



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Kelly Cristina Nascimento Rodrigues Pedro

**Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo de soja ácido
por via enzimática**

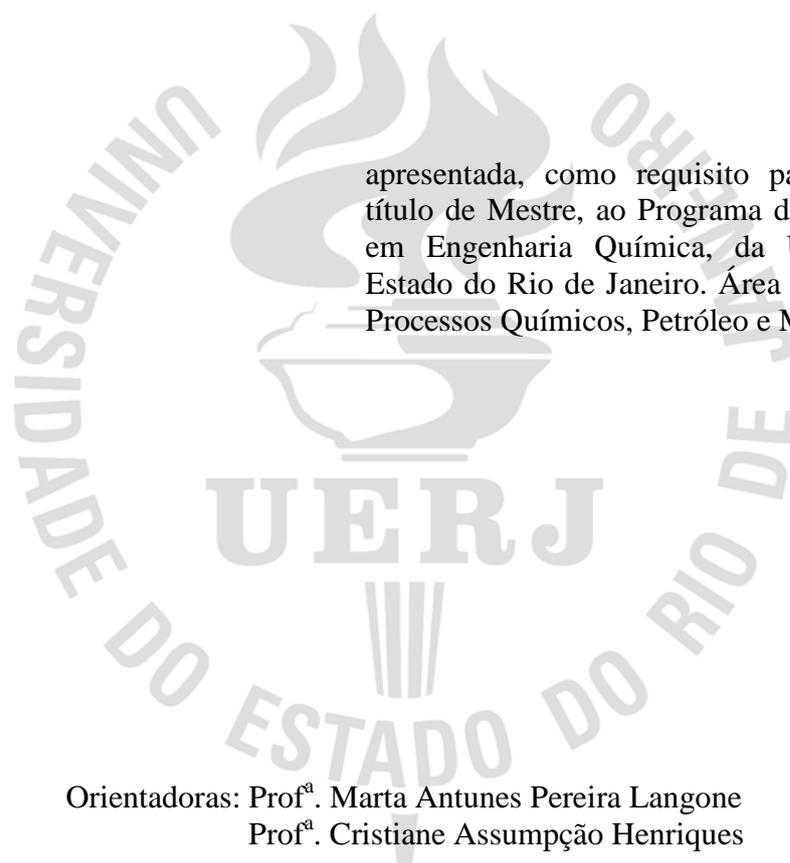
Rio de Janeiro

2013

Kelly Cristina Nascimento Rodrigues Pedro

Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo de soja ácido por via enzimática

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente



Orientadoras: Prof^a. Marta Antunes Pereira Langone
Prof^a. Cristiane Assumpção Henriques

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

P372 Pedro, Kelly Cristina Nascimento Rodrigues.
Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo de soja de ácido por via enzimática. / Kelly Cristina Nascimento Rodrigues Pedro. - 2013.
134 f.

Orientador: Marta Antunes Pereira Langone.
Orientador: Cristiane Assumpção Henriques.
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Biodiesel - Teses. 2. Lipase – Teses. 3. Transesterificação – Teses. 4. Esterificação (Química) – Teses. 5. Óleo ácido – Teses. I. Langone, Marta Antunes Pereira. II. Henriques, Cristiane Assumpção. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 662.756.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Kelly Cristina Nascimento Rodrigues Pedro

Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo de soja ácido por via enzimática

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Processos Químicos, Petróleo e Meio Ambiente.

Aprovado em 14 de Agosto de 2013.

Banca Examinadora :

Prof^ª. Dr.^a Marta Antunes Pereira Langone (Orientadora)

Instituto de Química - UERJ

Prof^ª. Dr.^a Cristiane Assumpção Henriques (Orientadora)

Instituto de Química – UERJ

Dr.^a. Aline Machado de Castro

CENPES - PETROBRAS

Prof^ª. Dr.^a Fátima Maria Zanon Zotin

Instituto de Química - UERJ

Dr. Marcio Figueiredo Portilho

CENPES - PETROBRAS

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

As mulheres da minha vida: minha mãe, Célia Maria Nascimento dos Santos, pelo amor e dedicação incondicionais e minha avó Laurita Maria do Nascimento, que não se encontra mais presente entre nós, sempre me incentivou a não desistir dos meus sonhos. Um exemplo de vida, dedicação e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tudo que tem feito em minha vida, pelo amor incondicional e amparo nos momentos de tristeza.

A minha mãe Célia Maria, pelo amor, carinho, compreensão, incentivo e apoio incondicional durante toda a jornada.

Ao meu irmão Kleber que mesmo sem entender o que acontecia sempre me apoiou e incentivou.

Ao meu namorado Diego, pelo carinho, compreensão, paciência e amor a mim dedicados, um verdadeiro companheiro.

As minhas orientadoras, Marta Antunes Pereira Langone e Cristiane Assumpção Henriques, pela paciência, carinho e compreensão, verdadeiros exemplos de competência e experiência, sempre me encorajaram e incentivaram ao longo de todas as etapas do trabalho, desde as aulas até a orientação, meu muito obrigado.

Aos meus familiares, que sempre me incentivaram, compreenderam a minha ausência em várias situações. Obrigado por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus amigos da época da graduação Bruno Gabriel, Fábio, Ivone e Marcos pelo incentivo e pelas palavras amigas em todos os momentos. Obrigada pela amizade.

A minha nova amiga Camila, pelas palavras encorajadoras e atenção. Muito obrigada pela sua amizade.

Aos meus novos amigos da UERJ, Deivisson e Ricardo pelo apoio e amizade.

Ao secretário da Pós Graduação Marco Antonio da Rocha Coelho pela atenção, incentivo e amizade.

Aos estagiários do LTE, Danielle, Douglas e Juliana pela ajuda no desenvolvimento da parte experimental, por proporcionarem um ambiente de trabalho alegre e descontraído, pelo apoio e palavras encorajadoras nos momentos de angústia, meu muito obrigado.

Ao técnico do LTE, Otávio, pelo suporte prestado na parte experimental e pelas palavras incentivadoras.

A aluna de mestrado do LTE, Anna Carolina pelo apoio e palavras de incentivo.

A Suzana Lorena pela ajuda e partilha do conhecimento na etapa inicial da parte experimental deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da UERJ pelo apoio e disseminação do conhecimento.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

E a todos que não foram citados nominalmente, mas que de forma direta ou indireta contribuíram para a elaboração deste trabalho, obrigada.

Você ganha força, coragem e confiança em toda experiência que você encara o seu medo.

Você deve fazer aquilo que pensa que não pode fazer.

Eleanor Roosevelt.

RESUMO

PEDRO, Kelly Cristina Nascimento Rodrigues. *Produção de Biodiesel a partir da transesterificação de óleo de soja ácido por via enzimática*, 2013. 134 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Neste trabalho, foi estudada a transesterificação enzimática do óleo de soja com álcool catalisada por lipase comercial imobilizada. Inicialmente foram investigados os efeitos da temperatura, do tipo de enzima (Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM) e do tipo de álcool (etanol ou butanol) na síntese de biodiesel utilizando óleo de soja refinado. A melhor temperatura observada para as reações empregando Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM foi de 50°C, enquanto que para a Novozym 435, a temperatura ótima foi de 70°C. O maior teor em biodiesel (~60%) foi obtido na etanólise do óleo de soja a 70°C utilizando Novozym 435 a 5% m/m. Também foi avaliada a síntese de biodiesel por via enzimática a partir da etanólise de óleos ácidos com índice de acidez (IA) (de 8,5, 54,4 e 93,7). A conversão do ácido graxo livre foi superior a 90% nas reações conduzidas com Novozym 435 nas reações com os três óleos ácidos testados. O teor em biodiesel foi próximo a 50% na etanólise do óleo de soja com índice de acidez de 8,5 empregando Lipozyme TL IM, porém para índices de acidez maiores este rendimento diminuiu. Para as reações conduzidas com Lipozyme RM-IM, o teor em biodiesel manteve-se em torno de 30% para todos os óleos ácidos investigados. A etanólise do óleo de soja refinado empregando reator de leito fixo em modo contínuo, a 50°C, foi investigada variando a velocidade espacial dos reagentes (0,255 e 0,508 h⁻¹), o tipo de lipase (Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM) e a possibilidade de reuso do biocatalisador após lavagem com butanol. Na reação com Novozym 435, o teor em biodiesel foi de aproximadamente 50% e se manteve estável durante 4,5 h para as duas velocidades espaciais testadas. A lipase Lipozyme TL-IM apresentou teor em biodiesel maior do que o obtido nas reações com os outros biocatalisadores (~80%), porém não apresentou a mesma estabilidade. Foi observada uma queda significativa na produção de biodiesel nas reações empregando o reuso do biocatalisador.

Palavras-chave: Biodiesel. Lipase. Óleo ácido. Esterificação. Transesterificação.

ABSTRACT

PEDRO, Kelly Cristina Nascimento Rodrigues. *Biodiesel production from the transesterification of acid soybean oil by enzymatic route*, 2013. 134 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

In this work, the enzymatic transesterification of soybean oil with alcohol catalyzed by commercial immobilized lipase was studied. Initially the effects of temperature, type of enzyme (Novozym 435, Lipozyme RM-IM and Lipozyme TL-IM) and the type of alcohol (ethanol or butanol) in the synthesis of biodiesel using refined soybean oil were investigated. The best temperature observed for reactions employed Lipozyme TL-IM and Lipozyme RM-IM was 50°C, while that for Novozym 435, the optimal temperature was 70°C. The major biodiesel content (~60%) was obtained in the ethanolysis of soybean oil at 70°C using 5% (w/w) of Novozym 435. It was also evaluated the enzymatic synthesis of biodiesel from the ethanolysis of acid oils with acidity index (AI) (8,5, 54,4 and 93,7). The conversion of free fatty acid was higher than 90% in reactions conducted with Novozym 435 in reactions with the three acid oils tested. The biodiesel content was close to 50% in ethanolysis of soybean oil with acidity index of 8,5 employing Lipozyme TL-IM, however for higher acidity indexes this yield decreased. For the reactions conducted with Lipozyme RM-IM, the biodiesel content remained around 30% for all acid oils investigated. The ethanolysis of refined soybean oil employing fixed bed reactor in continuous mode at 50°C was investigated by varying the space velocity of reagents (0,255 and 0,508 h⁻¹), the type of lipase (Novozym 435, Lipozyme RM-IM and Lipozyme TL-IM) and the possibility of reuse of the biocatalyst after washing with butanol. In the reaction with Novozym 435, the biodiesel content was approximately 50% and remained stable during 4,5 h for the two space velocity tested. The lipase Lipozyme TL-IM presented biodiesel content higher than that obtained in reactions with other biocatalysts (~80 %), but did not show the same stability. It was observed a significant decrease in the biodiesel production in the reactions employing reuse of the biocatalyst.

Keywords: Biodiesel. Lipases. Acid Oil. Esterification. Transesterification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Produção brasileira de biodiesel em m ³	25
Figura 2-	Participação Regional na produção de biodiesel (%) – janeiro a fevereiro de 2013.....	26
Figura 3-	Participação das matérias-primas na produção de biodiesel.....	27
Figura 4-	Reação de esterificação.....	34
Figura 5-	Reação de transesterificação, onde R1, R2 e R3 são cadeias longas de hidrocarboneto e R' é uma cadeia de hidrocarboneto de um álcool simples (etanol ou metanol).....	35
Figura 6-	Etapas das reações de transesterificação de triacilglicerol.....	35
Figura 7-	Mecanismo da transesterificação catalisada por base.....	37
Figura 8-	Reação de hidrólise: saponificação.....	38
Figura 9-	Processo de produção de biodiesel.....	39
Figura 10-	Mecanismo de transesterificação catalisada por ácido.....	42
Figura 11-	Atuação da lipase sobre o triacilglicerol.....	49
Figura 12-	Representação esquemática das reações catalisadas por lipases.....	50
Figura 13-	Estrutura da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	51
Figura 14-	Sistema reacional com reator batelada.....	72
Figura 15-	Sistema reacional com reator de leito fixo.....	75
Figura 16-	Consumo de ácido oleico na reação de esterificação com álcool (etanol e butanol), empregando razão molar ácido oleico/álcool igual a 1 e 3% (m/m) de enzima ((a) Novozym 435 (b) Lipozyme RM IM (c) Lipozyme TL IM), a 45 °C.....	82
Figura 17-	Cinética da reação de transesterificação da trilaurina com etanol, empregando razão molar trilaurina/etanol igual a 1:3, com adição escalonada do álcool foi nos tempos 0, 0,5 e 1,0 hora e 3% (m/m) de enzima (a) Novozym 435 (b) Lipozyme RM -IM (c) Lipozyme TL-IM), a 50°C.....	84
Figura 18-	Influência da temperatura no teor em ésteres alquílicos obtido na reação de transesterificação do óleo de soja, utilizando razão molar de álcool ((a) etanol (b) butanol) /óleo de soja igual a 3, com adição escalonada de	

	álcool (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) e Novozym 435 a 5% m/m.....	86
Figura 19-	Influência da temperatura no teor em ésteres alquílicos obtido na reação de transesterificação do óleo de soja, utilizando razão molar de álcool ((a) etanol (b) butanol) /óleo de soja igual a 3, com adição escalonada de álcool (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) e Lipozyme RM IM a 5% m/m.....	87
Figura 20-	Influência da temperatura no teor em ésteres alquílicos obtido na reação de transesterificação do óleo de soja, utilizando razão molar de álcool ((a) etanol (b) butanol) /óleo de soja igual a 3, com adição escalonada de álcool (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) e Lipozyme TL IM a 5% m/m.....	88
Figura 21-	Influência do teor de acidez ((a) IA 8,5 (b) IA 54,4 (c) IA 93,7) e do tipo de lipase no teor em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja ácido e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, etanol/ácido oléico igual a 1 com adição escalonada de etanol (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h), utilizando 5% m/m de Novozym 435, a 50°C.....	92
Figura 22-	Influência do teor de acidez ((a) IA 8,5 (b) IA 54,4 (c) IA 93,7) e do tipo de lipase no teor em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja ácido e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, etanol/ácido oléico igual a 1 com adição escalonada de etanol (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) utilizando 5% m/m de Lipozyme RM-IM, a 50°C.....	93
Figura 23-	Influência do teor de acidez ((a) IA 8,5 (b) IA 54,4 (c) IA 93,7) e do tipo de lipase no rendimento em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja ácido e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, etanol/ácido oléico igual a 1 com adição escalonada de etanol (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) utilizando 5% m/m de Lipozyme RM-IM, a 50°C.....	94
Figura 24-	Influência do teor de acidez (a) IA 8,5 (b) IA 54,4 (c) IA 93,7) e do tipo de lipase no rendimento em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja ácido e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de	

	soja igual a 3, etanol/ácido oléico igual a 1 com adição escalonada de etanol (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) utilizando 5% m/m de Lipozyme TL-IM, a 50°C.....	95
Figura 25-	Teor de biodiesel obtido a partir da esterificação do ácido oleico e da transesterificação do óleo de soja na reação de transesterificação entre o óleo de soja ácido e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, etanol/ácido oleico igual a 1 com adição escalonada de etanol (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) utilizando 5% m/m de lipase (a)Novozym 435 (b) Lipozyme RM IM (c) Lipozyme TL IM), a 50°C.....	97
Figura 26-	Influência do teor de acidez (a) IA 8,5 (b) IA 54 (c) IA 93,7) e da temperatura (50°C e 70°C) no teor em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja ácido e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, etanol/ácido oléico igual a 1 com adição escalonada de etanol (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) utilizando 5% m/m de Novozym 435.....	100
Figura 27-	Teor em biodiesel obtido na transesterificação entre o óleo de soja e o etanol, empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura da lipase Novozym 435 a 50°C.....	102
Figura 28-	Influência da velocidade espacial no teor em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura da lipase Novozym 435 a 50°C.....	103
Figura 29-	Teor em biodiesel obtido na transesterificação entre o óleo de soja e o etanol, empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura da lipase Lipozyme RM-IM a 50°C.....	103
Figura 30-	Influência da velocidade espacial no teor em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura da lipase Lipozyme RM-IM a 50°C.....	104
Figura 31-	Teor em biodiesel obtido na transesterificação entre o óleo de soja e o	

	etanol, empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura da lipase Lipozyme TL-IM a 50°C.....	105
Figura 32-	Influência da velocidade espacial no teor em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura da lipase Lipozyme RM-IM a 50°C.....	106
Figura 33-	Reutilização da lipase Novozym 435 na reação de transesterificação do entre o óleo de soja e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura a 500C, para reação conduzida com velocidade espacial dos reagentes de (a) 0,255 h-1 (b) 0,508 h-1.....	108
Figura 34-	Reutilização da lipase Lipozyme RM-IM na reação de transesterificação do entre o óleo de soja e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura a 500C, para reação conduzida com velocidade espacial dos reagentes de (a) 0,255 h-1 (b) 0,508 h-1.....	109
Figura 35-	Reutilização da lipase Lipozyme TL-IM na reação de transesterificação do entre o óleo de soja e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura a 500C, para reação conduzida com velocidade espacial dos reagentes de (a) 0,255 h-1 e (b) 0,508 h-1.....	110
Figura 36-	Curvas padrão (a) laureato de etila (b) monolaurina (c) dilaurina (d) trilaurina.....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Produção de Biodiesel em alguns países e continentes no período de 2007 a 2011.....	29
Tabela 2-	Oleaginosas cultivadas no Brasil para a produção de biodiesel.....	32
Tabela 3-	Características das principais culturas oleaginosas do Brasil.....	32
Tabela 4-	Tipo de óleo ou gordura e a respectiva composição em ácido graxo.....	33
Tabela 5-	Comparação entre o processo enzimático e o processo químico para a produção de biodiesel.....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIOVE	Associação Brasileira da Indústria de Óleos Vegetais
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustível.
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EIA	Energy Information Administration
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz
IA	Índice de Acidez
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PBR	Packed Bed Reactor
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
USA	United States of America
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

t	Tonelada
ha	Hectare
%	Porcentagem
m ³	Metro cúbico
m	Massa
°C	Grau Celsius
h	Hora
<	Menor que
>	Maior que
k	Kilo
Da	Dalton
pH	Potencial hidrogeniônico
Gly	Glicina
Ser	Serina
His	Histidina
Asp	Ácido aspártico
Glu	Ácido glutâmico
mm	Milímetro
mL	Mililitro
cm	Centímetro
v	Volume
min	Minuto
mg	Miligramma
g	Gramma
μ	Micro
mmols	Mili mols
L	Litro
μL	Microlitro
m	Metro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.1	Biodiesel	23
1.2	Produção de biodiesel	25
1.2.1	<u>Brasil</u>	25
1.2.2	<u>Mundo</u>	28
1.3	Matérias-Primas	30
1.4	Óleos Vegetais	31
1.5	Processos para Obtenção de Biodiesel	33
1.5.1	<u>Esterificação</u>	33
1.5.2	<u>Transesterificação</u>	34
1.5.2.1	Catálise alcalina	36
1.5.2.2	Catálise ácida.....	41
1.5.2.3	Catálise enzimática.....	43
1.6	Lipases	46
1.6.1	<u>Fontes de Lipases</u>	47
1.6.2	<u>Propriedades das Lipases</u>	48
1.6.3	<u>Reações Catalisadas por Lipases</u>	49
1.6.4	<u>Estrutura Protéica</u>	51
1.6.5	<u>Mecanismo Catalítico</u>	52
1.7	<u>Fatores que influenciam o processo de produção de biodiesel empregando lipases</u>	53
1.7.1	<u>Enzimas Livres e Imobilizadas</u>	53
1.7.2	<u>Tipo de Álcool</u>	54
1.7.3	<u>Razão molar álcool / óleo e forma de adição do álcool</u>	55
1.7.4	<u>Temperatura</u>	56
1.7.5	<u>Teor de Água</u>	57
1.7.6	<u>Óleos ácidos</u>	58
1.7.7	<u>Produção de biodiesel em sistema batelada e contínuo</u>	61
2	MATERIAIS E MÉTODOS	67

2.1	Materiais	67
2.1.1	<u>Reagentes</u>	67
2.1.2	<u>Enzimas</u>	67
2.1.3	<u>Óleo de soja ácido</u>	68
2.1.4	<u>Equipamentos</u>	68
2.2	Métodos	69
2.2.1	<u>Determinação da atividade enzimática</u>	69
2.2.1.1	Atividade de esterificação.....	69
2.2.1.2	Atividade de transesterificação.....	70
2.2.2	<u>Determinação do índice de acidez</u>	71
2.2.3	<u>Reação de síntese enzimática de biodiesel em reator batelada</u>	72
2.2.3.1	<u>Efeitos da temperatura, do tipo de álcool e da lipase empregada na síntese de biodiesel</u>	73
2.2.3.2	Efeitos da acidez do óleo de soja e da lipase empregada na síntese de biodiesel.....	73
2.2.4	<u>Reação de síntese enzimática de biodiesel em reator de leito fixo em sistema contínuo</u>	74
2.2.4.1	Efeitos da velocidade espacial dos reagentes e da lipase empregada na síntese de biodiesel.....	75
2.2.4.2	Reutilização da lipase para a síntese de biodiesel.....	76
2.2.5	<u>Análise cromatográfica para determinação da atividade de transesterificação</u>	76
2.2.6	<u>Análise cromatográfica para quantificação dos ésteres alquílicos (biodiesel)</u>	77
2.2.7	<u>Análise titulométrica para determinação do consumo de ácido oleico nas reações de síntese de biodiesel empregando óleo ácido</u>	78
2.2.8	<u>Análise dos resultados: Cálculo do teor em ésteres proveniente da reação de transesterificação e de esterificação do óleo ácido</u>	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
3.1	<u>Atividade Enzimática</u>	80
3.1.1	<u>Atividade de Esterificação</u>	80
3.1.2	<u>Atividade de Transesterificação</u>	80
3.2	Influência da temperatura na reação de transesterificação enzimática	85
3.3	Reação de síntese de biodiesel utilizando óleo ácido	89
3.3.1	Avaliação do efeito da temperatura na reação de transesterificação	

	enzimática com o óleo ácido empregando a lipase Novozym 435.....	98
3.4	Transesterificação enzimática em modo contínuo.....	101
3.4.1	<u>Efeito da velocidade espacial na reação de transesterificação enzimática em modo contínuo.....</u>	98
3.4.2	<u>Reutilização das lipases na reação de transesterificação enzimática em modo contínuo.....</u>	107
	CONCLUSÕES.....	112
	SUGESTÕES.....	114
	REFERÊNCIAS.....	115
	ANEXO I - Curvas padrão para determinação da atividade de transesterificação.....	133

INTRODUÇÃO

Para atender a crescente demanda por energia de forma sustentável, diminuindo o impacto ambiental, cresce a motivação pelo desenvolvimento de tecnologias que utilizem fontes de energia renováveis e que possam substituir os combustíveis fósseis. Neste contexto, os biocombustíveis emergem como uma fonte alternativa de energia e de modo especial ressalta-se o papel do biodiesel. O biodiesel é definido como uma mistura de ésteres monoalquílicos derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais (SCHUCHARDT, SERCHELI *et al.*, 1998; RAMOS, KUČEK *et al.*, 2003). O biodiesel pode ser empregado como um substituto do diesel em motores a compressão (DERMIBAS, 2008; BOZBAS, 2008; DERMIBAS, 2007; SALEH *et al.*, 2010; QI *et al.*, 2009). Além disto, esse biocombustível oferece inúmeras vantagens em relação aos combustíveis fósseis, tais como: diminuição na emissão de CO₂, de SO_x e de hidrocarbonetos aromáticos durante o processo de combustão (ABREU *et al.*, 2004), redução da emissão de material particulado e de fumaça, biodegradabilidade e não toxicidade (BOEHMAN, 2005). A utilização do biodiesel também permite que se estabeleça um ciclo fechado de carbono, no qual o dióxido de carbono (CO₂) é absorvido pela planta no processo de fotossíntese e é liberado quando o biocombustível é queimado no motor.

A Lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira e desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. O país está entre os maiores produtores e consumidores mundiais de biodiesel. Contudo, ainda apresenta custo elevado de produção, devido ao elevado custo da matéria-prima utilizada (AMORIM, 2008). O Brasil é um país rico em oleaginosas, porém restringe a utilização de suas culturas para fins alimentícios. Dentre as várias espécies vegetais no Brasil, das quais se pode produzir biodiesel, destacam-se a mamona, o dendê (palma), o girassol, o babaçu, o amendoim, o pinhão manso e a soja, dentre outras. Além da diversificada disponibilidade de oleaginosas, há de se considerar as gorduras animais, como o sebo bovino, os óleos de peixes, o óleo de mocotó e a banha de porco, entre outros (VILAS, 2005). Óleos e gorduras residuais, resultantes de processamento doméstico, comercial e industrial, também podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel (VILAS, 2005).

A rota convencional de produção de biodiesel consiste na transesterificação de óleos vegetais com metanol ou etanol utilizando catalisadores homogêneos alcalinos (NaOH ou

KOH), com geração de glicerol como subproduto (JEGANNATHAN *et al.*, 2011). Porém, nesse processo existe uma restrição quanto à matéria-prima, pois esta deve ser essencialmente anidra e possuir um teor de ácidos graxos livres menor que 0,5% em massa. A presença de ácidos graxos ocasiona a reação de neutralização com o catalisador básico, que resulta na perda de catalisador e na formação de sabão (PARK *et al.*, 2008), além de propiciar o aumento da viscosidade. A elevação da viscosidade dificulta o processo de separação do biodiesel ao final da reação, reduzindo o rendimento e gerando um grande volume de efluentes. Assim, caso a matéria-prima contenha um teor de ácidos graxos livres maior do que o especificado, é necessária a remoção dos mesmos através, por exemplo, de uma etapa preliminar de esterificação, usualmente catalisada por ácido. O emprego de óleos refinados para produção de biodiesel significa cerca de 70-95% do custo total de produção desse biocombustível (ZHANG *et al.*, 2003).

Uma forma eficaz de reduzir o custo do biodiesel é o uso de matérias-primas com alto teor de ácidos graxos livres ou óleos não comestíveis, que tendem a ser consideravelmente mais baratos do que os óleos vegetais refinados (SRIVASTAVA e PRASAD, 2000).

O emprego da catálise enzimática, utilizando lipases (triacilglicerol éster hidrolases - EC 3.1.1.3), na síntese de biodiesel a partir de matérias-primas com elevado teor de ácidos graxos livres pode representar uma tecnologia atrativa, uma vez que essas enzimas são capazes de catalisar as reações de transesterificação dos triacilgliceróis e de esterificação dos ácidos graxos livres presentes na matéria-prima formando biodiesel. O emprego desses biocatalisadores elimina o problema de saponificação (já que os ácidos graxos livres são convertidos em biodiesel) (HALIM e KAMARUDDIN, 2008), permite que as reações sejam conduzidas em condições reacionais brandas de temperatura e pressão (quando comparadas as condições empregadas no processo químico), ocasiona a geração de um menor volume de produtos secundários e efluentes, visto que as lipases são catalisadores altamente seletivos (ROBLES-MEDINA, *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2004), utiliza quantidades estequiométricas de álcool em relação à quantidade de óleo, proporcionando economia no reagente e nos custos de energia. Além disso, o biocatalisador imobilizado pode ser facilmente recuperado do meio reacional e reutilizado (SOTOFT *et al.*, 2010; GHALY *et al.*, 2010).

Desta forma, matérias-primas de baixo custo com alto teor de ácidos graxos livres, tais como óleos não comestíveis e gorduras, incluindo resíduos de óleo de cozinha, sebo, óleo de algas e óleos de sementes de plantas não comestíveis, podem ser empregadas na síntese de biodiesel (FJERBAEK *et al.*, 2009; BERCHMANS e HIRATA, 2008). A motivação para a

utilização dos óleos ácidos é que estes não competem com a indústria alimentícia, dispensam a etapa de refino e muitos desses óleos possuem alta produtividade de óleo por hectare, bem como deve-se considerar as condições geográficas e climáticas do Brasil, que propiciam a produção dessas oleaginosas. Dentre estes óleos destacam-se: andiroba, buriti, dendê, mahua, macaúba e oiticica.

Vários tipos de reatores podem ser empregados na síntese de biodiesel por via enzimática, dentre eles destacam-se: o reator em batelada e o reator em leito fixo. O reator em batelada permite uma boa dispersão do álcool no óleo através da agitação mecânica, que, no entanto, pode causar, pela tensão de cisalhamento, danos ao suporte das enzimas, reduzindo a sua vida útil (TAN *et al.*, 2010). O emprego de reator em leito fixo permite a condução do processo em modo contínuo (WANG *et al.*, 2011). Nesse sistema, a enzima está submetida à baixa tensão de cisalhamento, o que aumenta a estabilidade da enzima a longo prazo (HAMA *et al.*, 2011), porém, sujeita a compactação devido à pressão da coluna do leito.

Este trabalho teve como objetivo principal estudar a reação de transesterificação enzimática do óleo de soja ácido com etanol empregando lipases comerciais imobilizadas (Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM). O etanol foi selecionado para ser o álcool empregado na reação devido a sua produção em larga escala no país, além de ser um produto obtido de fontes renováveis, tornando o processo de obtenção de biodiesel totalmente independente do petróleo (VEIGA FILHO, 2008).

Dentre os objetivos específicos estão:

- Avaliação das lipases comerciais imobilizadas (Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM) a partir da determinação da atividade de esterificação e de transesterificação;
- Estudo do efeito da temperatura na síntese de biodiesel, utilizando razão estequiométrica dos reagentes e lipase comercial imobilizada (Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM);
- Estudo do efeito do teor de ácido graxo (índice de acidez de 8, 50 e 90) no óleo de soja na síntese de biodiesel empregando lipase comercial imobilizada (Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM);
- Avaliação da síntese de biodiesel em sistema contínuo, empregando reator de leito fixo empacotado com biocatalisador (Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM).

O presente trabalho está dividido em cinco capítulos. Inicialmente, no Capítulo 1, será apresentada uma revisão da literatura no tocante à produção de biodiesel. No Capítulo 2 serão abordadas as metodologias empregadas para a execução dos experimentos e os

materiais e reagentes empregados. Já no Capítulo 3 são apresentados os resultados obtidos e as discussões pertinentes, enquanto que no Capítulo 5, a presente dissertação é encerrada, apresentando-se as conclusões obtidas a partir do trabalho realizado. No Capítulo 6 são apresentadas as sugestões para trabalhos futuros.

1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Existem várias razões para a introdução do biodiesel como uma alternativa aos combustíveis fósseis derivados do petróleo, dentre elas a diminuição na emissão de certos poluentes, bem como seu potencial renovável.

Nesta revisão bibliográfica serão abordados os fatores relevantes para a produção de biodiesel como a escolha da matéria-prima empregada e sua composição, bem como os diferentes processos de produção empregados, ressaltando o processo enzimático utilizando lipases.

1.1 – Biodiesel

Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, o biodiesel é denominado como qualquer combustível alternativo de natureza renovável que possa oferecer vantagens sócio-ambientais ao ser empregado na substituição total ou parcial do diesel de petróleo, em motores de ignição por compressão interna (motores do ciclo Diesel). Esta definição, bastante ampla, inclui diversas opções tecnológicas como o uso de: óleos vegetais in natura; misturas binárias óleo/diesel, álcool/diesel e ésteres/diesel; micro emulsões; hidrocarbonetos derivados da pirólise de biomassa vegetal como o bagaço de cana-de-açúcar; óleos vegetais craqueados (ou derivados do craqueamento termocatalítico); e misturas ternárias álcool/diesel/co-solventes.

No entanto, segundo a Resolução ANP Nº 7, de 19/03/2008, o único tipo de biodiesel regulamentado no território brasileiro corresponde aos ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais.

Deste modo, o biodiesel apresenta características similares ao óleo diesel, tais como índice de cetano, conteúdo energético e viscosidade, podendo, portanto, ser utilizado em motores do ciclo Diesel. Além disso, a sua mistura ao diesel de petróleo traz vantagens, tanto do ponto de vista da performance dos motores (melhora da lubrificidade e do índice de cetano), quanto do ponto de vista ambiental, uma vez que ele é praticamente isento de enxofre, não é tóxico, é biodegradável, sendo ainda menores as emissões de partículas poluentes, de hidrocarbonetos (HC), de monóxido de carbono (CO) e de hidrocarbonetos poli-aromáticos (PAH) (HAAS *et*

al., 2001; PETERSON *et al.*, 2002; FELIZARDO, 2003; GERPEN, 2005 e NABI *et al.*, 2006).

O biodiesel pode ser usado puro ou em mistura com o óleo diesel em qualquer proporção. Mundialmente passou-se a adotar uma nomenclatura apropriada para sinalizar a concentração de biodiesel na mistura com o diesel, o biodiesel BXX, onde XX é a porcentagem em volume do biodiesel na mistura. Sendo assim, o biodiesel no mercado de combustíveis se encontra em quatro níveis de concentração: puro (B100), misturas (B20-B30), aditivo (B5) e aditivo de lubricidade (B2).

A Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005 previa que em 2013 todos os veículos de transporte de cargas do Brasil seriam obrigados a usar o B5. Essa projeção fazia parte do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), que foi criado juntamente com a lei. Contudo, esta projeção se tornou realidade antes do prazo pré-estabelecido, sendo alcançada em Janeiro de 2010. A disponibilidade de matéria-prima para a produção do biodiesel brasileiro é ampla, uma vez que o clima quente em diversas regiões do país é propício para o cultivo de mamona, dendê (palma), de babaçu, de amendoim, de pinhão manso, de girassol, de algodão e de soja. Contudo, a soja representa cerca de 75% da matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel no país. O restante do fornecimento está distribuído entre a gordura animal que de acordo com a ANP, responde por cerca de 17% do total; o óleo de algodão, com uma média de 5% e outros materiais graxos, da ordem de 3% (UBRABIO, 2013).

O ótimo desempenho produtivo é resultado do cultivo destas culturas por médios e pequenos agricultores nas mais diversas regiões do país. Um incentivo na produção de biodiesel pode ocasionar a manutenção da população no campo diminuindo assim o êxodo rural, além de propiciar um aumento na renda dessas famílias. Sendo assim, o biodiesel surge como uma alternativa para reduzir a dependência brasileira do óleo diesel, uma vez que o país importa cerca de 10% de todo o óleo que consome. Desde o lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel até o final de 2011, o Brasil produziu 8,3 bilhões de litros de biodiesel, que reduziram as importações de diesel em um montante de US\$ 5,3 bilhões, contribuindo positivamente para a balança comercial brasileira (BRASIL, 2013). O óleo diesel é o combustível mais consumido no país, registrando 56% do mercado de combustíveis. Com o emprego do biodiesel o Brasil irá participar mais efetivamente do mercado de certificados de carbono, que são títulos financeiros voltados para a diminuição da emissão de dióxido de carbono na atmosfera, que é responsável pelo aumento do efeito estufa.

1.2 – Produção de biodiesel

1.2.1 – Brasil

Os dados de produção e entrega de biodiesel no Brasil mostram que a produção acumulada de janeiro até fevereiro de 2013 foi de 423.243 m³, possibilitando um aumento de 6% quando comparado ao mesmo período de 2012. O estado com maior participação na produção de biodiesel no primeiro bimestre de 2013 foi o Rio Grande do Sul (RS) (28%), seguido de Goiás (GO) (21%) e Mato Grosso (MT) (12%). Já em termos regionais, o Centro-Oeste respondeu por 41% da oferta total de biodiesel (175.743 m³), seguido pelas regiões Sul (33% da produção, com 145.247 m³) e Sudeste (12%, com 50.693 m³). As entregas de biodiesel das usinas às distribuidoras de combustíveis, referentes aos volumes comercializados diretamente nos leilões organizados pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), totalizaram 455.490 m³ nos dois primeiros meses de 2013, uma elevação de 15,4% em relação ao mesmo período de 2012 (394.627 m³) (ABIOVE, Março de 2013). Na Figura 1.1 é apresentada a produção brasileira de biodiesel

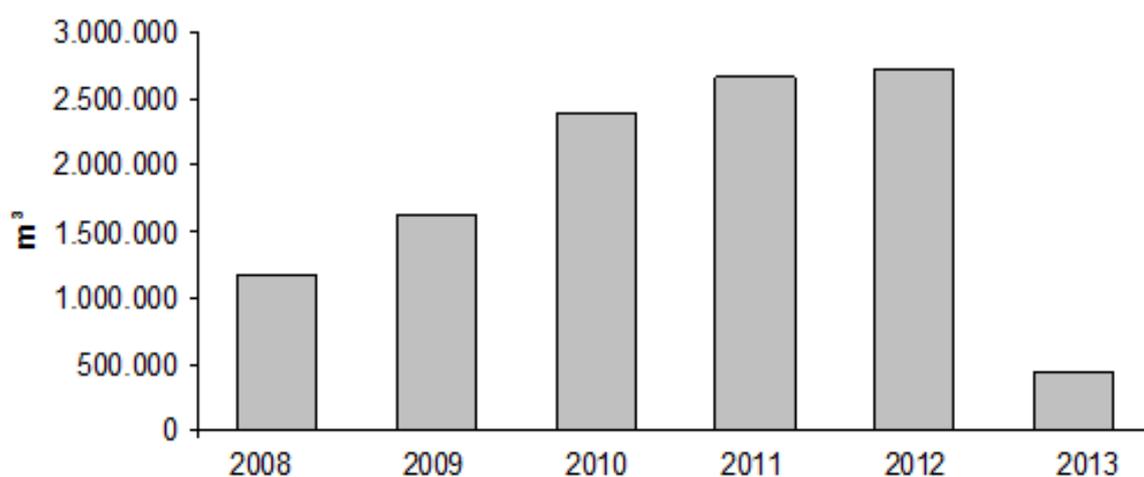


Figura 1.1- Produção brasileira de biodiesel em m³*

Fonte: ANP elaboração ABIOVE (2013)

* para o ano de 2013 são apresentados apenas a produção referente aos meses de Janeiro e Fevereiro de 2013.

A Figura 1.2 ilustra a contribuição de cada região na produção de biodiesel.

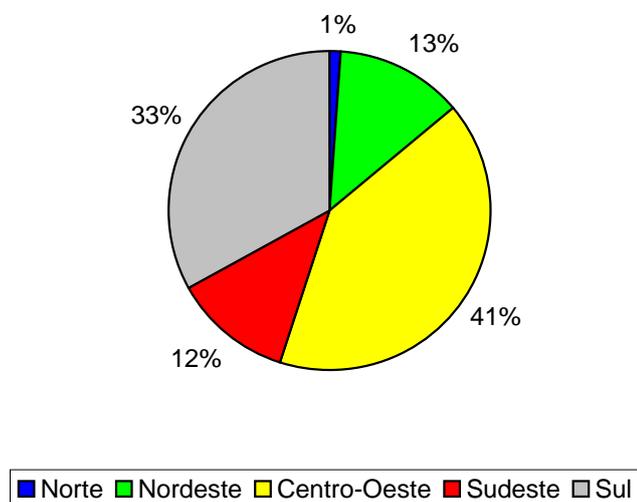


Figura 1.2 - Participação Regional na produção de biodiesel (%) – janeiro a fevereiro de 2013
Fonte: ANP elaboração ABIOVE (2013)

Quanto à utilização das matérias-primas, as informações consolidadas para o primeiro bimestre de 2013 indicam que o percentual de utilização destas para a produção de biodiesel manteve-se inalterado em relação a janeiro de 2013. O óleo de soja segue respondendo por 67% do biodiesel, seguido pelo sebo bovino (22%) e pelo óleo de algodão (5%). As demais matérias-primas representaram 6% da produção nacional de biodiesel (ABIOVE, Março de 2013). Na comparação com o mesmo período de 2012, a produção de biodiesel a partir do óleo de soja teve um decréscimo de 1,9% (290,7 mil m³, frente a 296,5 mil m³ em 2012). Outra variação negativa pôde ser observada na produção via óleo de algodão, que saiu de 30,5 mil m³ nos primeiros dois meses de 2012 para 19,6 mil m³ em 2013. Já a utilização de sebo bovino teve um aumento de 37,3%, passando de 68,7 mil m³ de biodiesel produzidos para 94,3 mil m³. Por fim, a elevação de uso mais expressiva se deu nas outras matérias-primas, com um aumento de 130,8%. Entre janeiro e fevereiro de 2012 haviam sido produzidos 12 mil m³ de biodiesel nesse grupo, enquanto que no mesmo período de 2013 esse valor foi de 27,7 mil m³ (ABIOVE, Março de 2013). Na Figura 1.3 destaca-se a participação das matérias-primas na produção de biodiesel.

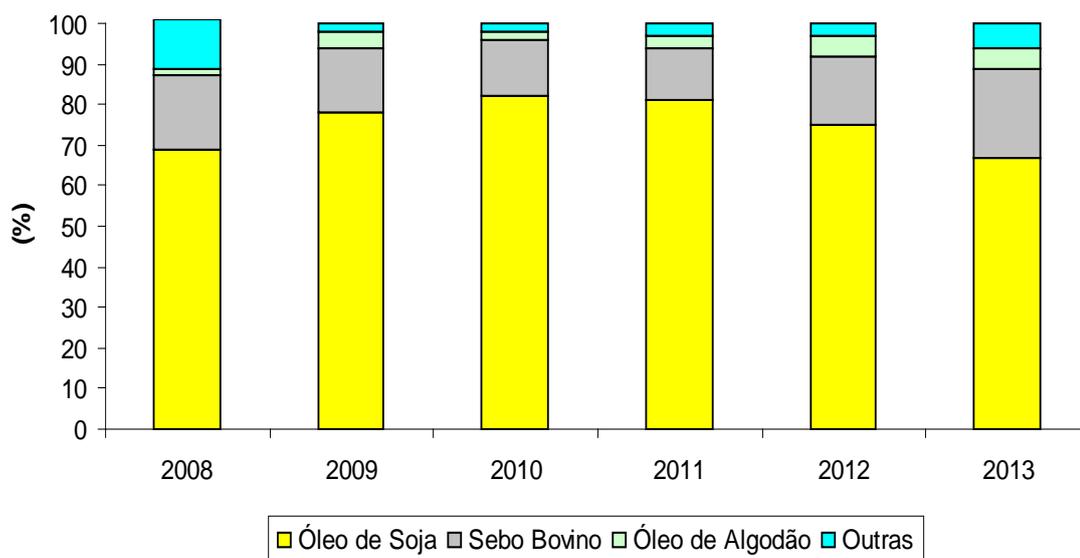


Figura 1.3 - Participação das matérias-primas na produção de biodiesel
 Fonte: ANP elaboração ABIOVE (2013)

Tendo em vista o panorama exposto anteriormente, o Brasil tem um grande potencial para melhorar a sua matriz de combustíveis. Todas as condições sinalizam para uma ampliação de 5% para 7% de biodiesel na mistura com o diesel mineral, estabelecendo um percentual mais elevado para 2020. Desde 2010, o índice de 5% de mistura obrigatória de biodiesel ao diesel consumido no mercado doméstico não evoluiu, apesar da oferta de matérias-primas ser muito superior à demanda. Por exemplo, em 2013 o Brasil será o maior produtor mundial de soja em grão, deslocando os EUA dessa posição. O país deverá produzir mais de 82 milhões de toneladas de soja, onde 38 milhões serão processados em fábricas esmagadoras. Sendo assim, uma disponibilidade recorde de 7,4 milhões de toneladas de óleo de soja será alcançada, o que pode ocasionar um aumento da participação de biodiesel na matriz de transportes brasileira, uma vez que o óleo de soja poderia ser empregado como matéria-prima na produção de biodiesel, isto sem causar prejuízo ao consumo alimentar, industrial ou das exportações (O ESTADO DE SÃO PAULO, Março de 2013).

O biodiesel emite uma concentração de poluentes bem menor que o diesel mineral, além disso, o impacto inflacionário do aumento do percentual na mistura seria mínimo. O consumo de biodiesel de soja no Brasil é responsável por reduções do impacto inflacionário da mistura superiores a 70%, em comparação com o diesel mineral europeu, segundo estudo da Delta CO2, empresa ligada à Esalq-USP (O ESTADO DE SÃO PAULO, Março de 2013).

Quanto à dependência energética, a maior inserção do biodiesel na matriz energética em curto e médio prazo, reduziria a necessidade de importação de diesel mineral. Essas importações representam cerca de 20% do consumo interno de diesel. Outra vantagem é a oportunidade de contribuir para o desenvolvimento da agricultura familiar. Foram gerados cerca de 86 mil empregos, ocasionando um fornecimento de quase 2 milhões de toneladas em matérias-primas para a produção de biodiesel, no ano de 2011. Ainda em 2013, instalações com capacidade de produção de mais de 700 mil m³ devem iniciar operações de produção de biodiesel nos estados de Mato Grosso (MT), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS). A capacidade industrial nacional de produção gira em torno de 7,40 milhões de m³/ano.

Nos anos de 2011 e 2012 o país produziu 2,67 e 2,71 milhões de m³ de biodiesel, respectivamente. O abastecimento continuará assegurado mesmo que a mistura utilizada passe a ser o B7, apenas empregando a capacidade não utilizada.

O setor de biodiesel reúne 61 empresas autorizadas a comercializar biodiesel, das quais 70% operam ativamente nos leilões bimestrais promovidos pela ANP. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de biodiesel, atrás de EUA, Argentina e Alemanha, e tem plenas condições de assumir a liderança mundial nesse mercado, se seguir a sua tradição de incentivo às energias renováveis (O ESTADO DE SÃO PAULO, Março de 2013).

1.2.2 – Mundo

O biodiesel surgiu como uma alternativa aos combustíveis fósseis e seu caráter renovável o torna uma fonte importante de energia a longo prazo. Países como Argentina, Brasil, Estados Unidos, Malásia, Alemanha, França e Itália produzem o biodiesel comercialmente, incentivando cada vez mais o desenvolvimento do processo em escala industrial. Na Alemanha o biodiesel é produzido a partir da canola (colza), que possui uma capacidade de produção de cerca de 1 milhão de toneladas por ano, já na Malásia este é produzido a partir do óleo de polpa de dendê, com uma capacidade de produção equivalente a 500 mil toneladas por ano. Na Tabela 1.1 é apresentada a produção de biodiesel (1000 barris por dia) em vários países, no período de 2007 a 2011.

Tabela 1.1 – Produção de Biodiesel em alguns países e continentes no período de 2007 a 2011.

País ou Continente	Ano (barris/dia)				
	2007	2008	2009	2010	2011
América do Norte	33.652	45.913	35.846	24.903	65.910
Estados Unidos	31.952	44.113	33.646	22.403	63.110
América Central e do Sul	11.248	35.828	56.942	85.154	103.249
Argentina	3.600	13.900	23.100	36.000	47.340
Brasil	6.968	20.057	27.710	41.123	46.058
Europa	122.390	150.690	173.870	183.142	177.690
Áustria	5.200	4.200	6.100	5.700	6.200
Bélgica	3.200	5.400	8.100	8.500	8.700
França	18.700	34.400	41.000	37.000	34.000
Alemanha	57.000	55.000	45.000	49.000	52.000
Itália	9.200	13.100	15.600	14.500	11.200
Holanda	1.700	2.000	5.400	7.500	9.600
Polônia	900	5.000	6.000	7.000	7.500
Portugal	3.500	3.300	4.900	6.000	5.500
Espanha	3.500	4.300	14.000	16.000	12.000
Eurásia	720	2.500	3.800	3.260	3.250
Ásia e Oceania	10.820	27.120	38.524	41.030	53.370
China	2.000	500	6.000	6.000	7.800
Índia	200	200	1.000	2.000	2.000
Indonésia	1.000	2.000	6.000	8.000	20.000
Coréia do Sul	1.700	3.200	5.000	6.500	6.300
Malásia	2.500	4.500	4.500	2.000	1.000
Tailândia	1.200	7.700	10.500	11.000	10.200
Mundo	178.830	262.096	309.072	337.760	403.739

Fonte: Energy Information Administration (EIA, 2013)

1.3 - Matérias-Primas

A escolha de matérias-primas mais baratas é necessária para viabilizar os processos empregados na produção de biodiesel e depende de fatores geográficos, climáticos e econômicos.

As matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel são: óleos comestíveis, gorduras animais, óleos e gorduras residuais, óleos não comestíveis, subprodutos do refino dos óleos comestíveis e óleos microbianos.

Óleos comestíveis têm aplicação na indústria alimentícia e seus preços são relativamente altos, além disso, a oferta dos mesmos poderia não suprir a demanda para produção de biodiesel (MOSER, 2009).

Os óleos residuais como o óleo de cozinha usado, graxa, borra e outros subprodutos da indústria de papel e celulose e óleo da semente do tabaco (subproduto da produção de folhas de tabaco) vem sendo empregados na produção de biodiesel dado a sua abundância e o seu custo.

Óleos não comestíveis obtidos de pinhão manso (*J. curcas*), karanja (*Pongamia pinata*), mahua (*Madhuca indica*), polanga (*Caophyllum inophyllum*), borracha (*Ficus elastica*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), mamona (*Ricinus communis L.*), macaúba (*Acrocomia aculeata*) e babaçu (*Orbignya phalerata*) são mais baratos (com exceção do óleo obtido da mamona) que os óleos comestíveis e potencialmente disponíveis para a produção de biodiesel. Porém, alguns destes óleos como o de macaúba, o de jatropha e o de mahua, possuem um alto teor de água e ácidos graxos livres, o que dificulta o emprego do processo convencional de produção de biodiesel a partir da transesterificação do óleo vegetal com alcoóis de cadeia curta empregando catálise alcalina (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007; TALUKDER *et al.*, 2009).

Óleos microbianos também estão sendo estudados para produção de biodiesel, uma vez que alguns microrganismos são capazes de acumular óleos no interior das células com elevada produtividade. Os principais microrganismos produtores são: microalgas, bactérias, leveduras e fungos. As microalgas têm sido mais empregadas, pois quando comparadas com outras culturas possuem alta eficiência fotossintética, alta produção de biomassa (SHARMA *et al.*, 2008). Os gêneros empregados na produção de biodiesel são *Pseudochoricystis*, *Phaeodactylum*, *Thalassiosira ellipsoidea*, *Chlorella*, *Dunaliella tertiolecta*, *Volvox*, *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas*, *Pseudochlorococcum* (PREISS e KOWALSKI, 2010).

Dentre as bactérias destaca-se a *Escherichia coli*, que tem sido considerada uma fonte promissora de óleo. O teor de óleo obtido de várias cepas de levedura como *Cryptococcus*, *Lipomyces* e *Rhodotorula* alcança 60-70% de seu peso seco (MENG *et al.*, 2009). Em relação aos fungos, as espécies potenciais são *Aspergillus oryzae*, *Mortierella isabellina*, *Humicola lanuginosa* e *Mortierella vinacea* (AZÓCAR *et al.*, 2010). Porém, atualmente, a principal matéria-prima para a produção de biodiesel ainda são os óleos vegetais refinados extraídos de oleaginosas. O custo desses materiais representa cerca de 70% do custo total de produção (BEHZADI e FARID, 2007).

1.4 - Óleos Vegetais

Óleos são produtos naturais constituídos por triacilgliceróis, cujos ácidos graxos contêm cadeias de 8 a 24 átomos de carbono com diferentes graus de insaturação (SUARES, 2007).

No Brasil a diversidade de solo, clima permite o cultivo de inúmeras espécies de oleaginosas. As oleaginosas são plantas que contêm um alto teor de óleo, tanto a partir de suas sementes (soja, colza/canola, girassol) como a partir de seus frutos (palma, babaçu, coco), podendo ser utilizadas para a produção de óleo vegetal. Outra característica importante de algumas dessas plantas é o fato de que após a extração do óleo, os subprodutos podem ser utilizados para diferentes aplicações.

Na Tabela 1.2 estão descritas as oleaginosas que possuem potencial para serem utilizadas como matérias-primas para a produção de biodiesel e a região do Brasil em que são cultivadas.

Tabela 1.2 - Oleaginosas cultivadas no Brasil para a produção de biodiesel

Região	Óleos Vegetais Disponíveis
Norte	Dendê e soja
Nordeste	Soja, mamona, dendê, algodão e coco
Centro-Oeste	Soja, mamona, algodão, girassol e dendê.
Sudeste	Soja, mamona, algodão, girassol.
Sul	Soja, canola, girassol e algodão

Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MDA) (2012).

Na Tabela 1.3 é apresentada a relação entre as principais oleaginosas produzidas no Brasil, origem e teor do óleo, meses de colheita e rendimento.

Tabela 1.3 - Características das principais culturas oleaginosas do Brasil

Espécie	Nome Científico	Origem do óleo	Teor de óleo (%)	Meses de colheita por ano	Produtividade de (kg óleo ha ⁻¹)
Dendê	<i>Elaeis guineensis L.</i>	Polpa	22	12	2076
Girassol	<i>Helianthus annus L.</i>	Semente	38 – 48	3	731,28
Mamona	<i>Ricinus communis L.</i>	Semente	45 – 50	3	82,65
Soja	<i>Glycine Max (L.) Merril</i>	Grão	18	3	528,84
Algodão	<i>Gossypum hirsutum L.</i>	Grão	15	3	552,3

Fonte: CONAB (2013)
Adaptado pelo autor (2013)

Na Tabela 1.4 é apresentada a composição em ácidos graxos de alguns óleos e gorduras.

Tabela 1.4 – Tipo de óleo ou gordura e a respectiva composição em ácido graxo

<i>Óleo ou Gordura</i>	<i>Composição em ácidos graxos (% em massa)</i>						
	Láurico C ₁₂ H ₂₄ O	Mirístico C ₁₄ H ₂₈ O ₂	Palmítico C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Estearico C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Oleico C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Linoleico C ₁₈ H ₃₀ O ₂	Linolênico C ₁₈ H ₂₈ O ₂
	2						
Algodão	-	1,5	22	5	19	50	-
Amendoim		0,5	6,0-11,4	3,0 - 6,0	42,3 - 61	13 - 33,5	-
Babaçu	44-45	15-16,5	5,8-8,5	2,5 - 5,5	12-16	1,4 - 2,8	-
Coco	44-51	13-18,5	7,5-11	1-3	5 - 8,2	1,0 - 2,6	-
Dendê	-	0,6 - 2,4	32 - 45	4,0 - 6,3	38 - 53	6 - 12	-
Girassol	-	-	3,6 - 6,5	1,3 - 3,0	14 - 43	44 - 68	-
Linhaça	-	6	4	13 - 37	5 - 23	26 - 58	26- 58
Milho	-	-	7	3	43	39	-
Oliva	-	1,3	7 - 16	1,4-3,3	64-84	4-15	-
Soja	-	-	2,3 - 11	2,4 - 6	23,5 - 31	49 - 51,5	2 -10,5
Sebo	-		25-37	14-29	26-50	1- 2,5	-

Fonte: RINALDI *et al.* (2007)

1.5 – Processos para Obtenção de Biodiesel

Os principais processos para a produção de biodiesel consistem na transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com álcool, processo denominado de alcoólise, e a esterificação de ácidos graxos com álcool. Estes processos podem ser conduzidos por via química ou enzimática.

1.5.1 - Esterificação

A esterificação ocorre através da reação entre um ácido graxo e um álcool. Esse processo pode ser aplicado no aproveitamento de resíduos (ácidos graxos livres) de outros processos industriais (curtumes, resíduos de indústrias alimentícias, frigoríficos, abatedouros, etc.) (SRIVASTAVA e PRASAD, 2000; BARNWAL e SHARMA, 2005). Na Figura 1.4 está exemplificada a reação de esterificação.

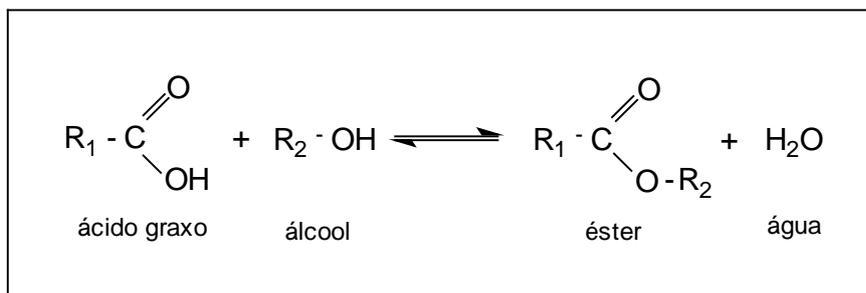


Figura 1.4 – Reação de esterificação

A esterificação direta do ácido graxo com álcool pode ser empregada como uma etapa de pré-tratamento na produção de biodiesel, quando o óleo vegetal ou gordura empregada possui elevado índice de acidez. Este pré-tratamento permite evitar a formação de sabões, que ocasiona uma redução do rendimento em biodiesel. A reação pode ocorrer empregando catalisadores enzimáticos, como as lipases, ou na presença de catalisadores ácidos como os ácidos sulfúrico (H_2SO_4), clorídrico (HCl) e metano sulfônico ($\text{H}_3\text{C-SO}_3\text{H}$). Quando catalisadores ácidos são empregados, são necessárias condições um pouco mais severas de temperatura (maiores que 100°C) e pressão, além de uma etapa adicional de neutralização do catalisador, bem como o emprego de equipamentos resistentes à corrosão (VICENTE, MARTÍNEZ e ARACIL, 2004).

1.5.2 Transesterificação

A reação de transesterificação, ou alcoólise, consiste na troca do álcool de um éster por outro empregando um processo similar à hidrólise, porém utiliza-se álcool no lugar da água (SRIVASTAVA e PRASAD, 2000).

A alcoólise consiste no principal processo de produção de biodiesel e corresponde à reação de transesterificação entre os triglicerídeos, presentes nos óleos vegetais e gorduras animais, e o álcool (metanol ou etanol) gerando como produtos éster alquílicos (biodiesel) e glicerol.

Na Figura 1.5, pode-se observar a estequiometria da reação de transesterificação, que requer 3 mols de álcool para 1 mol de triacilglicerol, produzindo 3 mols de ésteres de ácidos graxos e 1 mol de glicerol. O excesso de álcool favorece a formação do éster (biodiesel) através do deslocamento do equilíbrio da reação.

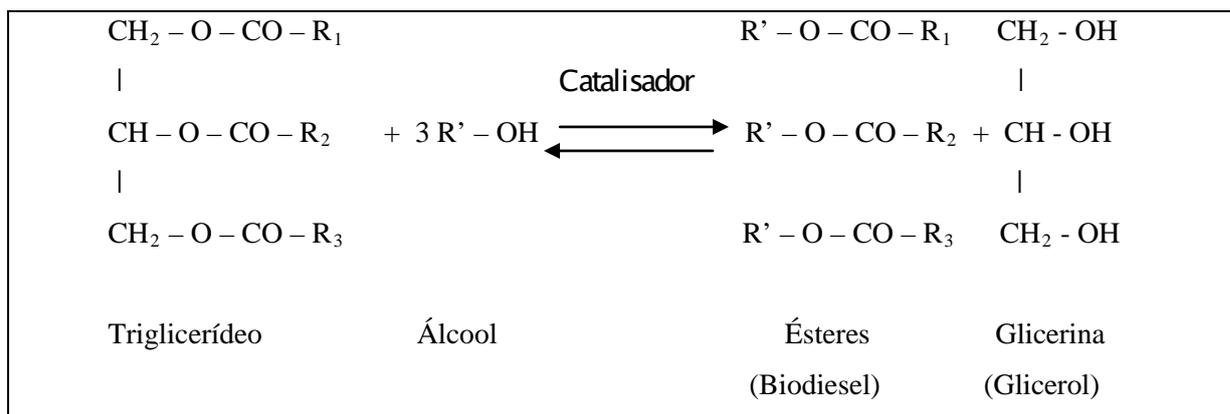


Figura 1.5 - Reação de transesterificação, onde R_1 , R_2 e R_3 são cadeias longas de hidrocarboneto e R' é uma cadeia de hidrocarboneto de um álcool simples (etanol ou metanol). Fonte: MELO *et al.* (2007).

A reação de transesterificação ocorre em etapas, onde os monoacilgliceróis e diacilgliceróis são os intermediários em uma sequência de três reações reversíveis e consecutivas (MARCHETTI *et al.*, 2007), conforme Figura 1.6.

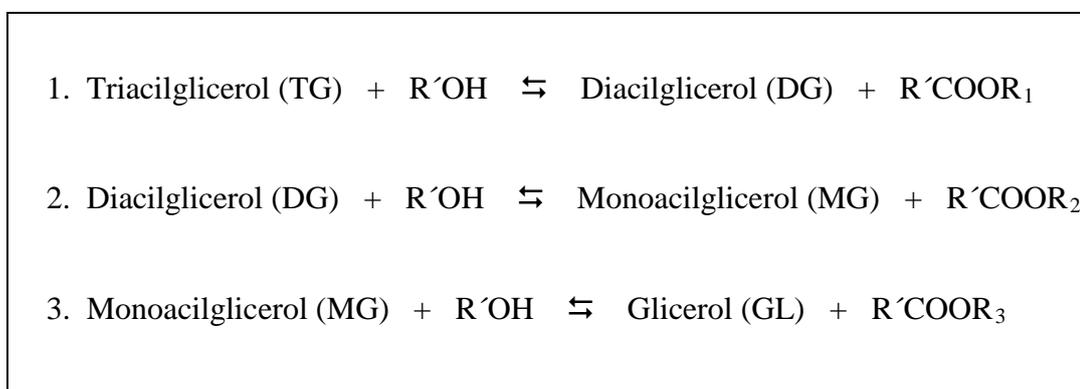


Figura 1.6 - Etapas das reações de transesterificação de triacilglicerol
Fonte: FUKUDA, KONDO e NODA, 2001; BARNWAL e SHARMA, 2005.

A transesterificação pode ser catalisada por catalisadores básicos (alcalinos), ácidos ou enzimáticos, em meios homogêneos ou heterogêneos. O processo pode ainda ser conduzido em fluidos supercríticos (DERMIBAS, 2007).

Os catalisadores alcalinos como os hidróxidos de sódio e potássio, se destacam pela alta taxa de reação e baixo custo. Porém, seu emprego ocasiona a formação de subprodutos indesejados como sabões, estes são produzidos através da reação de saponificação do

triacilglicerol (VICENTE, MARTÍNEZ e ARACIL, 2004). A formação destes subprodutos é responsável pela redução no rendimento da reação, além de dificultar a separação e purificação dos produtos. A etapa de remoção do catalisador é mais difícil, o que ocasiona um aumento nos custos tanto do processo quanto do produto final.

Quando catalisadores ácidos são empregados pode ocorrer corrosão nos equipamentos, bem como baixas taxas de reação, sendo necessária a utilização de pressões e temperaturas bem maiores que as utilizadas na catálise alcalina, aumentando assim os custos do processo (VICENTE, MARTÍNEZ e ARACIL, 2004).

Os catalisadores enzimáticos apresentam vantagens frente aos catalisadores ácidos e básicos como: facilidade de separação do biocatalisador imobilizado do produto (biodiesel), possibilitando a sua posterior recuperação, obtenção de produtos com maior grau de pureza, menor sensibilidade à presença da água (não ocorre o processo de saponificação e permite a utilização de etanol hidratado na reação), além de ser uma opção mais atrativa do ponto de vista ambiental, pois ocorre uma minimização dos resíduos gerados no processo (VILLENEUVE *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2008). Por todas as vantagens expostas anteriormente e pela diminuição de custos com energia e minimização da degradação térmica dos compostos, quando comparada com as vias químicas tradicionais, é que a transesterificação utilizando lipases imobilizadas como catalisadores vêm sendo estudada (HASAN *et al.*, 2006, ROYON *et al.*, 2007) apesar do seu maior custo.

A seguir serão apresentadas de forma geral as rotas de transesterificação empregando catálise alcalina (básica), catálise ácida e catálise enzimática.

1.5.2.1 *Catálise alcalina*

A catálise alcalina pode ser conduzida tanto em sistema homogêneo quanto em sistema heterogêneo. Os catalisadores alcalinos homogêneos empregados são os alcoóxidos como o metóxido de sódio e butóxido de sódio, carbonatos e os hidróxidos de sódio e potássio. Os hidróxidos de sódio e potássio são mais utilizados, pois são mais reativos e possuem menor custo (PINTO *et al.*, 2005). A catálise alcalina possui uma cinética de reação mais rápida, cerca de 4000 vezes mais rápida do que a ácida (FUKUDA, KONDO e NODA, 2001), e apresenta rendimentos em biodiesel superiores a 90%, sendo a mais empregada

comercialmente. Meher e colaboradores (2006) descreveram o mecanismo de reação de transesterificação por catalisador básico, que é apresentado na Figura 1.7

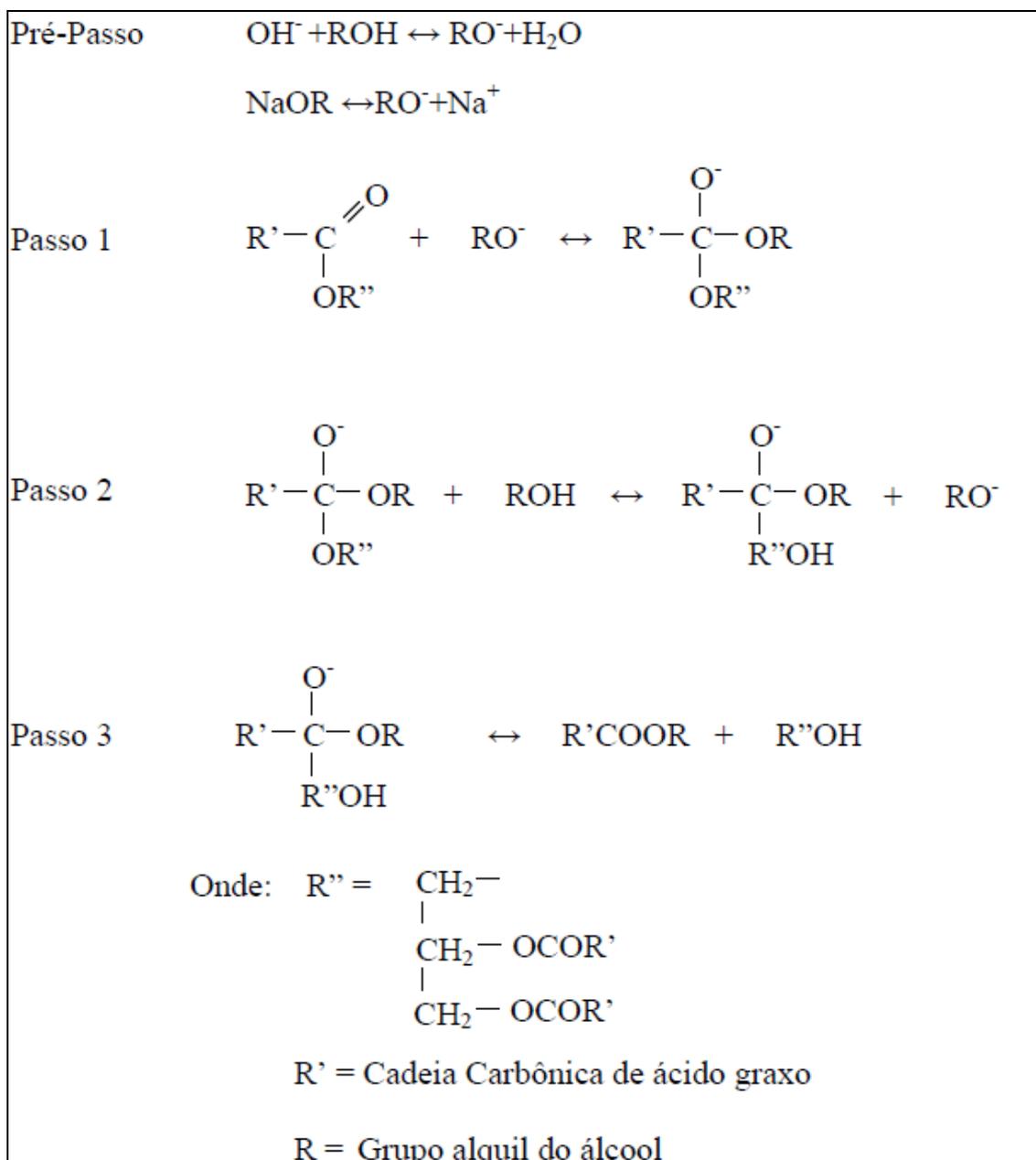


Figura 1.7 – Mecanismo da transesterificação catalisada por base
 Fonte: MEHER *et al.*, 2006.

O passo inicial da reação é a formação de um íon alcóxido pela adição de bases fortes. Em seguida, ocorre um ataque do íon alcóxido ao ácido carboxílico do triglicerídeo, resultando na formação de um intermediário tetraédrico. Em seguida, este intermediário reage com o álcool formando um íon alcóxido. Finalmente, ocorre um rearranjo entre os intermediários tetraédricos, gerando um éster e um diglicerídeo.

Quando hidróxidos são utilizados no pré-passo ocorre a formação de água no meio reacional. A presença desta água no meio reacional pode ocasionar a hidrólise dos ésteres formados, potencializando a produção de sabão, que ocorre devido ao ataque do íon hidróxido, que consome o catalisador reduzindo a eficiência catalítica. A produção de sabão também ocasiona um aumento na viscosidade e como consequência ocorre a formação de gel, que dificulta a separação do glicerol, comprometendo a qualidade do produto final (GERPEN e KNOTHE, 2005; HE *et al.*, 2008). Este processo é descrito na Figura 1.8.

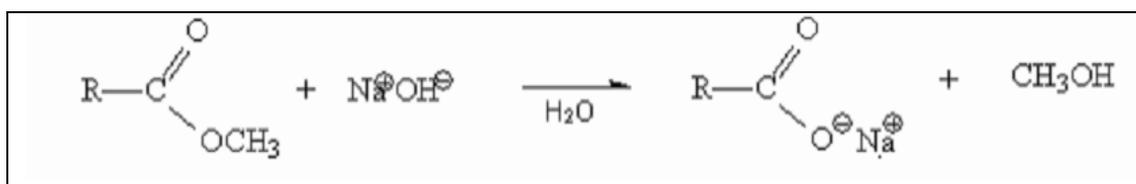


Figura 1.8 - Reação de hidrólise: saponificação.
Fonte: MILINSK (2007).

A razão molar álcool/óleo pode variar entre 1:1 a 6:1, sendo a última a mais utilizada. Os alcoóis mais usados são o metanol e o etanol, sendo o etanol menos tóxico. O teor de catalisador varia de 0,5 a 1% (m/m) (massa de catalisador por massa de óleo). A temperatura mais empregada é a de 60°C, que pode variar dependendo do catalisador empregado, afetando também o rendimento final da reação (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007).

A presença de ácidos graxos livres no óleo também ocasiona a formação de sabão, que dificulta a separação dos ésteres no processo. Para que os ácidos graxos livres sejam eliminados são necessárias etapas preliminares. Quando este teor de ácido graxo é alto, acima de 3%, são necessários estágios de esterificação com um catalisador ácido. Nesse processo o ácido graxo reage com metanol, na presença de ácido sulfúrico como catalisador. A reação é seguida da decantação por gravidade. A camada de ácido é processada para recuperação do metanol e a camada de éster é processada para a transesterificação.

Assim, as vantagens do emprego de catalisadores básicos na síntese de biodiesel são: taxa elevada de reação, emprego de baixa concentração dos catalisadores e altos rendimentos.

As desvantagens deste processo são: a necessidade de remoção de sais inorgânicos do produto, o tratamento dos efluentes do processo (água alcalina residual) (FUKUDA *et al.*, 2001) e a especificação da matéria-prima, já que esta não pode conter um elevado teor de água nem de ácidos graxos livres, para não acarretar na formação de sabão.

No fluxograma apresentado na Figura 1.9 são descritas as principais etapas de fabricação do biodiesel.

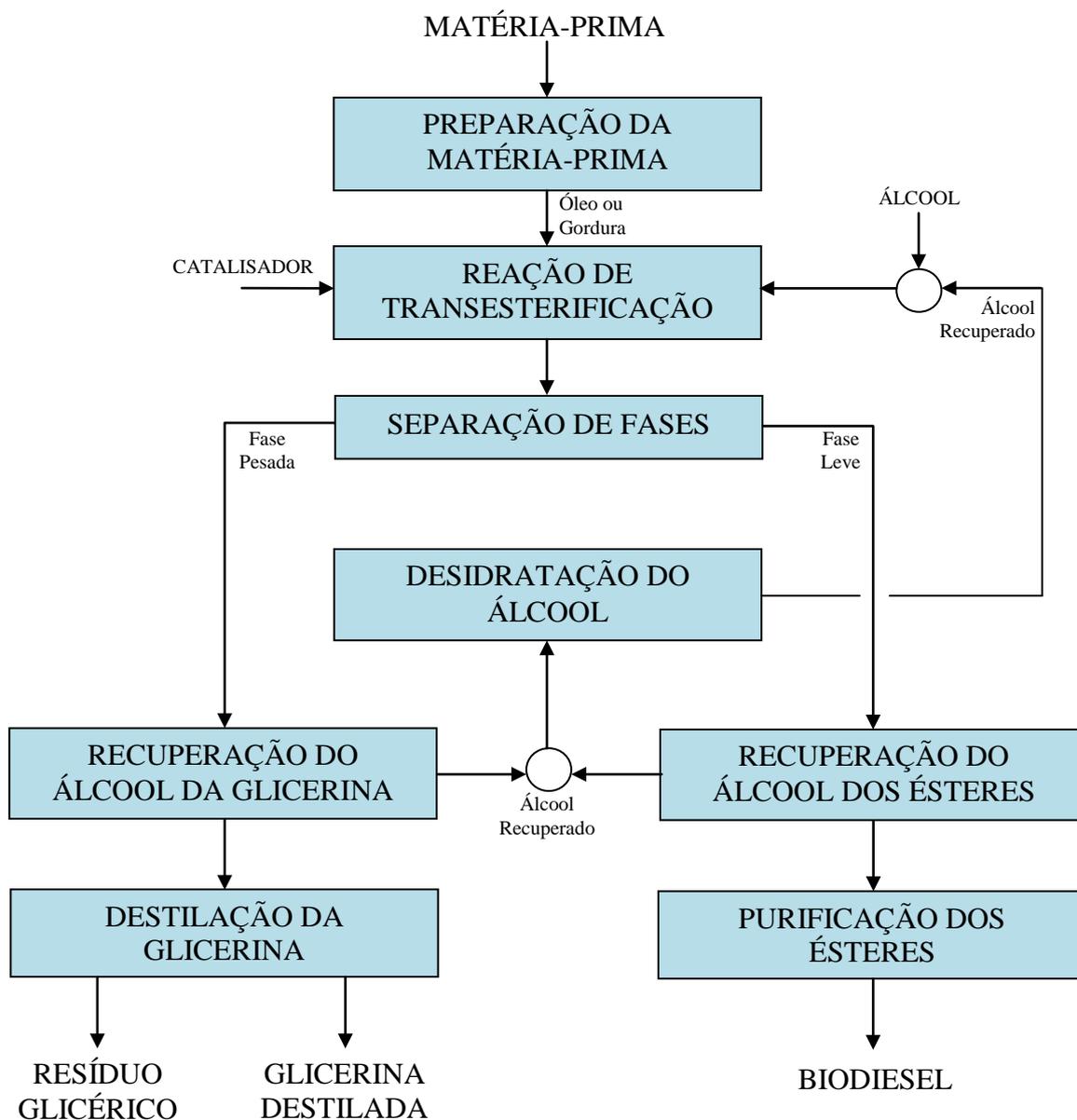


Figura 1.9 – Processo de produção de biodiesel.
Fonte: PARENTE (2003)

Na primeira etapa, é realizada a preparação da matéria-prima, que é submetida a um processo de neutralização, através da lavagem com solução alcalina de hidróxido de potássio ou sódio, depois é realizada a secagem e desumidificação, para que a matéria-prima tenha teores de umidade e acidez mínimos (DORADO, 2004).

Na segunda etapa, ocorre a reação de transesterificação do triglicerídeo com o metanol, onde um excesso de álcool é empregado, a fim de deslocar o equilíbrio da reação no sentido de formação do produto desejado. O metanol é mais utilizado devido a suas propriedades físico-químicas (cadeia curta e polaridade), porém o etanol se torna mais interessante já que é produzido em larga escala no Brasil, possui caráter renovável e é menos tóxico. O catalisador mais empregado é o hidróxido de sódio tanto pelas razões econômicas como pela disponibilidade no mercado (PARENTE, 2003).

Na terceira etapa, o produto da reação que é constituído de duas fases, é separado por decantação ou centrifugação. A fase mais pesada é formada por glicerina bruta e a fase menos densa é constituída por uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos (PARENTE, 2003). Esta etapa é a mais importante do processo, visto que o refino dos produtos é tecnicamente difícil e assim pode elevar os custos de produção. A pureza do Biodiesel tem que ser alta (DORADO, 2004), a especificação da União Européia exige teores mínimos de ácidos graxos livres, álcool, glicerina e água a fim de que a pureza do biodiesel seja maior que 96,5% (MA e HANNA, 1999). O glicerol na sua forma pura é removido e revendido a fim de manter a competitividade do custo de produção (MA e HANNA, 1999).

Na quarta etapa, a fase pesada é submetida a um processo de evaporação a fim de separar a água do álcool. Os vapores de álcool e água são liquefeitos e recolhidos em um condensador. O álcool residual é recuperado da fase leve liberando os ésteres metílicos ou etílicos para as etapas seguintes. Após essa recuperação, o álcool ainda tem água e deve ser desidratado. A desidratação é feita por destilação (SCHUCHARDT, 1998).

Na quinta etapa, o glicerol, que é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel (10% do volume total de biodiesel equivalem a glicerol), é purificado (DASARI *et al.*, 2005). A purificação da glicerina bruta pode ser feita por destilação a vácuo, gerando um produto límpido e transparente.

Na última etapa, é realizada a purificação do biodiesel, onde os ésteres serão lavados, centrifugados e desumidificados para, posteriormente, serem enquadrados nas especificações das normas técnicas estabelecidas para que o biodiesel seja empregado como combustível nos motores do ciclo diesel (SCHUCHARDT, 1998).

1.5.2.2 *Catálise ácida*

Os catalisadores ácidos homogêneos mais utilizados neste método de produção de biodiesel são os ácidos sulfúrico, clorídrico, fosfórico e sulfônico (FUKUDA, KONDO e NODA, 2001). Dentre os catalisadores citados, o ácido sulfônico apresenta o rendimento mais elevado, contudo a reação é mais lenta e requer um tempo elevado para a formação do produto (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007). O catalisador ácido mais empregado é o ácido sulfúrico. A faixa de temperatura empregada no processo varia entre 55 e 85°C, a razão molar álcool/óleo empregada é de 30:1 e a concentração de ácido sulfúrico é 1% (molar), o que permite uma conversão final de 99%, após 50 h de reação (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007).

O processo de catálise ácida apresenta uma série de desvantagens, tais como: menor velocidade de reação, alta relação molar álcool/óleo, maior consumo de catalisador, bem como um elevado gasto energético, já que temperaturas elevadas são requeridas neste processo. Os resíduos gerados precisam de tratamento antes de ser descartados, pois possuem elevada acidez. A principal desvantagem da utilização deste processo é a necessidade de remoção/neutralização do catalisador após a reação de transesterificação com a finalidade de prevenir danos aos equipamentos (corrosão) (CANAKSI e GERPEN, 2001).

Na Figura 1.10 são descritas as etapas que compõem a reação de produção de biodiesel empregando catálise ácida.

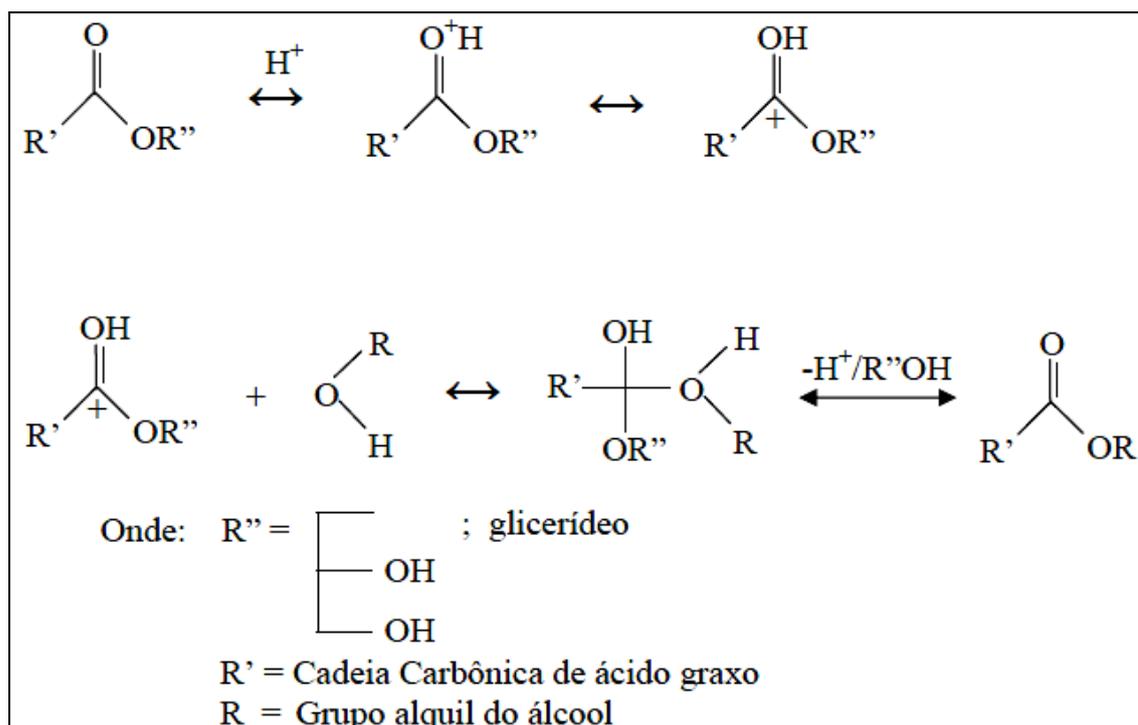


Figura 1.10 – Mecanismo de transesterificação catalisada por ácido
 Fonte: MEHER *et al.*, 2006

A protonação de um grupo carbonila do triglicerídeo forma um carbocátion que, depois do ataque nucleofílico do álcool, produz o intermediário tetraédrico. Este intermediário elimina o glicerol para formar o novo éster e regenera o catalisador (MEHER *et al.*, 2006).

Schuchardt e colaboradores (2006) afirmam que na transesterificação por catalisador ácido, os carbocátions gerados a partir do ácido carboxílico podem ser formados devido à presença de água no sistema reacional, uma vez que a água compete pelo carbocátion (para formação de ácido carboxílico), diminuindo o rendimento da reação.

A vantagem do emprego da catálise ácida é a possibilidade da utilização de óleos não refinados e resíduos industriais e domésticos ricos em triacilgliceróis. Como estes materiais possuem altos teores de ácidos graxos livres, não podem ser utilizados diretamente na transesterificação alcalina, pois, neste caso, necessitariam de uma etapa de pré-tratamento. Assim, a transesterificação ácida também é indicada para a produção de biodiesel quando a matéria-prima contém um teor de ácidos graxos livres alto (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007), nesse caso também é possível o emprego da esterificação. Deste modo, a utilização de catalisadores ácidos na transesterificação destas matérias-primas não ocasiona a saponificação dos ácidos graxos livres, conduzindo a um aumento no rendimento em ésteres alquílicos (biodiesel).

1.5.2.3 *Catálise enzimática*

O processo tradicional de produção de biodiesel, como já mencionado, emprega a transesterificação de óleos vegetais refinados com alcoóis de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de um catalisador básico homogêneo, como hidróxido de sódio ou potássio. Contudo, esses processos catalíticos apresentam algumas dificuldades como a remoção do catalisador básico após a reação e geração de um grande volume de efluentes. Além disso, é necessário utilizar óleos vegetais refinados, nos quais o teor de ácidos graxos livres seja pequeno (<0,1%), a fim de evitar a formação de emulsão que dificulta o processo de separação do biodiesel (SARAF e THOMAS, 2007). No processo químico convencional, o custo do óleo vegetal refinado representa cerca de 75% do custo de produção do biodiesel (HAAS *et al.*, 2006). Uma alternativa estudada para a produção de biodiesel é baseada no emprego da rota enzimática que permite a utilização de óleos e gorduras não refinados (WATANABE *et al.*, 2005). O processo enzimático é baseado na utilização de lipases imobilizadas, que catalisam simultaneamente as reações de esterificação e de transesterificação em meio não aquoso, o que permite o emprego de óleos vegetais com alto índice de acidez. Além disso, o uso de lipases imobilizadas apresenta vantagens, tais como: condução da reação em condições moderadas de temperatura e pressão, bem como o reuso do catalisador. Cabe ressaltar, que lipases livres também podem catalisar reações em condições moderadas de temperatura e pressão como as lipases imobilizadas.

Neste cenário a transesterificação enzimática surge como uma alternativa capaz de solucionar os problemas encontrados na transesterificação química, como a difícil recuperação do glicerol e a conversão incompleta dos ácidos graxos livres (FELIZARDO *et al.*, 2006).

A etapa de separação do produto é facilitada pelo emprego de lipases imobilizadas (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007), já que a separação da enzima do glicerol bruto é realizada através de um processo de centrifugação. Deste modo, a recuperação do glicerol é mais simples e a enzima imobilizada pode ser reutilizada. Sendo assim, o emprego de enzimas minimiza os resíduos gerados no processo, o que reduz o impacto ambiental.

Na Tabela 1.3 é apresentada uma comparação entre o processo enzimático e o processo químico (alcalino e ácido).

Vários autores vêm estudando o emprego de lipases na produção de biodiesel, sendo as mais empregadas aquelas provenientes de *Candida antarctica* (Novozym 435), *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM), *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-IM).

Oliveira e colaboradores (2004) estudaram a etanólise do óleo de mamona empregando a lipase Novozym 435 (20% (m/m)), a 65°C e razão molar óleo:etanol de 1:10. Ao final de 6 h o rendimento obtido foi de 81,4%. Neste estudo também foi avaliado o potencial da lipase Lipozyme IM na transesterificação do óleo de mamona, utilizando 20% (m/m) desse biocatalisador a 65°C e razão molar óleo:etanol de 1:3. O rendimento alcançado após 8 horas de reação foi de 98%.

A etanólise de óleo de soja foi estudada por Bernardes e colaboradores (2007) usando a lipase Lipozyme RM-IM. Os autores obtiveram rendimento em biodiesel de 55% após 4 h de reação nas seguintes condições reacionais: razão molar etanol:óleo de soja de 3, com adição do etanol de forma escalonada em 3 etapas, temperatura de 50°C e um teor de enzima de 7% (m/m).

A lipase Novozym 435 foi testada por Souza *et al.* (2009) para a síntese de ésteres alquílicos a partir da reação entre o desodorizado de óleo de soja e o etanol empregando as lipases Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM. O rendimento mais alto, 83,5%, foi obtido após 1,5 h de reação a 50°C utilizando o biocatalisador Novozym 435 (3% (m/m)), uma razão molar ácido graxo:etanol 1:1, com adição do etanol de forma escalonada em 2 etapas.

Tabela 1.5 – Comparação entre o processo enzimático e os processos químicos para a produção de biodiesel

Parâmetro	Processo Enzimático	Processo Alcalino	Processo Ácido
Presença de ácidos graxos livres na matéria-prima	Ácidos graxos livres são convertidos em biodiesel	Ácidos graxos livres são transformados em sabão	Ácidos graxos livres são convertidos em biodiesel
Presença de água na matéria-prima	Não é prejudicial para a lipase até o teor mínimo, acima deste pode prejudicar a atividade da lipase.	Formação de sabão. Hidrólise do óleo forma mais sabão	Desativação do catalisador
Rendimento em biodiesel ^a	Alto, em torno de 90%	Muito alto, >96%	Alto (>90%), somente para razão molar álcool:óleo alta, alta concentração de catalisador e alta temperatura
Taxa de reação ^b	Baixa	Alta	Mais lento que o processo alcalino
Recuperação do glicerol	Fácil, glicerol de alta qualidade	Complexa, glicerol de baixa qualidade	Complexa, glicerol de baixa qualidade
Recuperação do catalisador e reuso	Fácil (enzimas imobilizadas) Reuso provado mas não suficientemente estudado	Diffícil; Neutralizado por um ácido parcialmente nas etapas de processamento posteriores	Diffícil, O catalisador termina com os produtos não é reutilizável
Custo energético	Baixo Temperatura: 20-50°C	Médio Temperatura: 60-80°C	Alto Temperatura: >100°C
Custo do catalisador	Muito alto	Baixo	Baixo Alto custo do equipamento devido à corrosão ácida
Impacto Ambiental	Baixo; porém é necessário o tratamento da enzima imobilizada após seu uso.	Alto; é necessário o tratamento do efluente	Alto; é necessário o tratamento do efluente

Fonte: ROBLES-MEDINA *et al.* (2009)

Nota: ^aPorcentagem do óleo inicial transformado em biodiesel

^bMassa de biodiesel produzida por volume do reator e por unidade de tempo

Rodrigues e colaboradores (2010) também investigaram a síntese de biodiesel a partir da transesterificação de óleo de soja com etanol catalisada por Lipozyme TL-IM. O rendimento em biodiesel, alcançado ao final de 100 h de reação foi de aproximadamente 100%. A reação foi conduzida utilizando 15% (m/m) de biocatalisador, 4% de água, razão

molar etanol:óleo de soja de 7,5:1, *n*-hexano como co-solvente e temperatura de reação de 30°C; no sistema livre de solvente o rendimento obtido foi de 75%.

Apesar das vantagens da catálise enzimática, o alto custo das enzimas é o maior responsável pela dificuldade do seu emprego na indústria. Para minimizar seu custo, a enzima pode ser imobilizada, o que permite a sua fácil recuperação e reuso (BALCÃO, PAIVA e MALCATA, 1996). O advento da engenharia genética e de novos métodos de imobilização das enzimas proporciona um aumento na estabilidade, permite a reutilização da enzima, reduz o custo, o que torna cada vez mais promissor o seu emprego em escala industrial. A imobilização das lipases pode aumentar sua estabilidade, por exemplo, à presença de solvente orgânico. Verifica-se também maior estabilidade térmica da enzima em relação a sua forma livre (MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007).

1.6 – Lipases

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (BROCKMAN *et al.*, 1988). Pertencentes à família das hidrolases, as lipases atuam na interface orgânica-aquosa demonstrando níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes aquosos e não-aquosos, ao contrário de outras enzimas (HASAN *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2008; SAXENA *et al.*, 1999). A função biológica das lipases é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis (TAG) de cadeia longa, bem como realizar a síntese reversa, a reação de esterificação de ácidos graxos de cadeia longa com glicerol (HASAN *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2008; SAXENA *et al.*, 1999).

1.6.1 Fontes de Lipases

As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal e microbiana (bactérias e fungos) (MARTINS *et al.*, 2008). Nos animais, estas enzimas participam do metabolismo de lipídeos, como a digestão, a absorção, a reconstituição de gorduras e também no metabolismo de lipoproteínas. Nas plantas, são encontradas em tecidos de reserva de energia (SHARMA *et al.*, 2001).

Do ponto de vista industrial e econômico, as lipases microbianas apresentam inúmeras vantagens frente às lipases de origens animal e vegetal. Uma vez que as lipases microbianas são em sua maioria extracelulares, apresentam procedimento mais fácil de extração, de isolamento e de purificação tendo um custo de produção menor. As lipases microbianas são mais estáveis e possuem propriedades distintas das lipases de origem animal e vegetal (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 1975; MARTINS *et al.*, 2008; NAWANI *et al.*, 1998; SHARMA *et al.*, 2001), propiciam altos rendimentos, possuem facilidade de manipulação genética e podem ser produzidas regularmente devido à ausência de flutuações sazonais e rápido crescimento dos microrganismos em meios relativamente baratos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As lipases podem ser produzidas por fermentação a partir de microrganismos, dos quais se destacam os seguintes gêneros: bactérias: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Acinetobacter* e *Aeromonas*; fungos filamentosos: *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Beauveria*, *Humicola*, *Rhizomucor*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Eurotrium*; leveduras: *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Toulospora* e *Trichosporon*. Estes microrganismos têm sido encontrados em diversos ambientes, como efluentes industriais, fábricas de processamento de óleo vegetal, indústrias de laticínios, solos contaminados com óleo, óleos de sementes e alimentos em decomposição (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

1.6.2 Propriedades das Lipases

A massa molecular das lipases pode variar entre 20 a 75 kDa. A atividade ótima é observada na faixa de pH entre 4 a 9 e em temperatura entre a ambiente até 70°C, mas com atividade ótima na faixa entre 30 e 40°C. A termoestabilidade das lipases varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que apresentam maior estabilidade térmica (CASTRO *et al.*, 2004).

Quanto à especificidade em relação ao substrato (regioseletividade), as lipases microbianas podem ser classificadas em três grupos (MACRAE e HAMMOND, 1985):

Não-específicas: As lipases pertencentes a este grupo não apresentam especificidade com relação à natureza do grupo acil ou à posição em que esse grupo está esterificado na molécula de glicerol. Clivam aleatoriamente as moléculas dos acilgliceróis, gerando como produtos ácidos graxos livres (FFAs) e glicerol, e como intermediários mono- e diglicerídeos. Pertencem a esta categoria as lipases produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum*, *Thermomyces lanuginosus* e *Pseudomonas sp.*, *Penicillium cyclopium*, *Corynebacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Candida cylindracea*.

1,3 específicas: As lipases 1,3 específicas são responsáveis por catalisar a liberação dos ácidos graxos especificamente das posições sn-1 e sn-3 dos acilgliceróis, gerando produtos com composições diferentes dos obtidos pelas lipases não regioseletivas. Geralmente, a hidrólise de triglicerídeos a diglicerídeos é muito mais rápida do que a de triglicerídeos em monoglicerídeos. A hidrólise total pode ocorrer se a reação for por tempo prolongado, considerando-se que o 2-monoacilglicerol ou 1,2 (2,3)- diacilglicerol formados, ambos quimicamente instáveis, podem ser isomerizados espontaneamente para as posições 1 ou 3. As lipases de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhizopus niveus*, *Penicillium roquefortii* pertencem a esta categoria. A lipase pancreática é uma típica lipase sn-1,3 específica e algumas lipases vegetais (de colza, de mostarda e de lupino) têm demonstrado possuir este tipo de especificidade.

Ácido graxo específicas: As lipases deste grupo são responsáveis pela catálise da hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de triacilgliceróis (TAG). Um representante típico deste grupo é a lipase de *Geotrichum candidum*, que hidrolisa

preferencialmente grupos acila de cadeia longa, que contenham dupla ligação cis na posição 9.

Além disso, as lipases podem apresentar ainda especificidade estereoquímica, atuando particularmente sobre um dos isômeros ópticos, onde um dos isômeros de um racemato é hidrolisado preferencialmente sobre o outro, ou mesmo a formação de um isômero pode ser catalisada seletivamente por precursores quirais, tais como meso-diéster ou meso-diol compostos. As lipases de *Burkholderia cepacia*, *Pseudozyma antarctica*, *Candida rugosa* e *Rhizopus delemar* possuem esta especificidade (QUEIROZ, 2002).

1.6.3 Reações Catalisadas por Lipases

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis conforme descrito na Figura 1.11.

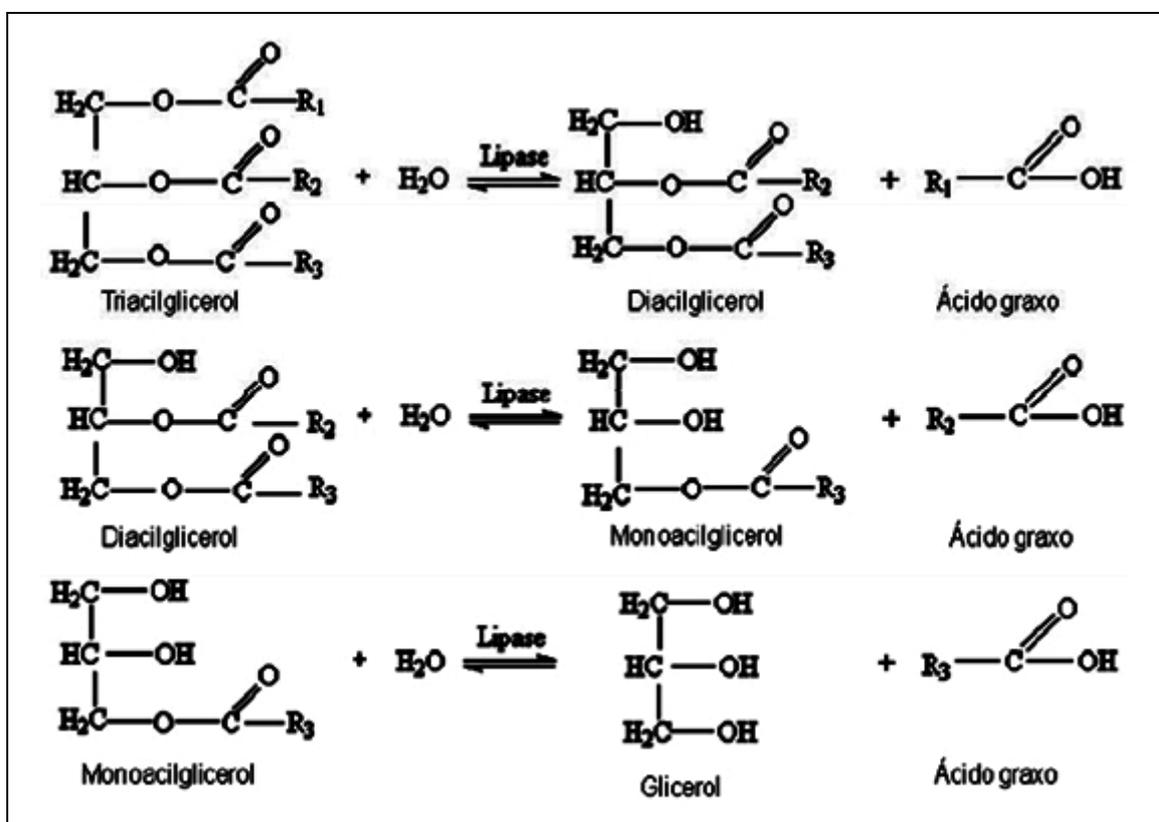


Figura 1.11 – Representação esquemática da atuação da lipase sobre os acilgliceróis.

Fonte: DEREWENDA (1994).

Também podem catalisar reações de esterificação e de interesterificação (alcoólise, acidólise e transesterificação) representadas na Figura 1.12 (RODRIGUES, 2009).

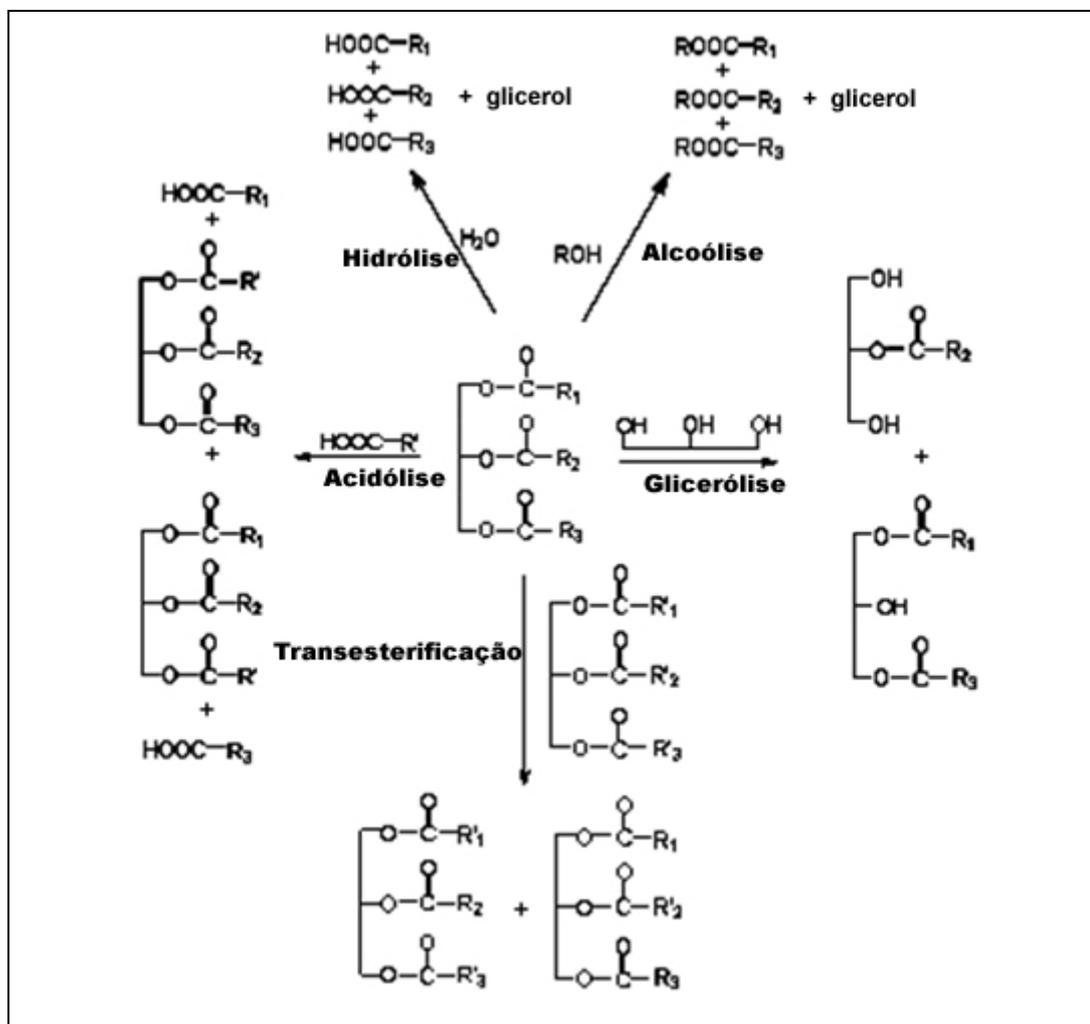


Figura 1.12 - Representação esquemática das reações catalisadas por lipases

Fonte: (RODRIGUES, 2009)

A reação de hidrólise consiste no ataque à ligação éster do triacilglicerol (TAG) para produzir glicerol e ácidos graxos, na presença de água. A reação de esterificação é a reação inversa da hidrólise, ocorrendo entre alcóois polihídricos e ácidos graxos livres do glicerídeo correspondente. A relação entre as velocidades da reação direta (hidrólise) e da reação inversa (esterificação) é normalmente controlada pelo conteúdo de água do meio de reação (CARVALHO *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2004). O termo interesterificação relaciona-se com a troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise) ou um éster e outro éster (transesterificação). Nestas reações um ácido graxo, um álcool ou

outro éster, reagem com o TAG, resultando em um rearranjo dos grupos de ácidos graxos do TAG produzindo um novo TAG com propriedades físicas e químicas diversas. O rearranjo é resultado de reações concorrentes, de hidrólise e de esterificação. Sob condições nas quais a quantidade de água no sistema é restrita, a hidrólise de gordura pode ser minimizada de forma que a interesterificação seja a reação dominante (CARVALHO *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2004).

1.6.4 Estrutura Protéica

Lipases são serina hidrolases e seu sítio ativo, localizado no sentido C-terminal da estrutura β , é composto por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico (ou glutâmico). Essa tríade, que contém o resíduo nucleofílico (serina em Gly x Ser x Gly, onde o x é qualquer aminoácido com exceção da prolina), está protegida por um oligopeptídeo hidrofóbico chamado de tampa ou lid (na qual o resíduo de aminoácido histidina da tríade está inserido) (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ,1999). A Figura 1.13 ilustra essa estrutura.

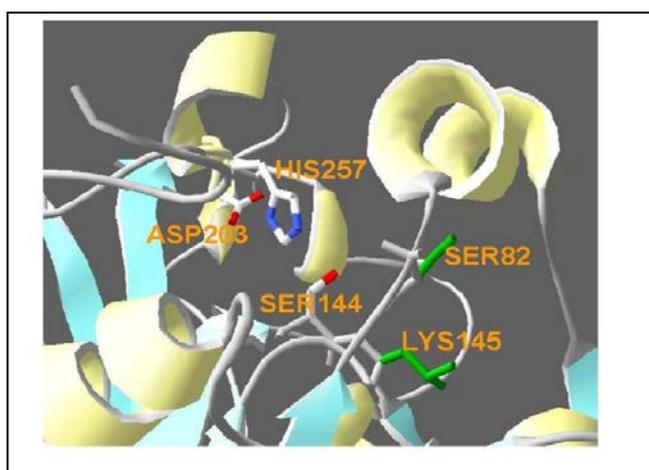


Figura 1.13 - Estrutura da lipase de *Rhizomucor miehei*
Fonte: Protein Data Bank

A função da tampa hidrofóbica seria permitir o acesso do substrato ao sítio catalítico através do fenômeno de ativação interfacial. A interação entre a tampa hidrofóbica e uma interface lipídeo/água provoca uma alteração conformacional na estrutura da enzima, que por sua vez promove a abertura da tampa, e, conseqüentemente, a exposição do sítio ativo

(ALOULOU *et al.*, 2006; VERGER, 1997; DODSON, LAWSON; WINKLER, 1992). Na conformação em que o sítio ativo da enzima está fechado pela tampa, que cobre a entrada do sítio ativo deixando-o completamente isolado do meio da reação, a lipase é considerada inativa. Já a segunda conformação ocorre quando há ligação do substrato na superfície da enzima. Neste caso, a tampa desloca-se alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, deixando o sítio ativo acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica, que facilita a ligação da lipase à interface hidrofóbica (conformação ativa). Este fenômeno é nomeado como ativação interfacial (BULCHHOLZ *et al.*, 2005). Por isso, as lipases atuam preferencialmente em interfaces água-óleo, ou água-solvente orgânico, e a ativação interfacial relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, atuando preferencialmente em substratos emulsionados. Devido a esta grande superfície hidrofóbica apresentada em sua conformação ativa, estas enzimas apresentam uma enorme afinidade por qualquer tipo de superfície hidrofóbica.

Quanto ao movimento da tampa, além da desobstrução espacial e da formação da superfície hidrofóbica, este é fundamental para que um dos resíduos responsáveis pela formação da cavidade do oxiânion (Ser82) adquira uma conformação favorável para estabilização do intermediário tetraédrico.

1.6.5 Mecanismo Catalítico

O mecanismo catalítico de reações de hidrólise ou de síntese de ésteres catalisadas pelas lipases é baseado no mecanismo proposto para proteases, devido à semelhança estrutural entre o sítio ativo destas enzimas (presença da tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu). O centro ativo fica oculto pela tampa polipeptídica na forma nativa da enzima, o que o torna inacessível às moléculas do substrato que estejam isoladas em meio aquoso. A ativação da enzima, como mencionado anteriormente, ocorre quando há contato com uma interface, e então, há a abertura dessa tampa polipeptídica. Essa abertura consiste na reestruturação conformacional da lipase que cria uma região eletrofílica (“buraco do oxiânion”) em torno do resíduo serina: a tampa helicoidal vira-se para trás encobrindo seu lado hidrofílico em uma cavidade polar, antes preenchida por moléculas de água, e expondo totalmente o lado hidrofóbico da tampa. Essa exposição faz com que a superfície apolar em torno do sítio catalítico seja expandida. O buraco do oxiânion é responsável pela estabilização de cargas

negativas geradas durante o ataque nucleofílico na ligação carbonila do substrato, portanto estabiliza o estado de transição durante a catálise (PAIVA *et al.*, 2000).

A ação das lipases é, geralmente, descrita pelo mecanismo cinético ping-pong bi bi. Este mecanismo consiste de duas etapas principais:

1) ataque nucleofílico na ligação éster do substrato pelo átomo de oxigênio do grupo hidroxila do resíduo serina do sítio ativo após a abertura da tampa (resultando na formação de complexo enzimático acilado e desprendimento de espécie álcool do substrato original) e;

2) hidrólise do complexo enzimático acilado, resultando na regeneração da enzima (JAEGER *et al.*, 1999; PAIVA *et al.*, 2000).

1.7 – Fatores que influenciam o processo de produção de biodiesel empregando lipases.

Vários fatores influenciam a atividade das lipases no processo de produção de biodiesel, dentre os quais se podem destacar: a forma da lipase (livre ou imobilizada), o tipo de álcool, a razão molar álcool/óleo e a forma de adição do álcool, a temperatura, o teor de água, o tipo de óleo empregado, o nível de acidez do óleo e a forma de condução do processo de produção de biodiesel, ou seja, em regime batelada ou contínuo (RIBEIRO *et al.*, 2011).

1.7.1 - Enzimas Livres e Imobilizadas

O uso de lipases em sua forma livre para a produção de biodiesel resulta em limitações técnicas como a impossibilidade de recuperação e posterior reutilização, por isto a utilização de lipases comerciais imobilizadas é necessária. Uma vez que esta permite a reutilização do catalisador e evita a lixiviação, já que a lipase permanece vinculada ao suporte, aumentando a superfície de contato, elevando a transferência de massa. Deste modo, ocorre um aumento na eficiência do catalisador, diminuindo os custos do processo e melhorando a qualidade do produto final (TAN *et al.*, 2010).

As enzimas imobilizadas mais empregadas na produção de biodiesel são Lipozyme RM-IM de *Rhizomucor miehei* imobilizada em uma resina aniônica, Lipozyme TL-IM de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em sílica gel e Novozym 435 de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica macroporosa (FJERBAEK *et al.*, 2009).

1.7.2 Tipo de Álcool

Os alcoóis mais empregados para a produção de biodiesel incluem metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, *n*-butanol e iso-butanol. Dentre esses alcoóis, metanol e etanol são os mais baratos e produzidos em larga escala, por isso vem sendo utilizados para a produção de biodiesel (NELSON *et al.*, 1996). Contudo, esses dois alcoóis são fortes agentes desnaturantes para as enzimas (NELSON *et al.*, 1996). Além disso, a taxa de reação de transesterificação catalisada por lipase geralmente aumenta com o comprimento da cadeia do álcool. Apesar das razões expostas anteriormente, o metanol é o mais utilizado devido ao seu baixo custo e suas vantagens físicas e químicas (polar e menor cadeia carbônica) (MA e HANNA, 1999). No Brasil, o etanol vem sendo amplamente empregado por ser obtido a partir de uma fonte renovável (biomassa). Vale ressaltar que o metanol também pode ser produzido a partir de biomassa, contudo seu emprego exige um cuidado maior com a segurança já que este é mais tóxico que o etanol. No entanto, os ésteres etílicos são mais solúveis no glicerol, o que dificulta a sua separação, reduzindo o rendimento do processo de obtenção do biodiesel (GERPEN, 2005).

Nelson, Foglia e Marmer (apud FUKUDA, KONDO e NODA, 2001) observaram diferença significativa no rendimento da transesterificação de triacilgliceróis empregando vários álcoois de cadeia curta catalisada por diferentes lipases. A lipase obtida de *Mucor miehei* foi mais eficiente com álcoois primários, enquanto a da *Candida antarctica* teve uma performance mais elevada com álcoois secundários. Foram obtidos rendimentos em biodiesel na faixa de 94,8 a 98,5% para a transesterificação com metanol, etanol, propanol, *n*-butanol e isobutanol, contra 83,3% para isopropanol e 2-butanol.

Hernández-Martin e Otero (2007) estudaram a transesterificação enzimática de diferentes óleos vegetais (óleo de girassol, de oliva e óleo de soja) empregando as lipases Lipozyme TL-IM e Novozym 435. As maiores conversões foram alcançadas quando óleo de soja foi empregado como substrato. As condições de reação para a lipase Novozym 435

foram: teor de biocatalisador 10% (m/m), razão molar etanol/ácido graxo residual de 6, tempo de reação 24 h e temperatura de 25°C, tendo sido obtido um rendimento em ésteres etílicos de 86%. Já para a lipase Lipozyme TL-IM, as condições experimentais foram: teor de biocatalisador de 10% (m/m), razão molar etanol/ácido graxo residual de 2, tempo de reação 24 h e temperatura de 25°C, sendo obtido um rendimento em ésteres etílicos de 81%. Quanto à influência do tipo de álcool, esta foi estudada empregando a lipase Novozym 435 em um teor de 50% (m/m), uma razão molar álcool/ácido graxo residual de 6,5 a 25°C. Em 24 h a etanólise proporcionou uma conversão de 100% dos ácidos graxos residuais a ésteres etílicos, enquanto a metanólise obteve uma conversão de ésteres metílicos de 85%.

1.7.3 Razão molar álcool / óleo e forma de adição do álcool

A razão molar entre álcool e óleo é uma das mais importantes variáveis que afetam o rendimento da transesterificação. Excesso de álcool, considerando que a razão estequiométrica molar de álcool/óleo é de 3:1, é usado para assegurar uma alta taxa de reação e minimizar as limitações difusionais. Contudo, este excesso não pode ser exagerado, já que como dito anteriormente, alcoóis de cadeia curta podem inativar a enzima devido ao aumento da polaridade do meio e à remoção da camada de água que solvata a enzima (RODRIGUES, 2008). Este efeito foi observado por Brusamarello e colaboradores (2010) na transesterificação do óleo de soja, onde a razão molar etanol/óleo foi de 6:1 e uma conversão de 93% foi alcançada após 8 h de reação. Quando a razão molar foi aumentada para 9:1 e 12:1 a conversão caiu para 51 e 55%, respectivamente. Shimada e colaboradores (2002) observaram a inativação da lipase de *Candida antarctica* por metanol e etanol quando a razão molar álcool:óleo foi maior que 3:1.

A forma de adição do álcool também afeta o rendimento da reação. As enzimas sofrem desativação quando submetidas a elevadas concentrações de álcool (HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2007). Por isso, várias estratégias vem sendo empregadas para solucionar este problema. Alguns autores empregam a adição escalonada do álcool, ao invés de uma adição única no início da reação. Nelson, Foglia e Marmer (apud FUKUDA, KONDO e NODA, 2001), Shimada *et al.* (2002) e Bernardes *et al.* (2007) utilizaram adição escalonada de álcool de modo a elevar o rendimento final em biodiesel.

Shimada e colaboradores (2002) empregaram 1/3 do volume total de metanol no início da reação, 1/3 após 10 h e 1/3 após 24 h da reação de metanólise do óleo vegetal empregando a lipase de *Candida antarctica*. Nelson, Foglia e Marmer (apud FUKUDA, KONDO e NODA, 2001) minimizaram a desativação ocasionada pelos alcoóis secundários (isopropanol e 2-butanol) através da diluição destes em hexano na reação de transesterificação enzimática dos óleos de soja e de canola (colza) e sebo empregando a lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435).

Cabe destacar que o volume ótimo de álcool depende do tipo e do teor de enzima empregada no meio reacional, este volume é maior para a lipase Novozym 435 do que para a Lipozyme TL-IM (HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2007).

1.7.4 Temperatura

A transesterificação enzimática é usualmente realizada a baixas temperaturas variando entre 25 a 60°C. Em geral, inicialmente a taxa de reação aumenta com o aumento da temperatura de reação, devido a um aumento da constante de velocidade com a temperatura e redução das limitações de transferência de massa (LECA *et al.*, 2010; AL-ZUHAIR, 2007). A temperatura ótima para várias lipases usadas na síntese de biodiesel está na faixa entre 30 a 55°C (XU *et al.*, 2004; ISO *et al.*, 2001; HAAS *et al.*, 2001). O aumento da temperatura além da temperatura ótima acelera a desnaturação térmica da enzima, ocasionando a sua desativação, logo, diminuindo a atividade catalítica da enzima.

Matassoli e colaboradores (2009) investigaram a influência da temperatura na etanólise do óleo de palma bruto catalisada pela lipase Lipozyme TL-IM (3% (m/m)) com razão molar etanol:óleo de 3:1 e adição escalonada de etanol, nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 78°C e o melhor resultado foi observado a 50°C (25,2%).

A influência da temperatura na síntese de biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja e o etanol empregando Lipozyme TL-IM foi estudada por *Rodrigues et al.* (2009). As reações foram conduzidas empregando diferentes razões molares etanol/óleo de soja (3:1, 7,5:1 e 12:1), diferentes teores de enzima (5 %, 10 %, 15 %, 17,5 %, 25 % e 30 %), diferentes teores de água (0 %, 4 %, 10 %, 16 % e 20%), e diferentes temperaturas (20°C, 26°C, 35°C, 44°C, 50°C e 60°C). Neste estudo foi observado o efeito negativo da elevação da temperatura (60°C) na atividade enzimática, ocasionando a diminuição do rendimento. Sendo

assim as condições ótimas para conduzir a reação foram: razão molar etanol/óleo de soja de 7,5:1, teor de enzima de 25 % (m/m) (em relação à massa de óleo empregada), teor de água adicionada de 4% (m/m) (em relação à massa de óleo empregada) e temperatura de 26°C, que permitiu um rendimento em ésteres etílicos de 69% ao final de 12 h.

Brusamarelo e colaboradores (2010) propuseram um modelo semi-empírico onde o efeito da temperatura na síntese de biodiesel foi avaliado, a transesterificação enzimática do óleo de soja foi realizada empregando a lipase Novozym 435 na faixa de temperatura de 45-70°C e o melhor rendimento (92%) foi alcançado a 65°C.

A síntese de biodiesel utilizando a lipase Lipozyme TL-IM foi estudada por Xu *et al.* (2004), neste estudo foi observado que um aumento gradual na temperatura de 30 para 40°C ocasionava um incremento na velocidade da reação, porém o mesmo não ocorria quando a temperatura empregada era de 50°C.

O efeito da temperatura na etanolise do óleo de soja foi avaliado por Hernández-Martín e Otero (2007), para tal foi empregada uma razão molar etanol/resíduos de ácido graxos de 1:1, 5% (m/m) das lipases Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM, nas temperaturas de 25, 35, 50 e 60°C. Os melhores resultados para as lipases Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM foram obtidos na temperatura de 25°C, o que reduziu o gasto energético bem como o efeito da desativação da enzima pelo nucleófilo, que deve ser mais pronunciado em temperaturas mais elevadas. Porém, o mesmo efeito não foi observado para a lipase Novozym 435, que proporcionou o melhor rendimento na temperatura de 60°C.

Dessa forma, observa-se que a temperatura ótima para a transesterificação enzimática resulta da interação entre a estabilidade funcional da lipase e a taxa de reação de transesterificação e depende da enzima e dos substratos empregados na reação.

1.7.5 Teor de Água

A presença de água afeta as reações de transesterificação catalisadas por enzimas. O conteúdo de água é importante por várias razões, pois a água: (a) age como “lubrificante” mantendo a enzima em sua conformação ativa; (b) participa de muitos mecanismos de reação que podem causar a desativação da enzima; (c) é responsável pela agregação das partículas da enzima; (d) induz a limitações na difusão do substrato em elevados teores de água; (e) pode

promover a hidrólise do substrato, reduzindo o rendimento da reação (ADLERCREUTZ, 2000).

A lipase requer um teor mínimo de água para manter a sua conformação ativa, um excesso de água pode promover a hidrólise do substrato e gerar limitações de difusão de substrato, reduzindo assim o rendimento de biodiesel. O teor de água pode influenciar negativamente a reação quando o álcool utilizado é o metanol ou etanol, porém o mesmo não ocorre quando alcoóis de cadeia maiores são utilizados (DRAPCHO *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2008; ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009).

Kaieda e colaboradores (2001) testaram várias lipases livres (não imobilizadas) de *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* e *Pseudomonas fluorescens* na síntese de biodiesel. Quando o sistema estava livre de água a reação não ocorreu, a taxa de reação aumentou com o aumento no teor de água (1-20% (m/m)), neste caso o aumento no teor de água ocasionou uma estabilidade na estrutura da lipase e diminuiu o efeito inibitório do metanol sobre a lipase.

O comportamento inverso foi observado com a lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435) que apresentou um aumento da atividade com a menor quantidade de água no meio, uma vez que um teor de água elevado pode diminuir o tempo de vida da enzima (ROYON *et al.*, 2007; DU *et al.*, 2004; WATANABE *et al.*, 2006; SHIMADA *et al.*, 1999; DENG *et al.*, 2005). Já a lipase de *Pseudomonas cepacia* (DENG *et al.*, 2005) mostra atividade superior com o aumento do teor de água.

1.7.6 - Óleos ácidos

A escolha de matérias-primas mais baratas do que o óleo vegetal refinado é necessária para viabilizar os processos empregados na produção de biodiesel. O Brasil possui um grande potencial para produção de biomassa para fins energéticos, isto se deve a sua elevada extensão territorial e clima favorável ao plantio das oleaginosas. A mamona, o dendê (palma), a soja, o girassol, o babaçu, o amendoim, a macaúba, o pinhão manso, entre outras oleaginosas, podem ser utilizadas como matéria-prima para a produção de biodiesel. Outra matéria-prima potencial para a produção de biodiesel consiste nos óleos e gorduras residuais, resultantes de processamento doméstico, comercial e industrial, bem como as borras ácidas provenientes do processo de refino dos óleos comestíveis.

No Brasil, cerca de 80% da produção de biodiesel é realizada a partir do óleo de soja (BRASIL, 2012). No entanto, a utilização de óleos comestíveis para produção de biodiesel resulta na elevação do preço da matéria-prima e, por consequência, de seus produtos finais (óleo comestível e biodiesel). Para evitar a competição com o setor alimentício, pesquisas estão sendo desenvolvidas para produzir biodiesel a partir de óleos não comestíveis.

Nesse sentido, o emprego de óleos com alto teor de ácidos graxos livres para a síntese de biodiesel vem sendo estudado por diversos autores e também será alvo de investigação no presente trabalho.

Dossat e colaboradores (2002) estudaram a transesterificação enzimática do óleo de girassol com alto teor de ácido oleico com butanol empregando a lipase Lipozyme RM-IM em um sistema sem solvente e utilizando *n*-hexano como co-solvente, a 40°C. No sistema isento de solvente, 94% dos ácidos graxos foram convertidos a ésteres. Na razão estequiométrica, apenas 65% de rendimento em éster butílico foi obtido. No sistema empregando *n*-hexano como co-solvente, o rendimento em éster butílico foi de 95%.

Tueter e colaboradores (2004) empregaram o óleo de girassol ácido (55,6% de ácidos graxos livres) e o óleo de milho ácido (75,3% de ácidos graxos livres) como matérias-primas para a produção de biodiesel empregando a lipase Novozym 435 na metanólise destes óleos. As condições empregadas nestas reações foram: teor de enzima de 15% (baseado na massa de óleo ácido), 5 g de óleo ácido, 25 mL de *n*-hexano (empregado como co-solvente) e uma temperatura de 50°C. Após 1,5 h de reação os rendimentos em ésteres metílicos obtidos quando óleo de girassol ácido e o óleo de milho ácido foram empregados como substrato foram 46,2% e 62,7%, respectivamente. Quando a temperatura empregada na metanólise foi modificada, rendimentos maiores foram alcançados. Para o óleo de girassol ácido o rendimento foi de 63,6% na temperatura de 40°C, já para o óleo de milho ácido o maior rendimento foi alcançado a 30°C, sendo este 50,1%.

Kumari *et al.* (2007) estudaram a síntese de biodiesel a partir da metanólise do óleo ácido de Mahua (*Madhuca indica*), empregando Lipozyme RM-IM, razão óleo de mahua/etanol de 1:4, a 40°C. Após 24 h, o rendimento obtido em ésteres etílicos foi de 80% (m/m).

A metanólise do destilado desodorizado do óleo de soja (SODD) (essa matéria-prima é composta por 45-55% de triglicerídeos e 25-35% de ácidos graxos livres), empregando Novozym 435 e Lipozyme TL-IM, foi investigada por Wang *et al.* (2006). As condições reacionais empregadas foram razão molar metanol/óleo de 3,6:1, 4% (m/m) de Novozym 435 baseada na massa de óleo empregada e a temperatura de 40°C. Quando 80% (baseado na

massa de óleo) de *tert*-butanol foi utilizado como co-solvente, o rendimento alcançado em ésteres metílicos foi de 84%. A metanólise do destilado desodorizado do óleo de soja também foi testada empregando uma combinação das lipases Novozym 435 (2%) e Lipozyme TL-IM (3%), 80% de *tert*-butanol foi usado como co-solvente, esta reação também foi conduzida a 40°C, utilizando uma razão molar metanol/óleo de 3,6:1. Após 12 h, o rendimento em ésteres metílicos de 84% pôde ser alcançado. Quando a razão molar metanol/óleo empregada nesta reação foi de 3,9:1, o rendimento em ésteres metílicos de 94% foi obtido.

A metanólise de óleo de colza catalisada por lipase foi estudada por Li *et al.* (2006). O emprego de *tert*-butanol como co-solvente foi também avaliado. As condições da metanólise empregando Lipozyme TL-IM foram: temperatura de 35°C, razão molar metanol/óleo de 4:1, 5% (m/m) de biocatalisador (baseada na massa de óleo empregada) e razão *tert*-butanol/óleo de 0,75 (v/v). Após 12 h, 75% de rendimento em biodiesel foi alcançado. Quando a metanólise foi conduzida empregando uma razão molar metanol/óleo de 4:1, razão *tert*-butanol/óleo de 1:1 e 20% (m/m) de Lipozyme TL-IM, o rendimento foi de 80% após 12 h. A metanólise empregando 2% (m/m) da lipase Novozym 435 foi testada empregando as mesmas condições descritas anteriormente e 90% de rendimento foi alcançado após 12h. A combinação das lipases Lipozyme TL-IM (3%) e Novozym 435 (1%) também foi testada e após 12 h de reação o rendimento foi de 95%. Neste estudo também foi estudada a metanólise do óleo usado, que possui acidez maior que o óleo de colza (cerca de 40 vezes). A reação foi conduzida empregando as seguintes condições: razão molar metanol/óleo de 4:1, razão *tert*-butanol/óleo de 1:1 (v/v) e uma mistura de lipases contendo 3% (m/m) de Lipozyme TL-IM e 1% (m/m) de Novozym 435, verificando, após 25 h, um rendimento de 80% em ésteres metílicos.

Hou e Shaw (2008) (apud RIBEIRO *et al.*, 2011) relataram que a esterificação dos óleos ácidos é mais rápida do que a transesterificação de óleos não ácidos. Quando óleos ácidos foram empregados foram necessárias apenas 3 h de reação e 1% de lipase para a esterificação destes ácidos graxos livres, onde um rendimento de 95% foi alcançado. O mesmo não ocorreu quando óleo não ácido foi utilizado, sendo necessárias 30 h de metanólise e o emprego de um teor maior de lipase (4%) para que o mesmo rendimento fosse alcançado. Quanto à desvantagem do emprego destas matérias-primas, o que ocorre é que a reação de esterificação dos ácidos graxos livres ocasiona a formação de água como co-produto, o que frequentemente inibe a reação de transesterificação. A solução para este inconveniente é a condução da reação em duas etapas separadas: primeiro a esterificação dos ácidos graxos livres da mistura com a evaporação da água gerada, depois é realizada a metanólise dos

triglicerídeos. Na primeira etapa a relação molar metanol/ácidos graxos livres deve ser baixa, como 1:2 e baixo teor de enzima (0,5% (m/m)) é necessário. Na segunda etapa uma razão molar metanol/triglicerídeos deve ser de 1:1 e o teor de enzima deve ser incrementado em cerca de 6% (m/m).

Pandey (2009) (apud RIBEIRO *et al.*, 2011) estudou a síntese de biodiesel a partir da reação com o óleo de girassol ácido (55,6% de ácidos graxos livres) e com o óleo de milho ácido (75,3% de ácidos graxos livres), na presença de hexano, empregando a lipase imobilizada de *Candida antarctica*. Rendimentos em ésteres metílicos de 64% e 50%, respectivamente foram obtidos.

Veras e colaboradores (2011) estudaram a síntese de ésteres etílicos a partir de matérias-primas residuais com elevada acidez (HAWFs) - o óleo residual proveniente do refino do óleo de palma (POFA) e o óleo residual de frango (CRO) proveniente da indústria de processamento de frango. As reações foram conduzidas com etanol, utilizando Novozym 435, em meio isento de solvente, com razão etanol/óleo residual de 5:1, a 60°C. Os ácidos graxos livres foram rapidamente esterificados com o etanol, formando os ésteres etílicos. Os resultados demonstraram que a Novozym 435 é capaz não apenas de esterificar os ácidos graxos livres, mas também de transesterificar os triglicerídeos presentes nas matérias-primas residuais com elevada acidez (HAWFs) a uma taxa cinética constante comparada com os sistemas que empregam co-solventes (FERRÃO-GONZALES *et al.*, 2011; FU e VASUDEVAN, 2010; LARA e PARK, 2004; LI *et al.*, 2006; ROYON *et al.*, 2007). Estes resultados sugerem que os ácidos graxos livres e etanol podem atuar juntos como solventes, permitindo que o triglicerídeo acesse o sítio ativo da lipase.

1.7.7 – Produção de biodiesel em sistema batelada e contínuo

A maioria dos estudos usando enzimas como catalisador adota o processo de batelada para a produção de biodiesel, porém este processo apresenta desvantagens como longo tempo de reação, baixa qualidade dos produtos, uma vez que este é mais variável do que o obtido no processo contínuo de produção, possibilidade de cisalhamento do biocatalisador imobilizado e alto custo do processo (HE *et al.*, 2007).

Assim, a viabilidade de um processo contínuo de transesterificação é de importância primordial para assegurar um custo competitivo para o biodiesel. Além disso, o sistema

contínuo pode ser operado com um melhor desempenho do que em reator batelada, levando a uma melhor qualidade do produto, bem como a uma maior reprodutibilidade (VAN KASTEREN e NISWORO, 2007).

O uso de reatores de leito fixo com lipases comerciais imobilizadas é uma solução adequada para a produção contínua de biodiesel, uma vez que as enzimas sofrem menor tensão de cisalhamento e uma menor exposição ao excesso de álcool em comparação com o processo em batelada (HAMA *et al.*, 2007). Embora os reatores de leito fixo (Packed Bed Reactor) (PBR) sejam indicados para a produção de biodiesel em sistema contínuo, a principal desvantagem desse sistema é que o glicerol resultante permanece na parte inferior do reator e pode depositar-se na superfície da lipase imobilizada, diminuindo assim a eficiência catalítica. Dessa forma, o glicerol tem que ser eliminado em tempo hábil no processo.

Vários estudos reportam a aplicação de reatores de leito fixo para a produção de biodiesel empregando catálise enzimática usando diferentes configurações: um único reator de leito fixo com adição escalonada de metanol (ROYON *et al.*, 2007; SHIMADA *et al.*, 2002), um único reator de leito fixo com recirculação (HSU *et al.*, 2004), três reatores de leito fixo em série com remoção de glicerol e adição escalonada de metanol (CHEN *et al.*, 2006).

O uso de reatores de leito fixo apresenta a vantagem de um longo período de estabilidade da enzima, na presença ou ausência de solventes. Entretanto, quando reatores de leito fixo são empregados em sistemas sem solvente, a queda da pressão deve ser reduzida e o reator de leito fixo precisa ser operado a baixas velocidades de escoamento.

Como mencionado por Laudani *et al.* (2007), o reator de leito fixo pode ser vantajosamente empregado na catálise heterogênea, particularmente para as reações catalisadas por enzimas, devido à facilidade de contato e separação, bem como da remoção contínua de substâncias inibidoras. Além de empregar uma maior razão enzima/substrato, também facilita a reutilização da enzima, sendo adequado para a produção contínua em escala industrial.

A síntese de biodiesel em sistema contínuo foi estudada por diversos autores.

A metanólise do resíduo de óleo alimentício (que possui cerca de 2,5% de ácidos graxos livres) empregando a lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435) foi estudada por Watanabe *et al.* (2001). A reação, em sistema contínuo empregando um sistema composto por três colunas empacotadas com 3 g de lipase (15x80 mm), foi conduzida a 30°C durante 100 dias. O meio reacional que foi bombeado para a primeira coluna consistia em: uma mistura de óleo residual e 1/3 do metanol molar equivalente (adicionado em relação aos ácidos graxos totais presentes no óleo, já para a segunda coluna o meio era constituído pelo eluído da

primeira coluna livre do glicerol e 1:3 do metanol molar equivalente e para a última coluna o substrato empregado foi o eluído da segunda coluna (livre do glicerol) e 1:3 do metanol molar equivalente. As vazões empregadas na primeira, segunda e terceira etapas foram: 6, 6 e 4 mL.h⁻¹, respectivamente. Deste modo, os rendimentos em ésteres metílicos alcançados ao final da primeira e da segunda etapas foram de 34 e 66%, respectivamente. Para a última etapa a conversão alcançada foi de 95,9%. O efeito da vazão foi estudado para esta reação, foi possível observar para o primeiro reator que o teor de ésteres metílicos no eluído aumentou com o incremento da vazão. No último reator, o rendimento em ésteres metílicos aumentou com a diminuição da vazão, o rendimento que era de 85,1% a uma vazão de 6,1 mL.h⁻¹ aumentou para 90,9% quando a vazão de 4,2 mL.h⁻¹ foi empregada. Para investigar a estabilidade da lipase na metanólise do óleo residual foi empregado um sistema composto por três reatores em série, onde as vazões empregadas no primeiro, segundo e terceiro reatores foram de 6, 6 e 4 mL.h⁻¹, respectivamente. A reação foi mantida por 100 dias e o teor de ésteres metílicos permaneceu em 33,5, 65,8 e 90,3%, respectivamente.

A metanólise do óleo de soja também foi estudada por Shaw *et al.* (2008), porém a lipase utilizada foi a Novozym 435. Para tal foi empregado um reator de leito fixo de aço inoxidável com diâmetro interno de 0,25 cm e 25 cm de altura. O meio reacional era composto por uma mistura de óleo de soja (100Mm), metanol e co-solvente (*n*-hexano:*tert*-butanol de 9:1 (v/v)). A mistura foi bombeada através de um leito enzimático composto por 1 g de Novozym 435. As variáveis estudadas foram: a temperatura (45 a 65°C), a vazão variou entre 0,1-0,5 mL.min⁻¹ e a razão molar metanol:óleo de soja variando de 3:1-5:1. O efeito da vazão foi avaliado utilizando as seguintes condições: razão molar metanol:óleo de soja de 4:1, temperatura de 50°C, *n*-hexano:*tert*-butanol de 9:1 (v/v) como co-solvente. A porcentagem molar de conversão do biodiesel aumentou para 75% quando a vazão empregada foi de 0,1 mL.min⁻¹. Um modelo para estimar as melhores condições para a reação de metanólise do óleo de soja foi desenvolvido, sendo assim as melhores condições foram: temperatura de 55°C, vazão de 0,1 mL.min⁻¹, razão molar metanol:óleo de soja de 5:1, empregando estas condições foi alcançada uma conversão molar de 74,08% após 30 min de reação.

Wang e colaboradores (2011) avaliaram a metanólise do óleo de soja empregando a lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em nano partículas magnéticas de Fe₃O₄. Para tal foi empregado um reator de leito fixo com raio interno de 1,6 cm e 20 cm de altura. O volume do reator era de 160 mL. O peso do material empacotado (composto por 40 mg de lipase suportada em 10 g de algodão) era de 40 g. O volume de trabalho foi de 136 ml. A reação de

transesterificação foi conduzida em um reator de leito fixo ou em um sistema formado por quatro reatores de leito fixo em série e também um sistema composto por quatro reatores em série a fim de avaliar o que ocorre com a conversão. O meio reacional era composto por uma mistura de óleo de soja, água destilada, metanol e *n*-hexano. A razão do volume de óleo de soja:água destilada:metanol: *n*-hexano foi 6:3:1:0,2. A temperatura empregada foi 40°C. Após 24 h de reação a mistura foi removida a fim de se determinar o rendimento em ésteres. O efeito da vazão foi avaliado, esta foi testada em um intervalo entre 0,125 a 2 mL.min⁻¹ em um reator de leito fixo. A conversão máxima foi obtida quando a vazão de 0,25 mL.min⁻¹ foi empregada. Uma taxa de conversão de cerca de 75% (máxima conversão obtida) foi alcançada após 12 h de reação, seguida por uma fase estacionária de 132 h. Após 240 h a taxa de conversão manteve-se acima de 45%. Em contraste, após 9 ciclos, a conversão manteve-se em apenas 18,5% no processo em batelada (WANG *et al.*, 2009). Quando o sistema formado por 4 reatores de leito fixo em série foi empregado a taxa de conversão de biodiesel foi mantida acima de 88% por 192 h. Após 240 h de reação, a taxa de conversão caiu ligeiramente para aproximadamente 75%. Comparando com o sistema formado por um único reator de leito fixo há um evidente aumento na taxa de conversão e uma boa estabilidade que foi obtida com o sistema em série. As razões para que isto ocorresse foram um longo tempo de residência do meio reacional no reator e a redução da inibição da lipase causada pelos produtos (HAMA *et al.*, 2007; THANH *et al.*, 2010).

A síntese de biodiesel a partir do resíduo de óleo de cozinha (WCO) utilizando a lipase de *Candida sp.* 99-125 foi investigada por Chen *et al.* (2009), a metanólise foi realizada em três etapas empregando três reatores em série e o glicerol foi separado ao final de cada etapa. O meio reacional era constituído por óleo de cozinha, metanol, hexano e água, este meio foi bombeado para o topo dos reatores. A reação foi conduzida empregando as seguintes condições: temperatura de 45°C, razão molar do resíduo de óleo de cozinha/metanol de 1:1 em cada etapa da reação, 25% de lipase, 15% de solvente, 10% de água. O efeito da vazão do reagente está associado com o tempo de reação, e este foi estudado através da variação da vazão entre 0,4 mL.min⁻¹ e 1,5 mL.min⁻¹, a vazão do reagente foi controlada por uma bomba peristáltica. O teor de ésteres metílicos primeiro aumenta e depois diminui com o aumento da vazão. Quando a vazão empregada é muito baixa o metanol permanece em contato com a lipase imobilizada por muito tempo, o que reduz a atividade da enzima. Quando uma vazão elevada é empregada o teor de ésteres diminui, pois o tempo de contato entre a lipase e o substrato é insuficiente. O rendimento máximo em ésteres metílicos alcançado foi de 91,08%

quando a vazão utilizada foi de $1,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A reação foi conduzida por 100 h e o teor de ésteres metílicos diminuiu em 15,74%, de 91,08% a 76,74%, acima de 100 h.

Halim e colaboradores (2009) estudaram a transesterificação do resíduo do óleo de palma usado com metanol empregando a lipase Novozym 435 utilizando um sistema formado por dois reatores em série e *tert*-butanol como co-solvente. A transesterificação foi conduzida em um forno (60 cm x 60 cm x 45 cm) equipado com um elemento de aquecimento e um controlador de temperatura do tipo PID. Cada reator de leito fixo era composto por uma coluna de vidro Pyrex com 1 cm de diâmetro interno e 18 cm de altura, no qual era colocado o leito formado pela enzima imobilizada posicionado entre duas camadas de lã de vidro. O substrato era introduzido na coluna por meio de uma bomba peristáltica. O meio reacional era composto por resíduo de óleo de palma usado e metanol, uma razão molar de 1:4. O *tert*-butanol foi usado como co-solvente numa razão 1:1 (v/v) *tert*-butanol:resíduo de óleo de palma usado. A vazão do substrato e a quantidade de lipase empregada (altura do leito empacotado) foram as variáveis avaliadas. A reação foi conduzida a 40°C e amostras foram coletadas após 3 h de reação. O teor de ésteres metílicos variou com a quantidade de lipase (altura do leito) e com a vazão do substrato, tendo sido observado que o rendimento inicial dos ésteres metílicos aumentou com o aumento da vazão do substrato e com a altura da coluna empacotada. O rendimento máximo de ésteres metílicos foi de 80%, alcançado com um leito empacotado de 12 cm de altura e uma vazão de substrato próxima de $0,55 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. De acordo com os autores, quando a vazão empregada esteve na faixa de $0,9\text{-}1,02 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, o substrato só passaria pela enzima, sem interagir com a mesma, sendo assim, não ocorreria o acoplamento da molécula do substrato com o sítio ativo da enzima. Portanto, há um menor contato entre o substrato e os sítios ativos da enzima, proporcionando um menor rendimento em ésteres metílicos. Também foi observado que o aumento na altura do leito fixo, além de nove centímetros, não teve muito efeito no aumento do rendimento dos ésteres metílicos. Isto pode ser devido a um efeito de saturação da quantidade de enzima. As condições ótimas para as duas variáveis foram obtidas através de otimização, sendo a altura do leito empacotado de enzima de 10,53 cm (3,3 g de Novozym 435) e vazão de $0,57 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, prevendo um rendimento em ésteres metílicos de 80,3%. A transesterificação alcançou o equilíbrio em 4 h e o rendimento em ésteres metílicos foi de 80%. A enzima se manteve estável por mais de 120 h, que manteve um valor de rendimento de 79-80% durante todo o experimento

Chen e colaboradores (2011) investigaram a síntese de biodiesel empregando a metanólise de óleo de soja usando Novozym 435 e *tert*-butanol como co-solvente. A reação de transesterificação foi conduzida em um reator contínuo que consistia de um tubo de aço

inoxidável de 25 cm de altura e com 0,46 cm de diâmetro interno. A mistura reacional era composta por óleo de soja (0,05 mol), 32,5% de *tert*-butanol (baseado no peso do óleo de soja) e metanol com razões molares diferentes, esta foi bombeada para o reator contínuo (uma coluna empacotada com 1,7 g de Novozym 435). O efeito da vazão foi avaliado neste estudo, esta variou na faixa de 0,1-0,5 mL.min⁻¹. A conversão diminuiu com o aumento da vazão, a conversão máxima (81%) foi obtida quando a vazão de 0,1 mL.min⁻¹ foi utilizada. Deste modo, o aumento na vazão ocasionou uma redução no tempo de residência no reator de leito fixo, o que resultou em um contato deficiente entre a lipase e o substrato. As condições ótimas para a reação foram: vazão de 0,1 mL.min⁻¹, temperatura de 52,1°C e razão molar de substrato (metanol: óleo de soja) de 1:4. Nestas condições o rendimento em ésteres obtido foi de 83,31%. O reuso da enzima também foi estudado, a enzima mostrou excelente estabilidade nas condições ótimas. Uma conversão alta (80%) foi obtida e a lipase imobilizada se manteve estável (sem perda de atividade catalítica) durante 30 dias.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Materiais

2.1.1 Reagentes

O padrão cromatográfico heptadecanoato de metila (95%), a 1-monolaurina (99%) e a dilaurina (mistura de isômeros, 99%) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). O *n*-hexano P.A., o 1-butanol P.A., o etanol P.A., o etanol (95%), a acetona P.A., o hidróxido de sódio P.A. e o ácido oleico (para síntese, 85%) foram obtidos da Vetec Química Fina Ltda (Brasil). O ácido láurico (para síntese, 99%) e a trilaurina (97%) foram fornecidos pela Merck (Brasil). O óleo de soja refinado utilizado foi o óleo SOYA da Sadia (Brasil).

2.1.2 Enzimas

No desenvolvimento desta pesquisa foram empregadas as lipases comerciais Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM, produzidas e gentilmente doadas pela Novozymes Latin American Ltda (Paraná, Brasil).

A Novozym 435 é a lipase B de *Candida antarctica* produzida por fermentação com o microrganismo geneticamente modificado *Aspergillus oryzae*. O método de imobilização desta lipase é a adsorção e seu suporte é uma resina acrílica macroporosa. O diâmetro das partículas desta enzima imobilizada é de 0,3 a 0,9 mm e o teor de água presente nesta lipase é 1 a 2% (m/m). A lipase Novozym 435 exibe especificidade para as posições 1 e 3, porém age também como uma lipase não específica (Oils e Fats / 2001-06950-03, Product Sheet, Novozymes).

Lipozyme RM IM é uma lipase de *Rhizomucor miehei* produzida por fermentação submersa do microrganismo *Aspergillus oryzae*, sendo imobilizada em uma resina de troca iônica macroporosa. O diâmetro das partículas desta enzima imobilizada é de 0,2 a 0,6 mm e

o teor de água presente nesta lipase é de 2 a 3% (m/m). A lipase Lipozyme RM IM apresenta especificidade para as posições 1 e 3 (Oils e Fats / 2000-10503-04, Product Sheet, Novozymes).

Lipozyme TL IM é uma lipase de *Thermomyces lanuginosus* produzida por fermentação submersa do microrganismo *Aspergillus oryzae*. O diâmetro das partículas desta enzima imobilizada é de 0,3 a 1,0 mm. A lipase Lipozyme TL IM apresenta especificidade para as posições 1 e 3 (Oils e Fats / 2001-06952-04, Product Sheet, Novozymes).

2.1.3 Óleo de soja ácido

Três óleos ácidos, com índice de acidez de 8, 50 e 90 (mg KOH.g⁻¹ óleo), foram preparados através da adição de ácido oleico ao óleo de soja refinado SOYA. Cerca de 20 mL, 127 mL e 329 mL de ácido oleico foram adicionados a 400 mL de óleo de soja para obter um óleo com índice de acidez de 8,5, 54,4 e 93,7 mg KOH.g⁻¹, respectivamente.

2.1.4 Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho são apresentados a seguir:

- Agitador de tubos AP56 PHOENIX
- Balança analítica digital Mettler modelo Classic Plus APS KH
- Banho termostático HAAKE D10
- Bomba peristáltica Gilson (miniplus evolution)
- Centrífuga eppendorf miniSpin
- Cromatógrafo a gás VARIAN modelo CP 3380 com amostrador automático
- Placa de agitação e aquecimento IKA C-MAg HS 4
- Titulador automático Mettler T50, com amostrador automático

2.2 - Métodos

2.2.1. Determinação da atividade enzimática

2.2.1.1 Atividade de esterificação

A atividade de esterificação das lipases comerciais imobilizadas (Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM) foi determinada pelo consumo de ácido oleico na reação de esterificação com o álcool (etanol e butanol) empregando a razão molar ácido oleico:álcool estequiométrica (1:1), a 45°C e concentração de enzima de 3,0% (m/m), conforme o método descrito por Dias *et al.* (2006). Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μmol de ácido oleico por minuto (U), nas condições citadas anteriormente.

No procedimento de determinação da atividade enzimática, 30 mmols de ácido oleico e 30 mmols de álcool foram adicionados em um reator batelada fechado de capacidade de 15 mL, provido de agitação magnética e condensador. A temperatura do meio reacional foi mantida constante através da circulação de etileno glicol, proveniente do banho termostático (HAAKE D10), pela camisa do reator. A reação de esterificação foi iniciada após a adição de 0,3 g da lipase ao meio reacional. Alíquotas de 100 μL, em duplicata, foram retiradas do meio reacional nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 min de reação. O consumo de ácido oleico nas alíquotas foi determinado por titulometria de neutralização. As alíquotas foram diluídas em 30 mL de acetona/etanol 1:1 e tituladas com solução de NaOH 0,02 mol.L⁻¹, utilizando-se um titulador automático Mettler modelo T50.

A equação 2.1 descreve o cálculo da atividade enzimática de esterificação.

$$A = \frac{(V_1 - V_2) \times M}{t \times m} \times \frac{V_a}{V_m} \times 1000 \quad (2.1)$$

Onde:

A = atividade de esterificação (U.g⁻¹);

V_1 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo zero de reação (mL);

V_2 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo t minutos de reação (mL);

M = concentração da solução de NaOH em mol.L⁻¹;

t = tempo de reação (min);

m = massa de enzima empregada na reação (g);

V_a = volume de amostra (mL);

V_m = volume do meio reacional (mL).

2.2.1.2 Atividade de transesterificação

A atividade de transesterificação das lipases comerciais imobilizadas (Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM) foi determinada pelo consumo de trilaurina na reação de transesterificação com o etanol, empregando razão molar trilaurina:etanol estequiométrica (1:3), a 50°C e concentração de enzima de 3,0% (m/m),

Na reação, 4 g de trilaurina e 1095 μ L de etanol, adicionados de forma escalonada (em três adições iguais, nos tempos de 0, 0,5 e 1,0 h), foram misturados em um reator batelada fechado de capacidade de 15 mL, provido de agitação magnética e condensador. A temperatura do meio reacional foi mantida constante através da circulação de etileno glicol, proveniente do banho termostático (HAAKE D10), pela camisa do reator. A reação de transesterificação foi iniciada após a adição de 0,12 g da lipase ao meio reacional. Alíquotas de 20 μ L foram retiradas do meio reacional, após interromper a agitação do sistema, quando então ocorreu a decantação da lipase do meio reacional, nos seguintes tempos 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 h de reação. As amostras foram analisadas por cromatografia em fase gasosa. Uma unidade de atividade de transesterificação foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μ mol de trilaurina por minuto (U), nas condições citadas. A equação 2.2 descreve o cálculo da atividade enzimática de transesterificação.

$$A = \frac{(n_1 - n_2)}{t \times m} \times f \times 10^6 \quad (2.2)$$

Onde:

A = atividade de transesterificação ($U \cdot g^{-1}$);

n_1 = número de mols de trilaurina no tempo zero de reação (mol);

n_2 = número de mols de trilaurina no tempo t minutos de reação (mol);

t = tempo de reação (min);

m = massa de enzima empregada na reação (g);

f = fator de diluição da amostra.

2.2.2 Determinação do índice de acidez

O índice de acidez (IA) dos óleos ácidos é a massa de hidróxido de potássio (mg) necessária para neutralizar os ácidos graxos presentes em 1 g de amostra. Para essa análise, amostras de 100 μ L, retiradas em duplicata, do óleo vegetal foram dissolvidas em 50 mL de solução de acetona/etanol 1:1 e tituladas com solução de NaOH 0,02 mol.L⁻¹, empregando o titulador automático Mettler modelo T50. A equação 2.3 descreve como o índice de acidez foi calculado.

$$\text{Índice de Acidez (mg KOH.g}^{-1}\text{)} = \frac{M \times V \times MM}{m} \quad (2.3)$$

Onde:

M = concentração em mol.L⁻¹ da solução de hidróxido de sódio;

V = volume da solução de hidróxido de sódio empregada na titulação da amostra (mL);

MM = massa molar do KOH em g.mol⁻¹ (56,1 g.mol⁻¹);

m = massa da alíquota (g).

2.2.3. Reação de síntese enzimática de biodiesel em reator batelada

As reações de transesterificação enzimática do óleo de soja refinado e dos óleos com diferentes índices de acidez (8,5, 54,4 e 93,7 mg KOH.g⁻¹) foram realizadas em um reator batelada fechado de capacidade de 15 mL, provido de condensador e de agitação magnética (Figura 2.1). Para evitar a perda do álcool por evaporação, a água que circula no condensador era resfriada com o auxílio de banho termostático. A temperatura do meio reacional foi mantida constante através da circulação de etilenoglicol pela camisa do reator, proveniente de um banho termostático.



Figura 2.1 Sistema reacional com reator batelada

A seguir são descritas as condições experimentais utilizadas para avaliação de alguns parâmetros reacionais.

2.2.3.1 Efeitos da temperatura, do tipo de álcool e da lipase empregada na síntese de biodiesel

A influência da temperatura, do tipo de álcool e da lipase empregada na produção de biodiesel foi investigada nas reações de transesterificação do óleo de soja com o álcool (etanol e butanol), empregando a razão molar óleo/álcool de 1:3, com adição escalonada do álcool (três adições com volumes iguais nos tempos 0, 30 e 60 min, conforme descrito por Bernardes *et al.*, 2007) e 5% (m/m) das lipases comerciais imobilizadas Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM. As reações foram conduzidas nas temperaturas de 50, 60 e 70°C e, para a lipase Lipozyme TL IM, também nas temperaturas de 30 e 40°C. O progresso da reação foi acompanhado pela retirada de amostras de 20 µL do meio reacional, em duplicata, nos tempos de reação 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 h, que foram analisadas por cromatografia em fase gasosa.

2.2.3.2 Efeitos da acidez do óleo de soja e da lipase empregada na síntese de biodiesel

A influência da acidez do óleo de soja e da lipase empregada na síntese de biodiesel foi investigada nas reações de transesterificação entre o óleo de soja ácido (óleo de soja com índice de acidez de 8,5; 54,4 e 93,7) e o etanol, com 5% (m/m) de lipase (Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozym 435). As reações empregando Lipozyme RM IM e TL IM foram realizadas a 50°C, enquanto que com Novozym 435, as temperaturas utilizadas foram 50°C e 70°C. O progresso da reação foi acompanhado pela retirada de amostras, em duplicata, nos tempos 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 4,0 h, que foram analisadas por cromatografia em fase gasosa e por titulometria de neutralização.

2.2.4. Reação de síntese enzimática de biodiesel em reator de leito fixo em sistema contínuo

As reações de síntese enzimática de biodiesel em sistema contínuo foram realizadas em um reator de leito fixo com 10 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro interno. O aparato experimental era constituído de um tanque de alimentação de vidro encamisado com volume total de 500 mL e de um reator de vidro encamisado (reator contínuo) com volume total de 7,5 mL (Figura 2.2). Este volume foi calculado a partir da fórmula descrita em 2.4.

$$V = \frac{\pi \times D^2}{4} \times h \quad (2.4)$$

Onde:

V = volume do reator de leito fixo (cm³);

π = aproximadamente 3;

D = diâmetro do reator de leito fixo (cm);

h = altura do reator de leito fixo (cm).

Para controlar a temperatura do meio reacional foi utilizado um banho termostático (HAAKE D10). A coluna do reator foi preenchida com cerca de 0,7 g de lipase comercial imobilizadas para os biocatalisadores Lipozyme RM-IM e Novozym 435, para a lipase Lipozyme TL-IM a massa requerida foi de 0,85 g, representando uma altura de leito de 5,0 cm no reator. Os reagentes, óleo de soja refinado e etanol na razão molar igual a 1:3, foram mantidos no tanque de alimentação sob agitação magnética e temperatura controlada (50°C), sendo bombeados em fluxo ascendente até o reator de leito fixo com auxílio de uma bomba peristáltica (Gilson, modelo Miniplus Evolution) na vazão ajustada. Para que fosse possível acompanhar o rendimento das reações de transesterificação foram coletadas amostras de 100 µL após o meio reacional percolar o leito enzimático. As amostras, retiradas em diferentes tempos de reação, foram analisadas por cromatografia em fase gasosa.



Figura 2.2 Sistema reacional com reator de leito fixo

A seguir são descritas as condições experimentais utilizadas para avaliação de alguns parâmetros reacionais.

2.2.4.1 Efeitos da velocidade espacial dos reagentes e da lipase empregada na síntese de biodiesel

A influência da velocidade espacial dos reagentes e da lipase empregada (Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozym 435) na síntese de biodiesel foi investigada nas reações a 50°C, empregando o reator de leito fixo com leito enzimático de 5 cm de altura. Para cada

preparação enzimática, as velocidades espaciais dos reagentes testadas foram de 0,255 e 0,508 h⁻¹.

2.2.4.2 Reutilização da lipase para a síntese de biodiesel

A possibilidade de reutilização da lipase comercial (Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozym 435), após as reações de transesterificação entre o óleo de soja refinado e o etanol, nas velocidades espaciais de 0,255 e 0,508 h⁻¹, no reator de leito fixo, foi avaliada. Após 24 h (para a lipase Lipozyme RM-IM na velocidade espacial de 0,508 h⁻¹ e Lipozyme TL-IM na velocidade espacial de 0,255 h⁻¹), 48 h (para a lipase Lipozyme RM-IM e Novozym 435 na velocidade espacial de 0,255 h⁻¹ e Lipozyme TL-IM na velocidade espacial de 0,508 h⁻¹) e 72 h (para a lipase Novozym 435 na velocidade espacial de 0,508 h⁻¹) de reação, a lipase foi retirada do reator, lavada com 30 mL de butanol e filtrada a vácuo. Em seguida a enzima recuperada foi reutilizada em uma nova reação, na temperatura de 50°C, empregando as velocidades espaciais de 0,255 e 0,508 h⁻¹.

2.2.5 Análise cromatográfica para determinação da atividade de transesterificação

Para determinação da atividade de transesterificação da lipase, o consumo de trilaurina, com a formação de ácido láurico, monolaurina e dilaurina, foi acompanhado por cromatografia em fase gasosa conforme método descrito por Langone e Sant'Anna (1999). Amostras de 20 µL, retiradas da reação entre trilaurina e etanol, foram diluídas (25 vezes) em solução de acetato de etila/hexano 1:1, e injetadas no cromatógrafo a gás Varian 3380, equipado com uma coluna capilar Factor Four VF-1 (15 m x 0,25 x 0,25 µm) equipado com detector de ionização de chama (FID). Alíquotas de 20 µL das diluições 1:5; 1:10; 1:20; 1:40 e 1:50 das soluções padrão foram retiradas diluídas em uma solução de acetato de etila/hexano 1:1 e também foram injetadas no cromatógrafo a gás. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250°C e 280°C. A temperatura do forno foi, inicialmente, de 100°C durante 3 min e, em seguida, aumentada a uma taxa de 25°C/min, até atingir a temperatura de 150°C. Em seguida, a temperatura foi aumentada até 300°C, a uma taxa de 20°C/min, permanecendo 2 min nessa temperatura e, em seguida, aumentada a uma taxa de

10°C/min, até atingir a temperatura de 320°C, permanecendo 3 min nessa temperatura. O hidrogênio foi o gás de arraste utilizado, na vazão de 2 mL.min⁻¹, e a pressão da coluna foi mantida constante em 20 psi. Um computador equipado com o software Star Workstation 6.2 foi conectado ao cromatógrafo a gás através do módulo de interface (Star 800) para integrar automaticamente os picos obtidos.

As concentrações de trilaurina, dilaurina, monolaurina e ácido láurico foram calculadas como frações molares baseadas na área dos picos usando curvas de calibração. As curvas-padrão para essas substâncias foram feitas a partir da diluição (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:50), em acetato de etila/hexano, das soluções de 6,43x10⁻⁵ mol/g de trilaurina; de 2,61 x10⁻⁵ mol.g⁻¹ de dilaurina; de 3,99 x10⁻⁵ mol.g⁻¹ de monolaurina e de 6,47 x10⁻⁵ mol.g⁻¹ de ácido láurico, cujos resultados encontram-se no Anexo I (na Figura 2.3)

2.2.6 – Análise cromatográfica para quantificação dos ésteres alquílicos (biodiesel)

Para determinar a concentração dos ésteres alquílicos foi utilizado método cromatográfico adaptado da norma indicada pelo Comitê de Padronização Europeu (Draft prEN 14103, 2001). Alíquotas de 20 µL do meio reacional foram diluídas 25 vezes em hexano contendo heptadecanoato de metila (padrão interno). Em seguida, 1,0 µL da amostra diluída foi injetada no cromatógrafo a gás Varian CP 3800 equipado com uma coluna CP WAX 52 CB (30m x 0,25mm x 0,25µm) e detector de ionização de chama (DIC), em sistema de injeção split com razão de 1:20. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 250°C. A pressão do gás de arraste (H₂) no sistema foi de 12 psi. A temperatura inicial do forno foi, inicialmente, mantida a 200°C por 4,5 min e, em seguida, aumentada a 210°C a uma taxa de 20°C/min e mantida por 30 segundos nesta temperatura. A seguir, a temperatura foi aumentada a 220°C, utilizando a mesma taxa de aquecimento, e mantida por 30 segundos. Finalmente, a temperatura do forno foi elevada a 260°C através da mesma taxa de aquecimento e mantida por 5,0 min. Um computador equipado com o software Star Workstation 6.2 foi conectado ao cromatógrafo a gás através do módulo de interface (Star 800) para integrar automaticamente os picos obtidos.

O cálculo utilizado para a determinação do teor em ésteres obtido em cada reação segue o critério indicado pela norma. A soma das áreas dos ésteres na amostra (pesada

previamente) é comparada com a área de uma massa conhecida de padrão, dentro da faixa de resposta linear do detector para o heptadecanoato de metila (padrão) e calculado o conteúdo percentual em massa dos ésteres obtidos na reação (biodiesel) – equação 2.5.

$$C = \frac{(\sum A) - A_{PI}}{A_{PI}} \times \frac{C_{PI} \times V_{PI}}{M_{am}} \times 100 \quad (2.5)$$

Onde:

C = conteúdo percentual em massa dos ésteres (biodiesel)

$\sum A$ = área total dos picos dos ésteres;

A_{PI} = área do pico do padrão interno;

C_{PI} = concentração do padrão de heptadecanoato de metila em hexano (mg/mL);

V_{PI} = volume da solução de padrão interno utilizada para dissolver a amostra (mL);

M_{am} = massa da amostra (mg)

2.2.7 Análise titulométrica para determinação do consumo de ácido oleico nas reações de síntese de biodiesel empregando óleo ácido

O consumo de ácido oleico foi determinado nas reações entre o óleo de soja ácido e o etanol, empregando 5% (m/m de lipase). As amostras de 100 μ L, retiradas em duplicata do meio reacional, foram pesadas e, então, dissolvidas em 40 mL de acetona/etanol 1:1 e tituladas com solução de NaOH 0,04 mol.L⁻¹, empregando titulador automático Mettler modelo T50.

O cálculo utilizado para a determinação do teor em oleato de etila, a partir do consumo de ácido oleico, é descrito na equação 2.6.

$$C_{\text{Esterificação}} = \frac{M \times (V_1 - V_2) \times MM \times 10^{-3}}{m} \times 100 \quad (2.6)$$

Onde:

$C_{Esterificação}$ = conteúdo percentual em massa de éster (oleato de etila) formado na reação de esterificação do óleo ácido;

M = concentração da solução de NaOH em mol.L⁻¹;

V_1 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo zero de reação (mL);

V_2 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada após o término da reação (mL);

MM = massa molar do oleato de etila em g.mol⁻¹ (310,51 g.mol⁻¹);

m = massa da amostra (g).

2.2.8. Análise dos resultados: Cálculo do teor em ésteres proveniente da reação de transesterificação e de esterificação do óleo ácido

O cálculo utilizado para a determinação do teor em ésteres provenientes da reação de transesterificação do óleo ácido é descrito na equação 2.7.

$$C_{Transesterificação} = C_{Total} - C_{Esterificação} \quad (2.7)$$

Onde:

$C_{Transesterificação}$ = conteúdo percentual em massa dos ésteres proveniente da reação de transesterificação;

C_{Total} = conteúdo percentual em massa dos ésteres (biodiesel), calculado conforme equação 2.5;

$C_{Esterificação}$ = conteúdo percentual em massa de éster (oleato de etila) formado na reação de esterificação do óleo ácido, calculado conforme equação 2.6

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no estudo da produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo de soja por via enzimática. Em uma primeira etapa foram investigados os efeitos da temperatura, da composição da carga (nível de acidez do óleo) e do tipo de lipase. Em uma segunda etapa, foram realizadas reações de transesterificação enzimática do óleo de soja refinado em sistema contínuo com o propósito de comparar com os resultados obtidos no sistema em batelada. O reuso da lipase no sistema contínuo foi também investigado.

3.1 – Atividade Enzimática

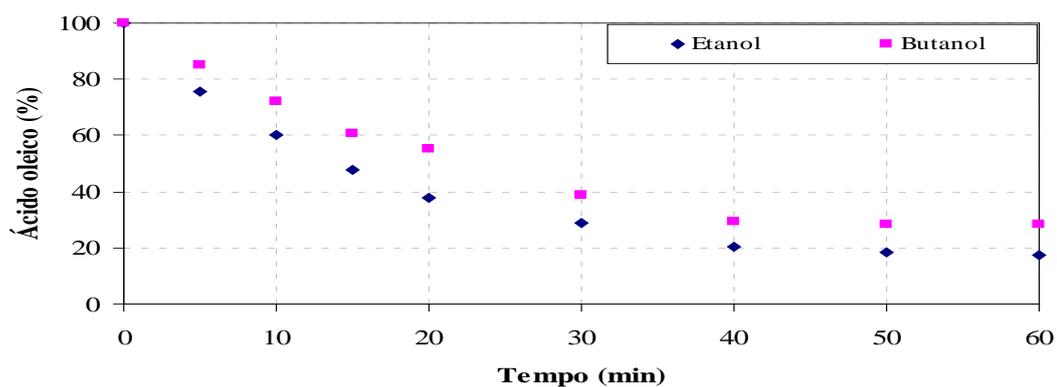
As lipases comerciais imobilizadas empregadas neste trabalho para síntese de biodiesel foram inicialmente caracterizadas em relação a suas atividades de esterificação e de transesterificação.

3.1.1- Atividade de Esterificação

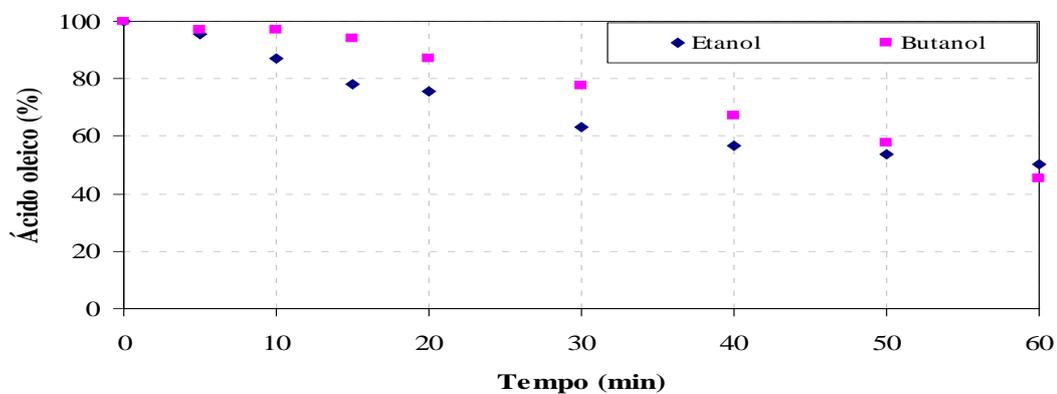
As atividades de esterificação das enzimas comerciais Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM foram determinadas pelo consumo de ácido oléico nas reações de esterificação com etanol e butanol, empregando razão molar ácido oleico/álcool igual a 1 e 3% (m/m) de enzima, a 45 °C, conforme descrito no item 2.2.1.1. Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μmol de ácido oleico por minuto, nas condições citadas. Os valores de atividade de esterificação, nas reações empregando etanol, das lipases Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM foram de 3301, 1451 e 722 U.g^{-1} , respectivamente. Quando o álcool utilizado foi o butanol, as atividades foram de 2898, 1419 e 742 U.g^{-1} , respectivamente. Nas duas reações de esterificação, a Novozym 435 apresentou o maior potencial catalítico, seguido pela Lipozyme

RM IM. A preparação enzimática Lipozyme TL IM não é indicada para reações de esterificação.

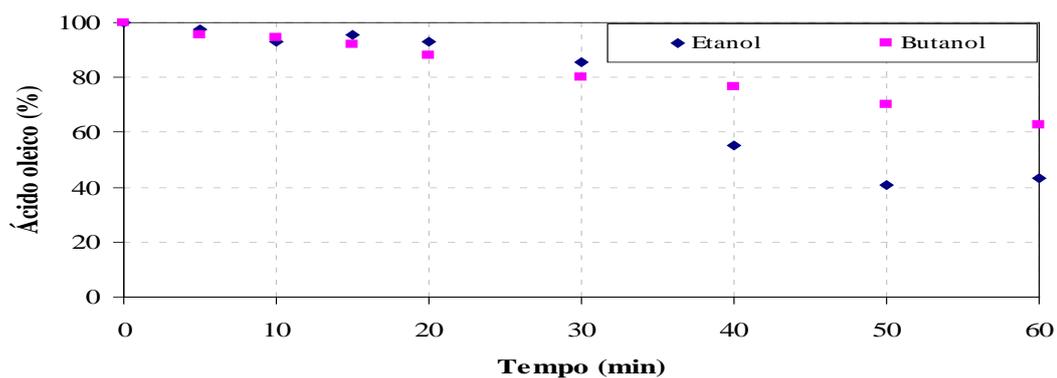
A Figura 3.1 ilustra a variação do consumo de ácido em função do tempo associada às reações realizadas para determinação da atividade de esterificação. Pode-se comprovar que a maior velocidade de reação foi verificada nas reações empregando Novozym 435. Por outro lado, o consumo de ácido oleico foi muito menor nas reações com Lipozyme TL IM. Em relação ao tipo de álcool, não foi observada diferença significativa na conversão da reação para as lipases testada



(a) Novozym 435



(b) Lipozyme RM-IM



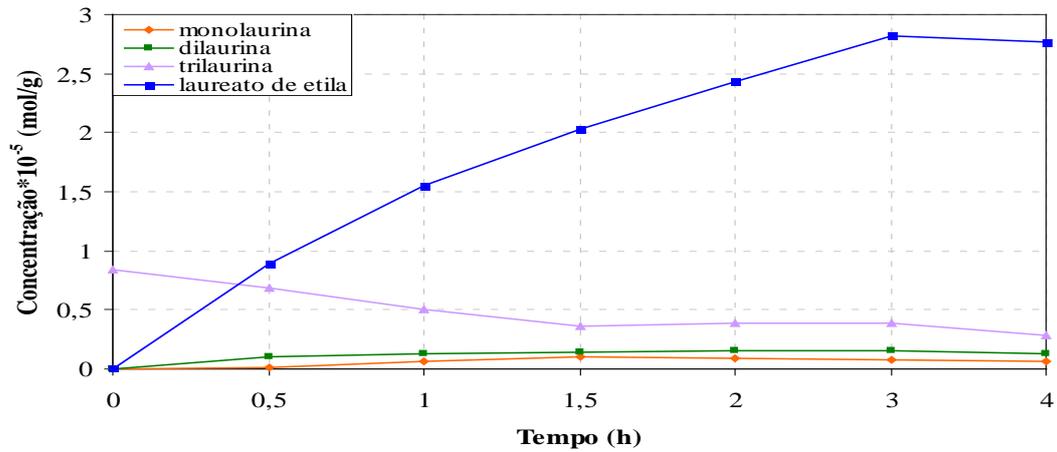
(c) Lipozyme TL-IM

Figura 3.1 – Consumo de ácido oleico na reação de esterificação com álcool (etanol e butanol), empregando razão molar ácido oleico/álcool igual a 1 e 3% (m/m) de enzima ((a) Novozym 435 (b) Lipozyme RM IM (c) Lipozyme TL IM), a 45 °C.

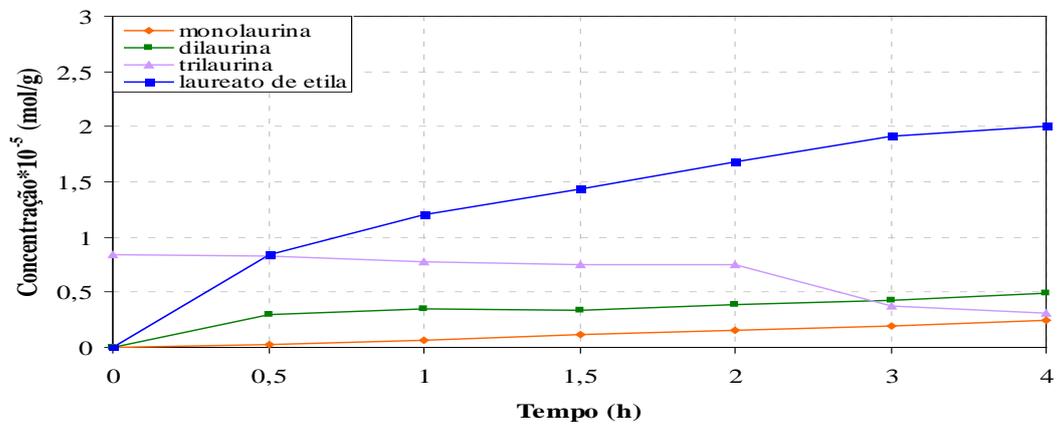
3.1.2- Atividade de Transesterificação

As atividades de transesterificação das enzimas comerciais Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM foram determinadas pelo consumo de trilaurina nas reações de transesterificação com etanol P.A., empregando razão molar trilaurina/etanol igual a 1:3, com adição escalonada do álcool e 3% (m/m) de enzima, a 50°C, conforme descrito no item 2.2.1.2. Uma unidade de atividade de transesterificação foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μmol de trilaurina por minuto, nas condições citadas. Os valores de atividade obtidos para as lipases Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM foram de 3115, 662 e 3872 U.g^{-1} , respectivamente. A Figura 3.2 ilustra os resultados obtidos nessas reações, os quais mostram que a maior velocidade de consumo do triglicerídeo foi observada na reação com a Lipozyme TL-IM, seguida pela Novozym 435.

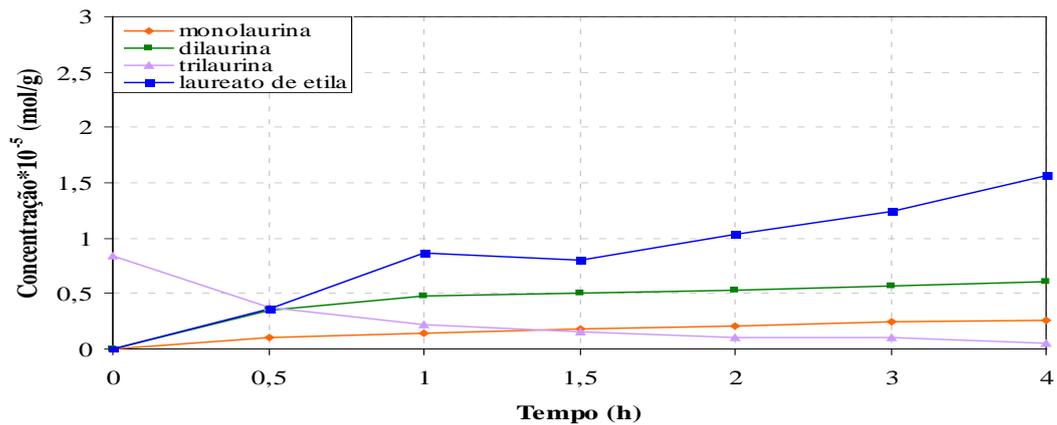
A reação de etanólise da trilaurina catalisada por Novozym 435 leva à formação de ácido láurico, não sendo determinada concentração significativa de monolaurina e dilaurina no meio reacional (Figura 3.2a). Considerando que a lipase de *Candida antarctica* é uma lipase não específica (WONG, 2002; UHLIG, 1998), esse resultado era esperado. Já nas reações com Lipozyme RM IM e TL IM observa-se a formação concomitante de monolaurina, dilaurina e ácido láurico, com maior velocidade na formação de dilaurina e de ácido láurico, em relação à formação de monolaurina, o que pode ser resultado da seletividade da lipase pela posição 1 ou 3 do triglicerídeo, gerando o diglicerídeo.



(a) Novozym 435



(b) Lipozyme RM IM



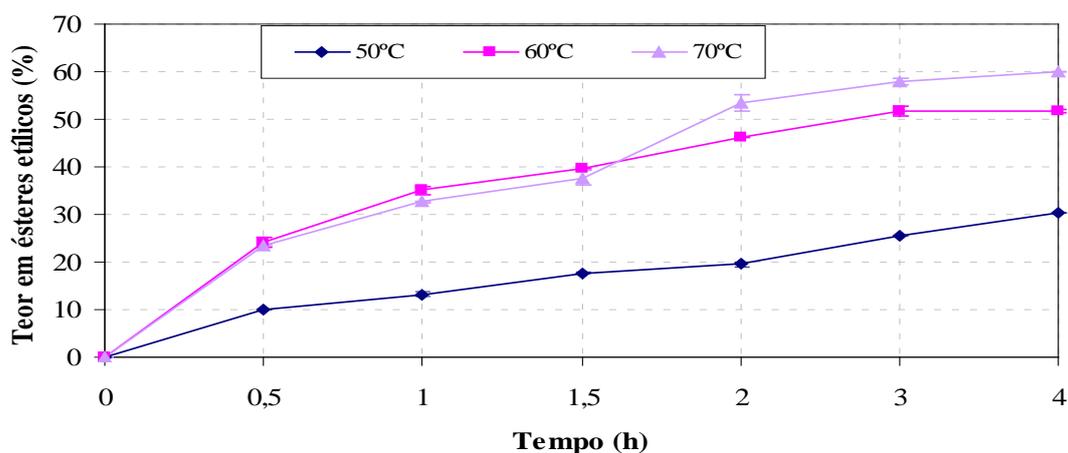
(c) Lipozyme TL IM

Figura 3.2 – Cinética da reação de transesterificação da trilaurina com etanol, empregando razão molar trilaurina/etanol igual a 1:3, com adição escalonada do álcool foi nos tempos 0, 0,5 e 1,0 hora e 3% (m/m) de enzima ((a)Novozym 435(b) Lipozyme RM –IM (c) Lipozyme TL-IM), a 50°C.

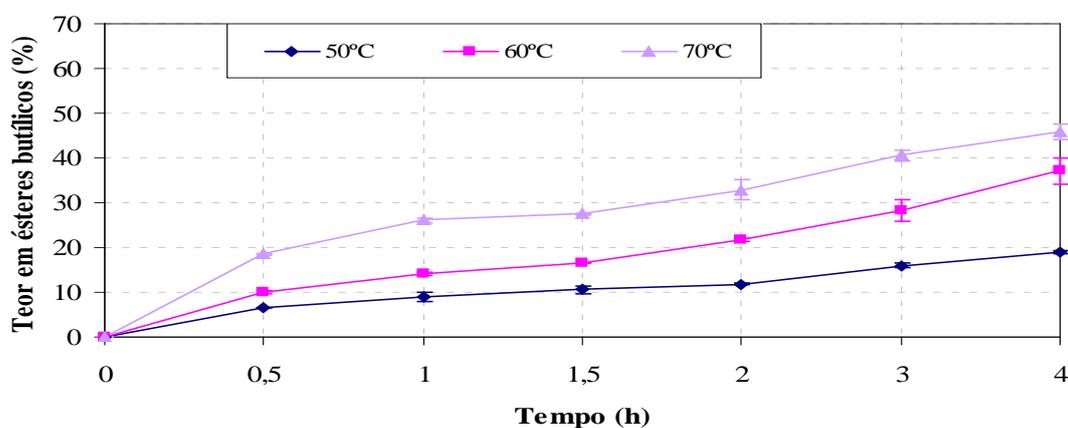
3.2 – Influência da temperatura na reação de transesterificação enzimática

A influência da temperatura na produção de biodiesel pela transesterificação do óleo de soja com o álcool (etanol e butanol), empregando 5% (m/m) das lipases comerciais imobilizadas Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM foi avaliada nas temperaturas de 50, 60 e 70°C. Para a lipase Lipozyme TL IM também foram estudadas as temperaturas de 30 e 40°C. Todas as reações foram conduzidas empregando razão molar álcool:óleo igual a 3, com adição escalonada do álcool, a fim de evitar a desnaturação da enzima (BERNARDES *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos para a lipase Novozym 435 são apresentados na Figura 3.3, onde se observa que o maior rendimento em ésteres alquílicos, independentemente do álcool utilizado, foi alcançado na temperatura de 70°C. Nas temperaturas de 50 e 60°C, os rendimentos em ésteres etílicos foram de 31 e 52%, respectivamente, já os rendimentos em ésteres butílicos foram de 19 e 37%, respectivamente. A temperatura de 70°C permitiu os maiores rendimentos em ésteres, cerca de 60%, quando o álcool utilizado foi o etanol, e 46%, quando o butanol foi utilizado.



(a) etanol

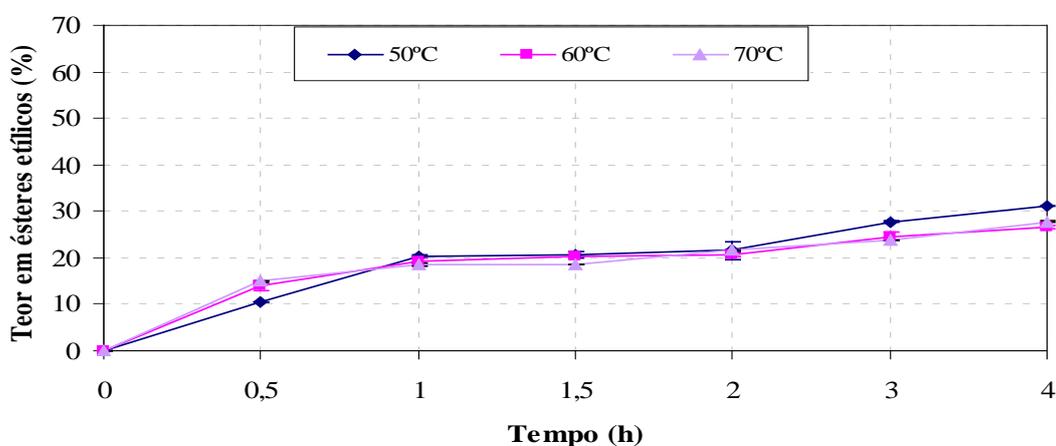


(b) butanol

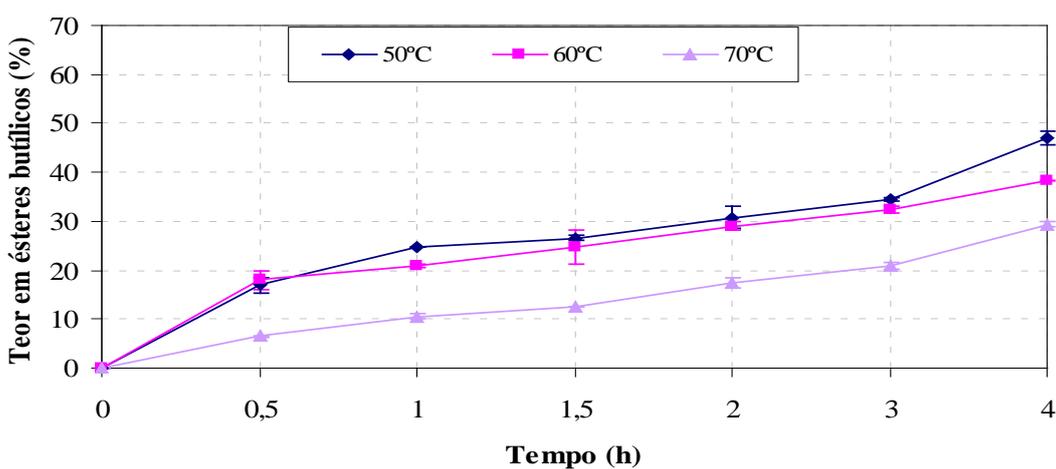
Figura 3.3 - Influência da temperatura no teor em ésteres alquílicos obtido na reação de transesterificação do óleo de soja refinado, utilizando razão molar de álcool ((a) etanol (b) butanol) /óleo de soja igual a 3, com adição escalonada de álcool (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) e Novozym 435 a 5% m/m.

Para a lipase Lipozyme RM-IM os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.4, onde se pode observar que o maior rendimento em ésteres, independente do álcool utilizado, foi alcançado na temperatura de 50°C. Nas temperaturas de 60 e 70°C os rendimentos em ésteres alquílicos foram, respectivamente, de 27 e 28%, quando o etanol foi utilizado, e de 38 e 29%, para as reações com o butanol. A temperatura de 50°C propiciou valores maiores de rendimento, 31% em ésteres etílicos e 44% em ésteres butílicos, nas condições reacionais citadas anteriormente.

Os resultados obtidos quando o biocatalisador Lipozyme TL-IM foi utilizado nas reações de transesterificação são apresentados na Figura 3.5, onde se observa que o maior rendimento em ésteres, independente do álcool utilizado, também foi alcançado na temperatura de 50°C (teor em biodiesel de 54% e 50% nas reações com etanol e butanol, respectivamente). Nas temperaturas de 30 e 40°C, o teor em ésteres etílicos foi de 51% e em torno de 40% de ésteres butílicos. Para as temperaturas de 60 e 70°C, o teor em biodiesel na reação com etanol foi de cerca de 47 e 41 %, respectivamente, e quando o butanol foi utilizado, os valores obtidos foram de 47 e 35%, respectivamente.

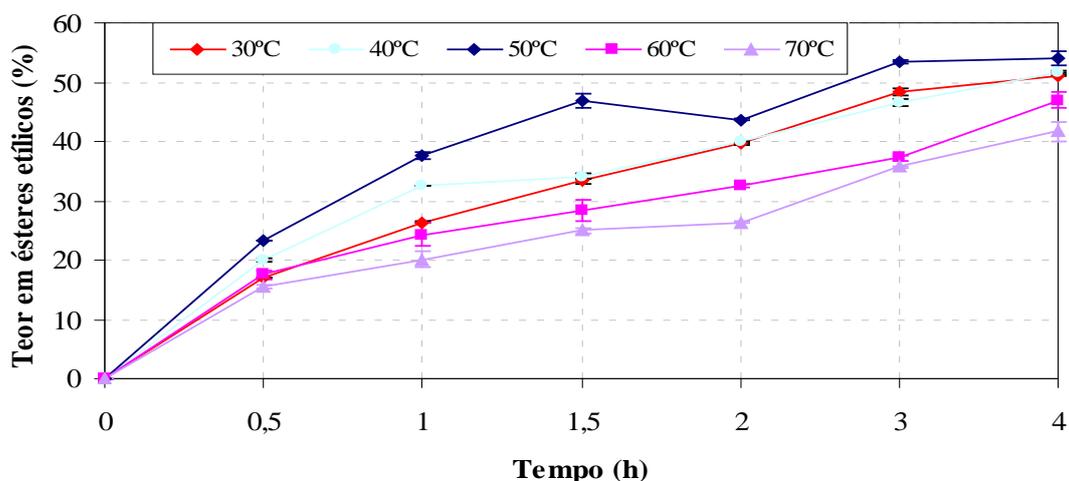


(a) etanol

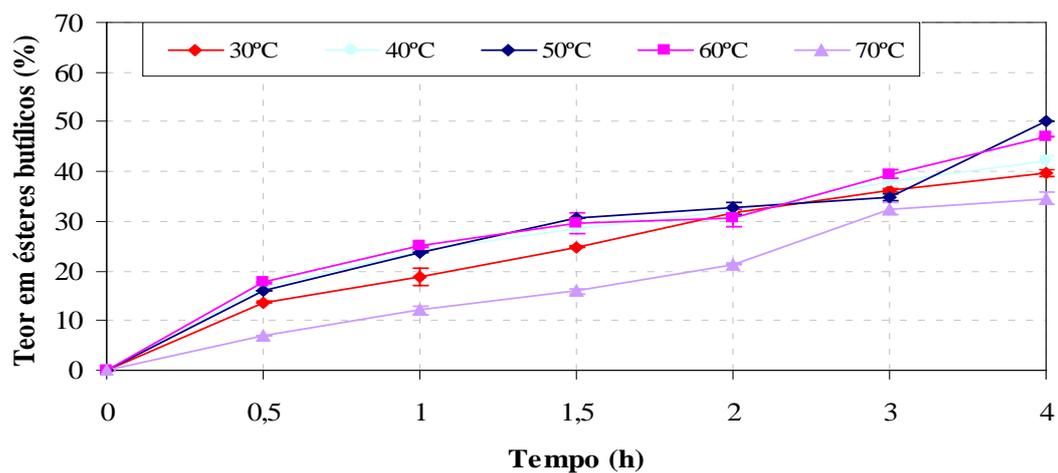


(b) butanol

Figura 3.4 - Influência da temperatura no teor em ésteres alquílicos obtido na reação de transesterificação do óleo de soja refinado, utilizando razão molar de álcool ((a) etanol (b) butanol) / óleo de soja igual a 3, com adição escalonada de álcool (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) e Lipozyme RM IM a 5% m/m.



(a) etanol



(b) butanol

Figura 3.5 - Influência da temperatura no teor em ésteres alquílicos obtido na reação de transesterificação do óleo de soja refinado, utilizando razão molar de álcool ((a) etanol (b) butanol) / óleo de soja igual a 3, com adição escalonada de álcool (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) e Lipozyme TL IM a 5% m/m.

A elevação da temperatura acarreta num aumento da velocidade de reação, já que esta aumenta a energia cinética das moléculas que compõem o sistema, possibilitando um aumento na probabilidade de choques efetivos entre essas moléculas. Porém, este efeito só é observado quando ocorre em um intervalo de temperatura que permita a manutenção da estrutura espacial da enzima. A elevação da temperatura pode ocasionar a perda da estrutura catalítica nativa da enzima (desnaturação), uma vez que as ligações químicas responsáveis pela manutenção dessa estrutura tridimensional são alteradas. Com o rompimento das ligações de hidrogênio, uma série de alterações estruturais ocorre, ocasionando a formação de uma nova

conformação ou um estado sem estrutura definida, no qual a enzima é dita desnaturada. Esta temperatura de desnaturação é variável para cada enzima, porém esta se encontra pouco acima de sua dita temperatura ótima (SEGEL, 1993).

O solvente empregado no meio reacional também influencia na estabilidade térmica das enzimas. Solventes hidrofílicos, como o etanol, tendem a diminuir a estabilidade térmica das enzimas.

Outro fator observado durante a condução das reações com a lipase Lipozyme TL-IM foi a formação de agregados com o aumento da temperatura de reação, o que acarretou em uma distribuição não homogênea do biocatalisador. Segundo Foresti e Ferreira (2005), as moléculas de enzima na superfície desses agregados estariam expostas a altas concentrações de substrato, contudo limitações à transferência de massa ao longo desse agregado poderiam limitar drasticamente a concentração de substrato dentro do agregado, impossibilitando que a enzima localizada no interior do mesmo participasse da reação. Assim, a baixa atividade de uma fração do catalisador reduziria o rendimento global, diminuindo a eficiência por unidade de massa do biocatalisador.

3.3 - Reação de síntese de biodiesel utilizando óleo ácido

Visto que o uso de óleos comestíveis refinados representa cerca de 75 % do custo de produção de biodiesel (HAAS *et al.*, 2006), o emprego de matérias primas mais baratas é uma premissa importante. No Brasil algumas das oleaginosas que são cultivadas e podem ser empregadas na produção de biodiesel são: a soja, o dendê, o girassol, o babaçu, o amendoim, a mamona, o pinhão manso, o algodão, a macaúba e muitas outras. Porém, no momento, apenas a soja é produzida em quantidade suficiente para a produção de biodiesel em escala comercial, uma vez que 80% da atual produção brasileira de óleos vegetais provêm dessa oleaginosa. No entanto, com o dendê, por exemplo, é possível fabricar uma quantidade 13 vezes maior de biodiesel do que com a soja. Pinhão manso, algodão, girassol e amendoim também são considerados fontes promissoras. Uma das desvantagens do uso dessas oleaginosas para produção de biodiesel é o maior índice de acidez em comparação com o do óleo de soja por hectare. O índice de acidez do óleo de soja situa-se entre 0,1 a 0,3 (máximo) (ANVISA, 1999), enquanto que o do óleo de girassol está entre 5,8 a 9 (ARAÚJO, 1994) e o do óleo de dendê é menor do que 5 (ANVISA, 1999).

Nesse sentido, foi estudada a síntese de biodiesel por via enzimática a partir da etanólise de óleos ácidos. Considerando que 50°C foi a melhor temperatura para as enzimas Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM, a influência da acidez e do tipo de lipase na reação de transesterificação do óleo de soja ácido foi avaliada nessa temperatura. As reações foram conduzidas empregando 5% (m/m) dos biocatalisadores, razão molar etanol/óleo igual a 3, razão molar etanol/ácido oleico igual a 1 com adição escalonada do álcool nos tempos de 0, 0,5 e 1 h. As reações foram realizadas com o álcool etílico, tendo em vista a sua importância no mercado energético nacional e custo para a produção de biodiesel. Além disso, de acordo com os resultados ilustrados nas Figuras 3.1, 3.3 a 3.5, não foi observado um efeito prejudicial significativo em relação ao uso do butanol que justificasse a escolha do álcool de maior cadeia.

Os óleos ácidos empregados foram preparados para ter valores de índice de acidez de 8, 50 e 90 e os valores obtidos para esses óleos foram de 8,5, 54,4 e 93,7 mg KOH. g⁻¹.

Os resultados da síntese de biodiesel na reação de transesterificação do óleo de soja ácido, com diferentes índices de acidez, realizada em quadruplicata, empregando a lipase Novozym 435, estão apresentados na Figura 3.6. Para a reação de transesterificação empregando o óleo com índice de acidez de 8,5 pode-se observar um perfil linear crescente na produção de biodiesel com o tempo de reação. Visto que o teor de ácido adicionado é pequeno, o biodiesel gerado é produzido em sua grande parte pela transesterificação do óleo e a cinética de reação é similar à observada na Figura 3.3. As reações de transesterificação com os óleos com índice de acidez de 54,4 e 93,7 apresentam, por outro lado, um elevado teor em biodiesel após 30 min. de reação, sinalizando que a formação de ésteres ocorre principalmente até os 30 min iniciais da reação e torna-se praticamente constante a partir de 1 h de reação indicando que praticamente todo o ácido adicionado foi esterificado.

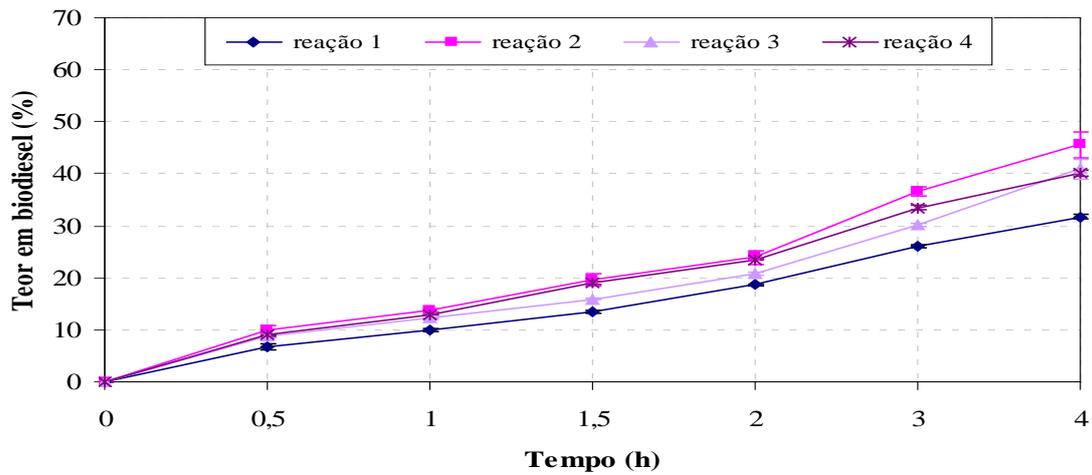
Conforme observado na Figuras 3.1a e 3.2a, a taxa da reação de esterificação catalisada pela Novozym 435 é muito maior que a de transesterificação, considerando o consumo de ácido oleico e de trilaurina, respectivamente, com o tempo. De acordo com Watanabe e colaboradores (2002), a lipase catalisa a esterificação dos ácidos graxos livres mais rápido do que a alcoólise dos triglicerídeos.

Na Figura 3.7 são apresentados os perfis de variação do teor de biodiesel formado em função do tempo obtidos na transesterificação do óleo de soja ácido, realizada em triplicata, empregando a lipase Lipozyme RM-IM. A reação de transesterificação empregando o óleo com índice de acidez de 8,5 apresentou o mesmo comportamento da reação apresentada na Figura 3.4 com o óleo de soja refinado. Os perfis obtidos nas reações de transesterificação

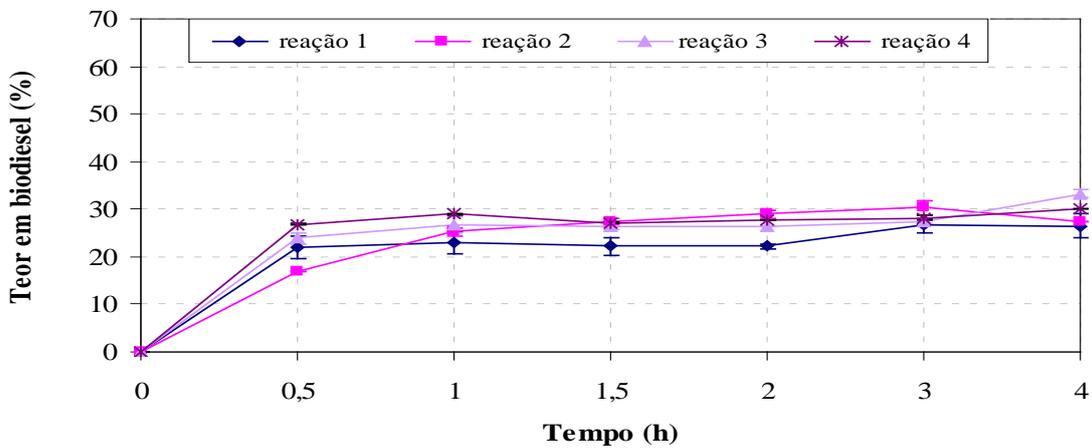
com os óleos com índice de acidez de 54,4 e 93,7 são similares e a taxa de formação de ésteres foi menor na primeira hora de reação do que a observada na reação catalisada por Novozym 435.

Os resultados da síntese de biodiesel, empregando Lipozyme TL IM, utilizando óleo de soja ácido são apresentados na Figura 3.8. Quando a lipase Lipozyme TL-IM foi empregada na reação de transesterificação do óleo com índice de 8,5 foi observado um perfil cinético semelhante ao da Figura 3.5, da mesma forma que para a Lipozyme RM IM e Novozym 435. Já as reações de transesterificação com os óleos com índice de acidez de 54,4 e 93,7 resultaram em menor formação de ésteres do que as apresentadas pelos outros biocatalisadores, o que era esperado considerando a menor atividade de esterificação dessa preparação enzimática

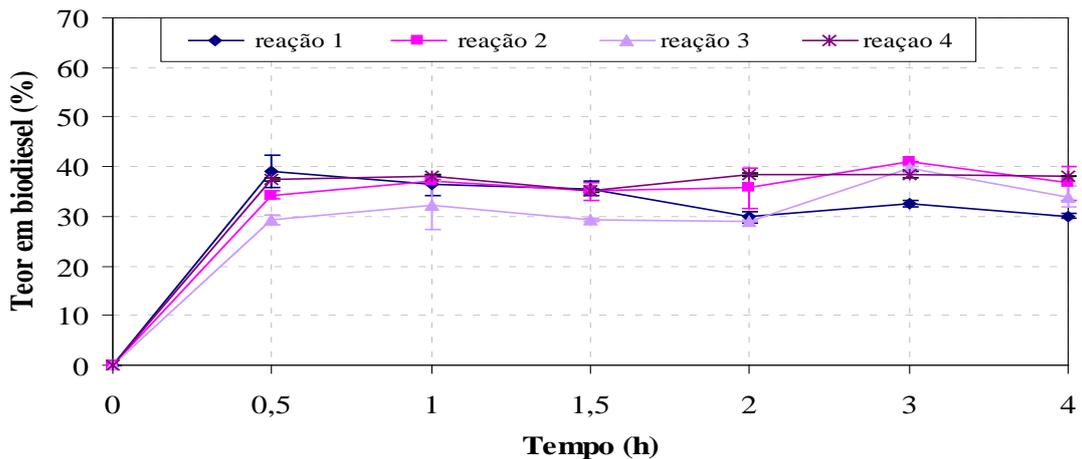
O consumo de ácido oléico também foi acompanhado nas reações de transesterificação entre o óleo de soja ácido e o etanol, sendo os resultados apresentados na Figura 3.9.



(a) Índice de acidez de 8,5

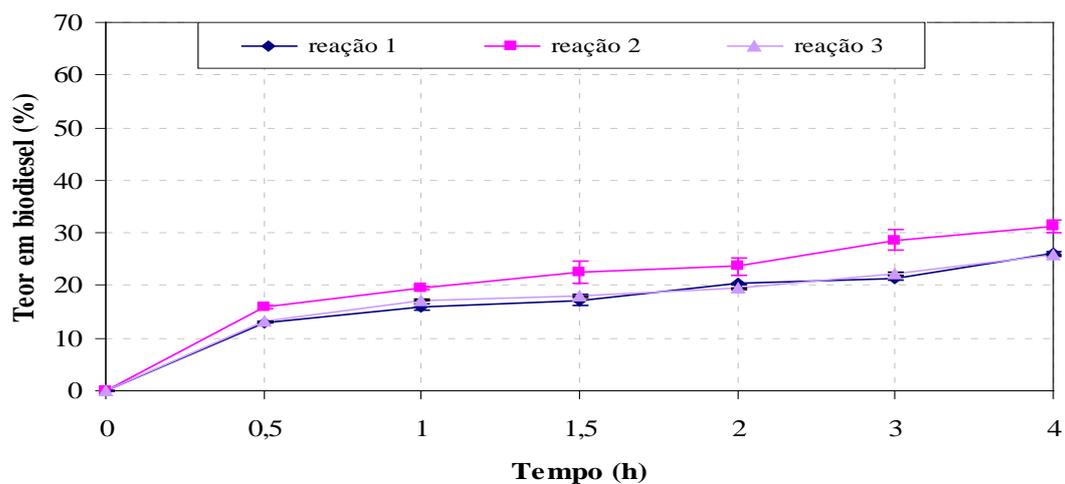


(b) Índice de acidez de 54,4

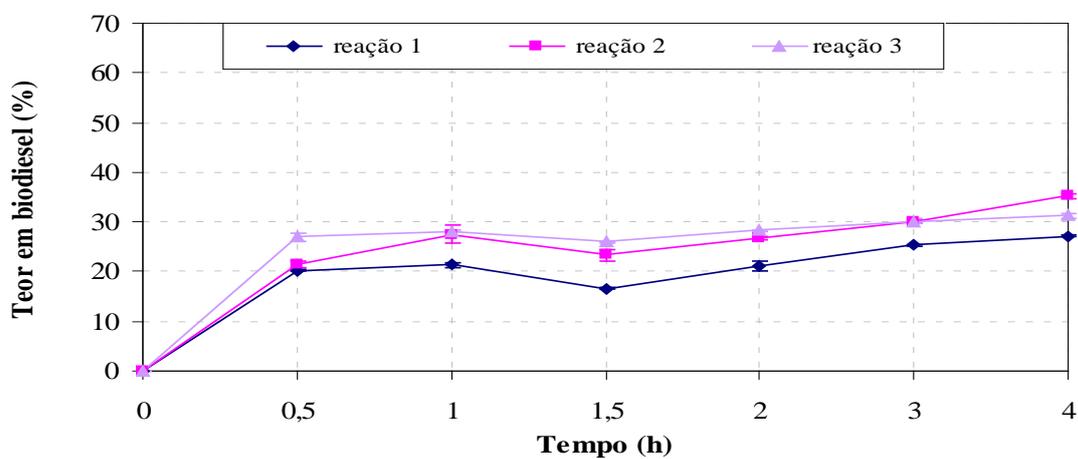


(c) Índice de acidez de 93,7

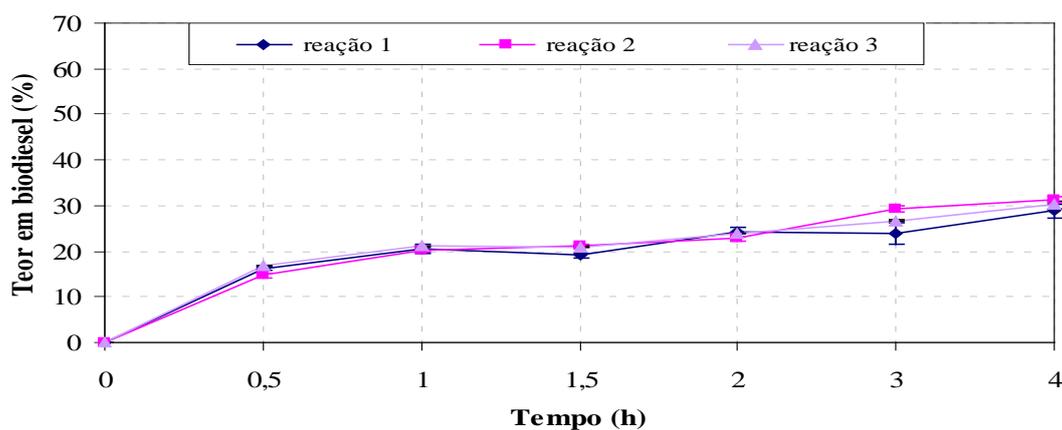
Figura 3.6 - Influência do teor de acidez ((a) IA 8,5 (b) IA 54,4 (c) IA 93,7) e do tipo de lipase no teor em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja ácido e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, etanol/ácido oléico igual a 1 com adição escalonada de etanol (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h), utilizando 5% m/m de Novozym 435, a 50°C.



(a) Índice de acidez de 8,5

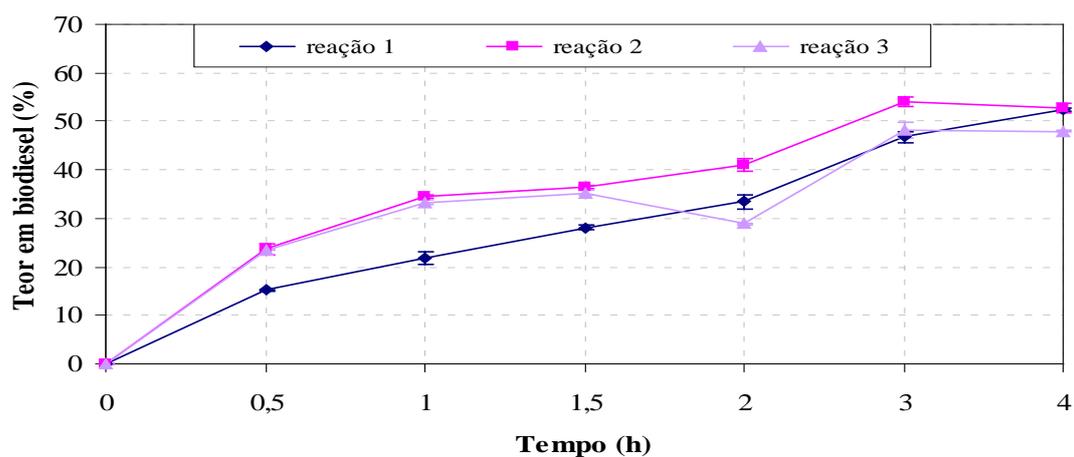


(b) Índice de acidez de 54,4

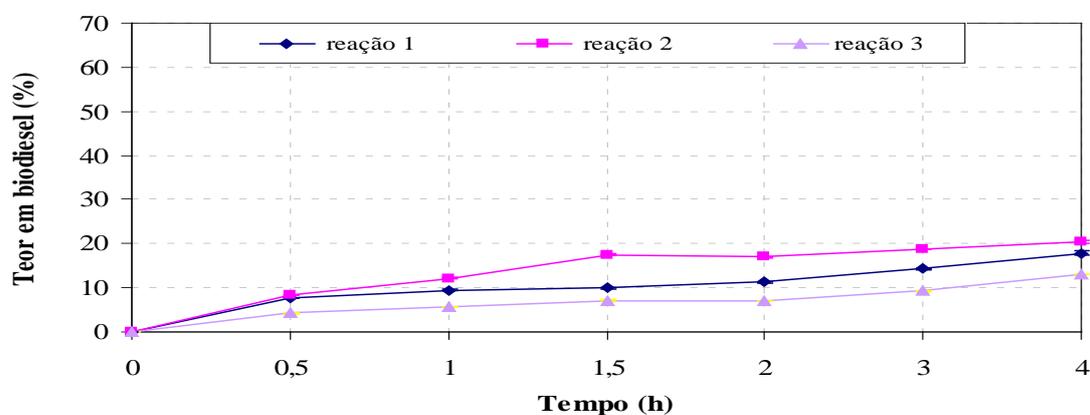


(c) Índice de acidez de 93,7

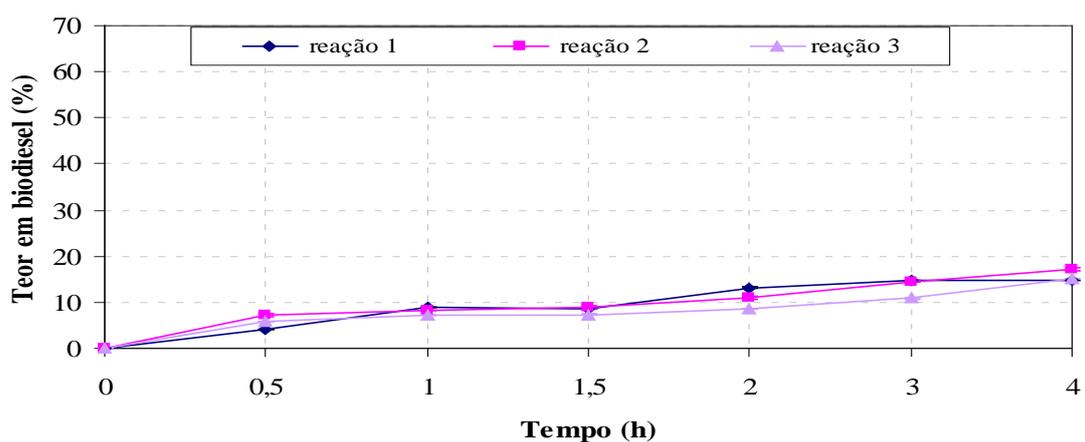
Figura 3.7 - Influência do teor de acidez ((a) IA 8,5 (b) 54,4 (c) 93,7) e do tipo de lipase no teor em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja ácido e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, etanol/ácido oléico igual a 1 com adição escalonada de etanol (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) utilizando 5% m/m de Lipozyme RM-IM, a 50°C.



(a) Índice de acidez de 8,5

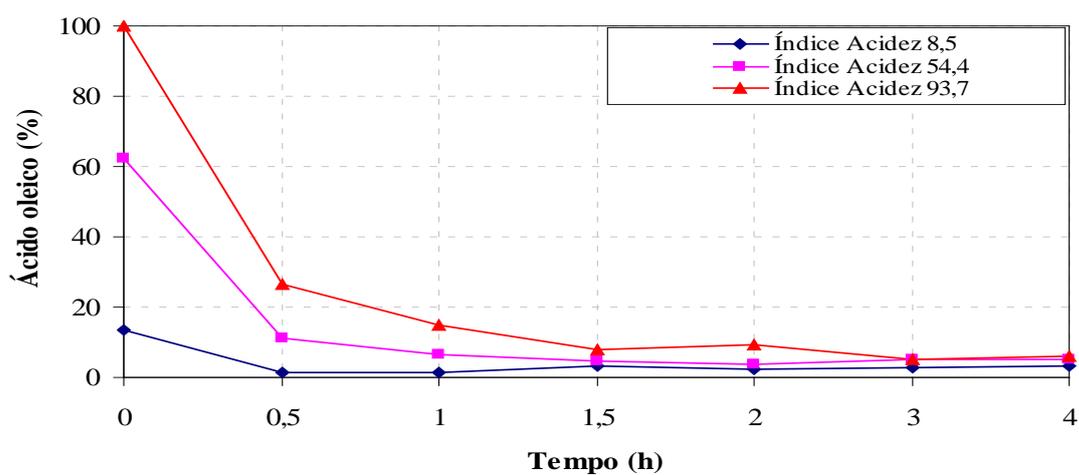


(b) Índice de acidez de 54,4

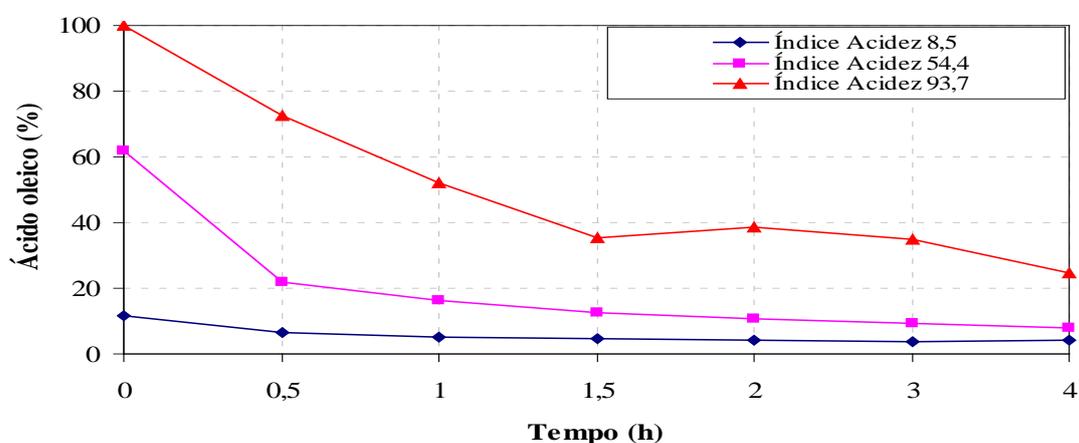


(c) Índice de acidez de 93,7

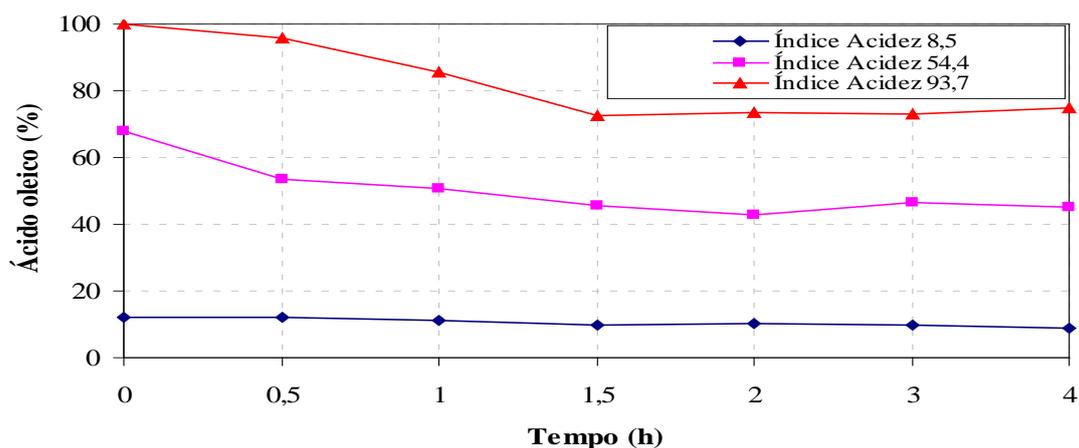
Figura 3.8– Influência do teor de acidez ((a) IA 8,5 (b) 54,4 (c) IA 93,7) e do tipo de lipase no rendimento em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja ácido e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, etanol/ácido oléico igual a 1 com adição escalonada de etanol (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) utilizando 5% m/m de Lipozyme TL-IM, a 50°C.



(a) Novozym 435



(b) Lipozyme RM-IM



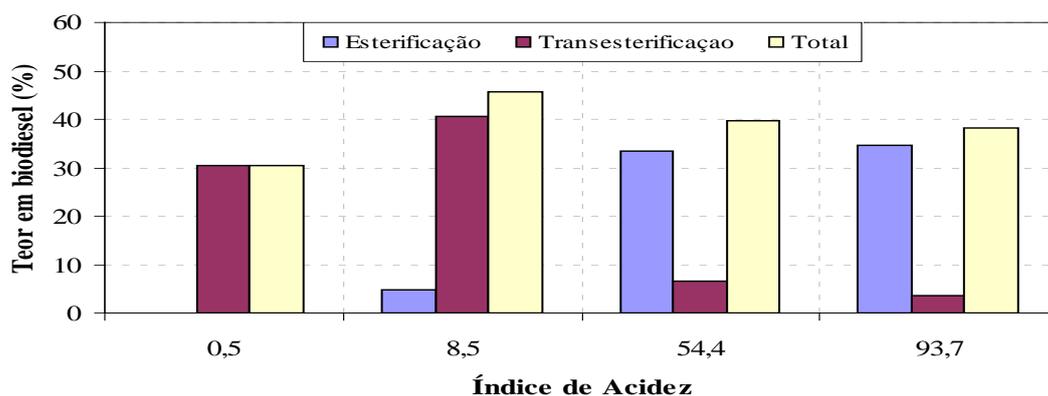
(c) Lipozyme TL-IM.

Figura 3.9 - Consumo do ácido oleico durante a reação de transesterificação do óleo de soja ácido com etanol, empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, etanol/ácido oleico igual a 1 com adição escalonada de etanol (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) utilizando 5% m/m de lipase ((a) Novozym 435 (b) Lipozyme RM IM (c) Lipozyme TL IM) a 50°C.

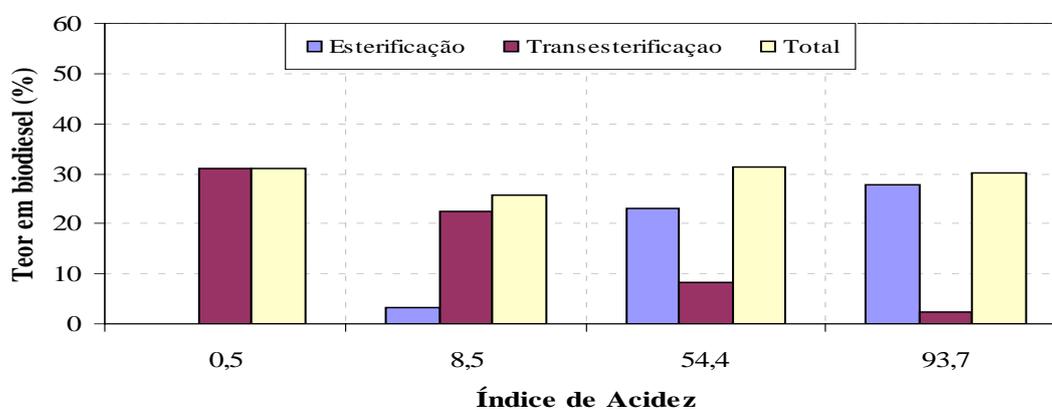
Conforme se pode verificar na Figura 3.9a, a Novozym 435 converteu praticamente todo o ácido graxo presente no meio, após 4 h, para as três reações testadas. Esse comportamento já era esperado, considerando a sua elevada atividade de esterificação. Na Figura 3.9b verifica-se que a reação conduzida com Lipozyme RM-IM apresentou um perfil reacional semelhante ao da reação com Novozym 435 para os óleos com índice de acidez de 8,5 e 54,4. Quando o óleo utilizado tinha índice de acidez de 93,7, a conversão de ácido oléico foi de apenas 75% após 4 h de reação, enquanto que com a Novozym foi de 94%. Na Figura 3.9c é apresentada a cinética de consumo de ácido oleico nas reações de síntese de biodiesel empregando Lipozyme TL-IM. Os valores de conversão de ácido oléico foram de 28%, 34% e 27,6%, para os óleos com índice de acidez de 8,5, 54,4 e 93,7, respectivamente. O pior desempenho dessa enzima em reações de esterificação é esperado considerando o menor valor de atividade de esterificação em relação aos dois outros biocatalisadores.

O teor em ésteres etílicos (biodiesel) obtido a partir da esterificação do ácido oleico e da transesterificação do óleo de soja com etanol na reação de transesterificação do óleo de soja ácido empregando as lipases Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM foi calculado, conforme o método descrito nos itens 2.2.6 a 2.2.8 está ilustrado na Figura 3.10.

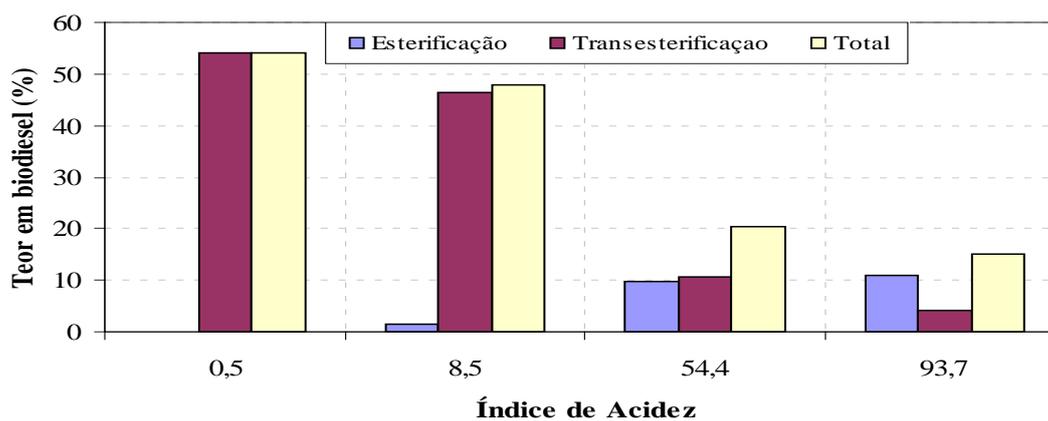
De acordo com os resultados apresentados na Figura 3.10, observa-se que a Lipozyme TL-IM apresentou rendimento em biodiesel, próximo a 50%, para óleo de soja com índice de acidez de 8,5, porém para índices de acidez maiores este rendimento diminuiu. Esses resultados refletem a alta atividade de transesterificação (3872 U/g) desse biocatalisador, associada à baixa atividade de esterificação (722 U/g). Por outro lado, o desempenho da Lipozyme RM-IM não foi influenciado pelo aumento da quantidade de ácido oleico no óleo, já que o teor em biodiesel manteve-se em torno de 30% para todos os níveis de índice de acidez do óleo investigados. Para a Novozym 435, uma ligeira queda no teor em biodiesel de 45 para 38% foi observada com o aumento da quantidade de ácido oleico adicionada ao óleo. Isso pode ser justificado considerando a elevada atividade de esterificação (3301 U/g) e de transesterificação (3115 U/g) apresentada por esse biocatalisador. Além disso, a Novozym 435 apresenta uma alta estabilidade mesmo na presença de teores maiores de etanol (TORRES *et al.*, 2004), que é a condição utilizada nas reações de transesterificação com óleo com índice de acidez igual a 90.



(a) Novozym 435



(b) Lipozyme RM-IM



(c) Lipozyme TL-IM

Figura 3.10 - Teor de biodiesel obtido após 4 h a partir da esterificação do ácido oleico e da transesterificação do óleo de soja na reação de transesterificação entre o óleo de soja ácido e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, etanol/ácido oleico igual a 1 com adição escalonada de etanol (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) utilizando 5% m/m de lipase ((a) Novozym 435 (b) Lipozyme RM IM (c) Lipozyme TL IM), a 50°C.

A queda no rendimento das reações de transesterificação empregando óleo ácido também pode ser explicada pelo efeito desnaturante que os alcoóis de cadeia curta como o metanol e o etanol causam nas enzimas. Deste modo, o excesso de álcool empregado quando o índice de acidez do óleo aumenta produz efeitos contrários como a diminuição da estabilidade da lipase. Sendo assim, a desativação da lipase pelo excesso de álcool foi mais atuante. O álcool pode remover a camada de água essencial que é responsável pela estabilidade da enzima imobilizada, bem como ocasionar a formação de complexos binários inibitórios álcool-lipase, o que justifica o efeito prejudicial da elevada concentração de álcool na atividade da lipase (KÖSE *et al.*, 2002).

Vários autores têm estudado o emprego de óleos ácidos na síntese de biodiesel. Estes óleos são provenientes de diversas fontes dentre as quais cabe destacar: óleos residuais, óleos que não podem ser empregados na indústria alimentícia como mahua (*Madhuca indica*), macaúba (*Acrocomia aculeata*) jatropha (*J.curcas*) e óleos que podem ser empregados nesta indústria, como o óleo de girassol e de canola (colza). Comparando com a literatura (trabalhos citados no capítulo 2), os rendimentos obtidos na transesterificação do óleo ácido no presente trabalho são promissores, indicando que é possível utilizar matérias-primas ácidas para sintetizar biodiesel empregando a transesterificação enzimática. A lipase Novozym 435 apresentou os melhores resultados independentemente da carga ácida empregada. Esta lipase converteu praticamente todo o ácido graxo presente no meio, o que a torna apta para ser utilizada na transesterificação dos mais diversos óleos ácidos, principalmente os com maiores índices de acidez, como o de macaúba. Já para óleos com baixo índice de acidez, como os de pinhão-manso, dendê, mamona e girassol, a lipase Lipozyme TL-IM é a mais indicada, visto que para o óleo ácido com índice de acidez de 8,5 obteve-se rendimentos superiores a 45%. A lipase Lipozyme RM-IM apresentou rendimentos de 30% independente da carga ácida utilizada, sendo indicada para a transesterificação de óleos com índice de acidez de até 50.

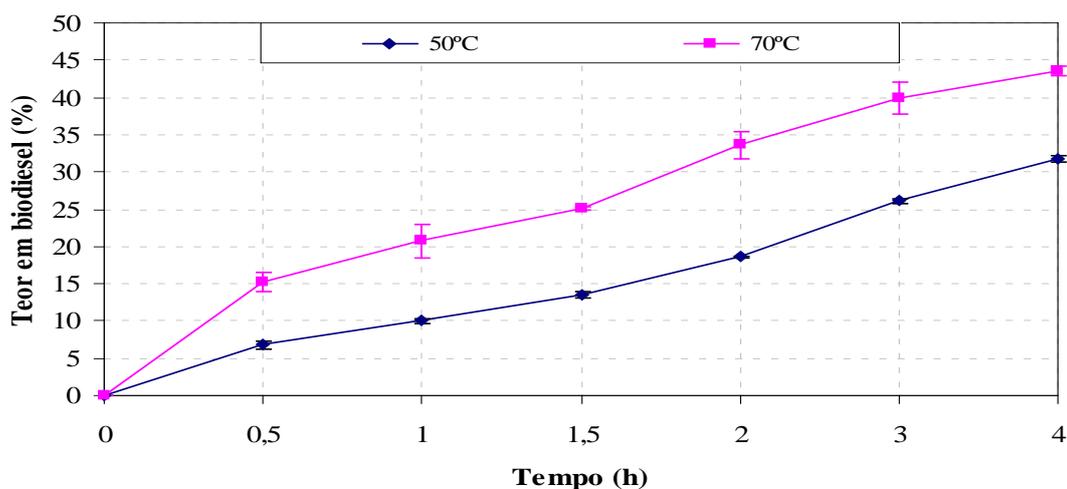
3.3.1 – Avaliação do efeito da temperatura na reação de transesterificação enzimática com o óleo ácido empregando a lipase Novozym 435

Visto que a lipase Novozym 435 proporcionou a obtenção de maiores teores de biodiesel na temperatura de 70°C, foram realizados também experimentos, nesta temperatura, com o óleo de soja com índice de acidez nominais de 8, 50 e 90. Estes experimentos foram

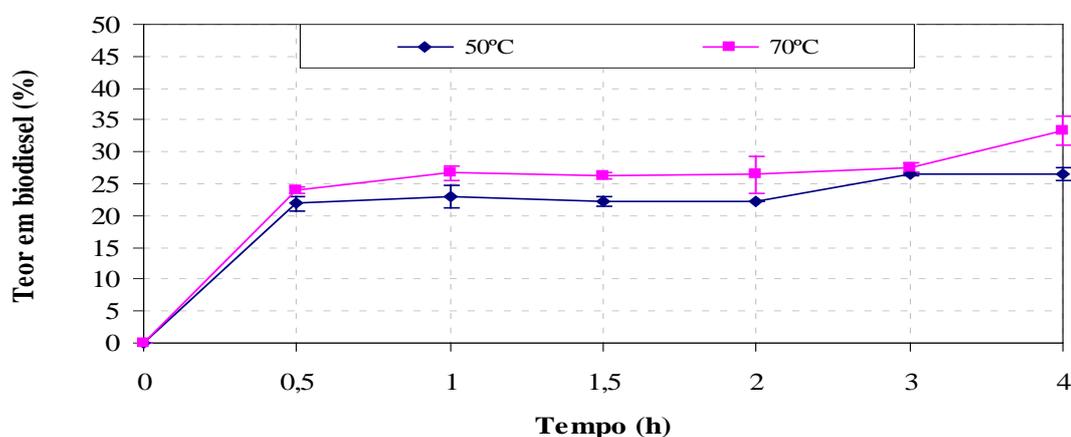
realizados em duplicata. Os resultados estão apresentados na Figura 3.11. Observa-se que o teor em biodiesel diminuiu com o aumento do índice de acidez do óleo a 70°C: 44%, 41% e 28% para os óleos com índice de acidez de 8,5, 54,4 e 93,7, respectivamente. Provavelmente, o aumento da temperatura associado ao aumento da quantidade de etanol no meio (consequência do maior índice de acidez empregado) acarretou em uma diminuição da estabilidade enzimática. Álcoois de cadeia curta geralmente têm um impacto negativo na estabilidade das lipases (BAN *et al.*, 2002) e este efeito desestabilizante aumenta com a elevação da temperatura (XU *et al.*, 2004).

Shimada e colaboradores (2001) estudaram a esterificação do ácido docosa-hexaenóico (DHA) empregando etanol como solvente. A reação foi conduzida empregando as seguintes condições: relação molar DHA/etanol de 1:1, 2% (m/m) de lipase de *Candida antarctica*, temperatura de reação entre 30 e 50°C. A presença do etanol foi o principal fator de inativação da lipase de *Candida antarctica*, que aumentou com a elevação da temperatura. Quando a temperatura empregada foi 30°C o rendimento em ésteres etílicos foi de 81%, para a temperatura de 40°C o rendimento obtido foi de 73%, na temperatura de 50°C, o rendimento alcançado foi de 30%. Este comportamento comprova que o efeito inibitório do etanol é potencializado pelo aumento da temperatura.

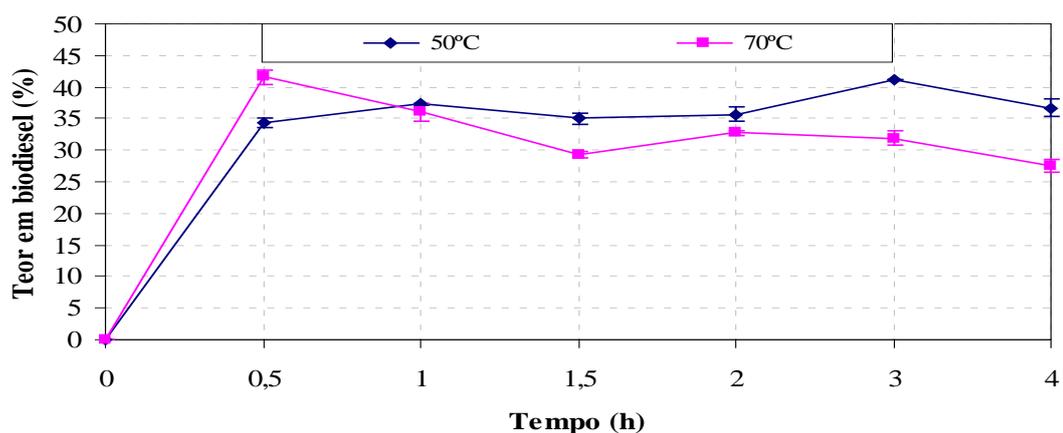
Este mesmo efeito foi observado por Xu e colaboradores (2004), na metanólise do óleo de soja empregando a lipase Lipozyme TL-IM em meio isento de solvente. A reação foi conduzida utilizando as seguintes condições: razão molar óleo de soja/metanol de 1:1, teor de lipase 4% (baseado na massa de óleo) e a temperatura variando de 30 a 50°C. A 40°C a taxa de reação foi maior do que a 30°C, mas um aumento adicional da temperatura, não resultou numa melhoria da taxa de reação. Quando uma razão molar metanol/óleo de soja maior que 1,5 foi empregada, a metanólise decresceu drasticamente. Sendo assim, a lipase Lipozyme TL-IM sofreu uma rápida inativação ocasionada pelo aumento na razão óleo:álcool juntamente com uma elevação da temperatura.



(a) Índice de acidez de 8,5



(b) Índice de acidez de 54,4



(c) Índice de acidez de 93,7

Fig. 3.11 - Influência do teor de acidez ((a) IA 8,5 (b) IA 54 (c) IA 93,7) e da temperatura (50°C e 70°C) no teor em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja ácido e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, etanol/ácido oléico igual a 1 com adição escalonada de etanol (1/3 em 0h, 1/3 após 0,5 h e 1/3 após 1 h) utilizando 5% m/m de Novozym 435.

3.4 - Transesterificação enzimática em modo contínuo

A influência do modo de produção do biodiesel foi investigada na reação de transesterificação enzimática do óleo de soja com o etanol empregando razão molar etanol:óleo igual a 3. Um leito catalítico de 5 cm de altura (volume de 3,93 cm³), a lã de vidro foi empregada para permitir a delimitação deste leito, o mesmo foi montado utilizando as lipases comerciais imobilizadas Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM. As reações foram conduzidas a 50°C para todas as enzimas, apesar da temperatura ótima para a lipase Novozym 435 ser 70°C. O reator empregado para este estudo foi um reator de leito fixo. As vantagens da utilização deste modo de produção são: aumento da área de contato entre a enzima e o substrato, remoção contínua do glicerol, proteção para as partículas das enzimas contra o cisalhamento mecânico, emprego de uma maior razão enzima/substrato. O teor de biodiesel obtido após percorrer o reator de leito fixo foi determinado pelo método descrito em 2.2.6.

3.4.1. Efeito da velocidade espacial na reação de transesterificação enzimática em modo contínuo

O efeito da velocidade espacial foi investigado nas reações de transesterificação entre o óleo de soja e o etanol empregando as condições reacionais descritas no item 2.2.4. As velocidades espaciais (do meio reacional composto por óleo de soja e etanol na razão molar de 1:3) testadas foram de 0,255 e 0,508 h⁻¹, empregando um leito catalítico de 0,7 g de lipase (5 cm de altura).

Na Figura 3.12 é apresentado o teor em biodiesel obtido na reação de transesterificação enzimática empregando a lipase Novozym 435. Observa-se que a lipase Novozym 435 manteve o rendimento em biodiesel em torno de 55%, o qual se manteve estável durante 4,5 h quando a velocidade espacial de 0,255 h⁻¹ foi empregada. A velocidade espacial de 0,508 h⁻¹ também permitiu um rendimento acima de 50%, porém não apresentou um perfil tão estável quanto o apresentado pela menor velocidade espacial, ocorreram flutuações no rendimento até 2 h de reação. Isto se deve ao menor tempo de contato da enzima com o substrato. Após 3 h, o rendimento começa a diminuir, sinalizando a

diminuição do potencial catalítico da enzima. Após 24 h de reação o rendimento sofreu uma queda brusca. Este comportamento é apresentado na Figura 3.13, na qual se pode observar uma diminuição drástica no rendimento em biodiesel independente da velocidade espacial empregada, porém, esta queda é mais acentuada na velocidade espacial de $0,255 \text{ h}^{-1}$. A queda do rendimento em biodiesel pode ter sido causada pelo acúmulo de glicerol no suporte do biocatalisador. Este acúmulo pode levar a uma perda significativa de atividade (XU *et al.*, 2011).

Chen e Wu (2003) investigaram a perda de atividade da lipase Novozym 435 na reação de transesterificação com diversos álcoois, como o metanol, etanol, n-propanol e n-butanol, e propuseram que esta poderia ocorrer devido ao material do suporte (resina acrílica) que adsorveria componentes polares como o metanol e o etanol, provocando a inativação da lipase.

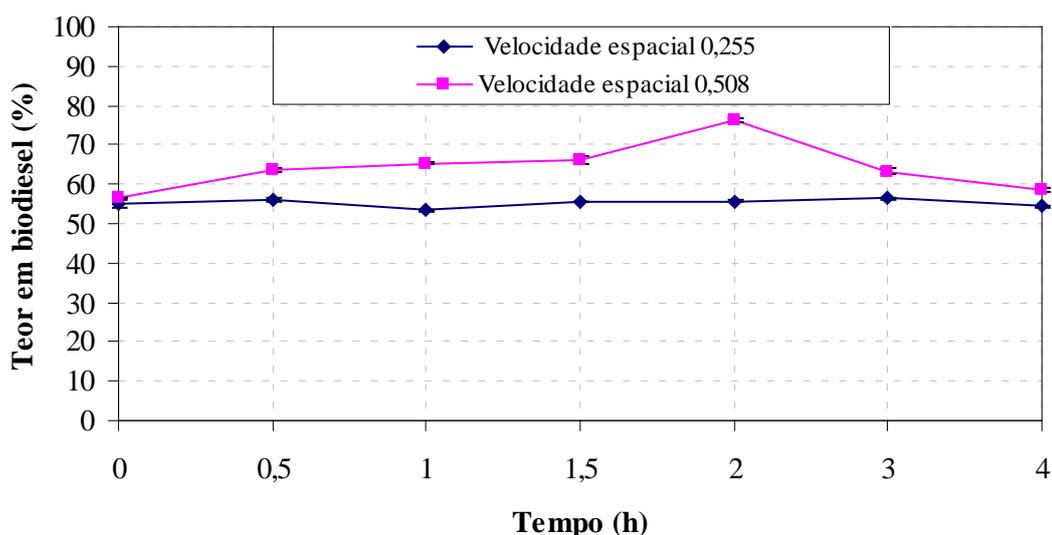


Figura 3.12 – Teor em biodiesel obtido na transesterificação entre o óleo de soja e o etanol, empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura da lipase Novozym 435 a 50°C .

Nota: Para a velocidade espacial de $0,255 \text{ h}^{-1}$ o tempo de 0 h equivale a um tempo de reação de 3 h, para a velocidade espacial de $0,508 \text{ h}^{-1}$ o tempo de reação é de 1,5 h.

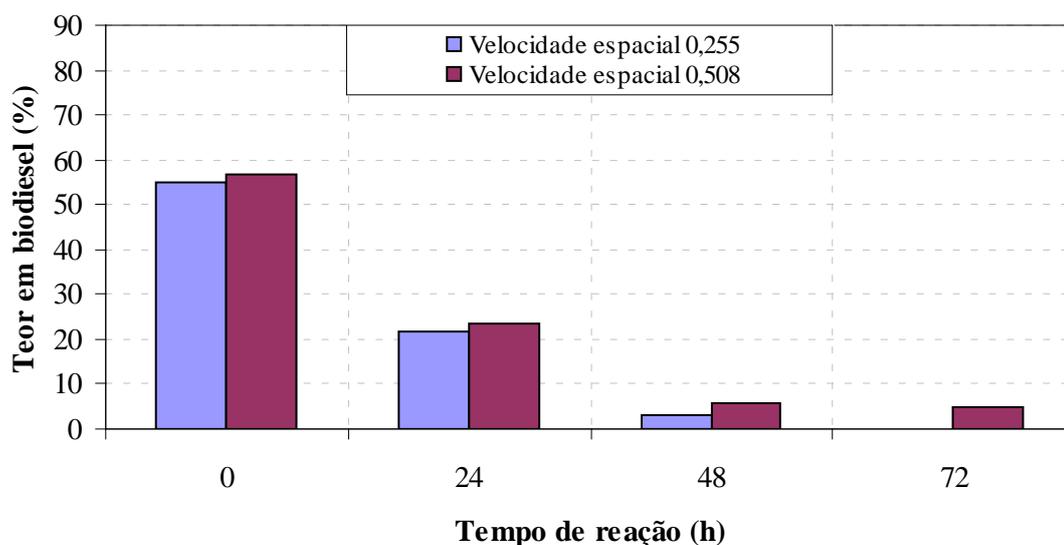


Figura 3.13 – Influência da velocidade espacial no teor em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura da lipase Novozym 435 a 50°C.

Nota: Para a velocidade espacial de 0,255 h⁻¹ o tempo de 0 h equivale a um tempo de reação de 3 h, para a velocidade espacial de 0,508 h⁻¹ o tempo de reação é de 1,5 h.

Os resultados da síntese de biodiesel em reator de leito fixo empregando a lipase Lipozyme RM-IM estão ilustrados na Figura 3.14.

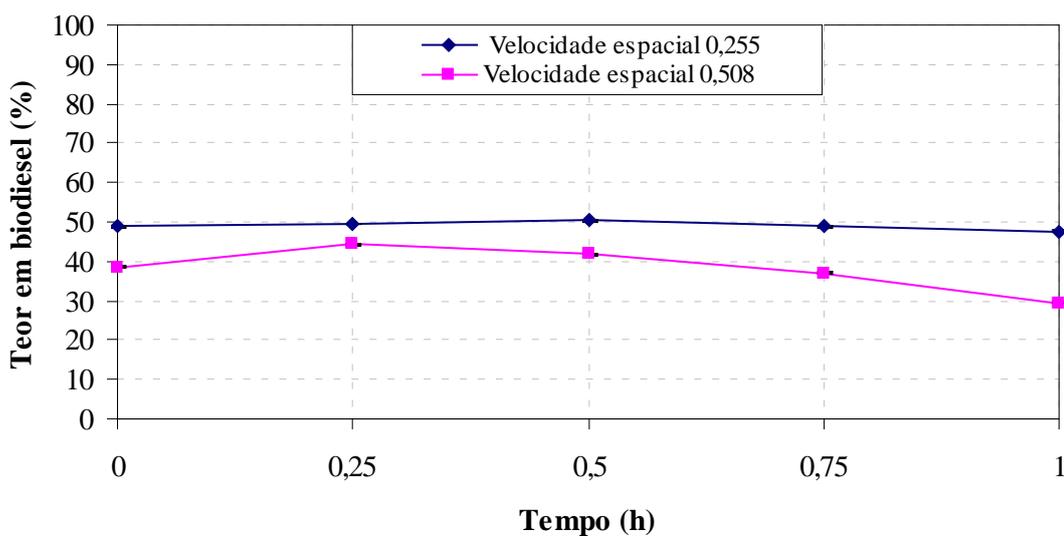


Figura 3.14 – Teor em biodiesel obtido na transesterificação entre o óleo de soja e o etanol, empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura da lipase Lipozyme RM-IM a 50°C.

Nota: Para a velocidade espacial de 0,255 h⁻¹ o tempo de 0 h equivale a um tempo de reação de 3 h, para a velocidade espacial de 0,508 h⁻¹ o tempo de reação é de 1,5 h.

A lipase Lipozyme RM-IM apresentou um rendimento de 50% quando a velocidade espacial de $0,255 \text{ h}^{-1}$ (tempo de reação de 3 h) foi empregada e o teor de biodiesel permaneceu praticamente constante até 1 h de reação. Na velocidade espacial de $0,508 \text{ h}^{-1}$ (tempo de reação de 1,5 h) o rendimento inicial de biodiesel obtido foi de 40%, porém este começou a diminuir após 0,5 h de reação. Os teores alcançados após 24 e 48 h de reação são mostrados na Figura 3.15.

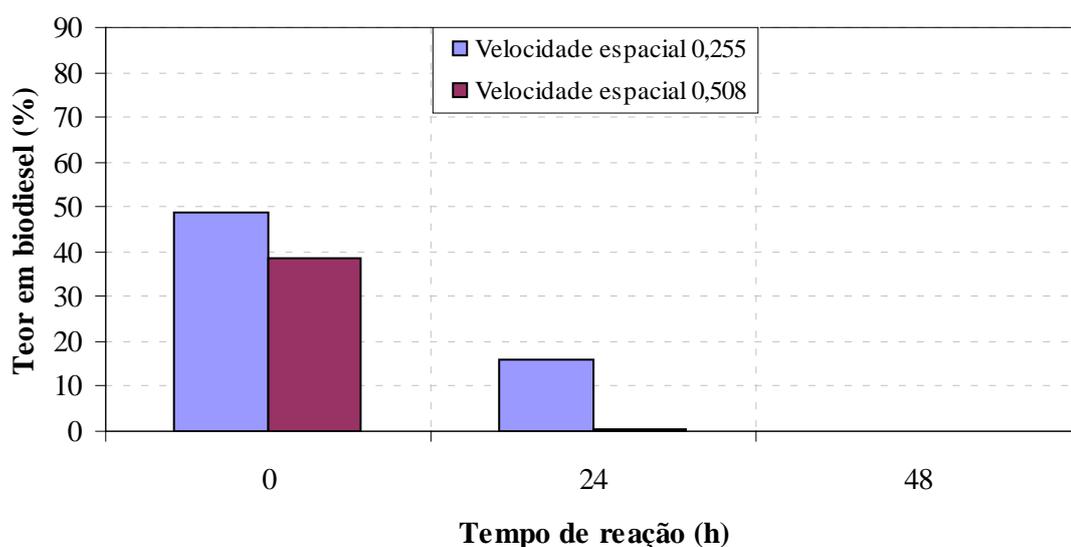


Figura 3.15 – Influência da velocidade espacial no teor em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura da lipase Lipozyme RM-IM a 50°C .

Nota: Para a velocidade espacial de $0,255 \text{ h}^{-1}$ o tempo de 0 h equivale a um tempo de reação de 3 h, para a velocidade espacial de $0,508 \text{ h}^{-1}$ o tempo de reação é de 1,5 h.

O aumento da velocidade espacial (diminuição do tempo de reação) potencializou a queda no rendimento, já que a lipase Lipozyme RM-IM apresentou uma diminuição drástica do seu potencial catalítico, provavelmente devido à formação de glicerol que adsorveu no suporte e obstruiu os sítios catalíticos. Esta inativação também pode ter sido provocada pelo solvente, já que o etanol pode causar a inativação da enzima, como já citado

Dossat e colaboradores (1999) estudaram o emprego da transesterificação enzimática do óleo de girassol com alto teor de ácido oleico utilizando a lipase Lipozyme RM-IM e o butanol utilizando n-hexano como co-solvente. A reação foi conduzida a 40°C , em uma coluna de 9 mm de diâmetro com um leito catalítico de 4 cm/g. A conversão de 95% foi alcançada no início da reação, porém a conversão decaiu com o tempo e tornou-se menor que

10% após 14 h de reação. O glicerol gerado durante a reação não foi solubilizado pelo *n*-hexano e permaneceu adsorvido no suporte da enzima, ocasionando um decréscimo na atividade enzimática.

Na Figura 3.16 são apresentados os resultados da reação de transesterificação em sistema contínuo empregando a lipase Lipozyme TL-IM.

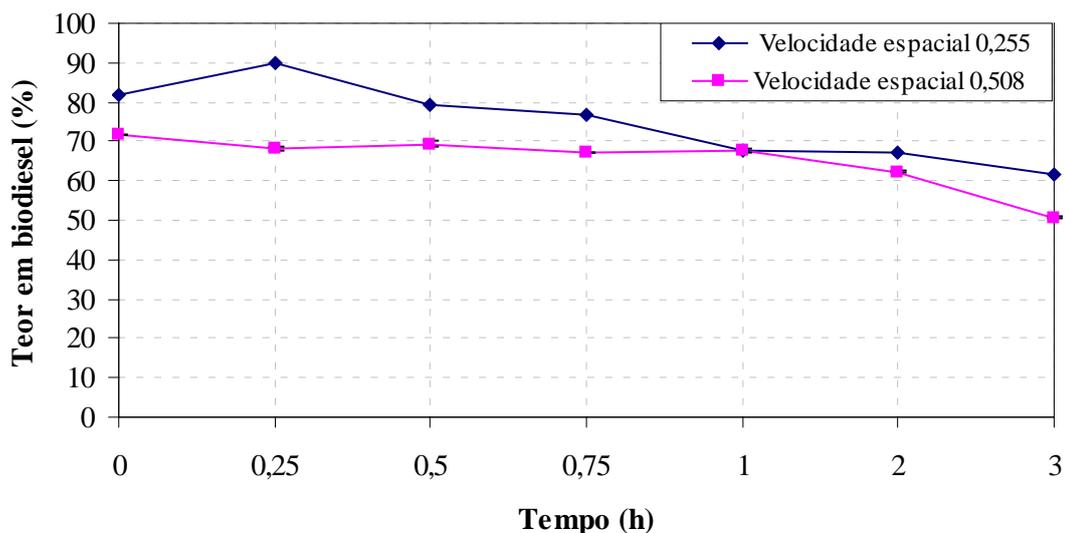


Figura 3.16 – Teor em biodiesel obtido na transesterificação entre o óleo de soja e o etanol, empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura da lipase Lipozyme TL-IM a 50°C.

Nota: Para a velocidade espacial de 0,255 h⁻¹ o tempo de 0 h equivale a um tempo de reação de 3 h, para a velocidade espacial de 0,508 h⁻¹ o tempo de reação é de 1,5 h.

A lipase Lipozyme TL-IM apresentou rendimentos maiores que os outros biocatalisadores empregados, porém não apresentou a mesma estabilidade. Na velocidade espacial de 0,508 h⁻¹ (tempo de reação de 3 h), o rendimento se manteve estável até 1 h de reação. Na velocidade espacial de 0,255 mL.min⁻¹ (tempo de reação de 1,5 h) o rendimento começou a cair após 0,5 h de reação. Na Figura 3.17 é mostrada a queda no rendimento em função do tempo de reação.

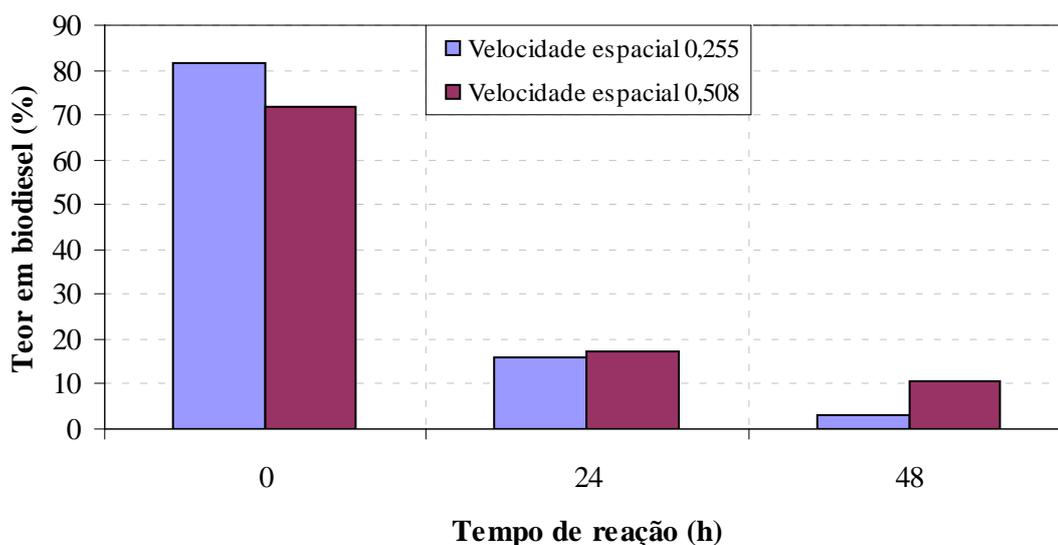


Figura 3.17 – Influência da velocidade espacial no teor em biodiesel na reação de transesterificação entre o óleo de soja e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura da lipase Lipozyme TL-IM a 50°C.

Nota: Para a velocidade espacial de 0,255 h⁻¹ o tempo de 0 h equivale a um tempo de reação de 3 h, para a velocidade espacial de 0,508 h⁻¹ o tempo de reação é de 1,5 h.

Após 24 h de reação ocorreu um declínio no rendimento, porém este não foi tão evidenciado quanto o apresentado pela Lipozyme RM-IM. Este comportamento pode ser explicado pela elevada atividade de transesterificação da lipase Lipozyme TL-IM.

A queda no rendimento após 24 h de reação para as lipases Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM pode ser explicada pela baixa solubilidade do glicerol, que na mistura de produtos tem um forte efeito negativo, por bloquear a atividade da enzima. Este efeito tem sido atribuído à formação de um filme hidrofílico (deposição do glicerol no suporte da enzima) ao redor da enzima resultando em limitações difusionais do substrato hidrofóbico da fase orgânica para os sítios ativos da enzima (DOSSAT *et al.*, 1999). Outro problema é o álcool não reagido que migra do meio reacional para a camada de glicerol formado que cobre a lipase imobilizada, resultando na inativação da lipase pela alta concentração local do álcool (WATANABE *et al.*, 2000), estes efeitos são potencializados no reator contínuo.

Comparando os rendimentos obtidos no processo em batelada com os obtidos no processo contínuo, esses últimos foram superiores, visto que a lipase não estava exposta ao cisalhamento, causado pelo agitador magnético no reator batelada, que ocasiona danos ao suporte, causando a diminuição da atividade catalítica do biocatalisador devido à diminuição

da área superficial e consequente redução no número dos sítios catalíticos (HAMA *et al.*, 2007).

Na literatura, inúmeros estudos foram realizados a fim de aperfeiçoar o processo de produção de biodiesel em modo contínuo, já que neste processo é possível reutilizar o biocatalisador sem uma separação prévia, remover continuamente o glicerol e proteger a enzima da tensão de cisalhamento mecânica.

Comparando os resultados obtidos na literatura com os do presente estudo, os teores em biodiesel obtidos e apresentados nas Figuras 3.12 a 3.16 são bem menores, porém a estratégia empregada na maioria dos trabalhos foi a adição escalonada do álcool em um sistema composto por reatores em série, o que diminui o efeito inibitório do álcool sobre a atividade enzimática da lipase, bem como a separação do glicerol do eluído, já que este produto é responsável pela formação de um filme que ocasiona limitações difusionais que impedem a migração do substrato hidrofóbico da fase orgânica para os sítios ativos da enzima.

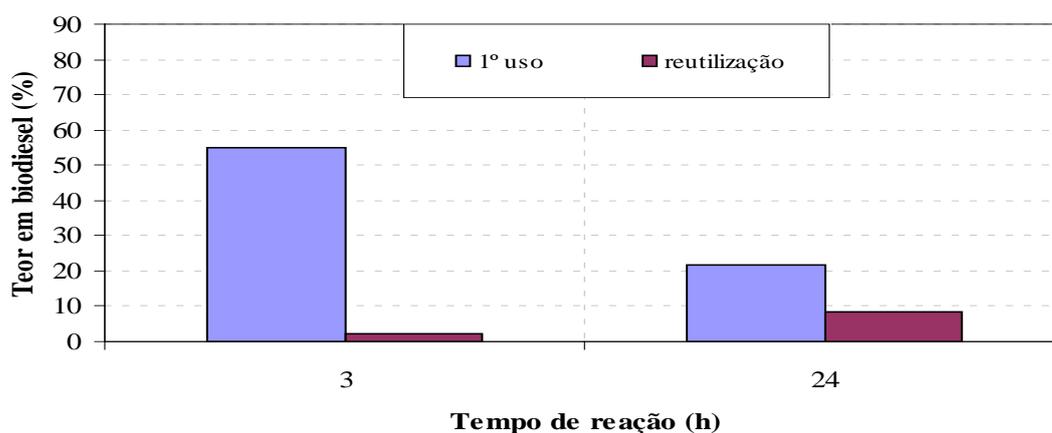
3.4.2. Reutilização das lipases na reação de transesterificação enzimática em modo contínuo

A possibilidade de reutilização do biocatalisador é uma das vantagens do emprego de processo contínuo utilizando lipases comerciais imobilizadas, o que pode ocasionar uma redução do custo do processo. Sendo assim, a investigação da reutilização das lipases na transesterificação enzimática em modo contínuo foi realizada empregando as mesmas condições utilizadas para avaliar o efeito da velocidade espacial dos reagentes: temperatura de 50°C, razão etanol:óleo de soja igual a 3, com adição única do etanol, um leito catalítico de 0,8 g (5 cm de altura), utilizando as velocidades espaciais de 0,255 e 0,508 h⁻¹. A enzima foi retirada do leito catalítico e lavada com 30 mL de 1-butanol, este álcool foi escolhido pois possibilitou uma maior remoção do glicerol adsorvido no suporte da enzima, conforme procedimento estudado pelo grupo (COUTEIRO, RIBEIRO e LANGONE, 2012) e filtrada à vácuo. Após esse tratamento, a enzima foi reutilizada.

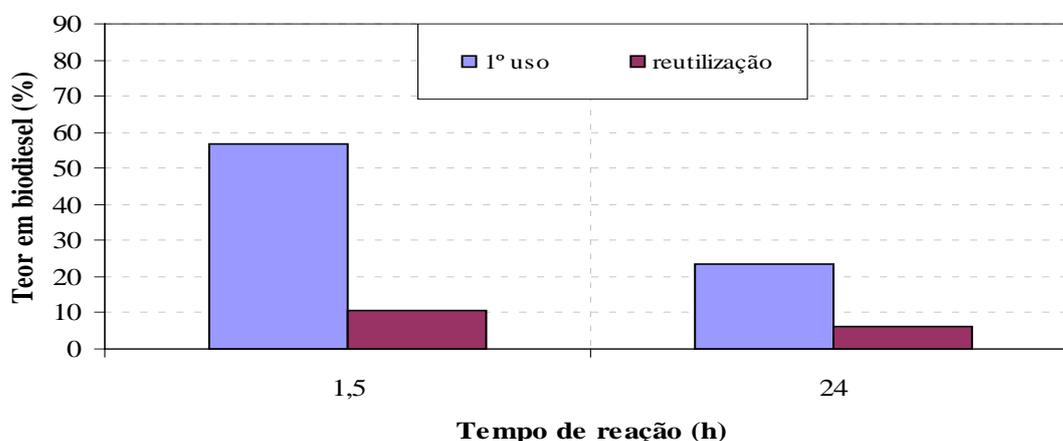
Nas Figuras 3.18, 3.19 e 3.20 são apresentados os resultados para a reutilização das lipases Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM, respectivamente. Os resultados

mostram que as três lipases mostraram uma redução significativa da atividade catalítica quando reutilizadas, independentemente da vazão empregada.

Esta perda da atividade catalítica dos biocatalisadores pode ser atribuída tanto ao glicerol adsorvido no suporte quanto ao efeito desnaturante do etanol. Além disso, nota-se também que, mesmo após a lavagem com butanol, não foi possível a regeneração da atividade catalítica.

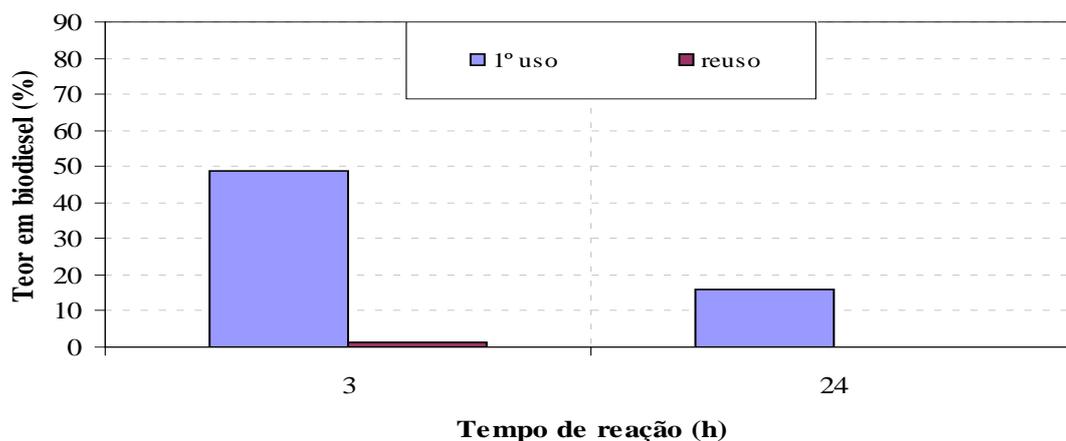


(a) Velocidade espacial de 0,255 h⁻¹

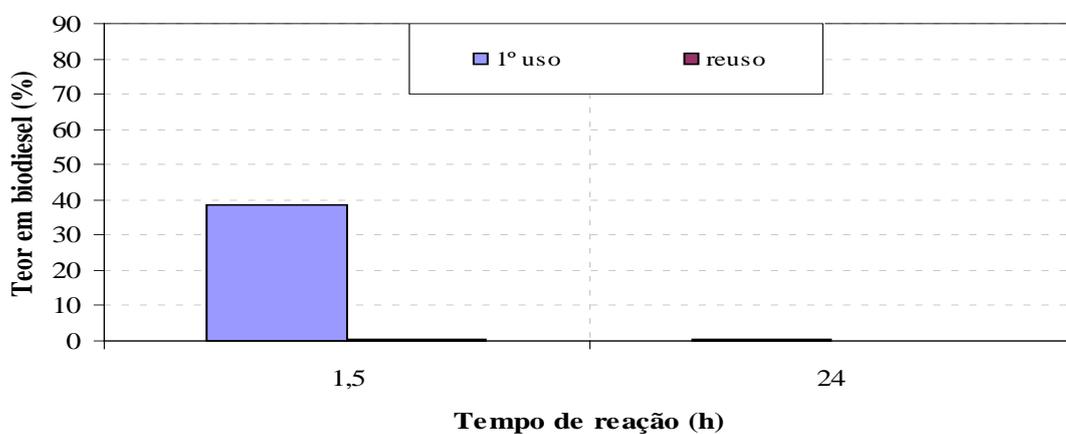


(b) Velocidade espacial de 0,508 h⁻¹

Figura 3.18 – Reutilização da lipase Novozym 435 na reação de transesterificação do entre o óleo de soja e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura a 50⁰C, para reação conduzida com velocidade espacial dos reagentes de (a) 0,255 h⁻¹ (b) 0,508 h⁻¹.



(a) Velocidade espacial de $0,255 \text{ h}^{-1}$



(b) Velocidade espacial de $0,508 \text{ h}^{-1}$

Figura 3.19 – Reutilização da lipase Lipozyme RM-IM na reação de transesterificação do entre o óleo de soja e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura a 50°C , para reação conduzida com velocidade espacial dos reagentes de (a) $0,255 \text{ h}^{-1}$ (b) $0,508 \text{ h}^{-1}$.

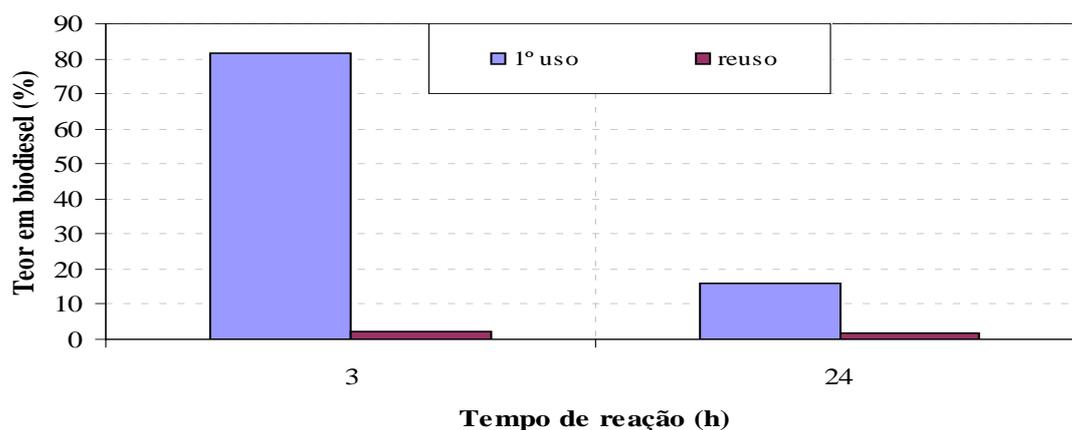
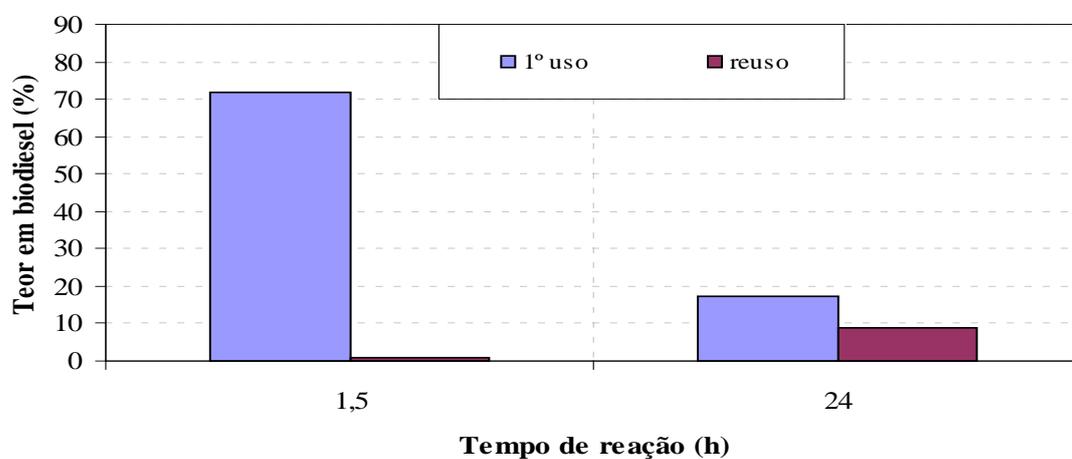
(a) Velocidade espacial de $0,255 \text{ h}^{-1}$ (b) Velocidade espacial de $0,508 \text{ h}^{-1}$

Figura 3.20 – Reutilização da lipase Lipozyme TL-IM na reação de transesterificação do entre o óleo de soja e o etanol empregando razão molar de etanol/óleo de soja igual a 3, utilizando um leito catalítico de 5 cm de altura a 50°C , para reação conduzida com velocidade espacial dos reagentes de (a) $0,255 \text{ h}^{-1}$ (b) $0,508 \text{ h}^{-1}$.

Segundo Soumanou e Bornscheuer (2003), a presença do glicerol pode inibir a reação através da limitação difusional do produto e substrato, devido a sua insolubilidade no óleo. Foi observada retenção da atividade catalítica da enzima superior a 75% da atividade original após 5 ciclos de 24 h com Lipozyme RM IM, a 10% m/m em relação ao óleo, a 40°C , empregando razão molar metanol/óleo de algodão igual a 3. Em condições semelhantes, a Lipozyme TL IM reteve atividade superior a 75% até o 3º reuso, apresentando perda significativamente superior de atividade em relação à Lipozyme RM IM. Isto pode ser atribuído a diferentes fatores como a inativação da enzima na fase hidrofóbica (óleo), tipo de

suporte utilizado na imobilização da enzima ou sensibilidade da enzima à longa exposição ao metanol.

Xu, Du e Liu (2005) também sinalizaram que o glicerol gerado na reação de transesterificação pode ser adsorvido no suporte de imobilização da lipase, proporcionando uma modificação do micro ambiente da enzima que ocasionou a um decréscimo na sua atividade.

A atividade catalítica inicial da lipase Novozym 435 foi avaliada por Sanchez e Vasudevan (2006) que observaram a manutenção de 95% desta atividade na transesterificação de trioleína com metanol, adicionado em etapas, a 60°C, com razão molar álcool/óleo igual a 8:1, na presença de hexano, após reuso em 5 bateladas e mais de 70% de sua atividade inicial após 8 bateladas. Uma nova batelada de reagentes era introduzida a cada 24h de reação.

A perda de atividade catalítica da lipase imobilizada de *Pseudomonas cepacia* foi investigada por Shah e Gupta (2007) na reação de transesterificação do óleo de pinhão manso com etanol empregando uma razão molar etanol/óleo igual a 4, com 10% de lipase, a 40°C, em meio sem solvente onde não ocorreu nenhuma perda de atividade até a 4ª reação.

Com base nos resultados obtidos pelo presente trabalho é possível produzir ésteres etílicos em modo contínuo empregando óleo de soja como substrato. Independentemente da velocidade espacial utilizada, a atividade das lipases diminui com a reutilização. Porém, a lipase Novozym 435 apresentou um melhor desempenho na reutilização quando comparada as demais lipases, indicando que esta lipase pode ser reutilizada no processo contínuo de produção de biodiesel. Contudo, ainda faz-se necessário um estudo para determinar um solvente que possa ser empregado na lavagem da lipase e que possibilite a diminuição do teor de glicerol adsorvido no suporte da enzima.

CONCLUSÕES

Três lipases comerciais imobilizadas, Novozym 435, Lipozyme RM-IM e Lipozyme TL-IM, foram comparadas, para síntese de biodiesel a partir de óleo de soja ácido, em relação as suas atividades de esterificação e de transesterificação. A lipase Novozym 435 apresentou elevado potencial catalítico, tanto para reação de transesterificação como de esterificação, enquanto que os resultados obtidos indicaram que o biocatalisador Lipozyme TL IM não é apropriado para reações de esterificação, devido a sua baixa atividade de esterificação. A lipase Lipozyme RM-IM é indicada para reações de esterificação, visto que apresenta elevada atividade de esterificação. Os efeitos da temperatura foram avaliados na reação de transesterificação do óleo de soja refinado com etanol e com butanol e a melhor temperatura estudada para as reações conduzidas com Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM foi a 50°C. Para a Novozym 435, o maior rendimento em ésteres alquílicos, independente do álcool empregado, foi a 70°C.

A síntese de biodiesel foi investigada na reação entre óleos ácidos, com índices de acidez de 8,5, 54,4 e 93,7, e etanol, a 50°C. A lipase comercial Novozym 435 permitiu a conversão de praticamente todo o ácido graxo presente no meio, independente da carga ácida empregada, o que a qualifica para ser utilizada na transesterificação dos mais diversos óleos ácidos. Lipozyme RM-IM apresentou teor em biodiesel de cerca de 30%, para as reações de transesterificação de óleos com índice de acidez de até 50. Para óleos com baixo índice de acidez, a lipase Lipozyme TL-IM é a mais indicada, visto que para o óleo ácido com índice de acidez de 8,5 obteve teor superior a 45%.

Assim, as lipases comerciais imobilizadas podem ser utilizadas na produção de biodiesel a partir de óleos com elevados índices de acidez, que representam uma matéria-prima barata, através de um processo ambientalmente aceitável. Óleos com elevados índices de acidez não podem ser utilizados no processo de produção de biodiesel empregando catálise alcalina sem uma pré-etapa de esterificação, que usualmente é feita com ácidos, já que a presença de ácidos graxos livres possibilita o processo de saponificação. Esses biocatalisadores podem, então, ser empregados em uma etapa preliminar, à catálise alcalina, em substituição à catálise ácida homogênea que apresenta várias desvantagens como a geração de um grande volume de efluentes ácidos, a necessidade de neutralização com o catalisador básico que resulta na perda de catalisador e formação de sabão.

A produção de biodiesel em sistema contínuo, utilizando reator de leito fixo empacotado com lipase imobilizada, foi investigada e para as três lipases (Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM) observou-se uma queda significativa no rendimento após 24 h de reação. A lipase comercial Novozym 435 manteve o teor em biodiesel em torno de 50% para as duas velocidades espaciais estudadas por 4 h. A reação com Lipozyme TL-IM apresentou maior teor em biodiesel (~80%), porém não apresentou a mesma estabilidade.

Também foi avaliada a lavagem da preparação enzimática, após 24 h de reação para as lipases Lipozyme RM-IM, 48 h para a lipase Lipozyme TL-IM e 72 h para a lipase Novozym 435 com butanol, e o seu reuso, contudo, a produção de biodiesel caiu significativamente. Considerando a quantidade de enzima utilizada no sistema contínuo e em batelada, conclui-se que em escala laboratorial o modo de produção em batelada é mais adequado, pois utiliza um menor teor de enzima.

SUGESTÕES

Estudar a produção de biodiesel a partir de óleo ácido em sistema contínuo empregando dois reatores de leito fixo, em série, utilizando diferentes lipases imobilizadas escolhidas de acordo com os resultados das atividades de esterificação e de transesterificação e dos ensaios conduzidos em batelada.

Avaliar a produção de biodiesel empregando óleo ácido em sistema contínuo utilizando três reatores de leito fixo, em série, empregando a lipase comercial imobilizada Novozym 435, empregando a razão molar álcool (etanol ou metanol): óleo ácido de 1:1.

Estudar a síntese de biodiesel em sistema contínuo utilizando duas bombas, uma para bombear o óleo ácido e outra para bombear o etanol, será necessário o emprego de um pré-leito para misturar o óleo ácido e o etanol.

Avaliar a produção de biodiesel em sistema contínuo utilizando óleo de mamona já que este forma uma mistura homogênea com o etanol, empregando razão molar etanol:óleo de mamona de 1:1.

Testar as condições empregadas no estudo de Watanabe *et al.* (2001), uma vez que os resultados obtidos neste experimento são muito bons.

Investigar a utilização de solvente na síntese de biodiesel em modo contínuo, para possibilitar a remoção do glicerol produzido, evitando a sua adsorção no suporte da enzima, e aumentar a estabilidade da enzima durante o processo.

Avaliar a utilização de lipases em uma etapa preliminar ao processo de síntese de biodiesel a partir de óleos ácidos empregando catalisadores alcalinos.

Estudar o efeito da velocidade espacial no leito fixo.

Testar a presença de glicerol adsorvido no suporte da enzima empregando os kits enzimáticos de determinação de glicerol.

REFERÊNCIAS

ABIOVE – Associação Brasileira da Indústria de Óleos Vegetais. **Análise Mensal do Mercado de Biodiesel: Edição nº 2 – Março de 2013.**

Disponível em: <http://www.abiove.org.br/site/_FILES/Portugues/08042013-091117-2013.03-2_-_analise_abiove_do_mercado_de_biodiesel.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2013.

ABREU, F. R.; LIMA, D. G.; HAMÚ, E. H.; WOLF, C.; SUAREZ, P. A. Z. Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 2009, n. 1-2, p. 29-33, 2004.

ADLERCREUTZ, P. Biocatalysis in non-convencional media. In: *Applied Biocatalysis*, Ed. Harwood Academic Publishers, 2 ed., Amsterdam, p. 295-316, 2000.

ALOULOU, A.; RODRIGUEZ, J. A.; FERNANDEZ, S.; VAN OOSTERHOUT, D.; PUCCINELLI, D.; CARRIERE, F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1761, n. 9, p. 995–1013, 2006.

AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 1, p. 57–66, 2007.

AMORIM, P. Q. R. Gargalos e oportunidades da cadeia produtiva do biodiesel. In: FNP Consultoria & Agroinformativos. *AGRIANUAL 2008: Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira*. São Paulo: Instituto FNP, 2008, p. 38-42.

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Boletim Mensal do Biodiesel: Março de 2013.** Disponível em:

<<http://www.anp.gov.br/?pg=66827&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1374749272870>>. Acesso em 15 mar. 2013.

ANVISA. Resolução n. 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais, *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, p. 82 - 87, 1999.

ARAÚJO, C. N. L.; MAIA, G. A.; NUNES, R. de P.; GUEDES, Z. B de L.; MONTEIROS, J. C. S. Caracterização de doze genótipos de girassol (*Hellinathus annuus L.*) obtidos sob condições climáticas do estado do Ceará. *Pesquisas Agropecuária Brasileira*, v. 29, n.6, p. 901-906, Brasília-DF, 1994.

AZÓCAR, L.; CIUDAD, G.; HEIPIEPER, H. J.; NAVIA, R. Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 88, n. 3, p. 621-636, 2010.

BALCAO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.

BAN, K.; HAMA, S.; NISHIZUKA, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T., KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 17, n. 3-5, p. 157-165, 2002.

BARNWAL, B.; SHARMA, M. P. Prospect of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable & sustainable energy reviews*, v.9, p. 363–378, 2005.

BEHZADI S.; FARID M. M. Review: examining the use of different feedstock for the production of biodiesel. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, v.2, n.5, p. 480-486, 2007.

BERCHMANS, H.J.; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1716-1721, 2008.

BERNARDES, O. L.; BEVILAQUA J. V.; LEAL M. C. M R.; FREIRE, D. M. G; LANGONE, M. A. P. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136–140, p. 105-114, 2007.

BOEHMAN, A. L. Biodiesel production and processing: foreword. *Fuel Process Technology*, v. 86, p. 1057-1080, 2005.

BOZBAS, K. Biodiesel as an alternative motor fuel: production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 12, p. 542-552, 2008

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

BRASIL, 2012. Disponível em:
< <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2012/11/06/aumento-na-producao-de-biodiesel-exigira-novas-materias-primas>>. Acesso em 10 mai. 2013.

BRASIL, 2013. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/sobre/economia/energia/matriz-energetica/biocombustiveis>>. Acesso em 13 mai. 2013.

BRUSAMARELO, C. Z.; ROSSETE, E.; CÉSARO, A.; TREICHEL, H, OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of lipase catalyzed synthesis of soybean fatty acid ethyl esters in pressurized propane. *Journal of Biotechnology*, v. 147, n. 2, p. 108-115, 2010.

BROCKMAN, H. L.; MOMSEN, W. E.; TSUJITA, T. Lipid-lipid complexes: Properties and effects on lipase binding to surfaces. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 65, n. 6, p. 891-896, 1988.

CANAKSI, M; J. VAN GERPEN, J. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Transactions of ASAE*, v. 44, p.1429-1436, 2001.

- CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B; NOFFS M. D'ADDIO; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v. 26, n.1, 2003.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CHEN, J. W.; WU, W. T. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95, n. 5, p. 466-469, 2003.
- CHEN, G.; YING, M.; LI, W. Enzymatic conversion of waste cooking oils into alternative fuel-biodiesel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129–132, p. 911-921, 2006.
- CHEN, Y. M.; XIAO, B.; CHANG, J.; FU, Y.; LV, P. M.; WANG, X. W. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management*, v. 50, n. 3, p. 668-673, 2009.
- 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*, v. 2011, p. 1-6, 2011.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, 2013. Disponível em:< http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_09_10_43_44_boletim_portugues_agosto_2013_port.pdf>. Acesso em 01 ago. 2013.
- COUTEIRO, P. P.; RIBEIRO, D. S.; LANGONE, M. A. P. Reutilização de lipases comerciais imobilizadas na síntese de biodiesel a partir da etanólise ou butanólise do óleo de soja. XXIII Congresso IberoAmericano de Catálisis. Santa Fé, Argentina, 2012.
- DASARI, M. A.; KIATSIMKUL, P. P.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G.J.; Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. *Applied Catalysis A: General*, v. 281, p. 225-231, 2005.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.
- DENG, L.; XU, X. B.; HARALSSON, G.G.; TAN, T. W; WANG, F. Enzymatic production of alkyl esters through alcoholysis: A critical evaluation of lipases and alcohols. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 82, n. 5, p. 341–347, 2005.
- DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; GREEN, R.; WEI, Y.; YAMAGUCHI, S.; JOERGER, R.; HAAS, M. J.; DEREWENDA, Z. S. Current Progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Engineering*, n. 7, p. 551-557, 1994.
- DERMIBAS, A. Diesel fuel from vegetable oil via transesterification and soap pyrolysis. *Energy Sources*, v. 24, p. 835-841, 2002.
- DERMIBAS, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy*, v. 35, p. 4661-4670, 2007.
- DERMIBAS, A. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Conversion and Management*, v. 49, p. 125-130, 2008.

DODSON, G. G.; LAWSON, D. M.; WINKLER, F. K. Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. *Faraday Discuss*, v. 93, p. 95-105, 1992.

DORADO, M. P. Optimization of Alkali-Catalyzed Transesterification of *Brassica Carinata* Oil for Biodiesel Production. *Energy & Fuels*, v.18, p. 77-83, 2004.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed-bed reactor: influence of the glycerol production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, n. 3-5, p. 194-200, 1999.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 30, n. 1, p. 90-94, 2002.

DRAPCHO, C. M.; NHUAN, N. P.; WALKER, T. H. *Biofuels Engineering Process Technology*, Mc Graw-Hill, New York, NY, USA, 2008.

DU., W.; XU, Y.; LIU, D.; SENG, J. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, n. 3-4, p. 125-129, 2004.

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION – EIA. International energy statistics. 2013. Disponível em:

<<http://tonto.eia.gov/cfapps/ipdproject/IEDIndex3.cfm?tid=79&pid=79&aid=1>>. Acesso em 13 mar. 2013.

FELIZARDO, P. M. G. Produção de biodiesel a partir de óleos usados de frituras- Lisboa: Centro de informação de Resíduos, Instituto Superior Técnico, Departamento de Engenharia Química, 127p. Relatório Técnico, 2003.

FELIZARDO P.; NEIVA CORREIA M. J.; RAPOSO I.; MENDES J. F.; BERKEMEIER R.; BORDADO J.M. Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Manage*, v. 26, p. 487-494. 2006.

FERRÃO-GONZALES, A. D.; VÉRAS, I. C.; SILVA, F. A. L.; ALVAREZ, H. M.; MOREAU, V. H. Thermodynamic analysis of the kinetics reactions of the production of FAME and FAEE using Novozym 435 as catalyst. *Fuel Processing Technology*, v. 92, p. 1007-1011, 2011.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A. Review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 5, p. 1298-1315, 2009.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida Antarctica B* adsorbed on polypropylene powder. *Catalys. Today*, v. 107-108, p. 23-30, 2005.

FU, B.; VASUDEVAN, P. T. Effect of solvent-co-solvent mixtures on lipase catalyzed transesterification of canola oil. *Energy and Fuels*, v. 24, p. 4646-4651, 2010.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 5, p. 405 – 416, 2001.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology*, v. 86, p. 1097–107, 2005.

GHALY, A. E.; DAVE, D.; BROOKS, M. S.; BUDGE, S. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v. 6, n. 2, p. 54-76, 2010.

HAAS, M. J.; SCOTT, K. M.; ALLEMAN, T. L.; MC CORMICK, R. L.; Engine performance of biodiesel fuel prepared from soybean soap stock: a high quality renewable fuel produced from a waste feedstock. *Energy Fuels*, v. 15, p. 1207, 2001.

HAAS M. J.; MCALOON A. J.; YEE W. C.; FOGLIA T. A. A process model to estimate biodiesel production costs. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 671-678, 2006.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H. Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. *Process Biochemistry*, v. 43, n. 12, p. 1436-1439, 2008.

HALIM S. F. A.; KAMARUDDIN A. H.; FERNANDO, W. J. N. 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*, v. 100, p. 710-716, 2009.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, I.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H., FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal*, v. 34, p. 273-278, 2007.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; KURATANI, N.; NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. *Biochemical Engineering Journal*, v. 55, p. 66–71, 2011.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.

HE, Q.; XU, Y., TENG, Y., WANG, D. Biodiesel Production catalyzed by whole cell lipase from *Rhizopus chinesis*. *Chinese Journal of Catalysis*, v. 29, p. 41-46, 2008.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. *Biosource Technology*, v. 99, p. 277-286, 2008.

HOU, C. T.; SHAW, J. F. *Biocatalysis and Bioenergy*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 2008.

HSU, A. F.; JONES, K. C.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Transesterification activity of lipases immobilized in a phyllosilicate sol-gel matrix. *Biotechnology Letters*, v. 26, p. 917-921, 2004.

- ISO, M.; CHEN, B. X.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.
- JAEGER, K. E.; DIJKA STRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures and biotechnology applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*. v. 53, 315-351, 1999.
- JEGANNATHAN, K.R.; ENG-SENG, C.; RAVINDRA, P. Economic assessment of biodiesel production: Comparison of alkali and biocatalyst processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 745-751, 2011.
- KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, n. 1, p. 12-15, 2001.
- KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, v. 86, p. 1059-1070, 2005.
- KÖSE, O.; TÜTER, M, AKSOY, H. A. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresource Technology*. v. 83, n. 2, p.125-129, 2002.
- KUMARI, V.; SHAH, S.; GUPTA, M. N. Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*. *Energy and Fuels*, v. 21, p. 368-371, 2007.
- LANGONE, M. A. P.; SANT'ANNA, G. J. Enzymatic synthesis of medium-chain triglycerides in a solvent free system. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 77-79, p. 759-770. 1999
- LARA, P. V.; PARK, E. Y. Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 34, p. 270–277, 2004.
- LAUDANI, C. G.; HABULIN, M.; KNEZ, Z.; DELLA PORTA, G.; REVERCHON, E. Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench-scale packed-bed reactor study. *Journal of Supercritical Fluid*, v. 41, n. 1, p. 74-81, 2007.
- LECA, M.; TCACENCO, L.; MICUTZ, M.; STAICU, T. Optimization of biodiesel production by transesterification of vegetable oils using lipases. *Romanian Biotechnological Letters*, v.15, n. 5, p. 5618-5630, 2010.
- LEI nº. 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Brasília/DF, 13/01/2005. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>. Acesso em 04 abr. 2013.

- LI, L. L.; DU, W.; LIU, D. H.; WANG, L.; LI, Z. B. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 43, n. 1-4, p. 58-62, 2006.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia- Tecnologia das fermentações. Ed. Edgard Blücher Ltda, 1975.
- MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, v. 70, n.1. p. 1-15, 1999.
- MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Reviews*, v. 3, Intercept Ltda., 1985.
- MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 11, p. 1300-1311, 2007.
- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.
- MATASSOLI, A.; CÔRREA, I. N. S.; PORTILHO, M. F.; VELOSO, C. O.; LANGONE, M. A. P. Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 155, p. 347-355, 2009.
- MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v.10, p. 248-268, 2006.
- MELO, J. C.; PACHECO, J. G. A.; STRAGEVITCH, L.; BARBOSA, F. L. P.; JUCA, J. F. T.; NEVES, A. M. Cinética da transesterificação do óleo de algodão para a produção de biodiesel. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/producao/15.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2013.
- MENG, X. M., CHEN, G. Y.; WANG, Y. H. Biodiesel production from waste cooking oil via alkali catalyst and its engine test. *Fuel Processing Technology*, v. 89, n. 9, p. 851- 857, 2009.
- MILINSK, M. C. Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal. 2007. Tese (Doutorado em Química pelo Programa de Química/ Centro de Ciências Exatas/ Departamento de Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MDA, 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/estatisticas/producao/JULHO_2012/aquisicoes%20oleaginosas%20agricultura%20familiar%20-%20PNPB%20-%202002%2008%202012.pdf>. Acesso em 15 abr. 2013.
- MOSER B. R. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant*, 45, p. 226-229, 2009.

NABI, MD. NURUN, AKHTER, MD. SHAMIM & SHAHADAT, MHIA MD. ZAGLUL. Improvement of engine emissions with conventional diesel fuel and diesel-biodiesel blends. *Bioresource Technology*, v. 97, p.372-378, 2006.

NAWANI, N.; DOSANJH, N.S.; KAUR, J. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters*, v. 20, p. 997-1000, 1998.

NELSON, L. A.; FOGLIA, A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *Journal of American Oil Chemistry Society*, v. 73, p. 1191 – 1195, 1996.

O ESTADO DE SÃO PAULO. Oportunidade histórica para o biodiesel – 14/03/2013. Disponível em <<http://www.estadao.com.br/noticias/impresso,oportunidade-historica-para-o-biodiesel-,1008497,0.htm>>. Acesso em 20 mar. 2013.

OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M.; FACCIO, C.; DALLA ROSA, C.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C.; OLIVEIRA, J. V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology A: Enzyme Engineering and Biotechnology*, v. 113, n. 1-3, p. 771-780, 2004.

PAIVA, A. L.; BALCAO, V. M.; MALCAT, F. X. Kinetics and mechanism of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 27, n. (3-5), p. 187-204, 2000.

PANDEY A. *Handbook of Plant-Based Biofuels*, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2009.

PARENTE, E. J. S. Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado. UNIGRÁFICA, Gráfica Editora Ltda – ME, 2003.

PARK, Y.; LEE, M.; KIM, D. K.; LEE, J. S.; LEE, K. Y. The heterogeneous catalyst system for the continuous conversion of free fatty acid in used vegetable oils for the production of biodiesel. *Catalyst Today*, v. 131, p. 238-243, 2008.

PETERSON, C. L.; COOK, J. L.; THOMPSON, J. C.; TABERSKI, J. S. Continuous flow biodiesel production. *Applied Engineer in Agriculture da Agricultura*, n. 18, p. 5-11, 2002.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. D.; DE ANDRADE, J. B. Biodiesel: An overview. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.

PREISS M. R.; KOWALSKI S. P. Algae and biodiesel: patenting energized as green goes commercial. *Journal of Communication of Biotechnology*, v. 16, n. 4, p. 93-312. 2010.

QI, D. H.; GENG, L. M.; CHEN, H; BIAN, Y. Z. H; LIU, J.; REN, X. C. H. Combustion and performance evaluation of a diesel engine fuel with biodiesel produced from soybean crude oil. *Renewable Energy*, n. 34, p. 2706-2713, 2009.

QUEIROZ, N. *Síntese Enantiosseletiva de Amidas e Ésteres Catalisada por Lipases*. Florianópolis: Centro de Ciências Físicas e Matemáticas; Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. 152 p. Tese de Doutorado em Química Orgânica.

- RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio ambiental para o Brasil. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, p. 28-37, 2003.
- RIBEIRO, B. D.; DE CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: A review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research*, v. 2011, p. 1-16, 2011.
- RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: Uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p.1374-1380, 2007.
- ROBLES-MEDINA, A.; GONZALEZ-MORENO, P. A.; ESTEBANCERDAN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 4, p. 398-408, 2009.
- RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; WADA, K.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.85, p. 925-930, 2008.
- RODRIGUES, R. C. *Síntese de Biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual*. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 183 p., 2009.
- RODRIGUES, R. C.; PESSELA, B. C. C.; VOLPATO, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE R.; GUIBAN, J. M.; AYUB, M. A. Z. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized–stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1268–1273, 2010.
- ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 3, p. 648-653, 2007.
- SALEH, J.; TREMBLAY, A. Y.; DUBÉ, M. A. Glycerol removal from biodiesel using membrane separation technology. *Fuel*, v. 89, p. 2260-2266, 2010.
- SANCHEZ, F.; VASUDEVAN, P. T. Enzyme catalyzed production of biodiesel from olive oil. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 135, p. 1-14, 2006.
- SARAF, S.; THOMAS, B. Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 85, p. 360-364, 2007.
- SAXENA, R. K; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S.; BRADDOO, S.; GULATI, R. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*, v. 77, p.101-115, 1999.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; WU, X.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SHARMA, Y. C.; SINGH, B. Development of biodiesel from karanja, a tree found in rural India. *Fuel*, v. 87, n. 8-9, p. 1740-1742, 2008.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 76, n. 7, p. 789-793, 1999 .

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B*, v. 17, p. 133 - 142, 2002.

SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a Review. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, v. 9, n. 1, 1998.

SCHUCHARDT, U.; GARCIA, C. M.; TEIXEIRA, S.; MARCINIUK, L. L. Matérias-primas alternativas para produção de biodiesel por catálise ácida. In: *I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel*, Brasília-DF, 2006.

SEGEL, H. I. Enzyme Kinetics – Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems – 1975. John Wiley & Sons, Inc. Canada, 1993. 957p.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. *Process Biochemistry*, v. 42, n. 3, p. 409-414, 2007.

SHAW, J. F.; CHANG, S. W.; LIN, S. C.; WU, T. T.; JU, H. Y.; AKOH, C. C.; CHANG, R. H.; SHIEH, C. J. Continuous enzymatic synthesis of biodiesel with Novozym 435. *Energy & Fuels*, v. 22, n. 2, p. 840-844, 2008.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; BABA, T.; OOGURI, T.; MORIYAMA, S.; TERAII, T. Ethyl esterification of Docosahexaenoic acid in a organic solvent-free system with immobilized *Candida antarctica* Lipase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 1, p. 19-23, 2001.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.105, p. 656-660, 2003.

SOTOFT, L. F.; RONG, B. G.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. Process simulation and economical evaluation of enzymatic biodiesel production plant. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5266-5274, 2010.

SOUZA M. S.; AGUIEIRAS, E. C. G.; SILVA, M. A. P; LANGONE, M. A. P. Biodiesel synthesis via esterification of feedstock with high content of free fatty acids. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 154, p. 253–267, 2009.

SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.4, p. 111–133, 2000.

SUARES, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. 70º aniversário do biodiesel em 2007: Evolução histórica e situação atual no Brasil. *Química Nova*, v. 30, p. 2068-2071, 2007.

- TALUKDER, MD. M. R.; WU, J. C.; NGUYEN, T. B. V.; FEN, N. M.; MELISSA, Y. L. S. Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.60, n. 3-4, p.106-112, 2009.
- TAN, T. W.; LU, J. K.; NIE, K. L.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 6, p. 937-937, 2010.
- THANH, L. T.; OKITSU, K.; SADANAGA, Y.; TAKENAKA, N.; MAEDA, Y.; BANDOW, H. A two-step continuous ultrasound production of biodiesel fuel from waste cooking oils: a practical and economical approach to produce high quality biodiesel fuel. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5394-5401, 2010.
- TORRES, C. F.; HILL, C. G.; OTERO, C. Lipase catalyzed ethanolysis of borage oil: A kinetic study. *Bioresource Technology*, v. 20, n. 3, p. 756-763, 2004.
- TUETER, M.; AKSOY, H. A.; GILBAZ, E. E.; KURSUN, E. Synthesis of fatty acid esters from acid oils using Lipase B from *Candida antarctica*. *European Journal of Lipidic Science Technology*, v. 106, p. 513-517, 2004.
- UHLIG, H. Enzymes in flour processing and baking. In: *Industrial enzymes and their applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1998. 454 p.
- VAN KASTEREN, J. M. N.; NISWORO, A. P. A. Process model to estimate the cost of industrial scale biodiesel production from waste cooking oil by supercritical transesterification. *Resources, Conservation and recycling*, v. 50, p.442-458, 2007.
- VÉRAS, I. C.; SILVA, F. A. L.; FERRÃO-GONZALES, D. A.; MOREAU, V. H. One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent free media. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 9653-9658, 2011.
- VERGER, R. Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.
- VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresource Technology*, v.92, p. 297–305, 2004.
- VILAS, L. H. L. Panorama da Certificação ambiental no setor automotivo brasileiro: Um cenário das empresas Randon. In: II Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia – SEGeT 2005. Disponível em: <http://www.aedb.br/seget/artigos05/358_Panorama%20da%20certificacao%20ambiental%20no%20setor%20automotivo%20aedb%20oficial.pdf>. Acesso em 30 jun. 2013.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Review: 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.
- WANG, L.; DU, W.; LIU, D. H.; LI, L. L.; DAI, N. M. Lipase catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 43, n. 1-4, p. 29-32, 2006.

WANG, Y.; WU, H.; ZONG, M. H. Improvement of biodiesel production by Lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 7232–7237, 2008.

WANG, X.; DOU, P.; ZHAO, C.; DING, Y.; XU, P. Immobilization of lipases onto magnetic Fe₃O₄ nanoparticules for application in biodiesel production. *Chemistry and Sustainability: Energy and Fuels*, v. 2, p. 947-950, 2009.

WANG, X.; LIU, X.; ZHAO, C.; DING, Y., XU, P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase–nanoparticle biocomposite. *Bioresource Technology*, v. 2011, n. 102, p. 6352–6355, 2011.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 77, n. 4, p. 355-360, 2000.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v.78, p. 703-707, 2001.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 17, n. 3-5, p. 151-155, 2002.

WATANABE, Y.; PINSIRODOM, P.; NAGAO, T.; KOBAYASHI, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. Production of FAME from acid oil model using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 82, n. 11, p. 825-831, 2005.

WATANABE, Y.; PINSIRODOM, P.; NAGAO, T.; YAMAUCHI, A.; KOBAYASHI, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, .Y.; SHIMADA, Y. Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 44, p. 99-105, 2006.

WONG D. W. S. Lipase. In: Whitaker JR, editor. Handbook of food enzymology. New York, USA, Marcel Dekker Inc., p 667-680, 2002.

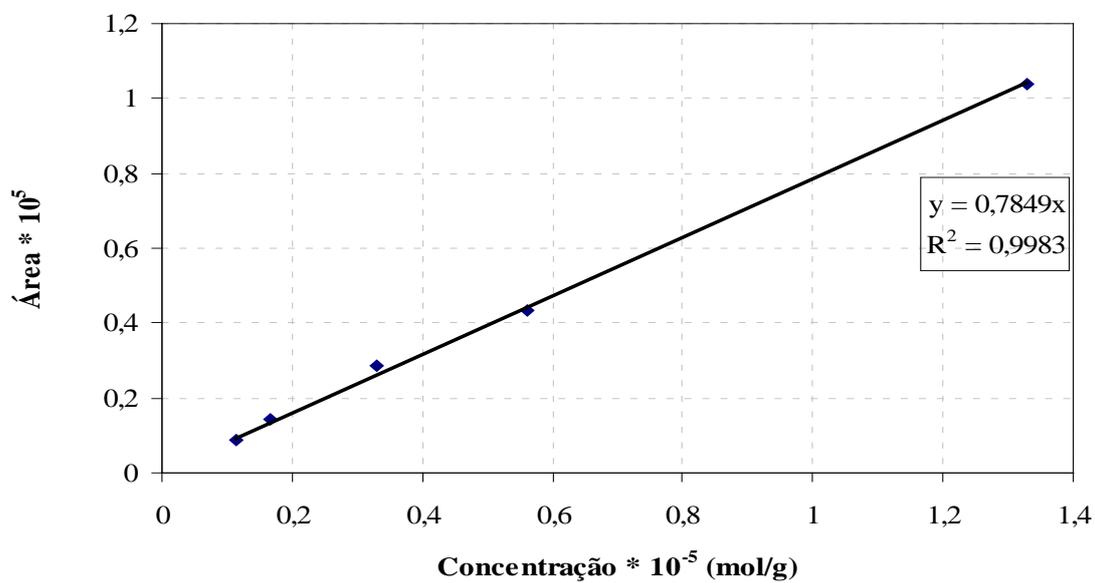
XU, Y. Y; DU, W.; ZENG, J.; LIU, D. H. Conversion of soybean oil to biodiesel fuel using Lipozyme TL IM in a solvent-free medium. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 22, n. 1, p. 45-48, 2004.

XU Y., DU W., LIU D. Study on the kineticx of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 32, n. 5-6, p. 241-245, 2005.

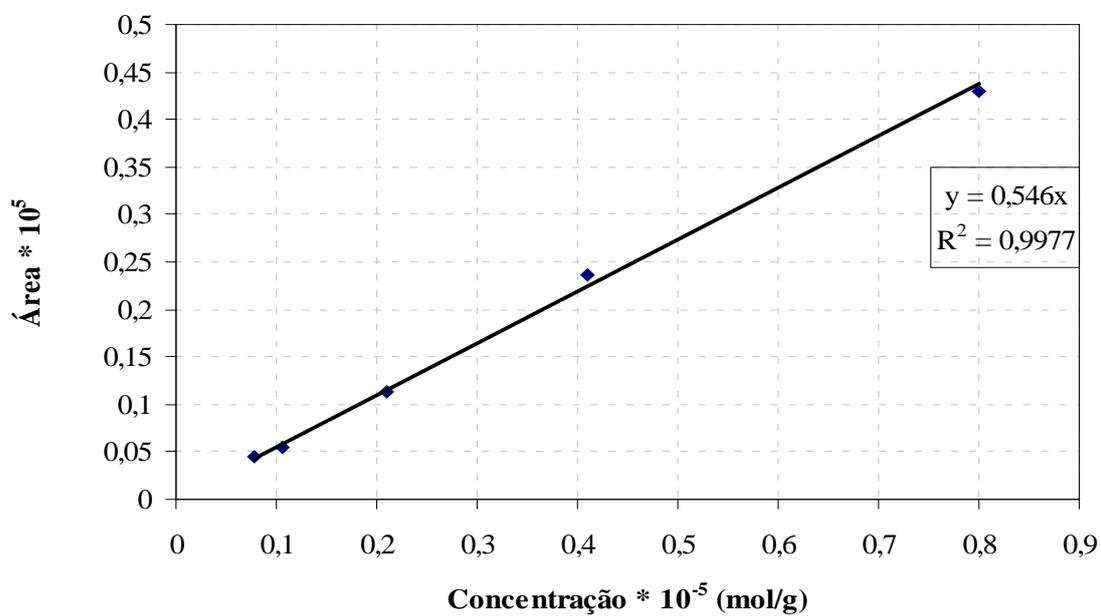
XU, Y.; NORDBLAD, M.; NIELSEN, PER, M.; BRASK, J.; WOODLEY, J. M. *In situ* visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolysis of rapeseed oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymathic*, v. 72, p. 213-219, 2011.

ZHANG, Y.; DUBÉ, M. A.; MCLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: economic assessment and sensitivity analysis. *Bioresource Technology*, v. 90, p. 229-240, 2003.

ANEXO I – Curvas padrão para determinação da atividade de transesterificação

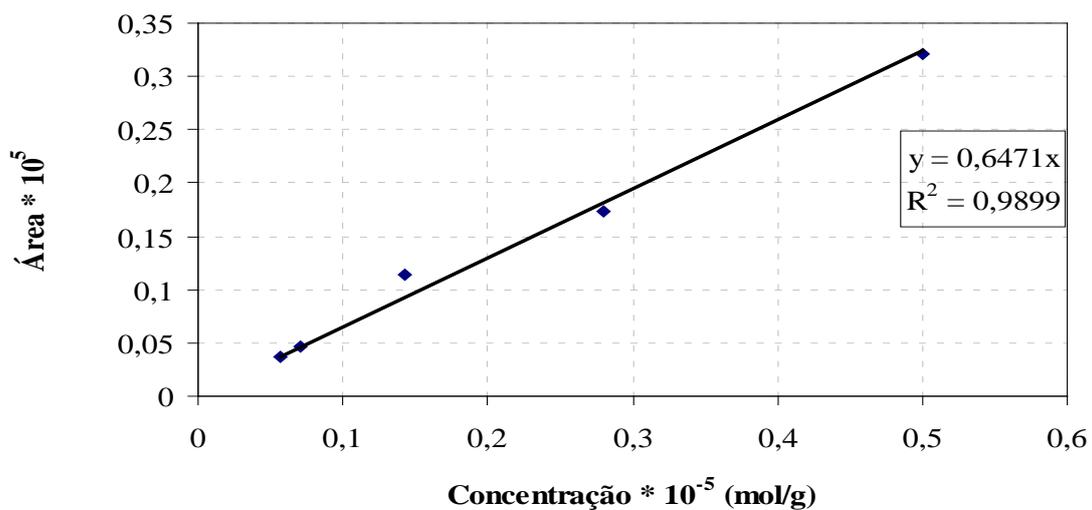


(a) Ácido láurico

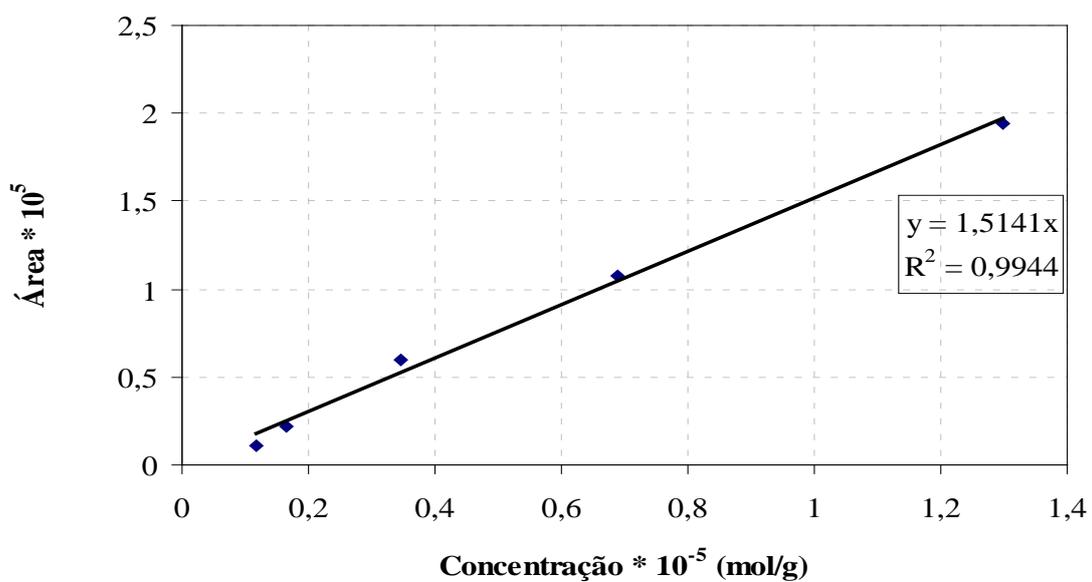


(b) Monolaurina

(Continua)



(c) Dilaurina



(d) Trilaurina

Figura 2.3 – Curvas padrão.