

## Artigo

**Biomassa Liofilizada de *Syncephalastrum racemosum* como um Biocatalisador Inovador para Produção de Biodiesel****Durán, N. P.; Takahashi, J. A.;\* Fortes, I. C.P.***Rev. Virtual Quim.*, 2019, 11 (1), 35-49. Data de publicação na Web: 7 de janeiro de 2019<http://rvq.sbj.org.br>**Lyophilized Biomass of *Syncephalastrum racemosum* as an Innovative Biocatalyzer for Biodiesel Production**

**Abstract:** The present work evaluates the production of biodiesel using lyophilized whole cells of the fungus *Syncephalastrum racemosum* in the transesterification reaction, aiming at its use as a catalyst. This study shows that the use of the integral cells of the fungus *S. racemosum* is an up-and-coming alternative to reduce the high costs of the use of purified lipases for this purpose. Some reaction parameters were studied such as reaction time, oil/alcohol molar ratio and amount of catalyst. These parameters were evaluated through factorial design 2<sup>3</sup> and Box-Behnken response surface methodology. These methodologies allowed us to conclude that the best reaction conditions are: room temperature, the water content of the 5 % w/w, the reaction time of 48 h, the oil/alcohol molar ratio of 1:3 and lyophilized biomass of the 0,3g, as biocatalyst. Under these conditions, there was a conversion of 85.5 % (w/w) to esters.

**Keywords:** *Syncephalastrum racemosum*; lyophilized biomass; biodiesel.

**Resumo**

O presente trabalho avalia a produção de biodiesel usando células íntegras liofilizadas do fungo *Syncephalastrum racemosum* na reação de transesterificação, visando o seu uso como catalisador. Este estudo mostra que a utilização das células íntegras do fungo *S. Racemosum* é uma alternativa bastante promissora para diminuir os custos elevados do emprego de lipases purificadas para este fim. Foram estudados alguns parâmetros reacionais que influenciam esta reação ; como tempo de reação, razão molar óleo/álcool e quantidade de catalisador avaliados através do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> e da metodologia de superfície de resposta Box-Behnken Os resultados destas metodologias permitiram concluir que as melhores condições para a realização da reação de transesterificação foram temperatura ambiente, teor de água 5 % (m/m) , tempo de reação 48 h; relação molar 1:3 e 0,3 g da biomassa liofilizada (célula íntegra) como biocatalisador. Nestas condições, houve uma conversão de 85,5 % (m/m).em teor de ésteres.

**Palavras-chave:** *Syncephalastrum racemosum*; biomassa liofilizada; biodiesel.

\* Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Av. Antônio Carlos 6627, Campus Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brasil.

 [jat@qui.ufmg.br](mailto:jat@qui.ufmg.br)

DOI: [10.21577/1984-6835.20190004](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190004)

## Biomassa Liofilizada de *Syncephalastrum racemosum* como um Biocatalisador Inovador para Produção de Biodiesel

**Norma P. Durán, Jacqueline A. Takahashi,\* Isabel C. P. Fortes**

<sup>a</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Av. Antônio Carlos 6627, Campus Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brasil.

\* [jat@qui.ufmg.br](mailto:jat@qui.ufmg.br)

*Recebido em 24 de março de 2018. Aceito para publicação em 16 de dezembro de 2018*

### 1. Introdução

### 2. Material e Métodos

#### 2.1. Reagentes e soluções

#### 2.2. Cultivo do fungo e obtenção da biomassa (biocatalisador)

#### 2.3. Reação de transesterificação

#### 2.4. Monitoramento dos produtos formados na reação de transesterificação

#### 2.5. Análise por cromatografia gasosa

#### 2.6. Planejamento fatorial 2k e metodologia de superfície de resposta (RMS)

#### 2.7. Teor de ésteres em amostra de biodiesel

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Planejamento fatorial 23 e metodologia de superfície de resposta (RMS) Box Behnken

### 4. Conclusões

### 1. Introdução

Atualmente, as reações de biotransformação têm ganhado interesse e estão sendo amplamente usadas em síntese orgânica. Nestas reações, enzimas purificadas ou células íntegras produzidas por micro-organismos produtores de enzimas, ambas na sua forma livre ou imobilizada, são usadas como biocatalisadores, apresentando uma grande diversidade de aplicações na indústria química.<sup>1</sup>

O uso de biocatalisadores (lipases) para produção de biodiesel é uma alternativa promissora para contornar os problemas associados com a rota convencional. Lipases (hidrolases de éster de glicerol, E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres, particularmente triglicerídeos de cadeia longa (TAG), produzindo ácidos graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol.<sup>2</sup>

A aplicação de enzimas isoladas como biocatalisadores na síntese de biodiesel tem alguns obstáculos, tais como baixa

produtividade do biocatalisador (devido à baixa estabilidade e baixa taxa de reação *in vitro*) e o alto custo de purificação das enzimas, o que torna esta rota atualmente inviável para a produção industrial de biodiesel. No entanto, atualmente tem sido estudadas muitas soluções para superar estes inconvenientes.<sup>3,4</sup>

Lipases usadas na produção de biodiesel são obtidas principalmente de fungos (leveduras e fungos filamentosos). Muitas estão disponíveis no mercado e são vendidas por empresas como a *Novozymes*, *Amano*, *Gist Brocades*, entre outros.<sup>5,6</sup> Em geral, existem quatro formas principais de biocatalisadores usados na síntese de biodiesel: lipases imobilizadas, lipases livres e, mais recentemente, células íntegras e sólidos fermentados (preparação enzimática sólida).<sup>1</sup>

O uso de células íntegras consiste no emprego de todo o micro-organismo com suas enzimas, e seu uso como biocatalisadores é uma tecnologia relativamente nova, que oferece vantagens no custo de produção e a simplificação da operação.<sup>5</sup> A célula íntegra produzida pelo micro-organismo não é submetida às etapas de extração, isolamento e purificação, que acontecem normalmente para a produção das enzimas comerciais, o que faz delas um produto de alto custo.<sup>6,7</sup> Biocatalisadores de célula íntegra muito utilizados atualmente são as lipases intracelulares ou extracelulares aderidas à superfície externa da biomassa, produzidas por fungos filamentosos.<sup>8,9</sup>

Os fungos filamentosos são micro-organismos que se alimentam de matéria orgânica já elaborada, absorvem nutrientes simples e solúveis e têm a capacidade de excretar proteínas. Estas características e o aprimoramento das condições de seleção, purificação, preservação e manipulação no cultivo de fungos filamentosos permitem obter biomassa de forma confiável sendo, por conseguinte, uma fonte apropriada para produção de enzimas, que podem ser usadas como biocatalisadores.<sup>10</sup>

A produção de biodiesel catalisada por lipase é influenciada por vários fatores tais

como razão molar óleo/álcool, concentração de enzima, teor de água, temperatura entre outras. Assim, a otimização desses parâmetros torna-se crucial para obter o máximo rendimento. Os métodos estatísticos tais como a metodologia de superfície de resposta (RSM) têm sido amplamente utilizados para otimização da produção de biodiesel catalisada por lipase bem como da otimização das variáveis que mais influenciam esta reação através de ferramentas estatísticas de otimização como a RSM.<sup>11,12</sup> Alguns autores já realizaram estudos utilizando esta ferramenta estatística para estudar a influência de algumas variáveis no processo de produção de biodiesel pela via enzimática. Hoang *et al.* avaliaram as lipases de *Rhizomucor miehei* e *Candida antártica* e as variáveis temperatura, razão molar óleo/álcool, quantidade de enzima e tempo de reação. Luna *et al.* estudaram a produção de biodiesel com enzima de *Rhizopus oryzae* identificando que as variáveis que têm efeito mais significativo são razão molar óleo/álcool, temperatura de reação, conteúdo de água e conteúdo de catalisador. Astete *et al.* reportaram rendimentos na produção de biodiesel de 98,1 %, 98,5 % e 99,3 % em experimentos com lipase de *Mucor miehei*, e concluíram que as variáveis que mais influenciam foram a concentração de enzima, temperatura, conteúdo de água e tempo de reação.<sup>13-19</sup>

O uso de célula íntegra como biocatalisador na produção de biodiesel é uma tecnologia relativamente mais recente. Qin *et al.* usaram a espécie *Rhizopus chinensis* como biocatalisador na transesterificação de óleo de soja com metanol com razão molar 1:3, teor de água 2 % (m/m), temperatura de reação 30 °C, tempo de reação 72 horas e obtiveram rendimento de teor de ésteres de 86 %. Colin *et al.* usaram micélios de *A. niger* para avaliar seu potencial como produtor de lipase intracelular e possível uso como biocatalisador na reação de transesterificação de azeite de oliva com etanol e estudaram as variáveis pH e temperatura, conseguindo o melhor rendimento de 71 %. Ban *et al.* usaram *R. oryzae* como biocatalisador para a reação com óleo de soja e metanol em relação 1:3 a

35 °C, com teor de água de 15 % (m/m), tempo de reação de 70 horas e obtiveram o rendimento de teor de éster de 91,1 %. Tamalampudi *et al.* usaram também *R. oryzae* na transesterificação de óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*) com metanol em relação 1:3, teor de água 5 % (m/m), temperatura de reação 30 °C, tempo de reação 60 horas e obtiveram rendimento de 80 % na formação de ésteres. Hama *et al.* utilizando *R. oryzae* como biocatalisador da reação de óleo de soja com metanol, em adições sucessivas, até razão de 1:4, temperatura ambiente, teor de água 5,2 % (m/m) e tempo de reação de 50 horas, obtiveram um rendimento de 90,9 %. Arumugam *et al.* empregando células de *R. oryzae* na reação de transesterificação de óleo não comestível de *Calophyllum inophyllum* com metanol 1:12, teor de água 15 % v/v, temperatura de reação 35 °C e tempo de reação de 72 horas, obtiveram um rendimento de 87 %.<sup>8,9,20-23</sup>

Com o emprego de ferramentas estatísticas é possível estudar mais parâmetros em conjunto a partir de um número reduzido de experimentos e ter uma melhor compreensão das interações entre variáveis e sua influência na reação. Neste trabalho foi estudada a reação de transesterificação do óleo de soja com uma mistura de álcoois (metílico e ter-butílico, 1:1) utilizando, como biocatalisador, a biomassa liofilizada do fungo filamentoso *S. racemosum*. Foram avaliadas as variáveis que influenciam a reação; razão molar (óleo/álcool), tempo de reação e quantidade de catalisador. Para tanto, foi utilizado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com posterior avaliação estatística (ANOVA e diagrama de Pareto) e a metodologia de superfície de resposta Box-Behnken.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico, das marcas DIFCO, HIMEDIA, Synth e Biobrás para a preparação dos meios

de cultura. Para a cromatografia líquida e gasosa foram usados solventes e padrões da marca Sigma-Aldrich de grau cromatográfico. Para o cultivo dos fungos utilizaram-se meio de cultura líquido com a seguinte composição: Caldo de batata dextrosado (24 g L<sup>-1</sup>), Peptona bacteriológica (5,0 g L<sup>-1</sup>), NaNO<sub>3</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5 g L<sup>-1</sup>).<sup>24</sup> Para a reação de transesterificação foram utilizados álcool metílico Synth, álcool ter-butílico Vetec ambos grau analítico e o óleo de soja foi adquirido no comércio local.

### 2.2. Cultivo do fungo e obtenção da biomassa (biocatalisador)

O fungo *S. racemosum*, depositado na coleção de fungos do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química da UFMG, foi cultivado por um período de 7 dias em tubos de ensaio contendo meio de cultura sólido do tipo ágar batata de concentração 39 g/L. Os esporos foram extraídos com 10 mL de água destilada esterilizada. Uma suspensão 5x10<sup>3</sup> esporos mL<sup>-1</sup> dos esporos do fungo, padronizada em câmara de Neubauer, foi vertida em erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura (caldo batata dextrosado e nutrientes). O desenvolvimento do fungo (formação de biomassa) aconteceu por 10 dias consecutivos em shaker (Incubadora de Bancada CT-712 CIENTEC). A biomassa formada foi liofilizada (Liofilizador LIOBRAS K105) e este material foi utilizado como biocatalisador.

### 2.3. Reação de transesterificação

A reação de transesterificação foi realizada com óleo de soja comercial adicionado de uma mistura de álcoois (metanol/álcool ter-butílico 1:1) e como catalisador, foi utilizada a biomassa liofilizada do fungo *S. racemosum*. O álcool t-butílico é adicionado ao meio reacional para aumentar a solubilidade do álcool com o óleo e assim permitir a transesterificação enzimática evitando a

desativação da lipase e melhorando sua atividade. As reações de transesterificação foram realizadas à temperatura ambiente sob agitação.

#### 2.4. Monitoramento dos produtos formados na reação de transesterificação

Os perfis cromatográficos foram obtidos em cromatógrafo líquido da marca SHIMADZU, modelo LC- 20AT, com sistema de gradiente binário e detector de UV/VIS, modelo SPD – 20 A, à temperatura de 40 °C. Foi utilizada uma coluna ODS HYPERSIL de dimensão 250 mm x 46 mm. As amostras foram diluídas em metanol para perfazerem uma solução de concentração 1 % (v/v). Uma alíquota de 20  $\mu$ L das amostras foi injetada. Como fase móvel foram utilizados os seguintes solventes: metanol, 2- propanol e hexano. No reservatório A foi adicionado metanol e no reservatório B uma solução contendo 2-propanol e hexano em uma proporção de 5:4 (v/v). Foi empregado um gradiente linear de 100 % de A para 50 % de A e 50 % de B em 15 minutos. A eluição foi feita isocraticamente com 100 % de B, por mais 5 minutos, totalizando um tempo de análise de 20 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min. O comprimento de onda de detecção utilizado foi o  $\lambda$  = 205 nm. Para tratamento dos dados foi utilizado o software LC Solution da Shimadzu.<sup>25</sup>

#### 2.5. Análise por cromatografia gasosa

A determinação de teor de ésteres foi realizada conforme a norma vigente da ANP (Agência Nacional de Petróleo, gás e biocombustíveis, ISO 14103). Foi utilizado em cromatógrafo a gás, modelo GC-2010-Shimadzu, equipado com detector de ionização de chama (FID), auto-injetor e sistema computacional com software GCSolution para análise de dados. Uma

alíquota de 0,1  $\mu$ L foi injetada, no modo *split*, com uma razão de divisão de (1:50). O gás de arraste utilizado foi hidrogênio a um fluxo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor e temperatura do detector utilizadas foram 255 °C, 260 °C, respectivamente. A programação do forno usada foi: isoterma a 60 °C por minuto, em seguida a temperatura foi aumentada a uma taxa de 10 °C. min<sup>-1</sup> até 200 °C e depois 250 °C a uma taxa de 5 °C.min<sup>-1</sup>. A temperatura final foi mantida por 15 minutos.

#### 2.6. Planejamento fatorial 2<sup>K</sup> e metodologia de superfície de resposta (RSM)

O planejamento fatorial 2<sup>K</sup> permite reduzir o número de experimentos necessários para a otimização de um processo. Os resultados deste planejamento são avaliados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA), diagrama de Pareto e gráfico de contorno. A partir destes dados é possível se determinar os fatores significativos para a variável de resposta e selecionar uma metodologia de superfícies de respostas como desenho de composto central (CCD), desenho Doehlert ou desenho Box-Behnken. Estas metodologias de superfícies de respostas podem ser executadas para a otimização do experimento visando a obtenção de valores dos fatores estudados que irão produzir uma melhor resposta desejada.<sup>26,27</sup> Após estudos preliminares das diversas variáveis que afetam a reação de transesterificação de óleo na presença de biocatalisadores (biomassa liofilizada do fungo *S. racemosum*), foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. Este planejamento foi executado com o intuito de analisar como os parâmetros tempo de reação, relação molar óleo/álcool e quantidade do catalisador influenciam a variável de resposta formação de ésteres. Os níveis para os três parâmetros escolhidos foram baseados em relatos já apresentados na literatura e em experimentos preliminares.<sup>20-23</sup>

**Tabela 1.** Planejamento 2<sup>3</sup>. Níveis máximos e mínimos dos parâmetros avaliados para a realização dos experimentos

Fatores	Níveis	
	-1	+1
Tempo (h)	24	72
Relação molar	1:3	1:9
Massa catalisador (g)	0,1	0,5

Com os resultados obtidos e visando melhorar o resultado da variável porcentagem de área de éster (%A), foi empregado um desenho Box-Behnken. Para o estudo foram utilizados os seguintes valores mínimos e máximos para os parâmetros estudados (Tabela 2). Foi utilizado para a construção da

superfície de resposta o mesmo critério anteriormente utilizado para o planejamento fatorial.

A análise dos resultados foi realizada com o software Statistica 8.0.

**Tabela 2.** Desenho de Box-Behnken: Níveis dos parâmetros avaliados para o desenho da superfície de resposta

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Tempo (h)	24	48	72
Relação molar	1:3	1:6	1:9
Massa catalisador (g)	0,1	0,5	0,8

## 2.7. Teor de ésteres em amostra de biodiesel

A partir dos dados de condições otimizadas para a produção de biodiesel, obtidos do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> associado à metodologia de superfície de resposta, foram realizados experimentos utilizando as seguintes condições: 0,880 g de óleo, relação molar óleo álcool 1:6, massa do biocatalisador 0,300 g, tempo de reação de 48 h e teor de água de 5 % (m/m). Os produtos da reação então foram separados: glicerol e biodiesel. O biodiesel foi lavado com água para retirada dos possíveis resíduos de glicerol e foi posteriormente separado. O material final foi

extraído com dietil éter. O solvente em excesso foi evaporado com nitrogênio gasoso e o biodiesel purificado foi analisado por cromatografia gasosa.

Para a avaliação dos resultados obtidos foram levados em consideração vários parâmetros estatísticos como análise de variância ANOVA, diagrama de Pareto, gráfico de contorno e gráficos de superfície de resposta.

## 3. Resultados e Discussão

Diferentemente dos trabalhos anteriormente citados, em que foram utilizadas enzimas puras e isoladas, neste

estudo foi utilizada a biomassa liofilizada da célula íntegra do fungo *S. racemosum* como biocatalisador da reação de transesterificação.<sup>13-19</sup> A reação foi monitorada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para avaliação das variáveis tempo de reação, relação molar óleo/álcool e a quantidade de biocatalisador foi utilizado um planejamento factorial 2<sup>3</sup> (Tabela 3).

A Tabela 3 demonstra que as variáveis relação molar(óleo/álcool) e massa de catalisador são as mais significativas para o

aumento do teor de éster. Neste caso, a melhor resposta é obtida com a menor relação molar e maior quantidade de biocatalisador. A variável tempo não afeta tanto o resultado. Para um tempo bem maior (72h) a variação em teor de éster não é muito representativa. Por outro lado, para a relação molar 1:9 há uma redução drástica do teor de ésteres presente, ou seja, a reação de transesterificação ocorre em menor extensão, independentemente do tempo de reação e da quantidade de massa de catalisador. O excesso de álcool no meio diminui o potencial do biocatalisador atuar

**Tabela 3.** Planejamento factorial 2<sup>3</sup> para os parâmetros tempo de reação, relação molar (óleo/álcool) e massa de catalisador e os resultados obtidos para a área de éster percentual

Tempo de reação (h)	Relação molar (óleo/álcool)	Massa do catalisador (g)	% Área de éster
1	1	1	9
-1	1	1	4
1	-1	1	94
-1	-1	1	89
1	1	-1	53
-1	1	-1	60
1	-1	-1	70
-1	-1	-1	84

Fatores	Níveis	
	-	+
Tempo (h)	24	72
Relação molar	1:3	1:9
Massa catalisador (g)	0,1	0,5

**Tabela 4.** ANOVA do Planejamento fatorial 2<sup>3</sup>

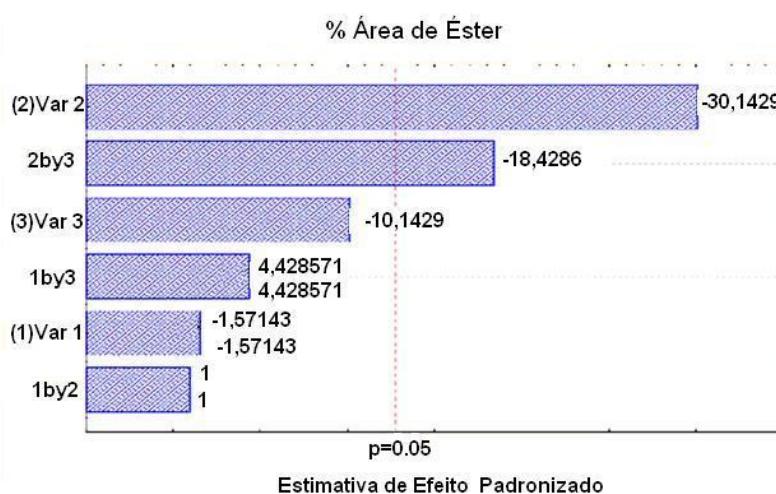
Fator	SS	df	MS	F	p
1 Tempo	15,125	1	15,125	2,4694	0,360791
2 Relação molar	5565,125	1	5565,125	908,5918	0,021112
3 Massa do catalisador	630,125	1	630,125	102,8776	0,062563
1*2	6,125	1	6,125	1,0000	0,500000
1*3	120,125	1	120,125	19,6122	0,141382
2*3	2080,125	1	2080,125	339,6122	0,034511
Erro	6,125	1	6,125		
Total SS	8422,875	7	8422,875		

R<sup>2</sup>: 0,99927; Adj:0,99491

SS: Soma de quadrados, df: graus de liberdade, MS: média quadrática.

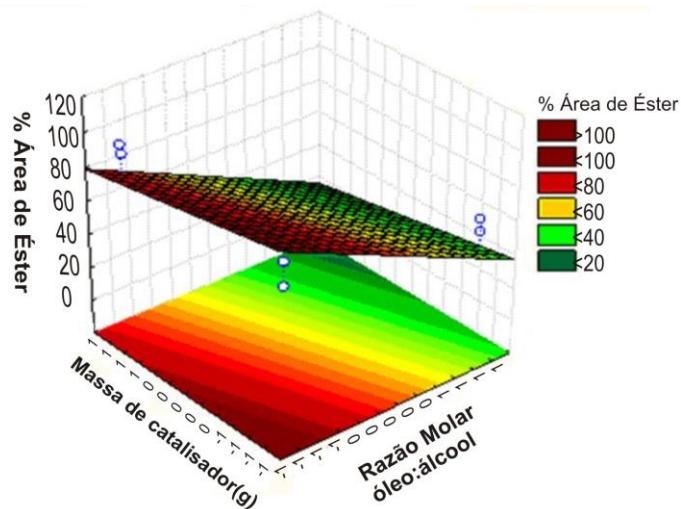
A Tabela 4 mostra os dados obtidos pelo planejamento fatorial 2<sup>3</sup> tratados estatisticamente por ANOVA. Os resultados apresentados nesta tabela corroboram os anteriormente apresentados para o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>: A análise de variância do planejamento fatorial executado mostra que a variável relação molar óleo/álcool foi a mais significativa com *p* valor de 0,021112, menor do que 0,05, que é considerado o valor crítico da análise. Os

resultados indicam que há uma interação significativa com *p* valor de 0,034511, entre as variáveis relação molar óleo/álcool e massa do catalisador. Esses dois resultados podem ser melhor evidenciados no diagrama de Pareto (Figura 1), onde a linha limítrofe, que separa valor crítico de 0,05 é ultrapassada para a variável 2 (relação molar óleo/álcool) e pela interação entre as variáveis 2 e 3 (relação molar e massa do catalisador).

**Figura 1.** Diagrama de pareto de efeitos padronizados do planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. MS Residual: 6,125

A Figura 2 apresenta o gráfico de contorno relativo à superfície de resposta para o planejamento  $2^3$  realizado. Esta superfície mostra que os melhores rendimentos acontecem para valores mais baixos para as variáveis estudadas (região vermelha). Isso

demonstra uma alta correlação entre estas variáveis, quantidade do catalisador e relação molar óleo/álcool. Para valores baixos de massa de catalisador (0.1), necessita-se de uma relação molar mais baixa (1:3) também.



**Figura 2.** Superfície de resposta do planejamento fatorial  $2^3$  para as variáveis relação molar, quantidade de catalisador em função da variável resposta percentagem em área de ésteres.

MS Residual: 553,125

A Tabela 5 apresenta os dados utilizados para a construção da superfície de resposta Box-Behnken, visando otimizar as condições experimentais para a melhor conversão em teor de ésteres. A superfície de resposta de Box-Behnken, diferentemente do planejamento fatorial trabalha com um ponto central para melhor combinação das três variáveis estudadas. De acordo, com a Tabela 5 os maiores rendimentos em teor de éster

surgem quando temos a menor relação molar (óleo/ álcool; 1:3) resultado análogo ao planejamento fatorial  $2^3$ . No entanto, o tempo de reação aqui fica maior (48 h ), pois neste caso temos um ponto central que não existia no planejamento fatorial. A massa de catalisador parece não afetar os melhores rendimentos. Vale ressaltar que na metodologia de superfície a combinação (-1, -1, 1) não foi contemplada

**Tabela 5.** Dados dos parâmetros (tempo de reação, relação molar, massa de catalisador e % de área de éster) para a construção do Desenho Box-Behnken

Tempo de reação (h)	Relação molar óleo/álcool	Massa do catalisador (g)	% Área de éster
-1	1	0	0,02
-1	-1	0	0,35
-1	0	1	0,6
-1	0	-1	59,1
0	1	-1	63,6
0	1	1	80,2
0	0	0	74,7
0	0	0	81,6
0	0	0	77,5
0	-1	-1	96,4
0	-1	1	95,0
1	1	0	92,5
1	0	-1	89,7
1	0	1	88,7
1	-1	0	87,7

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Tempo (h)	24	48	72
Relação molar	1:3	1:6	1:9
Massa catalisador (g)	0,1	0,3	0,5

Para avaliar as significâncias das variáveis estudadas, os dados da Tabela 5 foram tratados estatisticamente pela ANOVA e geraram a Tabela 6. De acordo com esta tabela a variável tempo de reação é a mais significativa. Ela apresenta  $p$  valor de 0,001785 e 0,025698 no modelo linear e no modelo quadrático respectivamente, ambos

menores do que 0,05, que é o valor crítico da análise.

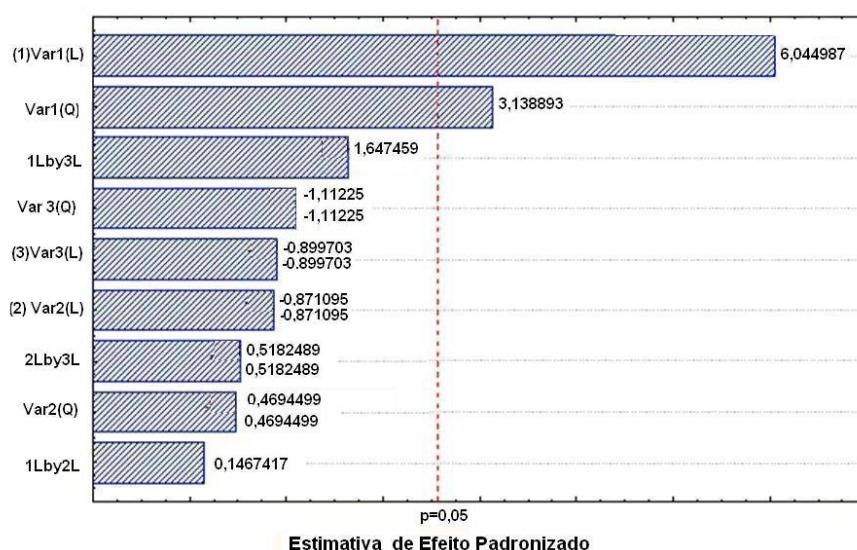
Esses resultados são corroborados pelo gráfico de Pareto da Figura 3, que mostra essa variável ultrapassando a linha vermelha do valor crítico de 0,05.

**Tabela 6.** ANOVA do desenho Box Behnken

Fator	SS	df	MS	F	p
1 Tempo (L)	11143,23	1	11143,23	36,54186	0,001785
1 Tempo (Q)	3004,51	1	3004,51	9,85265	0,025698
2 Relação molar (L)	231,39	1	231,39	0,75881	0,423546
2 Relação molar (Q)	67,20	1	67,20	0,22038	0,658507
3 Massa do catalisador (L)	246,84	1	246,84	0,80947	0,409515
3 Massa do catalisador (Q)	377,25	1	377,25	1,23710	0,316628
1*2	6,57	1	6,57	0,02153	0,889069
1*3	827,66	1	827,66	2,71412	0,160380
2*3	81,90	1	81,90	0,26858	0,626393
Erro	1524,72	5	304,94		
Total SS	17661,46	14			

$R^2$ : 0,91367; Adj:0,75827

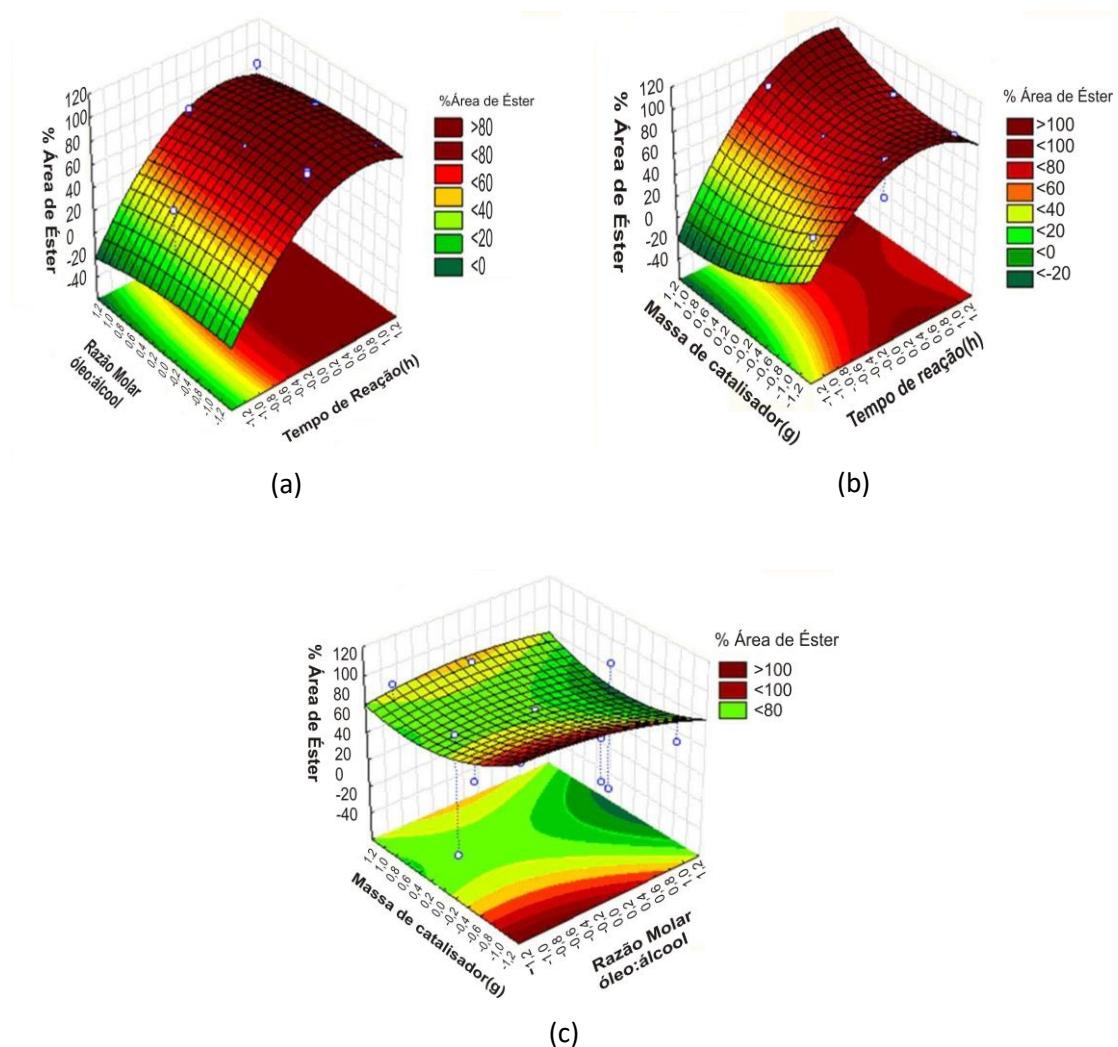
SS: Soma de quadrados, df: graus de liberdade, MS: média quadrática.



**Figura 3.** Diagrama de Pareto de efeitos padronizados do desenho Box Behnken. 3 fatores 3 níveis, 1 bloco, 15 corridas; MS Residual: 304,9442

Para avaliar a interação entre as variáveis foram construídas as superfícies de respostas do desenho Box Behnken a partir dos dados da Tabela 5. As Figura 4a, 4b e 4c apresentam

estas superfícies. Elas demonstram as interações duas a duas das variáveis estudadas com relação a resposta de porcentagem em área de éster (% A).



**Figura 4.** Superfícies de resposta do desenho Box Behnken para as variáveis estudada em função da variável resposta percentagem em área de ésteres. (a) tempo de reação e relação molar óleo/álcool; (b), tempo de reação e quantidade do catalisador (c) relação molar óleo/álcool e quantidade do catalisador. 3 fatores 3 níveis, 1 bloco, 15 corridas; MS Residual: 304,9442.

Comparando as três curvas geradas podemos observar que há uma correlação entre as variáveis estudadas. A Figura 4a demonstra que há um aumento do rendimento a medida que aumentamos o tempo de reação e quando empregamos uma relação molar óleo/álcool menor. Sendo que a curva apresenta seu máximo para um tempo de reação de 48 horas e a razão molar óleo/álcool 1:3. A medida que aumentamos a relação molar há um decréscimo na extensão em que ocorre a reação. Isto significa que uma quantidade muito grande de álcool no meio inibe o funcionamento do biocatalisador. Para Figura 4b observa-se que para maiores

tempos de reação há também um crescimento da variável resposta porcentagem área de éster, sendo que esta variável se torna mais significativa para tempos maiores do que 48h, que é o ponto central. No entanto, a variável quantidade de biocatalisador atua no sentido inverso, tendo melhores resultados para concentrações mais baixas. Ou seja, a formação de ésteres aumenta diretamente com o tempo de reação e inversamente as outras duas variáveis relação molar óleo/álcool e quantidade de biocatalisador.

A Figura 4c mostra que há uma correlação direta entre as variáveis quantidade do

catalisador e relação molar e, para os níveis baixos de cada uma delas, a variável de resposta porcentagem de área de éster aumenta e vice-versa.

O uso de célula íntegra como biocatalisador na produção de biodiesel é uma tecnologia relativamente mais recente. As espécies de *Rhizopus sp* e *Aspergillus sp*, produtoras de lipase intracelular, são atualmente as mais empregadas e há diversos trabalhos publicados nesta área. Experimentos realizados utilizando outras espécies também são reportados, como *Rhizopus chinensis*, *A. Niger*, *R. Oryzae*, em condições em que as variáveis empregadas variaram: temperatura de reação: 30-35 °C, teor de água 2 a 15 % (m/m), tempo de reação 60-72 h, relação óleo/álcool 1:3-1:12. Os rendimentos em teor de ésteres variaram entre 80-91,1 % (m/m).<sup>28-30</sup>

No experimento realizado utilizando as condições otimizadas pela metodologia de superfície resposta Box Behnken: temperatura ambiente, teor de água 5 % (m/m), tempo de reação 48 h; relação molar 1:3 e 0,3 g da biomassa liofilizada (célula íntegra) como biocatalisador. O rendimento da reação de transesterificação encontrado foi de 85,5 % (m/m).

#### 4. Conclusões

A biomassa liofilizada de *S. racemosum* mostrou ser um promissor biocatalisador para a produção de biodiesel por rota enzimática. Através da metodologia de superfície de resposta foi possível determinar que a variável tempo de reação foi mais significativa do que as variáveis quantidade de biocatalisador e razão molar óleo/álcool. Com relação à quantidade de biocatalisador que variou entre 0,1 a 0,8 g, todos os resultados mostraram uma boa eficiência do uso de células íntegras para a reação de transesterificação. Nos três níveis investigados, a variável resposta % área de éster variou até um valor máximo de 96,4%. Para o experimento realizados com as variáveis otimizadas o tempo de reação é

menor (48 h) quando comparado com os outros da literatura (60-72h) e o rendimento está na mesma ordem de grandeza. Além disso, a quantidade de biomassa utilizada foi bastante pequena. Estes resultados parecem bastante promissores quando comparado com outros relatados na literatura utilizando células íntegras de outras espécies. Vale ressaltar o potencial inovador de células íntegras liofilizadas de *S. racemosum* para a produção de biodiesel, uma vez que este tipo de processo não é tão oneroso quanto a utilização de enzimas purificadas, porém mantém as vantagens da síntese enzimática.

#### Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Corteza, D. V.; De Castro, H. F.; Andrade, G. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. *Química Nova* **2017**, *40*, 85. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>2</sup> Luna, D.; Calero, J.; Sancho, E. D.; Luna, C.; Posadillo, A.; Bautista, F. M.; Romero, A. A.; Berbel, J.; Verdugo, C. Technological challenges for the production of biodiesel in arid lands. *Journal of Arid Environments* **2014**, *102*, 138. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>3</sup> Gog, A.; Roman, M.; Tosa, M.; Paizs, C.; Irimie, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification – current state and perspectives. *Renewable Energy* **2012**, *39*, 10. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>4</sup> Pourzolfaghar, H.; Abnisa, F.; Daud, W. M. A. W.; Aroua, M. K. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2016**, *61*, 245. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>5</sup> Yan, Y.; Li, X.; Wang, G.; Gui, X.; Li, G.; Su, F. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: a review. *Applied Energy* **2014**, *113*, 1614. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>6</sup> Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* **2001**, *19*, 627. [\[CrossRef\]](#)

- <sup>7</sup> Athalye, S.; Sharma-Shivappa, R.; Peretti, S.; Kolar, P.; Davis, Jack P. D. Producing biodiesel from cottonseed oil using *Rhizopus oryzae* ATCC #34612 whole cell biocatalysts: Culture media and cultivation period optimization. *Energy for Sustainable Development* **2013**, *17*, 331. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>8</sup> Qin, H.; Yan, X.; Yun, T.; Dong, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. *Chinese Journal of Catalysis* **2008**, *29*, 41. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>9</sup> Colin, V. L.; Baigori, M. D.; Pera, L. M. Mycelium-bound lipase production from *Aspergillus niger* MYA 135, and its potential applications for the transesterification of ethanol. *Journal of Basic Microbiology* **2011**, *51*, 236. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>10</sup> Vera, M. Genetic engineering of filamentous fungi, Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances* **2008**, *26*, 177. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>11</sup> Verdugo, C.; Luna, D.; Posadillo, A.; Sancho, E. D.; Rodriguez, S.; Bautista, F.; Luque, R.; Marinas, J. M.; Romero, A. A. Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. *Catalysis Today* **2011**, *167*, 107. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>12</sup> Luna, C.; Verdugo, C.; Sancho, E. D.; Luna, D.; Calero, J.; Posadillo, A.; Bautista, F. M.; Romero, A. A. A Biofuel Similar to Biodiesel Obtained by Using a Lipase from *Rhizopus oryzae*, Optimized by Response Surface Methodology. *Energies* **2014**, *7*, 3383. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>13</sup> Wei, L.; Wei, D.; Dehua, L. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2007**, *45*, 122. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>14</sup> Chen, H. C.; Ju, H. Y.; Wu, T. T.; Liu, Y. C.; Lee, C. C.; Chang, C.; Chung, Y. L.; Shieh, C. J. Continuous Production of Lipase-Catalyzed Biodiesel in a Packed-Bed Reactor: Optimization and Enzyme Reuse Study. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**, *2011*, 1. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>15</sup> Halim, S. F.; Kamaruddin, A. H.; Fernando, W. J. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response Surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresource Technology* **2009**, *100*, 710. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>16</sup> Zhang, L.; Zheng, S.; Wang, Y.; Lin, Y.; Jin, Z.; Han, S. Combined utilization of lipase-displaying *Pichia pastoris* whole-cell biocatalysts to improve biodiesel production in co-solvent media. *Bioresource Technology* **2013**, *130*, 102. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>17</sup> Nde, D. B.; Astete, C.; Boldor, D. ESolvent-free, enzyme-catalyzed biodiesel production from mango, neem, and shea oils via response surface methodology. *AMB Express* **2015**, *5*, 83. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>18</sup> Nguyen, H. C.; Liang, S.; Doan, T. T.; Su, C.; Yang, P. Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel from black soldier fly (*Hermetica illucens*): Optimization by using response surface methodology. *Energy Conversion and Management* **2017**, *145*, 335. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>19</sup> Chang, C.; Chen, J. H.; Chang, C. M. J.; Wu, T. T.; Shieh, C. J. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by isopropanolysis in a continuous packed-bed reactor using response surface methodology. *New Biotechnology* **2009**, *26*, 187. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>20</sup> Ban, K.; Kaieda, M.; Matsumoto, T.; Kondo, A.; Fukuda, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal* **2001**, *8*, 39. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>21</sup> Tamalampudi, S.; Talukder, M. R.; Hama, S.; Numata, T.; Kondo, A.; Fukuda, H. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: a comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal* **2008**, *39*, 185. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>22</sup> Hama, S.; Yamaji, H.; Fukumizo, T.; Numata, T.; Tamalampudi, S.; Kondo, A. Biodiesel fuel production in a packed- bed reactor using

- lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal* **2007**, 34, 273. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>23</sup> Arumugam, A.; Ponnusami, V. Biodiesel production from *Calophyllum inophyllum* oil using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within reticulated foams. *Renewable Energy* **2014**, 64, 276. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>24</sup> Oliveira, M. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2009. [\[Link\]](#)
- <sup>25</sup> Holcapek, M.; Jandera, P.; Fisher, J.; Prokes, B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by highperformance liquid chromatography with various detection methods. *Journal of Chromatography A* **1999**, 858, 13. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>26</sup> Myers, R.; Montgomery, D.; Cook, C. A.; *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, 4a. ed., Wiley: New York, 2009.
- <sup>27</sup> Teófilo, R. F.; *Métodos Quimiométricos: Uma visão geral. Conceitos Básicos de Quimiometria*, 1a. ed., UFV: Viçosa, 2013.
- <sup>28</sup> Amini, Z.; Ilham, Z.; Ong, H.; Mazaheri, H.; Wei-Hsin Chen, W. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. *Energy Conversion and Management* **2017**, 141, 339. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>29</sup> Qin, H.; Yan, X.; Yun, T.; Dong, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. *Chinese Journal of Catalysis* **2008**, 29, 41. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>30</sup> Adachi, D.; Hama, S.; Numata, T.; Nakashima, K.; Ogino, C.; Fukuda, H.; Kondo, A. Development of an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst coexpressing triglyceride and partial glyceride lipases for biodiesel production. *Bioresource Technology* **2011**, 102, 6723. [\[CrossRef\]](#)