

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

**GRAZIELLE SANTOS SILVA ANDRADE**

Produção de Biodiesel a partir de Óleos Vegetais usando  
Células Íntegras Imobilizadas de Fungos Filamentosos com  
Elevada Atividade Lipolítica  
(Glicerol Éster Hidrolase – E.C. 3.1.1.3)

**Lorena – SP  
2012**

GRAZIELLE SANTOS SILVA ANDRADE

Produção de Biodiesel a partir de Óleos Vegetais usando Células Íntegras Imobilizadas de Fungos Filamentosos com Elevada Atividade Lipolítica (Glicerol Éster Hidrolase – E.C.3.1.1.3)

Tese de Doutorado apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada  
Orientador: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Lorena – SP  
Março, 2012

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Biblioteca Especializada em Engenharia de Materiais  
USP/EEL

Andrade, Grazielle Santos Silva

Produção de biodiesel a partir de óleos vegetais usando células íntegras imobilizadas de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica (glicerol éster hidrolase – E.C. 3.1.1.3)/ Grazielle Santos Silva Andrade. Orientador Heizir Ferreira de Castro.-- Lorena, 2012.  
158f.: il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo.

1. Células íntegras 2. Imobilização 3. Óleos Vegetais  
4. Biodiesel I. Título.

CDU 662.756

## **Dedicatória**

*Aos meus pais: Celso e Elizabeth,  
Por terem me proporcionado a realização deste sonho,  
Por estarem presentes em todas as etapas da minha vida,  
Pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela paciência,  
Pelo amor incondicional...  
Pelo privilégio de ser sua filha...*

*Ao meu marido: Karol,  
Por todos os momentos que dividimos juntos,  
Pela compreensão, carinho, respeito, paciência,  
Por ser meu companheiro por toda vida...*

*Confie no Senhor de todo o coração  
e não se apóie na sua própria inteligência.  
Lembre de Deus em tudo o que fizer,  
e ele lhe mostrará o caminho certo.”*

*Provérbios 3:5-6 (NLTJ)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar e guiar minha vida, por renovar minha fé todos os dias, por me dar força e sabedoria nos momentos difíceis e por sua presença constante ao meu lado. Obrigada Pai pelas pessoas maravilhosas que colocastes em meu caminho, pelas bênçãos e promessas cumpridas em minha vida.

Aos meus pais Celso e Elizabeth por contribuírem diretamente na minha formação profissional e pessoal, por me proporcionarem um ambiente familiar de muito amor e respeito, por terem incentivado e financiado meus estudos e por terem me ensinado seus valores e princípios de honestidade e caráter.

Ao meu marido Karol pelo amor, amizade, companheirismo, paciência, confiança e respeito. Obrigada por estar sempre ao meu lado e me fazer feliz.

A profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro pela orientação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Obrigada pela amizade, confiança, paciência, conselhos, incentivo, apoio e acima de tudo por sempre ter me ajudado em todos os momentos.

Ao prof. Júlio e prof. Pedro pela ótima convivência no laboratório de Biocatálise, pela amizade e contribuição neste trabalho.

A prof. Laura e aos funcionários dos laboratórios de Microbiologia e Fitopatologia da Embrapa/CE pelo auxílio fundamental na área de microbiologia no início deste trabalho.

A prof. Bernadete e a técnica Lucinha do laboratório de Microbiologia Industrial por todos os ensinamentos e por estarem sempre dispostas a me ajudar.

Aos meus familiares, pelo apoio, estímulo e carinho e por toda valorização que deram à minha formação e educação.

Aos meus sogros Sueli e Rui e minha cunhada Kelen, pela ajuda, carinho e incentivo ao meu trabalho.

Aos meus amigos e irmãos Luana, Douglas, Dani, Alexandre, Ciça, Rodrigo, Fernanda, Rafael, Giga e Nilton por tantos anos de amizade e companheirismo, por todos os momentos que compartilhamos juntos e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus queridos amigos presentes e aos que já fizeram parte do laboratório de Biocatálise Ana Karine, Larissa, Patrícia, Lívia, Gisele, Natália, Weriton, Márcio, William, Daniel, Mateus, Layne, Bruno e em especial minha amiga e irmã Ariela pelos anos de amizade, por sempre me ajudar, por seus conselhos e suas orações. Obrigado a todos pela rica convivência, pela amizade e por contribuírem na realização deste trabalho.

A todos os professores e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena, que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido.

## RESUMO

ANDRADE, G. S. S. **Produção de Biodiesel a partir de Óleos Vegetais usando Células Íntegras Imobilizadas de Fungos Filamentosos com Elevada Atividade Lipolítica (Glicerol Éster Hidrolase – E.C.3.1.1.3)**. 2012, 158f. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2012.

O objetivo deste trabalho foi contribuir no desenvolvimento de técnicas para obtenção de biocatalisadores imobilizados de baixo custo e alto poder catalítico para ser empregado na síntese de biodiesel a partir de óleos vegetais pela rota etílica. Baseia-se na utilização de células íntegras de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica (glicerol éster hidrolase – E.C. 3.1.1.3) imobilizadas em suporte adequado. O trabalho experimental foi desenvolvido em diferentes etapas e iniciado pela triagem de linhagens de fungos adquiridas de banco de cultura nacional, com habilidade de produzir lipase intracelular em cultivo submerso. Mediante a avaliação da atividade lipolítica do micélio, foram selecionadas as linhagens dos fungos: *Rhizopus oryzae* (3231 e 4692), *Mucor circinelloides* (4140 e 4182) e *Penicillium citrinum* (4216) e efetuados testes de imobilização por adsorção física (*in situ* e *extra-situ*) da biomassa produzida, utilizando os seguintes suportes: espuma de poliuretano, Celite e polihidroxibutirato. Nas condições testadas, o melhor desempenho foi alcançado pela matriz de poliuretano que permitiu a retenção de elevada concentração de biomassa celular para todas as linhagens selecionadas, exceto para fungo de *P.citrinum* (4216). Testes adicionais de imobilização da biomassa celular na espuma de poliuretano foram efetuados, complementando desta forma, as propriedades físicas e morfológicas desse suporte e do sistema imobilizado. Os resultados indicaram que espumas de poliuretano cortadas em cubos de 6 mm foram mais adequadas para promover completa adsorção da biomassa celular produzida pelos fungos selecionados, em especial do fungo *M. circinelloides* 4182, que apresentou elevado poder catalítico na reação de transesterificação. Em virtude desse fato, as condições de cultivo dessa linhagem foram estudadas, mediante variação das fontes de carbono e nitrogênio, aeração e inóculo. O biocatalisador obtido nas melhores condições (atividade lipolítica= 65 U/g) foi utilizado na etanólise do óleo de babaçu e o processo foi otimizado por meio de um delineamento fatorial, avaliando-se a influência da temperatura (33 – 47°C) e da razão molar entre óleo de babaçu e etanol (1:4,8 – 1:13,2) no rendimento de transesterificação. As condições otimizadas previstas pelo planejamento fatorial foram: temperatura de 35°C e razão molar etanol/óleo de 6:1, obtendo-se rendimento de 90,5% empregando 20% m/m de biocatalisador e terc-butanol como solvente. A estabilidade operacional do biocatalisador foi avaliada em reator operando em regime de bateladas consecutivas e em regime contínuo. Resultados satisfatórios foram obtidos em ambos os sistemas, entretanto o sistema contínuo evitou a dessorção do micélio do suporte, revelando tempo de meia-vida do biocatalisador superior a 20 dias. Finalmente, a influência de óleos vegetais contendo diferentes composições em ácidos graxos (andioba, macaúba, pinhão manso e palma) foi avaliada na reação de etanólise, sendo constatado a preferência do biocatalisador na transesterificação de ácidos graxos de cadeia média, presentes nos óleos de babaçu e macaúba. De forma geral, os resultados obtidos foram promissores e demonstraram a potencialidade de células íntegras de fungos filamentosos imobilizadas na síntese de biodiesel, com destaque para o desempenho obtido pelo fungo *Mucor circinelloides* 4182.

**Palavras chaves:** células íntegras, imobilização, óleos vegetais, biodiesel.

## ABSTRACT

ANDRADE, G. S. S. **Biodiesel production from vegetable oils using immobilized whole cells with high lipase activity (Glycerol Ester Hydrolase – E.C. 3.1.1.3)** 2012, 158f. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2012.

The objective of this work was contributed in developing techniques to obtain immobilized biocatalysts with low cost and high catalytic activity to be applied in the biodiesel synthesis by ethanol route. It is based on the utilization of filamentous fungi whole cells with high lipase activity (glycerol ester hydrolase – E.C.3.1.1.3) immobilized in suitable support. The experimental work was developed in different ways and started by screening fungi strains acquired from National Culture Collection which has the ability to produce intracellular lipase in submerge cultivation. Through lipase activity the fungi strains: *Rhizopus oryzae* (3231 and 4692), *Mucor circinelloides* (4140 e 4182) and *Penicillium citrinum* (4216) were selected. Tests to evaluate the biomass immobilization by physical adsorption (*in situ* and *extra-situ*) using the supports: polyurethane foam, Celite and polyhydroxybutyrate were carried out. The best performance was attained by polyurethane matrix that allowed attain high biomass concentration for all strain fungi, except for *P. citrinum* (4216). Additional tests were performed to complement the physical and morphological properties of support and immobilized system. Results indicated that polyurethane foam cut in cubes 6-mm were suitable to provide full adsorption of biomass from all selected fungi strains, specially strain of *M. circinelloides* 4182 displayed high catalytic activity in the transesterification reaction. Consequently, cultivation conditions of this strain were studied, evaluating the carbon and nitrogen sources, aeration and inoculum level. The biocatalyst obtained under the best conditions (lipase activity = 65 U/g) was used in the ethanolysis of babassu oil and the process was optimized by experimental design. The influence of temperature (33 – 47°C) and ethanol to oil molar ratio (4.8:1 – 13.2:1) were investigated in the transesterification yield. Under the optimized conditions (35°C and oil to ethanol molar ratio 6:1) transesterification yield of 90.5% was obtained employing 20% wt. of biocatalyst and tert-butanol as solvent. The biocatalyst operational stability was assessed under consecutive batch runs and continuous system. Satisfactory results were attained in both systems, however, the continuous system avoided cells desorption from support, revealing biocatalyst half life higher than 20 days. Finally, the influence of vegetable oils with different fatty acid compositions (babassu, andiroba, macauba, *Jatropha*, palm) was studied in the ethanolysis reaction, being evidenced the specificity of the biocatalyst to transesterify medium chain fatty acids as presented in babassu and macauba oils. The results obtained were promise and demonstrated the potential of filamentous fungi whole cells immobilized as biocatalysts in the biodiesel synthesis, with prominence to the performance of *Mucor circinelloides* 4182 strain.

Key words: whole cells, immobilization, vegetable oils, biodiesel.



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 3.1.</b> Aplicações industriais de lipases. ....	<b>37</b>
<b>TABELA 3.2.</b> Principais fungos produtores de lipase. ....	<b>40</b>
<b>TABELA 3.2.</b> Principais fungos produtores de lipase (continuação). ....	<b>41</b>
<b>TABELA 3.3.</b> Parâmetros de crescimento celular que podem ser modificados pela imobilização dos micro-organismos. ....	<b>51</b>
<b>TABELA 3.4.</b> Propriedades desejáveis para seleção de matriz ou suporte para imobilização de células microbianas. ....	<b>52</b>
<b>TABELA 3.5.</b> Reações de hidrólise e esterificação utilizando células íntegras imobilizadas em diferentes suportes. ....	<b>56</b>
<b>TABELA 3.6.</b> Processos de obtenção de biodiesel por transesterificação enzimática empregando células íntegras imobilizadas. ....	<b>58</b>
<b>TABELA 4.1.</b> Linhagens de fungos filamentosos adquiridos do departamento de micologia da UFPE. ....	<b>62</b>
<b>TABELA 4.2.</b> Fornecedores das matérias-primas lipídicas. ....	<b>63</b>
<b>TABELA 4.3.</b> Condições operacionais para determinação dos ésteres de etila por CG. ....	<b>72</b>
<b>TABELA 5.1.</b> Concentração de biomassa e valores máximos de atividade lipolítica do filtrado (extracelular) e da biomassa (intracelular) para os fungos testados. ....	<b>76</b>
<b>TABELA 5.2.</b> Caracterização das propriedades físicas da espuma de poliuretano comercial. ....	<b>82</b>
<b>TABELA 5.3.</b> Comparação entre os valores de biomassa seca e de atividade da biomassa imobilizada em diferentes tamanhos de cubos de poliuretano. ....	<b>85</b>
<b>TABELA 5.4.</b> Valores de rendimento de transesterificação (rend.), viscosidade (visc.) e densidade (dens.) dos produtos obtidos pela etanólise do óleo de babaçu empregando biomassas imobilizadas dos fungos <i>R. oryzae</i> e <i>M. circinelloides</i> . ....	<b>89</b>
<b>TABELA 5.5.</b> Composição em ácidos graxos dos óleos vegetais utilizados como fonte de carbono no cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> 4182. ....	<b>92</b>
<b>TABELA 5.6.</b> Biomassa imobilizada e atividade hidrolítica obtida no cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> empregando diferentes níveis de inóculo e variando os volumes dos frascos. ....	<b>97</b>
<b>TABELA 5.7.</b> Condições ótimas de cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> 4182. ....	<b>98</b>
<b>TABELA 5.8.</b> Efeito do carregamento de células imobilizadas na etanólise do óleo de babaçu. ....	<b>99</b>
<b>TABELA 5.9.</b> Influência de diferentes solventes na síntese enzimática do biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol catalisado por células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182. ....	<b>102</b>
<b>TABELA 5.10.</b> Matriz experimental e resultados obtidos de acordo com o planejamento central 2 <sup>2</sup> estrela rotacional utilizado para avaliar a influência das variáveis: razão molar e temperatura (as variáveis estão codificadas e os valores reais estão entre parênteses) no rendimento da etanólise do óleo de babaçu. ....	<b>104</b>
<b>TABELA 5.11.</b> Estimativa dos efeitos das variáveis, erros padrão e teste t de student's t para o rendimento da etanólise do óleo de babaçu utilizando planejamento central 2 <sup>2</sup> estrela rotacional. ....	<b>107</b>

<b>TABELA 5.12.</b> Análise de variância (ANOVA) para a regressão do moldeio que representa o rendimento da etanólise do óleo de babaçu utilizando o planejamento central 2 <sup>2</sup> estrela rotacional... 109	109
<b>TABELA 5.13.</b> Caracterização do biodiesel purificado de óleo de babaçu..... 111	111
<b>TABELA 5.14.</b> Temperaturas de degradação térmica do óleo de babaçu, diesel mineral e biodiesel catalisado pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182..... 114	114
<b>TABELA 5.14.</b> Valores de biomassa imobilizada e atividade hidrolítica obtidos no cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> 4182 empregando tratamento com GA e PEI 0,1% nas espumas e nas células íntegras imobilizadas. .... 117	117
<b>TABELA 5.16.</b> Valores de rendimento de transesterificação e viscosidade do produto purificado obtido na síntese enzimática do biodiesel a partir do óleo de babaçu e etanol mediado pela biomassa imobilizada de <i>M. circinelloides</i> 4182 tratada com agentes cross-linking (suporte tratado e biomassa tratada). .... 119	119
<b>TABELA 5.17.</b> Valores de biomassa imobilizada e atividade hidrolítica obtidos no cultivo e imobilização das células de <i>M. circinelloides</i> 4182 empregando tratamento com GA e Aliquat 0,1% nas células íntegras imobilizadas. .... 124	124
<b>TABELA 5.18.</b> Variação da concentração de ésteres etílicos, rendimento, produtividade e viscosidade dos sistemas reacionais contínuo empregando células imobilizadas tratadas com GA e Aliquat. .... 128	128
<b>TABELA 5.19.</b> Parâmetros da estabilidade operacional das células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 com e sem tratamento na etanólise do óleo de babaçu operando em sistema contínuo..... 128	128
<b>TABELA 5.20.</b> Resultados referentes à biomassa recuperada e atividades de transesterificação e hidrólise das células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182 com e sem tratamento após etanólise do óleo de babaçu em sistema contínuo. .... 130	130
<b>TABELA 5.21.</b> Composição em ácidos graxos das matérias-primas lipídicas utilizadas na síntese de biodiesel catalisado pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182..... 132	132
<b>TABELA 5.22.</b> Propriedades das matérias-primas lipídicas utilizadas na síntese de biodiesel catalisado pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182..... 134	134
<b>TABELA 5.23.</b> Valores de rendimento, viscosidade e densidade dos produtos obtidos da etanólise dos diferentes óleos vegetais catalisado pelas células imobilizadas de <i>M. circinelloides</i> 4182..... 137	137

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

