

LETÍCIA KAREN DOS SANTOS

Avaliação de diferentes suportes para imobilização de lipases visando à síntese de biodiesel a partir da hidroesterificação de matérias-primas de baixa qualidade

Tese apresentada ao Instituto de Química à Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Química.

Orientador:

Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan

Co-orientador:

Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Araraquara

2022

S237a Santos, Letícia Karen dos

Avaliação de diferentes suportes para imobilização de lipases visando à síntese de biodiesel a partir da hidroesterificação de matérias-primas de baixa qualidade / Letícia Karen dos Santos. -- Araraquara, 2022

126 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Danilo Luiz Flumignan

Coorientadora: Ariela Veloso de Paula Paula

1. Catalisadores. 2. Óleos vegetais. 3. Biocombustíveis. 4. Impressão 3D. 5. Polímeros impressos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Avaliação de diferentes suportes para imobilização de lipases visando à síntese de biodiesel a partir da hidroesterificação de matérias-primas de baixa qualidade"

AUTORA: LETÍCIA KAREN DOS SANTOS

ORIENTADOR: DANILO LUIZ FLUMIGNAN

COORIENTADORA: ARIELA VELOSO DE PAULA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DANILO LUIZ FLUMIGNAN (Participação Virtual)
Departamento de Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



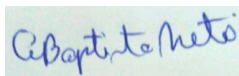
Prof. Dr. JÚLIO CESAR DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / USP - Escola de Engenharia de Lorena - SP

MURILO DANIEL DE MELLO
INNOCENTINI:10290211808
Assinado de forma digital por MURILO DANIEL DE MELLO
INNOCENTINI:10290211808
Dados: 2022.03.03 12:43:50 -03'00'

Prof. Dr. MURILO DANIEL DE MELLO INNOCENTINI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Química / Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP - Ribeirão Preto



Profa. Dra. GRAZIELLE SANTOS SILVA ANDRADE (Participação Virtual)
Instituto de Ciência e Tecnologia / Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - Poços de Caldas



Prof. Dr. ALVARO DE BAPTISTA NETO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 03 de março de 2022

DADOS CURRICULARES

Letícia Karen dos Santos

Endereço para acessar curriculum lattes: <http://lattes.cnpq.br/2129379201879042>

Formação acadêmica/titulação

2016 – atual - Doutorado em Química. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2014 – 2016 - Mestrado em Química. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2010 – 2013 - Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis. Instituto Federal de São Paulo, IFSP, São Paulo, Brasil.

Atuação profissional

2021 – atual – Pesquisadora: Embrapa Agroenergia –Brasília – DF

2018 – 2020 – Pesquisadora: Cempecq – UNESP – IQ Araraquara – SP

Artigos completos publicados em periódicos

1. BARBOSA, SANDRO L.; ROCHA, ADELINE C. PEREIRA; NELSON, DAVID LEE; DE FREITAS, MILTON S.; MESTRE, ANTÔNIO A. P. FULGÊNCIO; KLEIN, STANLEI I.; CLOSOSKI, GIULIANO C.; CAIRES, FRANCO J.; FLUMIGNAN, DANILO L.; **DOS SANTOS, LETÍCIA KAREN**; WENTZ, ALEXANDRE P.; PASA, VÂNIA M. DUARTE; RIOS, REGIANE D. FERNANDES. **Catalytic Transformation of Triglycerides to Biodiesel with SiO₂-SO₃H and Quaternary Ammonium Salts in Toluene or DMSO**. MOLECULES. , v.27, , 2022 IF: 4.0 – doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27030953>.

2. BOTTI, R.F.; INNOCENTINI, M.D.M.; FALEIROS, T.A.; MELLO, M.F.; FLUMIGNAN, D.L.; **DOS SANTOS, Letícia KAREN**.; FRANCHIN, G.; COLOMBO, P. **Additively manufactured geopolymer structured heterogeneous catalysts for biodiesel production**. Applied Materials Today., v.23, 2021. IF- 10.3 - doi: <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101022>

2. **DOS SANTOS, LETÍCIA KAREN**; FUSS BOTTI, RENATA; DE MELLO INNOCENTINI, MURILO DANIEL; FERNANDO COSTA MARQUES, RODRIGO; COLOMBO, PAOLO; DE PAULA, ARIELA VELOSO; LUIZ FLUMIGNAN, DANILO. **3D Printed Geopolymer: an efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase**. Chemical Engineering Journal., v.414, 2021. IF 10.6 – doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128843>

3. BOTTI, R. F.; INNOCENTINI, M. D.; FALEIROS, T. A.; MELLO, M. F.; FLUMIGNAN, D. L.; **DOS SANTOS, LETÍCIA KAREN**; FRANCHIN, G.; COLOMBO, P. Biodiesel Processing Using Sodium and Potassium Geopolymer Powders as Heterogeneous Catalysts. *Molecules*, v.25 , 2020. IF 3.0 - doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25122839>

4. DOMINGUES, OTÁVIO; **SANTOS, LETÍCIA KAREN DOS**; HERCULANO, RONDINELLI DONIZETTI; FLUMIGNAN, DANILO LUIZ; PAULA, ARIELA VELOSO DE PAULA. **Evaluation of magnetic carriers employed for immobilization of lipase from *candida rugosa***. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*. , v.6, p.0498 - 0504, 2020. doi: <https://doi.org/10.18540/jcecvl6iss4pp0498-0504>

5. **DOS SANTOS, LETÍCIA KAREN**; HATANAKA, RAFAEL RODRIGUES; DE OLIVEIRA, JOSÉ EDUARDO; FLUMIGNAN, DANILO LUIZ. **Production of Biodiesel from Crude Palm Oil by a Sequential Hydrolysis/Esterification Process using Subcritical Water**. *RENEWABLE ENERGY*, v.130, p.633 - 640, 2018. IF:6.2 - doi: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.102>

6. **DOS SANTOS, LETÍCIA KAREN**; HATANAKA, RAFAEL RODRIGUES; DE OLIVEIRA, JOSÉ EDUARDO; FLUMIGNAN, DANILO LUIZ. **Experimental factorial design on hydroesterification of waste cooking oil by subcritical conditions for biodiesel production**. *RENEWABLE ENERGY*, v.114, p.574 - 580, 2017. IF: 6.2. – doi: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.066>

Patente

1. **SANTOS, L. K.**; OLIVEIRA, J. E; FLUMIGNAN, D. L. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIODIESEL POR HIDROESTERIFICAÇÃO EM CONDIÇÃO SUBCRÍTICA, 2017. Categoria: Processo. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR10201701823. Data de depósito: 25/08/2017. Depositante/Titular: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

*Aos meus pais, por todo amor,
carinho e apoio ao longo de toda
minha vida.*

Agradecimentos

A Deus, por seu infinito amor;

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan, pela orientação, amizade, confiança, disponibilidade e paciência que teve comigo, durante todos esses anos; e que muito contribuí para o enriquecimento do meu conhecimento científico e de mundo;

A minha co-orientadora, a Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula, pela disponibilidade, amizade, apoio e incentivo, contribuindo para o meu amadurecimento profissional;

E aos meus pais Carlos e Rosa, por todo amor, por toda a amizade, pelos exemplos ao longo de toda minha vida, incentivo, confiança, e apoio incondicional;

Aos pesquisadores do Cempeq, Antônio, Camila, Gabrielle, Larissa, Lúcia, Maurício, Rafael e Wesley pelas orientações, colaborações no trabalho e pela amizade;

Ao Cempeq, em especial a Isabela, Karol e Malu, pela convivência, pela paciência e por terem me ajudado sempre que precisei, também deixo uma lembrança especial a todos que fizeram parte da equipe Cempeq entre o início de 2016 até início de 2022;

Aos pesquisadores do EnziTag, que muito me ensinaram sobre enzimas, pelas partilhas e por deixarem os dias mais alegres no laboratório, em especial o **Otávio** que foi meu aluno de IC;

Aos pesquisadores, Prof. Dr. Murilo Daniel de Mello Innocentini (UNAERP), Prof. Dr. Paolo Colombo e PhD Renata Fuss Botti (Universidade de Pádua) pela colaboração com as peças em 3D que muito enriqueceu este trabalho;

Aos meus amigos; pelos momentos de descontração, por entender e aceitar a minha ausência e torcerem por mim;

Aos meus avós, por sempre orarem por mim;

A Thalyse Santana, por me mostrar que a vida mais leve se inicia com saúde mental;

A banca, por contribuir para o enriquecimento deste trabalho;

A CAPES, CNPq e a Fundunesp por apoiar o programa de pós-graduação da UNESP –IQ

Enfim, a todos que compartilharam, compartilham e compartilharão do meu eterno aprendizado.

A todos, muito obrigada!

*“Não há um centímetro quadrado deste mundo
do qual Cristo não possa dizer: é meu”.*

Abraham Kuyper.

Resumo

Óleos e gorduras residuais (OGR) e óleos brutos são um desafio para a produção de biodiesel via transesterificação. Neste cenário, surge como alternativa, a hidroesterificação, processo que envolve duas etapas consecutivas, hidrólise seguida de esterificação e que permite o uso de qualquer matéria-prima graxa. Neste trabalho avaliou-se suportes como argila, grafite, partículas magnéticas e geopolímero impresso em 3D para a imobilização da lipase de *Candida rugosa* para a aplicação na reação de hidrólise, primeira etapa para a produção de biodiesel por hidroesterificação do OGR e óleo de palma bruto. As imobilizações foram testadas por meio de adsorção física e ligação. Os melhores resultados foram obtidos por ligação covalente no suporte de geopolímero impresso em 3D, obtendo um biocatalisador com atividade hidrolítica específica de 815 U/g. Caracterizou-se a atividade do biocatalisador obtendo a melhor ação no pH 3,98 e temperatura de 55 °C. Aplicando-se o biocatalisador na reação de hidrólise do OGR obteve-se conversão de 90,0 % de ácidos graxos com 3 ciclos de 24 horas; já na reação com óleo de palma bruto foi possível obter 94,5 % de conversão. A produção de biodiesel a partir da esterificação, forneceu conversão de ácidos graxos proveniente do OGR de 98,3 % de ésteres metílicos e para os ácidos graxos do óleo de palma bruto 97,1 %. O processo de imobilização da lipase *Candida rugosa* no suporte de geopolímero impresso em 3D traz tecnologia e inovação para os processos de produção de biodiesel e apresenta uma alternativa viável e sustentável, utilizando matérias-primas de baixo valor agregado, contribuindo para a produção de combustíveis renováveis.

Abstract

Waste cooking oils (OGR) and crude oils are a challenge for production of biodiesel via transesterification. In this scenario, hydroesterification appears as an alternative, a process that involves two consecutive steps, hydrolysis followed by esterification, and which allows the use of any fatty raw material. In this work, supports such as clay, graphite, magnetic particles, and 3D printed geopolymers were evaluated for the immobilization of *Candida rugosa* lipase for application in the hydrolysis reaction, the first step for the production of biodiesel by hydroesterification of OGR and crude palm oil. . The immobilizations were tested utilizing physical adsorption and covalent bond. The best results were obtained by covalently bonding the 3D printed geopolymer support, obtaining a biocatalyst with a specific hydrolytic activity of 815 U/g. The activity of the biocatalyst was characterized, obtaining the best action at pH 3.98 and a temperature of 55 °C. Applying the biocatalyst in the hydrolysis reaction of the OGR, a conversion of 90.0% of fatty acids was obtained with 3 recycles of 24 hours; in the reaction with crude palm oil, it was possible to obtain 94.5% of conversion. The production of biodiesel from esterification provided conversion of fatty acids from the OGR of 98.3% of methyl esters and to the fatty acids of crude palm oil of 97.1%. The process of immobilization of lipase *Candida rugosa* on the 3D-printed geopolymer support brings technology and innovation to biodiesel production processes and presents a viable and sustainable alternative, using raw materials of low added value, contributing to the production of renewable fuels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de hidrólise para óleos e gorduras	20
Figura 2. Reação de Transesterificação de óleos e gorduras	21
Figura 3. Reações secundárias que podem ocorrer durante a transesterificações de óleos vegetais: (1) hidrólise, (2) saponificação e (3) neutralização de ácidos graxos livres	23
Figura 4. Hidrólise de triacilglicerídeos.....	24
Figura 5. Esterificação de ácidos graxos.....	25
Figura 6. Reações com triglicerídeos utilizando como biocatalisador lipases.....	28
Figura 7. Desenhos esquemáticos mostrando as estruturas (a) da folha tetraédrica, (b) da folha octaédrica, (c) mineral argiloso tipo 2:1 e (d) mineral argiloso tipo 1:1.	35
Figura 8. Estrutura cristalina da Maghemita.....	36
Figura 9. Estrutura cristalina da Magnetita.....	37
Figura 10. Fluxograma das etapas desenvolvidas.....	40
Figura 11. Esquema do teste de permeação de fluxo de ar.....	47
Figura 12. Fotos das amostras de geopolímero testadas.	48
Figura 13. Esquema do sistema da reação de hidrólise utilizado quando utilizado o suporte de geopolímero impresso em 3D. (1) recipiente de mistura de reação; (2) agitador magnético; (3) bomba peristáltica; (4) reator; (5) amostra; (6) camisa de água, (7) banho de água de recirculação	63
Figura 14. Sequência dos aminoácidos do flap da CRL, os resíduos em vermelho são hidrofóbicos.	70
Figura 15. Lipase <i>Candida rugosa</i> Lip1.....	70
Figura 16. Estabilidade a temperatura e pH da lipase de <i>Candida rugosa</i>	71
Figura 17. pH ótimo da lipase de <i>Candia rugosa</i> pelo o método de atividade hidrolítica	72
Figura 18. Espectroscopia de infravermelho (FTIR) da CRL.....	73
Figura 19. Reação de hidrólise controle - Lipase de <i>Candida rugosa</i> livre em comparação com a Novozyme 453 tempo de reação 24 horas utilizando OGR.....	74
Figura 20. Reação de hidrólise utilizando a enzima Novozyme 435. A – fase de ácidos graxos livres com a enzima Novozyme 435, B- Fase aquosa rica em glicerol.	75
Figura 21. Processo de modificação da superfície e imobilização por ligação covalente.	78
Figura 22. Espectro de Infravermelho do suporte argilomineral Caulim (azul), Caulim com APTES (verde) e APTES (preto).	80
Figura 23. Grafite flakes mw 12,01 – 100 mesh.....	81
Figura 24. Maghemita seca.	83

Figura 25. MEV do biocatalisador estudado em distintas ampliações: (a) MGM pura; (b)MGM@RL – ligação covalentemente.....	86
Figura 26. Gráfico de intensidade por graus obtidos para o estudo da Difração de Raio X (DRX) da maghemita pura e do derivado imobilizado covalentemente.	88
Figura 27. FTIR da Maghenita sintetizada, ativada e imobilizada com CRL.....	89
Figura 28. Mapa de permeabilidade com classificação de materiais porosos e localização dos carregadores de enzimas	91
Figura 29. Curvas de queda de pressão simuladas para três biocatalisadores enzimáticos porosos	92
Figura 30. Determinação de aminas em amostras geopolímero impressas com superfícies funcionalizadas (SF-Geo) usando ensaios colorimétricos de ninidrina.	94
Figura 31. Espectros de FTIR do Na-Geo e das etapas de imobilização da CRL	95
Figura 32. Gráfico com valores de proteína no sobrenadante durante o tempo de estudo	97
Figura 33. Imagens do MEV detalhes de superfície: (a) e (b) morfologia do geopolímero antes da imobilização da lipase (amostra Na-Geo); (c) e (d) morfologia do geopolímero após a imobilização da lipase (amostra CRL-Geo).	98
Figura 34. RMN de ^{13}C e ^{29}Si das amostras Geo-Na; b) SF-Geo; c) CRL-Geo).....	99
Figura 35. O gráfico de contorno da superfície de resposta obtida de acordo com o modelo predito para a atividade hidrolítica do CRL-Geo em função do pH e da temperatura.....	102
Figura 36. Influência da concentração substrato para atuação do biocatalisador para os diferentes tipos de óleos – pH 3,98 e temperatura 55 °C.....	104
Figura 37. Diferenças entre as emulsões para o estudo de concentração de substrato	105
Figura 38. Sistema da reação de hidrólise	106
Figura 39. Reator com o biocatalisador CRL-Geo no 2º reuso matéria-prima Palma - A) Antes da reação, B) Durante as primeiras horas de reação, C) após 24 horas D)Vista superior	108
Figura 40. Ésteres metílicos produzidos na 2º Etapa da hidroesterificação.	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre os tipos de catalisadores usados para produção de biodiesel (14–17).	22
Tabela 2. Diferentes fontes de lipase microbiana (Christopher et al. 2014 (39)).	27
Tabela 3. Comparação entre lipase livre e imobilizada (46–48).....	30
Tabela 4. Fatores levado em consideração antes da imobilização de enzimas	33
Tabela 5 . Características físicas das amostras de geopolímero testadas.....	48
Tabela 6. Níveis do planejamento composto central	54
Tabela 7. Soluções tampões 0,1 M usados no preparo da emulsão.	55
Tabela 8. Proporção de substrato e tampão no preparo da emulsão	56
Tabela 9 - Condições da análise de perfil composicional	61
Tabela 10. Índice de acidez do óleo vegetal	67
Tabela 11. Teor de água nas amostras	68
Tabela 12. Perfil composicional dos óleos obtido por CG-DIC	69
Tabela 13. Atividade hidrolítica da lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizadas por adsorção em Cau- lim, Argila Montmorilonita, Vermiculita.....	76
Tabela 14. Atividade hidrolítica da lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizadas por adsorção em Cau- lim, Argila Montmorilonita, Vermiculita.....	78
Tabela 15. Reação de hidrólise com OGR em pH 5 utilizando os biocatalisadores de argilominerías imobilizados pelo processo de ligação covalente	79
Tabela 16. Atividade hidrolítica do biocatalisadores de grafite com a lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada.....	81
Tabela 17. Atividade hidrolítica do biocatalisadores de grafite com a lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em diferentes pH e temperatura	82
Tabela 18. Dados de atividade hidrolítica e rendimento de imobilização dos derivado imobilizados em nanopartículas magnéticas imobilizados por adsorção física.....	84
Tabela 19. Dados de atividade hidrolítica e rendimento dos biocatalisadores em nanopartículas magnéticas imobilização do derivado imobilizado por ligação covalente.....	85
Tabela 20. Dados da Análise Elementar Superficial (EDS) da maghemita pura e do derivado imobilizado.....	87
Tabela 21. Atividade hidrolítica da lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizadas por adsorção no geopolímero impresso em 3D	90
Tabela 22. .Composição química (% em peso) obtida por EDS / SEM no geopolímero impressos ao longo do processo de troca iônica (Na^+ a NH_4^+).	93

Tabela 23. Rendimento de imobilização e atividade hidrolítica para diferentes carregamentos em SF-GEO.....	96
Tabela 24. Matriz com valores utilizados para o planejamento fatorial, bem como as atividades hidrolíticas determinadas para o estudo da influência das variáveis pH e temperatura.....	101
Tabela 25. Análise da Variância para a atividade hidrolítica do CRL-Geo.....	101
Tabela 26. Estabilidade a temperatura do biocatalisador CRL-Geo nos pontos 3 e 5 do planejamento de experimentos.....	103
Tabela 27. Constantes cinéticas de Michaelis-Menten (k_m) e velocidade máxima de reação (V_{max}) determinadas de acordo com o sistema gráfico de Lineweaver-Burk.	105
Tabela 28. Teor de ácidos graxos, mono-, di- e triglicerídeo após a reação de hidrólise de 24 horas utilizando como matéria-prima OGR.....	107
Tabela 29. Teor de ácidos graxos, mono-, di- e triglicerídeo após a reação de hidrólise de 24 horas utilizando como matéria-prima óleo de Palma	107
Tabela 30. Teor de ésteres.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG – Ácidos graxos

ANOVA – Análise de Variância (do Inglês *Analysis of Variance*)

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ANVISA – Agência Nacional da Vigilância Sanitária

AOCS – American Oil Society

APTES - 3-aminopropiltrietoxisilano

ASTM – American Society For Testing and Materials

CRL – Lipase *Candida rugosa*

Cempecq – Centro Multidisciplinar de Pesquisa em Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados

CG-DIC – Cromatógrafo a gás com detector por ionização de chama

DIW - Escrita direta / Direct Ink Writing

DG – Diacilglicerídeos

EN – Norma Europeia (do inglês *European Standard*)

MG – Monoacilgliceróis

Magnetita (MGN)

maghemita (MGM)

MP – Material particulado

Na-Geo - Geopolímeros a base de sódio

OGR – Óleos e gorduras residuais

TG – Triglicerídeos

WCO – Waste cooking oil

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Óleos e gorduras	19
2.2	Biodiesel.....	20
2.3	Hidroesterificação.....	23
2.4	Matérias – primas	25
2.5	Produção de biodiesel por biocatalisadores	26
2.5	A lipase - <i>Candida rugosa</i>	30
2.6	Imobilização	31
2.7	Suporte para a imobilização	33
2.8.1	Argilas.....	34
2.8.2	Grafite.....	35
2.8.3	Suportes Magnéticos.....	36
2.8.4	Geopolímeros e impressão 3D.....	37
3	OBJETIVO	39
4	EXPERIMENTAL	40
4.1	Coleta e armazenamento das amostras	41
4.2	Suportes	41
4.2.1	Síntese das partículas magnéticas	41
4.2.2	Produção do suporte 3D de geopolímero.....	43
4.2.3	Tratamento da superfície do suporte de geopolímero impresso em 3D.....	44
4.2.3.1	Modificação de superfície do Geo –Na e Geo- K.....	44
4.2.3.2	Troca iônica.....	44
4.2.3.3	Ativação com APTES.....	45
4.2.3.4	Determinação de grupos funcionais de amina por colorimetria.....	45
4.2.4	Caracterização física do geopolímero.....	46

4.2.4.1 Permeabilidade.....	46
4.2.4.1.1 Amostras para o teste de permeabilidade.....	48
4.3 Imobilização	49
4.3.1 Imobilização da Lipase de <i>Candida rugosa</i> por adsorção.....	49
4.3.2 Imobilização da Lipase de <i>Candida rugosa</i> por ligação covalente.....	49
4.4 Avaliação da eficiência da imobilização da lipase candida rugosa nos suportes hidrofílicos, hidrofílicos modificados e magnéticos.....	51
4.4.1 Determinação de Proteína.....	51
4.4.2 Determinação da Atividade Hidrolítica.....	51
4.4.3 Fluorimetria diferencial de varredura (ThermoFluor).....	52
4.4.4 Determinação do Teor de Umidade.....	53
4.4.5 Rendimento de Imobilização.....	53
4.4.6 REUSO	54
4.5 Caracterização do biocatalisador selecionado.....	54
4.5.1 Testes de Estabilidade do Biocatalisador	55
4.5.1.1 Temperatura e pH.....	55
4.5.1.2 Concentração e tipo de substrato para avaliar parâmetros cinéticos.....	56
4.5.3 Ressonância magnética nuclear protônica.....	57
4.5.4 Teste de dessorção (Lixiviação).....	57
4.6 ANÁLISE DAS MATÉRIAS-PRIMAS PARA A HIDROESTERIFICAÇÃO	57
4.6.1 Teor de ácidos graxos livres e índice de acidez.....	57
4.6.2 Determinação do teor de água por Karl Fischer.....	59
4.6.3 Perfil composicional do óleo.....	60
4.7 REAÇÕES DE HIDRÓLISE.....	62
4.7.1 Hidrólise – geração de ácidos graxos.....	62
4.8 Tratamento estatístico dos resultados.....	63
4.9 Reações de esterificação - geração de ésteres metílicos de ácido graxos	63
4.9.1 Reação de Esterificação (<i>adaptado de Hassan; Vinjamur,2014(99)</i>).....	64
4.9.1.2 Estudo das conversões nas reações de esterificação.....	64

4.9.1.3 Separação dos ésteres metílicos (biodiesel).....	64
4.9.1.4 Secagem dos ésteres metílicos (biodiesel).....	65
4.9.2 Ensaio comparativo	65
4.9.2.2 Reação de Transesterificação com geopolímero de sódio e potássio (adaptado de Garcia, 2007 (102))......	65
4.9.2.3 Separação da mistura ésteres metílicos (biodiesel) e glicerol.....	65
4.9.2.4 Lavagem dos ésteres metílicos (biodiesel).....	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
5.1 Matéria-prima para a reação de hidroesterificação	67
5.1.1 Teores de ácidos graxos livres, índices de acidez e teores de umidade.....	67
5.3.2 Perfis composicionais dos óleos.....	68
5.2 LIPASE DE CANDIDA RUGOSA (CRL)	69
5.1.1 Determinação da estabilidade térmica – Thermofluor.....	70
5.1.2 Espectroscopia de infravermelho (FTIR) – Lipase <i>Candida rugosa</i>	72
5.1.3 Reação de hidrólise – controle.....	73
5.2 Imobilização	75
5.2.1 Argilas.....	75
5.2.1.1 Argilas: Imobilização por adsorção física nos suportes.....	75
5.2.1.2 Argilas: Imobilização por Ligação covalente.....	77
5.2.2 Grafite.....	80
5.2.2.1 Imobilização em Grafite.....	81
5.2.3 Partículas magnéticas.....	83
5.2.3.1 Imobilização nas partículas magnéticas.....	84
5.2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise elementar superficial (EDS).....	85
5.2.3.3 Difração de Raio X (DRX).....	88
5.2.3.4 FTIR - Espectroscopia de infravermelho da Maghemita (MGM).....	88
5.2.5 Geopolímero.....	89
5.2.5.1 Caracterização física do geopolímero impresso em 3D.....	91
5.2.5.2 Troca iônica.....	92

5.2.5.3	Funcionalização de superfície.....	93
5.2.3.4	FTIR - Espectroscopia de infravermelho do geopolímero.....	94
5.2.5.5	Imobilização da CRL no SF-Geo.....	95
5.2.5.7	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) no geopolímero.....	97
5.2.5.8	Ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^{29}Si	98
5.2.6	Planejamento composto central para a determinação das melhores condições operacionais	100
5.2.7	Estabilidade a temperatura do CRL-Geo.....	103
5.2.8	Determinação dos parâmetros cinéticos do biocatalisador CRL-Geo.....	104
5.3	REAÇÃO DE HIDRÓLISE COM O BIOCATALISADOR CRL-GEO	106
5.4	PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÁLICOS	109
5.5.1	Reação de esterificação – 2 etapa da hidroesterificação.....	109
5.5.2	Reação de transesterificação.....	110
5.5.3	Teor de ésteres.....	111
6	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS:.....	115

1 INTRODUÇÃO

Em 2020, devido a pandemia causada pela COVID-19, diversos países acharam necessário que as pessoas reduzissem suas atividades fora de suas casas, muitas pessoas trabalharam em sistema home office, e em diversas metrópoles, ao redor do mundo, observaram a melhora na qualidade do ar nesse período e redução significativa de CO, CO₂, NO_x, e material particulado, um exemplo foi a cidade de São Paulo, que observou até uma redução em supertempestades devido a melhora da qualidade do ar (1).

Essa experiência vivenciada mostra o quanto nós nos movemos e como consumimos intensivamente combustíveis fósseis e seus derivados. Os combustíveis fósseis são uma fonte finita na natureza, sendo que, a busca por fontes renováveis de energia principalmente para substituir os combustíveis fósseis de primeira geração como o diesel e a gasolina não é somente porque eles têm fim com data prevista, mas também devido a qualidade do ar.

Amplamente considerado promissor no setor de transporte, os biocombustíveis como o biodiesel possuem propriedades e atributos vantajosos, pois promovem a redução das emissões de gases e de material particulado, possuem semelhança ao óleo diesel pode ser utilizado na maioria dos motores a diesel em sua forma pura B100 ou com misturas em qualquer porcentagem.

Com a demanda crescente de combustíveis o biodiesel desempenhará um papel significativo no aumento da demanda por combustíveis nas próximas décadas. Entretanto mesmo havendo grande disponibilidade de matérias-primas, como óleos vegetais e gorduras, há uma limitação no processo convencional, via transesterificação, que é a aquisição de matérias-primas que devem ser de acidez e teor de umidade reduzido, o qual inviabiliza o uso de diversas matérias-primas e eleva o custo pois se adequa aos óleos vegetais refinados (2).

No entanto, o processo de hidroesterificação (reação de hidrólise seguida de esterificação) é a mais moderna alternativa na produção de biodiesel, pois permite o uso de qualquer matéria-prima graxa, independente dos teores de acidez e umidade. A hidrólise consiste em uma reação química entre o óleo (ou gordura) com a água na presença de um catalisador, gerando glicerol (coproduto) e ácidos graxos que são esterificados com álcool, obtendo-se um éster com elevada pureza (biodiesel)(3).

Dessa forma, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar diferentes suportes: argilas; grafite; magnéticos e geopolímeros impressos em 3D para a imobilização da lipase *Candida rugosa* visando à utilização desta enzima como biocatalisador na reação de hidrólise de matérias-primas de baixa qualidade – primeira etapa na segunda etapa os ácidos graxos serão esterificados via catálise química, permitindo a obtenção de biodiesel de alta pureza. Trata-se, portanto, de uma tentativa de eliminar, através do processo de produção de biodiesel em duas etapas, os problemas

reacionais encontrados no processo de transesterificação convencional. Sendo assim, o estudo propõe uma estratégia inovadora na cadeia produtiva do biodiesel, visando à utilização sustentável da matéria-prima de baixa qualidade, e consequentemente, contribuindo para o aumento do biodiesel na matriz energética e o desenvolvimento econômico e social deste mercado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

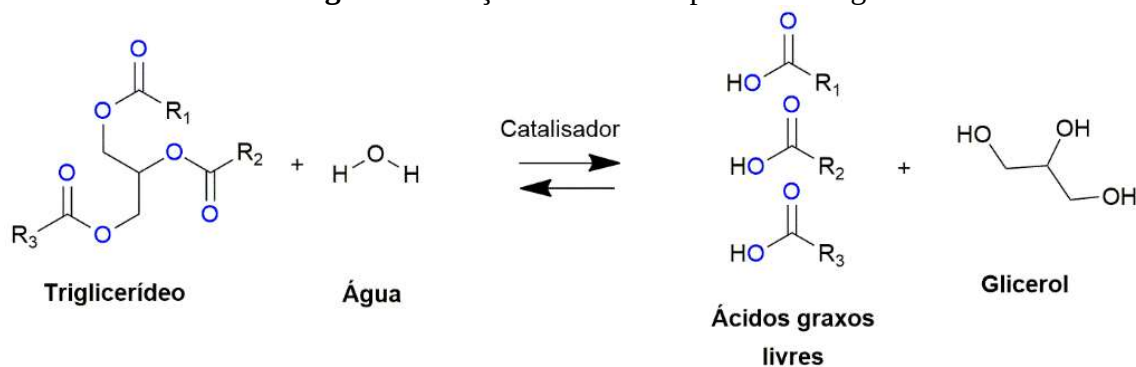
A história do biodiesel não inicia na última década, quando o mundo se vê frente a grande demanda energética, e seus desafios ambientais. Rudolf Diesel em 1898 apresentou na Feira Mundial de Paris, um motor abastecido com óleo de amendoim mais eficiente que os motores a vapor usados na época, e fez a seguinte afirmativa:

“O motor a diesel pode ser alimentado por óleos vegetais e ajudará no desenvolvimento agrário dos países que vierem a utilizá-lo (...). O uso de óleos vegetais como combustível pode parecer insignificante hoje em dia. Mas com o tempo (estes óleos) tornar-se-ão tão importantes quanto o petróleo e o carvão são atualmente.” Rudolf Diesel, 1912 (4).

2.1 Óleos e gorduras

Os óleos e gorduras são ricos em triglicerídeos (TAG) muitas vezes obtidos a partir de oleaginosas ou fonte animal, são matérias-primas para a produção de biodiesel, que é uma alternativa biodegradável e mais limpa ao óleo diesel.

Os triglicerídeos são consumidos a milhares de anos entretanto foi somente no século XIX que iniciou as primeiras pesquisas sobre a constituição de óleos e gorduras com o químico e físico Michel-Eugène Chevreul, que observou que os óleos e gorduras são misturas relativamente complexas, que a hidrólise de óleos e gorduras dava origem a ácidos graxos livres e glicerol (5) conforme demonstrado na **Figura 1**.

Figura 1. Reação de hidrólise para óleos e gorduras

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dessa observação, os óleos e gorduras passaram a ser chamados de ésteres de glicerol (glicerídeos, acilglicerídeos ou triacilglicerídeos). Desta forma, o triglicerídeo é um éster formado a partir de ácidos carboxílicos de cadeia longa (ácidos graxos) e glicerol. As unidades acila, correspondentes aos ácidos graxos, representam cerca de 95 % da massa molecular dos trigliceróis (6). As propriedades físicas, químicas e nutricionais de óleos e gorduras dependem, fundamentalmente, da natureza, do número de átomos de carbono e posição dos grupos acila presentes nas moléculas dos trigliceróis (7).

Os ácidos graxos mais comuns encontrados nos óleos e gorduras que constituem os triglicerídeos apresentam 12, 14, 16 ou 18 átomos de carbono, embora ácidos com menor ou maior número de átomos de carbono possam ser encontrados (7).

Devido à grande variedade de ácidos graxos é evidente que os óleos e gorduras são compostos de muitos tipos de triglicerídeos com diferentes graus de insaturações. Nos óleos e gorduras, além dos triglicerídeos, há em sua composição quantidades significativas de ácidos graxos livres, fosfolípidios, esteróis e tocoferóis.

No entanto, as propriedades mais importantes dos óleos vegetais e gorduras para uso como biocombustíveis incluem alto teor de energia; poder calorífico comparável ao dos hidrocarbonetos derivados do petróleo; baixo teor de enxofre e nitrogênio e carbono neutro (8,9).

2.2 Biodiesel

O biodiesel é composto por ésteres alquílicos de ácidos graxos, podendo ser sintetizado por catálise química, enzimática ou sob condições supercríticas, a partir de matérias-primas renováveis definidas como (10):

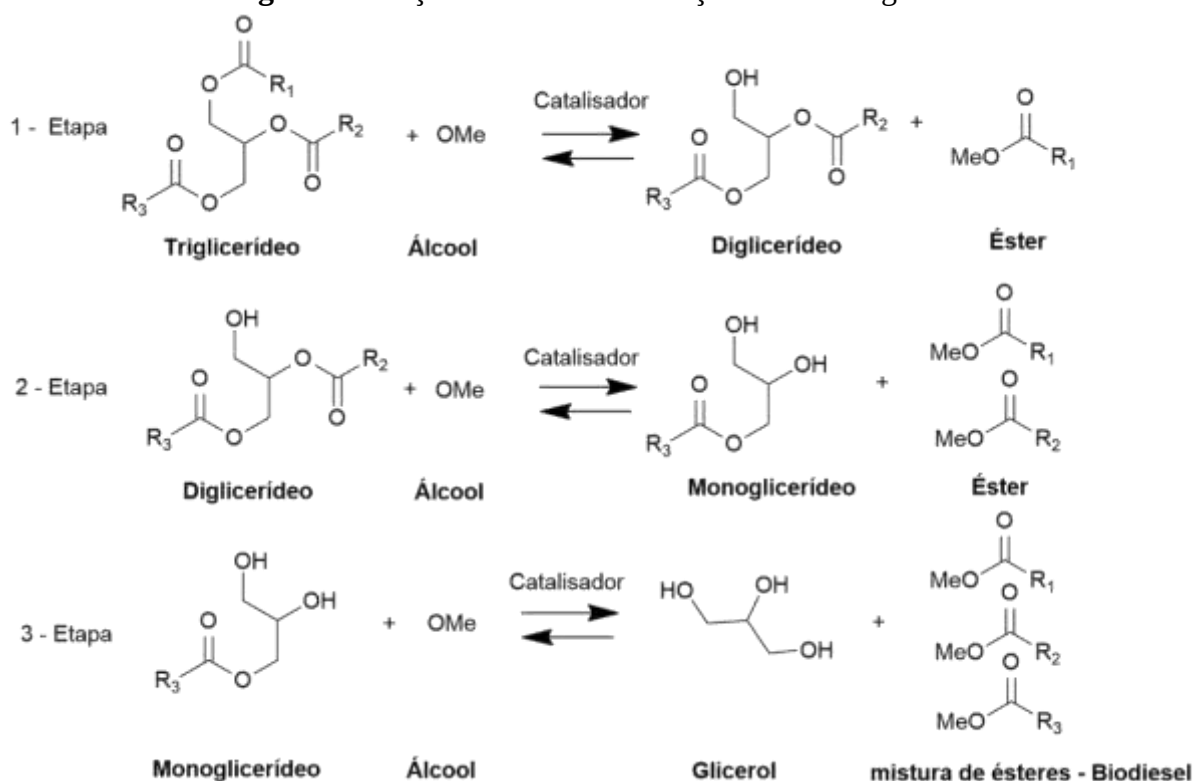
- (i) Primeira geração: óleo vegetal comestíveis;
- (ii) Segunda geração: óleo vegetal não comestível;
- (iii) Terceira geração: óleo de algas, óleo residual de fritura/cozinha e gorduras animais;
- (iv) Quarta geração: óleo sintetizado.

Historicamente, a tecnologia de produção no Brasil começou na década de 1980 com a primeira planta piloto de Expedito Parente no nordeste do Brasil (11). Desde então, no mundo, o biodiesel tem despertado a atenção por ser um combustível renovável, biodegradável e não tóxico, possibilitando o desenvolvimento de uma fonte de energia sustentável.

O biodiesel é miscível e físico-quimicamente semelhante ao óleo diesel e utilizável em motores diesel sem a necessidade de adaptações significativas ou numerosas (12).

A principal rota de produção de biodiesel é a reação de transesterificação por catálise de base homogênea. O termo transesterificação, em geral, é usado para descrever uma importante classe de reações orgânicas em que um éster é transformado em outro, através da troca de grupos alcóxido na presença de um catalisador produzindo uma mistura de ésteres monoalquílicos e glicerol (**Figura 2**).

Figura 2. Reação de Transesterificação de óleos e gorduras



Fonte: Elaborada pela autora.

A síntese do biodiesel é uma sequência de três reações consecutivas e reversíveis em que os triglicerídeos são gradualmente convertidos em diglicerídeos e monoglicerídeos como intermediários, um mol do éster é liberado em cada etapa.

A reação de transesterificação pode ser acelerada por catalisadores químicos (homogêneos ou heterogêneos), biocatalisadores (livres ou imobilizados) ou não catalíticos (supercríticos), conforme apresentado na **Tabela 1**. As vantagens e desvantagens de cada processo também foram detalhadas. Além disso, o biodiesel pode ser produzido por outras vias, como esterificação, hidroesterificação ou processos não catalíticos (13).

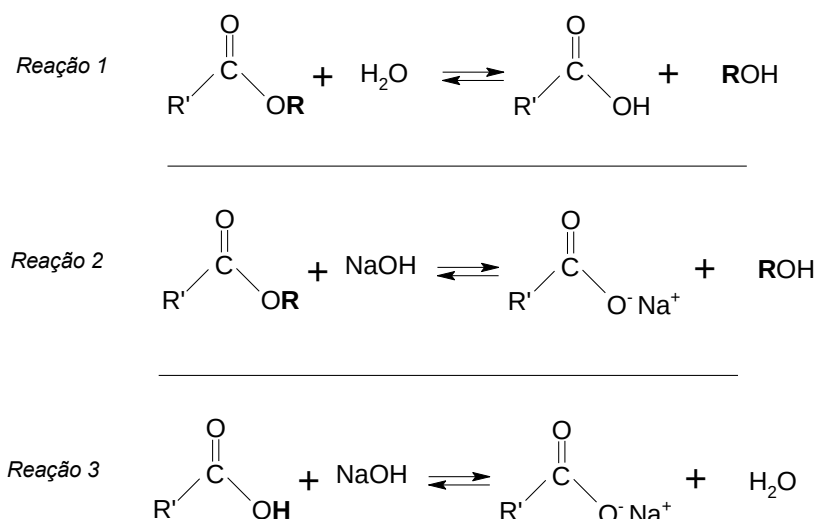
Tabela 1. Comparação entre os tipos de catalisadores usados para produção de biodiesel (14–17).

Tipo de catalisador	Vantagens	Desvantagens
Homogêneos	Taxa de reação muito rápida	O glicerol de baixa qualidade produzido requer, portanto, um longo processo de destilação para purificação
	Alta conversão ($\geq 99\%$)	Natureza higroscópica dos catalisadores (NaOH, KOH)
	A matéria-prima deve ser de alta qualidade para manter o rendimento do processo: livre de AGL ($< 0,5\%$) e água ($< 0,3\%$)	Catalisador homogêneo básico - FFAs reagem com o catalisador e formam sabão
	Às vezes, esterificação e transesterificação ocorrem em processos conjugados	Catalisadores homogêneos ácidos são muito prejudiciais, muito corrosivos para o reator e tubulação e requerem manuseio cuidadoso
	Catalisador básico de custo relativamente baixo e disponível (NaOH e KOH)	A água promove a hidrólise dos ésteres alquílicos em AGL
	Método preferido para matéria-prima de alta qualidade	A matéria-prima de alta qualidade representa 70-95% do custo final do biodiesel
	1% de catalisador com base na massa de óleo	A etapa de purificação do processo de biodiesel é relativamente difícil e requer uma grande quantidade de água O catalisador não pode ser reutilizado
Heterogêneos	Alta estabilidade catalítica contra a lixiviação	Converte triglicerídeos em uma taxa relativamente mais lenta que o processo homogêneo
	Fácil separação do catalisador do produto	Procedimentos complexos de síntese de catalisadores levam a um custo mais alto
	A separação do glicerol e catalisador do biodiesel é muito mais fácil	Efetivamente ativo apenas em átomos de superfície
	Econômico por causa de sua natureza reutilizável	
Biocatalisador	Os AGL são convertidos em biodiesel, sem perda de matéria-prima	Longo tempo de processo devido à taxa de reação muito lenta (8 a 72 h), quando comparado ao processo homogêneo
	A matéria-prima de baixo preço pode ser empregada	Sensível ao álcool, que pode desativar a enzima
	Alta possibilidade de reutilizar e regenerar o catalisador	Alto custo do biocatalisador
	Apenas uma etapa de purificação simples é necessária	
	Fácil separação de biodiesel e biocatalisador por filtração	
	Fácil separação de biodiesel e glicerol por decantação	
	O glicerol é de alta qualidade e tem um alto valor As enzimas são biodegradáveis	
Não- catalítico (supercrítico)	Matéria-prima de baixa qualidade pode ser facilmente transformada em biodiesel	Mais energia é necessária na etapa de reação, especialmente na etapa de aquecimento, pois envolve um alto consumo de energia
	Glicerina de alta qualidade é gerada como coproduto	Possível geração de produtos de degradação térmica
	Etapas de separação e purificação mais simples envolvidas	Alta temperatura e pressão necessária
	Alta conversão (98%)	
	Tempo de reação curto (7-15 min)	É necessária uma alta proporção de álcool para óleo
	Sem custo de catalisador	

Fonte: Adaptada pela autora.

No Brasil, e em grande parte do mundo, as indústrias optaram pelo uso da transesterificação via catálise alcalina utilizando principalmente o metóxido de sódio como catalisador para a produção de ésteres monoalquílicos, por apresentar baixo custo. No entanto, existem desvantagens neste método principalmente devido à ocorrência de reações secundárias (**Figura 3**), que reduzem o rendimento na produção de ésteres monoalquílicos. Além disso, é uma rota que requer grandes quantidades de energia, tratamento de efluentes e alta qualidade da matéria-prima (baixos teores de água e ácidos graxos livres), limitando o uso de diversas matérias-primas, aumentando assim o preço da produção de ésteres (18,19).

Figura 3. Reações secundárias que podem ocorrer durante a transesterificações de óleos vegetais: (1) hidrólise, (2) saponificação e (3) neutralização de ácidos graxos livres



Fonte: Elaborada pela autora.

Nesse contexto, a procura por processos que não apresentam as dificuldades apresentadas a rota convencional (via transesterificação alcalina) tem aumentado, de maneira que seja possível trabalhar com matérias primas da 2° e da 3° geração, pois elas normalmente apresentam alto teor de água e de acidez.

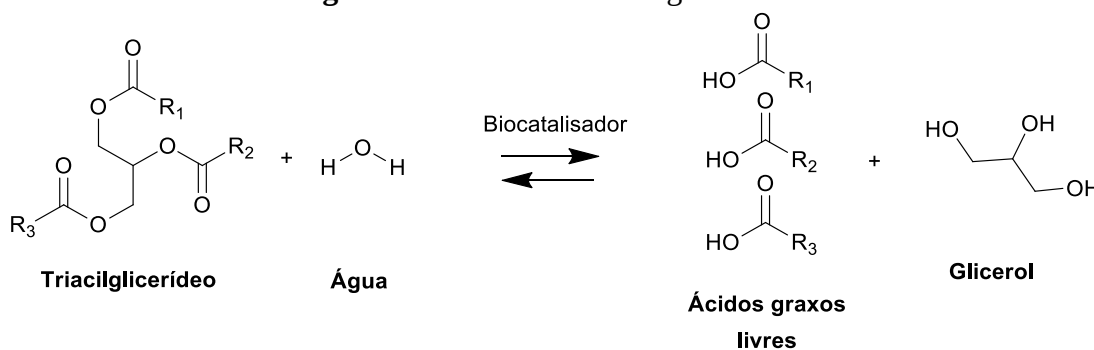
Uma rota que aceita essas matérias-primas sem nenhum pré-tratamento que pode utilizar biocatalisadores empregando tecnologia e produção mais sustentável é a hidroesterificação.

2.3 Hidroesterificação

O processo hidroesterificação, a mais recente alternativa para produção de biodiesel, pois permite o uso de qualquer matéria-prima graxa, independentemente do teor de ácidos graxos livres e de água (20–22). Trata-se de um processo integrado que envolve duas etapas consecutivas: a hidrólise seguida de esterificação (3,20,23). Este processo pode ser realizado através (i) hidroesterificação em processos não catalíticos (condição subcrítica ou supercrítica na hidrólise e esterificação) (24); (ii) hidroesterificação subcrítica/química (21,25); (iii) hidroesterificação enzimática/química (26) ou (iv) hidroesterificação enzimática (27).

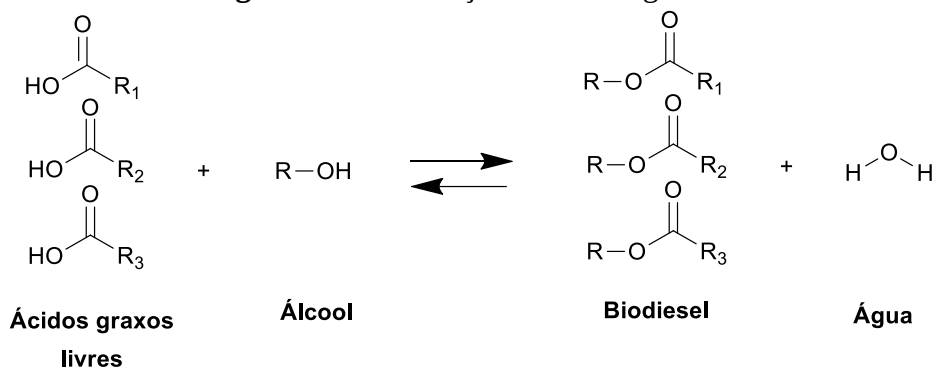
A primeira etapa – hidrólise (**Figura 4**) consiste numa reação química entre os acilgliceróis da gordura ou óleo vegetal (mono-, di-, e trigliceróis) com a água, produzindo ácidos graxos livres e glicerol, que são co-produtos intermediários com alto valor agregado e com ampla variedade de utilizações na indústria química. Nesta etapa inicial, podem ser empregadas matérias-primas com altos teores de acidez e de umidade, uma vez que o objetivo da hidrólise é obter altas conversões em ácidos graxos livres e a água é um dos reagentes (28).

Figura 4. Hidrólise de triacilglicerídeos.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na segunda etapa, os ácidos graxos gerados na etapa anterior, são esterificados com metanol ou etanol na presença de um catalisador (**Figura 5**). Não existe contato do glicerol (produzido e removido na hidrólise, etapa inicial) com o biodiesel (produzido na esterificação). Isso evita problemas de contaminação dos ésteres com resíduos de glicerol livre ou total (mono-, di- e triacilgliceróis), resultando em um biodiesel com pureza elevada (28).

Figura 5. Esterificação de ácidos graxos.

Fonte: Elaborada pela autora.

A hidroesterificação em condição subcrítica ou supercrítica produz uma taxa elevada de conversão dos triglicerídeos em ácidos graxos livres e posteriormente em biodiesel(25,29). No entanto, são empregadas altas temperaturas e pressões (200 a 400°C e 10 a 25 MPa, respectivamente), gerando um elevado custo operacional (22).

Já quando se utiliza biocatalisadores como lipases principalmente na primeira etapa é possível diminuir significativamente a taxa de temperatura da reação, mesmo quando se utiliza matérias-primas de baixa qualidade (3).

2.4 Matérias – primas

O biodiesel pode ser produzido a partir de diversas matérias-primas. O Brasil com sua imensa extensão territorial, associada às excelentes condições edafoclimáticas, apresenta um grande potencial de exploração de biomassa para fins alimentícios, químicos e energéticos.

Entretanto, óleos brutos e gorduras residuais são considerados matérias primas de baixa qualidade pois apresenta elevada acidez devido a sua quantidade de ácidos graxos livres (maiores que 3 mg NaOH/g) e umidade (superior á 0,1% m/m), inviabilizando utilização do processo convencional (transesterificação por catálise alcalina) (30–32), pois há a necessidade de se realizar um pré-tratamento, no qual acarretam em custos adicionais, e inviabiliza diversas matérias-primas na qual destaca-se o óleo bruto de palma e o óleo residual.

Os óleos e gorduras residuais (OGRs), classificado como 3º geração para produção de biodiesel apresentam uma disponibilidade e um potencial enorme, pois a quantidade de óleo

residual gerado por ano em qualquer país é elevada, são resíduos produzidos diariamente nas indústrias, residências e estabelecimentos comerciais (33).

Durante o processo de fritura dos alimentos, os óleos vegetais ou gordura animal sofrem alterações físico-químicas devido à exposição ao calor (160 a 200 °C) e à luz durante períodos de tempo relativamente longos. Por razões econômicas, o mesmo óleo ou gordura é utilizado várias vezes. Geralmente, em restaurantes públicos, a fritura é conduzida no mesmo óleo por vários dias (34). Obviamente, as condições utilizadas no processo de fritura causam alterações físico-químicas no óleo, e a água presente nos alimentos acelera a decomposição dos óleos e gorduras (35).

Apesar de serem expostos a agentes que provocam a degradação de sua estrutura química, os óleos e gorduras residuais provenientes de processos de fritura também são constituídos predominantemente por ácidos graxos e trigliceróis que podem ser convertidos em biodiesel (36). A reciclagem desse óleo como biocombustível proporcionaria a retirada de um resíduo que muitas vezes é descartado em lugares inapropriados, tais como pia/ralos e igarapés, agregando valor como matéria-prima, como fonte de energia.

Em 2019, o Brasil atingiu o 10º maior produtor de óleo de palma (*Elalis guineenses*) (37), com uma produção cerca de 550 mil toneladas, é a oleaginosa de valor econômico mais produtiva que se conhece.

A palma tem produtividade, em média 10 vezes mais que o óleo de soja.

A *Elalis guineenses* vive em conjunto com espécies nativas, é ideal para ser cultivada em áreas degradadas. Entretanto o óleo bruto (1º geração para a produção de biodiesel) proveniente do fruto da palma possui elevado teor de água e índice de acidez, sendo inviável o seu uso *in natura* criando a necessidade de um processo de refino para se adequar na resolução de óleos vegetais da ANVISA e ser comercializado (38) esse óleo pode ser utilizado de forma bruta na produção de biodiesel por hidroesterificação ampliando a sua utilização e a agricultura.

2.5 Produção de biodiesel por biocatalisadores

A utilização de enzimas para a produção de biodiesel tem apresentado muitas vantagens. Dentre os biocatalisadores, a aplicação de lipases é a classe de enzimas mais utilizada em síntese orgânica, pois possui excelente atividade catalítica, alta especificidade e pode catalisar diversas reações.

As lipases (triglicerol acil hidrolases-EC 3.1.1.3) são enzimas geradas por microrganismos (**Tabela 2**), animais e plantas(39,40). Pertencem à classe das hidrolases, capazes de hidrolisar os trigliceróis insolúveis na interface entre o substrato e a água. Além da hidrólise, eles são capazes

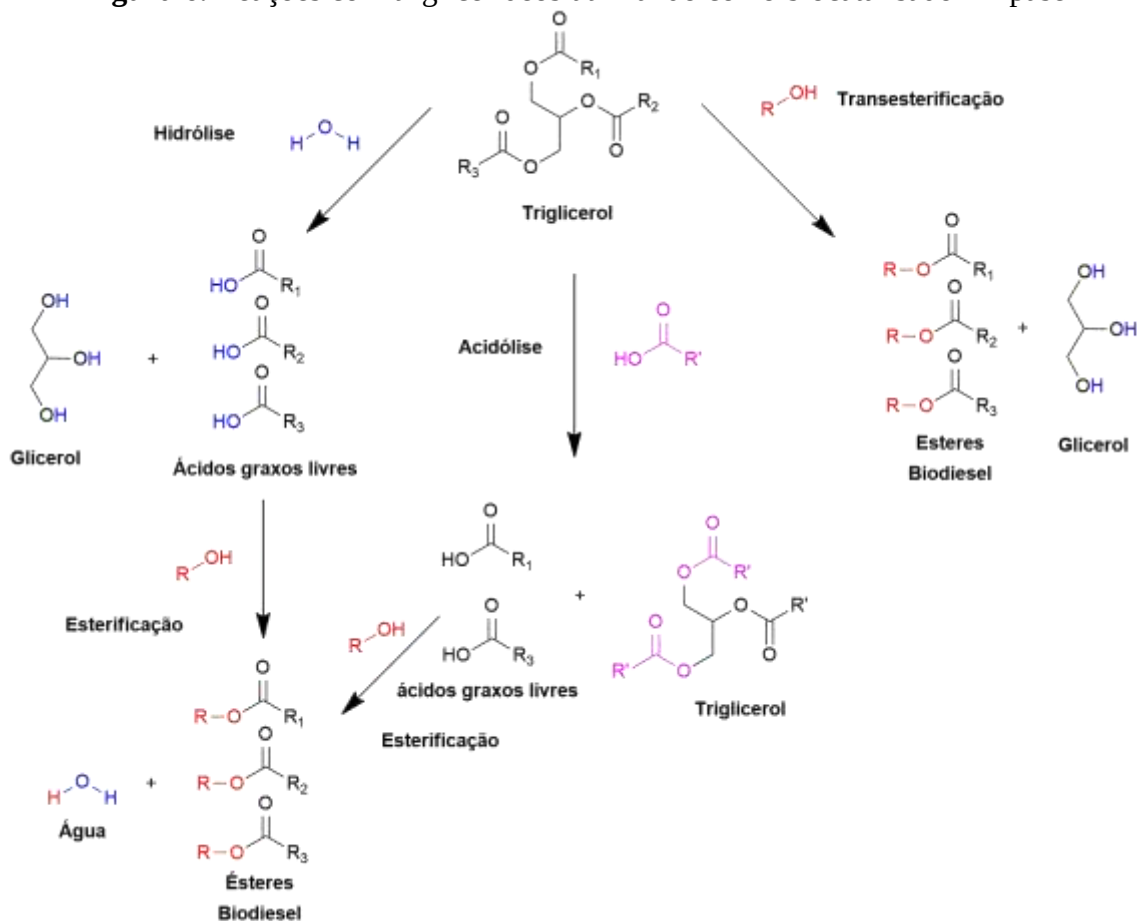
de realizar vários tipos de reações, dependendo da composição do sistema reacional, como esterificação, transesterificação, interesterificação, alcoólise e acidólise (**Figura 6**). Todos esses processos irão gerar ésteres monoalquílicos (biodiesel). Além disso, todos os coprodutos gerados e obtidos em todo o processo, em especial o glicerol, são de alta pureza e qualidade.

Tabela 2. Diferentes fontes de lipase microbiana (Christopher et al. 2014 (39)).

Fungos	Bacteria	Leveduras
	<i>Achromobacter</i>	
<i>Alternaria brassicicola</i>	<i>lipolyticum</i>	<i>Candida deformans</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Candida antarctica</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida rugose</i>
<i>Mucor miehei</i>	<i>Burkholderia glumae</i>	<i>Candida quercitrusa</i>
	<i>Chromobacterium</i>	
<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>viscosum</i>	<i>Pichia burtonii</i>
<i>Rhizopus chinensis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pichia sivicola</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Pichia xylosa</i>
<i>Streptomyces exfoliates</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Saccharomyces lipolytica</i>
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>

Fonte: Adaptada pela autora.

Figura 6. Reações com triglicerídeos utilizando como biocatalisador - lipase



Fonte: Elaborada pela autora.

As lipases são obtidas principalmente a partir da purificação de produtos vivos produzidos por microrganismos. Os principais microrganismos extracelulares são *Mucor miehei*, *R. oryzae*, *C. antarctica* e *P. cepacia* (17,41). As lipases intracelulares estão presentes dentro da célula ou na parede produtora de células.

As lipases possuem diferentes regioesletividade, especificidade e atividade catalítica. Em termos de regioesletividade, as lipases podem ser divididas em quatro grupos (42,43):

- (i) Sn-1,3-específico: hidrolisa ligações éster na posição sn-1 e sn-3;
- (ii) Sn-2-específico: hidrolisa a ligação éster na posição sn-2;
- (iii) Ácido graxo específico: hidrolisa ligações éster de ácidos graxos de cadeia longa com duplas ligações entre C9 e C10;
- (iv) Não específico: hidrolisa ligações éster em qualquer posição.

A transesterificação enzimática ganhou força em 1988, quando pesquisadores descobriram que as enzimas eram tolerantes a solventes orgânicos (44). O avanço no desenvolvimento da

biologia molecular da engenharia de proteínas em 1990, denominado “evolução dirigida”, proporcionou a produção de biodiesel a partir de biocatalisadores (45).

Desde então, muitos pesquisadores têm sido realizados para aplicar reação de transesterificação, esterificação e processos combinados (hidroesterificação e duas etapas) visando aumentar a produção de biodiesel (3). Os principais biocatalisadores utilizados na reação de transesterificação são as lipases não específicas, como *C. antarctica*, *C. rugosa*, *P. cepacia* e *P. fluorescens*, que apresentam altos rendimentos acima de 99% de conversão utilizando uma temperatura de 30 a 50°C.

Várias Sn-1,3 lipases também se mostraram eficientes com rendimentos superiores à eficiência teórica (66%, conversão máxima) devido à migração acila de posição devido ao sistema de reação. Isso ocorre porque cada lipase tem especificidade diferente sobre seus substratos (17).

A transesterificação do catalisador lipase segue o mecanismo ping-pong bi-bi. O mecanismo ping-pong bi-bi pode ser descrito como dois substratos reagem para produzir dois produtos através da formação de intermediários enzima-substrato (42).

A literatura propôs três vias cinéticas:

- (i) alcoólise direta de glicerídeos (triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos) em ésteres alquílicos;
- (ii) duas etapas consecutivas que consistem em hidrólise (conversão de glicerídeos em ácidos graxos livres) e seguida de esterificação (conversão de ácidos graxos livres em ésteres alquílicos);
- (iii) reações simultâneas de alcoólise e hidrólise seguidas de esterificação.

Além disso, é importante examinar a cinética enzimática, pois auxilia na determinação dos parâmetros ótimos de reação, em especial, estudos envolvendo tipo de lipase, imobilização de lipase, tipo de solvente, efeito da temperatura, concentrações de reagentes e fenômenos de transferência de massa; que são muito importantes para a ampliação do processo e para o projeto do reator.

Há preferência no uso de lipase imobilizada que a lipase livre, pois reduz o alto custo do biocatalisador, que é o maior obstáculo ao uso de lipases. Além disso, a lipase imobilizada promove fácil recuperação e permite a reutilização da enzima. As vantagens e desvantagens de cada tipo de lipase estão ilustradas na **Tabela 3** (46–48).

Tabela 3. Comparação entre lipase livre e imobilizada (46–48).

Catalisador	Vantagem	Desvantagem
Lipase livre	Atividade catalítica mais eficiente	Inativação da lipase pelo álcool
	Altamente seletivo	Lipase instável com pequena mudança no meio de reação
Lipase imobilizada		Alto custo
		Não é possível recuperar
	Melhor estabilidade, especialmente em relação a solventes orgânicos e temperaturas mais altas	Alta resistência à transferência de massa
	Alta estabilidade operacional	Menor taxa de reação
	A co-imobilização com outras enzimas é possível	Centrifugação e filtração necessárias para a separação
	Uso de reatores de leito fixo ou batelada sem necessidade de membrana para isolar a enzima do produto	A atividade enzimática diminuiu durante o processo de imobilização
	Reciclo	

Fonte: Adaptada pela autora.

Por outro lado, a imobilização da enzima pode afetar a atividade enzimática, a especificidade e a seletividade da enzima e também alterar sua forma estrutural. Essas mudanças nem sempre são benéficas. Alguns podem causar possíveis efeitos na estabilidade de temperatura, e solventes (álcool) da forma hiperativada da enzima, dispersão da enzima na superfície de suporte, enquanto outros podem levar a efeitos negativos como a desnaturação e a inibição da lipase.

2.5 A lipase - *Candida rugosa*

A lipase *Candida rugosa* (CRL) é uma glicoproteína hidrofóbica globular possui peso molecular de 45 – 62 kDa 4,2 % de açúcares neutros e volume molecular de 5 nm × 4.2 nm × 3.3 nm(49,50). A proporção de resíduos de aminoácidos polares para apolar da enzima é de 1.08 (50).

A *Candida rugosa* é uma lipase caracterizada como inespecífica, apresenta propriedades interessantes como estabilidade térmica (40 a 60 °C) e de pH (4 a 10) tornando-a atraente para a aplicação uma vasta gama de reações biocatalíticas em ambientes aquosos e não aquosos, que incluem reações de hidrólise inespecífica e estereoespecífica, esterificação e transesterificação (51). Segundo pesquisadores, até o momento nenhuma lipase está disponível com uma gama tão ampla de especificidade (substrato, posição do ácido graxo e estereopreferência) como a CRL, ela tem a capacidade de acomodar ésteres relativamente volumosos em seu sítio ativo (51,52).

A literatura relata que a lipase de *Candida rugosa* é uma enzima que pode ser aplicada na síntese de produção de biodiesel pela rota de transesterificação e esterificação, entretanto até o

momento não se há trabalho aplicando ela na rota de hidroesterificação, mas há pesquisas utilizando ela em reação de hidrólise de óleos vegetais (53–55). Nestes trabalhos, ou autores utilizaram a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em diferentes suportes: zircônia, líquido iônico e nanopartículas de sílica, no entanto os resultados tem demonstrado baixas conversões em ácidos graxos, e as que aplicam na reação de transesterificação quando imobilizada apresenta baixa conversões e poucos reusos da enzima devido à dificuldade de separação do meio reacional. Além disso, a Novozym 435, lipase imobilizada comercialmente da *Candida antarctica* lipase B (CALB), tem sido empregada com sucesso na reação de síntese de biodiesel por transesterificação (56–58).

Novozym 435 é imobilizada pelo método de adsorção em uma resina macroporosa chamada Lewatit VP OC 1600. De acordo com informações disponibilizadas pela Novozymes Co. a lipase produz biodiesel com mais de 97% (m/m) de ésteres monoalquílicos (56).

Atualmente, a Novozym 435 é a lipase comercial que supera o alto custo do biocatalisador, pois apresenta o melhor rendimento de produção de biodiesel quando comparada a outras lipases imobilizadas. No entanto, ela não é tolerante a altas concentrações de metanol e água, o que promove sua desnaturação, a indústria de biodiesel opera observando os níveis de água e aplicando álcool de forma fracionada. E não é possível produzir biodiesel utilizando matérias-primas de baixa qualidade ou óleo bruto o que promove desvantagem ao processo comercial.

2.6 Imobilização

O processo de imobilização de lipases é uma técnica que consiste no confinamento das enzimas no interior de poros ou na sua retenção na superfície de um material (59). A utilização de derivados imobilizados ganhou espaço na indústria nos últimos anos por apresentar vantagens no uso dos biocatalisadores, como retenção da atividade biológica por mais tempo; facilidade de separação do catalisador e do produto; redução do volume de reação, pois, a imobilização permite uma maior concentração de enzimas em menor volume de reator; maior estabilidade ao pH e a temperatura; facilita a interrupção da reação após atingir-se determinado grau de conversão de interesse e possibilidade de reaproveitamento da enzima em processos contínuos (59).

Outro fator importante é a viabilidade econômica ao se utilizar a imobilização de enzimas. É necessário considerar que o tipo de suporte utilizado e o método selecionado influenciam na atividade e reutilização da enzima em processos biocatalíticos (60). Na literatura há muitas

maneiras que possibilitam a imobilização de enzimas, com o objetivo de prolongar a atividade enzimática em diversos ciclos, principalmente em processos industriais.

Os métodos de imobilização mais empregados com sucesso são: (61,62).

(i) Adsorção física:

É uma das técnicas de imobilização mais simples. Baseia-se nas interações físicas do carreador e da enzima, como dipolo-dipolo, forças iônicas, hidrofóbicas/hidrofílicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas.

(ii) Ligação covalente

A ligação covalente fornece uma interação mais fortes entre a enzima e o suporte. A ligação é um processo de várias etapas: promoção de grupos reativos na superfície inorgânica; funcionalização; ativação e, finalmente, reação com a enzima.

(iii) Encapsulação

Aprisionamento via inclusão de uma enzima em um polímero rede, tipicamente matrizes poliméricas orgânicas ou inorgânicas.

(iv) Cross-linking

Reticulação de agregados enzimáticos ou cristais, se utilizada de um reagente bifuncional, para preparar macropartículas sem transportador, ou seja, liga uma enzima a outra. Podendo haver um suporte, entretanto leva a diluição da atividade.

Além do tipo de imobilização outros fatores como meio de imobilização (solvente ou tampão); temperatura; ponto isoelétrico e meio de imobilização são importantes ser avaliados para uma boa imobilização. Na **Tabela 4** são apresentados alguns fatores a ser levados em consideração ao se planejar imobilizar.

Tabela 4. Fatores levado em consideração antes da imobilização de enzimas

Técnica de imobilização	Fatores em consideração
Geral	Aditivos na preparação enzimática que podem interferir Estabilidade da enzima sob condições de imobilização Estabilidade do suporte em condições operacionais Lixiviação de proteínas em condições operatórias Interações não específicas do substrato com o suporte Custo e disponibilidade do suporte
Adsorção	Presença de regiões hidrofóbicas na enzima (Suporte hidrofílico) Presença de regiões hidrofílicas na enzima/glicosilação (Suporte hidrofóbico) Força iônica do tampão de imobilização para favorecer a adsorção de proteínas Interações iônicas pI da enzima
Ligação covalente / Crosslinking	Localização dos resíduos necessários para a ligação pH de imobilização adequado para ataque nucleofílico Flexibilidade conformacional exigida pelo mecanismo catalítico
Encapsulação	Tamanho da enzima Condições de síntese para o polímero

Fonte: Hanefeld, U; Gardossi, L; Magner, E et al 2009 (47) – modificada pela autora

2.7 Suporte para a imobilização

O avanço das técnicas de imobilização tem permitido o uso e o desenvolvimento de uma variedade de suportes sólidos orgânicos, ou inorgânicos, esses materiais apresentam propriedades físico-químicas e biológicas distintas e tamanho e formas diferentes.

Para a seleção de um suporte para a imobilização de enzimas é importante escolher um suporte que:

- (i) Possua arquitetura que mantenha a estrutura 3D da enzima;
- (ii) Promova a estabilidade da enzima (pH e temperatura);
- (iii) Promova a atividade enzimática;
- (iv) Proteja a enzima contra lixiviação;
- (v) Possuir carga superficial;
- (vi) Possua grupos funcionais;
- (vii) Forneça estabilidade química e térmica;
- (viii) Possua resistência mecânica;
- (ix) Tenha ausência de toxicidade
- (x) Seja aplicável em larga escala

Os suportes orgânicos podem ser divididos em duas classes: (i) biopolímeros e (ii) polímeros sintéticos, e podem apresentar diferentes formatos: partículas, membranas, nanofibras, etc. Eles são frequentemente utilizados e promovem alto desempenho, eficiência e estabilidade para as enzimas quando imobilizadas (63–65).

Os suportes inorgânicos, geralmente empregados em processos de imobilização de enzimas, apresentam alta estabilidade química e física; mas tem baixa resistência mecânica sob forte agitação (63–65).

2.8.1 Argilas

Nas últimas décadas as argilas tem demonstrado um papel importante em diversos processos industriais.

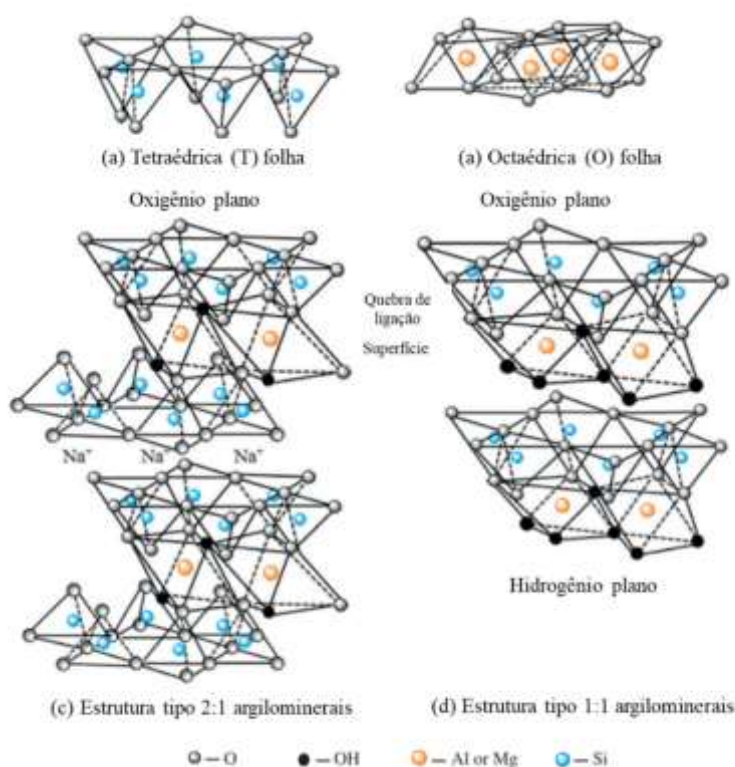
Argila é uma rocha constituída essencialmente por um grupo de minerais que recebem o nome de argilominerais.

Argilominerais são utilizadas como matéria-prima na indústria de cerâmica, materiais de construção, revestimentos de papel e etc. Entretanto, nos últimos anos tem sido aplicadas como adsorventes, catalisadores ou suportes de catalisadores (66).

Argilominerais são constituídos de silicatos de Al, Fe e Mg hidratados, dispostos em camadas de estruturas cristalinas, constituídos por folhas contínuas de tetraedros SiO_4 , ordenados de forma hexagonal, condensados com folhas octaédricas de hidróxidos de metais tri e divalentes.

Os diferentes argilominerais são classificados em grupos com base nas semelhanças em composição química e na estrutura cristalina. As estruturas cristalinas são classificadas em 2 tipos: estruturas 1:1 e estruturas 2:1, **Figura 7**.

Figura 7. Desenhos esquemáticos mostrando as estruturas (a) da folha tetraédrica, (b) da folha octaédrica, (c) mineral argiloso tipo 2:1 e (d) mineral argiloso tipo 1:1.



Fonte: N. An et al. traduzido pela autora

Além disso, argilominerais fornece alta área superficial e grupos funcionais como Si-O-Si, Si-O-OH e Al ou Mg (M)-OH. Os grupos na superfície podem interagir com as enzimas. Grupos hidroxila nas bordas quebradas de folhas tetraédricas e octaédricas são adequados para formar ligações de hidrogênio com moléculas de enzimas.

O Caulim, conhecido também como caulinita é um argilomineral que apresenta estrutura laminar tipo 1:1 (uma folha tetraédrica de sílica ligada a uma folha octaédrica de alumina), já os argilominerais Vermiculita e Montmorilonita apresentam a estrutura 2:1, diferença estrutural e tamanho das partículas.

2.8.2 Grafite

Grafite (C₆) é bastante abundante e de estrutura estável, é naturalmente encontrado em, rochas ígneas, sedimentares, metamórficas e ainda em alguns meteoritos de forma de cristais hexagonais com estrutura laminado em camadas, formado por milhares de folhas de grafeno, constituído de uma estrutura nas quais átomos de carbono com arranjo hexagonal interagem através

de ligações covalentes com outros carbonos no mesmo plano e somente forças de Van der Waals atuam entre as lamelas sucessivas.

O grafite é hidrofóbico, bom condutor de corrente elétrica e de calor, resistente a altas temperaturas e oxidação, tem apresentado como versáteis para imobilização de enzimas devido à sua grande área de superfície (67)

As propriedades e abundância do grafite, tem feito com que ele seja largamente utilizado para a produção de nanocompostos (68) com a ascensão do grafeno em 2007 (69) imobilizações utilizando nanocompostos de carbono e grafeno se iniciou na última década, e tem apresentado bons resultados em escala de bancada.

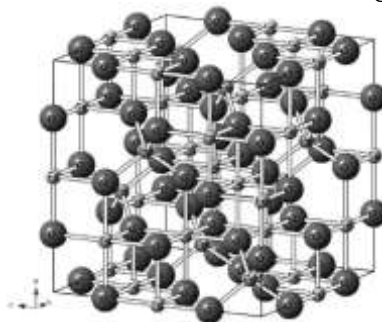
Devido suas propriedades químicas, e o avanço do grafeno, o grafite apresentar ser um potencial suporte para a imobilização de enzimas.

2.8.3 Suportes Magnéticos

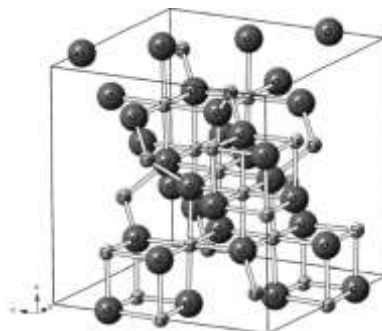
Os suportes magnéticos tem ganhado amplitude nos últimos anos e tem sido amplamente utilizados para finalidades biológicas, médicas, tecnológicas e na indústria (70). Além disso, vantagens como resistência a temperaturas elevadas pouca transferência de massa, ademais apresenta considerável área superficial disponível para a imobilização, promovendo uma reação que seja favorável e com menor perda de derivado durante o processo (71,72).

Os suportes magnéticos maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) e magnetita (Fe_3O_4), são óxidos de ferro formados por uma estrutura composta por íons de oxigênio, cujos espaços intersticiais estão preenchidos com por íons de ferro ferroso (Fe^{2+}), íons de ferro férrico (Fe^{3+}), se diferenciando pela ausência de ferro ferroso para a síntese de maghemita (73). As estruturas cristalinas da maghemita e magnetita são mostradas a seguir nas **Figuras 8 e 9**, respectivamente.

Figura 8. Estrutura cristalina da Maghemita.



Fonte: Oliveira et al. (2013) (74).

Figura 9. Estrutura cristalina da Magnetita

Fonte: Oliveira et al. (2013)(74).

Ademais, a utilização de suportes magnéticos para a imobilização de lipases para a aplicação na reação de biocombustíveis tem se mostrado eficaz (75–77). Portanto, na busca por materiais alternativos para imobilização de enzimas em bioprocessos, os suportes magnéticos surgem como uma possibilidade devido à sua característica magnética, facilitando a separação que pode ocorrer pela aplicação de um campo magnético externo, assim recuperando o derivado imobilizado ao final de cada reação.

2.8.4 Geopolímeros e impressão 3D

O geopolímero é um polímero inorgânico semicristalino formado pela policondensação de alumínio ($-\text{Si-O-Al-O}-$), nano estruturados com misturas de minerais ou compostos que consistem em unidades repetidas, como óxido de silício ($-\text{Si-O-Si-O}-$), ferro-silício-alumínio ($-\text{Fe-O-Si-O-Al-O}-$), ou alumínio fosfato (Al-O-P-O), pode ser fabricado a partir de minerais de aluminosilicato naturais/sintéticos ou subprodutos/resíduos de aluminosilicatos industriais (como: metacaulim, cinzas volantes, escórias, lama vermelha, vidro, perlita, areia, cinza de casca de arroz, argila ou uma combinação deles) misturado com uma solução aquosa contendo ingredientes reativos (hidróxido de potássio/sódio, ácido fosfórico, silicato de potássio/sódio, etc...) são polimerizados à temperatura ambiente ou mesmo a uma temperatura próxima de 100°C (78–80). Sua composição química é semelhante da zeólita - uma microestrutura variável (amorfa a semicristalina) que é muito utilizada para a imobilização de lipases (79,81).

Os geopolímeros surgiram como um dos materiais inorgânicos não metálicos mais promissores nos últimos anos, devido às suas notáveis vantagens, como na produção há baixo custo, baixo teor de emissão de CO_2 e baixo consumo de energia; síntese fácil; disponibilidade de matérias-primas; estabilidade térmica e química; estrutura leve e porosa, alta área de superfície;

endurecimento rápido a baixa temperatura com excelente resistência resultante (82). Além da aplicação mais comum em cimentos e na construção civil, os geopolímeros tem sido testado em uma variedade de aplicações incluindo suportes de membrana; adsorventes e filtros, catalisadores, biocatalisadores, encapsulamentos, novos precursores para zeólita , cerâmica e outras aplicações (80).

Os geopolímeros podem ser produzidos de diversas formas, o meio de produção do geopolímero tradicional é conhecido como espuma direta, em uma pasta homogênea é incorporado gás para a produção de espuma geopolimérica úmida que fica em suspensão ou líquida, que posteriormente é endurecida por cura a determinada temperatura para se obter o geopolímero de interesse.

Mas recentemente com o avanço da indústria de manufatura aditiva conhecida também com impressão tridimensional (3D), foi possível produzir matérias impressos em 3D produzido de a partir de geopolímero.

A nomenclatura de impressão tridimensional (3D) ou manufatura aditiva foi iniciada no final do século passado para narrar uma maneira de misturar diferentes materiais (polímeros, metais e cerâmicas) por ligação, fusão ou endurecimento em líquido ou resina para a criação de peças 3D através da criação de camadas usando desenho 3D assistido por computador (83,84).

A manufatura aditiva é uma ferramenta versátil para resolver inúmeros desafios para a produção de suportes para a imobilização de enzimas.

Franchin et al (2017) (85) inovaram a produção de geopolímeros, conseguindo imprimir a partir da técnica de escrita de tinta direta produzindo geopolímeros porosos à base de Na, sem rachaduras ou defeitos de superfície com alta porosidade, variando de 50 a 71% vol., e alta resistência à compressão (2–12 MPa) e uma área superficial de 14,3 m²/g e quando avaliado somente os filamentos internos também apresenta uma área de 14,8 m²/g. Utilizando essa tecnologia inovadora é possível imprimir em geopolímeros estruturas com a forma desejada para serem imobilizadas e utilizadas dentro de diversos tipos de reatores, trazendo inovação para a produção de suportes para biocatalisadores e para a produção de biodiesel, uma vez que é possível imprimir suportes de diversas formas.

3 OBJETIVO

Objetivo Geral

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar diferentes suportes para a imobilização da lipase *Candida rugosa* empregando-se diferentes métodos (adsorção física e ligação covalente) e selecionar os derivados imobilizados que possam ser aplicados como biocatalisador na reação de hidrólise a partir de matérias-primas de baixa qualidade (neste caso, OGR e óleo bruto de palma).

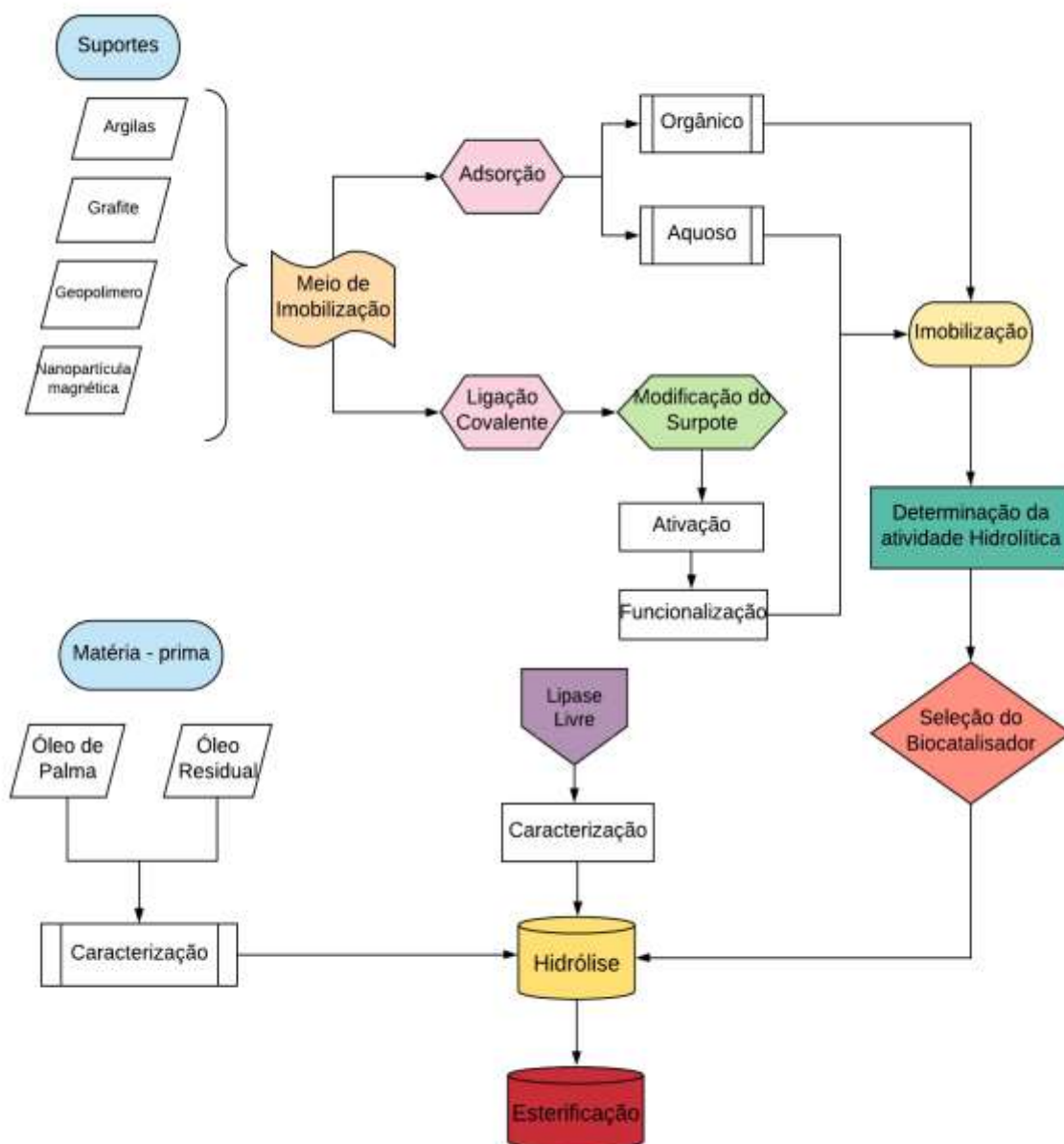
Objetivos Específicos

- Caracterização química dos óleos e gorduras residuais;
- Imobilização da lipase *Candida rugosa* em diferentes suportes;
- Avaliação do rendimento e das atividades hidrolíticas dos derivados imobilizados da lipase *Candida rugosa* nos suportes empregando-se diferentes métodos (adsorção física e ligação covalente);
- Seleção dos melhores biocatalisadores para aplicação na reação de hidrólise de óleos e gorduras;
- Otimização das condições reacionais da hidrólise em reator de bancada;
- Avaliação do rendimento reacional da hidrólise através da determinação do teor de ácidos graxos livres e da esterificação através da determinação do teor de ésteres no biodiesel produzido;

4 EXPERIMENTAL

Na **Figura 10** é apresentado um fluxograma das principais atividades desenvolvidas nesta pesquisa.

Figura 10. Fluxograma das etapas desenvolvidas.



Fonte: Elaborado pela a autora

4.1 Coleta e armazenamento das amostras

Foram avaliadas matérias-primas de baixa qualidade, tais como, óleo bruto de palma e OGR oriundos de atividades industriais, urbanas ou domésticas.

As amostras de óleo de palma bruto foram fornecidas pela empresa Agropalma (Belém – PA), e a de OGR cedido pelo Instituto Federal de São Paulo – Campus Matão que possui, em seu campus, um ponto de coleta de óleo residual (OGR). As amostras foram armazenadas em frascos de polietileno com tampa de 5L, devidamente identificadas e acondicionadas em ambiente sob temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sem exposição à luz.

4.2 Suportes

Os suportes Caulim, Argila Vermiculita e Argila Montmorilonita, foram cedidos pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). O geopolímero em 3D foi fornecido pela Universidade de Padova (Itália). O grupo de Grafeno da Universidade Presbiteriana Mackenzie cedeu Grafite flakes mw 12,01 – 100 mesh e as partículas magnéticas de Fe_3O_4 foram sintetizadas em laboratório.

4.2.1 Síntese das partículas magnéticas

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Erlenmyer de 250 mL;
- ✓ Balança Analítica Ohaus, série Adventure com capacidade de carga de 210 g e precisão de 0,0001 g;
- ✓ Papel de Filtro;
- ✓ Bomba de vácuo
- ✓ Reator de vidro encapsulados 50 mL
- ✓ Banho termostatisado
- ✓ Chapa magnética de agitação
- ✓ Estufa
- ✓ Mufla

Reagentes e soluções

- ✓ Cloreto de Ferro III 99,9% - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- ✓ Cloreto de Ferro II 99,5% - Química Moderna Industrial e Comércio LTDA.
- ✓ Acetato de etila 99,0% - NEON Reagentes Analíticos LTDA.
- ✓ Hidróxido de Sódio 99,0% - Química Moderna Industrial e Comércio LTDA.
- ✓ Hidróxido de Amônio 99,9%- Química Moderna Industrial e Comércio LTDA.
- ✓ Ácido clorídrico 37,5%- NEON Reagentes Analíticos LTDA.
- ✓ Sulfito de Sódio 89 %
- ✓ Água ultrapura.

Procedimento do ensaio – Magnetita

As partículas de magnetita foram sintetizadas por meio de co-precipitação de Fe^{2+} e Fe^{3+} com hidróxido como agente precipitante. Em um béquer contendo 300 mL de água ultrapura (UP), 30 mL da solução de FeCl_2 (0,6 M) foram adicionadas sob forte agitação mecânica e após, sob vagarosa agitação, adicionados 30 mL da solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,1 M). Após a adição das soluções, a temperatura foi ajustada em 80°C e, por meio da adição de NaOH (4 M), o pH foi mantido em 11, permanecendo em agitação por 30 minutos. Além do NaOH, foram sintetizadas partículas utilizando NH_4OH (4 M) como agente precipitante. Assim, após os 30 minutos, o béquer foi mantido em repouso sob um ímã favorecendo a separação das partículas magnéticas, depositadas na forma de uma massa escura na parte inferior no béquer. Tirado o sobrenadante, a massa depositada foi lavada com água UP e acetato de etila (1:1), sendo deixadas em estufa por 24 horas à 100°C 1, sendo armazenadas em temperatura ambiente até a imobilização.

Procedimento do ensaio – Maghemita

Para a síntese da maghemita, em um béquer, foram adicionados 30 mL da solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2 M), preparada em solução de HCl (2 M). Em seguida, 30 mL de água UP e 20 mL da solução de Na_2SO_3 (1 M), nesta ordem, foram adicionados ao béquer. A mistura foi deixada sob agitação até que a solução ficasse amarela. Em um béquer de 2 litros, 51 mL de hidróxido de amônio foram adicionados em 870 mL de água UP. A mistura amarela foi então vertida lentamente no béquer com água e hidróxido, deixado sob agitação por 1 hora à 300 rpm. Decorrido o tempo, o béquer foi deixado sob um ímã e a massa escura lavada com água UP, sendo levado a estufa para secagem por 24 horas à 100°C. Por fim, para a formação da maghemita, a massa escura já seca foi levada a mufla à 250°C, pelo período de 1 hora. Após, o suporte foi armazenado em dessecador até sua utilização (87).

4.2.2 Produção do suporte 3D de geopolímero

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Impressora Delta (Delta Wasp 2040 Turbo, Wasproject, Massa Lombarda, Italy)
- ✓ Escrita direta com tinta (DIW) através de um bico com diâmetro de 840 μm (Nordson Italia S.p.a., Segrate, Itália)
- ✓ Seringa de 30 mm^3
- ✓ Balança analítica 0,0001 g;
- ✓ Bomba de vácuo
- ✓ Chapa magnética de agitação
- ✓ Estufa

Reagentes e soluções

- ✓ Água MilliQ
- ✓ Óxido de Alumínio Al_2O_3 - Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- ✓ Dióxido de Silício SiO_2 - Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- ✓ Óxido de sódio Na_2O - SS2942, Ingessil S.r.l., Montorio, Italy
- ✓ Metacaolin $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2$ - Argical 1200S, Imerys S.A., Paris, France
- ✓ Polietileno glicol (PEG) 1000, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA.

Procedimento do ensaio

O processo de preparo das pastas para a formação das estruturas de geopolímero impresso em 3D à base de Na e K neste trabalho tiveram as seguintes razões molares: $\text{H}_2\text{O} / \text{Al}_2\text{O}_3 = 18,5$, $\text{SiO}_2 / \text{Al}_2\text{O}_3 = 4$, $\text{Na}_2\text{O} / \text{Al}_2\text{O}_3 = 1,3$, para K $\text{Al}_2\text{O}_3 = 4$, KOH. O procedimento completo para preparar a pasta de geopolímero é descrito com mais precisão pelos pesquisadores Franchin e Innocentini (88,89). Para obter uma tinta imprimível com propriedades reológicas adequadas, foi utilizado geopolímero em pó e PEG como agente reológico (tinta).

O sistema de impressão consistia de uma impressora (Delta Wasp) equipada com uma câmara pressurizada com um parafuso de rosca infinita para extrusão da pasta; a tinta foi transferida para uma seringa de 30 mm^3 e acoplada na impressora. A tinta foi extrusada por escrita direta (DIW) através de um bico com diâmetro de 840 μm com ar e à temperatura ambiente, com

velocidade de impressão e fluxo de extrusão pré-determinados. Após a impressão da primeira camada composta por filamentos paralelos, o bico foi levantado na direção z para imprimir a segunda camada composta por filamentos paralelos girados em 90 °; esse processo foi repetido até atingir a altura máxima desejada. Seguindo este padrão, amostras de rede (Na-Geo e K-Geo) com 20 mm de diâmetro e 9,6 mm de altura foram impressas. Após o processo de impressão, as amostras foram colocadas em uma caixa fechada em uma estufa a 75 ° C por 2 dias para completar as reações de geopolimerização, e secas a 100 ° C durante a noite antes da caracterização (Esse procedimento foi realizado na Universidade de Padova – Itália) e após seguiu para a modificação da superfície.

4.2.3 Tratamento da superfície do suporte de geopolímero impresso em 3D

4.2.3.1 *Modificação de superfície do Geo –Na e Geo- K*

Para estabelecer o carregamento eficiente de lipase por ligação covalente em superfícies inorgânicas, grupos amino NH_2 foram enxertados usando APTES (3-aminopropiltrietoxisilano) e funcionalizados com reagente glutaraldeído para aumentar a hidrofobicidade. O método para modificar a superfície é descrito a seguir.

4.2.3.2 *Troca iônica*

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Chapa magnética de agitação
- ✓ Estufa

Reagentes e soluções

- ✓ Nitrato de amônio Química Moderna, São Paulo, Brasil;
- ✓ Solução de Nitrato de amônio 0,1 M

Procedimento do ensaio

As redes geopoliméricas impressas (Na-Geo e K-Geo) foram submetidas a troca de íons para remover íons de Na móveis do material e evitar um forte aumento no valor de pH das soluções aquosas em contato com ele. Uma solução NH_4NO_3 foi preparada e a troca iônica realizada na

relação geopolímero : 1 g / 100 mL (NH_4NO_3). As amostras de Na-Geo foram imersas na solução sob agitação mecânica; a cada 24h a solução foi trocada até a estabilização do pH em 7 por um total de 4 dias. As amostras resultantes, denominadas IE-Geo-Na e IE-Geo-K após o processo de troca iônica, foram secas a 110 ° C durante a noite (Esse procedimento foi realizado na Universidade de Padova – Itália) e após as peças foram funcionalizadas.

4.2.3.3 Ativação com APTES

Para a imobilização por ligação covalente o suporte IE-Geo-Na e IE-Geo-K foram ativado com uma solução de APTES 5% v/v em hexano - 80 mL desta solução para cada grama (g) do suporte, que permaneceu sob agitação em atmosfera de nitrogênio por 2 horas á 80 °C. Após a ativação o suporte foi denominado SF-Geo-Na (Geopolímero de Na revestido com NH_2) e SF-Geo-K (Geopolímero de K revestido com NH_2), e guardadas até a imobilização por ligação covalente.

4.2.3.4 Determinação de grupos funcionais de amina por colorimetria

Para avaliar a ativação com APTES no suporte de geopolímero impresso em 3D, foi realizado um teste colorimétrico com ninidrina. As amostras que foram realizados os testes foram: Geo-Na, Geo-K; IE-Geo-Na; IE-Geo-K; SF-Geo-Na e SF-Geo – K.

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Chapa magnética de agitação
- ✓ Estufa
- ✓ Vortex

- ✓ *Reagentes e soluções*
- ✓ Ninidrina (2,2-diidroxí-hidrindeno-1,3-diona);
- ✓ Solução aquosa de Ninidrina 0,1 % (m/m)
- ✓ Água destilada

Procedimento do ensaio

No tudo de ensaio foi adicionado 500 mg de amostra com 1 mL de água, e agitada no vortex por 1 min. Após 1 mL de solução de Ninidrina (0,1% m/m) foi adicionada no tubo. Os tubos foram colocados no banho maria a 40°C e permaneceu por 20 min. Passado o período de tempo os tubos foram retirados secos por fora e comparada visualmente (90,91).

4.2.4 Caracterização física do geopolímero

Foi realizada microanálise química por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX) em conjunto com microscopia eletrônica de varredura (MEV): FEI Quanta 200 pressão variável ambiental / ESEM, equipado com: filamento de tungstênio; Detector de elétrons secundários SED Everhart-Thornley, em HV; LFD (detector de elétrons secundários de grande campo em LV); BSED / GAD (detector de elétrons retroespalhados / detector analítico gasoso) em HV / LV; detector de energia dispersiva de raios-X (EDX) Elemento EDAX - C2B (Chip de 30 mm² - resolução 129 eV em Mn K); Vácuo de 0,53 Torr; a resolução máxima do instrumento é de 3 nm a 30 kV e foi usado para (semi) quantificar a troca de íons de sódio por nitrogênio no geopolímero. A análise foi realizada em várias regiões da amostra para obter um valor mais confiável (Essa análise foi realiza na Universidade de Pádua – Itália).

4.2.4.1 Permeabilidade

Os coeficientes de permeabilidade k_1 e k_2 podem ser obtidos por meio de experimentos de fluxo de gás em laboratório, ajustando a **Equação 1** aos dados experimentais de queda de pressão (ΔP) e velocidade do fluido (v_s). A grande vantagem é que esses parâmetros de permeabilidade são dependentes apenas da macroestrutura média (tamanho dos poros, porosidade, morfologia dos poros, interconectividade dos poros, etc.) e, portanto, podem ser usados para estimar as relações reais ΔP - v_s para outras condições de fluido e fluxo, desde que ρ e μ sejam corrigidos de acordo com a temperatura e pressão de teste. A avaliação experimental da permeabilidade foi realizada em aparelho fabricado no laboratório da UNAERP (Universidade de Ribeirão Preto – SP), com ensaios realizados em regime de regime permanente com fluxo de ar seco em condições ambientais ($T = 29^\circ \text{C}$ e $P_o = P_{\text{atm}} = 712 \text{ mmHg}$). O gradiente de pressão na amostra ($P_i - P_o$) foi medido por um manômetro digital (Sper Scientific, modelo 840083, Scottsdale-AZ, EUA) em resposta às

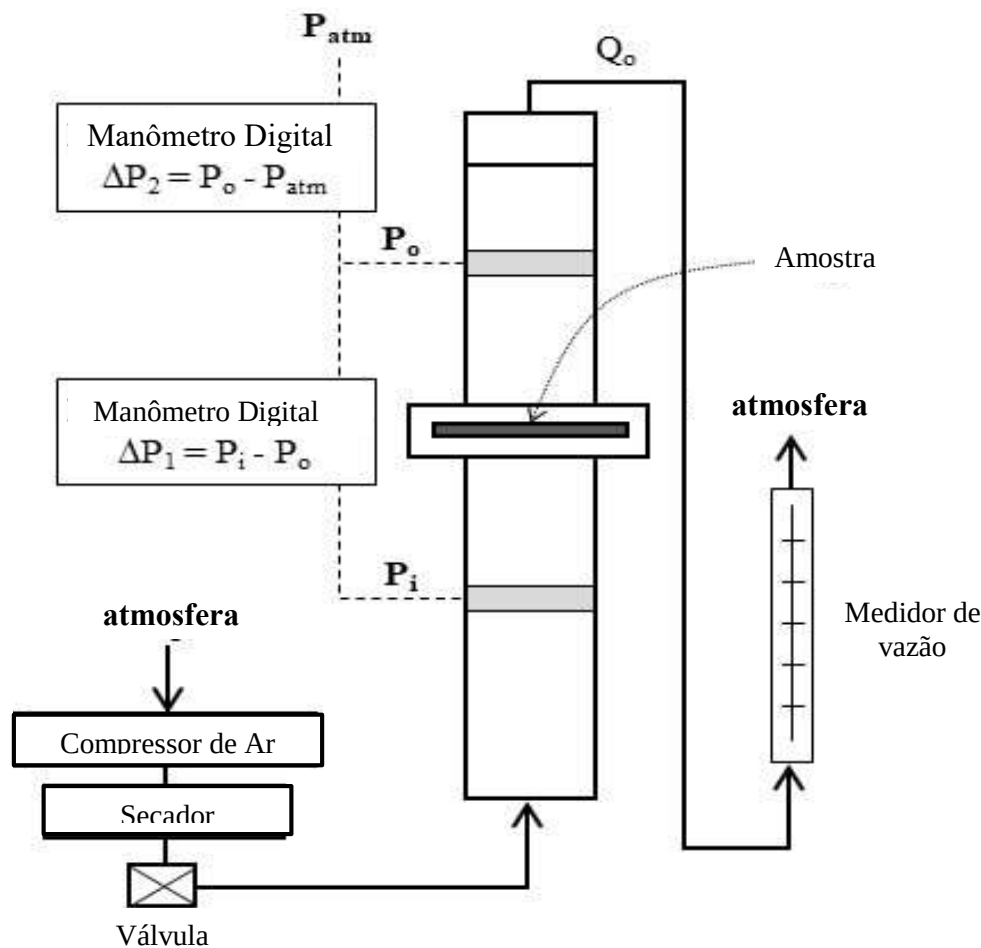
variações na taxa de fluxo volumétrico de ar Q , controlado por uma válvula de agulha e medido com um rotâmetro (Conaut, São Paulo-SP, Brasil) aberto à atmosfera. A vazão (Q) foi corrigida para o valor na saída da amostra (Q_o) e finalmente convertida para velocidade superficial por $v_s = Q_o / A_{\text{flow}}$. Mais detalhes da configuração são descritas pelo pesquisador Innocentini et al (92,93).

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{\mu}{K_1} V_S + \frac{\rho}{K_2} V_S^2 \quad \text{Equação 1}$$

O conjunto de dados coletados (P_1 , P_o e v_s) para cada teste foi ajustado e tratado de acordo com o método dos mínimos quadrados usando um modelo parabólico do tipo: $y = ax + bx^2$, onde y é ΔP (da **Equação 2**) e x é a velocidade do fluido v_s . Os parâmetros de permeabilidade foram então calculados a partir das constantes ajustadas a ($k_1 = \mu/a$) e b ($k_2 = \rho/b$) da **Equação 1**. O aparelho usado para testes de permeação é esquematizado na **Figura 11**.

$$\Delta P = \frac{P_1^2 - P_o^2}{2P} \quad \text{Equação 2}$$

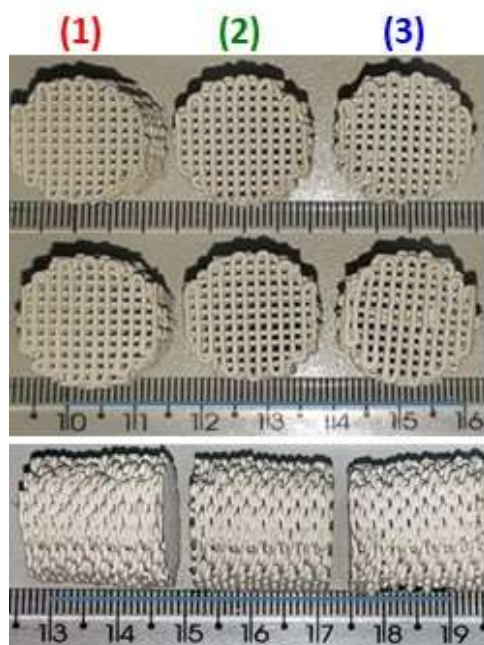
Figura 11. Esquema do teste de permeação de fluxo de ar.



4.2.4.1.1 Amostras para o teste de permeabilidade

Três amostras de geopolímero em 3D foram usadas para testes de permeação com fluxo de ar. As imagens das amostras são fornecidas na **Figura 12**. As características físicas e as dimensões são fornecidas na **Tabela 5**.

Figura 12. Fotos das amostras de geopolímero testadas.



Fonte: Murilo Daniel de Mello Innocentini

Tabela 5 . Características físicas das amostras de geopolímero testadas.

Amostra	Diâmetro D (mm)	Largura L (mm)	Massa M (g)	Volume V (cm ³)	Densidade aparente D (ρ_a g/cm ³)
Na – Geo - 1	18,60	19,50	4,303	11,39	0,378
Na – Geo - 2	18,95	19,45	4,564	11,58	0,394
Na – Geo - 3	19,50	19,25	4,419	11,79	0,375
Média	19,02	19,40	4,429	11,59	0,382
Desvio	0,45	0,13	0,131	0,20	0,010
CV (%)	2,39	0,68	2,95	2,72	2,74

4.3 Imobilização

4.3.1 Imobilização da Lipase de *Candida rugosa* por adsorção

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Erlenmyer de 250mL;
- ✓ Balança Analítica Ohaus, série Adventure com capacidade de carga de 210 g e precisão de 0,0001 g;
- ✓ Papel de Filtro;
- ✓ Bomba de vácuo

Reagentes e soluções

- ✓ Lipase de *Candida rugosa* tipo VII sólida - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- ✓ Hexano, pureza min. 99,5%: Química Moderna Industrial e Comércio LTDA.
- ✓ Polietilenoglicol (PEG) 1500 - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- ✓ Solução tampão pH 4.0; 5.0 e 7.0.
- ✓ Suportes: Caulim, Argila Vermiculita, Argila Montmorilonita, Maghemita, Magnetita, Grafite e Geopolímero 3D.

Procedimento do ensaio

Na imobilização da lipase por adsorção física em meio orgânico, o suporte foi embebido em hexano, em proporção 1:10 (m/v), e mantido sob agitação, em temperatura ambiente, por 2 horas conforme proposto por Paula (2012)(94). Após, foram adicionados ao suporte 200 µL de solução de PEG 0,5 mg/mL e 0,250g de enzima/ g de suporte. A lipase e o suporte foram mantidos em agitação á 4°C, por 24 horas, e posteriormente foi filtrada à vácuo e lavada com hexano. A imobilização em meio aquoso seguiu o mesmo procedimento utilizando como solvente solução tampão pH 4,0; 5,0 e 7,0.

4.3.2 Imobilização da Lipase de *Candida rugosa* por ligação covalente

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Erlenmyer de 250mL;

- ✓ Balança Analítica Ohaus, série Adventure com capacidade de carga de 210 g e precisão de 0,0001 g;
- ✓ Papel de Filtro;
- ✓ Bomba de vácuo;
- ✓ Bomba peristáltica
- ✓ Reator de vidro encapsulados 50 mL;
- ✓ Banho termostatisado;
- ✓ Chapa magnética de agitação.

Reagentes e soluções

- ✓ Lipase de *Candida rugosa* tipo VII sólida - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- ✓ APTES (3-aminopropiltietoxisilano) – Sigma Aldrich, St. Louis, USA.
- ✓ Hexano, pureza min. 99,5%: Química Moderna Industrial e Comércio LTDA.
- ✓ Solução tampão fosfato pH 7,5.
- ✓ Solução de Glutaraldeído 25 % (v/v) – Sigma Aldrich, St. Louis, USA.
- ✓ Suportes: Caulim, Argila Vermiculita, Argila Montmorilonita, Maghemita, Magnetita Grafite e Geopolímero 3D.

Procedimento do ensaio

Na imobilização por ligação covalente o suporte foi funcionalizado com uma solução de APTS 5% v/v em hexano - 80 mL desta solução para cada grama (g) do suporte, que permaneceu sob agitação em atmosfera de nitrogênio por 2 horas á 80 °C. Após esse período, o suporte foi filtrado e seco em estufa á 110°C por 12 horas. Em seguida, o suporte foi funcionalizado com glutaraldeído. Para cada grama (g) de suporte 20 mL da solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão fosfato pH 7,5 foi adicionada. Manteve-se em agitação a temperatura ambiente por 2 horas. Após, o suporte foi filtrado e lavado com álcool, água e solução tampão para garantir a retirada do excesso de glutaraldeído.

O suporte ativado e funcionalizado foi utilizado para a imobilização da lipase de *Candida rugosa* por ligação covalente. O procedimento constitui do contato da solução enzimática de 20 mg de lipase/ g de suporte solubilizada em pH 5 sob temperatura de 4 °C por 24 horas sob agitação a 200 rpm. Para o suporte geopolímero em 3D utilizou reator de coluna encamisado de 50 mL, 20 cm de altura e diâmetro interno de 2 cm, mantendo-se uma vazão de 6 mL/min com a bomba peristáltica.

4.4 Avaliação da eficiência da imobilização da lipase *candida rugosa* nos suportes hidrofílicos, hidrofílicos modificados e magnéticos

Os biocatalisadores foram caracterizados através das seguintes determinações: (i) Proteína; (ii) Atividade Hidrolítica; (iii) Teor de Umidade; (iv) Rendimento de Imobilização e (v) Reuso, para selecionar os melhores biocatalisadores para a aplicação na primeira etapa da reação de hidroesterificação.

O biocatalisador selecionado para a aplicação na produção de biodiesel, também foi caracterizado com as seguintes análises (i) pH e temperatura ótima; (ii) tempo de meia vida; (iii) TGA; (iv) RMN; (v) cinética enzimática.

4.4.1 Determinação de Proteína

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Espectrofotômetro UV-Vis ThermoAnalítica;
- ✓ Cubeta acrílica;
- ✓ Pipeta automática 10 -100 µL;
- ✓ Pipeta automática 100 - 1000 µL.

Reagente e soluções

- ✓ Bradford - Comassie brilliant blue BG-250. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA;
- ✓ Albumina de Soro Bovino (BSA);
- ✓ Água ultrapura.

Procedimento do ensaio

A técnica espectrofotométrica na região UV-Vis foi utilizada para determinar a concentração das enzimas livres e adsorvidas nos suportes, por meio da análise de teor de proteína por Bradford, o qual é baseado na interação entre o corante e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Foram obtidas curvas analíticas, na qual utilizou a BSA como padrão para a determinação do teor de proteínas em 595 nm.

4.4.2 Determinação da Atividade Hidrolítica

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Balança Analítica Ohaus, série Adventure com capacidade de carga de 210 g e precisão de 0,0001 g;
- ✓ Chapa de agitação;
- ✓ Bureta de 50 mL;
- ✓ Proveta de 100mL;
- ✓ Erlenmyer de 250mL.

Reagente e soluções

- ✓ Álcool etílico pureza mín. 99,5%: Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ;
- ✓ Azeite de oliva comercial (Carbonel, extra virgem, adquirido em mercado local)
- ✓ Goma Arábica: Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- ✓ Solução aquosa de HCl 0,05 M; previamente padronizada;
- ✓ Solução aquosa de KOH 0,05 M; previamente padronizada com biftalato de potássio;
- ✓ Solução aquosa de fenolftaleína 1mg/mL.

Procedimento do ensaio

Foi utilizado o método titulométrico usando emulsão de azeite de oliva conforme proposto por Paula (2012) (94). A emulsão foi constituída por água: azeite de oliva: goma arábica (50%: 50%: 7% sobre o valor da água m/m/m). A reação de hidrólise ocorreu na temperatura de 37 °C, sob agitação (200 rpm) em banho Dubnoff, por 5 minutos. Para a inativação da enzima foram adicionados 10 mL de álcool:acetona:água (1:1:1v/v/v) e 10 mL solução de KOH 0,05 M em excesso, o qual foi titulado com HCl 0,05 M. Para a determinação da atividade hidrolítica utilizou-se a **Equação 3**.

$$A(U / g) = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 10^6}{t \times m} \text{ Equação 3}$$

Em que: V_b = volume do branco (L); V_a = volume da amostra (L); M = molaridade da solução de HCl; t = tempo de incubação (min); m = massa de biocatalisador adicionado (g).

Uma unidade de atividade (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio.

4.4.3 Fluorimetria diferencial de varredura (ThermoFluor)

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Balança Analítica Ohaus, série Adventure. Capacidade de pesagem: 210 g;
- ✓ ThermoFluor - equipamento CFX96 Real-Time System (Bio-Rad)

Reagente e soluções

- ✓ Lipase de *Candida rugosa* tipo VII sólida - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
- ✓ Solução tampão pH 2.0 a pH 12

Procedimento do ensaio

A atividade e a temperatura ótima da lipase, foram analisadas no equipamento ThermoFluor no qual uma solução de 0,4 mg/mL de proteína na lipase foi incubada em solução tampão de pH 2 á pH 12 com a sonda SYPRO orange (Invitrogen). Após a adição da sonda foram realizadas medias de detecção da fluorescência na região de excitação de 490 nm e emissão de 530 nm. As amostras foram aquecidas passando por um intervalo de temperaturas iniciado em 25 °C, e finalizado em 90 °C (esse ensaio foi realizado somente para a lipase livre).

4.4.4 Determinação do Teor de Umidade

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Balança de secagem com Lâmpada de Infravermelho – Marte, Modelo: ID50;

Procedimento do ensaio

A umidade do biocatalisador foi medida diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho por 15 minutos a 105 °C (T0 = 0°C, 35°C/min).

4.4.5 Rendimento de Imobilização

O rendimento da imobilização foi calculado usando a **Equação 4**:

$$n(\%) = \frac{U \times 100}{U_o} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que, U_o = unidades de atividade hidrolítica oferecidas para imobilização e U = unidades de atividade hidrolítica total presente no suporte.

4.4.6 Reuso

Ao final da reação de atividade hidrolítica, procedeu a separação do biocatalisador do meio reacional através de filtração a vácuo. Utilizou funil de Buchner com papel de filtro. O biocatalisador foi lavado no próprio funil com 10 mL de n-hexano para a retirada de resíduo de óleo e compostos apolares na superfície do biocatalisador seguido de 15 mL de solução tampão fosfato pH 7,5. Após a lavagem o sistema permaneceu sob vácuo por 5 minutos para a retirada de excesso de umidade. Em seguida pesado e reutilizado para teste de reuso.

4.5 Caracterização do biocatalisador selecionado

Para conhecer algumas propriedades importante e de interesse do biocatalisador selecionado, foi realizado um planejamento composto central rotacional do tipo estrela. Inicialmente o planejamento é organizado como um planejamento fatorial 2^2 , com variáveis normalizadas entre -1 e 1 e ponto central (normalizada em 0), já os experimentos que representam o ponto estrela normalizados em $-\sqrt{2}$ a $\sqrt{2}$, que permite a combinação das variáveis em 5 níveis. Os níveis utilizados e os valores reais para cada variável estão descritos na **Tabela 6**

Tabela 6. Níveis do planejamento composto central

Variáveis	Nível $-\sqrt{2}$	Nível -1	Central (0)	Nível +1	Nível $\sqrt{2}$
T (°C)	19,6	30,0	55,0	80,0	90,3
pH (pH)	3,98	5,0	7,5	10,0	11,4

*Utilizou 0,5 g de biocatalisador em cada experimento

O planejamento de experimentos foi realizado para analisar em conjunto os efeitos de duas variáveis selecionadas: Temperatura (T) e pH (pH):

- ✓ Temperatura (T) – As lipases são facilmente inativas em condições extremas de temperatura dessa forma variou a temperatura no menor nível (-1) 30 °C (temperatura que

o óleo de palma é líquido) e no maior nível (1) 80 °C (pois é importante para o planejamento investigar os extremos).

- ✓ pH – dependendo do pH da solução a atividade enzimática varia devido a eletrosseletividade que também está associada a temperatura. Por isso essa variável foi escolhida, e variou de 3,98 a 11,4, pois condições ótimas de pH e Temperatura proporciona ótimo desempenho do biocatalisador. Na **Tabela 7** são apresentadas as soluções de tampão utilizada.

Tabela 7. Soluções tampões 0,1 M usados no preparo da emulsão.

pH	Tampão	pKa
3,9 a 5,5	Citrato ($C_6H_8O_7$ / $Na_3C_6H_5O_7$)	4,77
6,0 a 7,5	Fosfato (KH_2PO_4 / Na_2PO_4)	7,21
8,0 a 9,0	Tris-HCl	8,06
9,5 a 12,0	Carbonato ($NaHCO_3$ / K_2CO_3)	10,33

Fonte: elaborada pela autora.

4.5.1 Testes de Estabilidade do Biocatalisador

4.5.1.1 Temperatura e pH

Após o resultado da temperatura ótima apontada pelo planejamento de experimento que foi 55°C foi realizado o teste de estabilidade a temperatura, para avaliar a estabilidade do biocatalisador naquela determinada temperatura. Esse teste foi determinado por meio da incubação de 5 mg do biocatalisador no pH ótimo apontado pelo planejamento fatorial, pH 4 e 10 durante 1h; 2h; 3h; 4h; 5h; 6h e 24 horas. Após o tratamento térmico as amostras foram resfriadas em banho de gelo. Em seguida a atividade hidrolítica residual foi determinada conforme descrito no item 4.4.2 .

4.5.1.2 Concentração e tipo de substrato para avaliar parâmetros cinéticos

A cinética de Michaelis-Menten foi usada para avaliar alguns parâmetros cinéticos como K_m e $V_{m\acute{a}x}$ e descrever a dependência da atividade enzimática na concentração de substrato para a lipase imobilizada. Os parâmetros cinéticos, $V_{m\acute{a}x}$ e K_m foram determinados utilizando uma técnica de atividade hidrolítica conforme descrito no item 4.4.2 utilizando temperatura e pH ótimo. Na **Tabela 8** são apresentadas as concentrações e tipos de substrato no preparo da emulsão hidrolítica. Os resultados experimentais foram estimados a partir dos dados experimentais utilizando a equação de Lineweaver-Burk **Equação 5** e **Equação 6**, onde $V_{m\acute{a}x}$ é unidades de atividade por miligrama ($U\ mg^{-1}$) e K_m é concentração de substrato que dá uma taxa de reação de $\frac{1}{2} V_{m\acute{a}x}$ (mM).

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Equação 5})$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{S} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

[S] é a concentração do substrato (μM /g de óleo);

V_0 e $V_{m\acute{a}x}$ representam, respectivamente, a taxa inicial e máxima da reação (U/g);

K_m é a constante de Michaelis (mM).

Tabela 8. Proporção de substrato e tampão no preparo da emulsão

Substrato (% m/m)	Tampão (% m/m)	Teor de ácidos graxos (μM)		
		Azeite de oliva	Óleo de palma	OGR
10 (0,25 g)	90 (2,25 g)	186	197	196
15 (0,37 g)	85 (2,12 g)	279	295	294
20 (0,50 g)	80 (2,00 g)	372	394	392
30 (0,75 g)	70 (1,75 g)	558	590	587
50 (1,25 g)	50 (1,25 g)	930	984	979
70 (1,75 g)	30 (0,75 g)	1302	1377	1371

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.3 Ressonância magnética nuclear protônica

O espectro de RMN ^{13}C e ^{29}Si foi realizado no "Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear" do DQ-UFSCar utilizando um RMN na marca Bruker.

4.5.4 Teste de dessorção (Lixiviação)

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Espectrofotômetro UV-Vis TehmoAnalítica;
- ✓ Cubeta acrílica;
- ✓ Béquer
- ✓ Placa de agitação
- ✓ Pipeta automática

Reagente e soluções

- ✓ Bradford - Comassie brilliant blue BG-250. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA;
- ✓ Solução NaCl 1M
- ✓ Albumina de Soro Bovino (BSA);
- ✓ Água ultrapura;
- ✓ Biocatalisador
- ✓ Lipase *Candida rugosa* tipo VII , Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Procedimento do ensaio

O teste de lixiviação foi realizado em uma solução de NaCl 1M, 500 mg do biocatalisador (10 mg / g) e um branco com a lipase de *Candida rugosa* livre, foi adicionado e incubado com agitação magnética durante 24 h. Análise do sobrenadante foi realizada nos tempos 0, 2, 3, 4 e 24h. Usando o método de Bradford descrito no item 4.4.1, a concentração de proteínas liberadas no sobrenadante foi medida, um teste branco utilizando somente a solução de NaCl com geopolímero (Geo-Na) também foi realizado (95).

4.6 ANÁLISE DAS MATÉRIAS-PRIMAS PARA A HIDROESTERIFICAÇÃO

4.6.1 Teor de ácidos graxos livres e índice de acidez

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Balança Analítica Ohaus, série Adventure com capacidade de carga de 210 g e precisão de 0,0001 g;
- ✓ Sistema de aquecimento composto por chapa de aquecimento e béquer de 250 mL contendo água (banho Maria);
- ✓ Bureta de 50 mL;
- ✓ Proveta de 100 mL;
- ✓ Erlenmyer de 250 mL.

Reagente e soluções

- ✓ Álcool etílico, pureza mín. 99,5 %: Vetec Química Fina LTDA;
- ✓ Hidróxido de sódio P.A.: Labsynth Produtos para Laboratório LTDA;
- ✓ Biftalato de potássio P.A: Vetec Química Fina LTDA;
- ✓ Fenolftaleína P.A: Labsynth Produtos para Laboratório LTDA;
- ✓ Solução etanólica de NaOH 1,0 M; previamente padronizada com biftalato de potássio;
- ✓ Solução aquosa de fenolftaleína 1 mg/mL.

Procedimento do ensaio

O ensaio foi realizado de acordo com as determinações da AOCS Ca 5a-40-12(96), que consiste na determinação da acidez que é definida pela quantidade de miligramas de hidróxido de sódio (NaOH) necessária para neutralizar os ácidos graxos livres contidos em 1,00 g de amostra. É calculado através da **Equação 7**, é expresso normalmente como porcentagem de ácido oleico, láurico ou palmítico. Para o óleo de palma é expresso através do ácido palmítico, já para o OGR o ácido oleico.

$$\text{Ácido graxos livres \%} = \left(\frac{M \times V}{ma} \right) \times \text{Tipo de óleo} \quad \textbf{Equação 7}$$

Onde:

M = Molaridade da solução de NaOH;

V = Volume da solução de NaOH gasto na titulação da amostra de óleo;

ma = Massa da amostra.

Tipo de óleo: Oleico - 28,2; Láurico - 20,0 ou palmítico - 25,6.

A acidez pode ser expressa em termos de ácidos graxos livres calculada através da.

$$\text{Acidez } \left(\text{mg} \frac{\text{NaOH}}{\text{g}} \right) = 1,99 \times \text{Ácidos graxos livres} \quad \text{Equação 8}$$

4.6.2 Determinação do teor de água por Karl Fischer

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Titulador Coulométrico Karl Fischer Metrohm Pensalab modelo 831;
- ✓ Balança Analítica Ohaus, série Adventure com capacidade de carga de 210 g e precisão de 0,0001 g;
- ✓ Seringas de plástico descartáveis e agulhas hipodérmicas para inserção das amostras no titulador.

Reagentes e soluções

- ✓ Iso-propanol pureza mín. 99,5 %: Vetec Química Fina LTDA;
- ✓ 1-butanol grau ACS, ISO, Reag. Ph Eur, pureza mín. 99,5 %: Merck, Darmstadt, Alemanha;
- ✓ Hydranal® - Coulomat AG, reagente para titulação Karl Fischer coulométrico (solução anódica), pureza min. 99,9 %: Fluka Analytical, Wunstorf, Alemanha;
- ✓ Hydranal® - Coulomat CG, reagente para titulação Karl Fischer coulométrico (solução catódica), pureza min. 99,9 %: Fluka Analytical, Wunstorf, Alemanha;
- ✓ Álcool metílico pureza mín. 99,9%: Sigma-Aldrich, St. Louis,;
- ✓ Solução anódica Karl Fischer: preparada pela mistura, em volume, de solução de anodo Karl Fischer comercial com metanol, na proporção 6:4.

Procedimento do ensaio

O teor de água foi determinado pelo método de Karl Fischer coulométrico segundo a ASTM D6304(97), que consiste na determinação direta de água, na faixa entre 0,001 e 2,5 % m/m, em produtos de petróleo, óleos lubrificantes e aditivos. O teor de água foi calculado pela **Equação 9**.

$$\%H_2O = \frac{W}{(10000 \times m)} \quad \text{Equação 9}$$

Onde:

W = massa de água titulada na amostra de óleo/mg.

m = massa de amostra/g.

4.6.3 Perfil composicional do óleo

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC - 2010, com detector de ionização por chama (DIC);
- ✓ Balança Analítica Ohaus, série Adventure com capacidade de carga de 210 g e precisão de 0,0001 g;
- ✓ Frasco de vidro para cromatografia (vial) com capacidade de 2 mL, com tampa seladora do tipo crimp;
- ✓ Pipetas de Pasteur descartáveis;
- ✓ Coluna cromatográfica SP 2560 Supelco (100 m × 0,25 mm × 20 µm)
- ✓ Chapa aquecedora;
- ✓ Balão de fundo chato;
- ✓ Condensador de bolas.

Reagentes e soluções

- ✓ Iso-octano, pureza mín. 99,5 %: Vetec Química Fina LTDA;
- ✓ Álcool metílico pureza mín. 99,9 %: Sigma-Aldrich, St. Louis, USA;
- ✓ Hidróxido de potássio P.A: Labsynth Produtos para Laboratório LTDA;
- ✓ Ácido sulfúrico P.A.: Química Moderna Industrial e Comércio LTDA;
- ✓ Cloreto de sódio P.A: Labsynth Produtos para Laboratório LTDA;
- ✓ Solução metanólica de NaOH 0,2 mol/L;
- ✓ Solução metanólica de H₂SO₄ 1,0 mol/L;
- ✓ Solução saturada de NaCl 400 g/L;
- ✓ Gás hidrogênio, pureza min. 99,9 %;
- ✓ Ar sintético, pureza min. 99,9 %;
- ✓ Gás Hélio, pureza min. 99,9 %.

Procedimento do ensaio

Para a caracterização da matéria-prima foi realizado o ensaio do perfil composicional da amostra de óleo de palma e residual de acordo com a ISO 12966-2017 (*Animal and vegetable fats and oils – Gas chromatography of fatty acid methyl esters*)(98), que requer uma reação de transesterificação com óleo para ser analisada.

A reação de transesterificação foi realizada em um balão acoplado a um condensador. Aproximadamente 50 mg de amostra foi transferida para o balão e acionados 2 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio e aquecida até a ebulição. Após adicionou-se vagarosamente solução metanólica de ácido sulfúrico até o desaparecimento da cor rosa, manteve-se em aquecimento por mais 5 minutos, retirou-se do aquecimento, adicionou-se 2 mL de solução saturada de cloreto de sódio e 5 mL de *iso*-octano, observou-se a separação das fases, recolheu-se a fase superior para um vial de 2 mL e analisou-se por cromatografia gasosa.

A separação e identificação dos ésteres de ácidos graxos foi realizada em um cromatógrafo a gás, acoplado a um detector de ionização por chama (DIC). As condições de análise estão descritas na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Condições da análise de perfil composicional

Parâmetro	Condição
Temperatura do injetor	250°C
Programação de aquecimento da coluna	
Temperatura Inicial	120°C - Mantida por 2 minutos
Rampa 1	4°C/ min. até 240°C
Rampa 2	5°C/ min. até 240°C - Mantida por 7 minutos
Temperatura do detector	250°C
Coluna	SP 2560 (100 m × 0,25 mm × 20 µm)
Gás de arraste	Hélio
Modo de injeção	Split 100:1
Velocidade linear do gás de arraste	29.6cm/seg.
Fluxo do Gás de arraste	1.0mL/min.
Pressão	1001,1kPa
Tempo total de análise	30 min.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 REAÇÕES DE HIDRÓLISE

4.7.1 Hidrólise – geração de ácidos graxos

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Balança Analítica Ohaus, série Adventure com capacidade de carga de 210 g e precisão de 0,0001 g;
- ✓ Reator de vidro encapsulados 50 mL;
- ✓ Reator de vidro encapsulado 50 mL com placa porosa;
- ✓ Banho termostatisado;
- ✓ Chapa magnética de agitação;

Reagente e soluções

- ✓ Lipase de *Candida rugosa* tipo VII sólida - Sigma-Aldrich, St. Louis, USA;
- ✓ Lipase Novozyme 435 - Novozymes A/S, Bagsvaerd Denmark
- ✓ Solução tampão pH 5;
- ✓ Óleo residual e palma.

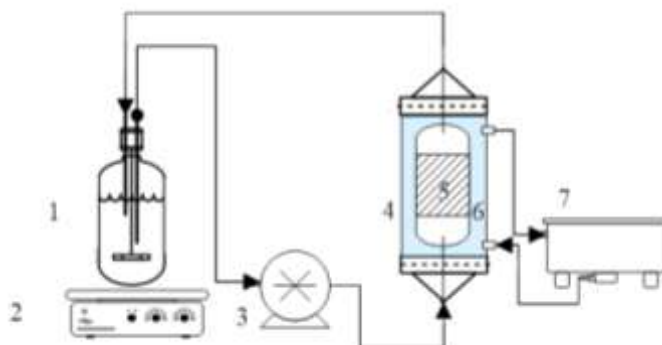
Procedimento do ensaio

A reação de hidrólise foi realizada em um reator de vidro encapsulado de 50 mL, diâmetro interno de 5 cm e altura de 10 cm, que operou no modo batelada. Quando utilizado o suporte de geopolímero utilizou um reator de batelada com recirculação de fluxo. O reator utilizado foi feito de coluna de vidro (10 cm de altura e 2 cm de diâmetro interno) que foi encamisada para controlar a temperatura da reação por recirculação de água. Na **Figura 13** há um esquema apresentando o reator de batelada com circulação de fluxo.

A proporção de biocatalisador utilizada foi de 100 U de atividade hidrolítica para cada grama de óleo, razão molar água: óleo de 25:1, temperatura de 50°C, agitação de 200 rpm e tempo de 24 horas. Ao término de cada reação de hidrólise, o produto foi deixado em repouso para a completa separação entre as fases de ácidos graxos e glicerol. Após a separação, os ácidos graxos foram submetidos à determinação do índice de acidez (AOCS Ca 5a-40).

Um ensaio comparativo utilizando a lipase Novozyme 435 foi realizado utilizando as mesmas condições.

Figura 13. Esquema do sistema da reação de hidrólise utilizado quando utilizado o suporte de geopolímero impresso em 3D. (1) recipiente de mistura de reação; (2) agitador magnético; (3) bomba peristáltica; (4) reator; (5) amostra; (6) camisa de água, (7) banho de água de recirculação



Fonte: Elaborada pela autora.

4.8 Tratamento estatístico dos resultados

Para o tratamento estatístico dos resultados e avaliação dos efeitos principais e das interações, bem como a obtenção dos modelos matemáticos das reações de hidrólise e esterificação, foram utilizados os softwares quimiométricos Matlab R-2013^a (Licença: 895804), JMP 2015 (Licença: PJK5R70JY) e Microsoft Office Home e Student Excel 2010 (Licença: X16-53284-01) e rotina Matlab *regression2*.

4.9 Reações de esterificação - geração de ésteres metílicos de ácido graxos

Equipamentos e materiais utilizados

- ✓ Chapa aquecedora;
- ✓ Reator de vidro encapsulados 50 mL;
- ✓ Banho termostatzado;
- ✓ Termômetro digital Incoterm;
- ✓ Balança Analítica Ohaus, série Adventure com capacidade de carga de 210 g e precisão de 0,0001 g, (Certificado: BA 009_06_15 IMETRO);

Reagentes e soluções

- ✓ Ácidos graxos do óleo de palma
- ✓ Ácidos graxos do OGR
- ✓ Álcool metílico pureza mín. 99,9 %: Sigma-Aldrich;

- ✓ Hidróxido de potássio P.A: Labsynth Produtos para Laboratório LTDA;
- ✓ Ácido sulfúrico P.A.: Química Moderna Industrial e Comércio LTDA;
- ✓ Ácido clorídrico P.A.: Vetec Química Fina LTDA;
- ✓ Cloreto de sódio P.A: Labsynth Produtos para Laboratório LTDA;
- ✓ Solução saturada de NaCl 400 g/L.
- ✓ Solução HCl 5 %

4.9.1 Reação de Esterificação (*adaptado de Hassan; Vinjamur,2014(99)*)

Procedimento do ensaio utilizado na reação de esterificação dos ácidos graxos provenientes do óleo de palma bruto e do OGR.

Em um reator de vidro de 50 mL acoplado a um banho termostatizado, foi introduzido os ácidos graxos obtido na reação de hidrólise, que permaneceu sob agitação (250 rpm aproximadamente) até atingir a temperatura desejada da reação; adicionou-se o catalisador e o álcool sobre os ácidos graxos. A reação foi mantida sob agitação e aquecimento. As quantidades de reagentes e de catalisador utilizados, bem como tempo e temperatura reacionais, serão especificados no item subsequente.

4.9.1.2 Estudo das conversões nas reações de esterificação

Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 4.9.1. em duplicata, utilizando como catalisador ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o álcool metílico. A razão molar álcool:ácidos graxos foi de 3:1, utilizando 1% m/m de H_2SO_4 em relação a massa de ácidos graxos de palma bruto e do óleo residual.

As reações foram realizadas na temperatura de $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, durante 60 minutos. Após o término, as reações foram submetidas a separação da fase aquosa e secagem dos ésteres metílicos.

4.9.1.3 Separação dos ésteres metílicos (*biodiesel*)

Transferiu-se o produto da reação para um funil de separação, após 30 minutos, observou a decantação da fase aquosa (fase inferior). Retirou-se toda a fase aquosa, e centrifugou a fase dos ésteres (biodiesel) por 30 minutos a 2000 rpm para se obter uma completa separação.

4.9.1.4 Secagem dos ésteres metílicos (biodiesel)

Colocou-se o biodiesel na estufa a 100°C, por 1 hora. Após esse intervalo de tempo, guardou o biodiesel em um frasco âmbar com tampa esmerilhada, para posterior análise de teor de ésteres EN 14103(100) e mono-, di- e triglicerídeos conforme a ABNT NBR 15764(101) .

4.9.2 Ensaio comparativo

4.9.2.2 *Reação de Transesterificação com geopolímero de sódio e potássio (adaptado de Garcia, 2007 (102))*

Procedimento do ensaio utilizado na transesterificação

Em um reator de vidro encapsulados 50 mL equipado com banho termostatizado foi introduzido o óleo de palma bruto e o OGR que permaneceu sob agitação (250 rpm aproximadamente) até atingir a temperatura de 60 °C. Paralelamente, 3% de geopolímero macerado e de metanol utilizado a razão molar álcool:óleo 6:1 foram adicionadas e homogeneizadas. A reação foi mantida sob agitação constante, e temperatura de 60 °C $\pm$ 5 °C, durante 60 minutos.

Ao término das reações o produto foi submetido à separação do glicerol, lavagem dos ésteres metílicos e secagem.

4.9.2.3 *Separação da mistura ésteres metílicos (biodiesel) e glicerol*

Transferiu-se o produto da reação para um funil de separação, esperou 30 minutos para o glicerol decantar na fase inferior. Após esse período optou-se por centrifugar por 30 minutos á 2000 rpm para se obter uma separação mais eficiente, e iniciou-se o processo de lavagem dos ésteres metílicos.

4.9.2.4 *Lavagem dos ésteres metílicos (biodiesel)*

No funil de separação introduziu-se o biodiesel e inicialmente adicionou-se 20 mL de solução aquosa de HCl 5%. Homogeneizou-se o sistema, permanecendo em repouso para a

separação. Após alguns minutos, removeu-se a fase aquosa inferior e repetiu-se o procedimento. Em seguida, lavou-se os ésteres metílicos com 20 mL de solução saturada de NaCl saturada em duplicata. Homogeneizou-se o sistema, permanecendo em repouso para a separação. Posteriormente, removeu-se a fase inferior. A seguir foi adicionado 25 mL de água destilada e repetiu-se o procedimento de homogeneização e separação em duplicata. Após isso, centrifugou-se o biodiesel por 30 minutos à 2000 rpm, e separou a fase superior em um béquer. Os ésteres metílicos foram secos conforme descrito no item 4.9.1.4.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Matéria-prima para a reação de hidroesterificação

5.1.1 Teores de ácidos graxos livres, índices de acidez e teores de umidade

Pesquisadores(3,35,103) sugerem que a quantidade de acidez presente nos óleos e gorduras para a produção de biodiesel via transesterificação por catálise alcalina seja inferior a 3 mg NaOH/g, portanto ácidos graxos livres e umidade são prejudiciais para o bom desempenho do processo de produção do biodiesel.

Conforme indicado na **Tabela 10**, a acidez determinada nas amostras de óleo de palma bruto e do OGR está em quantidades superiores a 3 mg NaOH/g, quantidade suficiente para comprometer o desempenho da reação de transesterificação por catálise alcalina.

Tabela 10. Índice de acidez do óleo vegetal

Óleo	Ácidos graxos livres	Índice de Acidez
Palma bruto	7,09 ± 0,02 % m/m	14,03 ± 0,05 mg NaOH/g
OGR	3,79 ± 0,02 % m/m	7,50 ± 0,07 mg NaOH/g

Fonte: Elaborada pela autora.

O óleo de palma apresentou uma maior acidez do que o OGR. Os óleos provenientes de frutos de palmeiras possuem uma enzima hidrolítica no interior do seu fruto, quando danificado sua estrutura externa para a extração do óleo, rapidamente dá origem a ácido graxo livre e diglicerídeo, essa enzima não é desativada imediatamente após a extração, é preciso o óleo passar por um processo de refino. O óleo enviado era bruto, ou seja, não passou por nenhum pré-processamento ou refino e sua acidez continuo aumentando de forma devagar ao longo do tempo, pois uma pequena presença de água favorece a ação enzimática.

O OGR passa por um processo de degradação hidrolítica que ocorre nos triacilgliceróis em função da sua exposição a água dos alimentos durante as frituras, e as elevadas temperaturas envolvidas no processo de fritura, o que favorece apresentar elevada acidez e teor de ácidos graxos livre.

Na **Tabela 11** são apresentados os teores de água determinados nas amostras de óleo de palma e residual, esses valores são superiores ao limite indicado para a reação de transesterificação por catálise básica, segundo Kusdiana e Saka (2004)(104), pois uma pequena

quantidade de água 0,1% m/m pode interferir significativamente nos rendimentos de produção de ésteres e favorecer a reação de saponificação.

Tabela 11. Teor de água nas amostras

Óleo	Teor de água
Palma bruto	$1,50 \pm 0,01$ % m/m
OGR	$3,10 \pm 0,01$ % m/m

Assim, os valores apresentados nas análises de índice de acidez e teor de umidade indicam que essas matérias-primas (óleo de palma bruto e OGR) são de baixa qualidade, não sendo adequadas a produção de biodiesel via transesterificação por catálise alcalina. Óleos e gorduras com elevados teores de ácidos graxos livres em reações com catalisadores alcalinos levam a formação de reações secundárias, diminuindo o rendimento de biodiesel. O alto teor de água favorece a transformação dos triacilglicerídeos em ácidos graxos livres, seguida por saponificação. Desta forma, a hidroesterificação é adequada para a produção de biodiesel com essas matérias-primas.

5.3.2 Perfis composicionais dos óleos

A composição média em ácidos graxos do óleo de palma bruto e do OGR foi determinada através da análise do seu perfil composicional por cromatografia a gás com detector de ionização por chama (CG-DIC) (**Tabela 12**).

As massas molares médias dos ácidos carboxílicos de cadeia longa, e a massa molar dos triglicerídeos dos óleos de palma e residual foram calculadas, utilizando as porcentagens de ácidos graxos obtidas por CG - DIC. A massa molar média calculada para os triglicerídeos do óleo de palma foi de 847,24 g/mol e para o OGR foi de 857,28 g/mol (**Tabela 12**) juntamente com as massas molares médias de 268,75 g/mol e 279,05 g/mol, respectivamente. Observa-se na **Tabela 12** que o ácido palmítico (C16:0) e o ácido oleico (C18:0) contribuem em 84 % para a composição do óleo bruto de palma, enquanto no OGR, o ácido palmítico (C16:0), oleico (C18:0) e linoleico (C18:2), contribuem em 86 % na composição.

Essa diferencia composicional, contribuiu para que o biocatalisador CRL-Geo apresente maior afinidade pelo substrato do óleo de palma, ou seja a CRL dá preferência em hidrolisar

cadeias de ácidos graxos menores, diminuindo assim o seu valor de K_m e aumentando o valor de $V_{máx}$.

Tabela 12. Perfil composicional dos óleos obtido por CG-DIC

Ácidos graxos	MM (g/mol)	Teor em porcentagem (%m/m)	
		Óleo de Palma	OGR
Ácido Láurico (C12:0)	200,32	0,21	n d
Ácido Mirístico (C14:0)	228,38	0,72	0,20
Ácido Palmítico (C16:0)	256,43	40,59	12,43
Ácido Esteárico (C18:0)	284,48	4,45	4,37
Ácido Oleico (C18:1)	282,47	43,26	26,43
Ácido Linoleico (C18:2)	280,45	9,71	47,14
Ácido Linolênico (C18:3)	278,44	0,23	4,31
Outros		0,83	5,12
Massa Molar média (g/mol)		268,75	272,09
Massa molar do triacilglicerídeo (g/mol)		847,24	851,14

nd= não detectado

Fonte: Elaborada pela autora.

Obtidas as massas molares médias estima-se que somente estão disponíveis 847,25 g/mol de triacilglicerídeos de óleo de palma e 851,14 g/mol de óleo residual para participarem da reação de hidrólise. Deste modo, para os cálculos da razão molar água (tampão):óleo, foram considerados esses valores.

5.2 Lipase de *Candida rugosa* (CRL)

Atualmente a lipase *Candida rugosa* (CRL) comercializada pela Sigma é uma mistura de isoenzimas (Lip1 – Lip5 e Lpi8) em diferentes proporções. A Lip1 e Lip3 são isoenzimas que apresentam maior expressão nas enzimas comerciais brutas, na qual 60% é constituída por Lip1(52,105,106).

As isoenzimas se diferem em ponto isoelétrico, grau de glicosilação e termos de sequência de aminoácidos (14 resíduos de aminoácidos são conservados nas estruturas Lip1, Lip2 e Lip3) (52).

Candida rugosa

Partindo do pressuposto que a Lip1 e a LiP3 são as isoenzimas de maior expressão, e sendo assim estaria presente na lipase adquirida, procurou-se na literatura outras informações sobre a estrutura da lipase em interesse em imobilizar. Poucas informações sobre a estrutura foram encontradas, entretanto o pesquisado Grochulski et. al 1993 (107), conseguiu isolar e analisa a Lip1 e segundo seu relato ela possui seu sito ativo coberta por uma estrutura helicoidal (65-94 resíduos) (*flap*), composta de aminoácidos com propriedades anfifílicas, que na conformação fechada é hidrofílica na parte superior da molécula, e no lado voltado para a proteína é hidrofóbica, que interage com os resíduos hidrofóbicos que circundam o sítio ativo. James et al. 2007 (108) determinou a sequência dos aminoácidos (**Figura 14**). Na **Figura 15** é demonstrado a estrutura da CRL.

Figura 14. Sequência dos aminoácidos do flap da CRL, os resíduos em vermelho são hidrofóbicos.

Nter 60- MQQNPEGTYE ENLPK**AALDL** **VMQSKVFEAV** SP-93Cter

Fonte: (JAMES et al., 2007) (Nter- 60 - Met-Gln-Gln-Asn-Pro-Glu-Gly-Thr-Tyr-Glu- Glu-Asn-Leu-Pro-Lys-Ala-Ala-Leu-Asp-Leu-Val-Met-Gln-Ser-Lys-Val-Phe-Glu-Ala-Val-Ser-Pro- 93Cter)

Figura 15. Lipase *Candida rugosa* Lip1.

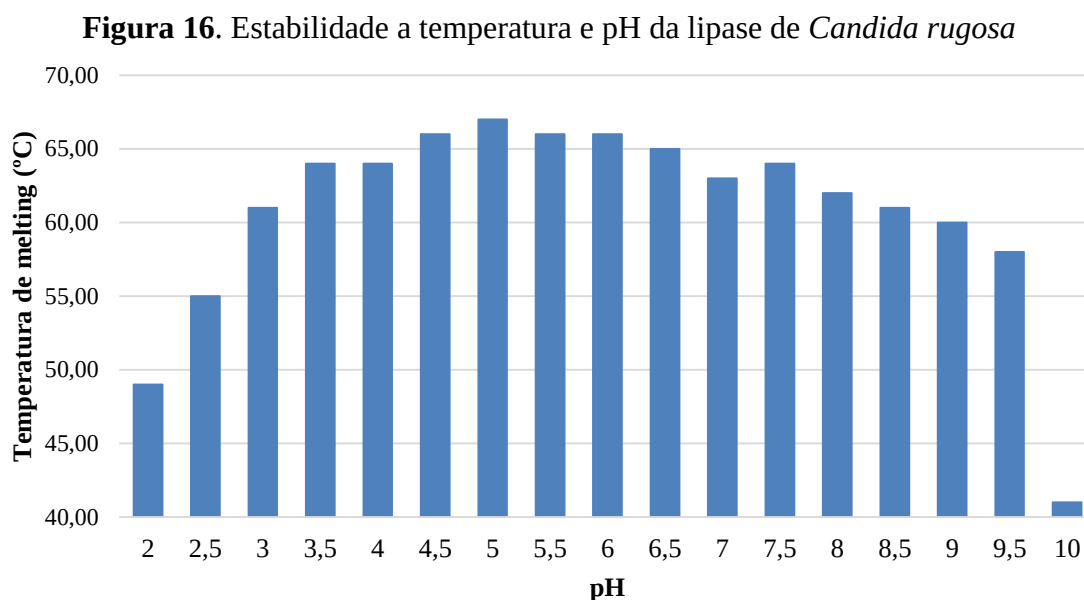


Fonte: (JAMES et al., 2007)(108)

5.1.1 Determinação da estabilidade térmica – ThermoFluor

A determinação da estabilidade térmica, correlacionada com o pH da lipase de CRL, foi obtida pelo ensaio de Fluorimetria diferencial de varredura (ThermoFluor), o qual baseia-se na

detecção da fluorescência devido as alterações do núcleo hidrofóbico de uma proteína em um determinado pH e temperatura. Na **Figura 16** é demonstrado a estabilidade térmica da *CRL*

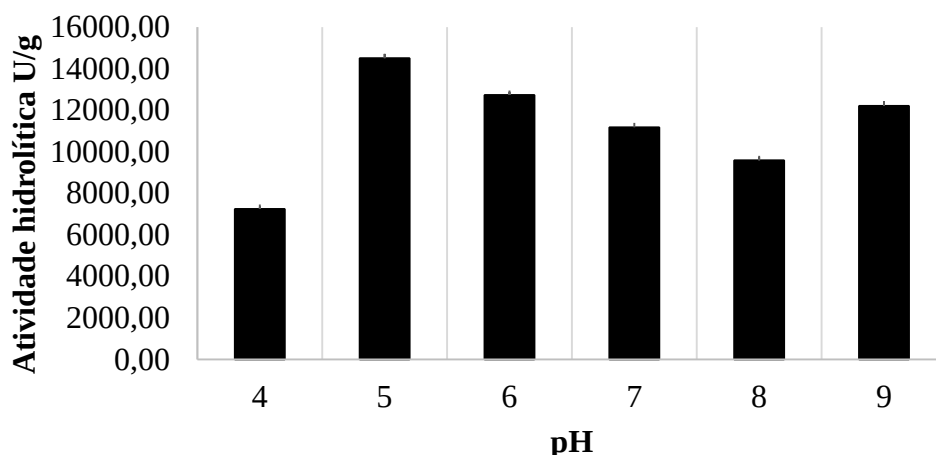


Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado na **Figura 16**, a lipase de *Candida rugosa* tipo VII (*CRL*) apresentou na faixa de pH entre 4,5 a 6,5 melhor estabilidade em temperaturas mais altas e em pHs abaixo de 3 e em 10 baixa estabilidade inclusive em temperaturas menores. Com a análise de ThermoFluor podemos iniciar nossa investigação do pH ótimo e da temperatura ótimo da lipase comercial de *Candida rugosa* em pH 5 e temperatura de 67 °C. Alguns pesquisadores determinaram a temperatura ótima da lipase em torno de 50 – 70 °C entretanto pH ótimo de 7,5 (3).

Para investigar a influência do pH, uma vez que ele é um parâmetro importante no desempenho catalítico da *CRL*, utilizou-se do método de atividade hidrolítica com emulsão de azeite de oliva, pois é uma atividade de interesse no estudo, a fim de confirmar o resultado obtido na análise de Termofluor. Dessa forma, variou-se o pH do meio de reação na faixa de 4,0 a 9,0 fixando a temperatura de incubação em 37 °C. A **Figura 17** apresenta os perfis de atividade obtidos com a variação do pH do meio reacional.

Figura 17. pH ótimo da lipase de *Candia rugosa* pelo o método de atividade hidrolítica



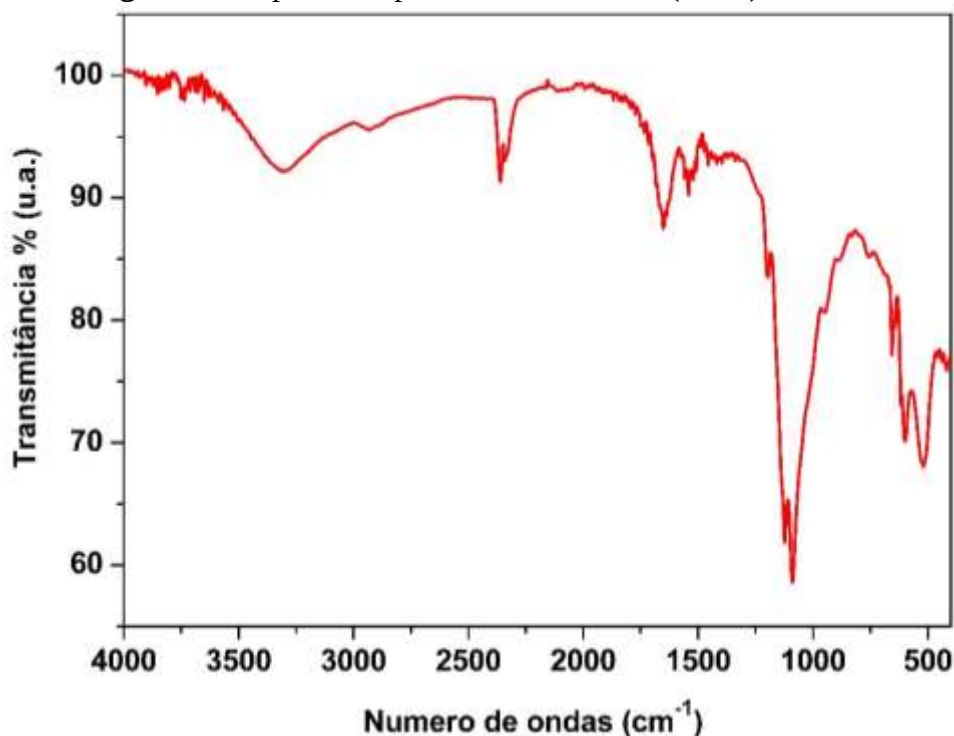
Fonte: Elaborada pela autora.

O método de determinação de atividade hidrolítica como demonstrando na **Figura 17** confirmou a análise do TermoFluor na qual também apresentou pH ótimo em 5,0 com $14.495,12 \pm 209,07$ U/g ou $54,01 \pm 0,78$ U/mL. Mais de fato, artigos recentes que fizeram o uso da CRL comercial da Sigma em suas pesquisas, também observaram esse mesmo comportamento da lipase com atividade hidrolítica mais alta em meio ácido (109). Ainda assim, a lipase sendo resistente a meios reacionais mais ácidos e apresentando maior atividade é de grande interesse para esse estudo, uma vez, que o produto da primeira etapa da reação de hidroesterificação é produzir ácidos graxos no qual deixa o meio reacional ácido.

5.1.2 Espectroscopia de infravermelho (FTIR) – Lipase *Candida rugosa*

O FTIR nos proporciona determinar as diferentes intensidades e posições dos picos, ou absorbâncias, presentes na região do infravermelho, de cada composto nele analisado, de forma a se analisar esses picos característicos de cada ligação, de acordo com a transmitância percentual (razão entre as intensidades dos feixes de amostragem e do feixe de referência)(110). Dessa forma, a fim de se analisar a imobilização da lipase nos suportes proposto, foi realizada a análise da CRL no FTIR, para que quando imobilizada, fosse possível observar os grupamentos caraterísticos, possibilitando a comparação entre os diferentes métodos de imobilização. A **Figura 18** a seguir mostra o espectro infravermelho da CRL.

Figura 18. Espectroscopia de infravermelho (FTIR) da CRL.



Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando a **Figura 18** a banda com absorção em 1096 cm^{-1} correspondem a banda de estiramento da ligação C–O, a absorção entre 1650 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} são correspondentes as bandas de estiramento associadas ao grupo amino primário e secundário e as bandas absorvidas na região entre 3400 cm^{-1} e 3200 cm^{-1} são características do estiramento de hidroxilas.

Sendo assim, quando analisada a espectroscopia de infravermelho com a lipase de CRL presente, será possível observar que as regiões acima citadas, servindo para análise e comparação futura com o derivado já imobilizado (biocatalisador).

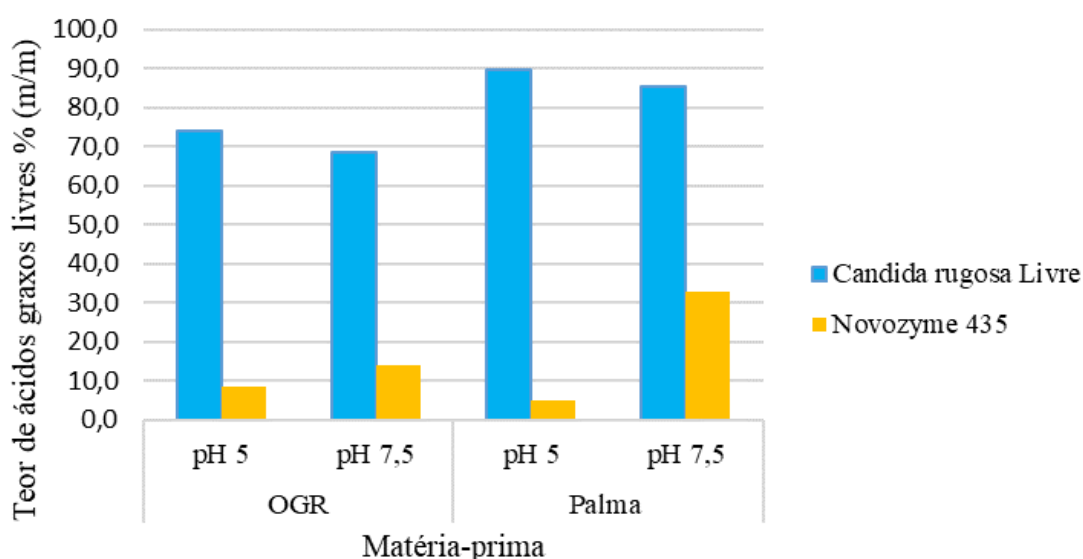
5.1.3 Reação de hidrólise – controle

O melhor pH indicado em ambos os ensaios de estabilidade e atividade hidrolítica foi o pH 5. Com esse resultado foi possível realizar uma reação de hidrólise utilizando o OGR e o óleo de palma, a fim de se verificar o desempenho da CRL nesse pH, uma vez que a primeira etapa da reação de hidroesterificação é a produção de ácidos graxos livres, na qual proporciona meio reacional mais ácido.

Foi realizado reações preliminares de hidrólise no pH 5 e 7,5 comparando com a enzima mais utilizada nos estudos de produção de biodiesel via rota enzimática a Novozyme 435 (CALB), uma relação de quantidade de catalisador de 2,5% em relação a massa de óleo foi utilizada para a melhor comparação dos resultados com a Novozyme 435, uma vez que não se sabe a atividade hidrolítica do biocatalisador comercializado.

Na **Figura 19** podemos observar o resultado de teor de ácidos graxos (% m/m) z utilizando a *CRL* e a Novozyme 435 em pH 5 e 7,5 na temperatura de 50 °C.

Figura 19. Reação de hidrólise controle - Lipase de *Candida rugosa* livre em comparação com a Novozyme 453 tempos de reação 24 horas utilizando OGR.



Fonte: Elaborada pela autora.

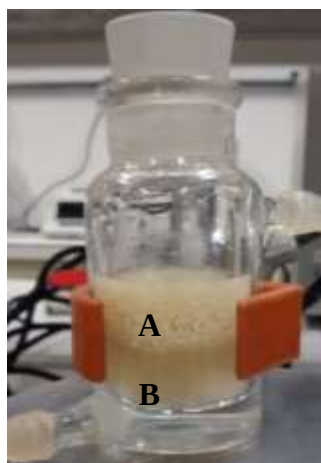
Os resultados revelam, que a *CRL* possui uma alta atividade hidrolítica em pHs abaixo de 7 e utilizando matérias-primas que são consideradas de baixa qualidade como óleo de palma e o óleo residual que apresentam elevado teor de água e acidez. Esse é um dado muito importante para a rota de produção em estudo. Obter um biocatalisador que atue em meios reacionais com pHs mais ácidos favorece o processo de produção de biodiesel por hidroesterificação.

Para essa reação de hidrólise o óleo residual foi utilizado sem nenhum pré-tratamento. Como pode ser observado na **Figura 19** após 24 horas de reação para as duas matérias-primas em estudo foi possível atingir um rendimento maior que 70% (m/m) de conversão dos triglicerídeos em ácidos graxos livres. Uns dos maiores desafios da hidroesterificação via rota enzimática e a

conversão de ácidos graxos em um menor tempo de reação, pesquisadores tem evidenciado conversões acima de 70% de ácidos graxos com tempo menores que 24 horas reação(58,111,112).

Entretanto em comparação com a enzima imobilizada comercial Novozyme 435, não foi possível obter uma elevada conversão de ácidos graxos livres, uma vez que a resina macroporosa que envolve a enzima é um polímero de ácido metacrílico reticulado com divinilbenzeno (DVB) e possui características hidrofóbicas(56). Essas propriedades dificultam a interação da enzima com a água e assim a formação do complexo substrato enzima, ocorrendo a reação somente na interface água óleo. Vale ressaltar que devido essa característica hidrofóbica da enzima comercial, a separação da enzima dos produtos é dificultada, como pode ser observado na **Figura 20**.

Figura 20. Reação de hidrólise utilizando a enzima Novozyme 435. A – fase de ácidos graxos livres com a enzima Novozyme 435, B- Fase aquosa rica em glicerol.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Imobilização

5.2.1 Argilas

Neste estudo foi selecionado os argilominerais Caulim, Vermiculita e Montmorilonita como suporte para a imobilização CRL para a produção de um biocatalisador reutilizável.

5.2.1.1 Argilas: Imobilização por adsorção física nos suportes

Após a imobilização por adsorção no meio aquoso e no meio orgânico utilizando CRL nos suportes argilominerais, a atividade hidrolítica dos derivados imobilizados foi quantificada. Os resultados obtidos estão presentes na **Tabela 13**.

Tabela 13. Atividade hidrolítica da lipase de *Candida rugosa* imobilizadas por adsorção em Caulim, Argila Montmorilonita, Vermiculita

Suporte	Atividade Hidrolítica Média (U/g)		Rendimento de Imobilização (%)	
	Aquoso	Orgânico	Aquoso	Orgânico
Caulim	232,9 ± 3,9	3039,0 ± 3,6	33,6	89,0
Argila Montmorilonita	96,9 ± 9,8	590, ± 2,5	5,1	23,4
Argila Vermiculita	129,7 ± 7,6	764,90 ± 6,1	15,7	39,2

*Em meio aquoso pH 7,5 e temperatura ambiente - Em meio orgânico utilizou hexano

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados obtidos revelam que os suportes imobilizados em meio orgânico apresentaram maior potencial para a imobilização da CRL quando comparada com os imobilizados em meio aquoso uma vez que forneceram biocatalisadores com elevados valores de atividade hidrolítica.

No meio orgânico utilizando o suporte Caulim foi possível obter uma atividade hidrolítica de 3.390,0 U/g, a maior atividade entre os argilominerais, 13 vezes maior quando comparada com a imobilização em meio aquoso.

Caulim foi utilizado para produção de biosensores pelo pesquisador Fiorito et al 2008(113) e no seu estudo, observaram que o Caulim não se expande quando molhado, o que impede a exposição da área de superfície interna, e a adsorção de íons e moléculas fica restrita às superfícies externas do cristal e às bordas da argila, por esse motivo, talvez a imobilização em meio aquoso teve rendimento tão baixo, quando comprada ao imobilizado em meio orgânico.

CIPOLATTI et al., (2016)(70) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* por adsorção em um co-polímero (STYDVB) em meio aquoso e em meio orgânico, onde observou que em meio orgânico os biocatalisadores obtidos apresentaram atividade hidrolítica e de esterificação sete vezes maiores.

A imobilização por adsorção em comparação com os métodos químicos apresenta maior potencial para a indústria, devido ao baixo custo e a simplicidade (114,115). Entretanto, estudos realizados por Fernandez-Larente et al (1998)(116) para a imobilização via adsorção física revela que as interações do suporte lipase são fracas.

Após a análise de atividade testou-se reciclo dos derivados imobilizados obtidos, entretanto não se observou nenhuma atividade hidrolítica no reciclo realizado. A lipase no meio reacional com água e óleo, passa a ser altamente hidrofóbica, e se desorveu do suporte na primeira reação perdendo assim a atividade derivado imobilizado. Com base nesse resultado verificou-se que seria necessária uma interação mais forte entre o suporte e a lipase como ligações.

Manoel et al. (2015) (117) demonstraram que as lipases preferem adsorver sobre suportes hidrofóbicos, envolvendo na adsorção das áreas hidrofóbicas que circundam o centro ativo e deixando o sítio ativo totalmente exposto ao meio reacional. Os suportes argilominerais selecionados neste estudo apresentam poucas áreas hidrofóbicas, dada essa informação a forma imobilização poderia ser melhorada com tratamento do suporte, realizando ligação covalente entre o suporte e a lipase.

5.2.1.2 Argilas: Imobilização por Ligação covalente

A fim de diminuir a característica hidrofílica dos argilominerais e substituir as moléculas de água por grupos funcionais de hidrofobicidade optou-se em realizar imobilização por ligação covalente.

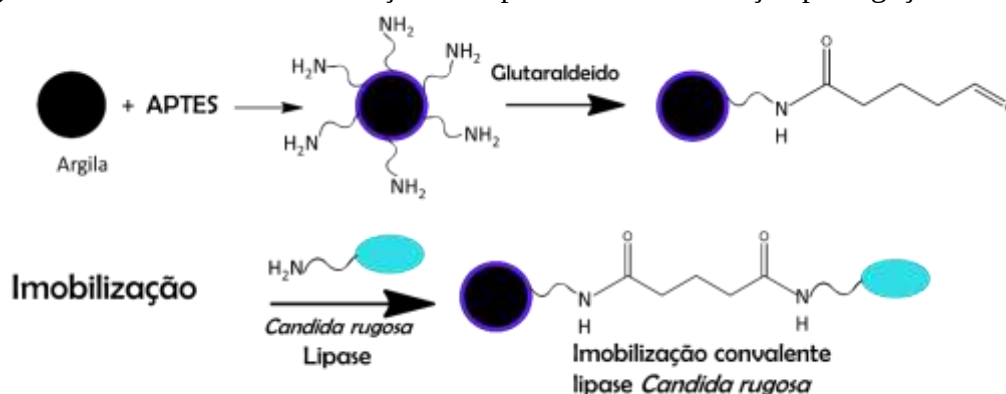
A imobilização por ligação covalente possui uma força superior do que a imobilização com adsorção, envolve vários resíduos da enzima, proporcionando uma grande rigidez à sua estrutura.

Antes de iniciar o processo de imobilização por ligação covalente as argilas foram pré tratadas com solução de 1,0M de ácido sulfúrico, 20 mL para cada grama de argila, permanecendo em agitação por 2 horas, após lavou até a água de lavagem apresentar pH neutro, secou na estufa overnight a 110°C e por 2h na mufla a 200°C. O tratamento ácido possibilita o aumento da área superficial da argila, e diminui a quantidade de água residual na superfície do suporte, gerando sólidos mais porosos o que possibilita maior área para a imobilização das lipases.

O processo ocorre em três etapas como demonstrado na **Figura 21**: primeiro o suporte é ativado, para a ativação, utilizou-se o reagente (3-aminopropil)triethoxysilano (APTES), por este ser um reagente acoplador de silano e grupamentos aminos, modificando a hidrofobicidade e dando maior estabilidade ao suporte (118,119) em seguida na segunda etapa é tratado com um reagente capaz de funcionalizar grupos; neste trabalho, utilizou-se o glutaraldeído devido a sua capacidade

em promover reações cruzadas irreversíveis, além de, possuir uma diferença de elétrons nos carbonos do grupo funcional carbonila. Assim, essa diferença de elétrons atua facilitando a interação entre as estruturas do suportes já modificadas e a enzima, devido a carga residual presente nas proteínas(120). Já na terceira etapa o suporte ativado e funcionalizado é mantido em contato com a enzima, afim de que as ligações covalentes entre o suporte e a enzima se estabeleçam.

Figura 21. Processo de modificação da superfície e imobilização por ligação covalente.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na **Tabela 14** é apresentado a atividade hidrolítica e o rendimento de imobilização em meio aquoso e orgânico dos suportes argilominerais imobilização por ligação covalente.

Tabela 14. Atividade hidrolítica da lipase de *Candida rugosa* imobilizadas por adsorção em Caulim, Argila Montmorilonita, Vermiculita

Suporte	Atividade Hidrolítica Média (U/g)		Rendimento de Imobilização (%)	
	Aquoso	Orgânico	Aquoso	Orgânico
Caulim	549,08 ± 1,7	1250,5 ± 9,6	32,1	63,0
Argila Montmorilonita	932,9 ± 13,9	1796,4 ± 7,5	39,5	77,6
Argila Vermiculita	961,9 ± 0,6	1841,0 ± 8,1	40,7	80,1

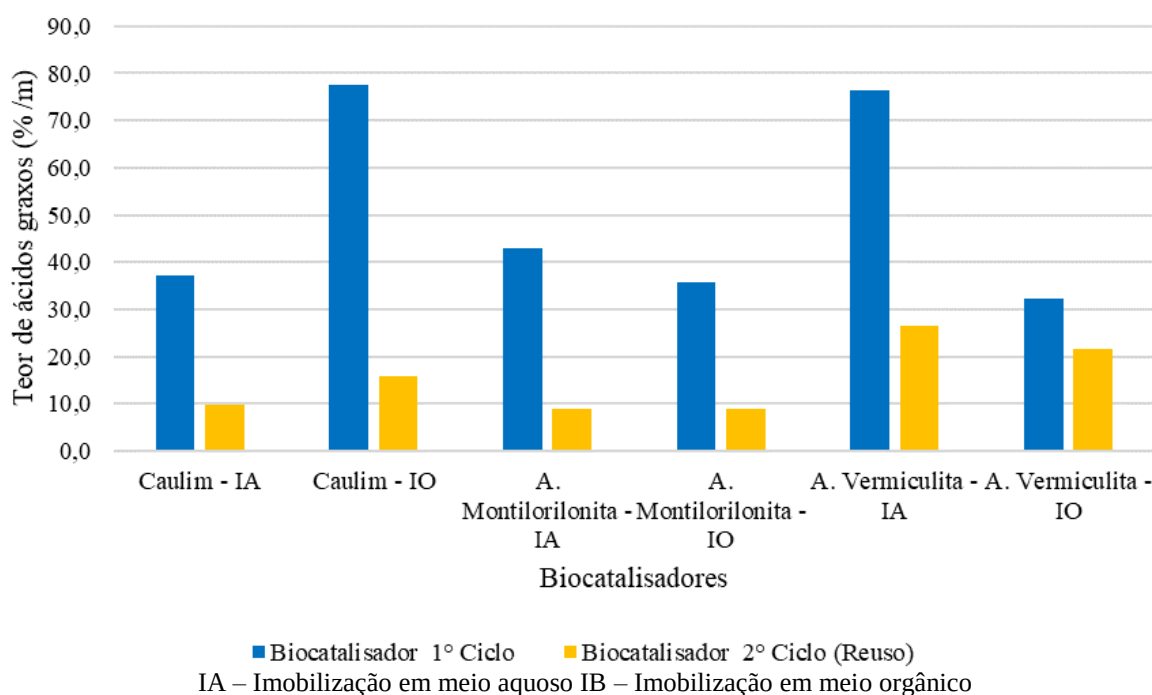
*Em meio aquoso pH 7,5 e temperatura ambiente - Em meio orgânico utilizou hexano

Fonte: Elaborada pela autora.

Na imobilização por ligação covalente no meio aquoso para os argilominerais foi possível obter atividades hidrolíticas (U/g) com valores superiores ao obtido na imobilização por adsorção, os biocatalisadores obtidos foram aplicados na reação de hidrólise do óleo residual.

Os resultados obtidos na reação de hidrólise do óleo residual são apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Reação de hidrólise com OGR em pH 5 utilizando os biocatalisadores de argilominerías imobilizados pelo processo de ligação covalente



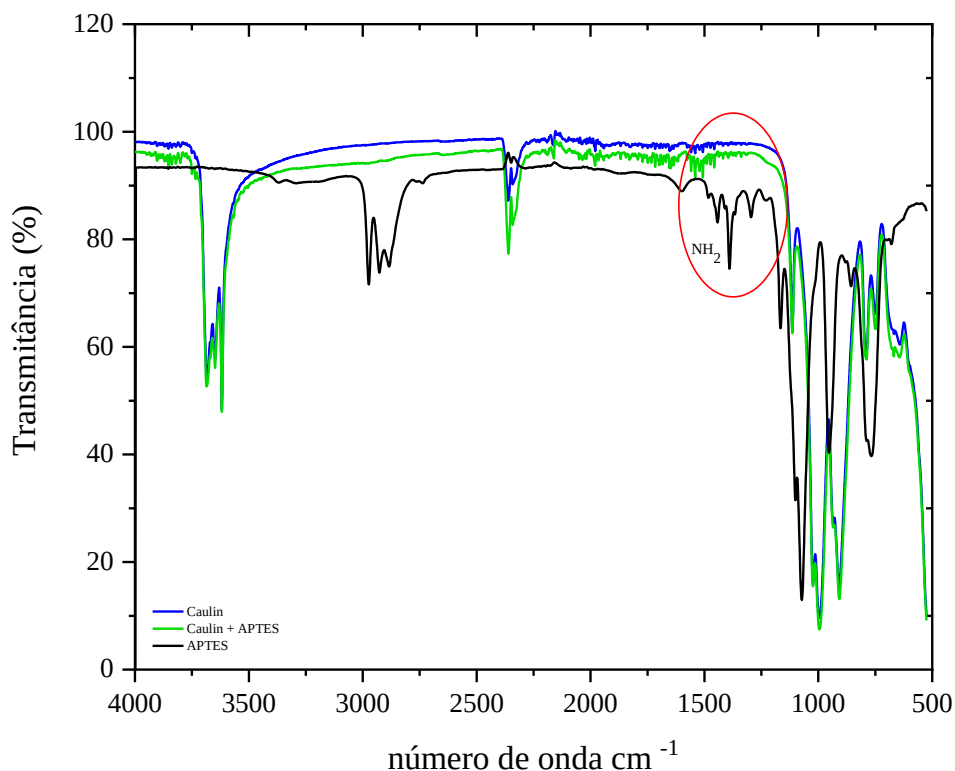
Fonte: Elaborada pela autora.

No primeiro ciclo de reação de hidrólise obtidos pelos biocatalisadores por ligação covalente os biocatalisadores Caulim – IO e A. Vermiculita IA foi possível obter reações com teores de AGL acima de 70 % (m/m), mas da mesma forma que ocorreu com os derivados imobilizados obtidos por adsorção não foi possível obter um reciclo com eficiência.

Os suportes argilominerais são hidrofílicos com poucas áreas hidrofóbicas, mesmo após ativação e funcionalização da superfície com APTES e glutaraldeído não foi possível aumentar a área hidrofóbica dos suportes, não sendo possível realizar imobilizar a lipase de *Candida rugosa* nesses suportes, como podemos observar na análise de FTIR - **Figura 22**, mesmo após a ativação com APTES não foi possível obter significativa mudança da estrutura da argila. Na qual não se

pode observar estiramento na região de 1600 – 1400 cm^{-1} , que é do grupamento NH_2 .

Figura 22. Espectro de Infravermelho do suporte argilomineral Caulim (azul), Caulim com APTES (verde) e APTES (preto).



Fonte: Elaborada pela autora.

A lipase *Candida rugosa* apresenta áreas altamente hidrofóbicas, quando colocada no meio que apresenta alta hidrobicidade como o meio reação da água e óleo, se ela não estiver com uma ligação forte com o suporte ela lixivia no meio reacional. Portanto, mesmo com a modificação do suporte à interação entre a lipase e o suporte foi pequena, sendo inviável a imobilização da *Candida rugosa* nos suportes argilominerais.

5.2.2 Grafite

O grafite (C_6) apresenta alta superfície hidrofóbica, uma estrutura homogênea e biomateriais derivados de grafite tem apresentado potencial de aplicação na imobilização de enzimas(121).

Dessa forma, afim de imobilizar a *CRL* e proporcionar o reciclo, foi proposto trabalhar com o grafite como suporte para a imobilização de vido sua alta hidrofobicidade. Na **Figura 23** é apresentado uma imagem do grafite utilizado.

Figura 23. Grafite flakes mw 12,01 – 100 mesh



Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2.1 Imobilização em Grafite

A imobilização da lipase no grafite foi realizada por adsorção, baseando no pressuposto de que a lipase *Candida rugosa* terá maior atração para a adsorção em superfícies sólidas fortemente hidrofóbicas.

Na **Tabela 16** são apresentados os valores de atividade hidrolítica obtidos após a imobilização da lipase em grafite. Foram avaliados dois grafites com áreas superficiais distintas.

Tabela 16. Atividade hidrolítica do biocatalisadores de grafite com a lipase de *Candida rugosa* imobilizada.

Solução	Grafite 1	Grafite 2
	Atividade hidrolítica (U/g)	
Aquoso pH 7,5	187,29 ± 14,06	140,69 ± 7,35
Orgânico	58,96 ± 5,23	53,97 ± 8,40
*Em meio aquoso pH 7,5 e temperatura ambiente		

*Grafite 1 – Sigma, Grafite 2 - Nacional (área superficial diferente)

Fonte: Elaborada pela autora.

A *CRL* foi imobilizada em meio orgânico e aquoso. Em meio aquoso foram obtidos melhores valores de atividade hidrolítica. Dessa forma, imobilizou-se em meio aquoso em outras condições de pH e temperatura, avaliando o ponto isoelétrico em meio aquoso para otimizar a imobilização por adsorção e a temperatura.

O pI do grafite é 2,3 ou seja, em solução com pH maior que 2,3 o grafite em meio aquoso apresenta carga positiva. Já para a *CRL* a literatura apresenta que o pI é próximo de 5,2. Sendo assim, avaliou-se a imobilização da lipase em pH 4,0 e pH 5,0, uma vez que a enzima apresentaria carga negativa e o suporte carga positiva. Os resultados são apresentados na **Tabela 17**.

Tabela 17. Atividade hidrolítica do biocatalisadores de grafite com a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em diferentes pH e temperatura

	Grafite 1	Grafite 2
	Atividade hidrolítica (U/g)	
pH 4 - 23 °C	274,8 ± 6,07	91,6 ± 10,13
pH 4 - 4 °C	358,0 ± 9,10	343,5 ± 5,45
pH 5 - 23 °C	229,0 ± 3,68	343,5 ± 9,32
pH 5 - 4 °C	330,09 ± 8,45	352,5 ± 8,79

Fonte: Elaborada pela autora.

A imobilização em grafite na temperatura de 4 °C para ambos os grafites foi possível obter um resultado melhor quando se comparado com a temperatura a 23 °C. A imobilização a menores temperaturas são mais favoráveis devido à redução da energia estrutural da lipase, diminuindo o risco de dessorção da lipase no suporte (122,123).

Já quando comparamos os diferentes pHs não houve mudança de atividade hidrolítica significativa.

Realizou-se uma reação de hidrólise com ORG, catalisada pelo derivado imobilizado - Grafite 2 imobilizado em pH 5 a temperatura de 4°C fornecendo 100 U/grama de óleo, ao final da reação (24 horas) obteve-se uma conversão de triglicerídeos em ácidos graxos livres de 4,0%. Esse baixo resultado de conversão pode ser devido ao fato que o grafite é uma estrutura plana linear, que podem ter se sobreposto. Isso provavelmente impossibilitou a molécula do triglicerídeo do contato com o sitio ativo da lipase, devido ao elevado volume estrutural. Considerando-se a massa de derivado imobilizado obtido (50 mg), o rendimento de imobilização não foi calculado.

Por outro lado, o Grafite demonstrou ser um suporte interessante para a imobilização da lipase *Candida rugosa*. Estudos devem ser realizados modificando-se sua estrutura, a fim de que a ligação covalente entre os grupos Lisina (lipase) e o suporte ocorram, a fim de melhorar a taxa de conversão de triglicerídeo em ácidos graxos livres da lipase e a reação de hidrólise.

5.2.3 Partículas magnéticas

Magnetita (MGN) e maghemita (MGM) foram sintetizadas para a imobilização da CRL. Neste contexto, a magnetita foi sintetizada pela co-precipitação das partículas utilizando hidróxido de sódio e hidróxido de amônio como agente precipitador. Para a síntese da maghemita, seguiu-se a rota proposta por Junior *et al.* (2010)(87), modificando-se a temperatura de 200°C para 250°C no processo final de formação da partículas magnéticas.

A utilização de uma temperatura acima da temperatura proposta pelo autor deu-se com o estudo da estrutura da partícula magnética, uma vez que a maghemita é metaestável e sua estrutura pode se inverter na estrutura da hematita, caso aquecida fora da sua temperatura de inversão (T_{inv}). Por isso, a fim de se evitar o problema relacionado à inversão da estrutura da maghemita, utilizou-se a temperatura de 250°C por esta ser a temperatura mínima de inversão e por ser uma temperatura capaz de tornar o tamanho homogêneo de 10 nanômetros formando a nanopartícula magnética (73,124). A **Figura 24** mostra a maghemita após secas no papel de filtro sob um ímã.

Figura 24. Maghemita seca.



Fonte: autoria Otávio Domingues

Em termos de rendimento, para a síntese da magnetita quando se utilizou o NaOH como agente precipitante obteve um rendimento de produção 58,31% e quando se utilizou NH_4OH

59,21%, partido de 5,52 g de FeCl_3 (massa seca) e 2,30 g de FeCl_2 . Já a síntese de maghemita, partindo-se de 10,03 g de FeCl_3 (massa seca), foi obtida uma massa de 4,91 g, obtendo um rendimento de 49%. Após a síntese, as partículas magnéticas foram analisadas, metade foi destinada a imobilização por adsorção em meio aquoso e a outra parte imobilização por ligação covalente.

5.2.3.1 Imobilização nas partículas magnéticas

Para o processo de imobilização, seguiu-se a metodologia proposta por Paula (2012)(94), com modificações. Entretanto, esta metodologia utilizava solvente orgânico (hexano, proporção 1:10) na etapa de imobilização. Porém, quando em contato com as partículas magnéticas, resultava na formação de aglomerados do suporte nas paredes do recipiente, impossibilitando o acesso da lipase para a imobilização. Dessa forma, as imobilizações foram realizadas somente em meio aquoso utilizando solução tampão, sendo possível constatar que as partículas magnéticas fluíam livremente em solução, facilitando o contato com a solução de lipase. No mais, como visto anteriormente, o pH ótimo da lipase apresentou-se na faixa de 5, justificando-se pela menor interferência de cargas na lipase. A temperatura de 8°C utilizada para a imobilização foi determinada a partir do estudo realizados com o grafite para o processo de imobilização, sendo que valores amenos são mais favoráveis devido à redução da energia estrutural da lipase, diminuindo o risco de desorção da lipase no suporte(122,123).

Os valores de atividade hidrolítica e rendimento de imobilização, estão contidos na **Tabela 18**, para imobilização por adsorção física, e na **Tabela 19**, para imobilização por ligação covalente.

Tabela 18. Dados de atividade hidrolítica e rendimento de imobilização dos derivados imobilizados em nano partículas magnéticas imobilizados por adsorção física

Nano partícula magnética	Atividade hidrolítica (U/g)	Rendimento de Imobilização %
MGN@NaOH-CRL	115,2 ± 24,0	10,5%
MGN@NH ₄ OH-CRL	121,9 ± 12,8	10,4%
MGM@CRL	126,4 ± 19,7	28,8%

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 19. Dados de atividade hidrolítica e rendimento dos biocatalisadores em nano partículas magnéticas imobilização do derivado imobilizado por ligação covalente.

Nano partícula magnética	Atividade hidrolítica (U/g)	Rendimento de Imobilização %
MGN@NaOH - CRL	144,4 ± 12,8	40,3%
MGN@NH ₄ OH - CRL	144,9 ± 12,0	40,6%
MGM@CRL	174,7 ± 12,9	52,4%

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos resultados apresentados nas tabelas anteriores, constatou-se que os valores de atividade hidrolítica obtidos para os biocatalisadores obtidos por ligação covalente foram superiores aos resultados obtidos por adsorção física. No mais, a maior atividade hidrolítica foi obtida a partir da imobilização da lipase em MGM, tanto por adsorção física como também por ligação covalente, mostrando maior eficiência na imobilização quando utilizada como suporte magnético.

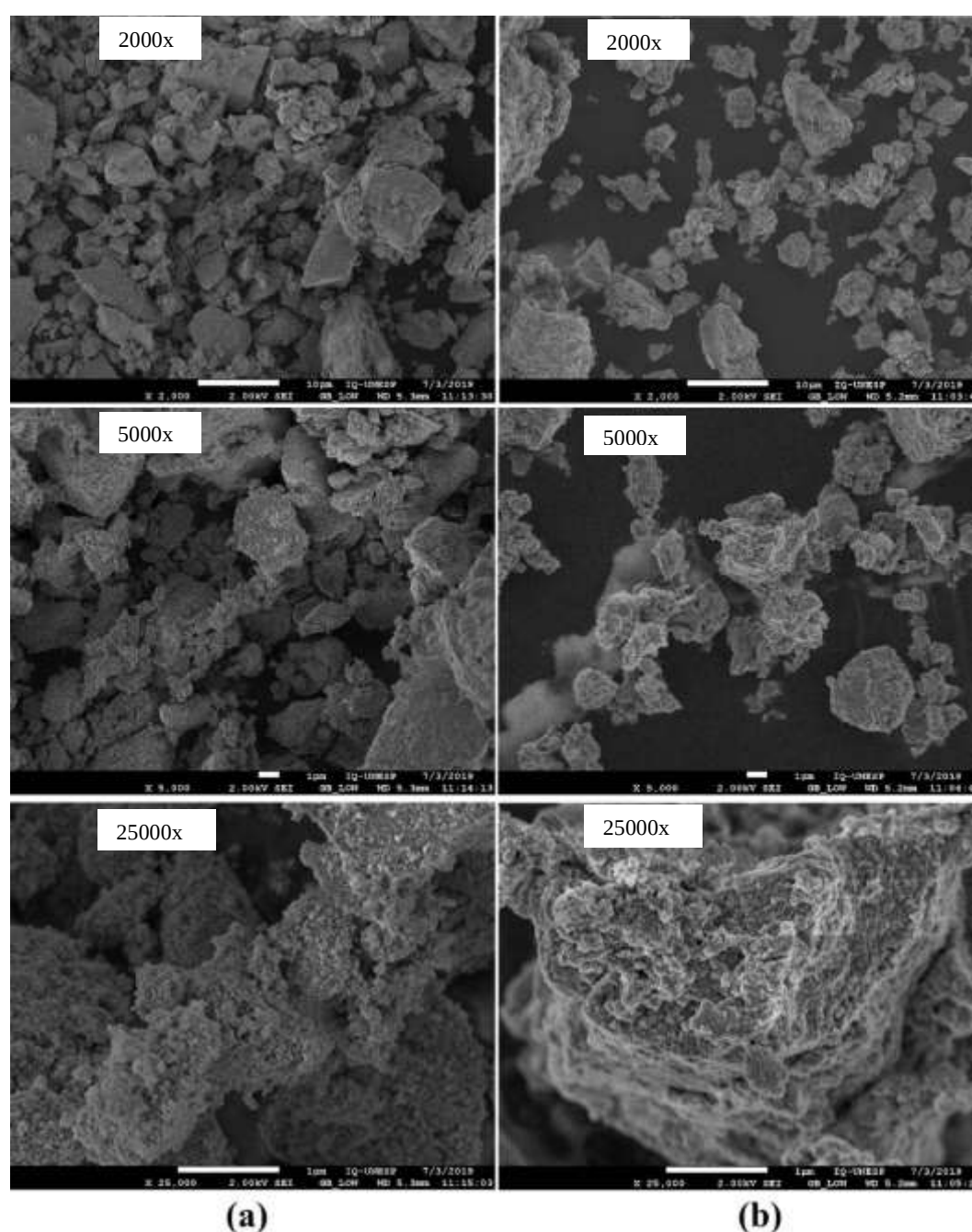
Hou *et al.* (2015)(125) que imobilizou a lipase de *Candida rugosa* em concha magnética de polidopamina/alginato por ligação covalente obteve uma atividade hidrolítica de 119,43 U/g, outro grupo de pesquisadores imobilizaram em sílica magnéticas na qual se obteve uma atividade hidrolítica de 177,3 U/g (126).

Dessa forma, comparando-se os dados obtidos neste estudo com os da literatura, foi possível verificar que a atividade obtida está próxima ao obtida por diversos pesquisadores, uma vez que suportes magnéticos são inovadores, e necessário se aprofundar nos estudos para melhorar a imobilização e a atividade hidrolítica obtida, foi selecionado a Maghemita (MGM@CRL) por ligação covalente, para realizar análises físico-químicas, a fim de explorar melhor esse suporte e o derivado imobilizado. (Os resultados obtidos na imobilização da lipase de *Candida rugosa* nas partículas magnéticas gerou um artigo científico que pode ser acessado no <https://doi.org/10.18540/jcecvl6iss4pp0498-0504>)

5.2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise elementar superficial (EDS)

Após a seleção do melhor suporte e método para a imobilização da lipase, foi realizada a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) da MGM e da MGM@CRL após o processo de imobilização por ligação covalente. A Figura 25 apresenta o resultado da análise.

Figura 25. MEV do biocatalisador estudado em distintas ampliações: (a) MGM pura; (b)MGM@RL – ligação covalentemente.



Fonte: Elaborada pela autora.

Realizadas as microscopias, foi possível observar que as partículas obtidas não são uniformes e quando analisadas separadamente, as nanopartículas de maghemita, com ampliação de 2.000x e 5.000x, estavam mais aglomeradas entre si, devido a não existência de outros compostos juntos a elas. Entretanto, quando analisadas as microscopias, em mesma ampliação, do biocatalisador, foi possível verificar que houve um maior desprendimento da nanopartículas, estando estas mais dispostas na superfície de análise e menos aglomeradas. Mesmo vistas as aglomerações apresentadas por ambas as análises, também é possível visualizar a presença de poros, os quais possibilitam o contato da lipase com o suporte, bem como do substrato com o biocatalisador.

Quanto à análise elementar superficial (EDS), as porcentagens mostradas na Tabela 20.

Tabela 20. Dados da Análise Elementar Superficial (EDS) da maghemita pura e do derivado imobilizado

Elemento	MGM		MGM@CRL	
	% mássica	% atômica	% mássica	% atômica
Carbono	-	-	0,59%	1,47%
Cloro	2,79%	2,45%	-	-
Ferro	66,08%	36,89%	59,60%	31,79%
Fósforo	-	-	3,50%	3,37%
Oxigênio	31,13%	60,66%	31,04%	57,79%
Silício	-	-	5,26%	5,58%

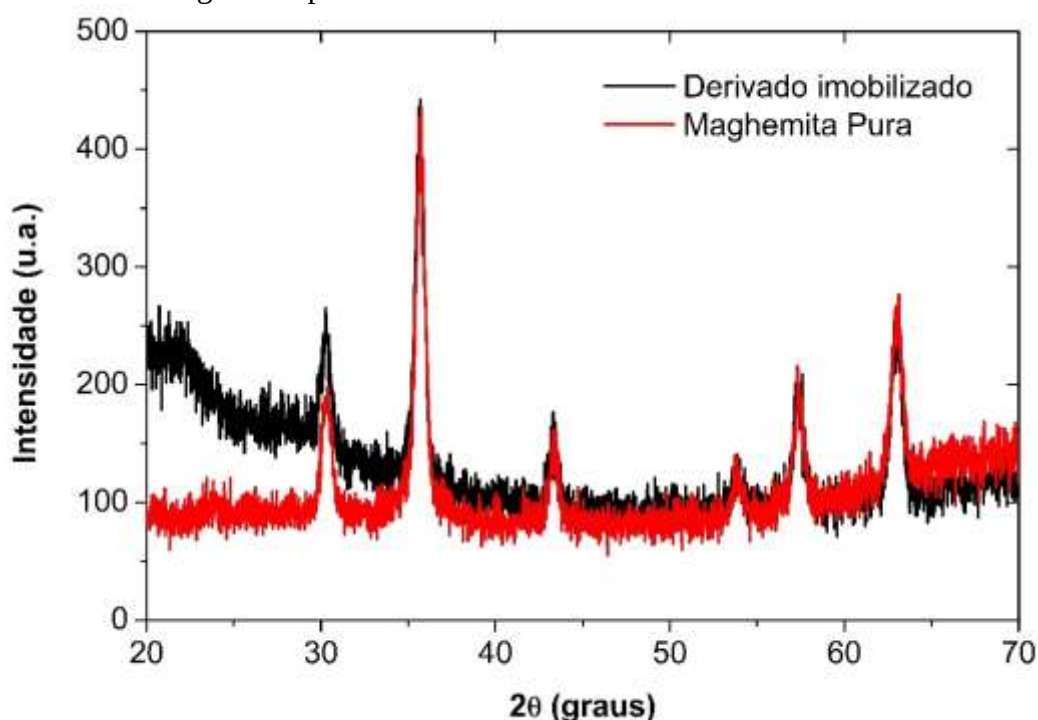
Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação à análise elementar, Silva *et al.* (2016)(127) apresentam valores de composição em composição mássica em média de 68,7% de Fe e 31,3% de O, bem como a composição atômica de 57,9% de Fe e 42,1% de O. Serna (2017)(128) relata valores de composição mássica de 70% em Fe e 30% em O e em percentual atômico de aproximadamente 40% em Fe e 60% em O. Nesse contexto, em relação às porcentagens mássicas, os valores obtidos para o presente estudo estão próximos aos valores descritos na literatura para a maghemita. Além disso, observa-se a presença de Silício e Carbono no derivado imobilizado, compostos presentes nos agentes utilizados para a modificação do suporte e na lipase, respectivamente.

5.2.3.3 Difração de Raio X (DRX)

A fim de se analisar as angulações contidas na estrutura da MGM e no MGM@CRL, foi realizada a análise de difração de Raio-X de ambas as amostras, sendo mostrado na Figura 26 a seguir, o gráfico obtido a partir do estudo.

Figura 26. Gráfico de intensidade por graus obtidos para o estudo da Difração de Raio X (DRX) da maghemita pura e do derivado imobilizado covalentemente.



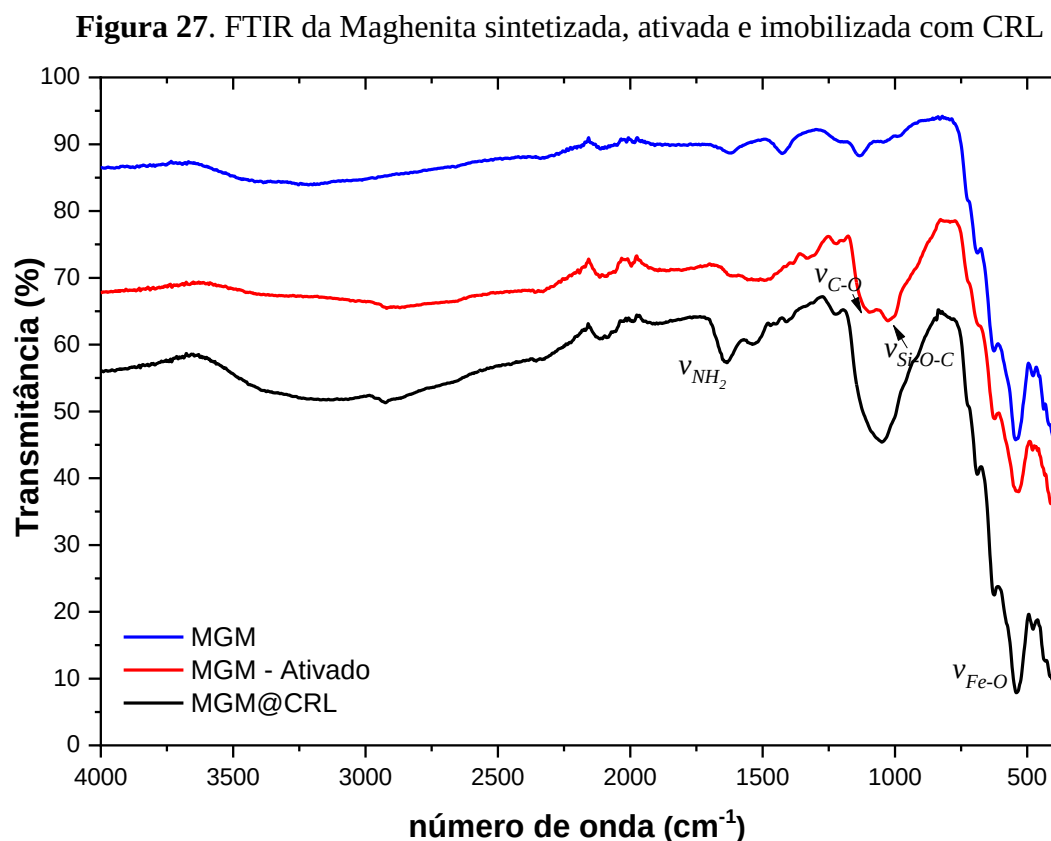
Fonte: Elaborada pela autora.

Como observado no gráfico, foram obtidos picos de intensidade semelhante entre a análise da maghemita pura e do derivado imobilizado, em regiões idênticas de ângulos de Bragg (θ), mostrando que, apesar de ter intensidades pouco diferentes para a região, com 2θ , próxima à 30 graus, as regiões e demais intensidades foram similares. No mais, pôde-se concluir que, o processo de imobilização realizado, mesmo após a modificação do suporte por adição de compostos químicos, não alterou os ângulos da estrutura cristalina das nano partículas, mostrando que o processo não acarreta e modificações na cristalinidade do material utilizado(129).

5.2.3.4 FTIR - Espectroscopia de infravermelho da Maghemita (MGM)

A fim de analisar a estrutura e as interações química na maghemita sintetizada, foi realizada a análise em FTIR (**Figura 27**). O Fico característico de maghemita em 575 cm^{-1} foi observado nos três espectros, o que indicou a geração bem-sucedida das partículas magnéticas $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ na qual manteve sua estrutura mesmo depois da ativação, funcionalização e imobilização.

No espectro MGM-Funcionalizada observa entre o intervalo $1775 - 1690\text{ cm}^{-1}$ a banda típica do grupo Si-O-C presente no agente de ativação - APTES e do estiramento de ligações C=O e ligações C-O, o que indica a ativação e a funcionalização no suporte com glutaraldeído. O espectro das MGM@CRL indica picos alongamento de NH_2 e grupo parcialmente OH, CH alifático e vibrações de flexão de CO, respectivamente. Bandas em 1720 cm^{-1} foi observada na MGM@CRL que indica a imobilização da CRL na estrutura da maghemita.



Entretanto por não apresentar atividade hidrolítica tão elevada para a reação de hidroesterificação do óleo residual e da palma, outro suporte foi estudado para ser aplicado nesta reação.

5.2.5 Geopolímero

Neste trabalho, em parceria com a Universidade de Padova – Itália, foram desenvolvidos geopolímeros a base de sódio (Na-Geo) e potássio (K-Geo), impresso em 3D, para a imobilização da CRL.

Devido aos geopolímeros possuírem em sua estrutura uma alta concentração de Na e K necessário para a formação e endurecimento, previamente verificou-se o pH do geopolímero, deixando-o em água ultrapura por 30 minutos. Após esse período, mediu-se o pH do meio, que estava em pH 12. Por apresentar essa alta basicidade e levando-se em consideração que a lipase sofre influências diretas do pH do meio reacional, foi proposto lixiviar o geopolímero com solução de HCl (1,0 mol/L) até pH=7. Na **Tabela 21** é apresentada a atividade hidrolítica obtida após a imobilização por adsorção em temperatura de 4 °C no suporte geopolímero com e sem lixiviação.

Tabela 21. Atividade hidrolítica da lipase de *Candida rugosa* imobilizadas por adsorção no geopolímero impresso em 3D

Suporte	Atividade Hidrolítica Média (U/g)		Rendimento de Imobilização (%)	
	Sem Lixiviação	Com Lixiviação	Sem Lixiviação	Com Lixiviação
Na-Geo	29,09 ± 9,55	86,83 ± 7,93	4,05 ± 2,54	12,11 ± 4,76
K-Geo	67,35 ± 8,98	115,49 ± 4,66	15,71 ± 6,98	31,87 ± 5,13

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se que os geopolímeros que não receberam tratamento para diminuir a característica básica quando em solução, forneceram menores valores de rendimento de imobilização, isso se deve ao fato da lipase, em pH maiores que 5,3 possui na sua estrutura cargas positivas que impendem a interação com o suporte, como pode foi observado na **Figura 27**.

Como os geopolímeros são sintetizados a partir de SiO₂ e Al₂O₃, que apresentam características hidrofílicas, propôs-se revestir a estrutura com grupamentos aminas, a partir da ativação com APTES, e realizar ligação covalente ao invés de imobilização por adsorção física, pois como visto em estudos anteriores somente por adsorção não foi possível obter um derivado imobilizado que seja possível reutilizar.

Para esse revestimento foi necessário primeiramente realizar troca iônica das bases, para a continuação do estudo optou pelo geopolímero a base de Na-Geo, devido a quantidade de peças dessa base enviada pela Universidade de Padova.

5.2.5.1 Caracterização física do geopolímero impresso em 3D

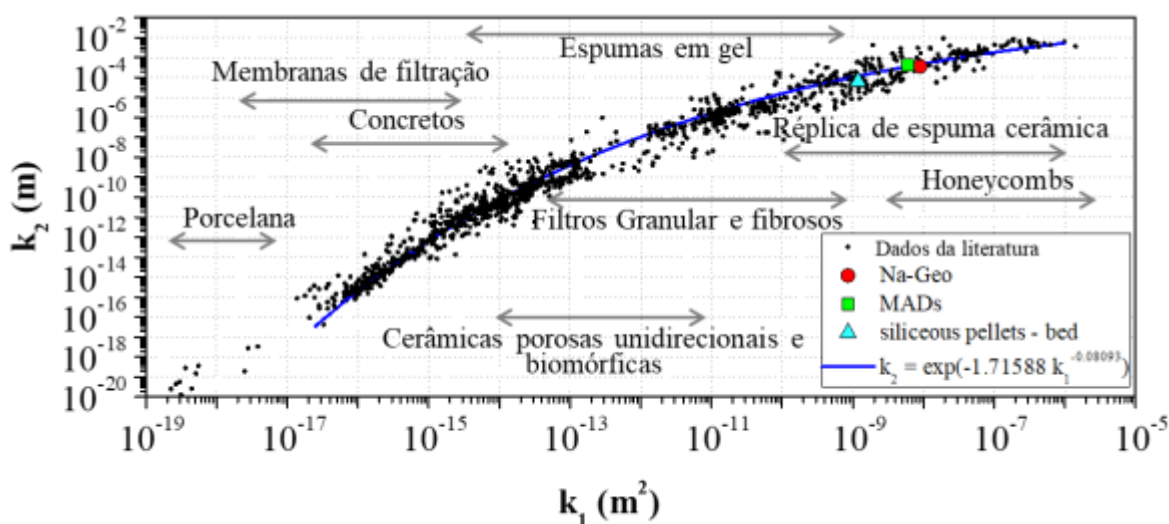
As amostras impressas de geopolímero (Na-Geo) tiveram suas bordas lixadas para melhor encaixe no reator; 10 amostras foram medidas, com um diâmetro médio de $17,13 \pm 0,32$ mm, espessura de $9,00 \pm 0,14$ mm e massa de $1,92 \pm 0,18$ g, confirmando a boa repetibilidade de fabricação usando a abordagem DIW.

As análises físicas nas amostras impressas mostraram uma porosidade total e aberta de 57,16 %vol e 56,45 %vol respectivamente, com um volume $0,924 \pm 0,059$ g/cm³, densidade aparente de $2,121 \pm 0,021$ g/cm³ e densidade verdadeira de $2,157 \pm 0,014$ g/cm³. A porosidade aberta combinou bem com a macro porosidade teórica do projeto (~ 50 vol%), assumindo o geopolímero como um material mesoporoso.

O teste de compressão mostrou que as amostras de Na-Geo tinham uma resistência à compressão média de $5,23 \pm 0,87$ MPa, de acordo com os resultados relatados em outros estudos usando formulações de geopolímero semelhantes(130).

Os coeficientes de permeabilidade para três amostras de Na-Geo apresentaram valores médios de $k_1 = (9,05 \pm 0,41) \times 10^{-9}$ m² e $k_2 = (3,64 \pm 0,26) \times 10^{-4}$ m, que estão plotados no mapa da **Figura 28**. O mapa é baseado em centenas de valores de k_1 e k_2 coletados na literatura e tem sido frequentemente usado para classificar o nível de permeabilidade de uma ampla gama de materiais porosos em diferentes aplicações (92). Observa-se que as redes geopoliméricas apresentaram maior nível de permeabilidade do que dois outros portadores típicos para reações enzimáticas: adsorventes monolíticos (MADs)(131) e pellets de siliceous para leitos empacotados(132)

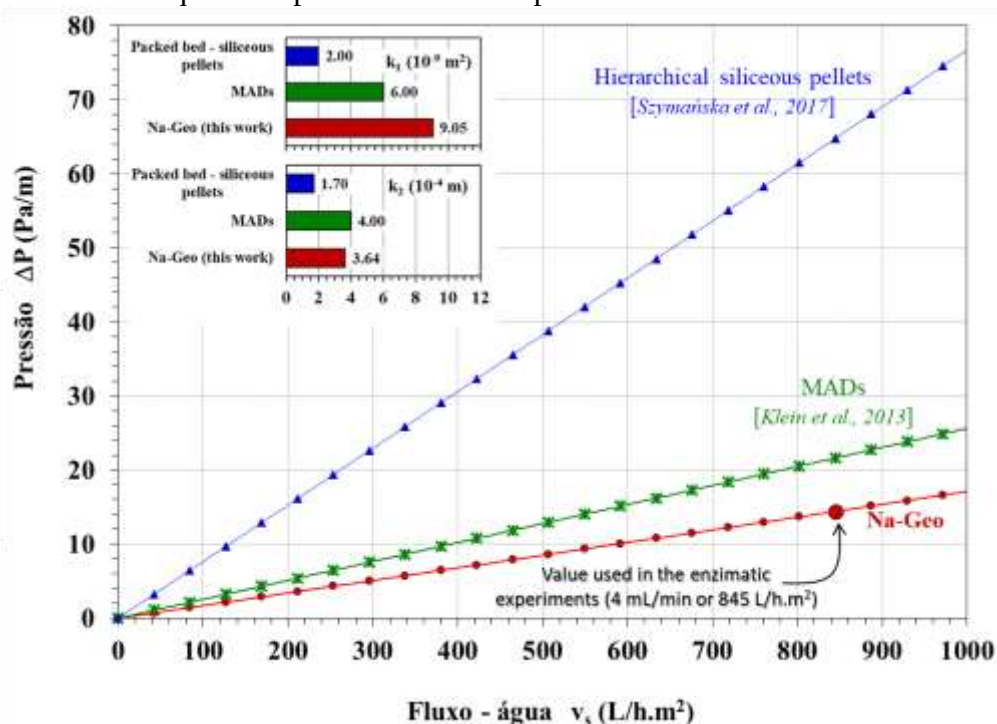
Figura 28. Mapa de permeabilidade com classificação de materiais porosos e localização dos carregadores de enzimas



Fonte: Adaptado de Potoczek et al., 2018(78) traduzido de dos Santos et al. 2021(133).

O desempenho de permeação superior das redes impressas é mais claramente avaliado na **Figura 29**, onde as curvas de queda de pressão simuladas para fluxo de água são comparadas para os três tipos de portadores. As curvas foram simuladas a partir das Equações (1) e (3), com $T = 50^\circ \text{C}$, $\mu = 5,49 \times 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$, $\rho = 988,1 \text{ kg/m}^3$. Os coeficientes k_1 e k_2 para ambos os MADs e pellets de siliceous foram recuperados da literatura (46,47). Para o valor de fluxo usado no biorreator ($845 \text{ L/m}^2/\text{h}$), a queda de pressão normalizada $\Delta P/L$ foi de 14 Pa/m para a rede, 22 Pa/m para os MADs e 65 Pa/m para os pellets siliceous.

Figura 29. Curvas de queda de pressão simuladas para três biocatalisadores enzimáticos porosos



Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.5.2 Troca iônica

A troca iônica Na^+ para NH_4^+ foi realizada a fim de diminuir o pH e aumentam a interação química entre a lipase e o suporte Na-Geo (134). A **Tabela 22** mostra a análise de EDS/SEM realizada com as mudanças na composição das amostras de Na-Geo expostas à troca iônica (de Na^+ para NH_4^+). Uma clara redução dos íons sódio (16,1% a 1,10%) e um aumento dos íons nitrogênio (0 a 4,66%) foi observada até a estabilização do pH após 4 dias(135). O pH variou de

um valor inicial de 12 a 6 após 4 dias. Ti e Fe estão presentes como impurezas no metacaulim de partida.

Tabela 22. . Composição química (% em peso) obtida por EDS / SEM no geopolímero impressos ao longo do processo de troca iônica (Na^+ a NH_4^+).

Amostra	N	Na	K	O	Si	Al	Fe	Ti
Na-Geo (green)	0.00	16.10	0.55	47.73	22.60	11.39	0.80	0.65
Na-Geo (1 dia)	1.58	5.71	0.68	50.36	26.10	13.80	1,05	0.54
Na-Geo (2 dia)	4.67	2.02	0.39	54.94	24.00	13.04	0.53	0.40
Na-Geo (3 dia)	3.27	1.94	0.59	52.73	26.77	14.04	0.78	0.55
Na-Geo (4 dia)	4.66	1.10	0.46	53.75	25.15	13.29	0.73	0.51

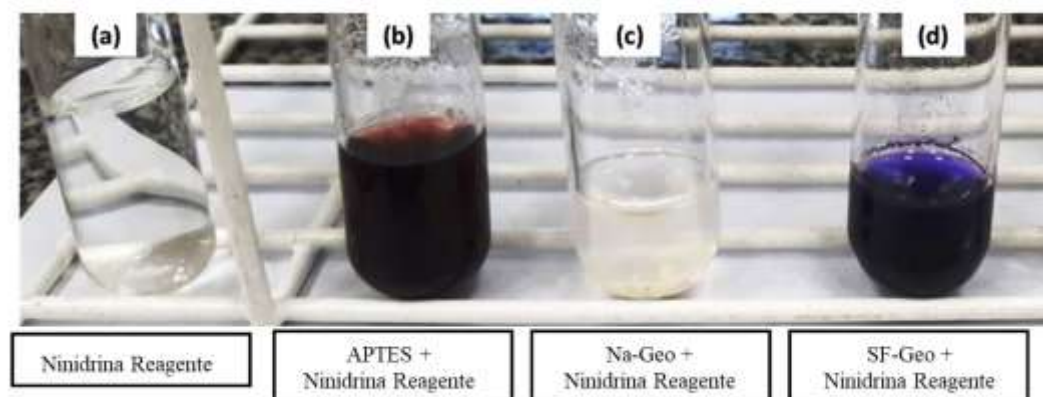
Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.5.3 Funcionalização de superfície

Os zeólitos e os materiais cerâmicos têm uma vida útil relativamente mais longa quando comparados a outros materiais inorgânicos(136). Além disso, são capazes de trabalhar em diferentes configurações, conforme aplicado nesta pesquisa com estruturas impressas em 3D, o que favorece a aplicação em biorreatores como suportes para a imobilização de lipases. No entanto, para a imobilização direta sobre o suporte Na-Geo é limitada, devido à falta de grupos reativos na superfície. Portanto, uma etapa de modificação na superfície é imprescindível para a criação desses grupos relativos, utilizando reagentes ativadores e funcionalizantes (APTES e glutaraldeído)(137) criando uma forte ligação entre a lipase e o suporte por ligação covalente, resultando em melhor estabilidade e pouca lixiviação enzimática. O ensaio da ninidrina tem sido amplamente utilizado para a determinação qualitativa e quantitativa de aminas. A reação das aminas primárias com a ninidrina ocorre por um deslocamento nucleofílico inicial de um grupo

hidroxila da ninidrina por uma amina, seguido por um mecanismo que gera um complexo colorido conhecido como púrpura de Ruhemann (90,91). A **Figura 30** mostra a presença da amina primária após a ativação com APTES devido à formação do complexo roxo Ruhemann no geopolímero com superfície funcionalizada (SF-Geo) (**Figura 30d**)

Figura 30. Determinação de aminas em amostras geopolímero impressas com superfícies funcionalizadas (SF-Geo) usando ensaios colorimétricos de ninidrina.



Fonte: Elaborada pela autora.

Confirmado a presença de grupamentos amina na superfície da estrutura do geopolímero, seguiu-se para a etapa de funcionalização com glutaraldeído. Nesta etapa do trabalho, utilizou-se um reator tubular (altura 20 cm e diâmetro interno 10 cm), mantendo-se a vazão de 6 mL/minuto de solução de glutaraldeído para funcionalizar as peças impressas em 3D. Optou-se por se ativar o suporte de forma contínua nesta etapa a fim de se obter maior contato do suporte com a solução, e não somente o contato superficial.

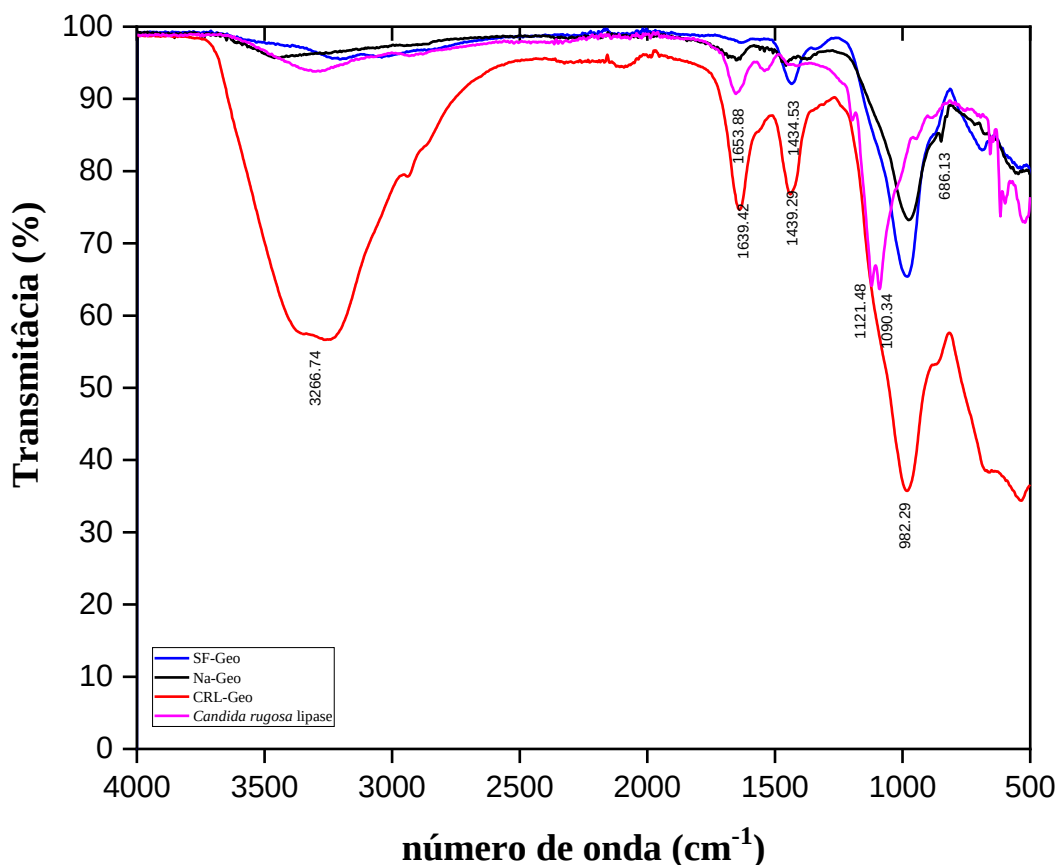
5.2.3.4 FTIR - Espectroscopia de infravermelho do geopolímero

Os espectros FTIR foram obtidos para as amostras Na-Geo, SF-Geo e CRL-Geo para verificar a eficiência da imobilização da lipase. Os espectros obtidos são mostrados na **Figura 31**. O Na-Geo apresenta picos de vibração característicos dos grupos Si-O em 976 cm^{-1} e 849 cm^{-1} . Após a reação com APTES a amostra SF-GEO se observa a banda em 1434 cm^{-1} , pode ser atribuído ao modo de deformação simétrica a CH_3 e CN, os grupos siloxanos Si-O (976 cm^{-1} e 849 cm^{-1}) picos alongados devido para APTES na superfície do geopolímero.

O Espectro de lipase de *Candida rugosa* (CRL), os picos em 1653 cm^{-1} e 1126 cm^{-1} são atribuídos ao grupo amida N-H curvando C-N (CO-NH_2) e 1090 cm^{-1} C-O.

Após a imobilização foram detectados na amostra CRL-Geo, todos os picos, demonstrando o sucesso da imobilização da lipase.

Figura 31. Espectros de FTIR do Na-Geo e das etapas de imobilização da CRL



Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.5.5 Imobilização da CRL no SF-Geo

Os suportes SF-Geo produzidos apresentaram alta porosidade e permeabilidade, características desejáveis durante o processo de imobilização da enzima, pois proporcionam acesso livre e rápido aos sítios funcionalizados. O efeito da concentração inicial de lipase no desempenho de imobilização foi investigado com amostras inteiras de SF-Geo expostas a uma quantidade especificada de CRL. A imobilização ocorreu no sistema de recirculação, permitindo maior eficiência e tempo de contato com a solução enzimática e sem riscos de danos à estrutura 3D. A **Tabela 23** fornece as cargas enzimáticas testadas.

Tabela 23. Rendimento de imobilização e atividade hidrolítica para diferentes carregamentos em SF-GEO.

Análises	Carregamento de CRL lipase (mg/g)			
	5	10	20	40
Atividade hidrolítica CRL-Geo (U/g)	157.1 ± 10.3	223.8 ± 9.0	522.4 ± 7.6	847.7 ± 9.7
Rendimento (%)	69.1	47.8	57.6	68.1

Fonte: Elaborada pela autora.

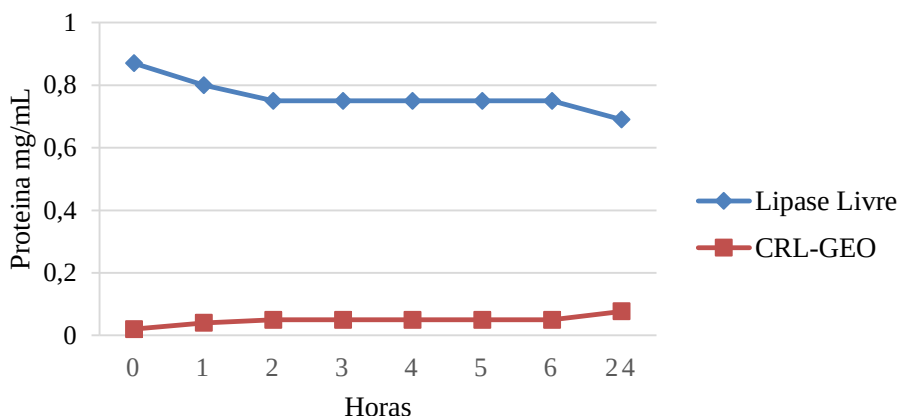
Conforme observado na **Tabela 20**, o aumento das cargas de lipase resultou em maiores atividades hidrolíticas, comprovando a presença de sítios funcionalizados para fixação da enzima na estrutura do carreador. Carregamentos superiores a 40 mg/g não tiveram sucesso devido à precipitação da solução enzimática. Não há estudos disponíveis relatados com CRL imobilizado em portadores impressos em 3D para permitir uma comparação direta de desempenho. No entanto, o maior valor de atividade hidrolítica alcançado (847 U/g) está dentro da faixa relatada para transportadores à base de sílica e alumina (384 - 983,3 U / g)(138,139), e indica que altas atividades hidrolíticas podem ser alcançadas com um ligação covalente em amostras SF-Geo.

5.2.5.6 *Teste de dessorção (lixiviação)*

A fim de averiguar se a atividade obtida é somente das lipases que estão imobilizadas por ligação covalente e que não há lipase na superfície do geopolímero aderida por adsorção foi realizado uma análise de dessorção utilizando solução de cloreto de sódio que ficou em contato com CRL-Geo por 24 horas, análise de proteína no sobrenadante foi realizada a cada uma hora e comparada com um teste em branco utilizando solução da lipase de *Candida rugosa* livre na mesma proporção que havia no biocatalisador.

A **Figura 32** corresponde aos dados de proteína obtido no sobrenadante em relação ao tempo de teste de dessorção da lipase no suporte de geopolímero, mediante adição da solução de cloreto de sódio.

Figura 32. Gráfico com valores de proteína no sobrenadante durante o tempo de estudo

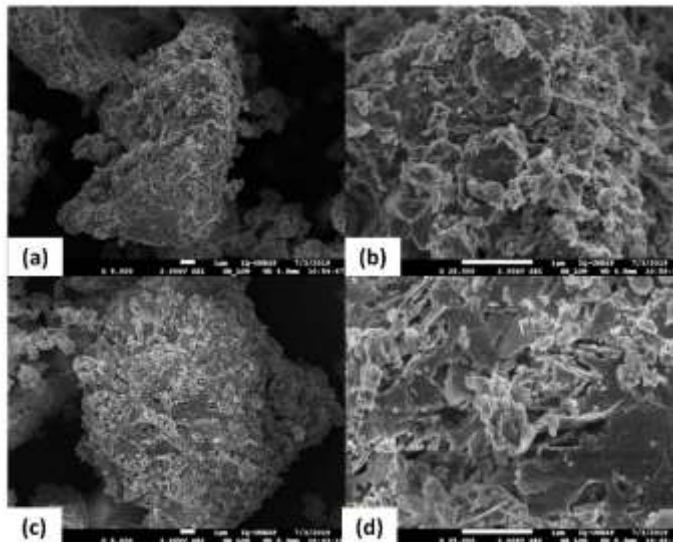


Como observado na **Figura 32**, os valores de proteína no sobrenadante, o teste em branco utilizando a lipase livre foi realizado para avaliar se seria possível determinar proteína na solução de NaCl ou se haveria alguma desnaturação ou inatividade na qual ficaria possível de determinar a proteína nessa solução, como pode ser observado a lipase livre se manteve estável. No sobrenadante do biocatalisador CRL-Geo foi detectado uma pequena quantidade $<0,1$ mg/mL de proteína, devido a presença de forte ligações entre o suporte e a enzima(140), confirmando o sucesso na imobilização da lipase no suporte de geopolímero.

5.2.5.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) no geopolímero

Imagens da MEV foram usadas para observar a morfologia do geopolímero superficial antes e após a imobilização da lipase de *Candida rugosa* (**Figura 33**). Claramente, o padrão regular da estrutura do geopolímero foi mantido após a ativação, funcionalização e imobilização. A lipase é pequena em comparação com a estrutura na qual foi imobilizada. A comparação das **Figuras 33a e 33c** confirma a presença de uma camada fina cobrindo a superfície da haste do geopolímero, feita de CRL, que é uma glicoproteína hidrofóbica globular com peso molecular de 45 - 62 kDa, 4,2% de açúcares neutros e volume molecular de $5 \text{ nm} \times 4,2 \text{ nm} \times 3,3 \text{ nm}$ [37,38]. As **Figuras 33b e 33d** revelam que a macroporosidade do suporte foi mantida mesmo após a imobilização da lipase. Isso é muito importante, pois a reação de hidrólise ocorre em três estágios; o primeiro requer a permeação de grandes moléculas de triacilglicerídeos através dos poros para entrar em contato com a lipase imobilizada e liberar os produtos da reação: 3 moléculas de ácidos graxos e 1 molécula de glicerol.

Figura 33. Imagens do MEV detalhes de superfície: (a) e (b) morfologia do geopolímero antes da imobilização da lipase (amostra Na-Geo); (c) e (d) morfologia do geopolímero após a imobilização da lipase (amostra CRL-Geo).

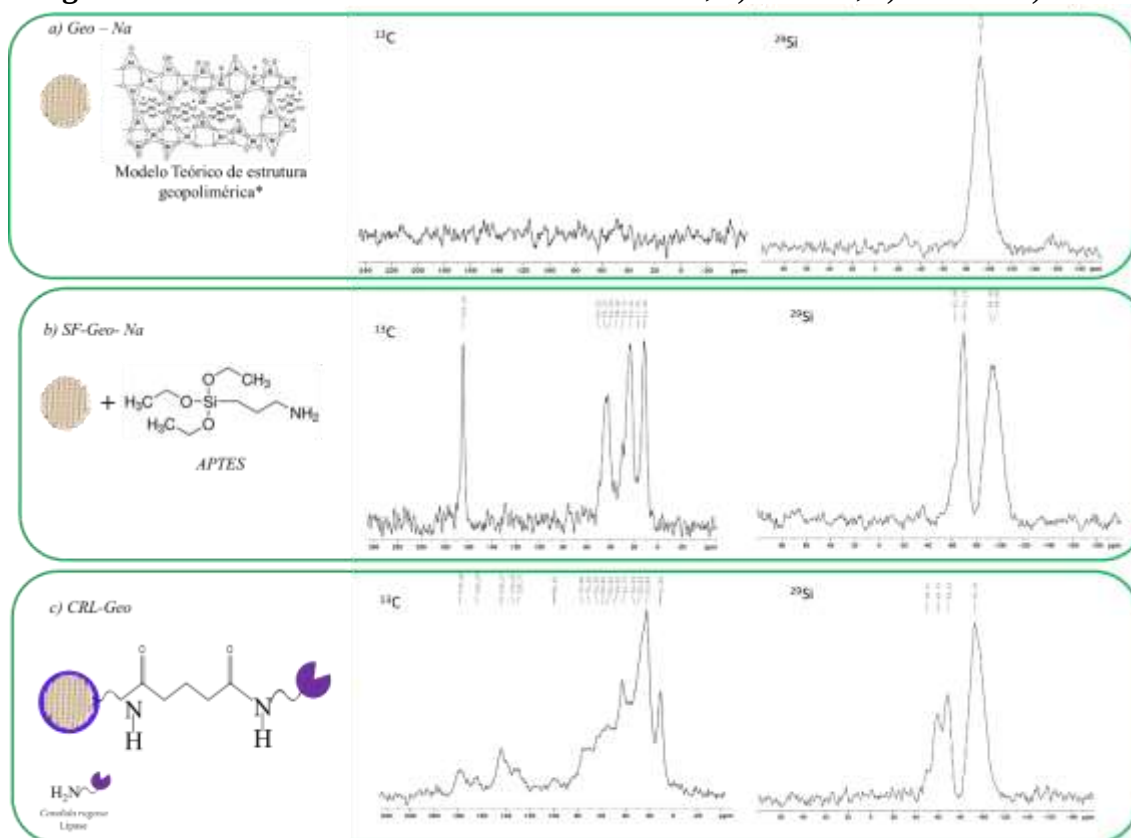


Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.5.8 Ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^{29}Si

A aplicação da técnica de RMN de ^{13}C em conjunto com a RMN de ^{29}Si no estado sólido para o desenvolvimento desse biocatalisador é uma ferramenta muito útil, para confirmar a imobilização da lipase de CRL no suporte de geopolímero impresso em 3D, pois RMN de ^{29}Si é de grande utilidade no estudo de estruturas e superfícies de sílica gel, silicatos, aluminossilicatos (zeólitas) e cimentos hidráulicos(110). Na **Figura 34** é apresentado os espectros obtidos para as 3 amostras analisadas: Geo-Na; SF-Geo e CRL-Geo.

Figura 34. RMN de ^{13}C e ^{29}Si das amostras Geo-Na; b) SF-Geo; c) CRL-Geo)



Na **Figura 34a**, foi analisado a amostra Geo-Na, é possível observar que no espectro de ^{13}C não houve aparecimento de nenhum sinal, indicando que o material produzido na impresso 3D é totalmente inorgânico. Já o espectro de ^{29}Si , apresentou sinal em Si-92ppm região de deslocamento químico que indica materiais que apresentam condensação dos tetraedros de $\text{Si}-(\text{O-Si})_n$, Q2 – estruturas em cadeias e Q3 – estruturas cíclicas em camadas, típica de geopolímeros.

Já na amostra SF-Geo-Na (**Figura 34b**), na qual o geopolímero foi ativada com APTES, que apresenta elementos de carbono na sua composição, podemos observar que o APTES foi incorporado na estrutura de Geo-Na, porque houve aparecimento de sinal no espectro de carbono, o sinal de $^{13}\text{C}_{164\text{ppm}}$ indica a deslocamento químico de C-NH₂, o sinal em $^{13}\text{C}_{40\text{ppm}}$ indica ligações de C-O e $^{13}\text{C}_{20\text{ppm}}$ típico de ligação de carbonos saturados (sp^3) que não estão ligados a elementos eletronegativos. O espectro de ^{29}Si é possível observar que também houve mudança, apresentando 2 sinais o $^{29}\text{Si}_{-92\text{ppm}}$ que indica a estrutura de condensação dos tetraedros de Si-O e em $^{29}\text{Si}_{-60\text{ppm}}$ indica o grupo R-Si-O-Si e R(OH)Si-O-Si do APTES.

Após a imobilização podemos verificar o espectro da **Figura 34c**, o espectro de ^{13}C apresenta que a funcionalização com o reagente glutaraldeio e a ligação covalente com a lipase ocorreu foi efetiva apresentando sinal $^{13}\text{C}_{-178\text{ppm}}$ que indica a região do grupo de aldeído ou seja confirma a presença do glutaraldeído que é utilizado para funcionalizar o suporte e ligar

covalentemente a lipase de CRL os sinais de ^{13}C -75 a -30 ppm indica ligações de C-N presente em grande proporção na lipase. Já o espectro de ^{29}Si se manteve o sinal da estrutura do geopolímero o que que o processo de imobilização não altera a estrutura, e o sinal que apresentou quando o Geo-Na foi ativado alterou uma vez que a amina presente no APTES é a precursora para a funcionalização e imobilização por ligação covalente.

As mudanças observadas nas 3 etapas da imobilização nos espectros de ^{13}C e ^{29}Si demonstra a incorporação efetiva da lipase na estrutura de Geo-Na indicando que houve uma imobilização eficiente produzindo de fato o biocatalisador CRL (110) Geo.

5.2.6 Planejamento composto central para a determinação das melhores condições operacionais

Com a finalidade de se obter as melhores condições operacionais após a CRL ter sido imobilizada no suporte de geopolímero de Na, foi realizado um planejamento composto central avaliando o pH, Temperatura (T) e as interações entre elas, uma vez que, uma mudanças pequenas nessas duas variáveis podem influenciar no aumento ou na inibição da atividade hidrolítica.

A escolha dessas duas variáveis foi realizada através do levantamento da literatura que aponta as lipases são facilmente inativas em condições extremas de temperatura e pH, e que após imobilizadas suas condições padrões de trabalho podem variar quando comparado a sua atividade na forma livre, devido sua interação com o suporte. Dessa forma optou-se por um planejamento composto central, na qual a variável resposta foi Atividade hidrolítica (U/g) que foi analisada pelo método de atividade hidrolítica, os resultados obtidos estão contidos na **Tabela 24**.

Tabela 24. Matriz com valores utilizados para o planejamento fatorial, bem como as atividades hidrolíticas determinadas para o estudo da influência das variáveis pH e temperatura.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Atividade hidrolítica (U/g)		
	x ₁	x ₂	pH	T °C	A1	A2	A3
1	-1,00	-1,00	5,00	30,00	771	748	770
2	-1,00	1,00	5,00	80,00	461	470	475
3	1,00	-1,00	10,00	30,00	845	836	847
4	1,00	1,00	10,00	80,00	494	494	483
5	-1,41	0,00	3,96	55,00	815	819	817
6	1,41	0,00	11,04	55,00	725	736	741
7	0,00	-1,41	7,50	19,64	650	650	646
8	0,00	1,41	7,50	90,36	569	537	553
9	0,00	0,00	7,50	55,00	647	638	656
10	0,00	0,00	7,50	55,00	642	649	645

Fonte: Elaborada pela autora.

Para o estudo realizado, os valores de atividade hidrolítica variaram de 461 a 847 U/g. Os menores valores de atividades hidrolíticas foram obtidos no experimento 2 e 4 onde as condições eram de pH 5 e pH 10 e temperatura de 80 °C, e os maiores valores obtidos em 2 pontos distintos 1º) pH 10 e temperatura de 33 °C e 2º) pH 3,98 e temperatura de 55 °C. Esses dados demonstram que a imobilização da lipase possibilitou o biocatalisador ter atividade hidrolítica em 2 diferentes pHs e temperatura.

Como o planejamento proposto é um ajuste fino, de maneira a se encontrar a melhor condição de atividade hidrolítica do CRL-Geo avaliou a análise de variância ANOVA (*Analysis of Variance*) para observar o modelo proposto pelo planejamento de experimento, apresentado na Tabela 25.

Tabela 25. Análise da Variância para a atividade hidrolítica do CRL-Geo

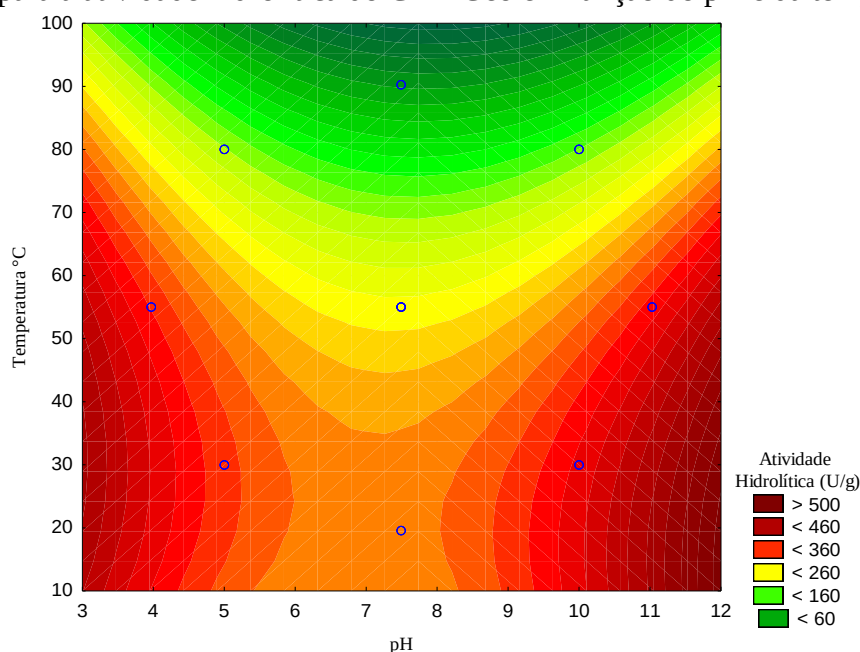
	Soma dos Quadrados	Grau de liberdade	Média Quadrática	F _{cal}	p
pH	381,0	1	381,0	0,06684	0,798201
pH.pH	47937,8	1	47937,8	8,40949	0,007862
T (°C)	228976,8	1	228976,8	40,16824	0,000001
T.T (°C)	18254,0	1	18254,0	3,20221	0,086167
pH.T	2565,5	1	2565,5	0,45005	0,508717
Erro Puro	136810,6	24	5700,4		
Resíduo	5700,4	29			
R ²	0,7155				

*nível de significância: 95%

Analisando-se a tabela Anova, conclui-se que estatisticamente, as variáveis pH no termo quadrático e temperatura no termo linear apresentaram influência com nível de significância de 95%, pois apresentam valores de p menor que 0,05.

O baixo valor obtido para R^2 expressa que o planejamento resultou em falta de ajuste do modelo. Entretanto nosso objetivo com esse planejamento não era obter o melhor ajuste possível, mais sim escanear da melhor forma quais condições operacionais seriam possíveis trabalhar com a CRL-Geo. Nesse contexto, essa falta de ajuste pode ser justificada pela obtenção de dois pontos de atividades ótimas obtidas que são opostas. Dessa forma, mesmo em condições distintas, o modelo não consegue se ajustar devido a tal proximidade entre as atividades, não invalidando o estudo aqui realizado (SERINOLI, 2009). Na Figura 35 é apresentado a superfície de resposta obtida para o estudo das atividades hidrolíticas a pós a imobilização da CRL-Geo.

Figura 35. O gráfico de contorno da superfície de resposta obtida de acordo com o modelo predito para a atividade hidrolítica do CRL-Geo em função do pH e da temperatura.



$$\text{Atividade hidrolítica (U/g)} = 73,36 - 10,11.(\text{pH})^2 - 11,14.(T \text{ } ^\circ\text{C}) - 13,70.(T \text{ } ^\circ\text{C})^2 + 12,26.(\text{pH}.T \text{ } ^\circ\text{C})$$

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado na Figura 35 há duas regiões onde a atividade hidrolítica obtida foi acima de 500 U/g. Obtido os dados avaliou-se a estabilidade térmica do biocatalisador nas duas condições proposta pelo planejamento experimental, uma vez que imobilização de lipases em geopolímeros impressos em 3D e outros materiais impressos em 3D ainda estão sendo explorados pelos pesquisadores e não foi encontrados dados na literatura para comparar.

5.2.7 Estabilidade a temperatura do CRL-Geo

Para o teste de estabilidade a temperatura foram escolhidos os pontos 3 e 5 do planejamento experimental (**Tabela 24**). Um aumento de temperatura que é uma variável significativa para a atividade hidrolítica, geralmente corresponde a um aumento na velocidade de reação. Entretanto, esse aumento de velocidade também pode promover o aumento da velocidade de desnaturação térmica da lipase, principalmente devido ao pH do meio reacional, reduzindo, portanto, a velocidade de formação de ácidos graxos livres.

O período de incubação foi de 24 horas, uma vez que a reação e hidrólise levará esse tempo. Os resultados estão apresentados na **Tabela 26**.

Tabela 26. Estabilidade a temperatura do biocatalisador CRL-Geo nos pontos 3 e 5 do planejamento de experimentos

Horas	pH 3,98 e 55 °C	pH 10 e 30 °C
	Atividade hidrolítica U/g	
0	811,69 ± 3,44	870,42 ± 5,73
1	806,24 ± 5,98	840,73 ± 4,32
2	799,45 ± 5,12	805,35 ± 7,65
3	789,35 ± 4,78	737,89 ± 4,89
4	768,40 ± 3,44	701,22 ± 7,39
5	765,01 ± 5,97	682,47 ± 3,58
6	764,79 ± 4,07	644,86 ± 4,64
24	764,01 ± 5,88	518,24 ± 5,78

Fonte: Elaborada pela autora.

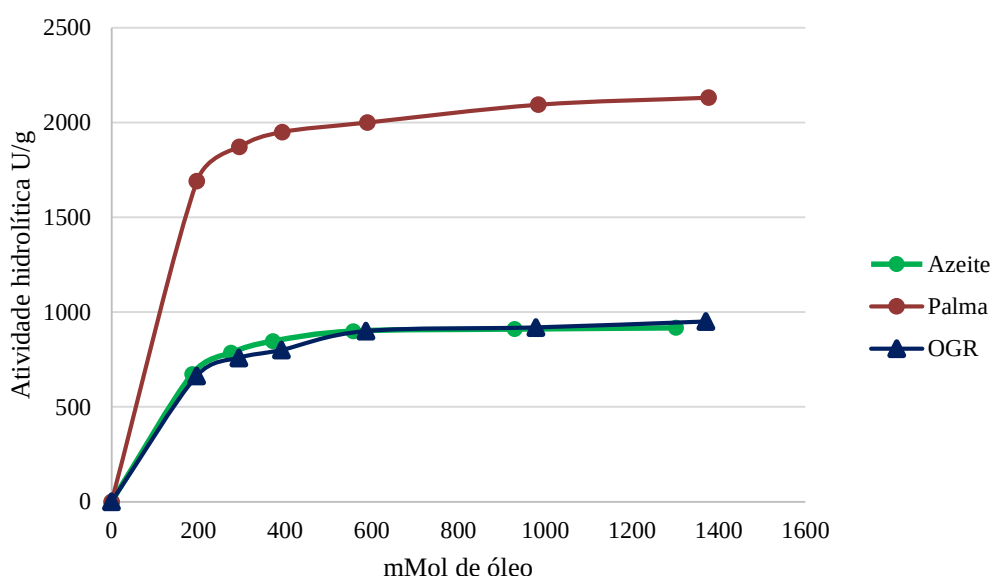
O biocatalisador CRL-Geo, apresentou uma baixa desativação térmica após o período de incubação, em pH 3,98 e temperatura de 55 °C houve uma perda de atividade de somente de 5,8 % (U/g), enquanto para o pH 10 e temperatura de 30 °C houve uma perda de 40,4 % (U/g). O que nos indicada, como apresentado no planejamento de experimento o pH é uma variável importante, mesmo em menor temperatura a desativação da lipase foi maior. A partir desses dados analisamos os parâmetros cinéticos relacionados com o biocatalisador CRL-Geo.

5.2.8 Determinação dos parâmetros cinéticos do biocatalisador CRL-Geo

Para verificar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de reação hidrolítica do biocatalisador CRL-Geo, variou-se o tipo de óleo e a sua porcentagem na emulsão na faixa de 10 a 70% (v/v), correspondendo a concentrações em ácidos graxos em mM. Os ensaios foram conduzidos no valor de pH ótimo e temperatura apresentado pelo planejamento de experimento, ponto 3 e 5.

Na **Figura 36** apresenta as curvas de saturação do substrato para os diferentes óleos para o ponto experimental 5.

Figura 36. Influência da concentração substrato para atuação do biocatalisador para os diferentes tipos de óleos – pH 3,98 e temperatura 55 °C

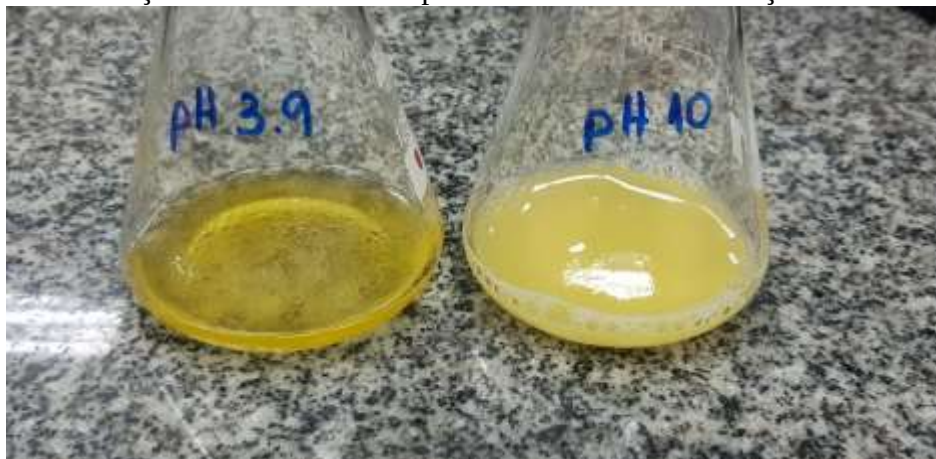


Fonte: Elaborada pela autora.

A **Figura 35** apresenta as curvas de saturação do substrato para os diferentes óleos vegetais, indicando que o aumento na concentração resultou em incrementos significativos nas velocidades de reação para todas as matérias-primas, azeite não é matéria prima para a aplicação na reação de hidroesterificação, entretanto realizamos esse estudo com ele pois é uma matéria-prima de alta qualidade e o mais utilizado para o cálculo desse parâmetro. Para concentrações de substrato superiores a 400 mM, a atividade enzimática da lipase tornou-se essencialmente independente da concentração do substrato, seguindo uma cinética do tipo Michaelis-Menten (141).

Entretanto, não foi possível realizar o cálculo de cinética para o ponto 3 do planejamento de experimentos. As matérias-primas selecionadas para o estudo OGR e Palma são oleaginosas de baixa qualidade, em contato com a solução tampão de pH 10 ocorreu reação de saponificação, devido ser um tampão com característica básica, não sendo possível seguir com a reação. Na **Figura 37** é apresentado a diferenças entre as emulsões para o OGR.

Figura 37. Diferenças entre as emulsões para o estudo de concentração de substrato



Fonte: Elaborada pela autora.

Por meio desses ensaios apresentados na **Figura 36** foi possível calcular os valores para $V_{m\acute{a}x}$ (velocidade máxima) e k_m (constante de Michaelis) o biocatalisador CRL-Geo, que podem ser vistos na **Tabela 27**.

Tabela 27. Constantes cinéticas de Michaelis-Menten (k_m) e velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) determinadas de acordo com o sistema gráfico de Lineweaver-Burk.

Tipo de óleo	Valores de K_m (mM)	Valores de $V_{m\acute{a}x}$ (U/g)
Azeite	85,6	1000
OGR	105,1	1000
Palma	67,75	2500

Fonte: Elaborada pela autora.

As constantes K_m e $V_{m\acute{a}x}$ são importantes para os parâmetros cinéticos do biocatalisador, Na **Tabela 27** é apresenta os valores obtidos das constantes de Michaelis-Menten, quanto menor o valor de K_m maior é a afinidade da enzima pelo substrato, sendo assim, o biocatalisador CRL-Geo tem maior afinidade como substrato o óleo de palma, observando a **Figura 35** podemos notar que para o óleo de palma houve uma maior atividade hidrolítica que se pode confirmar com o valor de K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Como a composição de ácidos graxos do azeite e do OGR são parecidos seus

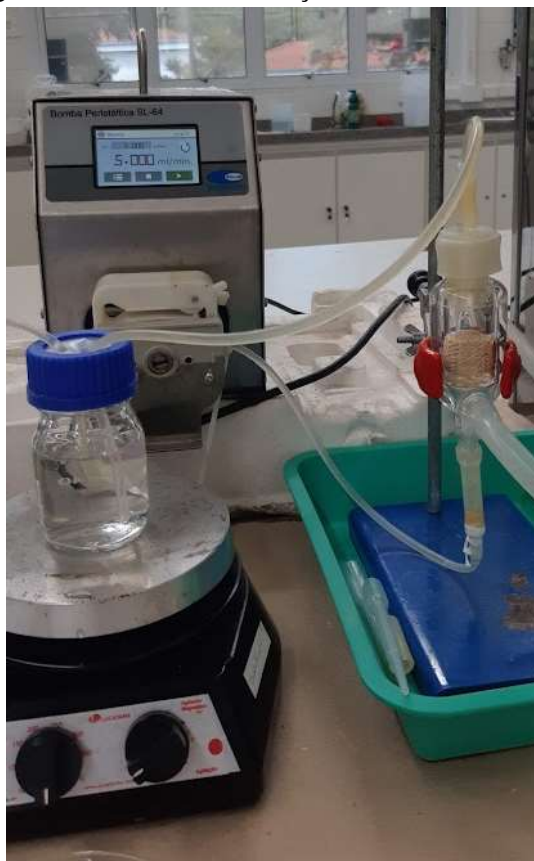
valores de $V_{m\acute{a}x}$ foram iguais, entretanto o biocatalisador teve maior afinidade pelo azeite ao invés do OGR, isso pode ter ocorrido pelo fato que o OGR passou por transformações físico-químicas que proporcionaram essa menor afinidade.

Utilizando as propriedades bioquímicas e cinéticas estudadas, foram realizadas a primeira reação de hidrólise com o biocatalisador CRL-Geo.

5.3 REAÇÃO DE HIDRÓLISE COM O BIOCATALISADOR CRL-Geo

A reação de hidrólise foi realizada em um reator de batelada de com recirculação (5 mL/min.) conforme a **Figura 38**. Para ter comparação foi fixado uma proporção de molar de 1:25 óleo:água (tampão pH 3,98) sem adição de goma arábica o biocatalisador CRL-Geo apresentou 847 U/g, fixou uma relação catalisador óleo de 100 U/g para cada grama de óleo, usou temperatura de 55 °C e o frasco que havia óleo e tampão ficou constantemente sobre agitação. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Figura 38. Sistema da reação de hidrólise



Fonte: Elaborada pela autora.

Após cada reação, todo o conjunto do reator mais o biocatalisador foi lavado com 10 mL de água destilada, hexano e solução tampão pH 3,98 2 vezes, em seguida iniciou um novo ciclo, para o OGR foi realizado 3 reuso/ciclo e 2 reuso/ciclo para o óleo de palma, os dados de teor de ácidos graxos, mono-, di e triglicerídeos são apresentados na **Tabela 28** para o OGR e na **Tabela 29** para o óleo de palma.

Tabela 28. Teor de ácidos graxos, mono-, di- e triglicerídeo após a reação de hidrólise de 24 horas utilizando como matéria-prima OGR

Biocatalisador	Teor de ácidos graxos	Monoglicerídeos	Diglicerídeos	Triglicerídeos
	Teor % m/m			
ORG	5,44 ± 0,67	0 ± 0,00	9,76 ± 0,33	84,80 ± 0,27
<i>Candida rugosa</i> livre	93,90 ± 1,78	0 ± 0,00	1,54 ± 0,28	4,56 ± 1,33
CRL – Geo 1°	90,00 ± 0,57	8,46 ± 0,87	1,54 ± 0,30	0 ± 0,00
CRL – Geo 2°	86,12 ± 0,66	4,78 ± 0,78	7,23 ± 0,45	1,87 ± 0,69
CRL - Geo 3°	75,67 ± 0,34	5,14 ± 0,83	10,20 ± 0,32	8,99 ± 0,14

Tabela 29. Teor de ácidos graxos, mono-, di- e triglicerídeo após a reação de hidrólise de 24 horas utilizando como matéria-prima óleo de Palma

Biocatalisador	Teor de ácidos graxos	Monoglicerídeos	Diglicerídeos	Triglicerídeos
	Teor % m/m			
Palma	8,09 ± 0,76	0,89 ± 0,08	0,01 ± 0,01	91,01 ± 0,77
<i>Candida rugosa</i> livre	98,32 ± 0,33	1,28 ± 0,03	0,40 ± 0,09	0,00 ± 0,00
CRL – Geo 1°	94,50 ± 0,65	0,00 ± 0,00	1,11 ± 0,78	4,39 ± 0,32
CRL - Geo 2°	31,69 ± 9,88	4,58 ± 2,34	21,76 ± 7,83	41,97 ± 6,39

Devido ao volume da reação, optou-se por realizar análise de teor de ácidos graxos por cromatografia determinando juntamente os mono-, di- e triglicerídeos utilizando a norma técnica ABNT NBR 15764(101) modificada por dos Santos 2016(25).

Na **Tabela 28** podemos observar que a lipase de *Candida rugosa* na forma livre conseguiu realizar a reação de hidrólise e obter 94% (m/m) de teor de ácidos graxos no final, ao ser imobilizada, o biocatalisador CRL-Geo obteve um rendimento de 90% (m/m) essa diminuição normalmente ocorre devido a alguns impedimentos estéricos que a lipase passa a ter quando é imobilizada. O rendimento nos ciclos seguintes caiu 95,5% no primeiro reuso e 83,3 % no segundo reuso.

Já o óleo de palma, como esperado, a lipase de *Candida rugosa* na forma livre apresentou maior afinidade devido a sua composição química e hidrolisou uma maior quantidade de triglicerídeos obtendo ao final 98% (m/m).

A primeira reação realizada com o biocatalisador CRL-Geo utilizando o óleo de palma (**Tabela 29**) forneceu um bom rendimento de ácidos graxos livres 94%(m/m); entretanto, o segundo ciclo foi ineficiente, diminuindo o rendimento em 66% devido o material entupir a estrutura 3D o que impediu que a mistura água:óleo percorresse pelo biocatalisador. O óleo por apresentar na sua composição maior quantidade de ácido palmítico (C16:0) é mais saturado o que aumenta sua viscosidade. Sendo difícil de realizar uma limpeza eficiente no interior da peça (**Figura 39**).

Figura 39. Reator com o biocatalisador CRL-Geo no 2º reuso matéria-prima Palma - A) Antes da reação, B) Durante as primeiras horas de reação, C) após 24 horas D) Vista superior



Fonte: Elaborada pela autora.

Provavelmente os espaços entre os filamentos internos das estruturas entupiram depois de algumas horas de reação o que impediu que o material percolar a estrutura do biocatalisador

inúmeras vezes, operando em modo batelada de recirculação, o que diminuiu drasticamente o rendimento.

A indústria de manufatura de impressão 3D tem uma vantagem que pode ser aliada das pesquisas no desenvolvimento biotecnológico, a estrutura testada não foi eficiente para o óleo de palma, entretanto novas estruturas com espaçamentos entre os filamentos diferentes e com diferentes formatos para atender à necessidade podem ser facilmente produzidas.

Na literatura ainda não há trabalhos de imobilização da lipase de *Candida rugosa* em suportes impressos em 3D afim de se comparar a atividade hidrolítica obtida. Entretanto, outros trabalhos que imobilizam a lipase de *Candida rugosa* e testaram na reação de hidrólise, obtiveram conversão em ácidos graxos livres na faixa de 80 – 90 % (m/m) (Citar), isso demonstra a grande aplicabilidade e inovação de biocatalisador.

5.4 PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS

Um estudo comparativo da produção de ésteres metílicos foi realizado utilizando a rota de transesterificação, Botti e colaboradores 2019(89) aplicou Na-Geo e K-Geo na produção de biodiesel por transesterificação utilizando óleo de soja. Aplicamos esses dois suportes macerados na produção de biodiesel por transesterificação utilizando o OGR e o óleo de palma que são de baixa qualidade para comparar com a rota de hidroesterificação.

5.5.1 Reação de esterificação – 2º etapa da hidroesterificação

Os ácidos graxos sintetizados na reação de hidrólise no primeiro ciclo foram introduzidos no balão juntamente com o catalisador H_2SO_4 e o metanol. Após o tempo determinado da reação, o produto foi deixado em repouso e foi observado nitidamente uma separação imediata de duas fases, a inferior água (polar) e a superior, os ésteres produzidos. Após a reação a fase polar foi lavada com água destilada (5vezes), até pH neutro, pois devido ao uso do o catalisador H_2SO_4 apresentou elevada acidez. Depois secou-se o biodiesel com nitrogênio devido sua alta hidrofobicidade, na **Figura 40** são os ésteres obtidos ao final da rota de hidroesterificação

Figura 40. Ésteres metílicos produzidos na 2ª Etapa da hidroesterificação.



Fonte: Arquivo pessoal.

5.5.2 Reação de transesterificação

O óleo de palma bruto e o OGR foram transesterificados utilizando como catalisador o Na-Geo sem nenhum tratamento – somente macerou ampliar a área de contato com o catalisador. Após o término das reações, deixou-se o produto da síntese em repouso no funil de separação, para os dois óleos analisados foi observado 3 fases: a superior composto de metanol que não reagiu, a fase intermediária os ésteres metílicos com glicerol que ficaram em uma única fase e a inferior o catalisador sólido, como não houve nenhuma mudança entre as fases após 30 minutos, separou as 3 fases e centrifugou a fase intermediária. Após a centrifugação observou novamente 3 fases: a superior composto de um pouco de metanol que não reagiu, a fase intermediária os ésteres metílicos e a inferior glicerol com grande quantidade de sabões, já esperado conforme estudos demonstrado por Meher, Sagar, Naik (2006) e Demirbas (2009)(103), devido a quantidade de água e ácidos graxos presentes nos óleos.

A etapa de lavagem na rota de produção de biodiesel via transesterificação alcalina teve como principal propósito a remoção de sabões, e de glicerol que tenha ficado eventualmente dispersos. A presença de sabões dificulta a separação do glicerol e favorece a formação de emulsões.

Na etapa de lavagem houve a formação de grande quantidade de emulsões, dificultando a separação da fase orgânica com a aquosa, um grande volume de água foi gasto na etapa final da lavagem, para a remoção completa dos sabões, indicativo da baixa eficiência desse processo para a produção de biodiesel com matérias-primas de baixa qualidade.

5.5.3 Teor de ésteres

A qualidade dos ésteres metílicos produzidos, foram analisados através do ensaio acreditado para o biodiesel de teor de ésteres conforme especificado na Resolução ANP n° 45, de 25 de outubro de 2014 e é apresentado na **Tabela 30**.

Tabela 30. Teor de ésteres

Meio de Produção	OGR	PALMA
	Teor de ésteres (% m/m)	
Hidroesterificação	98,3 ± 0,05	97,1 ± 0,00
Transesterificação Na-Geo	5,7 ± 0,02	7,3 ± 0,10

Como pode ser observado na **Tabela 30**, na segunda etapa da hidroesterificação foi possível obter um biodiesel com 98,3 % de ésteres metílicos para os AG do OGR e 97,1 % para os AG da palma, superior ao limite estabelecido pela resolução da ANP n° 45 que para a comercialização o biodiesel deve ter um percentual mínimo de teor de ésteres de 96,5 % m/m.

Entretanto essa resolução não se baseia na comercialização do biodiesel somente pela análise de teor de ésteres, há outras propriedades físico-químicas que devem ser estudados além do reaproveitamento da água formada na reação, pois a fase aquosa retirada dessa etapa é rica em mono-; e diacilglicerídeos que não reagiram, logo, poderiam retornar para a etapa de hidrólise para a formação de ácidos graxos.

Com a síntese comparativa pela rota convencional de transesterificação via catálise utilizando o Na-Geo, utilizando as etapas de um processo padrão de produção de biodiesel, não foi possível produzir ésteres metílicos, demonstrando dessa forma a dificuldade de se trabalhar com essas matérias-primas de baixa qualidade. Botti et al. 2020 (89,142) utilizando óleo de soja refinado produziu 89,9% de teor de ésteres, utilizando matéria-prima de baixa qualidade a pouca água e acidez promove fortemente reações secundárias que impedem a formação de ésteres.

Para que fosse possível a utilização desse tipo de matéria-prima seria necessário introduzir uma etapa de pré-tratamento para o óleo, e novas tecnologias na etapa de purificação, o que representa um aumento nos gastos de produção, maior geração efluentes e resíduos com baixo valor agregado, com características potenciais de contaminantes do meio ambiente.

A partir dos resultados das sínteses de comparação, pode-se confirmar o potencial da hidroesterificação – enzima/química para a produção de biodiesel como uma alternativa

promissora, utilizando biocatalisadores e matérias-primas de baixa qualidade, proporcionando um aumento significativo nas perspectivas de sustentabilidade de todo o processo de produção.

6 CONCLUSÕES

Para utilizar matéria-prima de baixa qualidade e diminuir os desafios na etapa da hidrólise, foi proposto trabalhar com a enzima *Candida rugosa*, uma lipase inespecífica que atua bem na hidrólise de óleos vegetais. Argilas, grafite e nano partículas magnéticas e geopolímero impresso em 3D foram propostas para a sua imobilização da lipase.

As argilas apresentam áreas superficiais elevadas, mas sua estrutura é altamente hidrofílica, não proporcionando áreas hidrofóbicas para que a lipase realizasse ligações químicas fortes com as argilas, o que levou o rápido desprendimento do suporte não sendo possível realizar o reuso.

O grafite altamente hidrofóbico de elevada área superficial, no entanto é leve e está distribuído em forma de camadas, foi possível realizar a imobilização por adsorção, mas devido a sua distribuição o sítio ativo da lipase não ficou disponível para a reação.

As nano partículas magnéticas tem a vantagem de separação do meio reacional pela aplicação de um campo magnético, apresentou ser um bom candidato como suporte para a imobilização da lipase de *Candida rugosa*, entretanto estudos sobre a produção e quantidade de carregamento são necessário para melhorar a aplicabilidade na reação de hidrólise.

Visando a aplicabilidade na reação com o avanço da tecnologia e da indústria de manufatura foi proposto utilizar como suporte o geopolímero impresso em 3D (Na-Geo).

O Na-Geo por ligação covalente se demonstrou inovador e apresentou resultados bastante satisfatório e reprodutivos após a imobilização.

A temperatura e o pH são as variáveis que mais influenciaram na atividade hidrolítica da lipase, ainda assim a imobilização da *Candida rugosa* no Na-Geo ampliou a condição ótima de operação da lipase, apresentando 2 condições ótimas de operação, para essa pesquisa somente o pH 3,98 e a temperatura de 55 °C foi a apropriada para a reação de hidrólise, não obstante o pH 10 e temperatura de 30 °C pode ser utilizadas com outros substratos e objetivos finais.

Na reação de hidrólise o biocatalisador CRL-Geo apresentou melhor afinidade pela matéria-prima de óleo de palma devido sua composição. Foi obtido uma conversão de 94,5 % de ácidos graxos proveniente do óleo de palma bruto e 90,0 % para o OGR, no primeiro ciclo, a reação de hidrólise, traçados para cada processo, segundo suas matérias-primas, apresentaram resultados bastante satisfatórios e reprodutivos, produzindo alto teores de ácidos graxos.

Na segunda etapa (esterificação), a taxa de conversão de ácidos graxos livres em éster acima de 97 % em ambas matrizes estudadas. O que demonstra que o grande desafio de se produzir biodiesel por hidroesterificação está na primeira etapa da reação a hidrólise.

A hidroesterificação proporciona uma estratégia inovadora na cadeia produtiva do biodiesel, incentivando a produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixa qualidade, pois possibilita o uso de óleos brutos e óleos residuais sem a necessidade de pré-tratamento. No entanto trabalhar com biocatalisadores melhora a temperatura de trabalho da primeira etapa mais ainda é um grande desafio, o biocatalisador impresso em 3D demonstrou ser inovador e um aliado para a produção de biodiesel por hidroesterificação.

REFERÊNCIAS:

1. Urrutia-Pereira M, Mello-da-Silva CA, Solé D. COVID-19 and air pollution: A dangerous association? **Allergologia et Immunopathologia**, v. 48, p. 496, 2020
2. dos Santos L K, Hatanaka RR, de Oliveira JE, Flumignan DL. Experimental Factorial Design on Hydroesterification of Waste Cooking Oil by Subcritical Conditions for Biodiesel Production. **Renewable Energy**, v. 114, p. 2017
3. Pourzolfaghar H, Abnisa F, Daud WMAW, Aroua MK. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 245–257, 2016.
4. GUNSTONE, F. D.; PADLEY FB. Lipid technologies and applications. In 1997. p. New York: M. Dekker, v.1, cap. 30 e 31.
5. GUNSTONE FD. **An introduction to the chemistry and biochemistry of fatty acids and their glycerides**. n. Ed. 2. 1967.
6. MORETTO E. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. Varela, organizador. 1998. 150 p.
7. Vianni R, Braz-filho R. Ácidos Graxos Naturais: Importância e Ocorrência em Alimentos. **Química Nova**, v. 19, p. 4, 1195.
8. Dandik L, Aksoy HA. Effect of catalyst on the pyrolysis of used oil carried out in a fractionating pyrolysis reactor. **Renewable Energy**, v. 16, n. 1–4, p. 1007–1010, 1999
9. Russo D, Dassisti M, Lawlor V, Olabi AG. State of the art of biofuels from pure plant oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 6, p. 4056–4070, 2012.
10. Cavalcante FTT, Neto FS, Rafael de Aguiar Falcão I, Erick da Silva Souza J, de Moura Junior LS, da Silva Sousa P, et al. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel**, v. 288, p. 119577, 2021
1. Suarez PAZ, Da Cruz RS, Meneghetti SMP. Biodiesel no Brasil: Impulso tecnológico. In: *in: MENEZES, Rafael Silva (Org.), Volume 1*, Lavras - UFLA - MG: [s.n.], 2016, p. 244
12. KNOTHE, Gerhard; KRAHL, Jürgen; GERPEN, Jon Van, **Biodiesel Handbook (2nd Edition)**, [s.l.: s.n.], 2010.
13. Ramos LP, Silva FR, Mangrich AS, Cordeiro S. **Tecnologias de Produção de Biodiesel** Tecnologias de Produção de Biodiesel. v. 3, n. 5, p. 385–405, 2011.
14. Robles-Medina A, González-Moreno PA, Esteban-Cerdán L, Molina-Grima E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 398–408, 2009
15. ARANSIOLA, E. F. *et al*, A review of current technology for biodiesel production: State of the art, **Biomass and Bioenergy**, v. 61, p. 276–297, 2014
16. DE LIMA, Ana Lúcia; RONCONI, Célia M.; MOTA, Claudio J.A., Heterogeneous basic catalysts for biodiesel production, **Catalysis Science and Technology**, v. 6, n. 9, p. 2877–2891, 2016;
17. NORJANNAH, B. *et al*, Enzymatic transesterification for biodiesel production: A

comprehensive review, **RSC Advances**, 2016.

18. VICENTE, Gemma; MARTÍNEZ, Mercedes; ARACIL, José, Integrated biodiesel production: A comparison of different homogeneous catalysts systems, **Bioresource Technology**, v. 92, n. 3, p. 297–305, 2004
19. Leung DY, Wu X, Leung MKH. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification, **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083–1095, 2010.
20. Aguiéiras ECG, Cavalcanti-Oliveira ED, De Castro AM, Langone MAP, Freire DMG. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: **Fuel**, v. 135, p. 315–321, 2014
21. Rocha LLL, Ramos ALD, Antoniosi NR, Furtado NC, Taft CA, Aranda DAG. Production of Biodiesel by a Two-Step Niobium Oxide Catalyzed Hydrolysis and Esterification. **Letters in Organic Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 571–578, 2010
22. Minami E, Saka S. Kinetics of hydrolysis and methyl esterification for biodiesel production in two-step supercritical methanol process. **Fuel**, v. 85, n. 17–18, p. 2479–2483, 2006.
23. Bressani APP, Garcia KCA, Hirata DB, Mendes AA. Production of alkyl esters from macaw palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using heterogeneous biocatalysts: Optimization by response surface methodology. **Bioprocess Biosyst Eng.** v.38 p.287–9, 2014.
24. Micic RD, Tomić MD, Kiss FE, Nikolić-Djorić EB, Simikić MD. Optimization of hydrolysis in subcritical water as a pretreatment step for biodiesel production by esterification in supercritical methanol. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 103, p. 90–100, 2015.
25. dos Santos LK. **Avaliação da Aplicação do Processo de Hidroesterificação na Produção de Biodiesel a partir de Matérias-Primas de Baixa Qualidade**, Dissertação. Araraquara - SP; 2016. 136 p.
26. de Sousa JS, Cavalcanti-Oliveira E d A, Aranda DAG, Freire DMG. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1–4, p. 133–137, 2010.
27. Meng Y, Wang G, Yang N, Zhou Z, Li Y, Liang X, et al. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. 2011;c:1–9.
28. Guimarães Freire DM, de Sousa JS, Cavalcanti-Oliveira E d A. Biotechnological methods to produce biodiesel. **Biofuels**, p. 315–337, 2011.
29. dos Santos LK, Hatanaka RR, de Oliveira JE, Flumignan DL. Production of biodiesel from crude palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using subcritical water. **Renewable Energy**, 2019
30. Demirbas A, Fatih Demirbas M. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **E Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 1, p. 163–170, 2011
31. Jacobson K, Gopinath R, Meher LC, Dalai AK. Solid acid catalyzed biodiesel production from waste cooking oil. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 85, n. 1–2, p. 86–91, 2008

32. Demirbas A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. **Energy Conversion and Management**, v. 49, n. 1, p. 125–130, 2008..
33. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E PESQUISA. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil**. Biblioteca do Ministerio do Planejamento, Orçamento e Gestão. 2010. p. 1–54.
34. Kocsisová T, Juhasz J, Cvengroš J. Hydrolysis of fatty acid esters in subcritical water. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 8, p. 652–658, 2006.
35. A. Pandey, C. Larroche, S.C Ricke, Dussap CG, E. Gnansounou. Biofuels **Alternative Feedstock and Conversion Process**. Elsevier. 2011. 629 p.
36. Knothe G, Van Gerpen JH, Krahl JJ, Gerpen JH Van. The Biodiesel. **The Biodiesel Handbook**, Vol. 2, p 302.
37. AGROPALMA, **História**, 2022, disponível em: <<https://www.agropalma.com.br/quem-somos/a-agropalma>>. acesso em: 12 dez. 2021.
38. Valores N. Agropalma 2013. 2013;
39. Christopher LP, Hemanathan Kumar, Zambare VP. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**. 2014.
40. Filho DG, Silva AG, Guidini CZ. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2019
41. Fjerbaek L, Christensen K V., Norddahl B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**. 2009.
42. Gog A, Roman M, Toşa M, Paizs C, Irimie FD. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. **Renewable Energy**. 2012.
43. Guldhe A, Singh B, Mutanda T, Permaul K, Bux F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 2015.
44. Zaks A, Klibanov AM. Substrate Specificity of Enzymes in Organic Solvents vs. Water Is Reversed. **J Am Chem Soc**. 1986;
45. Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K. Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**. 2012;
46. Ranganathan SV, Narasimhan SL, Muthukumar K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975–3981, 2008
47. Hanefeld U, Gardossi L, Magner E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 42, p. 6223–6235, 2013
48. Sheldon RA, Van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev*
49. Grochulski P, Li Y, Schrag JD, Bouthillier F, Smith P, Harrison D, et al. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Biological**

Chemistry, v. 268, n. 17, p. 12843–12847, 1993.

50. Tomizuka N, Ota Y, Yamada K. Studies on lipase from candida cylindracea. **Agric Biol Chem.** vol. 30, p. 576–84, 1966
51. Benjamin S, Pandey A. Candida rugosa lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. **Yeast**, v. 14, n. 12, p. 1069–1087, 1998.
52. Domínguez De María P, Sánchez-Montero JM, Sinisterra J V., Alcántara AR. Understanding Candida rugosa lipases: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 180–196, 2006.
53. Babaki M, Yousefi M, Habibi Z, Mohammadi M, Yousefi P, Mohammadi J, et al. Enzymatic production of biodiesel using lipases immobilized on silica nanoparticles as highly reusable biocatalysts: Effect of water, t-butanol and blue silica gel contents. **Renewable Energy**, v. 91, p. 196–206, 2016.
54. Guncheva M, Paunova K, Dimitrov M, Yancheva D. Stabilization of Candida rugosa lipase on nanosized zirconia-based materials. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 108, p. 43–50, 2014.
55. Knezevic Z, Mojovic L, Adnadjevic B. Palm oil hydrolysis by lipase from Candida cylindracea immobilized on zeolite type Y. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 4, p. 275–280, 1998.
56. José C, Austic GB, Bonetto RD, Burton RM, Briand LE. Investigation of the stability of Novozym® 435 in the production of biodiesel. **Catalysis Today**, v. 213, p. 73–80, 2013
57. Vescovi V, Kopp W, Guisán JM, Giordano RLC, Mendes AA, Tardioli PW. Improved catalytic properties of Candida antarctica lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino- glutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, 2016
58. Talukder MMR, Wu JC, Chua LPL. Conversion of waste cooking oil to biodiesel via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification. **Energy and Fuels**, v. 24, n. 3, p. 2016–2019, 2010.
59. Bon EPS, Pereira-Jr N, Gottschalk LMF, Sá-Pereira P, Roseiro JC, Ferrara MA. Bioprocessos para produção de enzimas. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**, 2008.
60. Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas MJ. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, 2000.
61. Ozturk TK, Kilinc A. Immobilization of lipase in organic solvent in the presence of fatty acid additives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3–4, p. 214–218, 2010
62. Avelar MHM, Cassimiro DMJ, Santos KC, Domingues RCC, De Castro HF, Mendes AA. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 452–458, 2013.
63. Reis C, Sousa E, Serpa J, Oliveira R, Oliveira R, Santos J. Design of immobilized enzyme biocatalysts: drawbacks and opportunities. **Química Nova** 2019.

64. Corma A, Fornes V, Rey F. Delaminated zeolites: An efficient support for enzymes. **Advanced Materials**, v. 14, n. 1, p. 71–74, 2002
65. Basso A, Serban S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, 2019.
66. de Paiva LB, Morales AR, Valenzuela Díaz FR. Organoclays: Properties, preparation and applications. **Applied Clay Science**, v. 42, n. 1–2, p. 8–24, 2008.
67. Thangaraj B, Solomon PR. Immobilization of Lipases – A Review. Part II: Carrier Materials. **ChemBioEng Reviews**, v. 6, n. 5, p. 167–194, 2019.
68. TROJANOWICZ, Marek, Analytical applications of carbon nanotubes: a review, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 480–489, 2006.
69. GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S., The rise of graphene, **Nature Materials**, v. 6, n. 3, p. 183–191, 2007.
70. Cipolatti EP, Valério A, Henriques RO, Moritz DE, Ninow JL, Freire DMG, et al. Nanomaterials for biocatalyst immobilization – state of the art and future trends. **RSC Adv.**, v. 6, n. 106, p. 104675–104692, 2016.
71. Shi Y, Liu W, Tao Q-L, Jiang X-P, Liu C-H, Zeng S, et al. Immobilization of Lipase by Adsorption Onto Magnetic Nanoparticles in Organic Solvents. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 1, p. 601–607, 2016
72. Li C, Jiang S, Zhao X, Liang H. Co-immobilization of enzymes and magnetic nanoparticles by metal-nucleotide hydrogel nanofibers for improving stability and recycling. **Molecules**, v. 22, n. 1, 2017.
73. Dunlop DJ, Özdemir Ö. **Rock Magnetism: Fundamentals and Frontiers**, [s.l.: s.n.], 1997.
74. Oliveira LCA, Fabris JD, Pereira MC. Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 123–130, 2013.
75. Kralj S, Drofenik M, Makovec D. Controlled surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles with terminal amino and carboxyl groups. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 7, p. 2829–2841, 2011
76. Xie W, Huang M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto graphene oxide Fe₃O₄ nanocomposite: Characterization and application for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 159, n. September 2017, p. 42–53, 2018
77. Yang D, Wang X, Shi J, Wang X, Zhang S, Han P, et al. In situ synthesized rGO-Fe₃O₄ nanocomposites as enzyme immobilization support for achieving high activity recovery and easy recycling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 273–280, 2016.
78. Potoczek M, Chmielarz A, Innocentini MD de M, Silva ICP, Colombo P, Winiarska B. Porosity effect on microstructure, mechanical, and fluid dynamic properties of Ti-2AlC by direct foaming and gel-casting. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 101, n. 12, p. 5346–5357, 2018
79. Bai C, Colombo P. Processing, properties and applications of highly porous geopolymers: A review. **Ceramics International** 2018.
80. Zhang X, Bai C, Qiao Y, Wang X, Jia D, Li H, et al. Porous geopolymer composites: A

- review. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**. v.150, p. 106629, 2021
81. Sazama P, Bortnovsky O, Dědeček J, Tvaržková Z, Sobalík Z. Geopolymer based catalysts- New group of catalytic materials. **Catalysis Today**. 2011.
 82. Glad BE, Kriven WM. Highly Porous Geopolymers Through Templating and Surface Interactions. Colombo P, organizador. **J Am Ceram Soc** 2015
 83. Shahzad A, Lazoglu I. Direct ink writing (DIW) of structural and functional ceramics: Recent achievements and future challenges. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**. 2021
 84. Ngo TD, Kashani A, Imbalzano G, Nguyen KTQ, Hui D. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. **Composites Part B: Engineering**. vol 143 p. 143, 2018
 85. Franchin G, Scanferla P, Zeffiro L, Elsayed H, Baliello A, Giacomello G, et al. Direct ink writing of geopolymeric inks. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 37, n. 6, p. 2481–2489, 2017
 86. Yong Y, Bai Y, Li YF, Lin L, Cui Y, Xia C. Preparation and application of polymer-grafted magnetic nanoparticles for lipase immobilization. **J Magn Magn Mater**. 2008.
 87. Junior FG de S, Marins JA, Rodrigues CHM, Pinto JC. A Magnetic Composite for Cleaning of Oil Spills on Water. **Macromol Mater Eng**. 2010.
 88. Franchin G, Scanferla P, Zeffiro L, Elsayed H, Baliello A, Giacomello G, et al. Direct ink writing of geopolymeric inks. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 37, n. 6, p. 2481–2489, 2017.
 89. Innocentini MDM, Botti RF, Bassi PM, Paschoalato CFPR, Flumignan DL, Franchin G, et al. Lattice-shaped geopolymer catalyst for biodiesel synthesis fabricated by additive manufacturing. **Ceramics International**, v. 45, n. 1, p. 1443–1446, 2019.
 90. Friedman M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 385–406, 2004.
 1. Sun Y, Kunc F, Balhara V, Coleman B, Kodra O, Raza M, et al. Quantification of amine functional groups on silica nanoparticles: A multi-method approach. **Nanoscale Advances**, v. 1, n. 4, p. 1598–1607, 2019.
 92. de Mello Innocentini MD, Sepulveda P, dos Santos Ortega F. Permeability. In: **Cellular Ceramics**, Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, p. 313–341;
 93. Stochero NP, de Moraes EG, Moreira AC, Fernandes CP, Innocentini MDM, Novaes de Oliveira AP. Ceramic shell foams produced by direct foaming and gelcasting of proteins: Permeability and microstructural characterization by X-ray microtomography. **J Eur Ceram** 2020.
 94. PAULA, A. Veloso de, **Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais.**, Lorena: Lorena: Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo212, 2012.
 95. Mehrasbi MR, Mohammadi J, Peyda M, Mohammadi M. Covalent immobilization of

- Candida antarctica lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. **Renew Energy** v. 102, p.593–602, 2017.
96. American Oil Chemist Society. **AOCS Ca 5a-40: Free fatty acids**. Urbana, USA: American Oil Chemist Society; 2012. p. 2.
 97. American Society for Testing and Materials. **ASTM D6304-16e1: Standard Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils, and Additives by Coulometric Karl Fischer**. West Conshohocken, PA,: American; 2016. p. 6.
 98. International Organization for Standardization. **ISO 12966-2:2017 Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters — Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids**. EU; 2017. p. 15.
 99. Hassan SZ, Vinjamur M. Parametric effects on kinetics of esterification for biodiesel production: A Taguchi approach. **Chemical Engineering Science**, v. 110, p. 94–104, 2014.
 100. EUROPEAN STANDARD. EN 14103 - Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents. UK; 2011. p. 18.
 101. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR 15764-15: Biodiesel: Determinação do teor total de ésteres por cromatografia gasosa**. Rio de Janeiro, RJ: Associação Brasileira de Normas Técnicas; 2015. p. 13.
 102. GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. 2006. 136 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2006.
 103. Meher LC, Sagar DV, Naik SN. Technical aspects of biodiesel production by transesterification — a review v. 10, p. 248–268, 2006.
 104. Kusdiana D, Saka S. Two-Step Preparation for Catalyst-Free Biodiesel Fuel Production: Hydrolysis and Methyl Esterification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115, n. 1–3, p. 0781–0792, 2004.
 105. Barriuso J, Vaquero ME, Prieto A, Martínez MJ. Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the Candida rugosa-like family: A review. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 874–885, 2016.
 106. Li G, Chen Y, Fang X, Su F, Xu L, Yan Y. Identification of a hot-spot to enhance: Candida rugosa lipase thermostability by rational design methods. **RSC Advances**, v. 8, n. 4, p. 1948–1957, 2018.
 107. Grochulski P, Li Y, Schrag JD, Cygler M. Two conformational states of Candida rugosa lipase. **Protein Science**, v. 3, n. 1, p. 82–91, 1994.
 108. James JJ, Lakshmi BS, Seshasayee ASN, Gautam P. Activation of Candida rugosa lipase at alkane-aqueous interfaces: A molecular dynamics study. **FEBS Letters**, v. 581, n. 23, p. 4377–4383, 2007.
 109. Jafarian F, Bordbar AK, Zare A, Khosropour A. The performance of immobilized Candida rugosa lipase on various surface modified graphene oxide nanosheets. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 1166–1174, 2018.
 110. Pavia D, Lampman G, Kriz G, Vyvyan J. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learn. 2012.

111. Adachi D, Hama S, Nakashima K, Bogaki T, Ogino C, Kondo A. Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 410–416, 2013.
112. Watanabe Y, Nagao T, Nishida Y, Takagi Y, Shimada Y. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, n. 11, p. 1015–1021, 2007.
113. Fiorito TM, Icoz I, Stotzky G. Adsorption and binding of the transgenic plant proteins, human serum albumin, β -glucuronidase, and Cry3Bb1, on montmorillonite and kaolinite: Microbial utilization and enzymatic activity of free and clay-bound proteins. **Applied Clay Science**, v. 39, n. 3–4, p. 142–150, 2008.
114. Gao S, Wang Y, Wang T, Luo G, Dai Y. Immobilization of lipase on methyl-modified silica aerogels by physical adsorption. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 996–999, 2009.
115. Ting WJ, Huang CM, Giridhar N, Wu WT. An enzymatic/acid-catalyzed hybrid process for biodiesel production from soybean oil. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 39, n. 3, p. 203–210, 2008.
116. Fernandez-lafuente R, Armise P, Sabuquillo P, Guisa M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and physics of lipids**, v.(1-2), p. 185–197, 1993 .
117. Manoel EA, dos Santos JCS, Freire DMG, Rueda N, Fernandez-Lafuente R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, 2015.
118. Liang Y, Huang J, Zang P, Kim J, Hu W. Molecular layer deposition of APTES on silicon nanowire biosensors: Surface characterization, stability and pH response. **Applied Surface Science**, v. 322, p. 202–208, 2014.
119. Hao Y, Chen Y, Xia H, Gao Q. Surface chemical functionalization of starch nanocrystals modified by 3-aminopropyl triethoxysilane. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.
120. LEHNINGER N., David; COX M., Michael, Principios de Bioquímica, **Lehninger - Principios de Bioquímica 5ed**, 2009.
121. Prlainović NŽ, Bezbradica DI, Knežević-Jugović ZD, Stevanović SI, Avramov Ivić ML, Uskoković PS, et al. Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on multi walled carbon nanotubes. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 279–285, 201.
122. Wang XY, Jiang XP, Li Y, Zeng S, Zhang YW. Preparation Fe₃O₄@chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015.
123. Jiao R, Tan Y, Jiang Y, Hu M, Li S, Zhai Q. Ordered mesoporous silica matrix for immobilization of chloroperoxidase with enhanced biocatalytic performance for oxidative decolorization of azo dye. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 31, p. 12201–12208, 2014.
124. Janot R, Guérard D. One-step synthesis of maghemite nanometric powders by ball-milling.

Journal of Alloys and Compounds, v. 333, n. 1–2, p. 302–307, 2002.

125. Hou C, Qi Z, Zhu H. Preparation of core–shell magnetic polydopamine/alginate biocomposite for *Candida rugosa* lipase immobilization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, n. 6, p. 544–551, 2015
126. Amirkhani L, Moghaddas J, Jafarizadeh-Malmiri H. *Candida rugosa* lipase immobilization on magnetic silica aerogel nanodispersion. **RSC Advances**, v. 6, n. 15, p. 12676–12687, 2016.
127. SILVA MO. **Hodium (II) succinate: synthesis, characterization and adsorption on maghemite nanoparticles**. Goiás: Dissertação (Mestrado em Educação em Química) - Universidade Federal de Goiás; 2012. p. 86.
128. SERNA TB. **Síntese e caracterização de nanopartículas de maghemita (γ -Fe₂O₃) via eletrodeposição**. Dissertação (Mestrado em Física) programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Paraná; 2017. p. 90.
129. SOUZA AT. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa)**. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) do Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP); 2011. p. 131.
130. Ordoñez E, Gallego JM, Colorado HA. 3D printing via the direct ink writing technique of ceramic pastes from typical formulations used in traditional ceramics industry. **Applied Clay Science**, v. 182, n. 53, p. 105285, 2019.
131. Klein TY, Treccani L, Thöming J, Rezwan K. Porous ceramic monoliths assembled from microbeads with high specific surface area for effective biocatalysis. **RSC Advances**, v. 3, n. 32, p. 13381, 2013
132. Szymańska K, Odrozek K, Zniszczoł A, Pudło W, Jarzębski AB. A novel hierarchically structured siliceous packing to boost the performance of rotating bed enzymatic reactors. **Chemical Engineering Journal**, v. 315, p. 18–24, 2017
133. dos Santos LK, Botti RF, Innocentini MD de M, Marques RFC, Colombo P, de Paula AV, et al. 3D printed geopolymer: An efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Chemical Engineering Journal**, v. 414, p. 128843, 2021.
134. An N, Zhou CH, Zhuang XY, Tong DS, Yu WH. Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. **Applied Clay Science**, v. 114, p. 283–296, 2015.
135. dos Santos LK, Botti RF, Innocentini MD de M, Marques RFC, Colombo P, de Paula AV, et al. 3D printed geopolymer: An efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Chemical Engineering Journal**, v. 414, p. 128843, 2021.
136. Mulinari J, Oliveira JV, Hotza D. Lipase immobilization on ceramic supports: An overview on techniques and materials. **Biotechnology Advances**, v. 42, n. June, p. 107581, 2020.
137. Sigurdardóttir SB, Lehmann J, Ovtar S, Grivel JC, Negra M Della, Kaiser A, et al. Enzyme Immobilization on Inorganic Surfaces for Membrane Reactor Applications: Mass Transfer Challenges, Enzyme Leakage and Reuse of Materials. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 360, n. 14, p. 2578–2607, 2018.

138. Ali Z, Tian L, Zhao P, Zhang B, Ali N, Khan M, et al. Immobilization of lipase on mesoporous silica nanoparticles with hierarchical fibrous pore. *J Mol Catal B Enzym* [Internet]. dezembro de 2016;134:129–35. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.10.011>
139. Greco-Duarte J, Cavalcanti-Oliveira ED, Da Silva JAC, Fernandez-Lafuente R, Freire DMG. Two-step enzymatic production of environmentally friendly biolubricants using castor oil: Enzyme selection and product characterization. **Fuel**, v. 202, p. 196–205, 2017.
140. Guidini CZ, Fischer J, Santana LNS, Cardoso VL, Ribeiro EJ. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 2–3, p. 137–143, 2010.
141. Martinelle M, Holmquist M, Hult K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1258, n. 3, p. 272–276, 1995.
142. Botti RF, Innocentini MDM, Faleiros TA, Mello MF, Flumignan DL, Santos LK, et al. Biodiesel Processing Using Sodium and Potassium Geopolymer Powders as Heterogeneous Catalysts. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2839, 2020