 2.5, nas seguintes etapas:

[1]: Ativação do resíduo serina através de uma ligação de hidrogênio com o nitrogênio da histidina vizinha.

[2]: Hidrólise do substrato através do ataque nucleofílico do átomo de carbono da carbonila da ligação éster pelo oxigênio da hidroxila da serina, formando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio com os átomos de nitrogênio da cadeia principal, pertencentes a “cavidade oxiânion”, seguida pela liberação de uma molécula de álcool.

[3]: Formação de um intermediário acil-enzima, no qual o substrato encontra-se esterificado com o resíduo de serina.

[4]: A molécula de álcool que se aproxima é ativada pelo resíduo de histidina. O íon hidroxila resultante promove o ataque nucleofílico ao átomo de carbono do intermediário covalente acil-enzima, abrindo a ligação C=O e formando um novo intermediário tetraédrico. O resíduo de histidina protona o átomo de oxigênio do resíduo serina ativo, quebrando a ligação éster entre a serina e o componente acil, liberando um éster e regenerando a enzima.

A reação de esterificação segue mecanismo semelhante, no qual ocorre a ligação covalente do ácido graxo com o álcool, sintetizando um éster e liberando uma molécula de água (CASTILLO et al., 2015).

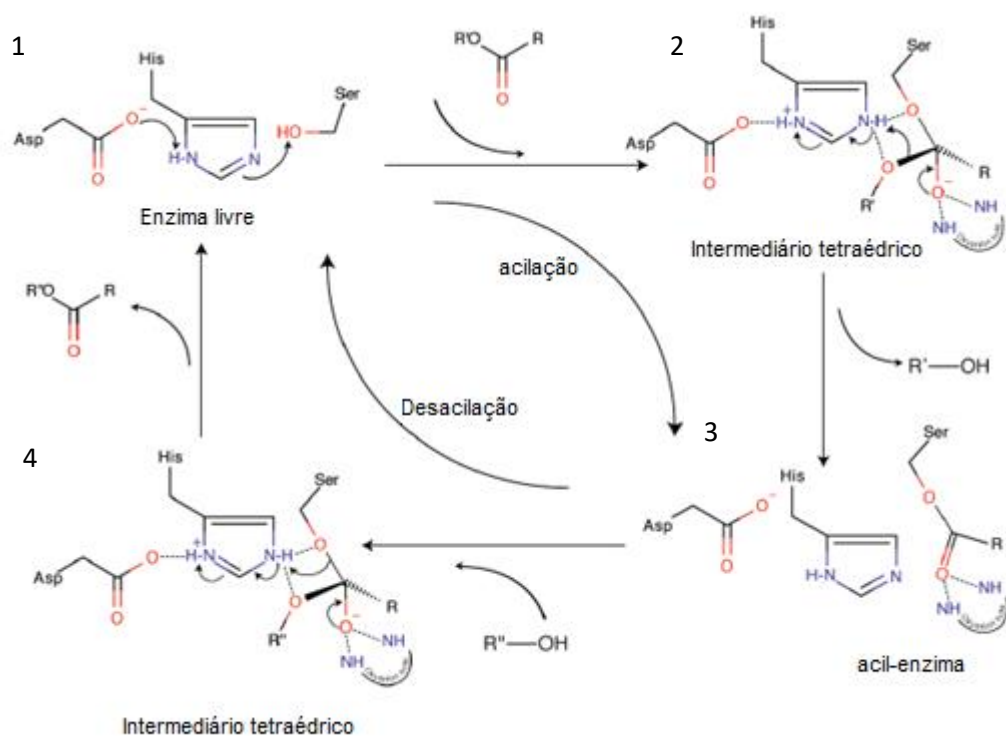


Figura 2.5: Mecanismo catalítico de lipases – reação de transesterificação
Adaptado de: CASTILLO, et al., 2015

Lipases não específicas de *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* e *Pseudomonas fluorescens* e lipases 1,3-específicas de *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* e *Rhizomucor miehei* são usadas como biocatalisadores para produção de biodiesel (LIU et al., 2014; GULDHE et al., 2015).

A literatura relata o fungo filamentoso *Rhizomucor miehei* (RML) como um excelente produtor de lipase. Foi relatado que esse fungo produz uma lipase com estrutura do tipo α/β cujo peso molecular é aproximadamente 30 kDa. A estrutura 3D dessa lipase, representada na Figura 2.6, foi determinada e seu sítio ativo é composto por uma tríade de Ser144, His257 e Asp203. Esta proteína é comercializada sob o nome de Lipozyme RMIM (imobilizada em resina de troca iônica) e é utilizada em hidrólise e síntese de ésteres e em reações de transesterificação. Porém seu alto custo representa uma barreira para o seu uso industrial (HUANG et al., 2012).



Figura 2.6: Estrutura da lipase do fungo *R. miehei*
Fonte: CASTILLO et al., 2015

2.5. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A maior parte das lipases produzidas comercialmente é de origem microbiana. Fermentação submersa e fermentação em estado sólido são os métodos mais utilizados para sua produção (GULDHE et al., 2015).

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como processo de fermentação em matriz sólida, a qual serve como suporte e fonte de nutrientes, que ocorre em ausência ou próximo à ausência de água livre. No entanto, deve haver umidade suficiente para que haja o crescimento e metabolismo dos micro-organismos (SINGHANIA et al., 2009). Este processo permite a utilização de resíduos agrícolas e agroindustriais para a produção de enzimas, o que representa uma alternativa para diminuir o custo da produção de lipases (SINGHANIA et al., 2009; LIU et al., 2014). A FES possui diversas vantagens do ponto de vista biotecnológico, tais como: alta produtividade de fermentação, alta concentração final de produto, geração de produtos altamente estáveis, pouca repressão catabólica e a possibilidade de utilização de resíduos e co-produtos agro-industriais, como cascas, farelos, bagaços, tortas e sementes, possibilitando agregar valor a estes. Além disso, o processo requer menores gastos de água e energia quando comparada à fermentação submersa e a possibilita a utilização de equipamentos menores e mais simples (SINGHANIA et al., 2009; AGUIEIRAS, 2015; THIRUNAVUKARASU et al., 2016).

Fungos filamentosos são micro-organismos interessantes para a FES, por produzirem enzimas extracelulares, o que reduz custos de extração das enzimas, e por sua tolerância a baixa atividade de água no meio (AGUIEIRAS, 2015). Uma vez finalizada a fermentação, o meio fermentado pode ser seco sendo denominado preparado enzimático sólido (PES). O PES pode ser utilizado diretamente como biocatalisador nas reações reduz os custos com extração, purificação e imobilização enzimática. A literatura reporta a fermentação em estado sólido para a produção de diversas enzimas de interesse industrial, além de produtos e processos de detoxificação de tortas e farelos. Sun et al. (2008) utilizaram fermentação em estado sólido para detoxificação de gossipol livre em subprodutos da semente de algodão. Arabi et al. (2011) para produção de xilanase por fungos da espécie *Fusarium*. Castro et al. (2015) a utilizaram para produção de hidrolases do fungo *Aspergillus awamori*. Amorim et al. (2017) também utilizaram *Aspergillus awamori*, porém com o objetivo de reduzir o teor de metilxantina e simultaneamente produzir xilanase em farelo de cacau. Liu et al. (2014) utilizaram a FES para a produção de enzimas utilizando a bactéria *Burkholderia cenocepacia* para a produção de biodiesel. Aguietas et al. (2014, 2015 e 2017) para produção de lipases do fungo *Rhizomucor miehei* em torta de babaçu também para produção de biodiesel. Estes trabalhos, entre outros, demonstram o potencial e aplicabilidade da fermentação em estado sólido.

2.6. ALGODÃO

O algodão é uma das maiores culturas de fibras do mundo. Sua demanda mundial cresce desde a década de 1950. Seu comércio movimentava cerca de US\$ 12 bilhões por ano (ABRAPA, 2018).

O Brasil é o terceiro maior exportador de algodão do mundo com cerca de 960 mil hectares de área plantada e aproximadamente 27 mil toneladas exportadas, atrás dos Estados Unidos (86 mil toneladas) e da Índia (33,6 mil toneladas), apesar de ser o sexto maior em área de plantio (32271 hectares) (ABRAPA, 2018). A Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) estima que a área de plantio nacional possa crescer 20,4% em 2018 (SNA, 2018). No país é produzido principalmente nas regiões centro-oeste e nordeste, nesta última, por

pequenos produtores, sendo importante fonte de renda (EMBRAPA, 2009; CONAB, 2018).

Após sua colheita, o algodão é separado em fibras da pluma, línter (fibras curtas) e caroço que é compreendido por semente e casca. As plumas são removidas por ação mecânica. O línter pode ser removido de forma mecânica ou química, que é utilizada quando se deseja preparar as sementes para plantio. Do caroço, com ou sem línter, pode ser retirado o óleo de algodão, utilizado na indústria de biocombustível, tanto por prensa hidráulica quanto por extração química. O subproduto da extração do óleo é chamado de farelo de algodão, possui elevado teor de proteínas (30 a 35%) e algum teor de óleo residual (variando de acordo com a forma de extração utilizada) sendo utilizado na composição de ração animal (CARDOSO, 1998; GARCEZ et al., 2014). Segundo a Conab (2018), durante a safra 2017/2018 o Brasil produziu mais de 2,9 mil toneladas de caroço de algodão, do qual 52% de sua massa constituirá em tortas e farelos após a retirada do óleo (BARROS et al. 2006). O histórico de produção de caroço e torta/farelo de algodão encontra-se na Figura 2.7.

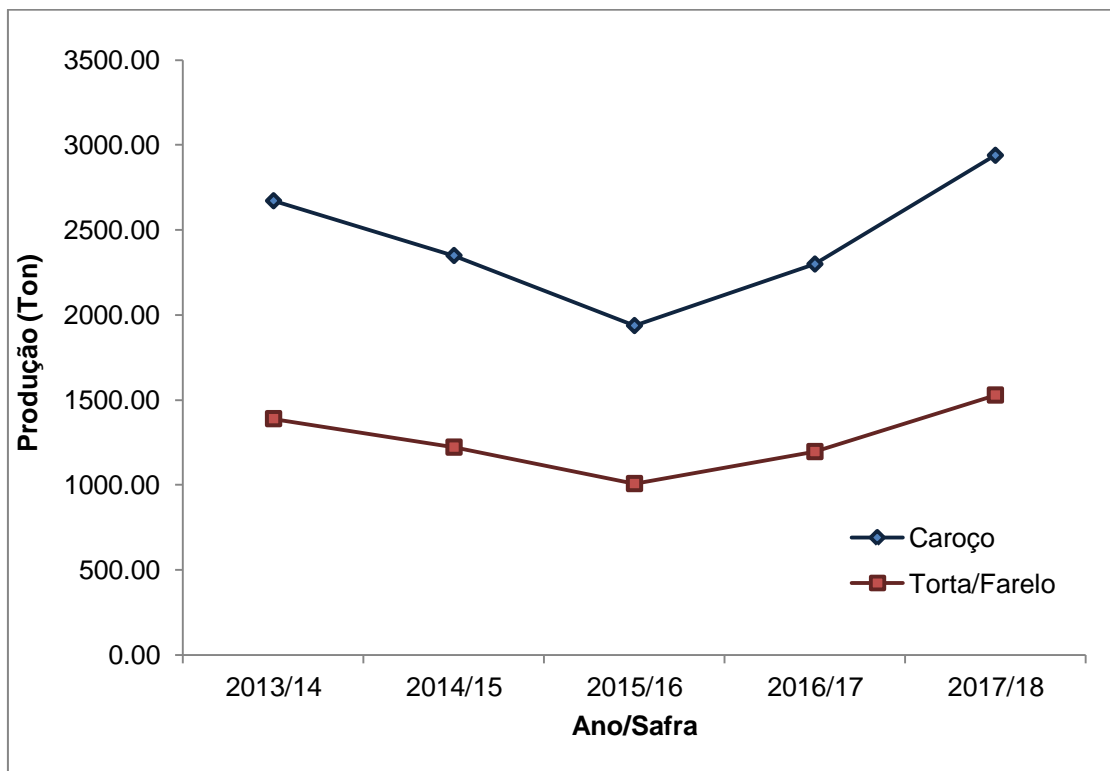


Figura 2.7: Histórico de produção de caroço e farelo/torta de algodão no Brasil nos últimos cinco anos.

Fonte: CONAB (2018)

O Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal (SINDIRAÇÕES) estima que em 2018 mais de 670 mil toneladas de farelo de algodão serão usadas para produção de ração animal. Entretanto, a utilização do farelo de algodão para a alimentação de animais monogástricos deve ser cuidadosa, devido à preocupação com o composto tóxico gossipol (Figura 2.8), presente nas sementes (BARBOSA; GATTÁS, 2004).

O gossipol é um ácido fraco que atua como agente quelante (GAMBOA et al., 2001) e é produzido por glândulas pigmentares do algodão. Sua ingestão pode causar entre outros problemas perda de apetite, edemas pulmonares, hipertrofia de fígado e necrose do músculo cardíaco. O acúmulo do gossipol pode levar o animal a óbito (BARBOSA; GATTÁS, 2004).

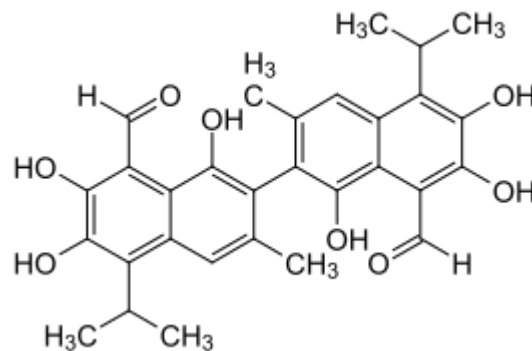


Figura 2.8: Estrutura molecular do gossipol.

Na literatura, a fermentação em estado sólido em farelo de algodão foi relatada para a detoxificação de gossipol livre por Sun et al., 2008 utilizando o fungo *Geotrichum candidum* G07. Zhang et al., 2006 a utilizaram para o mesmo objetivo produzindo lipases de *Candida Tropicalis* ZD-3. Thirunavukarasu et al., 2016 utilizaram a FES para produzir a lipase extracelular MTCC 5455 do fungo *Cryptococcus sp.* em torta de algodão para degradação enzimática dos polímeros poli(butileno succinato) e poli(butileno succinato-co-butileno adipato). Bai et al., 2016 usaram a FES da bactéria *Sporolactobacillus inulinus* YBS 1-5 em mistura de farelo de algodão e espiga de milho para produção de ácido láctico. Em todos estes trabalhos a

fermentação em estado sólido foi utilizada para gerar um produto de interesse comercial, agregando valor à torta ou ao farelo de algodão. Tendo em vista as grandes quantidades desse co-produto geradas, e a perspectiva de aumento de sua produção, o processo de FES visando a produção de biocatalisadores como as lipases, para aplicação na produção de biodiesel representa um importante aspecto do ponto de vista econômico, ambiental e industrial.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a produção de ésteres monoalquílicos (biodiesel) utilizando como catalisadores lipases, na forma de preparado enzimático sólido (PES), produzidas em farelo de algodão.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Utilizar o farelo de algodão como substrato para a produção de lipases pelo fungo *Rhizomucor miehei* por fermentação em estado sólido;
- Produzir ésteres através de reação de esterificação do ácido oleico com metanol ou etanol, utilizando como catalisadores o PES obtido por fermentação em estado sólido em farelo algodão;
- Produzir ésteres através de reação de transesterificação de óleo ácido vegetal com metanol ou etanol, utilizando como catalisadores o PES obtido por fermentação em estado sólido em farelo algodão;
- Agregar valor a um co-produto da indústria do algodão e do biodiesel ao utilizá-lo para produção de lipases como preparado enzimático sólido.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. FARELO DE ALGODÃO

O farelo de algodão utilizado neste trabalho foi obtido da empresa Aboissa Commodity Brokers sob o nome comercial de Farelo de Algodão 28%. Suas informações técnicas encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Características técnicas do farelo de algodão
Fonte: ABOISSA, 2018

Características	Especificações
Proteína Bruta (mín.)	280 (g/kg)
Fibra Bruta (mín.)	230 (g/kg)
Umidade (máx.)	120 (g/kg)
Material Mineral (máx.)	75 (g/kg)
Teor de Gossipol (máx.)	20 (g/kg)
Extrato Etéreo (mín.)	5000 (mg/kg)
Aflatoxinas (máx.)	0,05 (mg/kg)

4.2. ÓLEO ÁCIDO DE MACAÚBA

O óleo ácido de macaúba utilizado neste trabalho foi obtido da empresa PETROVASF da região de Montes Claros – MG. Este óleo possui a seguinte composição em ácidos graxos: ácido láurico (C12:0) 0,3%, ácido palmítico (C16:0) 13,6%, ácido palmitoleico (C16:1) 12,8%, ácido esteárico (C18:0) 2,6%, ácido oleico (C18:1) 67,3%, ácido lineoleico (C18:2) 12,1%, ácido linolênico (C18:3n3) 1,6% (AGUIEIRAS, 2015). Sua acidez percentual, ou seja, o teor de ácidos graxos livres no óleo, foi determinada por titulometria de neutralização.

4.3. BIOCATALISADOR

4.3.1. Produção do biocatalisador

Para obtenção dos esporos do fungo *Rhizomucor miehei*, cepas deste fungo pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBim), do Instituto de Química da UFRJ, foram inoculadas em meio PDA (Potato Dextrose Agar), que possui a composição (%m/v): extrato de batata 20,0; glicose 2,0 e ágar 2,0; pH final 5,6. O crescimento foi conduzido em estufa a 30°C por sete dias.

Os esporos foram raspados com a utilização de alça de platina e pérolas de vidro e suspensos em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0). A contagem dos esporos foi feita por microscopia óptica em câmara de Neubauer.

Com o objetivo de verificar o potencial de produção de lipases, os esporos do fungo *R. miehei* foram inoculados em farelo de algodão, nas seguintes condições de fermentação: 15 g de resíduo vegetal por bécher, 10^7 esporos por grama de resíduo seco, em estufa a 30°C com injeção de ar úmido, ou em câmara climática com saturação de umidade de 90%, por 72 h. A umidade inicial utilizada na fermentação foi 50%. O valor foi definido por ensaio de umidade, no qual se observou o percentual máximo de água que poderia ser adicionado ao farelo sem a presença de água livre, comprovado por teste de atividade de água, realizado utilizando o equipamento AquaLab Series 3 Quick Start. Após a fermentação, o PES obtido foi liofilizado até atingir umidade inferior a 3%, embalado e estocado em geladeira (4°C), visando sua conservação.

4.3.2. Cinética de fermentação de farelo de algodão

Com o objetivo de se determinar o pico de atividade lipásica do fungo *R. miehei* no farelo de algodão foi realizada uma cinética de fermentação do fungo. Os farelos foram inoculados como descrito no item anterior, Sendo a fermentação conduzida em estufa aqui chamada de condição 1 e a fermentação conduzida em câmara climática, condição 2. Foram retiradas alíquotas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h de fermentação e os biocatalisadores produzidos foram liofilizados e utilizados como catalisadores em reações de esterificação de ácido oleico e etanol como descritas no item 4.4.1. A cinética de hidrólise do PES produzido em estufa foi determinada pelo método espectrofotométrico, descrito no item 4.5.3. A partir dos resultados obtidos, o tempo de fermentação, bem como o equipamento utilizado na fermentação foram selecionados para a obtenção do biocatalisador.

4.4. REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO COM PES DE ALGODÃO

4.4.1. Reações preliminares de esterificação do ácido oleico

Os biocatalisadores obtidos foram utilizados em reações preliminares de esterificação com ácido oleico e etanol nas seguintes condições: 15,6 g de ácido oleico, metanol ou etanol como acceptor de elétrons, massa de PES equivalente a

20% da massa total do meio reacional. As reações foram conduzidas em reatores de batelada fechados, providos de agitação magnética. A temperatura foi mantida constante a 40°C por circulação de água na camisa do reator. Alíquotas foram tomadas em tempos pré-determinados e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos para separação do biocatalisador do meio reacional. O sobrenadante foi analisado por titulometria de neutralização para se determinar a cinética de conversão do ácido oleico da reação.

4.4.2. Reações com etanol

4.4.2.1. Influência da razão molar etanol:ácido oleico

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração de álcool na reação, foram realizadas reações de esterificação com diferentes razões molares etanol:ácido oleico. Foram testadas as razões molares 1:1, 2:1 e 3:1. O volume total de etanol foi adicionado no tempo 0 h de reação.

4.4.2.2. Comparação entre PES triturado e não triturado

Com o objetivo de melhorar a agitação do meio reacional e, portanto, a transferência de massa, testou-se triturar o PES liofilizado em liquidificador e utilizá-lo em reações de esterificação de ácido oleico com etanol, com razão molar etanol: ácido oleico 2:1.

4.4.2.3. Influência da adição escalonada de etanol

A adição do etanol em etapas foi avaliada na razão molar etanol: ácido oleico 3:1, sendo dois terços deste volume adicionados no tempo 0 h de reação e um terço em 2 h reação.

4.4.2.4. Batelada alimentada de PES

As reações foram conduzidas como determinado no item 4.4.1, porém com razão molar etanol: ácido oleico igual a 2:1 e as seguintes concentrações de PES: 10% com toda a carga de PES adicionada em 0 h de reação, 10% adicionado em 0 h acrescido de 10% em 6 h de reação e 20% de PES em 0 h de reação.

4.4.2.5. Reuso de PES sem lavagem

A possibilidade de utilizar o PES em reações consecutivas foi avaliada sem lavagem do biocatalisador ao final das reações. A reação foi conduzida como determinado no item 4.4.1, com razão molar etanol: ácido oleico 2:1. Após quatro horas de reação o PES foi retirado do meio reacional por filtração com gaze e reservado em dessecador para reuso em consecutivas reações nas mesmas condições.

4.4.2.6. Reuso do PES lavado com etanol

Para o reuso do PES com lavagem do biocatalisador a reação conduzida como no item anterior. Porém, após cada reação o PES utilizado foi lavado com 80 mL de etanol anidro, seco a vácuo e reservado em dessecador para reuso.

4.4.2.7. Branco de reação

Realizou-se um branco de reação com PES desativado (fermentado e autoclavado) e com farelo de algodão não fermentado. As condições foram as mesmas descritas no item 4.4.1, porém com razão molar etanol: ácido oleico igual a 2:1.

4.4.3. Reações de transesterificação com óleo ácido de macaúba

4.4.3.1. Influência do tipo de álcool (metanol e etanol)

Os biocatalisadores obtidos em farelo de algodão foram utilizados em reações de transesterificação do óleo ácido de macaúba com alcoóis de cadeia curta (etanol e metanol). As condições reacionais foram: razão molar álcool: triacilgliceróis de 6:1, sendo metade deste volume adicionado em 0h de reação e metade em 24 h de reação e massa de PES equivalente a 30% da massa total do meio reacional. As reações foram conduzidas em reatores de batelada fechados, providos de agitação magnética a 40°C. Alíquotas foram tomadas em tempos pré-determinados (0, 24, 48 e 96 h) e as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos para separação do biocatalisador do meio reacional. O sobrenadante foi analisado por cromatografia gasosa, para determinação do teor de ésteres produzido como explicado no item 4.5.4.

4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1. Determinação de acidez

São utilizados 0,5 g de óleo diluídos em 25 mL de etanol, a mistura é titulada com solução de NaOH 0,25 mol.L⁻¹ utilizando fenolftaleína como indicador. A acidez é determinada pela equação 4.1:

$$Acidez(\%) = \frac{V \times M \times AG}{10 \times m} \text{ (Eq. 4.1)}$$

Sendo:

V = volume de NaOH utilizado na titulação da amostra (mL)

M = concentração da solução de NaOH (mol.L⁻¹)

AG = massa molar do ácido graxo presente em maior concentração no óleo, no caso o ácido oleico (g)

m = massa da amostra (g)

4.5.2. Determinação de conversão de ácido oleico– titulometria

A conversão do ácido oleico em ésteres etílicos ou metílicos nas reações de esterificação foi determinada por titulometria de neutralização. 100 µL de cada alíquota tomada em tempos determinados foram diluídas em 50 mL de solução de acetona e etanol 1:1, e tituladas com solução de NaOH 0,04 mol/L até pH 11,0 em titulador automático Mettler DG20. A acidez das amostras foi calculada de acordo com a Equação 4.1 (item 4.2) e a conversão o ácido oleico foi calculada de acordo com a Equação 4.2.

$$conversão(\%) = \frac{(Acidez_{inicial} - Acidez_{final})}{Acidez_{inicial}} \times 100 \text{ (Eq. 4.2)}$$

4.5.3. Atividade hidrolítica– método espectrofotométrico

A atividade hidrolítica do PES foi medida em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-1800) a 412 nm utilizando p- nitrofenil laurato como substrato conforme descrito por Gutarra et al. (2009). As enzimas do PES liofilizado foram extraídas com tampão

fosfato de sódio (0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0) como descrito por Gombert et al. (1999). Para as reações de hidrólise 250 µL da solução de p-nitrofenil laurato foram diluídos em 2,2 mL de tampão fosfato (0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0) em uma cubeta. Uma alíquota de 50 µL do extrato enzimático foi adicionada ao sistema e a absorvância, decorrente da liberação do produto de hidrólise p-nitro fenol, foi acompanhada no espectrofotômetro.

$$\textit{Atividade (U/mL)} = \frac{\alpha x D x f x V_f}{V_s} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

Na qual:

α = variação de absorvância (ΔAbs) no intervalo de tempo Δt (3 minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear da absorvância;

D = diluição da solução enzimática;

f = fator de conversão, obtido através da construção de uma curva padrão do p-NFL em concentração variando entre 0,01 e 0,2 µmol.mL⁻¹;

V_f = volume reacional, que é o volume da solução de p-NPL em tampão e o volume da amostra (mL);

V_s = volume da solução enzimática utilizada no ensaio (mL).

4.5.4. Atividade hidrolítica – método titulométrico

A atividade de hidrólise dos biocatalisadores foi determinada pelo método titulométrico utilizando como substrato óleo de oliva (5% m/v) e goma arábica (5% m/v) em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (100 mM) emulsionados por 3 minutos. 0,2 g do PES foram adicionados a 19 mL da emulsão e este sistema foi incubado em banho térmico a 35°C com agitação a 200 rpm por 20 minutos. Ao fim do tempo foram adicionados ao sistema 20 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v) que tem a função de interromper a reação e também de promover a extração dos ácidos graxos liberados. Em seguida, os ácidos graxos livres foram titulados de acordo com o protocolo descrito em 4.5.1. O branco reacional foi obtido pelo mesmo protocolo descrito acima, no entanto, a adição do PES foi realizada após a adição de 20 mL da solução de acetona/etanol.

A atividade enzimática (U) é determinada pela Equação 4.4:

$$\textit{Atividade (U/g)} = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{t \times e} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

No qual:

V_a = volume de NaOH utilizado na titulação da amostra (mL)

V_b = volume de NaOH utilizada na titulação do branco (mL)

M = molaridade da solução de NaOH (mol.L^{-1})

t = tempo de reação (min)

e = massa de amostra utilizada (g)

4.5.5. Determinação de teor de ésteres – cromatografia gasosa

Os ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo a gás (SHIMADZU 2010) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar omegawax (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme). As condições das análises foram: temperatura inicial de 200°C por 5 minutos e, então, programada a uma taxa de 20°C/min até 260°C, permanecendo a 260°C por 6 min. As temperaturas do detector e do injetor foram de 250°C e 260°C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi hélio, a uma vazão de 2,0 mL/min e a injeção foi feita em modo split de 1:20.

O padrão interno heptadecanoato de metila foi solubilizado em etanol grau HPLC. Então, 20 μL da amostra foram solubilizados em 480 μL do padrão solubilizado em solvente e injetado no cromatógrafo como descrito no parágrafo anterior. O teor de ésteres foi calculado através da Equação 4.5:

$$\textit{Teor de éster \% (m/m)} = \frac{M_p \times A_a}{A_p \times M_a} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.5})$$

Sendo:

M_p = Massa do padrão

M_a = Massa da amostra

A_a = Área da amostra

A_p = Área do padrão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ÓLEO ÁCIDO DE MACAÚBA

O óleo ácido de macaúba utilizado apresentou acidez de 8%. Com este valor de acidez este óleo não poderia ser utilizado como matéria-prima para produção de biodiesel pela rota convencional de transesterificação alcalina. Portanto, é um bom candidato à matéria-prima para reação de transesterificação utilizando catálise enzimática.

5.2. BIOCATALISADOR

5.2.1. Produção do biocatalisador

A imagem do PES produzido por FES em farelo de algodão e liofilizado, assim como sua imagem aumentada em 40 vezes podem ser vistos na Figura 5.1. Este biocatalisador foi utilizado em uma reação preliminar de esterificação com o objetivo de avaliar sua atividade catalítica, as condições desta reação foram: 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol:ácido oleico 1:1, massa de PES igual a 20% da massa de meio reacional. O resultado da reação de esterificação catalisada pelo biocatalisador está apresentado na Figura 5.2.

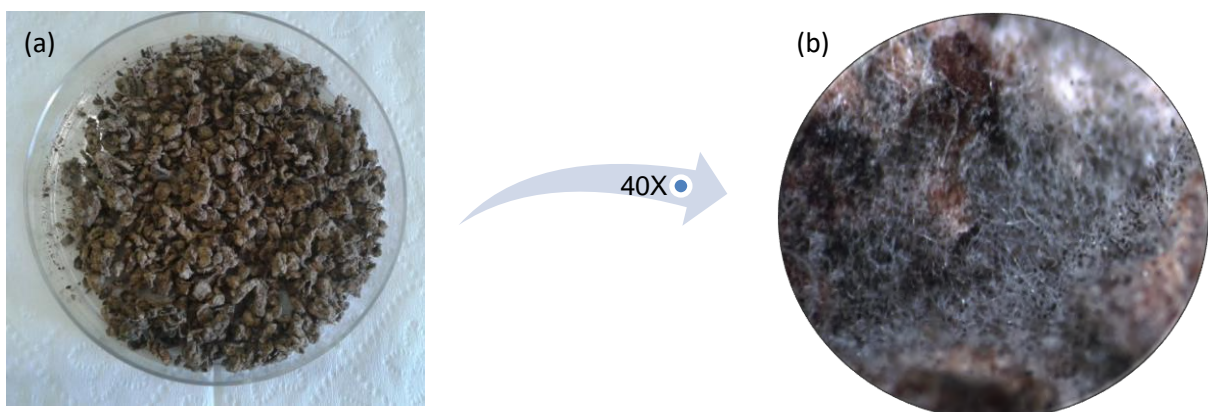


Figura 5. 1: PES produzido por fermentação em estado sólido em farelo de algodão (a) e sua imagem aumentada em 40 vezes (b).

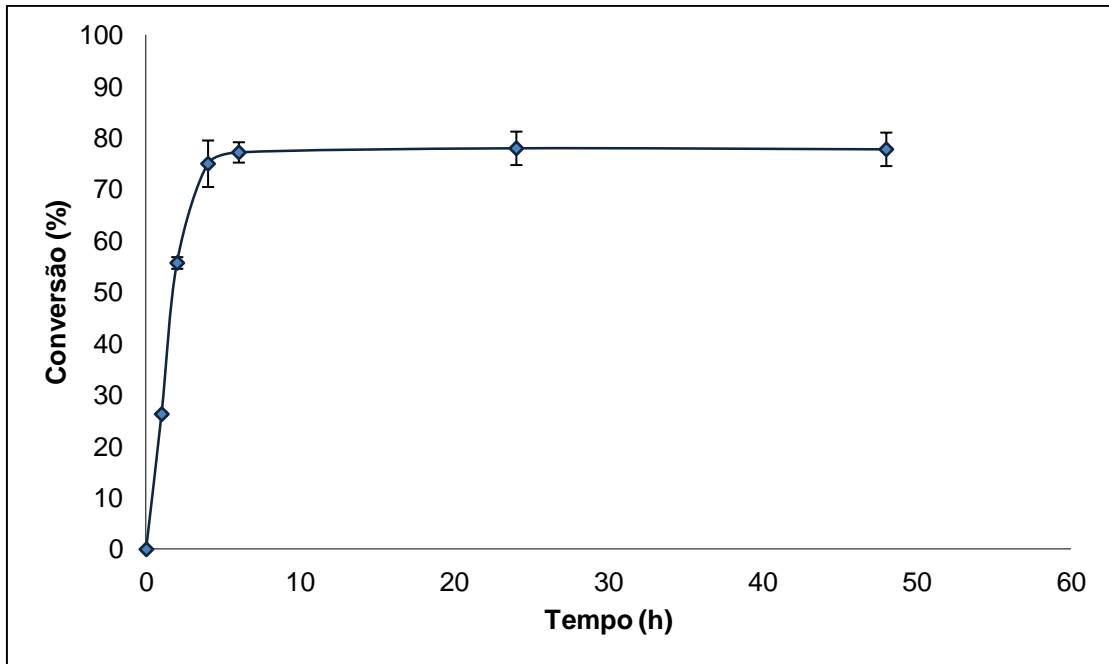


Figura 5.2: Cinética de conversão do ácido oleico em éster, por esterificação com etanol, utilizando como catalisador PES produzido por FES em farelo de algodão. **Condições reacionais:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 1:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C.

É possível observar que a reação catalisada pelo PES de farelo de algodão apresentou conversão próxima a 80% em 6 h de reação. Em condições otimizadas, Agueiras (2015) obteve conversões superiores a 90% em 12 h de reação. A atividade hidrolítica deste PES, avaliada pelo método titulométrico foi 22,15 ($\pm 3,60$) U/g.

5.2.2. Cinética de fermentação de farelo de algodão

A cinética de fermentação do farelo de algodão em estufa (Figura 5.3) e em câmara climática (Figura 5.4), assim como sua cinética de hidrólise (Tabela 5.1), apresentaram os seguintes resultados.

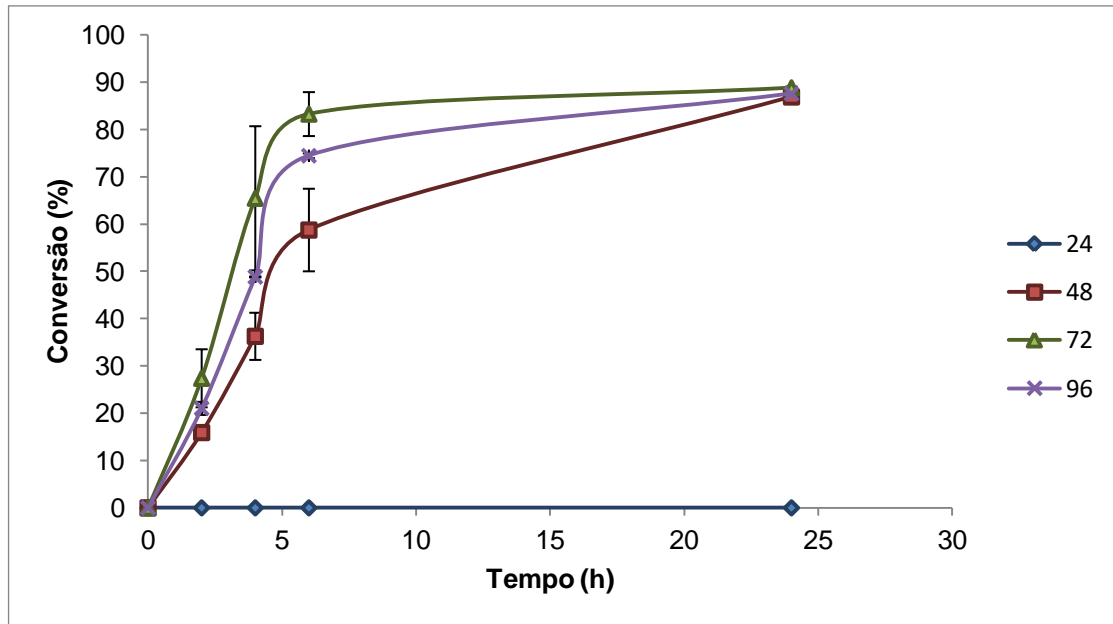


Figura 5.1: Cinética de conversão do ácido oleico em éster etílico para diferentes tempos de fermentação do fungo *R. miehei* em farelo de algodão em estufa. **Condições de fermentação:** 15 g de farelo por bécher, 50% de umidade, 10^7 esporos por grama de farelo, em estufa a 30°C com injeção de ar úmido. **Condições reacionais:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 1:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C.

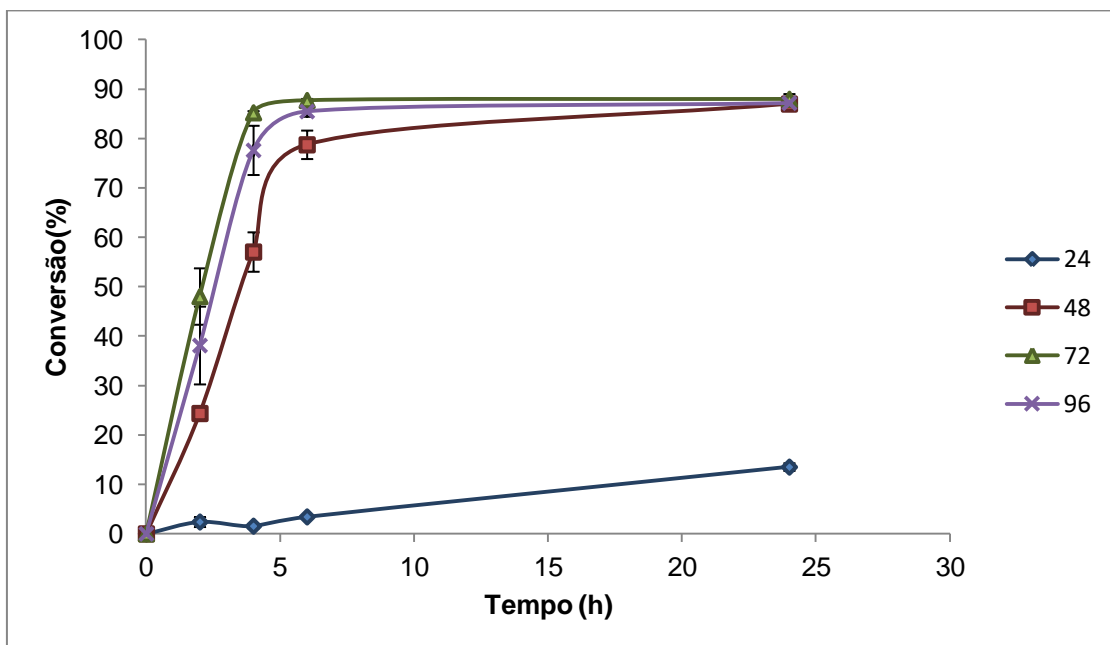


Figura 5.2: Cinética de conversão do ácido oleico em éster etílico para diferentes tempos de fermentação do fungo *R. miehei* em farelo de algodão em câmara climática. **Condições de fermentação:** 15 g de farelo por bécher, 50% de umidade, 10^7 esporos por grama de farelo, em câmara climática a 30°C com saturação de umidade de 90%. **Condições reacionais:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 1:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C.

Tabela 5.1: Cinética de hidrólise do PES obtido em torta de algodão fermentado em estufa pelo método espectrofotométrico

Tempo de Fermentação (h)	Atividade de Hidrólise (U/g)
24	17,2±2,6
48	46,8±14,1
72	89,2±0,9
96	93,0±1,7

A atividade de hidrólise máxima, nessas condições, foi obtida em 96 h de fermentação (93 U/g), valor próximo ao obtido em 72 h (89,2 U/g). Este perfil de produção de hidrolases é semelhante ao observado por Aguiéiras (2015) em PES produzido por fermentação em estado sólido em torta de babaçu, contudo a atividade deste tipo de enzima obtida na fermentação do farelo de algodão foi superior.

É possível observar que os resultados de conversão do ácido oleico em reações de esterificação, seguiram padrão similar ao perfil de hidrólise. Na fermentação realizada em estufa, os melhores resultados de conversão do ácido oleico foram obtidos em 72 h de fermentação. Nessa condição foi obtida conversão de 83% em 6h de reação. Na fermentação realizada em câmara climática, observam-se resultados semelhantes nos tempos de 72 e 96 h. Comparando-se os resultados obtidos utilizando-se o PES obtido em 72 h de fermentação das duas condições, como mostrado na Figura 5.5, é possível observar que, apesar de as duas reações apresentarem conversões próximas em 6 h de reação (superiores a 80%), a reação que utilizou o PES obtido em câmara climática apresentou 85 % de conversão em 4 h de reação, enquanto a reação que utilizou o PES obtido em estufa apresentou 65 % de conversão no mesmo tempo de reação. Pode-se afirmar então que o PES fermentado em câmara climática possui maior taxa de conversão (21,8% de conversão/h) que o PES fermentado em estufa (15,8% de conversão/h). A Figura 5.5 mostra uma comparação dos resultados obtidos em câmara climática e estufa (em 72h de fermentação). Este resultado se dá, provavelmente, pela maior capacidade da câmara climática em controlar a umidade do meio. Foi observado que em 72 h de fermentação a umidade no produto enzimático sólido cuja fermentação foi conduzida em câmara climática estava em torno de 62%, enquanto a do PES

fermentado em estufa, a umidade era próxima a 49%. Tendo em vista os resultados obtidos, optou-se por utilizar a fermentação em câmara climática por 72 h com saturação de umidade de 90% como condição padrão para os próximos experimentos.

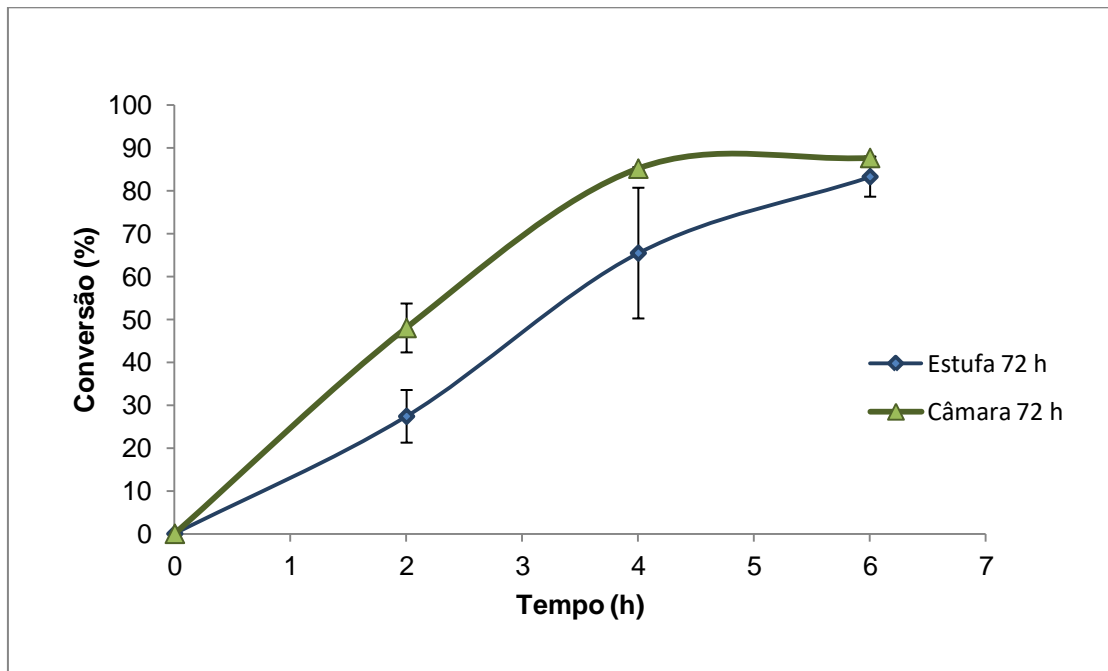


Figura 5.3: Comparação da conversão obtida em reações de esterificação utilizando como catalisador o PES obtido no melhor tempo da cinética de fermentação em farelo de algodão fermentado em câmara climática com o fermentado em estufa. **Condições reacionais:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 1:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C.

5.3. REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO COM PES DE ALGODÃO

5.3.1. Reações com etanol

5.3.1.1. Influência da razão molar etanol:ácido oleico

Os resultados das reações conduzidas com diferentes razões molares etanol:ácido oleico (1:1, 2:1 e 3:1) estão apresentados na Figura 5.6.

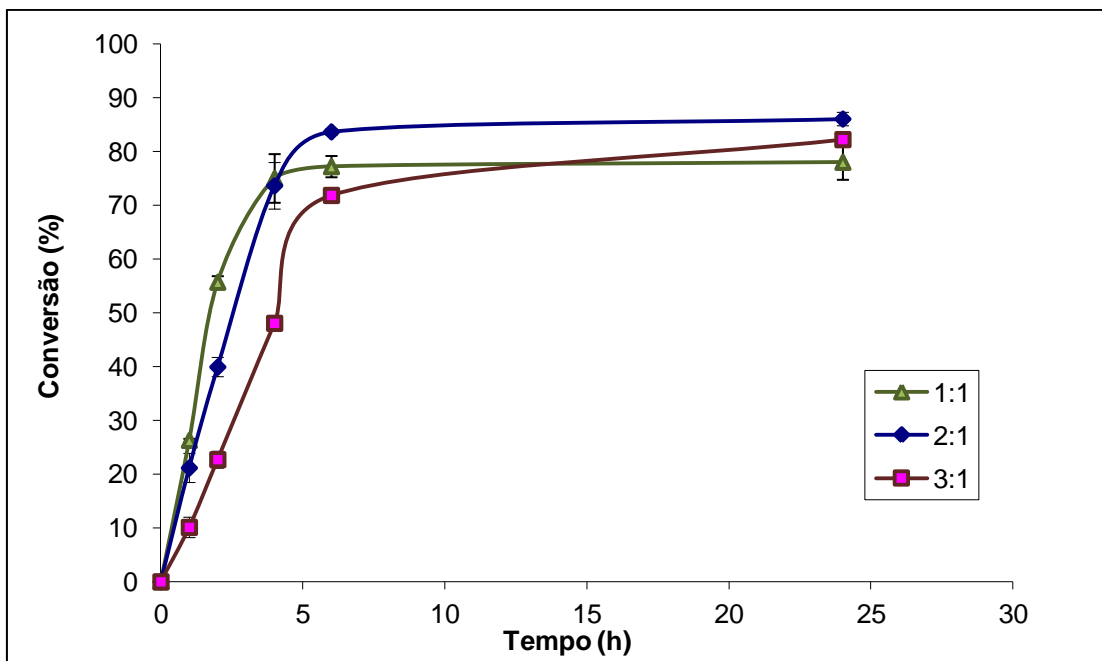


Figura 5.6: Avaliação da influência da concentração de etanol no meio reacional. **Condições reacionais:** **Condição 1:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 1:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C. **Condição 2:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 2:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C. **Condição 3:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 3:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C.

A melhor conversão foi obtida quando se utilizou a razão molar etanol:ácido oleico 2:1 (superior a 80% em 6 h de reação). Algum excesso de álcool (superior à concentração estequiométrica) desloca o equilíbrio da reação para a formação de produtos. No entanto, lipases são sensíveis a solventes, como alcoóis de cadeia curta, que causam sua inibição (GULDHE et al., 2015). Alcoóis primários em mecanismos catalíticos de lipases que seguem o mecanismo de ping pong bi-bi podem tanto agir como acil acceptor, como se ligar ao sítio ativo formando um complexo lipase - álcool inativo (CASTILLO et al., 2015). Isso pode ser observado no comportamento da curva que representa a conversão da reação conduzida com a razão molar etanol:ácido oleico 3:1. Por esta razão todas as reações realizadas para este estudo, após estes resultados terem sido obtidos, utilizaram razão molar etanol:ácido oleico 2:1.

5.3.1.2. Comparação entre PES triturado e não triturado

Problemas relacionados à transferência de massa em reações que utilizam catálise heterogênea são relatados por diversos autores. Uma das soluções apontadas para este tipo de problema é aumentar a área específica do catalisador (BASKAR; AISWARYA, 2016). Desta forma, testou-se triturar o catalisador liofilizado e aplicá-lo em reações de esterificação. Nas Figuras 5.7 e 5.8 podem ser vistos os PES não triturado e triturado, respectivamente. Os resultados obtidos nas reações catalisadas pelo PES de farelo de algodão triturado em comparação às catalisadas pelo PES não triturado encontram-se na Figura 5.9.



Figura 5. 7: PES de farelo de algodão liofilizado



Figura 5. 8: PES de farelo de algodão liofilizado e triturado

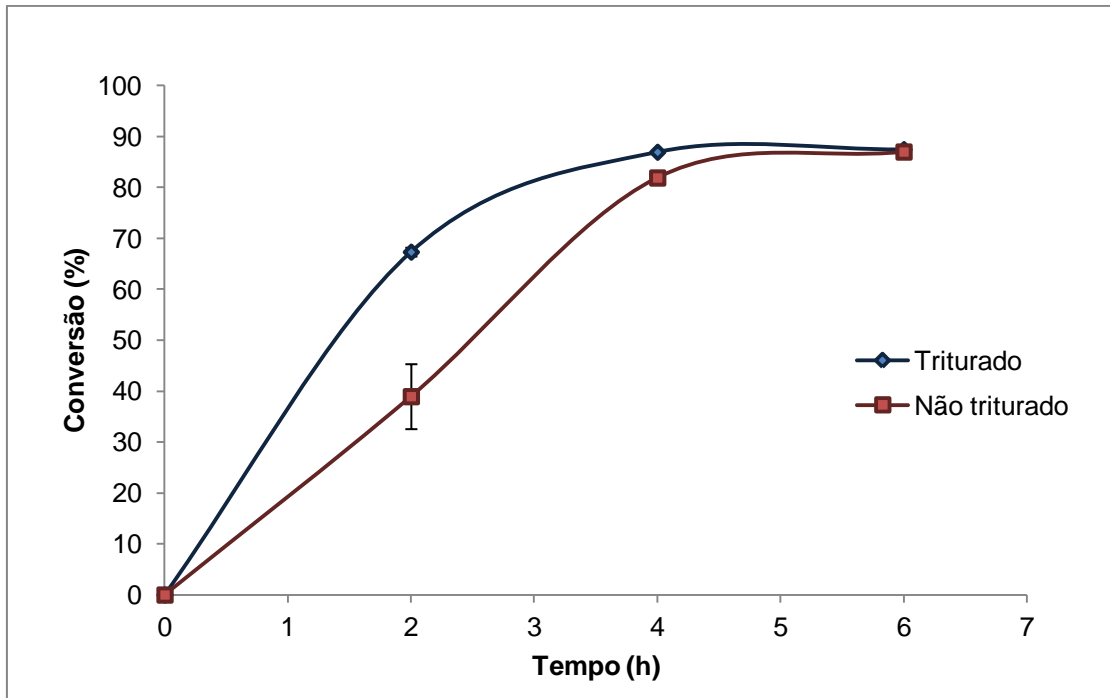


Figura 5.9: Comparação entre reações de esterificação de ácido oleico com etanol utilizando como catalisador PES produzido por FES em farelo de algodão com trituração do PES liofilizado e sem a trituração do PES. **Condições reacionais:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 2:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C.

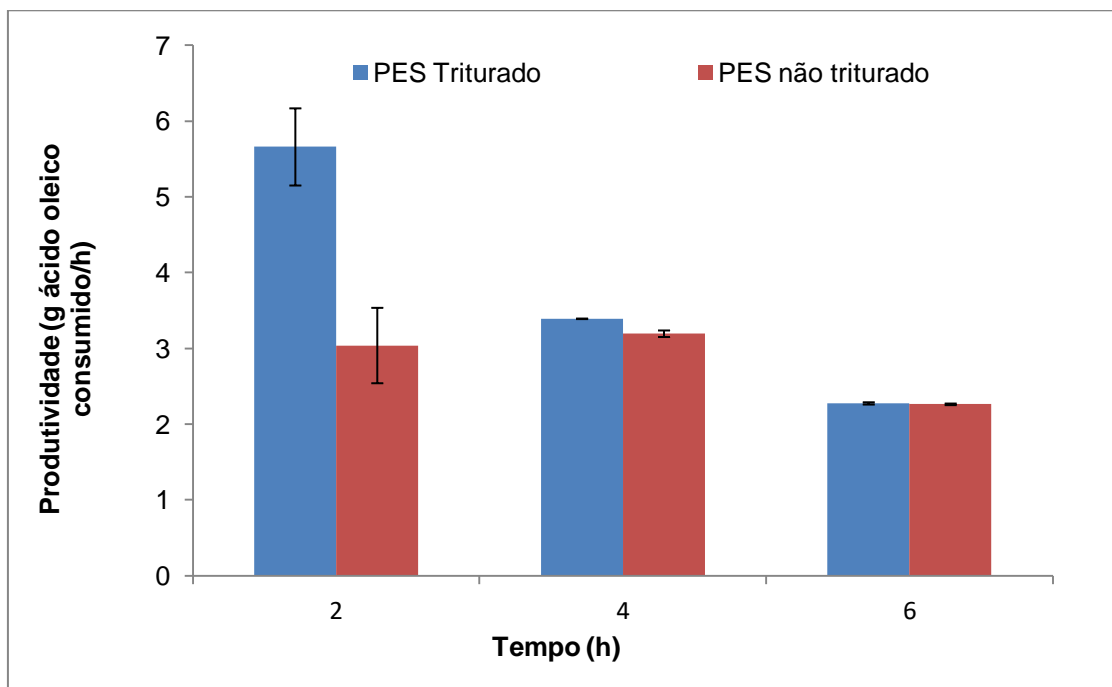


Figura 5. 10: Taxas de reação da conversão de ácido oleico em oleato de etila.

Pelos gráficos presentes na Figura 5.9 e na Figura 5.10 é possível observar que a reação conduzida com o PES triturado apresentou maior taxa de conversão inicial (33,7% de conversão/h) comparada à reação conduzida com o PES não triturado (19,5% de conversão/h), ou seja quase 2 vezes maior. Na fermentação em estado sólido as células do micro-organismo se imobilizam espontaneamente nas partículas do meio sólido de fermentação. Desta forma, as lipases excretadas permanecem aderidas à matriz sólida (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015). Considerando que os substratos e produtos precisam se difundir por dentro da matriz sólida, o tamanho da partícula pode causar limitações na transferência de massa do meio para a matriz sólida. Acredita-se que a trituração do PES, por diminuir o tamanho de suas partículas, aumentando sua área específica, tenha contribuído para melhor transferência de massa dos substratos através da matriz sólida do biocatalisador. Tendo em vista estes resultados, a etapa de trituração do PES foi incluída na preparação do biocatalisador e utilizada nos testes seguintes.

5.3.1.3. Influência da adição escalonada de etanol

A adição escalonada de álcool foi testada com o objetivo de deslocar o equilíbrio da reação sem que houvesse desativação do catalisador pelo excesso de álcool. Os resultados obtidos estão na Figura 5.11.

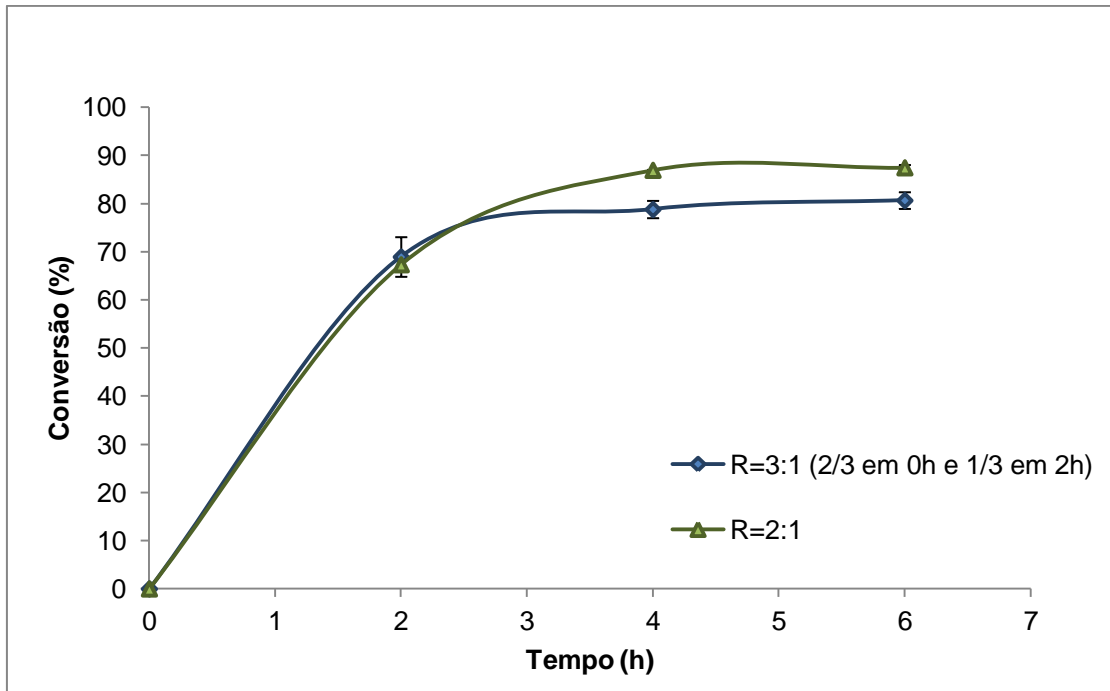


Figura 5.11: Avaliação de adição escalonada de etanol em reações de esterificação com ácido oleico. **Condições reacionais: Condição 1:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 3:1, sendo 2/3 adicionados em 0 h de reação e 1/3 em 2 h, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C. **Condição 2:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 2:1 com todo o etanol adicionado em 0 h de reação, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C.

Pode-se observar que as duas curvas presentes no gráfico acima apresentam comportamento idêntico até 2 h de reação, e quando o etanol foi adicionado na reação que seguia a condição 1, a curva sofre uma inflexão e se torna constante. Este comportamento indica que ocorre desativação da enzima na presença de excesso de álcool. Cabe ressaltar que, embora comportamento similar também possa ser observado na condição 2, nessa condição, as conversões obtidas foram superiores em 6h de reação. Desta forma, optou-se por manter a condição 2, que utiliza razão molar etanol:ácido oleico 2:1 com todo álcool adicionado no início da reação, como condição padrão.

5.3.1.4. Batelada alimentada de PES

Com o objetivo de verificar a hipótese de desativação do PES ao longo do tempo de reação, foi testada a batelada alimentada de PES. Seus resultados podem ser observados na Figura 5.12.

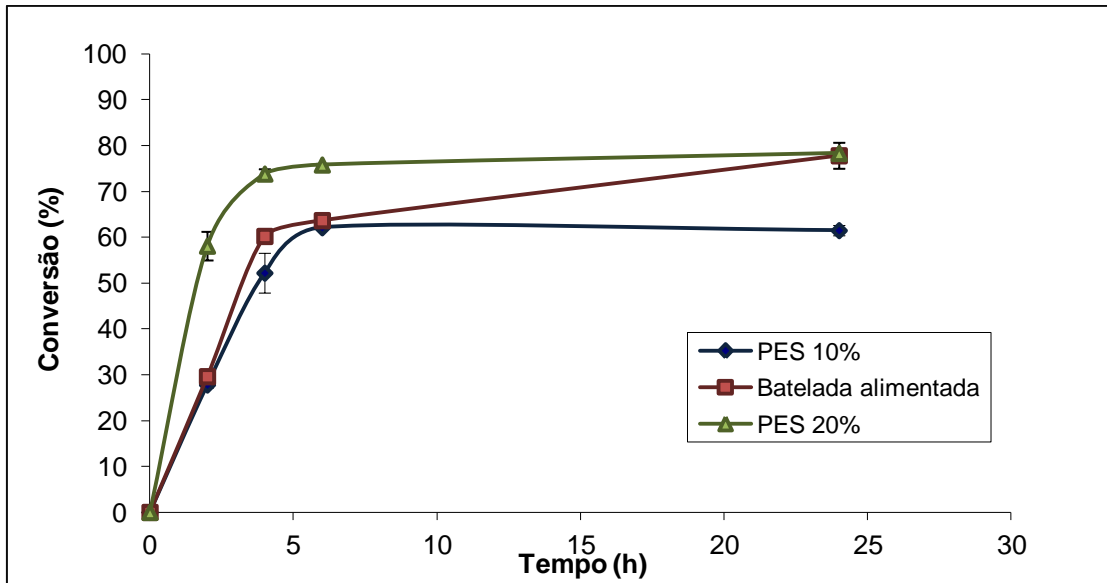


Figura 5.12: Avaliação de reação com batelada alimentada de PES em comparação a adição única de PES em tempo 0 h de reação. **Condições reacionais:** **Condição 1:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 2:1, massa de PES 10% da massa total do meio reacional adicionado em 0 h de reação. 40°C. **Condição 2:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 2:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional, sendo metade desta massa adicionada em 0 h de reação e a outra metade em 6 h. 40°C. **Condição 3:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 2:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional adicionado em 0 h de reação. 40°C.

Comparando as curvas obtidas neste experimento observa-se que a reação que utilizou a condição 3 (massa de PES igual a 20% da massa total do meio reacional adicionado no início da reação), apresentou maior conversão em 24 h de reação (78%), quando comparada a reação que utilizou a condição 1 (com massa de PES de apenas 10% da massa total do meio). É possível observar também que a reação conduzida na condição 3 possui maior taxa de conversão (29,0 % de conversão/h) que as outras duas condições (aproximadamente 14% de conversão/h) até 4 h de reação, quando a curva se estabiliza. A adição de mais biocatalisador após 6h de reação (condição 2) promoveu aumento na conversão sendo obtida, em 24h, a mesma conversão da condição 3 (20% de PES adicionado no início da reação). Levando-se em consideração que os rendimentos da reação são determinados apenas por sua termodinâmica (KASCHE, 1986), se nenhuma desativação é observada, o esperado é que reações com diferentes percentuais de catalisador apresentem conversões semelhantes no equilíbrio (TRUBIANO; BORIO; ERRAZU, 2007). Entretanto, o que se observou foram maiores conversões nas

reações com maiores concentrações de PES (aproximadamente 17% de diferença na conversão em 24 h). Então, as hipóteses consideradas para o equilíbrio observado a partir de 4 h de reação são: o excesso de água, produzida em uma das etapas reacionais, e a desativação provocada pelo etanol presente no meio.

No modelo cinético de ping-pong bi-bi, mecanismo das reações de esterificação catalisadas por lipases, um ácido graxo, agindo como substrato (S1), se liga a enzima (E), formando o complexo enzima-substrato (ES1). Este complexo se isomeriza, formando o intermediário acil enzima (AE) e liberando uma molécula de água. Na segunda etapa, o álcool, segundo substrato (S2), forma com o intermediário AE um complexo binário (AES2) formando um complexo lipase-éster (EP2), que libera o éster (P2) e regenera a enzima (E) (KRISHNA; KARANTH, 2001). Neste modelo, a água produzida na primeira etapa compete com o álcool pelo intermediário AE, podendo formar o produto final (éster) ou retornar para o substrato inicial (ácido graxo) em uma reação de hidrólise, o que ocasionaria o equilíbrio reacional. Já o etanol, além de substrato, age como solvente que pode influenciar parâmetros termodinâmicos da reação e atividade enzimática (VAYSSE et al., 2002). Soares et al., (2015) observaram em reações de esterificação entre ácido graxos livres e etanol que, devido a produção de água, 20 a 30% da massa do meio reacional era absorvida pelo PES, levando à desativação da enzima. Tendo em vista esta discussão, a condição 3 se torna mais interessante, pois atingindo conversões altas em 4 h de reação é possível diminuir o tempo total do procedimento, o que acarreta, entre outros, em menor gasto energético.

5.3.1.5. Reuso de PES sem lavagem

A possibilidade de reutilizar o biocatalisador repetidamente é fundamental para reduzir o custo operacional da produção de biodiesel e assim, contribuir para sua viabilidade econômica (GULDHE et al., 2015). O PES de algodão foi utilizado em três reações consecutivas sem que houvesse lavagem do catalisador entre as reações. Os resultados são apresentados na Figura 5.13.

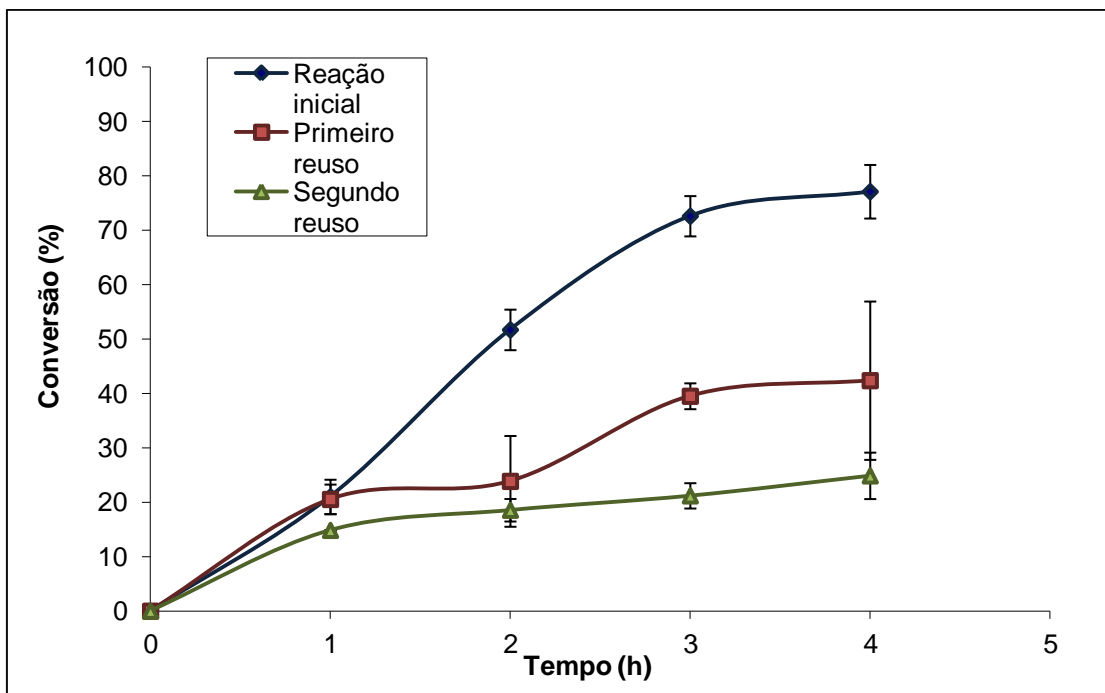


Figura 5.13: Cinética de reação da reutilização do PES em três reações consecutivas sem lavagem do catalisador. **Condições reacionais:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 2:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C.

A reutilização do PES em reações consecutivas sem sua lavagem foi testada, pois, caso não houvesse perda de atividade do catalisador, evitaria uma etapa e consequente gasto de solvente. Porém, como pode ser observado no gráfico acima, a conversão final da terceira batelada foi cerca de 30% da conversão da primeira batelada no mesmo tempo. Verifica-se que existe perda de atividade do biocatalisador, provavelmente por deposição de moléculas presentes no meio reacional, como ácidos graxos, ésteres ou água, que causam a obstrução do sítio ativo das lipases e, consequentemente a desativação do biocatalisador.

5.3.1.6. Reuso de PES lavado com etanol

O PES de algodão foi utilizado em quatro reações consecutivas. Entre cada uma das reações o biocatalisador foi lavado com 80 mL de etanol anidro e seco a vácuo. O etanol foi utilizado nesta etapa por ser um dos substratos da reação de esterificação e por ter tido bons resultados em processo semelhante, como observado por Aguierras (2015). Os resultados estão presentes na Figura 5.14. A comparação entre as conversões obtidas utilizando o PES sem lavagem e lavado com etanol pode ser observada na Figura 5.15.

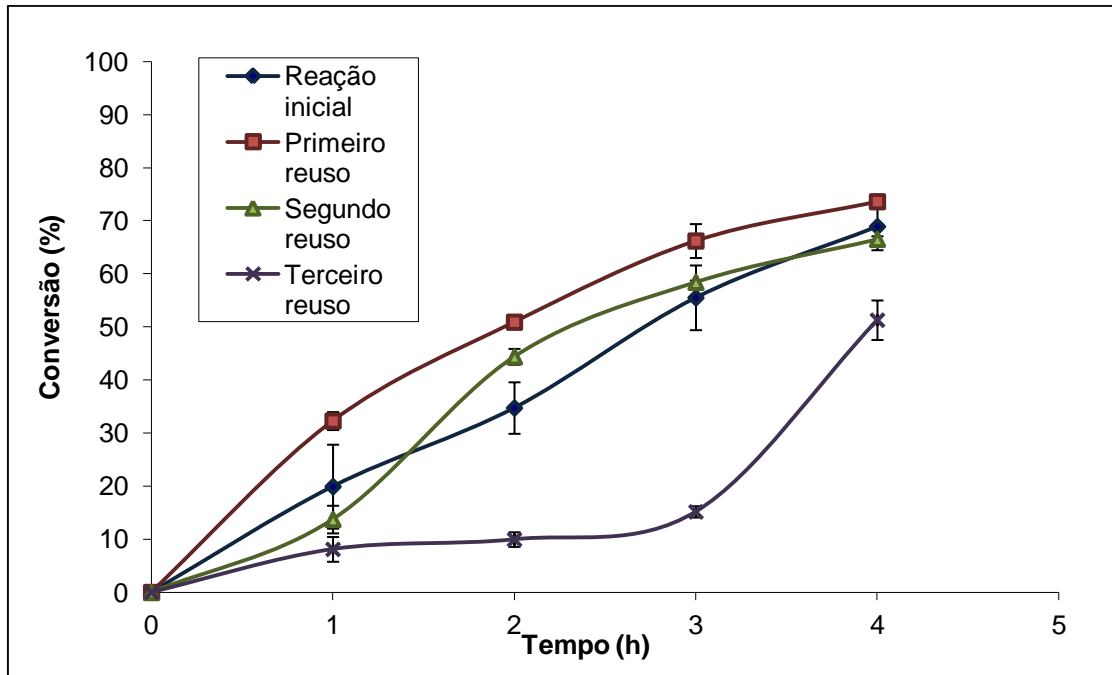


Figura 5.14: Cinética de reação da reutilização do PES em quatro reações consecutivas com lavagem do catalisador com etanol. **Condições reacionais:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 2:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C.

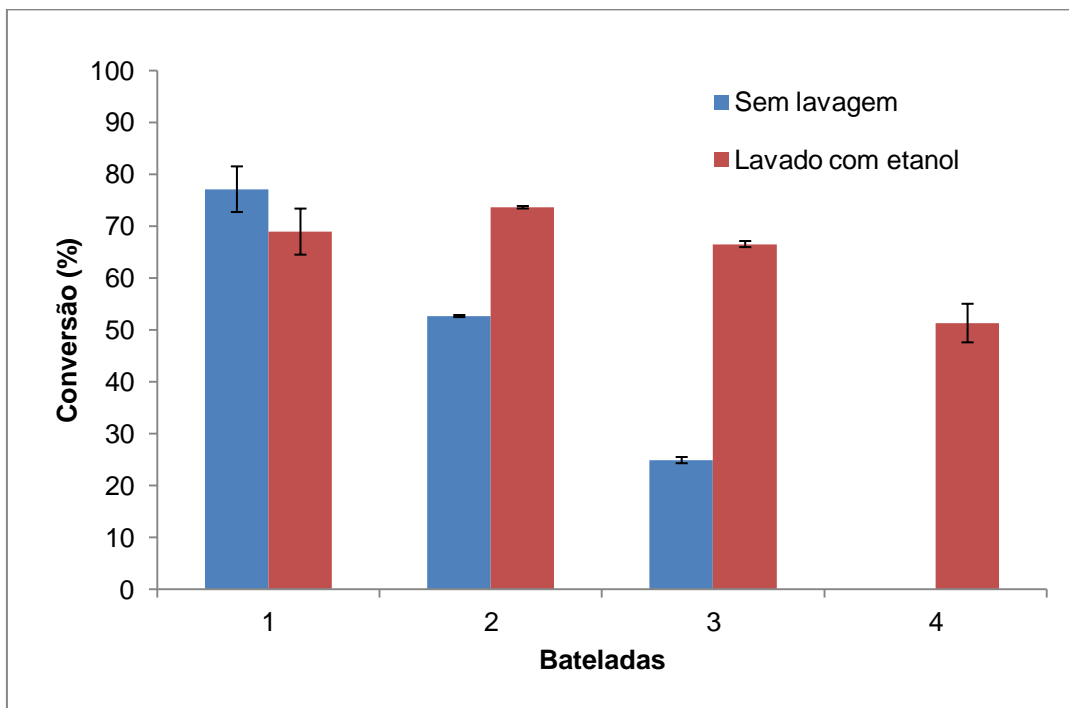


Figura 5.15: Comparação das conversões em 4 h de reação das bateladas de reação de esterificação de ácido oleico com etanol utilizando PES sem lavagem X PES lavado com etanol. **Condições reacionais:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 2:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C.

Realizando a lavagem do catalisador após cada reação, foi possível utilizar o PES em quatro reações consecutivas, tendo sido observada alguma perda de atividade apenas na quarta reação. Considerando que tanto o ácido oleico quanto o

oleato de etila são solúveis em etanol, este provoca a desobstrução dos sítios ativos pela solubilização dos depositados. É possível observar que houve um aumento da conversão na segunda reação com relação à primeira. Este efeito pode ser explicado pois o contato do PES com a mistura de ésteres e ácidos graxos na reação inicial pode causar um efeito de pré tratamento ao biocatalisador. Isto pode contribuir para melhor difusão dos substratos (WATANABE, 2005; AGUIEIRAS, 2015). Esse resultado é importante, pois a possibilidade de reutilização do catalisador contribui para sua viabilização econômica.

5.3.1.7. Branco de reação

O branco de reação foi realizado em reações de esterificação de ácido oleico com etanol utilizando-se PES desativado, ou seja, fermentado e autoclavado em seguida, bem como farelo de algodão não fermentado. Em 24 h de reação os resultados mostram que não houve conversão.

5.3.2. Reações com metanol

5.3.2.1. Reações preliminares de esterificação de ácido oleico

Considerando que o biodiesel produzido mundialmente utiliza principalmente metanol, por ser relativamente mais barato e mais reativo comparado ao etanol anidro (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; GULDHE et al., 2015), foram conduzidas reações preliminares de esterificação utilizando metanol. Os resultados obtidos nas reações com metanol foram comparados com os melhores resultados obtidos nas reações utilizando etanol, e encontram-se na Figura 5.16.

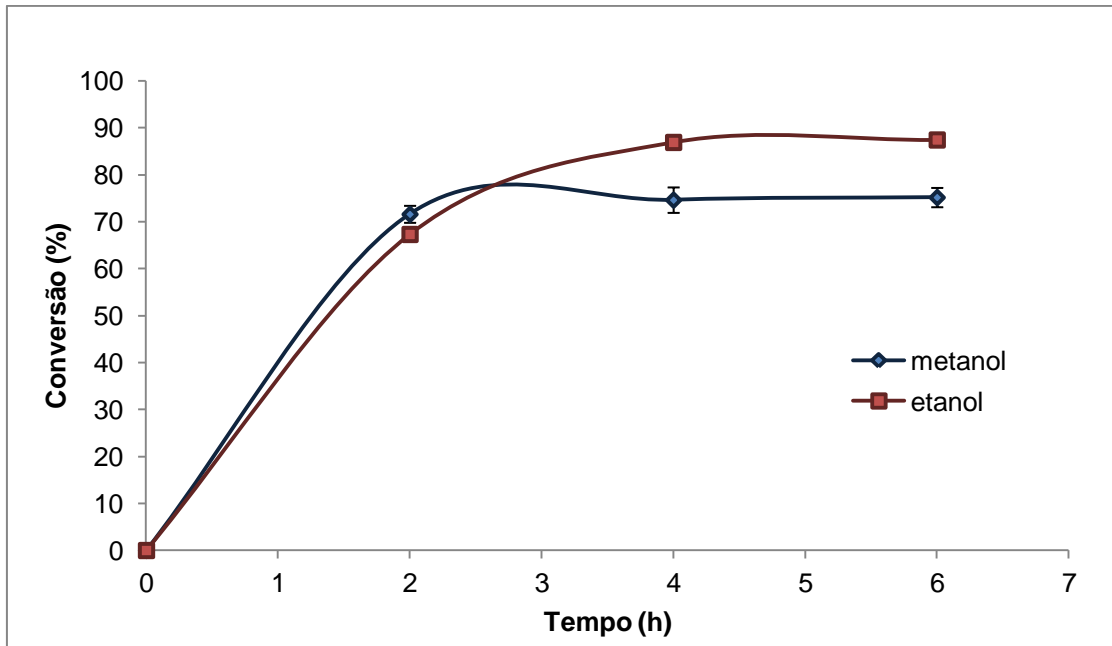


Figura 5.16: Cinética de reação de esterificação utilizando metanol em comparação com mesma reação utilizando etanol. **Condições reacionais: Reação com metanol:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar metanol: ácido oleico 1:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C. **Reação com etanol:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar etanol: ácido oleico 2:1, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C.

No gráfico acima é possível observar que em 2 h de reação ambas as reações apresentam conversão semelhante (próximas a 70%). Porém, na reação conduzida com metanol, a conversão se estabiliza próximo a duas horas de reação. Esta estabilização pode ocorrer tanto por ausência de substrato, visto que se utiliza uma concentração menor de metanol do que de etanol, desta forma a reação teria atingido equilíbrio; quanto por desativação do catalisador, pois lipases são sensíveis a solventes e são sabidamente mais sensíveis a metanol que a etanol (CHRISTOPHER et al., 2014; GULDHE et al., 2015).

5.3.2.2. Influência da adição escalonada de metanol

Tendo em vista os resultados obtidos no item anterior, a adição escalonada de álcool foi testada com o objetivo de deslocar o equilíbrio da reação para formação de produtos e verificar a sensibilidade das enzimas a presença de maiores concentrações do álcool. Esta estratégia é reportada na literatura para diminuir os efeitos negativos causados pelo solvente ao biocatalisador (CHRISTOPHER et al.,

2014; AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015). Os resultados obtidos estão na Figura 5.17.

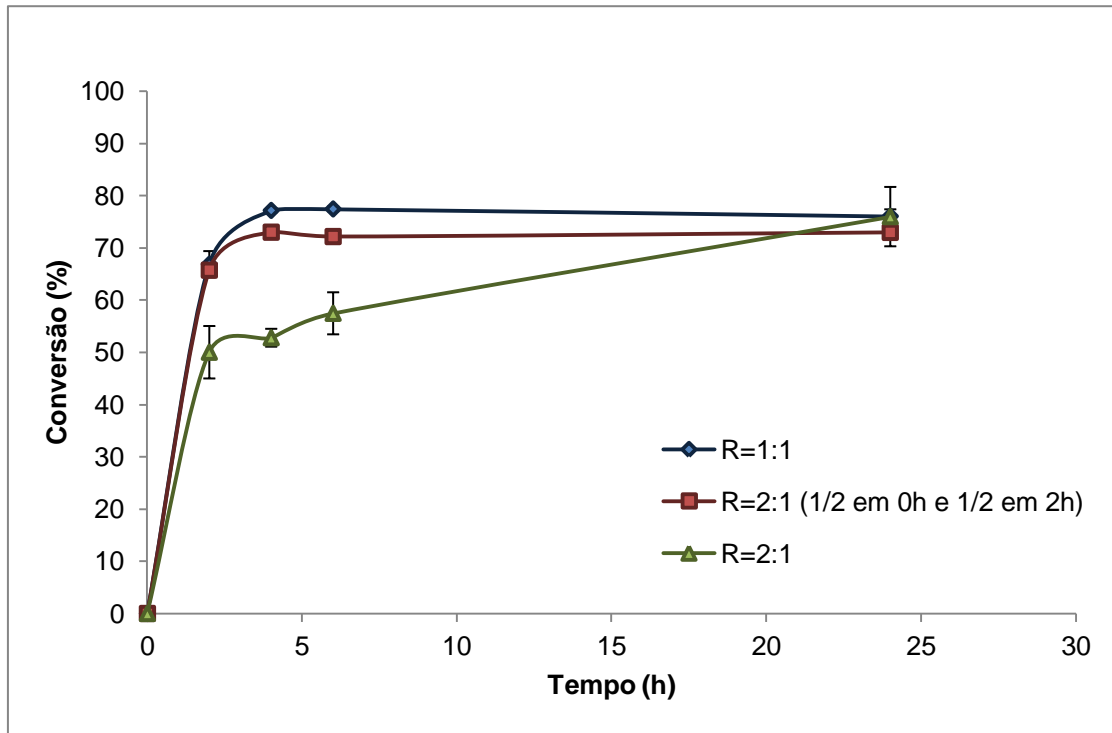


Figura 5.17: Avaliação de adição escalonada de metanol em reações de esterificação com ácido oleico. **Condições reacionais: Condição 1:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar metanol: ácido oleico 1:1 com todo o metanol adicionado em 0 h de reação, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C. **Condição 2:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar metanol: ácido oleico 2:1, sendo 1/2 adicionados em 0 h de reação e 1/2 em 2 h, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C. **Condição 3:** 15,6 g de ácido oleico, razão molar metanol: ácido oleico 2:1 com todo o metanol adicionado em 0 h de reação, massa de PES 20% da massa total do meio reacional. 40°C.

Os resultados obtidos neste teste sugerem que existe inibição do catalisador pelo álcool metílico. Desta forma, pode-se afirmar que é possível utilizar o metanol como substrato para produção de biodiesel por rota enzimática, no entanto, menores concentrações serão obtidas, se comparadas a reações que utilizam etanol. Aguietas (2015) obteve conversões próximas a 40% em reações utilizando metanol e óleo ácido de macaúba hidrolisado utilizando como biocatalisador PES do fungo *Rhizomucor miehei* produzido por fermentação em estado sólido em torta de babaçu. Nas mesmas condições, utilizando etanol, foram obtidas conversões superiores a 70%.

5.3.3. Reações de transesterificação com óleo ácido de macaúba

Os PES obtidos em farelo de algodão foram testados também em reações de transesterificação com o objetivo de verificar a possibilidade de produção de biocombustível por esta rota utilizando como matéria-prima o óleo ácido de macaúba que, por possuir acidez de cerca de 8%, não poderia ser utilizado para produção de biodiesel utilizando catálise básica. Foram utilizados tanto etanol quanto metanol como aceptores de acila; e testou-se também a influência da concentração de água no meio reacional das reações de transesterificação, pois a lipase necessita de uma interface água-lipídeo para que a estrutura que cobre seu sítio ativo se abra, permitindo que o sítio fique disponível, comportamento conhecido como “ativação interfacial” (CASTILLO et al., 2015). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 5.19.

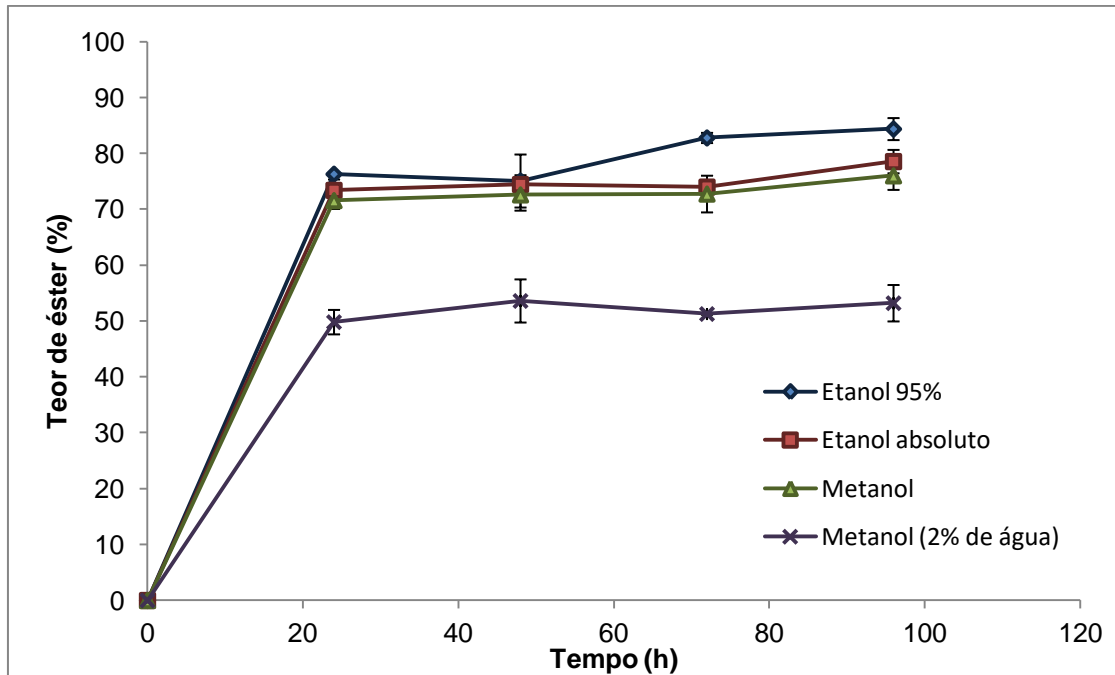


Figura 5.19: Condições reacionais: razão molar álcool: triacilgliceróis de 6:1, sendo 1/2 adicionado em 0h de reação e 1/2 em 24 h de reação e massa de PES 30% da massa total do meio reacional. 40°C.

Condição 1: utilizando etanol 95%

Condição 2: utilizando etanol absoluto

Condição 3: utilizando metanol anidro

Condição 4: utilizando metanol acrescido de 2% (v/v) de água destilada

As curvas referentes às reações que utilizam etanol e metanol anidros apresentam comportamentos semelhantes com conversões próximas a 80% em 96 h de reação, o que indica que é possível utilizar os dois alcoóis para produção de biodiesel por transesterificação/esterificação de óleos ácidos pela rota enzimática. Teores de ésteres semelhantes foram obtidos por Aguiaras (2015) utilizando óleo ácido de macaúba em reação com etanol. Sun et al. (2010) obtiveram 80 a 85% de conversão em reações com metanol e óleo de soja utilizando lipases de *Rhizopus oryzae*. No entanto, deve-se observar que a conversão obtida em 24 h na reação que utiliza metanol (72%) é um pouco menor que a da reação que utiliza etanol (76%), o que pode indicar diminuição da atividade do catalisador na presença de metanol. A curva que representa a reação conduzida com etanol 95% apresenta maior conversão em 96 h de reação que as demais (aproximadamente 85%), sugerindo a ativação do sítio ativo na interface água-lipídio. Este resultado é interessante, pois a utilização de etanol hidratado pode representar redução nos custos de produção, considerando que etapas de desidratação do álcool seriam

desnecessárias. No entanto, a reação que utilizou metanol com acréscimo de 2% (v/v) de água apresentou conversões próximas a 50% em 24 h e este valor se encontrou aproximadamente estável até a reação ser finalizada em 96 h. O volume de água adicionado pode ter sido superior ao necessário para obter a ativação interfacial e a atividade de água pode ter desfavorecido as condições termodinâmicas da reação (CASTILLO et al., 2015). Também é possível que a água adicionada tenha sido absorvida pelo biocatalisador e facilitado o acúmulo de metanol no ambiente enzimático, causando sua inibição ou desativação (SOARES et al., 2015). É importante também considerar que o óleo ácido de macaúba possui ácidos graxos livres em sua composição, portanto ocorrem simultaneamente reações de esterificação e transesterificação. Estas reações produzem água e glicerol como coprodutos. Galeano et al. (2017) relatam que durante a etanolise de óleo de palma catalizada por PES de *Burkholderia contaminans* LTEB, o glicerol foi visivelmente adsorvido no biocatalisador.

6. CONCLUSÕES

A partir deste trabalho é possível concluir:

- Utilizando o farelo de algodão, um coproduto da agroindústria algodoeira, foi possível obter um biocatalisador com alta atividade sintética;
- Aplicando o PES produzido como catalisador direto de reações de esterificação de ácido oleico em oleato de etila, foram obtidas conversões superiores a 80% em 4h;
- O PES foi utilizado também como catalisador em reações de transesterificação (metanólise e etanólise) de óleo ácido de macaúba, nas quais o teor de éster obtido foi superior a 80%;
- Foi possível utilizar o PES em quatro reações de esterificação consecutivas, nas mesmas condições, após lavagem deste com etanol, sem que fossem observadas grandes diminuições na conversão;
- Os resultados obtidos neste trabalho indicam potencial do uso deste biocatalisador para produção de biodiesel utilizando matérias-primas ácidas ou residuais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOISSA. *Farelo de algodão 28%*, 2018. Disponível em: <<http://www.aboissa.com.br/produtos/view/457/farelo-de-algodao-28.html>>. Acesso em: 07 de novembro de 2018.

ABRAPA. *Algodão no mundo*, 2018. Disponível em: <<https://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-mundo.aspx>>. Acesso em: 13 de outubro de 2018.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al., 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. *Produção de biodiesel por hidroesterificação e transesterificação do óleo ácido de macaúba (acrocomia aculeata) utilizando lipases não comerciais*. 2015. Tese (Doutorado em bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al., Influence of the raw material on the final properties of biodiesel produced using lipase from *Rhizomucor miehei* grown on babassu cake as biocatalyst of esterification reactions. *Renewable Energy*, v. 113, p. 112-118, 2017

ALVES, C. L. S. et al., Feedstock diversification for biodiesel production in Brazil: Using the Policy Analysis Matrix (PAM) to evaluate the impact of the PNPB and the economic competitiveness of alternative oilseeds. *Energy Policy*, v. 109, p. 297-309, 2017.

AMORIM, G. M. et al., Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 11, p. 34-41, 2017.

ANP, Regulamento Técnico n° 3/2014. *Resolução ANP n° 45/2014*, 2014.

ANP. Boletim mensal do biodiesel: fevereiro de 2017. Brasil: ANP, 2017.

ARABI, N. I. E.; BAKRI, Y.; JAWHAR, M. Extracellular Xylanase Production by *Fusarium* species in Solid State Fermentation. *Polish Journal of Microbiology*, v. 60, p. 209-212, 2011.

BAI, Z. et al. D-Lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 with simultaneous utilization of cottonseed meal and corncob residue. *Bioresource Technology*, v. 217, p. 346-352, 2016.

BARBOSA, F.F.; GATTÁS, G. Farelo de algodão na alimentação de suínos e aves. *Revista Eletrônica Nutritime*, v.1 p. 147-156, 2004.

BASKAR, G.; AISWARYA, R. Trends in catalytic production of biodiesel from various feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 57, p. 496-504, 2016.

BARROS, G. S. C. et al. Custos de produção de biodiesel no Brasil. *Revista da Política Agrícola*, v. 3, p. 36-50, 2006.

BIOMERCADO. *Indicadores de preços médios – Óleo de soja refinado*. Disponível em: <<http://www.biomercado.com.br/indicadoresPorProduto.php?produto=62>>. Acesso em 03 de novembro de 2018

CARDOSO, E. G. Utilização de subprodutos do algodoeiro na alimentação animal. In: EMBRAPA. *Algodão: Informações Técnicas*. Dourados: EMBRAPA, 1998. p. 255-267.

CASTILLO, E.; CASAS-GODOY, L.; SANDOVAL, G. Medium-engineering: a useful tool for modulating lipase activity and Selectivity. *Biocatalysis*, v.1, p.178-188, 2015.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 93, p. 303-308, 2015.

CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN, K.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, v. 119, p.497-520, 2014.

EMBRAPA. *Macaúba no Mercado de bioenergia*, 2012. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1481706/macauba-no-mercado-de-bioenergia--->>. Acesso em: 03 de novembro de 2018

FERNANDES, M. L. M. et al. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. *Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic*, v. 44, p. 8-13, 2007.

GARCEZ, B. S. et al. Características nutricionais de ingredientes de dietas para animais de produção. *Revista Eletrônica Nutritime*, v.11, p. 3257-3267, 2014.

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

GERIS, R. et al. Biodiesel de soja - reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Química Nova*, v. 30 p. 5, 2007

GOMBERT, A.K. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 85-90, 1999.

GULDHE, A. et al. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 41, p. 1447-1464, 2015.

GUTARRA, M. L. E. et al. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5249-5254, 2009.

HUANG, D. et al. Biodiesel production catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase-displaying *Pichia pastoris* whole cells in an isooctane system. *Biochemical Engineering Journal*, v. 63, p. 10-14, 2012.

JEGANNATHAN, K. R. et al. Economic assessment of biodiesel production: Comparison of alkali and biocatalyst processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 745-751, 2011.

KASCHE, V. Mechanism and yields in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics, peptides and other condensation products, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 8, p. 4-16, 1986.

KNOTHE, G; RAZON, L. F. Biodiesel fuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 58, p. 36-59, 2017.

KRISHNA, S.H.; KARANTH, N. G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate A kinetic study, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1547, p. 262-267, 2001.

LI, Q. et al. Ethanol as the acyl acceptor for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 25, p. 742-748, 2013.

LIU, Y. et al. Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* cultured via solid state fermentation for biodiesel production: Optimization and kinetics. *Applied Energy*, v. 113, p.713-721, 2014.

NASARUDDIN, R. R.; ALAM, Md. Z.; JAMI, M. S. Evaluation of solvent system for the enzymatic synthesis of ethanol-based biodiesel from sludge palm oil (SPO). *Bioresource Technology*, v. 154, p. 155-161, 2014.

RAMACHANDRAN, S. et al. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2000-2009, 2007.

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

REHAN, M. et al. Waste to biodiesel: A preliminary assessment for Saudi Arabia. *Bioresource Technology*, v. 250, p. 17-25, 2018.

ROBLES-MEDINA, A. et al. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 398-408, 2009.

SINDIRAÇÕES. *Boletim informativo do setor*, 2018. Disponível em: < https://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2018/09/boletim_informativo_do_setor_setembro_2018_vs_final_port_sindiracoes.pdf>. Acesso em: 06 de novembro de 2018

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 13-18, 2009.

SNA. *Conab estima safra e exportação recordes de algodão, com aumento no plantio em 2018/19*. Disponível em: < <http://www.sna.agr.br/conab-estima-safra-e-exportacao-recordes-de-algodao-com-aumento-no-plantio-em-2018-19/>>. Acesso em: 13 de outubro de 2018

SOARES, D. et al. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 15-23, 2013.

SOARES, D. et al. Analysis of multiphasic behavior during the ethyl esterification of fatty acids catalyzed by a fermented solid with lipolytic activity in a packed-bed bioreactor in a closed-loop batch system. *Fuel* v. 159, p. 364-372, 2015.

STERGIOU, P. Y. et al Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology Advances*, v. 31, p 1846-1859, 2013.

SUN, Z. T.; LIU, C.; DU, J. H. Optimisation of fermentation medium for the detoxification of free gossypol in cottonseed powder by *Geotrichum candidum* G07 in solid-state fermentation with response surface methodology. *Annals of Microbiology*, v. 58, p. 683-690, 2008.

SUN, T. et al. Exploring the effects of oil inducer on whole cell-mediated methanolysis for biodiesel production. *Process Biochemistry*, v.45, p. 514-518, 2010.

TALUKDER, M. R. et al. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, p. 207-212, 2010.

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

THIRUNAVUKARASU, K. et al., Degradation of poly(butylene succinate) and poly(butylenes succinate-co-butylene adipate) by a lipase from yeast *Cryptococcus* sp. grown on agro-industrial residues, v. 116, p. 99-107, 2016

TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida Antarctica* lipase, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 716-722, 2007.

ULIANA, N. R. et al. Acidity reduction of enzymatic biodiesel using alkaline washing. *Renewable Energy*, v.113, p. 393-396, 2017.

ULLAH, F. et al. Current advances in catalysis toward sustainable biodiesel production. *Journal of the Energy Institute*, v.89, p. 282-292, 2016.

VAYSSE, L. et al. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 648-655, 2002.

WANG, Y.T.; FANG, Z.; ZHANG, F. Esterification of oleic acid to biodiesel catalyzed by a highly acidic carbonaceous catalyst. *Catalysis Today*, v. 319, p. 172-181, 2019.

WATANABE, Y. et al. Production of FAME from Acid Oil Model Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 82, p. 825–831, 2005.

XIAO, M.; QI, C.; OBBARD, J. P. Biodiesel production using *Aspergillus niger* as a whole cell biocatalyst in a packed bed reactor. *GCB Bioenergy*, v. 3, p. 293-298, 2011.

ZHANG, W. J. et al. Optimization of process parameters for reduction of gossypol levels in cottonseed meal by *Candida tropicalis* ZD-3 during solid substrate fermentation. *Toxicon*, v. 48 p. 221-226, 2006