

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

EDILSON HOLANDA COSTA FILHO

ESTUDO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL
UTILIZANDO ÓLEO RESIDUAL E ETANOL

Fortaleza – Ceará
2008
EDILSON HOLANDA COSTA FILHO

ESTUDO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL UTILIZANDO ÓLEO RESIDUAL E ETANOL

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

**Fortaleza – Ceará
2008**

C870e Costa Filho, Edilson Holanda
Estudo da produção enzimática de Biodiesel utilizando óleo residual e
etanol / Edilson Holanda Costa Filho, 2008.
97 f. ;il. color. enc.

Orientador: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Área de concentração: Sistemas de reações biotecnológicas
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Tecnologia. Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2008.

1. Lipase imobilizada 2. Esterificação 3. Transesterificação I. Gonçalves,
Luciana Rocha Barros (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Química

CDD 660

EDILSON HOLANDA COSTA FILHO

ESTUDO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BODIESEL UTILZANDO ÓLEO
RESIDUAL E ETANOL

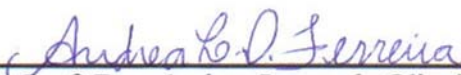
Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química na Área de Concentração de Sistemas de Reações Biotecnológicas.

Aprovada em 09 / 10 / 2008.

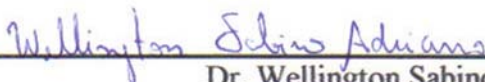
BANCA EXAMINADORA



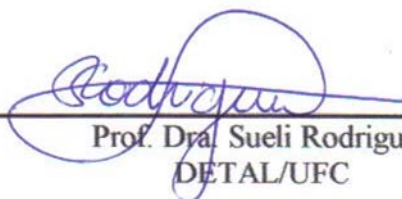
Prof. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)
PGEQ/UFC



Prof. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira
PGEQ/UFC



Dr. Wellington Sabino Adriano
PNPD/CAPEs



Prof. Dra. Sueli Rodrigues
DETAL/UFC

Aos meus pais, Edilson e Zenir,

pelo apoio e incentivo

durante essa caminhada

AGRADECIMENTOS

A Deus, por simplesmente tudo.

As professoras Luciana e Andréa, pela confiança, pela orientação e pela paciência que tiveram comigo durante esses dois anos.

A minha prima Denise, ao seu esposo Diniz e aos seus filhos Pedro e Mariana. Obrigado por esses quase 11 anos os quais vocês dividiram comigo o vosso lar. Obrigado pela paciência. Uma parte do que sou hoje devo a vocês.

As minhas amigas Kelly, Louise e Izabelly, pela ajuda, pelos conselhos, pelas boas gargalhadas que demos no laboratório e, principalmente, pela paciência que tiveram nos momentos difíceis.

Aos bolsistas do laboratório de biotecnologia do Departamento de Engenharia Química da UFC, especialmente a Ana Iraide pelas dúvidas tiradas e pela lípase fornecida.

A NOVOZYMES, pelo fornecimento da lípase.

Ao professor Rinaldo dos Santos Araújo, do Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará (CEFET), pelas dúvidas tiradas e pelas análises de cromatografia gasosa.

Ao aluno de mestrado Bruno César Barroso Salgado, do CEFET, pelas análises de cromatografia gasosa.

A empresa IRACEMA, pelo fornecimento do óleo de algodão.

Ao Jackson, da Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC), pelas análises de índice de iodo.

A Rosilene, da empresa TECBIO, pelas dúvidas tiradas.

Ao Estélio, do Laboratório de Combustíveis e Lubrificantes (LCL) pelas análises de densidade.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que de certa forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a conquista de mais essa vitória, incluindo todos os colegas, professores e funcionários técnico-administrativos da UFC e do Departamento de Engenharia Química.

**"Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar.
Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando,
fazendo que planejando, vivendo que esperando
porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu."
(Luiz Fernando Veríssimo)**

RESUMO

O biodiesel é uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos resultante da reação entre óleos vegetais e álcoois de cadeia curta, como metanol ou etanol, auxiliada por um catalisador, que pode ser ácido, básico ou enzimático. Entretanto, o alto custo da matéria-prima quando se utiliza óleo vegetal de grau alimentício tem inviabilizado economicamente a produção desse biocombustível. Por isso, as pesquisas com óleo residual tem aumentado, mostrando a viabilidade técnica da produção de biodiesel a partir de resíduos residenciais e industriais. Outro fator que influencia a reação de produção de biodiesel é o tipo de álcool. No Brasil, o uso do etanol é interessante desde que o nosso país se tornou um dos maiores produtores mundiais de etanol vegetal, um produto mais barato e menos tóxico que o metanol, diminuindo assim a nossa dependência do petróleo. O catalisador também exerce influência nesse tipo de reação. Os catalisadores mais usados industrialmente são as bases, mas quando o óleo vegetal tem um alto teor de ácidos graxos livres, o que acontece, geralmente, com os óleos residuais, não é possível usar catalisador básico por favorecer a formação de sabão e diminuir o rendimento em ésteres. Nesse caso, usa-se um catalisador ácido ou enzimático. Partindo dessa premissa, os resultados constantes nessa dissertação correspondem ao estudo da produção enzimática de biodiesel utilizando óleo residual e etanol. Avaliou-se o comportamento da lipase comercial imobilizada de *Cândida antarctica* tipo B (Novozym 435) na esterificação do ácido oléico comercial, estudando as variáveis que influenciam no processo. As variáveis escolhidas foram: temperatura (30-50° C), razão molar ácido:álcool (1:1-1:6) e a concentração de água presente no meio (0-20%). As reações foram conduzidas em erlenmeyers de 250 mL fechados contendo 10 g de óleo e a quantidade de álcool pré-determinada pelo planejamento de experimentos, mantendo-se a agitação fixa em 200rpm e a concentração de enzima em 5% m/m baseada na massa de óleo medida, obtendo-se uma conversão máxima de 88,36% na condição de maior razão molar, menor temperatura e menor concentração de água. Entretanto, pelo estudo cinético concluí-se que não é necessário um excesso de álcool para conseguir boas conversões. Em seguida, avaliou-se o comportamento de uma lipase do tipo B de *Cândida antarctica* imobilizada em quitosana na esterificação do ácido oléico, observando um comportamento semelhante ao da Novozym 435 mas com uma taxa inicial de reação mais lenta. Avaliou-se também o comportamento das duas lípases na esterificação do óleo de coco residual ácido, observando uma boa estabilidade para ambos os biocatalisadores que forneceram uma conversão acima de 80% com 60 minutos de reação e puderam ser reutilizados por no mínimo 10 vezes consecutivas sem perda considerável de atividade. Para comparar o comportamento da Novozym 435 em dois meios distintos, realizou-se um planejamento experimental fatorial com um óleo de algodão residual de baixa acidez livre, observando a mesma influência negativa da temperatura e da razão molar entre reagentes, mas com um tempo de reação maior, pois uma conversão máxima de 82,66% só foi atingida com 72 horas de reação. Para o cálculo da conversão, utilizou-se a redução do índice de acidez quando a matéria-prima tinha um alto teor de ácidos graxos livres e o método do periodato de sódio na determinação da glicerina quando a matéria-prima tinha uma baixa acidez livre.

PALAVRAS-CHAVE: Biodiesel, óleo residual, etanol, lipase imobilizada, esterificação, transesterificação.

ABSTRACT

Biodiesel is a mixture of fatty acid alkyl esters produced by the reaction between vegetable oils and short chain alcohols, like methanol and ethanol, using a catalyst that can be acid, basic or enzymatic. However, the high cost of the raw material when refined vegetable oil is used, have made biodiesel production economically unattractive. Therefore, research with waste oils has increased, showing the technical viability of the production of biodiesel using the residential and industrial residues as raw material. Another variable that has influenced this type of reaction is the type of alcohol. In Brazil, the use of ethanol is interesting because the country has become one of the top worldwide producers of ethanol from vegetables sources, a cheaper and less toxic product than methanol, decreasing our petroleum dependence. The type of catalyst also influences biodiesel production. Alkali is the catalysts that is more often used in industry, but when the vegetable oil has a high acid value, it can not be used because soap is produced, diminishing the esters yield. In this case an acid or an enzyme is used as a catalyst. Based on the previous explanation, the results of this work correspond to the study of enzymatic production of biodiesel using waste oil and ethanol. The immobilized *Candida antarctica* lipase (Novozym 435) behavior was studied in the oleic acid esterification, studying the effect of the variables that has influence in the process. The variables chosen were: temperature (30 – 50°C), molar ratio acid:alcohol (1:1 – 1:6) and water content (0 – 20%). The reaction were performed in closed reactors with a capacity of 250 mL containing 10 g of oil, a known amount content of alcohol, pre-determined by experimental design and enzyme content of 5% p/p, based on the oil mass. The reaction medium was kept under constant stirring, 200 rpm. Maximum conversion of 88,36% was achieved when high molar ration, the lower temperature and water content values were used. However, by the kinetic study, it can be concluded that it is not necessary to use an alcohol excess to achieve good conversions. After that, the behavior of *Candida Antarctica* lipase B immobilized in chitosan was studied in acid oleic esterification. A slower initial rate of reaction was observed in comparison to Novozym 435. The behavior of both lipases was also studied in the esterification of waste coconut oil, showing good stability and giving a conversion of about 80% in 60 minutes. Both biocatalyst could be reused 10 times, keeping the same activity. In order to compare the behavior of Novozym 435 in two different mediums, an experimental design was performed with waste cotton oil, which had a low acid value. The same negative influence of the temperature and molar ratio was observed, but with a high reaction time, getting a maximum conversion of 82,66% in 72 hours of reaction. To calculate the conversions, the decreasing of the acid value was used when the raw material had a high acid value, and when the raw material had a low acid value the glycerol production was used.

KEY WORDS: Biodiesel, waste oil, ethanol, immobilized lipase, esterification, transesterification.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1	Mecanismo da esterificação enzimática com etanol	26
FIGURA 2.2	Reação de transesterificação	27
FIGURA 2.3	Mecanismo da transesterificação enzimática com etanol	28
FIGURA 3.1	Fluxograma do procedimento experimental para a reação de alcoólise enzimática do ácido oléico e do óleo vegetal residual	50
FIGURA 4.1	Cromatograma do ácido oléico	57
FIGURA 4.2	Cromatograma do óleo de coco residual	58
FIGURA 4.3	Cromatograma do óleo de algodão residual	59
FIGURA 4.4	Diagrama de Pareto indicando o efeito dos valores estimados para as variáveis estudadas no planejamento experimental 2^3 com triplicata do ponto central da esterificação enzimática do ácido oléico	62
FIGURA 4.5	Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais da conversão em ésteres etílicos obtidos pelo planejamento experimental 2^3 com triplicata do ponto central da esterificação enzimática do ácido oléico	65
FIGURA 4.6	Superfície de resposta representando a conversão em função da razão molar entre os reagentes e concentração de água adicionada ao meio	66
FIGURA 4.7	Influência da temperatura na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na razão molar 1:1 e concentração de água $W=0\%$	67
FIGURA 4.8	Influência da temperatura na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na razão molar 1:6 e concentração de água $W=0\%$	67
FIGURA 4.9	Influência da razão molar ácido:álcool na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$ e na menor concentração de água ($W = 0\%$)	69
FIGURA 4.10	Influência da razão molar ácido:álcool na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na temperatura de $50\text{ }^\circ\text{C}$ e na menor concentração de água ($W = 0\%$)	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 4.11	Influência da concentração de água na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na temperatura de 30 °C e na menor razão molar (R = 1:1)	71
FIGURA 4.12	Influência do aumento da concentração de álcool com o aumento da concentração de água na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na temperatura de 30 °C	73
FIGURA 4.13	Comparação do comportamento da Lipase de <i>Candida Antarctica</i> Tipo B Imobilizada em Quitosana com a Novozym 435 na etanólise do ácido oléico na temperatura de 30 °C, razão molar ácido:álcool 1:1 e sem adição de água	74
FIGURA 4.14	Comparação do comportamento da Novozym 435 na reação de etanólise do ácido oléico com a etanólise do óleo de coco residual na temperatura de 30 °C, razão molar ácido:álcool 1:1 e sem adição de água	75
FIGURA 4.15	Estabilidade operacional da Novozym 435 e da Lipase de <i>Candida Antarctica</i> Tipo B Imobilizada em Quitosana na reação de etanólise do óleo de coco residual na temperatura de 30 °C, razão molar ácido:álcool 1:1 e sem adição de água	76
FIGURA 4.16	Diagrama de Pareto indicando o efeito dos valores estimados para as variáveis independentes para o Planejamento fatorial 2 ³ da reação de alcoólise enzimática do óleo de algodão residual	78
FIGURA 4.17	Valores previstos pelo modelo <i>versus</i> valores experimentais obtidos pelo pelo planejamento experimental fatorial 2 ³ com triplicata do ponto central para a reação de alcoólise enzimática do óleo de algodão	80
FIGURA 4.18	Superfície de resposta para a conversão em função da temperatura e razão molar óleo:álcool para alcoólise enzimática de óleo de algodão utilizando Novozymes 435 como catalisador .	81
FIGURA 4.19	Superfície de resposta para a conversão em função da temperatura e do tempo reacional para a alcoólise enzimática de óleo de algodão utilizando Novozymes 435 como catalisador	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1	Comparação das propriedades físico-químicas	17
TABELA 2.2	Distribuição espacial das principais fontes de oleaginosas pelas regiões do Brasil	21
TABELA 2.3	Comparação entre a catálise química e a catálise enzimática para produção de biodiesel	31
TABELA 2.4	Classificação das enzimas de acordo com IUBMB	35
TABELA 3.1	Valores reais das variáveis independentes para o Planejamento Fatorial 2^3 utilizado para otimizar as condições da esterificação enzimática do ácido oléico utilizando uma lipase do tipo B de <i>Candida antarctica</i> comercial como catalisador	51
TABELA 3.2	Valores reais das variáveis independentes para o Planejamento Fatorial 2^3 utilizado para otimizar as condições da etanolise enzimática do óleo de algodão residual utilizando uma lipase do tipo B de <i>Candida antarctica</i> comercial como catalisador	51
TABELA 4.1	Caracterização físico-química das matérias-primas lipídicas utilizadas nas reações de alcoólise enzimática	56
TABELA 4.2	Percentuais de ácidos graxos para o ácido oléico	57
TABELA 4.3	Percentuais de ácidos graxos para o óleo de coco residual	58
TABELA 4.4	Percentuais de ácidos graxos para o óleo de algodão residual	59
TABELA 4.5	Resultados do Planejamento Fatorial 2^3 com triplicata do ponto central tendo como variável resposta a conversão obtida na esterificação enzimática do ácido oléico utilizando uma lipase comercial de <i>Candida antarctica</i> tipo B (Novozym 435)	61
TABELA 4.6	Estimativa dos efeitos principais e suas interações na conversão do ácido oléico a ésteres etílicos	63
TABELA 4.7	Anova para a reação de alcoólise enzimática do ácido oléico utilizando Novozym 435 como catalisador	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.8	Conversões obtidas na alcoólise enzimática do óleo de algodão residual de baixa acidez livre utilizando uma lipase comercial de <i>Candida antarctica</i> tipo B (Novozym 435)	77
TABELA 4.9	Estimativa dos efeitos principais e suas interações na conversão do óleo de algodão a ésteres etílicos	79
TABELA 4.10	ANOVA para a reação de alcoólise enzimática do óleo de algodão utilizando Novozym 435 como catalisador	80
TABELA 4.11	Caracterização físico-química dos ésteres etílicos	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Contexto Histórico	16
2.2	Matérias-primas	19
2.3	Métodos de obtenção de biodiesel	23
2.3.1	Microemulsificação	24
2.3.2	Pirólise	24
2.3.3	Esterificação	25
2.3.4	Transesterificação	27
2.4	Catálise enzimática	32
2.4.1	Lipase	33
2.4.2	Enzimas imobilizadas	37
2.5	Considerações finais	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Substratos e Catalisador	40
3.2	Determinação da Atividade Hidrolítica das Enzimas Imobilizadas	41

3.3	Caracterização Físico-Química da Matéria-Prima e do Biodiesel	41
3.3.1	Índice de Acidez	42
3.3.2	Densidade	43
3.3.3	Teor de Umidade	43
3.3.4	Índice de Iodo	44
3.3.5	Glicerina Livre, Combinada e Total	45
3.4	Caracterização Cromatográfica da Matéria-Prima	47
3.5	Alcoólise Enzimática do Ácido Oléico e dos Óleos Vegetais Residuais Utilizando Lipase como Catalisador	49
3.6	Cálculo da Conversão em Ésteres Etilícos	52
3.7	Recuperação e Regeneração do Biocatalisador	53
3.8	Neutralização dos Ésteres Etilícos Obtidos	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1	Caracterização Físico-Química da Matéria-Prima	55
4.2	Caracterização Cromatográfica da Matéria-Prima	56
4.3	Alcoólise Enzimática do Ácido Oléico Utilizando Lipase Comercial de <i>Candida Antarctica</i> Tipo B (Novozym 435) como Catalisador	60
4.3.1	Efeito da Temperatura	66

4.3.2	Efeito da Razão Molar Ácido:Álcool	68
4.3.3	Efeito da Concentração de Água	70
4.4	Alcoólise Enzimática do Ácido Oléico Utilizando Lipase de <i>Candida Antarctica</i> Tipo B Imobilizada em Quitosana como Catalisador	74
4.5	Alcoólise Enzimática do Óleo de Coco Residual Utilizando Novozym 435 como Catalisador	75
4.6	Ciclos de Atividade	76
4.7	Alcoólise Enzimática do Óleo de Algodão Residual Utilizando Novozym 435 como Catalisador	77
4.8	Caracterização dos Ésteres Etilicos	82
4.9	Conclusões Parciais	83
5	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	ANEXO	95

1. INTRODUÇÃO

Diante das atuais perspectivas ambientais, o homem precisa se mobilizar em busca de garantir um planeta habitável para as próximas gerações. Além disso, a grande maioria da energia que a humanidade consome atualmente para os mais diversos fins advém do petróleo, gás natural e carvão, mas essas fontes são esgotáveis e poluentes, e o preço para sua aquisição aumenta a cada dia. Por isso, surge na comunidade científica e na população em geral, a necessidade de desenvolver combustíveis alternativos, renováveis, menos poluentes e a um preço razoável. Nesse contexto, nasce o biodiesel, um combustível ambientalmente correto, substituto do diesel de petróleo, que pode ser produzido a partir de fontes renováveis como óleos vegetais, gorduras animais e óleos utilizados para fritura de alimentos, resultando em uma fonte permanente de geração de energia (Demirbas, 2007; Ramos *et al.*, 2003).

Quimicamente, ele é definido como um derivado mono-álquil éster de ácidos graxos derivados de lipídeos de ocorrência natural e uma das maneiras pela qual pode ser produzido, juntamente com a glicerina, é através da reação de alcoólise de triacilgliceróis (ou triglicerídeos) com álcoois de cadeia curta, na presença de um catalisador ácido, básico ou enzimático (Al-Zuhair, 2005; Demirbas, 2007; Ramos *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2006).

O biodiesel nasceu basicamente como uma solução para a crise internacional do petróleo, mas também e, principalmente, em virtude dos problemas ambientais que o nosso planeta enfrenta na atualidade. Os benefícios ambientais que esse novo combustível pode trazer são imensos, tais como a redução de até 78% das emissões de gás carbônico, que é absorvido pela fotossíntese das próprias oleaginosas, redução de 90% das emissões de fumaças e de 98% de enxofre na atmosfera (Lin *et al.*, 2007).

Com essas características, o biodiesel se tornou um produto de grande interesse entre leigos e cientistas, sendo fonte de inúmeras pesquisas e desenvolvido em vários países do mundo, inclusive no Brasil, detentor da primeira patente mundial de produção industrial de biodiesel e que deve aproveitar a experiência obtida com o Programa Nacional do Alcool (PROALCOOL) para facilitar a introdução desse biocombustível na matriz energética brasileira e alcançar os benefícios esperados, sobretudo a geração de emprego e renda, pois o

biodiesel é capaz de melhorar não só as condições ambientais, mas também a situação sócio-econômica de regiões menos favorecidas. O nosso país tem todas as condições de se tornar um grande produtor de biodiesel, com a sua imensa extensão territorial e diversidade de clima, que o torna uma potência na produção de biomassa para fins energéticos. A mamona, o dendê, a soja, entre outras, e, mais recentemente, os resíduos industriais e residenciais, podem ser abundantes fontes de energia e inclusão social.

O biodiesel vem para substituir o óleo diesel mineral e é essa a motivação econômica para produção desse bioproduto no nosso país, uma vez que o diesel é o derivado do petróleo mais consumido no Brasil e que uma fração crescente desse produto vem sendo importada anualmente (Ramos *et al.*, 2003). Destaque-se que o Brasil importa cerca de 40 milhões de barris de óleo diesel, por ano, o que representa uma despesa em nosso balanço de pagamentos de pelo menos 1,2 bilhões de dólares (Holanda, 2004).

Uma outra característica desse biocombustível que deve ser ressaltada, é que ele pode ser usado em qualquer motor do ciclo diesel, com pouca ou nenhuma necessidade de adaptação, o que não acontece com o uso direto dos óleos vegetais como combustíveis, pois, devido a sua alta viscosidade, baixa volatilidade e combustão incompleta, alguns problemas foram detectados, tais como: (a) ocorrência de excessivos depósitos de carbono no motor; (b) a obstrução nos filtros de óleo e bicos injetores; (c) a diluição parcial do combustível no lubrificante; (d) o comprometimento da durabilidade do motor; e (e) um aumento considerável em custos de manutenção (Akoh *et al.*, 2007; Fukuda *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2006; Yagiz *et al.*, 2007).

Apesar de todos os benefícios que estão atrelados ao biodiesel, a sua produção enfrenta problemas, principalmente quanto ao custo da matéria-prima quando se utiliza óleo refinado. Sendo assim, o uso de óleos residuais tem se mostrado interessante para produção de biodiesel, uma vez que é uma matéria-prima mais barata, disposta incorretamente no meio ambiente, usada normalmente para produção de sabão, massa de vidraceiro e ração para animais e que não deve ser reutilizada por causar sérios danos à saúde humana. Somente o Japão contribui com cerca de 500.000 toneladas de óleo residual por ano, contribuindo com o aumento dos problemas ambientais se um efetivo sistema de coleta e reciclagem não for implantado. Já a China, por exemplo, produz mais de 20 mil toneladas de óleo de fritura anualmente, mas já há um sistema de coleta visando à produção de biodiesel (Canakci, 2007;

Encinar *et al.*, 2007; Samukawa *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007). Um levantamento primário da oferta de óleos residuais de fritura, suscetíveis a serem coletados (produção > 100 Kg/mês), revela um valor da oferta brasileira superior a 30.000 toneladas anuais (Holanda, 2004).

Dados reportados na literatura comprovam a viabilidade técnica da utilização de resíduos industriais e residenciais para produção de biodiesel. Vários autores mostram que os motores que funcionaram com o biodiesel obtido de óleo de fritura apresentaram um melhor desempenho e a sua queima emite menos CO₂, materiais particulados e gases do efeito estufa (Kulkarni *et al.*, 2006; Lebedevas e Vaicekauskas, 2006; Lin *et al.*, 2007). Além disso, o processo de purificação do biodiesel feito a partir de matérias-primas residuais ácidas é mais fácil, pois o subproduto da reação é água (Lucena, 2008).

Dentre os processos de produção de biodiesel, a alcoólise alcalina com metanol é o processo mais usado comercialmente. Entretanto, apesar do baixo custo dos catalisadores químicos homogêneos, essa rota de produção apresenta algumas desvantagens como a não recuperação e reutilização do catalisador, produção de sabão, difícil recuperação do glicerol, um grande gasto energético e a permanência da dependência do petróleo ao se utilizar metanol (Al-Zuhair, 2007; Al-Zuhair *et al.*, 2006; Iso *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006).

Nesse sentido, como o biodiesel precisa ser de alta pureza para ser usado como combustível nos motores de combustão interna, a etanolise enzimática apresenta-se como uma rota de produção promissora por possibilitar a obtenção de um produto mais puro, a fácil recuperação do glicerol, a não produção de sabão, um menor gasto energético, a fácil recuperação e reutilização do biocatalisador e a utilização de etanol como álcool transesterificante, um produto também obtido de uma fonte renovável, menos tóxico do que o metanol e com grande disponibilidade no Brasil, desde que se tornou um dos maiores produtores mundiais. Além disso, o uso de enzimas como catalisador da reação de alcoólise viabiliza o uso de matérias-primas com baixo valor agregado (elevado teor de ácidos graxos livres), pois a transesterificação alcalina exige que o óleo vegetal seja isento de umidade e de ácidos graxos livres (não podendo exceder 1% FFA¹), uma vez que a base pode reagir com os ácidos graxos, formando sabão e água, o que dificulta a separação e purificação do biodiesel (Dossat *et al.*, 1999; Lucena, 2008; Shieh *et al.*, 2003).

¹ Ácidos graxos livres

Todavia, a biotransformação ainda não é comercialmente competitiva com a catálise convencional em virtude do alto preço das enzimas e da sua inativação por contaminação pelo óleo, pelo álcool ou pelos subprodutos formados durante a reação (Isso *et al.*, 2001; Meher *et al.*, 2006; Ranganathan *et al.*, 2007; Royon *et al.*, 2007). Sendo assim, essa dissertação visa estudar a produção enzimática de biodiesel utilizando, primeiramente, ácido oléico comercial e etanol para avaliar o comportamento da lipase na esterificação de substratos ácidos e as variáveis que influenciam no processo. A importância de se utilizar primeiramente o ácido oléico comercial é que, além desse ácido ser o mais comumente encontrado nos óleos residuais, ao partir de uma matéria-prima pura, diminui-se a probabilidade de inativação da enzima por contaminantes do óleo residual, e avalia-se apenas a influência das variáveis escolhidas, buscando otimizar o processo a fim de estabelecer as características para aplicações industriais.

Conhecendo-se as melhores condições de esterificação do ácido oléico, avaliou-se o comportamento da lipase frente a óleos residuais e a sua estabilidade operacional após várias reações consecutivas. Objetivou-se também comparar o comportamento da lipase em meios com características físico-químicas distintas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo tem a finalidade de levantar o estado da arte inserido no contexto deste projeto e visa identificar as lacunas que devem ser preenchidas com esse trabalho. Ele é dividido em cinco tópicos nos quais, inicialmente, procura-se contextualizar o biodiesel, seguindo com uma descrição das matérias-primas e dos métodos de obtenção desse biocombustível, dando ênfase a alcoólise enzimática, objeto de estudo dessa dissertação.

2.1. Contexto Histórico

Historicamente, durante a escassez do petróleo, os óleos vegetais e seus derivados foram usados como combustível alternativo ao diesel do petróleo. O primeiro registro do uso de óleos vegetais como combustível líquido na combustão interna de motores data de 1900 quando Rudolf Diesel usou óleo de amendoim. Entretanto, devido ao baixo custo e alta eficiência, o petróleo tornou-se a fonte de energia dominante e o diesel do petróleo foi então produzido para motores a diesel. Apesar disso, sendo o petróleo uma fonte finita, surge na comunidade científica a necessidade de desenvolver energias alternativas. Assim, nos anos 30 e 40, os óleos vegetais passaram a ser usados diretamente nos motores a diesel em situações de emergência (Akoh *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 1999; Pousa *et al.*, 2007). No entanto, com essa prática, observou-se que a durabilidade do motor era comprometida devido a alta viscosidade, baixa volatilidade e combustão incompleta dos óleos vegetais *in natura*.

Sendo assim, iniciaram-se as primeiras transformações químicas nos óleos vegetais, a fim de torná-lo menos viscoso e mais eficiente. A pirólise foi o primeiro método de transformação utilizado, seguido da transesterificação e esterificação (Pousa *et al.*, 2007), mas a primeira patente mundial de produção industrial de biodiesel por transesterificação surgiu na década de 80, no Brasil, de autoria do engenheiro químico Expedito José de Sá Parente (Olga, 2005).

A descoberta do biodiesel por Expedito Parente se deu em 1977 quando ele observou uma vagem de ingá, cheia de óleo, onde ele visualizou uns grãos ligados, fomentando a molécula do biodiesel, com os ésteres de ácidos graxos. A partir daí, ele iniciou as pesquisas com óleo de algodão e metanol. Após a síntese, ele verificou que a viscosidade e as características aparentes se assemelhavam às do óleo diesel mineral e então testou o seu combustível num motor velho emprestado por um amigo, surpreendendo-se com o bom funcionamento do motor que não funcionava nem com o petrodiesel (Olga, 2005). A Tabela 2.1 mostra uma comparação das características do óleo diesel mineral com as características do biodiesel.

Tabela 2.1: Comparação das propriedades físico-químicas

Propriedade	Óleo Diesel	Biodiesel
Calor de combustão (MJ/Kg)	45,2	40,5
Viscosidade (cS a 40°C)	2,98	6,17
Enxofre (%)	0,15	< 0,01
Ponto de inflamabilidade (°C)	82	124
Número de cetano	49,2	59,7
Ponto de névoa (°C)	-14	-2
Ponto de orvalho (°C)	-21	-10

Fonte: HOLANDA, 2004.

Diante dessa motivação, o engenheiro parte em busca de parcerias e em 1980 patenteia sua metodologia de produção de biodiesel por transesterificação (Olga, 2005). No entanto, o governo brasileiro não deu muita importância à descoberta do pesquisador, mesmo depois de testes bem sucedidos feitos nos carros da Companhia Energética do Ceará e em um avião militar brasileiro. Com a falta de interesse e de investimento do governo, a patente torna-se de domínio público e o biodiesel passa a ser explorado em outras partes do planeta.

Na época da descoberta de Parente, o governo brasileiro preocupava-se apenas com o Programa Nacional do Álcool – PROALCOOL, implementado na década de 70 com o objetivo de abastecer com etanol, de forma extensiva, veículos movidos normalmente a gasolina (Holanda, 2004). No entanto, segundo o próprio Expedito, o álcool é um combustível solitário, só para veículos de passeio. Não é coletivo, não serve para caminhão, ônibus, trem, para produção de energia elétrica... Já o biodiesel, como sucedâneo do diesel mineral, é um

combustível coletivo, muito mais plural. Dessa forma, o álcool não diminui nossa dependência do petróleo.

O PROALCOOL surgiu por uma necessidade de mercado. Na época o açúcar estava muito barato, e os usineiros precisavam de alternativas. Então o programa do álcool não nasceu pela necessidade energética (Olga, 2005). O biodiesel, entretanto, ao invés de concentrador de riquezas, é um combustível distribuidor de riquezas.

Diante dessas constatações a respeito do PROALCOOL, das turbulências no mercado internacional do petróleo e das preocupações ambientais, o governo brasileiro cria em 2002 o Programa Nacional do Biodiesel, PROBIODIESEL, que tem como principal objetivo promover o desenvolvimento de tecnologias de produção e avaliar a viabilidade e a competitividade técnica, sócio-ambiental e econômica do biodiesel para os mercados interno e externo, bem como de sua produção e distribuição espacial nas diferentes regiões do país (Moreira *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2003). Esse programa é resultado de estudos feitos por comissões interministeriais em parceria com universidades e centros de pesquisa, considerando a etanolise de óleos vegetais como a principal rota de produção de biodiesel, em virtude da grande capacidade de produção de etanol pelo Brasil (Pousa *et al.*, 2007).

Em 2004, é lançado o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), cujo principal objetivo era a implementação de forma sustentável, tanto técnica, como economicamente, da produção e uso do biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, via geração de emprego e renda (Suarez *et al.*, 2006). Esse programa propõe a introdução de biocombustíveis derivados de óleos e gorduras na matriz energética brasileira através da adição de 2% de biodiesel (B2) ao diesel consumido no Brasil até 2008 e dentro de 15 anos as perspectivas são de que essa proporção passe para 20% de biodiesel e 80% de diesel (B20), o que, em termos ambientais, resultará em uma redução significativa no padrão de emissões de materiais particulados, óxidos de enxofre e gases que contribuem para o efeito estufa. Sendo assim, sua difusão, em longo prazo, proporcionará maiores expectativas de vida à população e, como consequência, um declínio nos gastos com saúde pública, possibilitando um redirecionamento de verbas para outros setores, como educação e previdência. Cabe aqui ainda ressaltar que a adição de biodiesel ao petrodiesel, em termos gerais, melhora as características do combustível fóssil, pois possibilita a redução dos

níveis de ruído e melhora a eficiência da combustão pelo aumento do número de cetano (Moreira *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2003).

Para garantir o cumprimento dessas metas, o governo federal incentiva a produção de biodiesel através do fornecimento de um selo social para os produtores que adquirem a matéria-prima em cooperativas. Esse selo, além de garantir isenções fiscais, melhora as condições de financiamento em bancos públicos (Pousa *et al.*, 2007).

Além do selo social, para estimular o mercado de biocombustíveis antes da obrigatoriedade de seu uso, o governo idealizou leilões de biodiesel, sob responsabilidade da Agência Nacional de Petróleo e Gás Natural, ANP, onde a PETROBRAS assegura a compra do volume necessário de Biodiesel para o B2 das empresas com o selo social. Houve cinco leilões entre 2005 e 2006 (Pousa *et al.*, 2007).

2.2. Matérias – Primas

A matéria-prima escolhida para a produção de biodiesel varia muito de acordo com a região. Qualquer lipídeo de origem animal ou vegetal deve ser considerado como adequado para produção de biodiesel, dependendo da disponibilidade, custo, propriedades de armazenamento e do desempenho como combustível. A escolha da matéria-prima pode sofrer também influência do governo que fornece incentivos fiscais para produção a partir de uma determinada matéria-prima em detrimento de outras. O Brasil, por exemplo, apesar de ser o segundo maior produtor mundial de soja, incentiva a produção de biodiesel de óleo de mamona, devido o mercado para o óleo de soja já ser bem estabelecido, enquanto o aproveitamento do óleo de mamona para o mercado de biodiesel poderá facilitar a geração de renda nas regiões mais pobres do país, onde a soja não pode ser cultivada (Knothe *et al.*, 2006).

O uso de óleos vegetais e animais para produção de biodiesel também é interessante por se tratar de um composto renovável e por seu uso sustentado não provocar danos ao meio ambiente, contribuindo assim para o sucesso do protocolo de Kyoto. Recentes levantamentos demonstram que apenas 2,2% da energia consumida no mundo é proveniente de fontes

renováveis, o que evidencia um extraordinário potencial para exploração de outras fontes. Considerando-se apenas a biomassa proveniente de atividades agroindustriais, calcula-se que o potencial combustível desse material seja equivalente a, aproximadamente, 6.587 milhões de litros de petróleo ao ano (Ramos *et al.*, 2003).

Os óleos vegetais são substâncias hidrofóbicas, obtidas pela prensagem ou por extração das sementes de oleaginosas, constituídos, principalmente, por triglicerídeos com pequenas quantidades de mono e diglicerídeos, além de ácidos graxos livres, fosfolipídeos, esteróis, água e outras impurezas que afetam a reação de transesterificação quando se usa catalisador básico ou ácido, dificultando a separação do glicerol (co- produto). Eles são líquidos a temperatura ambiente, altamente viscosos, com baixa volatilidade, caráter poliinsaturado e combustão incompleta, o que inviabiliza o seu uso direto nos motores (Demirbas, 2007; Felizardo *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 1999; Ramos *et al.*, 2003).

O Brasil, um país de grande biodiversidade, é considerado um paraíso para a produção de biomassa para fins alimentares, químicos e energéticos. Estudos divulgados pelo National Biodiesel Board encarregado da implementação do biodiesel nos Estados Unidos afirmam categoricamente que o Brasil tem condições de liderar a produção mundial de biodiesel, promovendo a substituição de, pelo menos, 60% do óleo diesel consumido no mundo (Holanda, 2004).

O aproveitamento energético dos óleos vegetais como combustível, além dos benefícios ambientais já comprovados, pode favorecer lugares menos favorecidos com o aumento da oferta de empregos, culminado com a valorização do campo e do trabalhador rural. A região semi-árida do Brasil, por exemplo, que abrange quase todos os estados do Nordeste e o norte de Minas Gerais, são regiões bastante castigadas pelas secas e com um grande número de pessoas vivendo na linha da pobreza. Nessa região, as culturas energéticas podem se basear em lavoura de sequeiro, isto é, sem irrigação. É o caso da mamona e do algodão, que podem conviver com regime pluviométrico do semi-árido. Portanto, a grande e forte motivação para um programa de biodiesel no Nordeste reside na possibilidade de erradicar ou diminuir a miséria do campo por meio de assentamentos familiares (Holanda, 2004). A Tabela 2.2 mostra as principais oleaginosas cultivadas nas cinco regiões brasileiras.

Acredita-se que as regiões mais carentes do Brasil poderão vir a ser grandes produtoras de biodiesel. A demanda mundial por combustíveis de origem renovável será

crecente, e o Brasil tem potencial para ser um grande exportador mundial, principalmente no contexto atual de mudanças climáticas (Holanda, 2004).

Tabela 2.2: Distribuição espacial das principais fontes de oleaginosas pelas regiões do Brasil

	CENTRO-OESTE	NORDESTE	NORTE	SUDESTE	SUL
ALGODÃO	X	X		X	X
BABAÇU		X	X		
COCO		X			
COLZA			X		X
DENDE	X	X			
GIRASSOL	X			X	X
MAMONA	X	X		X	
SOJA	X	X	X	X	X

Fonte: RAMOS, *et al.*, 2003.

Uma outra matéria-prima que pode ser utilizada para produção de biodiesel são as gorduras animais, mas ainda não há muitos estudos com esse substrato e os métodos de produção a partir dessas substâncias são diferentes dos usados com óleo vegetal devido às gorduras possuírem propriedades químicas diferentes (são sólidos a temperatura ambiente e possuem uma quantidade maior de ácidos graxos saturados) (Ma *et al.*, 1999). Essa matéria-prima é geralmente mais barata que os óleos refinados porque, ao invés de um produto primário, representam um subproduto da agroindústria animal, e porque a demanda por este produto é menor do que a maioria dos óleos vegetais mais comuns. Além do elevado teor de ácidos graxos saturados, elas possuem ponto de fusão relativamente alto, uma propriedade que, a baixas temperaturas, pode levar a precipitação e a um baixo desempenho do motor. Do lado positivo, o biodiesel derivado de gorduras animais, devido ao seu alto teor de ésteres de ácidos graxos saturados, geralmente apresenta número de cetano superior ao observado em biodiesel de óleo vegetal (Knothe *et al.*, 2006).

Até aqui, conclui-se que o biodiesel é totalmente benéfico, preservando o meio ambiente e contribuindo com o desenvolvimento econômico e social de regiões carentes do planeta. Apesar disso, há frentes que são contra o desenvolvimento desse biocombustível, alegando que ele compete com a produção de alimentos, que deve ser prioritária. Para se ter uma idéia, segundo uma matéria constante no site do jornal nacional, o preço do óleo de soja aumentou para o consumidor final, mesmo o Brasil sendo o segundo maior produtor desse

grão em todo o mundo. Uma das justificativas dadas na reportagem é que o óleo de soja tem sido usado para produção de biodiesel.

Contradições aparte, o biodiesel enfrenta uma grande barreira a sua comercialização: o custo da matéria-prima quando se usa óleo refinado. O biodiesel produzido a partir de óleos vegetais de grau alimentício não apresenta viabilidade econômica em relação ao petrodiesel, mesmo usando o mais barato dos óleos, uma vez que é essa matéria-prima que representa cerca de 70 a 85% do custo total de produção (Bonetti *et al.*, 2007; Knothe *et al.*, 2006).

Daí o grande número de pesquisas com óleos usados em frituras industriais e residenciais, uma matéria-prima mais barata, cuja produção é crescente em todo o mundo e que é, normalmente, disposta indiscriminadamente no meio ambiente, como nos esgotos das cidades, contaminado águas, ou então, integram a cadeia alimentar quando são vendidos como complemento de ração animal, tornando-se assim a causa de muitos problemas de saúde humana, uma vez que, durante a fritura, alguns componentes nocivos são formados. (Costa Neto *et al.*, 2000; Felizardo *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2006).

Devido ao grande número de estabelecimentos comerciais que fazem uso de óleos e gorduras, fica difícil fazer um levantamento preciso da disponibilidade desse resíduo em grandes centros urbanos. Muitos países desenvolvidos têm estabelecido políticas que penalizam a disposição de óleo residual em esgotos. No Japão, por exemplo, 500.000 toneladas de óleo residual são descartadas anualmente. Entretanto, em algumas cidades já há um programa de coleta desses óleos para transformá-los em biodiesel e usá-lo no transporte público (Costa Neto *et al.*, 2000; Felizardo *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2006, Shimada *et al.*, 2002).

Vários autores reportam a viabilidade técnica e ambiental da utilização de óleo usado para produção de biodiesel. Kulkarni *et al.* (2006), publicaram que os motores que funcionaram com o biodiesel obtido de óleo de fritura apresentaram um melhor desempenho e a sua queima emite menos CO₂, materiais particulados e gases do efeito estufa. Segundo Costa Neto *et al.* (2000), a significativa redução de fumaça, obtida em teste com biodiesel de óleo usado, demonstrou que vale a pena reutilizar o óleo descartado de frituras para produção desse biocombustível, fornecendo um destino mais adequado para esse poluente. No entanto, identificou-se também a necessidade de um eficiente sistema de coleta de óleos usados para que a substituição do óleo diesel mineral por biodiesel de óleo residual alcance o patamar

desejado, o que em termos gerais, será de grande contribuição para o meio ambiente (Utlu *et al.*, 2007; Yagiz *et al.*, 2007).

No estudo da produção de biodiesel a partir de óleos residuais, verificou-se que os óleos apresentavam uma composição variada de ácidos graxos livres, dos quais 40% correspondiam ao ácido oléico. Dessa forma o ácido oléico é um dos ácidos carboxílicos que ocorre em grandes quantidades na maioria dos lipídeos, sendo, portanto, responsável por grande parte da acidez livre em matérias residuais (Lucena, 2008).

Devido as transformações químicas e físicas pelas quais os óleos passam durante a fritura, é necessário uma modificação das tecnologias existentes para produção de um biodiesel de qualidade aceitável. Os ácidos graxos livres não são transformados em biodiesel pela alcoólise alcalina, o método mais convencional. Por isso, matérias-primas ácidas requerem processamento distinto do empregado em óleos e gorduras refinadas. A catálise ácida foi examinada, mas temperaturas muito altas, elevado excesso estequiométrico de álcool e longos tempos de reação foram necessários (Al-Zuhair *et al.*, 2007; Knothe *et al.*, 2006). Já a catálise enzimática apresenta-se como uma alternativa promissora para a alcoólise de matérias-primas com alto teor de ácidos graxos livres (Akoh *et al.*, 2007).

2.3. Métodos de Obtenção de Biodiesel

Em virtude da inviabilidade do uso direto de óleos vegetais nos motores de injeção direta e indireta, movidos a diesel, vários estudos têm sido conduzidos para desenvolver derivados de óleos vegetais, cujas propriedades e desempenho se aproximem do óleo diesel mineral.

Dentre os principais métodos de transformação de óleos vegetais, destacam-se a microemulsificação, a pirólise, a esterificação e a transesterificação.

2.3.1. Microemulsificação

Uma microemulsão é definida como uma dispersão isotrópica, termodinamicamente estável, de óleo, água, surfactante e geralmente uma molécula pequena anfifílica, denominada cosurfactante (Fukuda *et al.*, 2001).

Apesar das microemulsões apresentarem boas características, verificou-se que em longo prazo provocam a decomposição de carbono no motor, combustão incompleta e aumento da viscosidade dos óleos lubrificantes (Urioste, 2004).

2.3.2. Pirólise

A pirólise, ou craqueamento térmico, é um processo onde ocorre uma ruptura da estrutura molecular original de um determinado composto pela ação do calor, na ausência de ar ou oxigênio, a temperaturas superiores a 450 °C, geralmente auxiliado por um catalisador, de modo a gerar moléculas menores. Catalisadores típicos para serem empregados na pirólise são o óxido de silício – SiO₂ e o óxido de alumínio – Al₂O₃ (Holanda, 2004; Ma *et al.*, 1999).

O equipamento para pirólise ou craqueamento térmico é caro e os produtos resultantes desse processo são de difícil caracterização devido ao grande número de reações que ocorrem e devido ao grande número de produtos que são formados, tais como alcanos, alcenos, alcadienos, ácidos carboxílicos e aromáticos, dependendo da fonte do óleo vegetal decomposto. Contudo, apesar dos óleos vegetais pirolisados apresentarem concentrações satisfatórias de enxofre, água, sedimentos e cobre, são inaceitáveis os níveis de cinzas, resíduos de carbono e o ponto de ignição alcançado. Embora o produto da pirólise seja quimicamente semelhante ao diesel mineral, a remoção do oxigênio durante o processo térmico elimina qualquer benefício ambiental do produto e geralmente produz um

combustível mais próximo da gasolina que do diesel (Al-Zuhair *et al.*, 2007; Fukuda *et al.*, 2001; Holanda, 2004; Ma *et al.*, 1999; Ranganathan *et al.*, 2007; Urioste, 2004).

2.3.3. Esterificação

Outro método para produção de biodiesel é através da reação de esterificação, em que um ácido graxo reage com um álcool, a elevadas temperaturas, e é auxiliada por um catalisador ácido, geralmente ácido sulfúrico, fornecendo, além dos ésteres alquílicos, água como subproduto. Esse processo de obtenção de biodiesel é, normalmente, muito utilizado industrialmente como uma etapa de pré-tratamento para matérias-primas de elevada acidez livre, geralmente óleos residuais, efluentes graxos e matérias-primas com elevado teor de ácidos graxos na sua composição, como por exemplo, óleo de babaçu (Marchetti *et al.*, 2007).

No entanto, quimicamente, a reação de esterificação exige elevadas concentrações de álcool para se alcançar conversões significativas. Vários pesquisadores do processo informam que a mínima razão molar de álcool/ácido graxo necessária deve ser de pelo menos 9:1, ou seja, um excesso estequiométrico de 800%, uma vez que a relação estequiométrica entre o ácido graxo e o álcool é de 1:1. Esse problema deve-se principalmente pela água formada ao longo da reação, pois desativa o catalisador (H^+) presente no meio, favorecendo a reação inversa de hidrólise. Entretanto, essa reação de esterificação também pode ser catalisada enzimaticamente. Dados da literatura comprovam a viabilidade do uso de lipases na esterificação de matérias-primas de elevada acidez livre em proporções estequiométricas e em condições brandas de temperatura (Kulkarni *et al.*, 2006). A seguir, a Figura 2.1 mostra o mecanismo da esterificação enzimática.

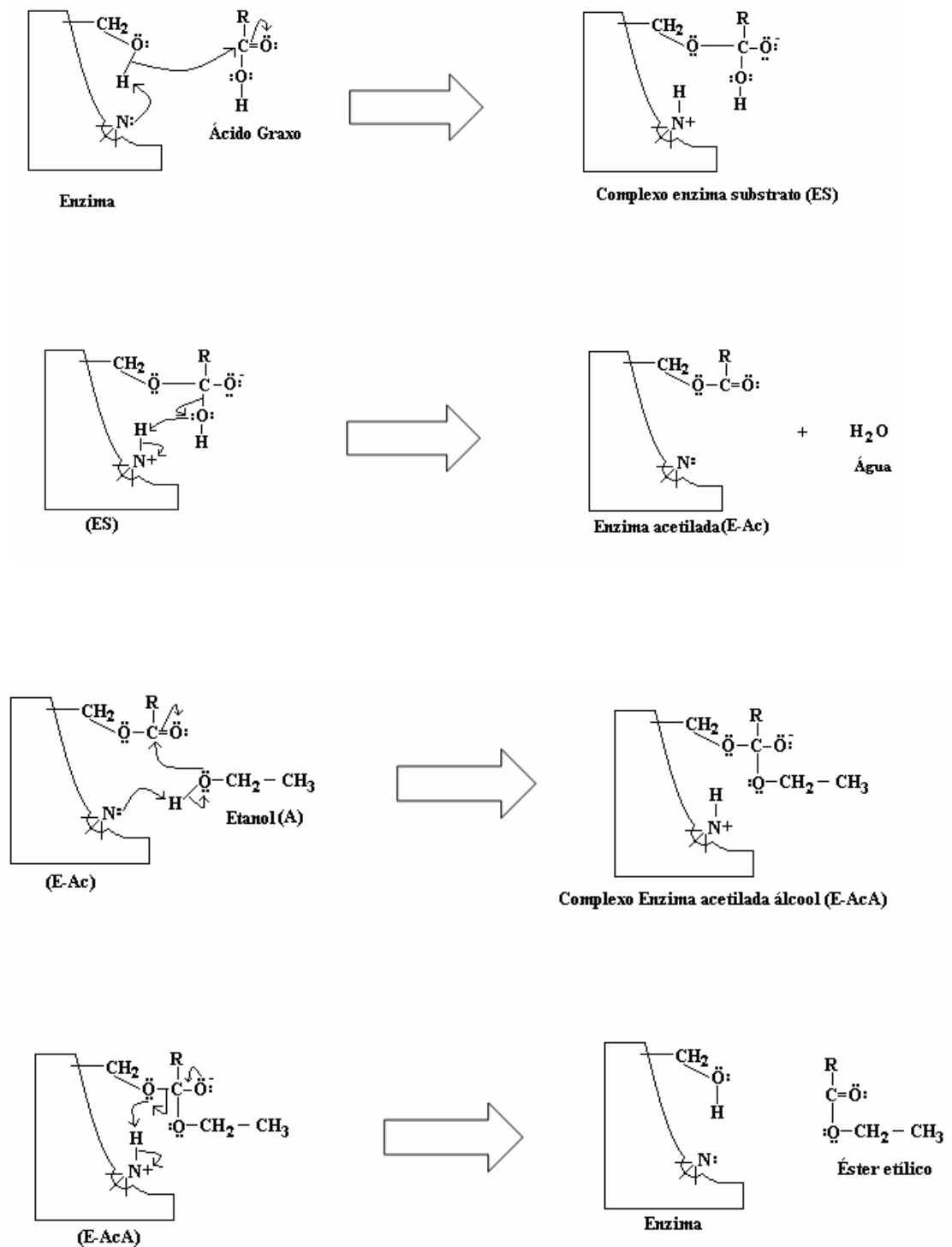


Figura 2.1 – Mecanismo da esterificação enzimática com etanol.

Inicialmente ocorre uma adição nucleofílica para formar o complexo enzima-substrato (ES). O nucleófilo é o oxigênio da hidroxila da enzima que ataca o carbono da carbonila do ácido graxo, e o par de elétrons do grupamento amino da enzima captura o hidrogênio da

hidroxila. Em seguida, o par de elétrons do oxigênio do ácido graxo no complexo enzima-substrato captura o hidrogênio do grupamento amina, liberando uma molécula de água (grupo abandonador) e formando um composto intermediário enzima acetilada (E-Ac). Esse composto intermediário sofre então o ataque do átomo de oxigênio do álcool que é adicionado ao átomo de carbono da carbonila do composto intermediário, e o par de elétrons do nitrogênio captura o hidrogênio da hidroxila do álcool, formando o composto enzima acetilada-álcool (E-AcA). Finalmente, o próton é transferido do ácido conjugado da amina para o átomo de oxigênio do complexo, liberando o éster alquílico e reconstituindo a enzima (Al-Zuhair *et al.*, 2007).

2.3.4. Transesterificação

A reação de transesterificação só acontece na presença de um catalisador, que pode ser ácido (esterificação), básico ou enzimático. A alcoólise alcalina, cujo catalisador é, geralmente, hidróxido de sódio ou de potássio, é o processo mais usado industrialmente, produzindo, além do produto de interesse (ésteres alquílicos), subprodutos tais como glicerol (também conhecido como glicerina), água e sabão (Salis *et al.*, 2005)

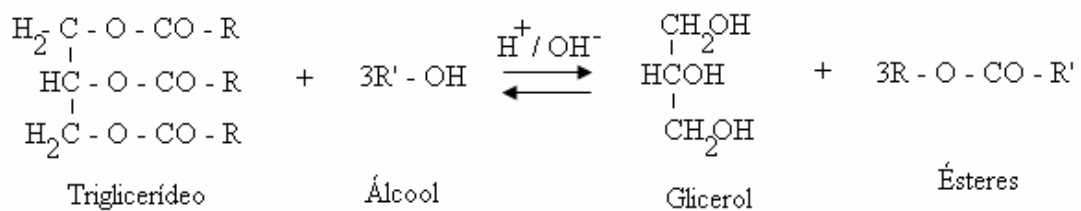
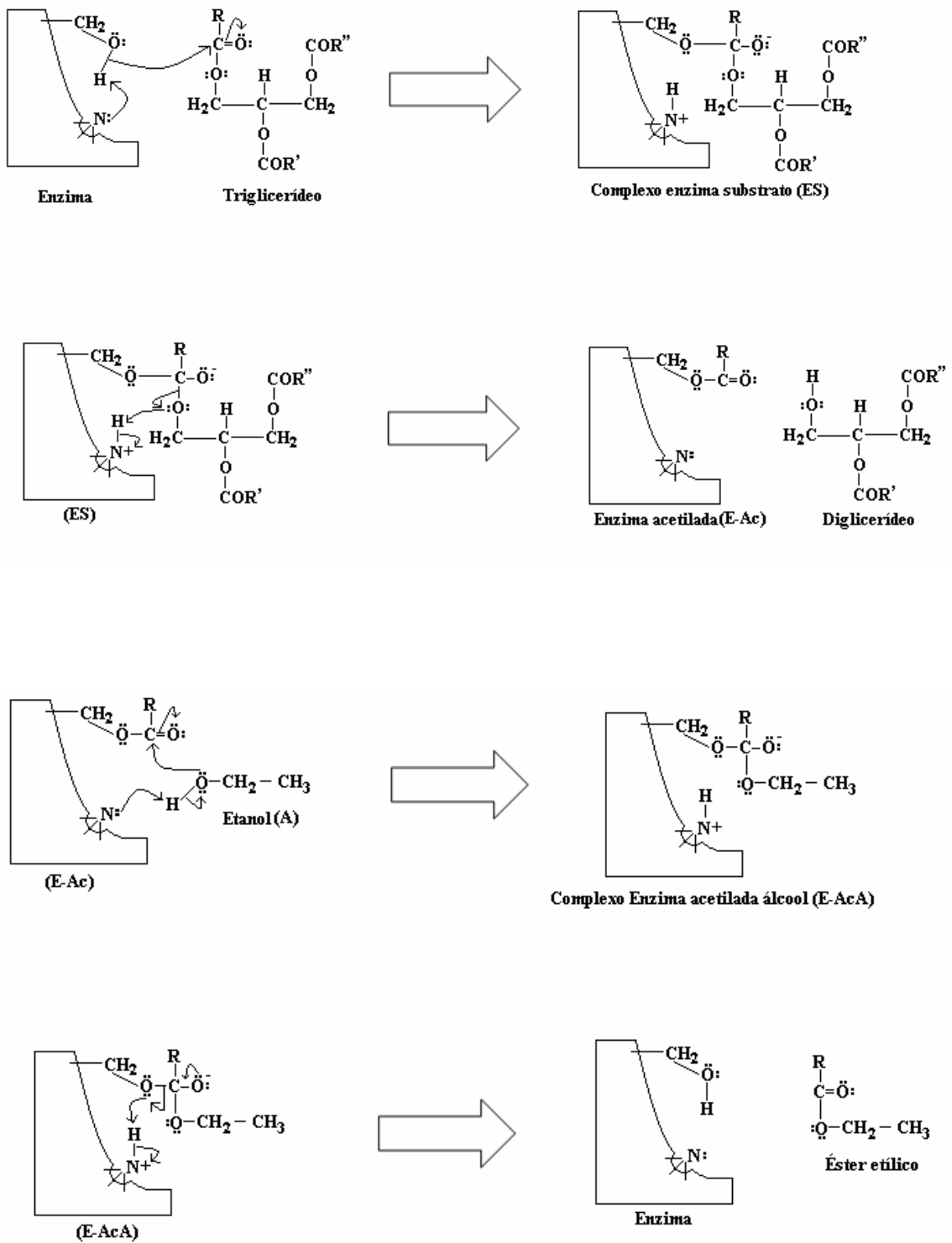


Figura 2.2 – Reação de transesterificação, onde R representa a cadeia carbônica dos ácidos graxos e R' a cadeia carbônica do álcool reagente.

Essa reação ocorre em etapas, tendo mono e diglicerídeos como produtos intermediários (Felizardo *et al.*, 2006; Marchetti *et al.*, 2007; Saad, 2005). A Figura 2.3, a seguir, mostra o mecanismo da transesterificação enzimática com etanol.



Fi

gura 2.3 – Mecanismo da transesterificação enzimática com etanol.

Comparando as Figura 2.1 e 2.3, o mecanismo é basicamente o mesmo, sendo a principal diferença o substrato e os produtos intermediários produzidos. Na transesterificação, o substrato é um triglicerídeo (óleo vegetal de baixa acidez livre) e ao invés de água, os subprodutos formados são glicerol, diglicerídeos e monoglicerídeos.

Os álcoois preferencialmente usados nesse tipo de reação são álcoois de cadeia curtas tais como o metanol, etanol, propanol, butanol ou álcool amílico. Os álcoois mais utilizados são o metanol e o etanol, principalmente pelo seu baixo custo, suas propriedades físico-químicas (menor cadeia carbônica) e grande disponibilidade na Europa, Japão e Estados Unidos (Lu *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 1999; Marchetti *et al.*, 2007; Urioste, 2004). Devido à elevada hidrofiliabilidade do metanol, ao se utilizar esse álcool, as reações enzimáticas são efetuadas em meio à solvente orgânico. Outra desvantagem do metanol é que quando usado em excesso pode inativar a enzima (Al-Zuhair *et al.*, 2006).

No Brasil, o etanol tem força natural desde que o país se tornou um dos maiores produtores mundiais, com uma tecnologia de produção bem estabelecida, grande capacidade industrial, com plantas instaladas em todo o país e devido ao fato de o etanol ser obtido de um recurso renovável (Faccio, 2004).

Apesar de o etanol ser menos reativo do que o metanol, ele tem a vantagem de ser menos tóxico e de evitar a adição de solvente orgânico em reações enzimáticas, o que viabiliza o processo de obtenção de biodiesel com redução de custos com solventes e com consumo de energia (Urioste, 2004). Além disso, ao se usar o etanol de origem vegetal, a emissão de dióxido de carbono decorrente da combustão do biodiesel é reabsorvida na íntegra pela fotossíntese, durante o crescimento das próximas safras das biomassas das quais se produz o álcool e o óleo, ou seja, o etanol é mais ambientalmente correto do que o metanol (Akoh *et al.*, 2007).

Apesar dos altos rendimentos conseguidos em um curto espaço de tempo quando se realiza uma transesterificação química, o alto gasto energético com as elevadas temperaturas e as dificuldades de recuperação do catalisador e dos subprodutos são as principais desvantagens da rota química convencional (Lu *et al.*, 2007; Shimada *et al.*, 1999).

De acordo com a Figura 2.2, para que a reação de transesterificação ocorra estequiometricamente, são necessários 3 moles de álcool para cada mol de triglicerídeo. O rendimento dessa reação depende de diversos fatores, tais como:

- A razão molar entre o óleo e o álcool, pois como a reação de transesterificação é reversível, geralmente ela é feita com excesso de álcool para favorecer a formação dos ésteres alquílicos (Ma *et al.*, 1999; Marchetti *et al.*, 2007; Saad, 2005; Urioste, 2004). Na catálise enzimática, no entanto, alguns autores alcançaram boas conversões na proporção estequiométrica, uma vez que o excesso de álcool pode provocar a inativação da enzima (Kose *et al.*, 2002, Oliveira *et al.*, 2004; Samukawa *et al.*, 2000);
- A temperatura também é outro fator importante que varia em função dos tipos de óleo e do catalisador. A metanólise alcalina, por exemplo, ocorre entre 20-35 °C (Urioste, 2004). Em relação a catálise enzimática, dependendo da fonte da enzima e do suporte na qual ela foi imobilizada, temperaturas elevadas podem desnatura-la.
- O tipo de catalisador. Os catalisadores possíveis são os ácidos (H₂SO₄, HCl, H₃PO₄), as bases (KOH, NaOH) ou as enzimas (lipases). A catálise alcalina é muito mais rápida do que a ácida, contudo, quando se utilizam óleos residuais com elevado teor de água e de ácidos graxos livres, a catálise ácida é mais indicada (esterificação) (Ma *et al.*, 1999; Urioste, 2004);
- A concentração de ácidos graxos livres e de água nos óleos quando a reação é catalisada por catalisador básico (NaOH). O conteúdo de água e de ácidos graxos livres nos reagentes deve ser baixo, pois a reação inversa de hidrólise pode ser favorecida e podem ser formados sabões no processo, o que aumenta a viscosidade final do produto, dificulta a separação do glicerol e diminui o rendimento em ésteres (Fukuda *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 1999; Marchetti *et al.*, 2007; Urioste, 2004);

Como já mencionado anteriormente, a reação de alcoólise pode ser conduzida por vários tipos de catalisadores e, dependendo do catalisador escolhido, há vantagens e desvantagens, e no que se refere ao uso de óleos residuais de elevada acidez livre, catalisadores alcalinos não são indicados, pois esses ácidos neutralizam a ação catalítica e favorecem a formação de sabão, diminuindo o rendimento da reação. Esse comportamento dos catalisadores alcalinos frente a matérias-primas ácidas é confirmado no trabalho de Malta *et al.* (2007). Segundo os resultados apresentados por esse autor, em nenhum momento o produto da reação, éster etílico, foi obtido quando da utilização de hidróxido de sódio, pois a

base, em todas as concentrações testadas, foi consumida na sua totalidade pelo excesso de acidez. Entretanto, ao se utilizar lipases como catalisadores, obtiveram-se níveis de conversão de até 82%.

A produção de biodiesel por biotransformação, ou catálise enzimática, tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos pela possibilidade concreta de recuperação e reutilização do catalisador ao usar enzima imobilizada, por permitir a recuperação simples do glicerol, por eliminar os problemas de índice de acidez com a total conversão dos ácidos graxos livres presentes no glicerídeo (eliminando a etapa de pré-tratamento numa catálise convencional), pelo uso de condições brandas no processo e pela tendência de obtenção de elevados rendimentos em meios constituídos de óleo e álcool em proporções estequiométricas, comportamento este não observado na rota química (Akoh *et al.*, 2007; Marchetti *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2004). Entretanto, o custo de produção desse catalisador é significativamente maior do que um catalisador químico (Felizardo *et al.*, 2006). A Tabela 2.3 mostra uma comparação entre a catálise química a catálise enzimática.

Tabela 2.3: Comparação entre a catálise química e a catálise enzimática para produção de biodiesel

	Catálise Química	Catálise Enzimática
Temperatura de reação (°C)	60 - 70	30 – 40
Ácidos graxos livres no óleo não refinado	Produtos saponificados	Ésteres
Água na matéria-prima	Interferência na reação	Interferência na reação
Rendimento em ésteres alquílicos	Alto	Alto
Recuperação do glicerol	Difícil	Fácil
Purificação de ésteres	Lavagens consecutivas	Nenhuma
Reutilização do catalisador	Nenhuma (quando catálise homogênea)	Fácil (quando imobilizado)

Fonte: URIOSTE, D. 2004.

2.4. Catálise Enzimática

Catálise enzimática ou biotransformação refere-se a modificações específicas ou interconversões na estrutura química de uma substância, realizadas por enzimas presentes nas células ou na forma isolada (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

A aplicação de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, devido à alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais, a sua alta especificidade e ao fato de atuarem com alta eficiência em condições reacionais bastante suaves (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente, nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e transesterificação de lipídeos por meio das lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; ii) não requerem a presença de co-fatores; iii) possuem uma larga especificidade pelo substrato e, iv) exibem uma alta enantiosseletividade (Carvalho *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004).

Embora, atualmente, as aplicações industriais de lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes, novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel, tratamento de resíduos industriais e mais recentemente na produção de combustíveis. Alguns autores já afirmam que no futuro as lipases serão os catalisadores escolhidos para produção de biodiesel (Akoh *et al.*, 2007). As lipases vêm, deste modo, conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais (Castro *et al.*, 2004).

No que se refere à produção de combustíveis, um biocombustível pode ser obtido a partir de óleos e gorduras através de modificações químicas dos ácidos graxos (hidrogenação), pela reversão da ligação éster (hidrólise) e reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do triglicerídeo (transesterificação) (Castro *et al.*, 2004).

Sem levar em consideração os outros processos existentes, como hidrogenação e fracionamento, pode-se afirmar que as limitações para obtenção desses produtos estão associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e requerem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista ou contaminada, que requerem uma etapa posterior de purificação, aumentando os custos de produção (Castro *et al.*, 2004).

Nesse sentido, o enfoque biotecnológico apresenta-se com uma alternativa promissora que atende aos apelos atuais da Química Verde, reduzindo o impacto ambiental pela minimização dos resíduos gerados nos processos químicos convencionais, fornecendo maiores rendimentos, obtendo produtos biodegradáveis com menor consumo de energia (Castro *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004).

Os óleos e gorduras são matérias-primas versáteis para aplicação da biotransformação, sendo inúmeros os processos implementados em escala comercial. A escolha do tipo de biocatalisador é efetuada entre os microrganismos vivos íntegros ou outros materiais biológicos como RNA, anticorpos ou enzimas isoladas ou contidas em células. O uso de enzimas isoladas é preferível, quando existem limitações com relação a permeabilidade do substrato na membrana da célula, ou quando ocorrem reações secundárias indesejáveis (Castro *et al.*, 2004).

2.4.1. Lipase

As enzimas são substâncias biodegradáveis, que tornam os processos de produção industrial mais eficientes e, geralmente, menos dispendiosos, proporcionando obtenção de produtos de qualidade superior. Elas são catalisadores biológicos, desde a síntese de intrincados compostos até a quebra de complexas moléculas. Como catalisadores, elas permanecem intactas ao final da reação, quando imobilizadas e quando não são desnaturadas por algum fator. As enzimas são altamente específicas (o que evita reações paralelas

indesejáveis) e, sendo proteínas, são 100% biodegradáveis, o que as torna ambientalmente inofensivas.

No início da utilização de enzimas em processos industriais, elas tinham pouca utilidade porque se acreditava que somente o meio aquoso era propício para manter a conformação estrutural cataliticamente ativa. Entretanto, sabe-se atualmente que muitas enzimas (ou complexos enzimáticos) são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar àquela encontrada em soluções aquosas, ou em certos casos até superior. Acredita-se que as enzimas sejam cataliticamente ativas em meio orgânico porque permanecem na sua forma original, e não se desdobram em meio não-aquoso. Apesar disso, as enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte. A água contribui para integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína e pode limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima.

Atualmente, mais de 3000 diferentes enzimas tem sido identificada e muitas isoladas em sua forma pura. Várias tem sido obtidas na forma cristalina e a seqüência de aminoácidos, bem como a estrutura tridimensional determinadas através de cristalografia de raios-X e RMN-2D (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

A nomenclatura das enzimas é feita baseada no substrato sobre o qual atuam, acrescentando o sufixo ase. Por exemplo, as lipases são enzimas que atuam sobre os lipídeos. A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) divide as enzimas em seis grandes classes (Tabela 2.4), e cada uma em subclasses de acordo com o tipo de reação que as mesmas catalisam (Saad, 2005).

De acordo com a Tabela 2.4, as lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre a ligação éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de estereases. A diferenciação entre uma lipase e uma esterease (EC. 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterease age em substratos solúveis (Cruz Junior *et al.*, 2007; Linko *et al.*, 1998).

Tabela 2.4 - Classificação das enzimas de acordo com a IUBMB

Número	Classe	Tipo de reação catalisada	Subclasse
1	Oxidoreduases	Reações de oxidação e redução de ligações do tipo C-H, C-C, e C=C	Hidrogenases, oxidases, peroxidases, etc.
2	Transferases	Transferência de grupos aldeídico, cetônico, acila, fosforila ou metila	Transaldolases, transcetolases, etc
3	Hidrolases	Hidrólise de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilas, anidridos e glicosídeos	Esterases, lipases, peptidases, fosfatases, etc.
4	Liases	Adição-eliminação de grupos a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos	Descarboxilases, cetoácidoliases, hidroliases.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da molécula para produzir isômeros	Racemases, epimerases, etc.
6	Ligases	Formação e clivagem de ligações C-C, C-S, C-O e C-N e ésteres de fosfato	Sintetases

Fonte: SAAD, E.B. 2005.

Entretanto, a diferenciação entre lipases e estereases ainda não está completamente definida. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética, que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as estereases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

As lipases são comumente encontradas na natureza em tecidos animais, vegetais e microbianos, sendo produzida, preferencialmente, por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais como os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, por leveduras de *Tulopis* sp e *Candida* sp e bactérias como *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp. Em função do baixo rendimento do processo fermentativo, as lipases microbianas tinham também um custo bem mais elevado quando comparado com outras hidrolases, como proteases e carboxilases. Entretanto, os recentes avanços registrados na tecnologia do DNA têm permitido aos fabricantes de enzimas

colocarem no mercado lipases microbianas com atividade bem elevada, a um custo bem mais acessível. Atualmente, lipases microbianas são produzidas por diversas indústrias, como Novozymes, Amano, Gist Brocades, entre outras. Uma publicação recente sobre a disponibilidade comercial de lipases listou enzimas de 34 diferentes fontes, incluindo 18 a partir de fungos e 7 de bactérias (Castro *et al.*, 2004; Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

O sítio catalítico é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas e é frequentemente protegido na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid” que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da tampa “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização das lipases. Estudos de raio-X realizados por Uppenberg *et al.*(1994) com lipase de *Cândida antarctica* revelou a existência de uma “tampa” similar recobrando a tríade catalítica Ser-His-Asp (Petkar *et al.*, 2006; Uppenberg *et al.*, 1994).

Mais recentemente, entretanto, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, sendo que as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Cândida antarctica* B, que apresentam “tampa” em suas estruturas, não sofrem ativação interfacial. Por outro lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a “tampa” e não precisam da interface para exercer a atividade hidrolítica (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Esta observação sugere que a presença de uma tampa dominante e a ativação interfacial não são critérios adequados para classificar uma enzima como lipase. Portanto, a definição atual é bastante simples: uma lipase é uma carboxiesterase que catalisa a hidrólise de acilglicerol de cadeia longa (Castro *et al.*, 2004).

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido a sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis nesse meio, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantioseletividade. Possuem habilidade de catalisar reações de esterificações, interesterificações, aminólise e tiotransesterificação (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Tinge *et al.*, 2006).

As reações lipolíticas ocorrem na interface água-lipídeo podendo, em alguns casos, impedir que as cinéticas das reações enzimáticas sejam descritas pelas equações de Michaelis-

Menten, que só são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea. A técnica de camada única tem sido usada extensivamente e, mais recentemente, a tecnologia gota-óleo foi proposta para estabelecimento da cinética da lipase, que é monitorada pela análise automática do perfil de uma gota de óleo suspensa em água; a redução na tensão superficial entre óleo e água causada pela hidrólise da lipase é medida em função do tempo (Castro *et al.*, 2004).

O estudo cinético da reação de alcoólise de óleos vegetais catalisada por lipase ainda é limitado na literatura, mas os resultados desses estudos são importantes para o projeto de reatores adequados e eficientes e para o controle e otimização do processo e dos efeitos das mudanças nas condições operacionais. A maioria dos estudos cinéticos constantes na literatura propõe um modelo *Ping-Pong bi-bi* com inibição competitiva pelo álcool (considerando álcoois de cadeia curta) (Al-Zuhair *et al.*, 2006).

CHULALAKSANANUKUL *et al.* (1993) estudaram o mecanismo cinético da reação de esterificação catalisada por lipase de *Mucor miehei* imobilizada em resina aniônica (Lipozyme IM) tendo o ácido oléico e etanol como substratos e hexano como solvente. Os autores propuseram também o mecanismo *Ping-Pong bi-bi*, com inibição por excesso de etanol (Faccio, 2004).

2.4.2. Enzimas Imobilizadas

Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, as enzimas estão sujeitas a inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-la da interação com o solvente, meio no qual são realizadas algumas reações, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, novas técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (Cruz Junior *et al.*, 2007).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação com sua

forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não devem ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de uma reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

Para ser efetivo na imobilização, o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

Uma outra vantagem de se imobilizar enzimas é a possibilidade de reutilizá-la ao final do processo, o que, em termos de produção de biodiesel, é interessante porque pode reduzir os custos da produção com aquisição da enzima, uma vez que ela pode ser recuperada e reutilizada e pode ser imobilizada em suportes baratos como a quitosana, por exemplo (Salis *et al.*, 2005).

2.5. Considerações Finais

De acordo com a literatura, a biotransformação enzimática de óleo vegetal residual, objeto de interesse dessa dissertação, apresenta, além de todas as vantagens já mencionadas anteriormente, o diferencial da matéria-prima não necessitar de um pré-tratamento, que consiste em utilizar primeiro um catalisador ácido para converter os ácidos graxos livres em seus respectivos ésteres e diminuir o nível desses ácidos no óleo, e depois realizar uma transesterificação alcalina (Kulkarni *et al.*, 2006).

Embora os processos de alcoólise enzimática para obtenção de biodiesel ainda não sejam comercialmente desenvolvidos, novos resultados têm sido reportados em artigos e patentes. O aspecto comum desses estudos consiste na otimização das condições de reação (solvente, temperatura, pH, enzima, entre outros), a fim de estabelecer as características para aplicações industriais. Contudo, tanto o rendimento, como o tempo de reação e o custo do biocatalisador ainda são desfavoráveis se comparados com o sistema de reação por catálise básica (Castro *et al.*, 2004).

Por tudo o que foi exposto nessa revisão bibliográfica, o presente trabalho visa estudar a produção enzimática de biodiesel a partir de óleo residual e etanol, verificando a influência das variáveis de processo e a cinética de reação, buscando a otimização e a redução de custos na obtenção de um produto de alto valor agregado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo mostra os reagentes e o procedimento experimental empregado no estudo da alcoólise enzimática do ácido oléico e do óleo vegetal residual, bem como a metodologia de caracterização da matéria-prima e de análise das amostras de ésteres etílicos (Biodiesel).

3.1. Substratos e Catalisador

Como o objetivo deste trabalho foi a obtenção de um biocombustível proveniente de uma matéria-prima residual e, como geralmente esses resíduos possuem um elevado índice de acidez livre, estudou-se primeiramente a influência das variáveis de processo da etanolise enzimática do ácido oléico, e para confirmar a viabilidade do uso de lipases nesse tipo de reação, realizaram-se alguns experimentos com dois óleos residuais de diferentes índices de acidez.

Portanto, três tipos de material lipídico foram utilizados para a reação de alcoólise enzimática visando à obtenção de ésteres etílicos. São eles: ácido oléico comercial para síntese (VETEC), óleo de coco residual resultante do processo de destilação do óleo da empresa DUCÔCO e óleo de algodão residual resultante do processo de fritura de castanhas da empresa IRACEMA. Álcool etílico comercial (VETEC, 99,8% de pureza) também foi utilizado como substrato em todos os experimentos.

Como catalisador, utilizou-se uma lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* tipo B (Novozym 435), gentilmente cedida pela Novozyme do Brasil (Araucária – PR), cuja atividade hidrolítica era de 491,98 U/g. Também usou-se como catalisador um derivado produzido pelo Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBIO) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará. Esse derivado consiste em uma lipase de *Candida antarctica* tipo B (CALB) imobilizada em quitosana, ativada com glicidol, etilenodiamina e glutaraldeído, cujo excesso de umidade foi retirado por secagem com hexano na presença 3% de ácido butírico. As condições de

imobilização, ativação e secagem desse derivado foram as condições otimizadas por Silva (2007). Foram imobilizadas 6 mg de proteína / g de suporte, apresentando uma atividade hidrolítica de 369,36 U/g.

3.2.Determinação da Atividade Hidrolítica das Enzimas Imobilizadas

A determinação da atividade hidrolítica da enzima foi descrita por Silva (2007). Segundo o autor, a atividade lipásica pode ser quantificada pela hidrólise do paranitrofenilbutirato (pNPB) em 2-propanol a 25 °C com adição de 0,01g de lipase. Para esta reação, um volume de 29mL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0, foi adicionado a 1,0 mL de solução de pNPB 15 mM em 2-propanol num reator encamisado, provido de agitação, sendo a reação iniciada pela adição da enzima. A variação da absorbância a um comprimento de onda de 410 nm foi monitorado por 7,5 minutos, retirando-se, para isso, aproximadamente 2 mL do sobrenadante a cada 1,5 minutos sendo lido imediatamente no espectrofotômetro. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 mmol de pNPB por minuto, e as atividades foram expressas em U/g.

3.3.Caracterização Físico-Química da Matéria-Prima e do Biodiesel

Os ésteres obtidos a partir da alcoólise de uma matéria-prima lipídica só podem ser considerados como biodiesel se atenderem a algumas exigências, ou seja, se estiverem dentro das especificações regulamentadas pela Agência Nacional de Petróleo (ANP). Para verificar se o produto obtido estava dentro dessas especificações, foram empregadas várias metodologias analíticas descritas pela American Oil Chemists Society (A.O.C.S.) e pela American Society for Testing and Materials (ASTM). A seguir, descrevem-se as análises realizadas na caracterização da matéria-prima e dos ésteres etílicos obtidos por síntese enzimática.

3.3.1. Índice de Acidez

O índice de acidez revela o estado de conservação do óleo e corresponde ao número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessário para neutralizar os ácidos graxos livres de um grama de gordura (em mg KOH/g). A decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, e a rancidez é quase sempre acompanhada pela formação de ácido graxo livre. Óleos com elevada acidez livre são impróprios para o consumo humano e para sua utilização como combustível, uma vez que a acidez livre tem ação corrosiva sobre os componentes metálicos do motor. (Dantas, 2006)

Os métodos de análise do índice de acidez e da porcentagem de ácidos graxos livres empregados nessa dissertação foram os métodos Cd 3d-63 e Ca 5a-40, respectivamente, que são descritos pela American Oil Chemists Society (A.O.C.S.).

Para o cálculo do índice de acidez, inicialmente neutralizou-se o solvente (álcool etílico comercial) com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,25 N, utilizando uma solução de fenolftaleína 1% em álcool como indicador. Em seguida, mediu-se cerca de 1 g da amostra a ser analisada em um erlenmeyer de 250 mL, adicionaram-se 50 mL de etanol neutralizado e 2 ou 3 gotas de fenolftaleína, titulando em seguida com a solução de NaOH 0,25 N, até que uma coloração levemente rósea persistisse por 15 segundos. Para amostras cujo índice de acidez era muito baixo, utilizou-se uma solução de NaOH 0,1 N.

Feito esse procedimento e anotado a massa da amostra analisada e o volume de NaOH gasto na titulação, fizeram-se os cálculos de acordo com as Equações 3.1 e 3.2.

$$IA(\text{mgKOH} / \text{g}) = \frac{V \times F \times N \times 56,11}{M} \quad (3.1)$$

$$AG(\%) = \frac{V \times F \times N \times 28,2}{M} \quad (3.2)$$

onde IA é o índice de acidez; V é o volume gasto de NaOH na titulação; F é o fator da solução de NaOH (sempre próximo de 1); N é a normalidade da solução de NaOH (mol/L); M é a massa da amostra utilizada e AG é a porcentagem de ácidos graxos livres, expressa como ácido oléico, em óleos comuns, brutos e refinados.

3.3.2. Densidade

A densidade relativa a 20 °C das amostras foi determinada segundo a norma ASTM D-4052, utilizando-se um densímetro digital da marca Anton Paar, modelo DMA 4500. Após a calibração do equipamento com água destilada, mediu-se 5 mL de amostra e preencheu-se a célula do densímetro para fazer a determinação da densidade. A leitura foi realizada diretamente no visor do equipamento a 20 °C em g/cm³.

3.3.3. Teor de Umidade

A quantidade de água presente nas amostras de substratos e ésteres etílicos foi medida segundo o método ASTM D-1744, utilizando um titulador Karl-Fischer da marca Metrohm, modelo 795 KTF Titrino, com capacidade de detectar umidade na ordem de ppm com precisão de $\pm 0,03\%$. O procedimento consistiu, primeiramente, em calibrar a solução Karl-Fischer com água destilada para determinação do fator de solução. Adicionou-se, em seguida, aproximadamente 1 g da amostra a ser analisada, e após um determinado período de tempo, o teor de umidade é lido no software Vesuv datalogger 1999.

3.3.4. Índice de Iodo

O índice de iodo é o número de miligramas de iodo absorvidos por 100 g de gordura e reflete o grau de insaturação da amostra analisada. Os resultados obtidos por esse método dependem de fatores tais como: tempo de contato, solução utilizada na determinação e o excesso de iodo presente na solução (Lucena, 2008).

Para análise das amostras constantes nessa dissertação, utilizou-se o método Cd 1-25 sugerido pela American Oil Chemists Society (A.O.C.S.). O procedimento consistiu em pesar de 0,2 g a 1,0 g da amostra em erlenmeyers de 250 mL de boca esmerilhada, adicionando-se em seguida 15 mL de tetracloreto de carbono e 25 mL de solução de Wijs (solução comercial de iodo em ácido acético glacial e tetracloreto de carbono). Deixou-se essa mistura reagir ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 1 hora. Decorrido esse período de tempo, adicionaram-se 20 mL de solução de iodeto de potássio e 150 mL de água destilada, titulando-se em seguida com solução de tiossulfato de sódio 0,1 N até o aparecimento de uma coloração levemente amarela, quando então adicionaram-se 2 mL de solução indicadora de amido e continuou-se a titulação com tiossulfato de sódio até o desaparecimento da coloração azul. Para o cálculo do índice de iodo, utilizou-se a Equação 3.3:

$$II = \frac{(V_B - V_T) \times 1,27 \times F}{M} \quad (3.3)$$

sendo V_T o volume gasto na titulação com tiossulfato de sódio 0,1 N; V_B é o volume gasto na titulação do branco; F é o fator da solução de tiossulfato de sódio e M é a massa da amostra em gramas.

3.3.5. Glicerina Livre, Combinada e Total

A glicerina, ou glicerol, é um subproduto resultante da reação de alcoólise de triglicerídeos. É feita uma distinção de dois tipos de glicerina: a glicerina livre e a glicerina combinada. A glicerina livre é o glicerol propriamente dito, um triálcool resultante da quebra da molécula de triglicerídeo e da combinação com o álcool transesterificante. A glicerina combinada, por sua vez, pode-se dizer que é o próprio triglicerídeo, ou seja, no óleo, antes da reação, há 100% de glicerina combinada e 0% de glicerina livre, pois se tem somente triglicerídeo e não se tem nada de glicerol. A medida que a reação prossegue e a molécula de triglicéris vai sendo quebrada, formando os ésteres lineares e o glicerol, a quantidade de glicerina combinada (triglicerídeo) diminui e a quantidade de glicerina livre (glicerol) aumenta. Portanto, a conversão da reação é medida em termos da diminuição da glicerina combinada ou da formação de glicerol.

A determinação da glicerina nas amostras de óleo e biodiesel seguiu o método do periodato de sódio de acordo com as normas NTB A-0104 e NTB A-0204, descritas por Menzel (2004). Esse método também tem sido utilizado por outros autores (Oliveira *et al.*, 2004). Durante o processo de análise, a amostra contendo glicerina (livre e/ou combinada) foi saponificada, liberando glicerina da sua forma de éster. Em seguida a glicerina foi separada da parte graxa, por extração com água acidulada. A glicerina foi dosada na parte aquosa ácida. Quando a amostra saponificada foi a amostra bruta, a glicerina dosada é a glicerina total.

O procedimento consistiu em medir cerca de 3 g da amostra (óleo e/ou biodiesel) diretamente num funil de separação tarado e seco. Adicionaram-se, em seguida, 20 mL de água destilada e 0,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1:4 v/v, agitando-se manual e vigorosamente. Feito isso, esperou-se a separação de fases, recolhendo a fase aquosa inferior em um erlenmeyer de 250 mL para dosagem da glicerina livre. Pesou-se essa fase e à metade dela adicionaram-se 50 mL de solução de periodato de sódio 5,5 g/L, 4 g de bicarbonato de sódio e 1 a 2 g de iodeto de potássio, titulando-se em seguida com solução de arsenito de sódio 0,1 N até o desaparecimento da coloração amarela. A porcentagem de glicerina livre foi calculada segundo a Equação 3.4.

A fase superior, para análise da glicerina combinada, foi transferida para um balão de fundo chato com o auxílio de 20 mL de água destilada e 5 mL de álcool etílico. Ao balão foi adicionado 3 mL de hidróxido de sódio 50% e essa mistura foi levada para aquecimento sob refluxo, até que a coloração ficasse translúcida. Esfriou-se o balão e o seu conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL completando o volume com água. Do conteúdo do balão, transferiu-se uma alíquota de 50 mL para um funil de separação de 250 mL, adicionando-se em seguida 10 mL de tolueno p.a., duas gotas de indicador de azul de bromofenol 0,1 % e 2 mL de ácido sulfúrico 1:4 v/v, agitando até que a coloração mudasse de azul para amarelo. Deixou-se separar as camadas, recolhendo a fase aquosa inferior em um erlenmeyer de 250 mL e adicionaram-se 50 mL de solução de periodado de sódio 5,5 g/L, 4 g de bicarbonato de sódio e 1 a 2 g de iodeto de potássio, titulando-se em seguida com solução de arsenito de sódio 0,1 N até a mudança da coloração azul para amarela. As porcentagens de glicerina combinada e total foram calculadas segundo as Equações 3.5 e 3.6, respectivamente.

$$GL(\%) = \frac{(V_b - V_1) \times T \times 0,1 \times M_{total}}{m \times M_{aliquota}} \quad (3.4)$$

$$GC(\%) = \frac{(V_b - V_2) \times T \times 25}{m \times A} \quad (3.5)$$

$$GT(\%) = \frac{(V_b - V_3) \times T \times 25}{m \times A} \quad (3.6)$$

sendo GL porcentagem de glicerina livre; GC é a porcentagem de glicerina combinada; GT é a porcentagem de glicerina total; m é a massa da amostra de óleo e/ou biodiesel; V_b é o volume do branco; V_1 , V_2 e V_3 são os volumes gastos nas titulações; T é o título da solução de arsenito; M_{total} é a massa total da fase aquosa utilizada na análise da glicerina livre; $M_{aliquota}$ é a metade da massa total e A corresponde aos 50 mL transferidos do balão volumétrico para o funil de separação na dosagem da glicerina combinada e total.

3.4. Caracterização Cromatográfica da Matéria-Prima

A composição química em ácidos graxos do ácido oléico e dos óleos vegetais residuais foi determinada fazendo-se a transesterificação da matéria-prima com metanol, e identificando-se quali-quantitativamente, por cromatografia gasosa, os ésteres metílicos purificados resultantes do processo.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás da marca Thermo Focus GC acoplado a um espectômetro de massa, com uma coluna adsorvedora Column Capillary RTX-5MS. As dimensões da coluna eram 15 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme líquido. O fluxo da coluna foi de 0,5 mL/min, a temperatura do detector foi de 200 °C, a temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura do forno iniciou em 50 °C, mantendo-se nessa temperatura por 2 minutos quando passou a aumentar 4 °C/min até atingir 250 °C. O gás de arraste foi gás hélio e o volume de amostra injetado foi de 1 μL .

Para realização da reação de transesterificação dos substratos, adotou-se o procedimento descrito por Silva (2005), com algumas modificações. Mediu-se 1 g de ácido oléico/óleo vegetal em um balão de fundo chato. Adicionaram-se 25 mL do reagente de saponificação, agitou-se vigorosamente e colocou-se para aquecer, sob refluxo, por 30 minutos. Depois esfriou-se o balão e adicionaram-se 25 mL do reagente de esterificação, agitando-se vigorosamente e colocado-se para aquecer, sob refluxo, por mais 30 minutos. Passado esse tempo, esfriou-se o balão e transferiu-se o seu conteúdo para um funil de separação com o auxílio de 25 mL de éter de petróleo. Observou-se a formação de 3 fases. Descartaram-se as duas fases inferiores e à fase superior adicionaram-se 20 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Dessa vez observou-se a formação de duas fases. Descartou-se a fase inferior e transferiu-se a fase superior (ésteres etílicos) para um becker com sulfato de sódio (para retirada de resquícios de água). Filtrou-se o sulfato de sódio, recolhendo a solução em outro becker. Deixou-se evaporar, a temperatura ambiente, de um dia para o outro, e só então a solução resultante foi injetada no cromatógrafo.

Reagentes:

- **Reagente de saponificação** – solução de KOH 0,5 mol/L em etanol anidro;
- **Reagente de esterificação** – 3,30 g de NH₄Cl + 100 mL de etanol anidro + 3 mL de H₂SO₄ concentrado;
- **Solução salina** – solução aquosa de NaCl 30%;
- **Éter de petróleo**

Após obtido os percentuais de ácidos graxos presentes nas amostras, a massa molar média do ácido oléico e dos óleos vegetais foi calculado de acordo com as Equações 3.7 e 3.8, respectivamente.

$$PMM_{\text{ácido}} = \left(\sum \frac{(PM_{AGi} \times W_{AGi})}{100} \right) \quad (3.7)$$

$$PMM_{\text{óleo}} = 3 \times \left(\sum \frac{(PM_{AGi} \times W_{AGi})}{100} \right) \quad (3.8)$$

sendo $PMM_{\text{ácido}}$ a massa molar média do ácido oléico; $PMM_{\text{óleo}}$ é a massa molar média do óleo vegetal; PM_{AGi} é a massa molar do ácido graxo e W_{AGi} é a porcentagem de ácido graxo presente na amostra analisada.

3.5. Alcoólise Enzimática do Ácido Oléico e dos Óleos Vegetais Residuais Utilizando Lipase como Catalisador

A matéria-prima lipídica utilizada em todos os experimentos não passou por nenhum tratamento prévio, apenas por uma simples filtração para retirada de materiais particulados quando da utilização dos óleos residuais.

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL fechados com tampa de vidro. A quantidade de ácido/óleo foi mantida fixa em 10 g em todos os experimentos, bem como a quantidade de lipase foi fixada em 5% p/p, baseada na massa de ácido/óleo medida. As quantidades de etanol foram pré-estabelecidas pelo planejamento de experimentos. O intervalo de estudo das variáveis procurou abranger a maioria dos estudos constantes na literatura referentes a reação de alcoólise enzimática de óleos vegetais.

Depois de calculada as quantidades de álcool, os erlenmeyers, contendo os substratos e o catalisador, foram colocados em um agitador rotativo, com controle digital de temperatura e agitação (incubadora TE - 420), à 200 rpm.

Decorrido o tempo de reação, também definido por um planejamento experimental fatorial, as amostras foram filtradas (para recuperação e posterior reutilização da enzima) e colocadas em um funil de separação para separação das fases (decantação da água quando da utilização do ácido oléico e do óleo de coco e decantação da glicerina quando da utilização do óleo de algodão). A fase superior, rica em ésteres etílicos, foi separada e analisada. Na Figura 3.1 está representado o fluxograma do procedimento experimental.

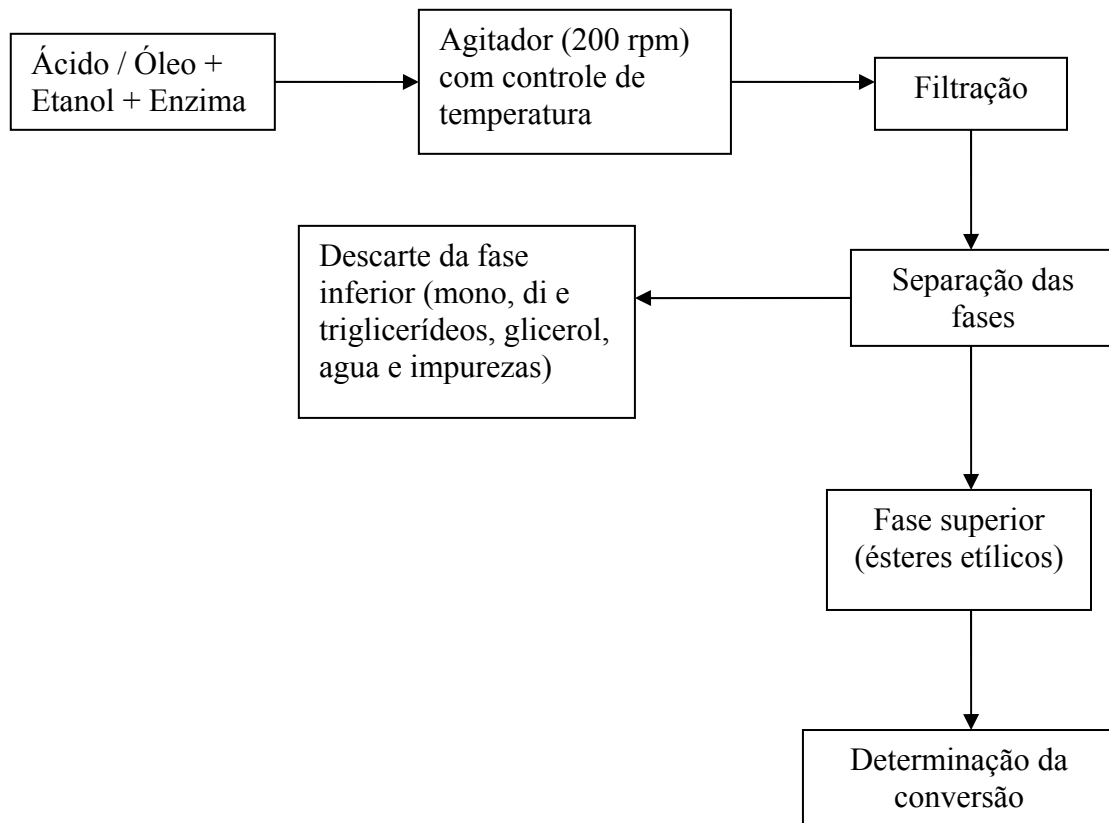


Figura 3.1 – Fluxograma do procedimento experimental para a reação de alcoólise enzimática do ácido oléico e do óleo vegetal residual

As variáveis escolhidas para serem estudadas variaram de acordo com a matéria-prima de partida. Quando da utilização do ácido oléico, estudou-se a influência da razão molar ácido:álcool, da temperatura do sistema reacional e da concentração de água, para um tempo reacional de 8 horas. Quando a matéria-prima de partida foi o óleo de algodão, as variáveis escolhidas foram a razão molar óleo:álcool, a temperatura e o tempo reacional, pois como se trata de uma reação de transesterificação, uma vez que o óleo de algodão apresentou um baixo índice de acidez, a literatura indica elevados tempos de reação. Para verificar o efeito das variáveis sobre a conversão da reação, bem como encontrar as condições que maximizassem a síntese de ésteres, um planejamento experimental fatorial com 2 níveis e 3 variáveis, foi realizado. As Tabelas 3.1 e 3.2 mostram os intervalos de estudo das variáveis. Esses intervalos foram definidos de modo a abranger a maioria dos estudos constantes na literatura.

Tabela 3.1 - Valores reais das variáveis independentes para o Planejamento Fatorial 2³ utilizado para otimizar as condições da esterificação enzimática do ácido oléico utilizando uma lipase do tipo B de *Candida antarctica* comercial como catalisador.

Variável	Intervalo de estudo
Razão molar ácido:etanol [R]	1:1-1:6
Temperatura [TR](°C)	30-50
Concentração de água [W] (% p/p)	0 - 20

Tabela 3.2 - Valores reais das variáveis independentes para o Planejamento Fatorial 2³ utilizado para otimizar as condições da etanolise enzimática do óleo de algodão residual utilizando uma lipase do tipo B de *Candida antarctica* comercial como catalisador.

Variável	Intervalo de estudo
Razão molar óleo:etanol [R]	1:3-1:9
Temperatura [TR](°C)	30-50
Tempo [TO](h)	24-72

Vale ressaltar que os experimentos foram realizados randomicamente e com triplicata do ponto central. Os dados experimentais foram analisados com o *software* Statistica 6.0.

Devido ao elevado índice de acidez do óleo de coco residual, escolheu-se a melhor condição experimental obtida com o ácido oléico para realizar uma reação com esse óleo e confirmar a viabilidade do uso de lipases nesse tipo de reação.

Os experimentos realizados com a lipase imobilizada em quitosana também ocorreram nas melhores condições obtidas tanto na alcoólise do ácido oléico quanto do óleo de coco para se verificar a potencialidade do uso deste derivado preparado com um suporte de baixo custo.

3.6. Cálculo da Conversão em Ésteres Etilícos

Quando a matéria-prima de partida foi o ácido oléico e o óleo residual ácido, a conversão foi calculada acompanhando a redução do índice de acidez de acordo com a Equação 3.9. Isso pode ser feito porque à medida que os ésteres vão sendo formados, a quantidade de ácidos graxos livres diminui e, portanto, o índice de acidez decresce. Segundo Lucena (2008), essa metodologia consegue prever bem a conversão em ésteres, obtendo-se valores bem próximos quando comparados aos dados obtidos com a cromatografia gasosa.

$$X(\%) = \left(\frac{IA_0 - IA_F}{IA_0} \right) \times 100 \quad (3.9)$$

sendo IA_0 o índice de acidez do ácido/óleo e IA_F é o índice de acidez do biodiesel.

Entretanto, quando a matéria-prima de partida foi o óleo de algodão residual, cujo índice de acidez estava dentro do limite necessário para se realizar uma transesterificação alcalina, a conversão foi calculada acompanhando a redução da glicerina combinada pelo método do periodato de sódio na determinação da glicerina, descrito no item 3.3.5 (Oliveira *et al.*, 2004).

$$X(\%) = \left(\frac{GLR}{GO} \right) \times 100 \quad (3.10)$$

sendo GLR a glicerina liberada durante a reação e GO é a glicerina combinada do óleo antes da reação.

3.7. Recuperação e Regeneração do Biocatalisador

Após a reação, o biocatalisador foi filtrado a vácuo, recolhendo-se o biodiesel num Kitassato e a lipase retida em um funil de porcelana com papel de filtro. O biocatalisador foi então lavado três vezes com hexano p.a. e secado a vácuo, sendo reutilizado em seguida para verificar a perda de atividade na reação de alcoólise do material lipídico.

3.8. Neutralização dos Ésteres Etilícos Obtidos

Depois de obtidos os ésteres etílicos com a catálise enzimática, observou-se que o índice de acidez não estava dentro do limite estabelecido pela Agência Nacional de Petróleo (ANP). Na tentativa de deixar a mistura de ésteres dentro da especificação no que se refere ao índice de acidez, fez-se uma neutralização com uma amostra de glicerina resultante do processo de transesterificação alcalina. Para tanto, segundo Souza (2008), dividiu-se o índice de acidez do biodiesel por 50,6 para obter o valor em meq/g. A esse resultado acrescentou-se 15% e o valor final correspondeu a 1 g de biodiesel. Partindo-se da quantidade de biodiesel que se queria neutralizar, por uma regra de três simples calculou-se a quantidade de biodiesel a ser neutralizada em meq/g. Em seguida, calculou-se a alcalinidade livre da fase glicerina, em meq/g, e esse valor corresponde a 1 g de glicerina. Como já se sabe a quantidade de biodiesel, em meq/g, que se quer neutralizar, por uma regra de três simples calculou-se a quantidade, em gramas, de glicerina correspondente a quantidade de biodiesel a ser neutralizada. Misturou-se, então, o biodiesel com a glicerina, deixando sob agitação e aquecimento até atingir a temperatura 120° C, permanecendo nessa temperatura por 30 minutos. Em seguida, colocou-se a mistura para decantação da glicerina, analisando a acidez da fase superior que corresponde aos ésteres neutralizados.

Para análise da alcalinidade livre da fase glicerina, mediu-se cerca de 2 g da amostra e misturou-se com 25 mL de álcool etílico neutralizado com hidróxido de sódio 0,25 N, utilizando uma solução de fenolftaleína 1% em álcool como indicador. Em seguida, titulou-se

a mistura com ácido clorídrico 0,1 N e calculou-se a alcalinidade livre de acordo com a equação a seguir.

$$AL(\text{meqKOH} / \text{g}) = \frac{(V_B - V_1) \times F \times N}{M} \quad 3.11)$$

onde AL é a alcalinidade livre; V_1 é o volume gasto de HCl na titulação; V_B é o volume gasto com o branco; F é o fator da solução de HCl (sempre próximo de 1); N é a normalidade da solução de HCl (mol/L) e M é a massa da amostra utilizada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo apresenta os resultados obtidos na caracterização e na reação de alcoólise enzimática dos três substratos descritos no capítulo de materiais e métodos, bem como as caracterizações dos ésteres etílicos obtidos após a reação. Mostra também as discussões desses resultados na tentativa de explicá-los.

Para um melhor entendimento, o capítulo foi dividido em 9 tópicos, iniciando pela caracterização físico-química e cromatográfica da matéria-prima, que objetivou um melhor conhecimento do material com o qual se trabalhou e um melhor entendimento de alguns resultados. Depois, mostra-se o resultado da reação de alcoólise enzimática do ácido oléico utilizando a Novozym 435 como catalisador, analisando a influência da temperatura, da razão molar entre os substratos e da concentração de água presente no meio. Em seguida, tem-se o resultado da mesma reação agora utilizando uma lipase do tipo B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em quitosana, para verificar a potencialidade do uso de um derivado produzido pelo Grupo de Pesquisas em Processos Biotecnológicos (GPBIO) do Departamento de Engenharia Química da UFC. Como o propósito dessa dissertação é verificar a viabilidade do uso de lipase na esterificação de óleos residuais, o tópico seguinte mostra o resultado da etanólise do óleo de coco residual ácido e o estudo de ciclos das duas lipases. Para comparar o comportamento da lipase em dois meios distintos, o último tópico apresenta o resultado do planejamento experimental fatorial realizado com um óleo residual de baixa acidez livre. Por fim, o último tópico desse capítulo mostra a caracterização físico-química dos ésteres etílicos obtidos.

4.1. Caracterização Físico-Química da Matéria-Prima

A Tabela 4.1 mostra o resultado da caracterização físico-química das matérias-primas lipídicas utilizadas neste trabalho.

Como pode ser observado na Tabela 4.1, o ácido oléico e o óleo de coco residual possuem um elevado índice de acidez, o que inviabiliza o seu uso em reações de alcoólise com catalisador básico. Entretanto, o óleo de algodão apresentou um baixo índice de acidez.

Tabela 4.1- Caracterização físico-química das matérias-primas lipídicas utilizadas nas reações de alcoólise enzimática.

PROPRIEDADES	Ácido oléico	Óleo de coco residual	Óleo de algodão residual
Índice de acidez (mg KOH/g)	191,62	195,08	1,79
Densidade a 20 °C (Kg/cm ³)	893,4	917,36	918,74
Índice de iodo (g/100g)	92,50	7,21	105,08
Teor de umidade (%)	0,07	0,25	0,07
Glicerina livre (%)	ND	0,03	0,068
Glicerina total (%)	ND	3,17	8,408

Observa-se também que o ácido oléico e o óleo de algodão residual apresentaram um elevado índice de iodo, indicando a forte presença de compostos insaturados (ácido palmitoléico, ácido linoléico e ácido oléico), que é confirmada pela análise cromatográfica, descrita no tópico 4.2. A presença de insaturações não é recomendada porque ligações duplas e triplas são extremamente reativas e fazem tanto o óleo quanto o biodiesel resultante apresentarem uma baixa resistência à oxidação e uma maior tendência em formar depósitos de “goma” nos motores (Araújo *et al*, 2007; Lucena, 2008). Já o óleo de coco residual apresentou um índice de iodo bem menor, o que sugere a baixa presença de compostos insaturados, confirmada também pela análise cromatográfica.

4.2. Caracterização Cromatográfica da Matéria-Prima

Nas Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4 estão listados os percentuais de ácidos graxos obtidos por cromatografia gasosa para o ácido oléico e para os óleos vegetais residuais.

Com base na composição química (Tabela 4.2), a massa molar média do ácido oléico é 282,47 g/mol.

Tabela 4.2 - Percentuais de ácidos graxos para o ácido oléico.

Ácido Graxo	Composição (%)
Ácido mirístico (C14:0)	0,850
Ácido palmitoleico (C16:1)	2,020
Ácido palmítico (C16:0)	2,550
Ácido oléico cis (C18:1)	94,40

A Figura 4.1 mostra o cromatograma do ácido oléico. Observa-se um pico bem definido para o ácido oléico, com tempo de retenção de 12,2 minutos. Entretanto, outros picos foram detectados, registrando a presença de outros ácidos graxos, em menor quantidade, indicando que a acidez constante na Tabela 4.1 não é referente apenas ao ácido oléico.

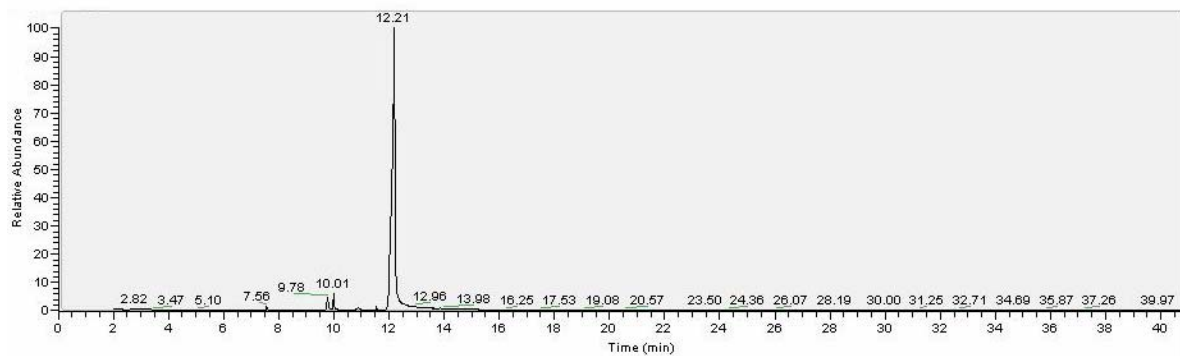


Figura 4.1- Cromatograma do ácido oléico.

Tabela 4.3 - Percentuais de ácidos graxos para o óleo de coco residual.

Ácido Graxo	Composição (%)
Ácido caprílico (C8:0)	2,640
Ácido cáprico (C10:0)	3,740
Ácido láurico (C12:0)	51,62
Ácido mirístico (C14:0)	22,40
Ácido palmítico (C16:0)	10,04
Ácido linoleico (C18:2)	0,510
Ácido oléico cis (C18:1)	0,650
Ácido oléico trans (C18:1)	5,500
Ácido esteárico (C18:0)	2,870

Com base na composição química e considerando que o óleo de coco residual, devido ao elevado índice de acidez, é constituído majoritariamente por ácidos graxos livres e não por triglicerídeos, a massa molar média desse óleo é 217,60 g/mol.

A Figura 4.2 mostra o cromatograma do óleo de coco residual com os picos mais representativos e os seus respectivos tempos de retenção. O pico mais intenso, cujo tempo de retenção é 21,32 minutos, refere-se ao ácido láurico (ácido dodecanóico), presente em maior quantidade na amostra de óleo.

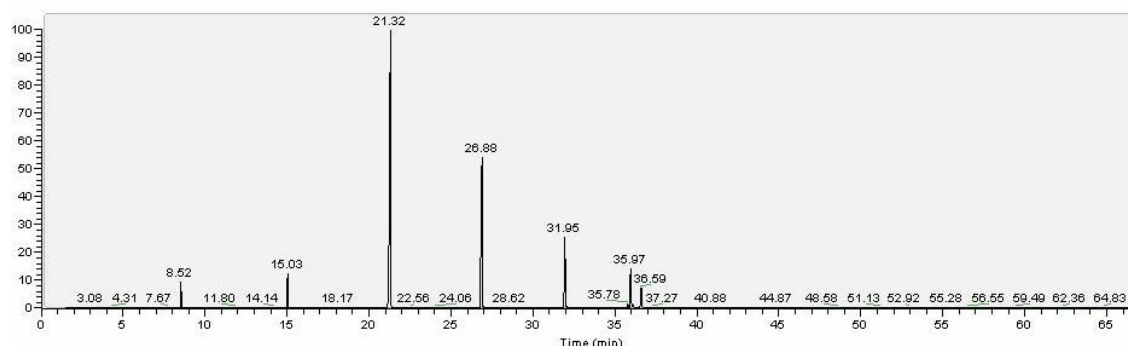
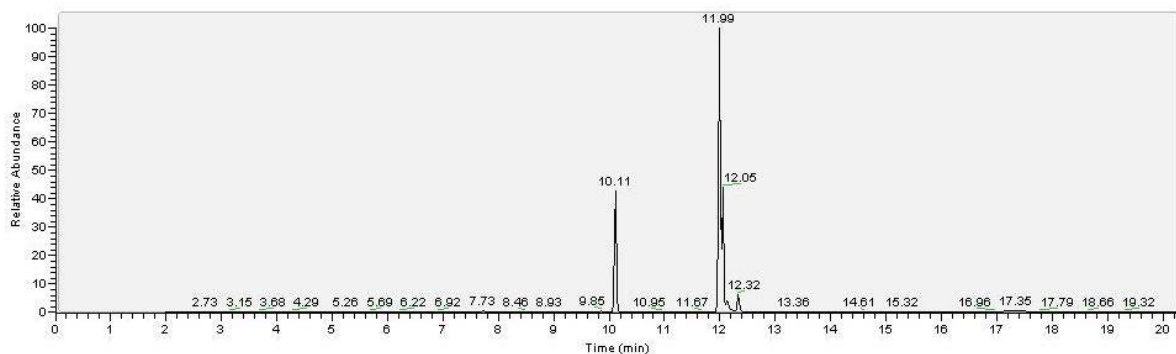
**Figura 4.2** - Cromatograma do óleo de coco residual.

Tabela 4.4 - Percentuais de ácidos graxos para o óleo de algodão residual.

Ácido Graxo	Composição (%)
Ácido mirístico (C14:0)	0,48
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,22
Ácido palmítico (C16:0)	21,40
Ácido linoleico (C18:2)	47,45
Ácido oléico cis (C18:1)	22,81
Ácido oléico trans (C18:1)	4,66
Ácido esteárico (C18:0)	2,98

Com base na Tabela 4.4, a massa molar média do óleo de algodão residual é 827,01 g/mol.

A Figura 4.3 mostra o cromatograma do óleo de algodão residual com os picos mais representativos e os seus respectivos tempos de retenção. O pico mais intenso, cujo tempo de retenção é 11,99 minutos, refere-se ao ácido linoléico, presente em maior quantidade na amostra de óleo.

**Figura 4.3** - Cromatograma do óleo de algodão residual.

4.3. Alcoólise Enzimática do Ácido Oléico Utilizando Lipase Comercial de *Candida Antarctica* Tipo B (Novozym 435) como Catalisador

Os resultados obtidos no planejamento experimental fatorial para a esterificação enzimática do ácido oléico comercial utilizando lipase comercial como catalisador são apresentados na Tabela 4.5. O tempo de reação foi mantido fixo em oito horas para todos os experimentos, uma vez que, em ensaios preliminares, observaram-se maiores conversões em ésteres nesse tempo, o que foi confirmado posteriormente ao se estudar a cinética de reação (subtópicos 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3).

Baseado nesses valores, o erro experimental foi de, aproximadamente 0,68 %, mostrando uma boa reprodutibilidade dos experimentos. Observando a Tabela 4.5, pode-se ver que a maior conversão de biodiesel foi de 88,36 % nas condições de menor temperatura (30 °C), maior razão molar ácido:álcool (1:6) e menor concentração de água (W = 0%). Entretanto, como será explicado posteriormente, a temperatura e a concentração de água adicionada ao meio reacional tiveram um efeito não significativo e negativo, respectivamente, na conversão em ésteres e, apesar do efeito positivo da razão molar, não foi necessário um excesso estequiométrico para obter conversões razoáveis.

Tabela 4.5 – Resultados do Planejamento Fatorial 2^3 com triplicata do ponto central tendo como variável resposta a conversão obtida após 8 horas de esterificação enzimática do ácido oléico utilizando uma lipase comercial de *Candida antarctica* tipo B (Novozym 435).

Experimento	Razão molar R	Temperatura T (°C)	Concentração	
			de água W (% p/p)	Conversão (%)
1	1 : 1	30	0	87,31 ± 0,68
2	1 : 6	30	0	88,36 ± 0,68
3	1 : 1	30	20	78,30 ± 0,68
4	1 : 6	30	20	86,80 ± 0,68
5	1 : 1	50	0	86,34 ± 0,68
6	1 : 6	50	0	87,90 ± 0,68
7	1 : 1	50	20	75,30 ± 0,68
8	1 : 6	50	20	82,70 ± 0,68
9 (c)	1 : 3,5	40	10	86,95 ± 0,68
10 (c)	1 : 3,5	40	10	85,04 ± 0,68
11(c)	1 : 3,5	40	10	85,73 ± 0,68

A partir dos dados da Tabela 4.5, fez-se a análise estatística utilizando o *software* Statistica 6.0. Através do Diagrama de Pareto, mostrado na Figura 4.4, pode-se observar que a variável concentração de água e razão molar entre os reagentes cruzam a linha de nível de significância de 95 %. Portanto, a razão molar ácido:álcool e a concentração de água tiveram efeito estatisticamente significativo na conversão em ésteres, dentro do intervalo estudado para cada variável.

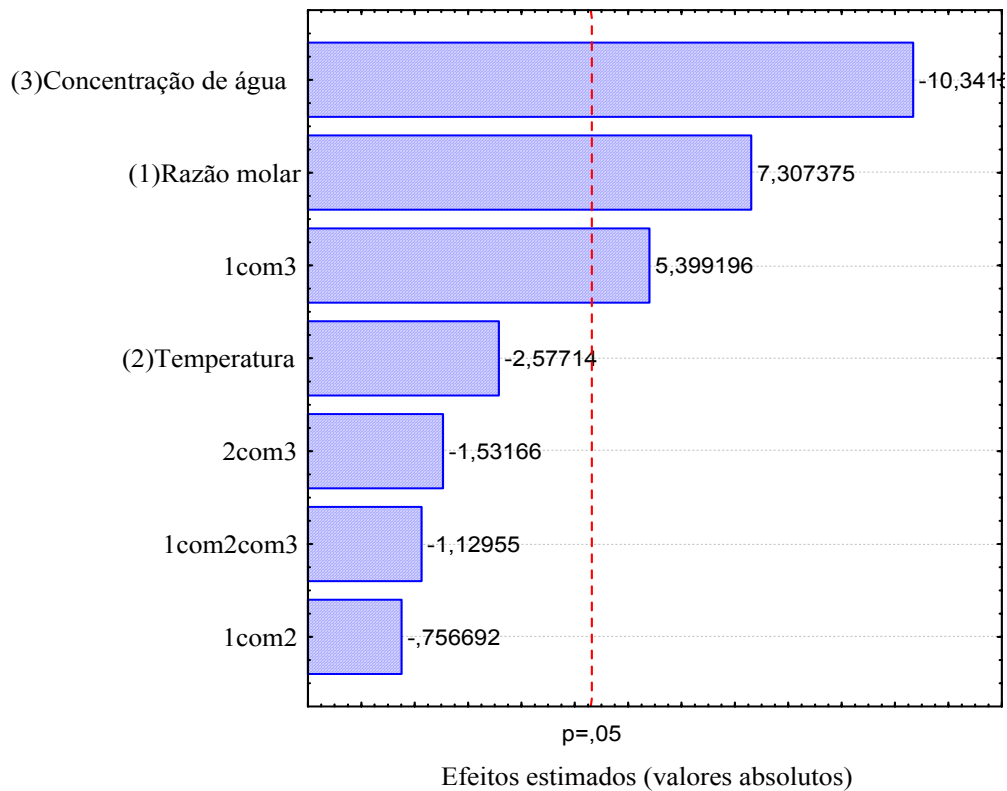


Figura 4.4 – Diagrama de Pareto indicando o efeito dos valores estimados para as variáveis estudadas no planejamento experimental 2^3 com triplicata do ponto central da esterificação enzimática do ácido oléico.

A Tabela 4.6 mostra a estimativa dos efeitos do planejamento experimental realizado. Pode-se observar que os valores de p obtidos para os fatores analisados são menores que 0,05, exceto para a temperatura e para as interações entre a temperatura e a razão molar entre os reagentes, entre temperatura e concentração de água e para interação entre as três variáveis. Logo, confirma-se que o único parâmetro sem efeito significativo dentro das faixas experimentais estudadas foi a temperatura.

Tabela 4.6 – Estimativa dos efeitos principais e suas interações na conversão do ácido oléico a ésteres etílicos.

Fatores	Efeitos	Desvio padrão	p
Média	84,47727	0,291615	0,000012
TR (°C)	-1,76250	0,683898	0,123323
R	4,99750	0,683898	0,018217
W (%)	-7,07250	0,683898	0,009221
TR * R	-0,51750	0,683898	0,528226
TR*W	-1,04750	0,683898	0,265286
R*W	3,69250	0,683898	0,032634
TR*R*W	-0,77250	0,683898	0,375917

TR – Temperatura; R – Razão molar entre reagentes; W – Concentração de água

Uma outra observação importante que se pode fazer da Tabela 4.6 é que a concentração de água apresentou um menor efeito, indicando ser ela a variável mais significativa no processo. Além disso, o efeito dessa variável foi negativo, o que já era esperado uma vez que o excesso de água favorece a reação de hidrólise do éster, diminuindo a conversão no equilíbrio.

Sendo assim, a partir da análise da regressão linear dos resultados obtidos, foi possível obter um modelo polinomial para descrever a conversão em éster etílico, dentro dos intervalos das variáveis estudadas. A Equação 4.1 mostra o modelo de primeira ordem para as variáveis, considerando todos os coeficientes de regressão.

$$\begin{aligned}
 \text{Conversão}(\%) = & \underset{\pm 3,4257}{89,2440} - \underset{\pm 0,0832}{(0,0536 \times TR)} + \underset{\pm 0,7975}{(0,0570 \times R)} - \underset{\pm 0,2425}{(0,6189 \times W)} \\
 & + \underset{\pm 0,0193}{(0,0051 \times TR \times R)} + \underset{\pm 0,0058}{(0,00017 \pm TR \times W)} + \underset{0,0563}{(0,13565 \times R \times W)} - \underset{\pm 0,0013}{(0,00155 \times TR \times R \times W)}
 \end{aligned} \quad (4.1)$$

sendo TR a temperatura de reação, R a razão molar entre os reagentes e W a concentração de água adicionada a mistura reacional.

A Tabela 4.7 mostra a análise da variância (ANOVA) para a variável resposta (conversão) da reação de alcoólise enzimática do ácido oléico utilizando lipase Novozym 435 como catalisador.

Tabela 4.7 – Anova para a reação de alcoólise enzimática do ácido oléico utilizando Novozym 435 como catalisador.

Fonte de Variação	Soma Quadrática SQ	Graus de Liberdade d.f.	Média Quadrática MQ	F
Regressão	195,82	8	24,47	26,16
Erro	1,8709	2	0,9354	
Total SS	197,69	10		

$$R^2 = 0,9479; F_{8;2;0,05}=19,37$$

A partir da Tabela 4.7 observa-se que o coeficiente de determinação (R^2), obtido pela regressão é 0,94. Por essa mesma Tabela 4.7, pode-se realizar o teste F para confirmar o ajuste do modelo obtido. Segundo Rodrigues (2005), para que os parâmetros do modelo tenham significância estatística, o valor de F da regressão deve ser maior que o valor de F tabelado. Comparando o valor de F da regressão com o tabelado ($F_{\text{tabelado}}=19,37$), verifica-se uma regressão significativa. Portanto, os dados experimentais são bem representados pelo modelo ajustado, ou seja, o modelo obtido para as variáveis significativas pode ser utilizado para prever a conversão em éster, dentro do intervalo estudado. Essa conclusão também é confirmada pela Figura 4.5, que apresenta a comparação entre os valores observados experimentalmente e aqueles preditos pelo modelo ajustado. Observa-se, pela análise dessa Figura 4.5, pouca dispersão dos pontos que estão próximos a reta representativa, o que comprova o bom ajuste do modelo.

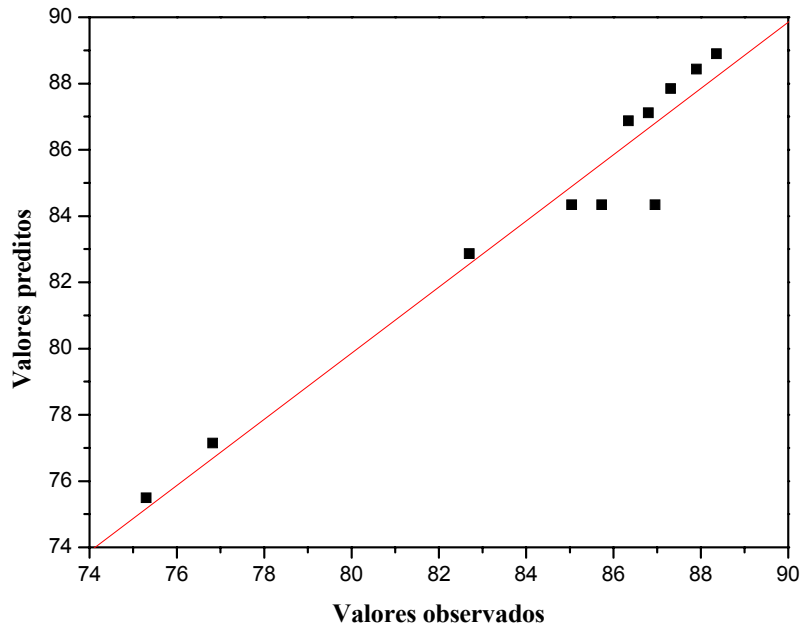


Figura 4.5 – Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais da conversão em ésteres etílicos obtidos pelo planejamento experimental 2^3 com triplicata do ponto central da esterificação enzimática do ácido oléico.

A Figura 4.6 representa a superfície de resposta para a conversão em ésteres em função da razão molar e da concentração de água adicionada ao meio. Por ela, observa-se que o aumento da concentração de água diminui a conversão enquanto o aumento da concentração de álcool a favorece. Entretanto, o ganho de conversão com o aumento da proporção entre os reagentes é muito pouco, o que indica a não necessidade de um excesso estequiométrico.

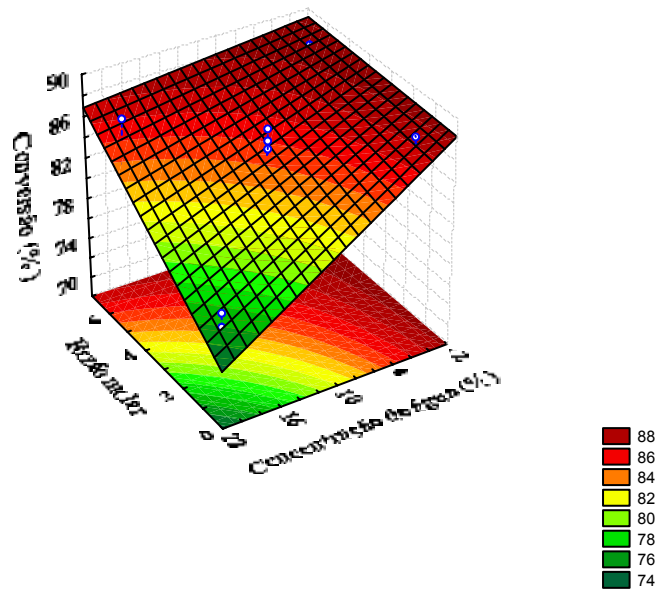


Figura 4.6 – Superfície de resposta representando a conversão em função da razão molar entre os reagentes e concentração de água adicionada ao meio.

Os tópicos seguintes apresentam uma discussão individualizada dos efeitos das variáveis estudadas.

4.3.1. Efeito da Temperatura (TR)

As Figuras 4.7 e 4.8 mostram a influência da temperatura na cinética da reação de esterificação do ácido oléico com etanol utilizando lipase Novozyme 435 como catalisador.

A literatura indica que a temperatura ótima da lipase é abaixo de 70 °C (Faccio, 2004). Segundo Gao *et al* (2006), ao estudarem a imobilização de lipase em resina macroporosa e sua aplicação na síntese de biodiesel em meios quase anidros, concluíram que a temperatura ótima de reação de uma lipase imobilizada foi 40 °C. Acima desse valor a taxa de conversão de biodiesel diminui rapidamente até a provável desativação da enzima.

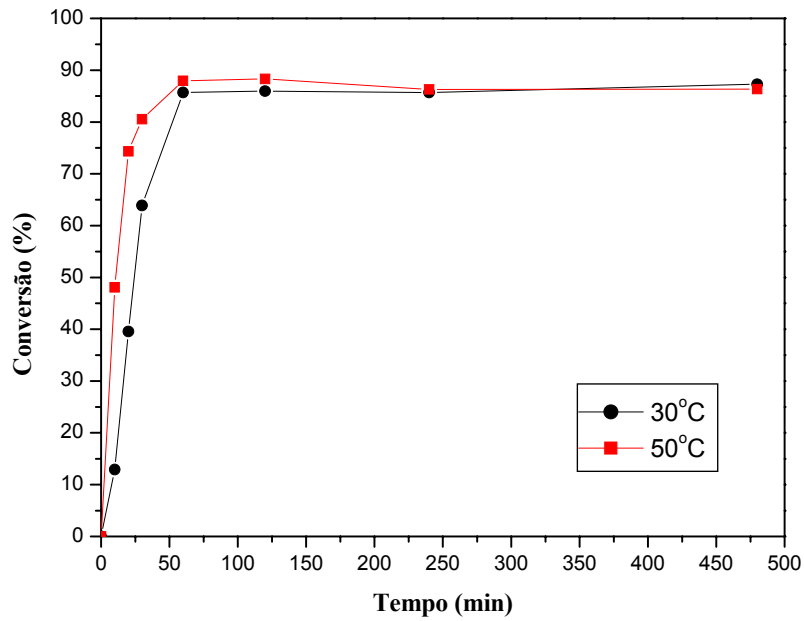


Figura 4.7- Influência da temperatura na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na razão molar 1:1 e concentração de água W=0%.

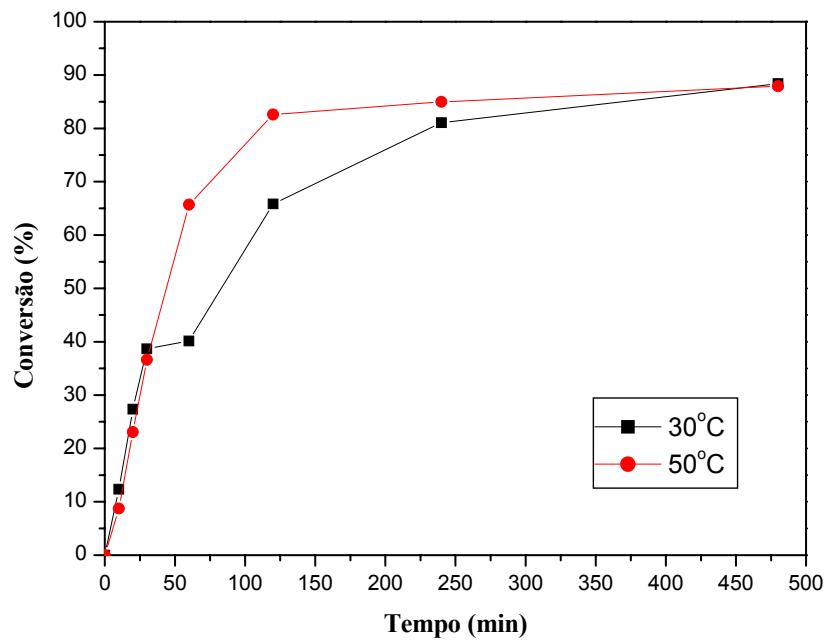


Figura 4.8- Influência da temperatura na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na razão molar 1:6 e concentração de água W=0%.

Neste trabalho, a temperatura não influenciou a conversão, dentro do intervalo estudado, o que pode ser observado nas Figuras 4.7 e 4.8, que mostram a cinética da reação na menor concentração de água ($W = 0\%$) e nas razões molares 1:1 e 1:6, respectivamente. Por elas percebe-se que, apesar de um ligeiro favorecimento da conversão nos primeiros minutos de reação com o aumento da temperatura, a conversão no equilíbrio é muito similar para ambas as temperaturas, e a velocidade de reação, especialmente quando se usa razão molar ácido:álcool 1:1, é praticamente a mesma, atingindo o equilíbrio quase ao mesmo tempo. Pela Figura 4.7 observa-se que para ambas as temperaturas uma conversão acima de 80% é atingida com 60 minutos de reação. Já pela Figura 4.8, uma conversão acima de 80% é conseguida com a temperatura de 50°C somente após 120 minutos de reação. Portanto, não é necessário um auto gasto energético com o aumento da temperatura, uma vez que é possível obter uma boa conversão numa temperatura próxima a ambiente (30°C) e a uma velocidade praticamente igual a da temperatura de 50°C.

4.3.2. Efeito da Razão Molar Ácido:Álcool (R)

As Figuras 4.9 e 4.10 mostram o efeito da razão molar na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozyme 435 como catalisador.

Apesar do efeito positivo apresentado pela variável razão molar ácido:álcool, observa-se pelas Figuras 4.9 e 4.10 que nos primeiros minutos de reação o aumento de R torna a reação mais lenta e embora as conversões no equilíbrio sejam maiores na condição de maior razão molar, os valores são muito próximos, indicando a não necessidade de um excesso estequiométrico, tornando o processo enzimático, nesse aspecto, mais vantajoso do que a catálise química convencional.

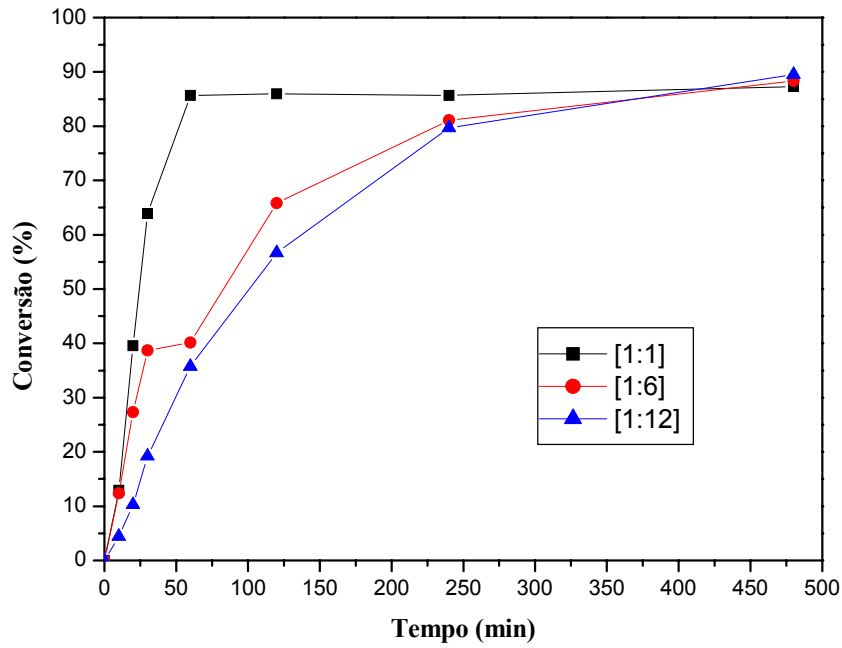


Figura 4.9- Influência da razão molar ácido:álcool na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na temperatura de 30 °C e na menor concentração de água (W = 0%).

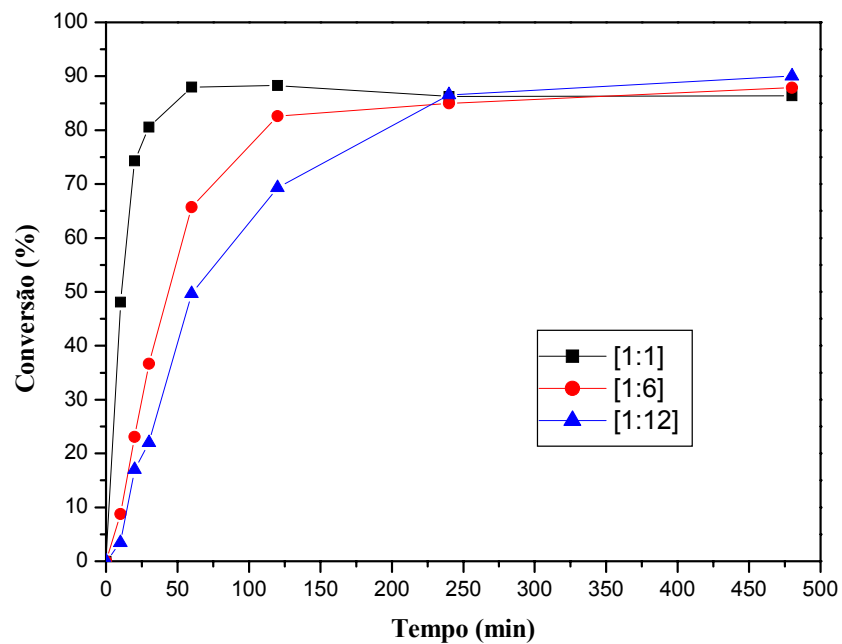


Figura 4.10- Influência da razão molar ácido:álcool na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na temperatura de 50 °C e na menor concentração de água (W = 0%).

Esses resultados estão de acordo com o que vem sendo reportado na literatura. Trubiano *et al* (2007), ao estudarem a influência das condições operacionais e das limitações

da transferência de massa externa na síntese de ésteres de ácidos graxos utilizando uma lipase de *Candida antarctica*, verificaram o mesmo efeito para a razão molar. Esses autores estudaram várias razões molares e verificaram que a medida que a quantidade de álcool aumentava, a conversão em ésteres progredia mais lentamente e a conversão no equilíbrio aumentava. Nesse estudo eles verificaram a existência de uma razão molar máxima na qual acima desse valor a taxa inicial de reação começava a diminuir, o que sugere a existência de uma razão molar ótima.

Wang *et al* (2007), ao estudarem a produção enzimática de biodiesel a partir de óleos residuais ácidos, também observaram que uma quantidade excessiva de álcool diminui a velocidade inicial de reação e tem um efeito negativo na lipase. Em comum acordo com vários autores, esse comportamento da lipase frente ao excesso estequiométrico de álcool pode ser explicado por efeitos inibitórios, uma vez que, devido a elevada polaridade de álcoois de cadeia curta como o etanol, por exemplo, ao entrar em contato com a enzima o álcool pode ficar adsorvido no suporte no qual a enzima foi imobilizada, formando uma camada limite aquosa em torno do biocatalisador, deixando o sítio ativo da enzima inacessível.

4.3.3. Efeito da Concentração de Água (W)

De acordo com a Figura 4.4, o aumento da concentração de água no meio reacional teve um efeito negativo na conversão em ésteres dentro do intervalo estudado, ou seja, no equilíbrio, à medida que a quantidade de água aumentou a conversão de biodiesel diminuiu. Esse efeito também é observado claramente na Figura 4.11, que mostra a cinética da reação de esterificação do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na temperatura de 30 °C e na razão molar ácido:álcool de 1:1.

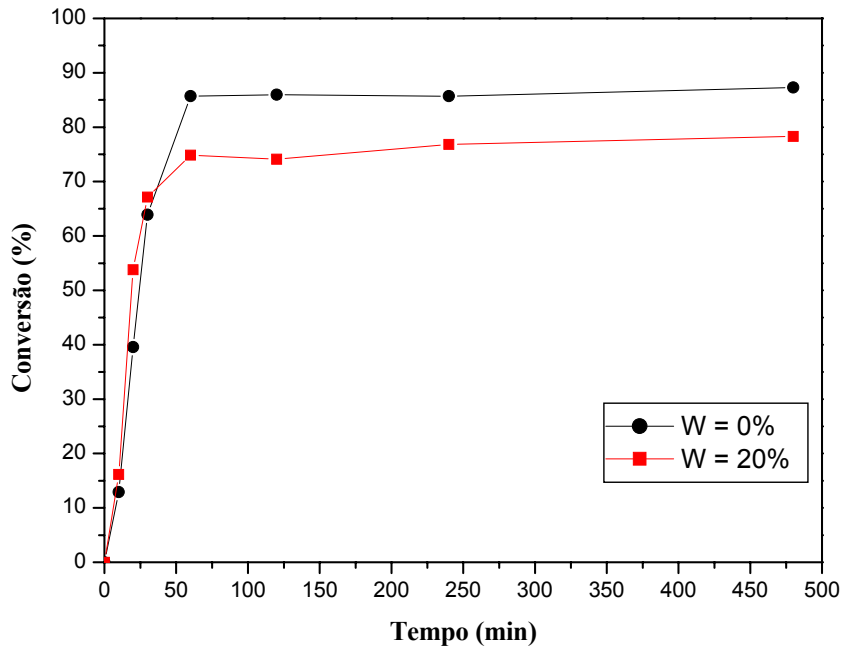


Figura 4.11- Influência da concentração de água na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na temperatura de 30 °C e na menor razão molar ($R = 1:1$)

Sabe-se que as lipases necessitam de uma certa quantidade de água para manter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando a enzima está covalentemente ligada a um suporte, uma vez que a água interage com os grupos hidrofílicos localizados na superfície da enzima levando a conformação aberta da lipase. Entretanto, existe uma concentração mínima de água em meios quase anidros na qual acima desse valor a taxa de conversão decresce significativamente, facilitando a hidrólise do éster (Gao *et al*, 2006; Trubiano *et al*, 2007; Yahya, *et al*, 1998).

De acordo com os resultados obtidos por Foresti *et al* (2007), em reações de esterificação e hidrólise, a quantidade de água afeta a conversão de equilíbrio assim como a distribuição dos produtos no meio. Particularmente para esterificações, à medida que a concentração de água aumenta, a conversão no equilíbrio diminui, o que pode ser resultado da água agindo como substrato na reação inversa de hidrólise.

Entretanto, observando a Figura 4.11, percebe-se um ligeiro favorecimento da conversão, nos primeiros minutos de reação, com o aumento da concentração de água presente no meio. Esse comportamento também foi observado por Foresti *et al* (2007) e por Foresti *et al* (2008), que explicaram que a adição de elevadas quantidades de água à mistura de substratos promoveu a formação de duas fases líquidas, aumentando significativamente o

rendimento em ésteres etílicos em condições distantes do equilíbrio. Isso acontece porque o sistema líquido bifásico formado logo no início da reação com a adição da água faz com que a água produzida pela reação de esterificação seja extraída para fase aquosa, tornando a fase orgânica rica em éster, pois devido a sua alta hidrofobicidade, eles permanecem nessa fase. No caso de reações feitas em sistemas com $W = 0\%$, as baixas conversões medidas no início da reação foram consequência de ambas hidratação insuficiente do biocatalisador e um contínuo aumento da quantidade de água dentro da fase reagente. No início, toda a água produzida permanece em uma única fase, favorecendo a hidrólise do éster, mas a medida que a quantidade de água aumenta, ocorre uma ruptura de fase, fazendo com que toda a água acumulada migre para a fase aquosa, reduzindo a taxa de reação inversa e favorecendo a síntese de éster. Por isso a conversão no equilíbrio na condição de menor quantidade de água foi maior.

Portanto, o ponto chave para explicar o aumento da taxa inicial de conversão com a elevação da quantidade de água é a formação de um sistema líquido bifásico logo no início. Se a água adicionada ao sistema reacional for alta o suficiente para a formação de duas fases líquidas, a conversão medida nos primeiros minutos de reação aumenta, pois o sistema bifásico promove a migração da água formada durante a reação da fase orgânica para a fase aquosa, tornando a fase orgânica rica em éster.

A Figura 4.12 mostra a influência do aumento da quantidade de álcool na maior concentração de água. Por ela percebe-se que quando se aumenta a quantidade de água juntamente com a quantidade de álcool, a conversão no equilíbrio é maior.

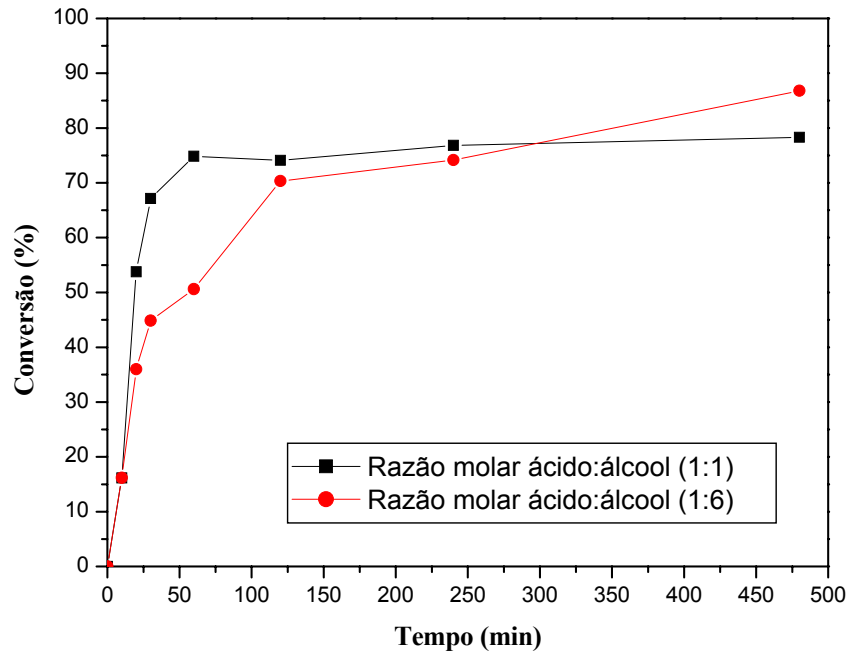


Figura 4.12- Influência do aumento da concentração de álcool com o aumento da concentração de água na esterificação enzimática do ácido oléico com etanol utilizando Novozym 435 como catalisador na temperatura de 30 °C.

O fato do aumento da quantidade de água ser menos prejudicial à reação de esterificação com o aumento da quantidade de álcool pode ser explicado pelo fato de que na proporção estequiométrica a água presente no meio é mais significativa do que a concentração de álcool, favorecendo a reação inversa de hidrólise do éster. Já com um excesso de álcool presente no meio, a água fica solubilizada com o álcool e por isso, além da conversão no equilíbrio ser maior, a velocidade de reação é menor, pois não há a formação do sistema bifásico logo no início. Entretanto, é importante salientar que o aumento na concentração de álcool e água não permitiu uma melhora na conversão, já que a maior conversão no equilíbrio (87 %) foi obtida na condição de menor concentração de água e menor razão molar entre substratos.

4.4. Alcoólise Enzimática do Ácido Oléico Utilizando Lipase de *Candida antarctica* Tipo B Imobilizada em Quitosana como Catalisador

A Figura 4.13 mostra a comparação dos resultados obtidos na reação de esterificação do ácido oléico com etanol utilizando o derivado de quitosana e a Novozym 435, como catalisador. De acordo com esta Figura, observa-se que a conversão no equilíbrio é praticamente a mesma. Entretanto, a velocidade de reação no início é menor quando se utilizou o derivado de quitosana como catalisador.

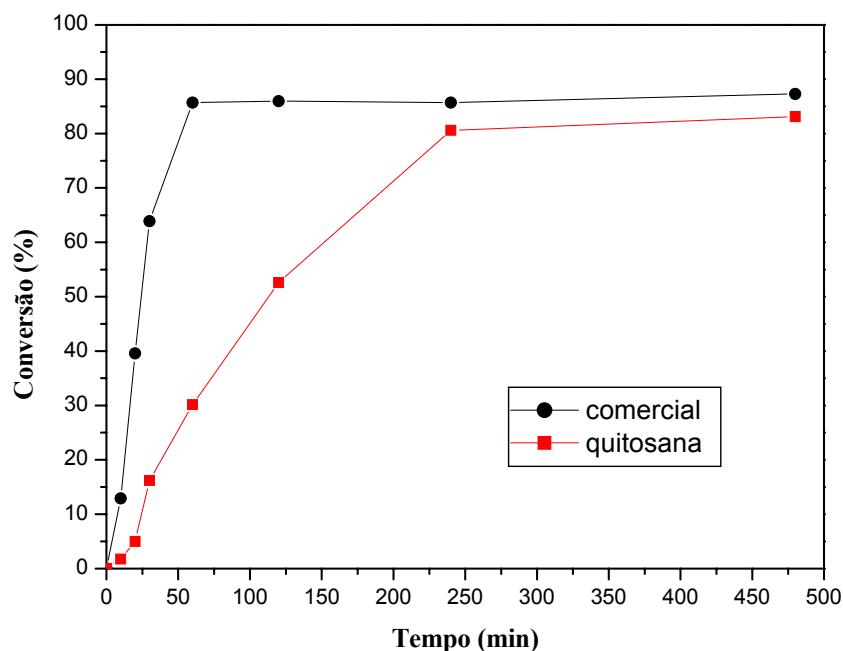


Figura 4.13 - Comparação do comportamento da Lipase de *Candida Antarctica* Tipo B Imobilizada em Quitosana com a Novozym 435 na etanolíse do ácido oléico na temperatura de 30 °C, razão molar ácido:álcool 1:1 e sem adição de água.

Esta observação pode ser explicada por dois motivos. Primeiramente, a quantidade de enzima imobilizada por grama de suporte para o derivado de quitosana é menor do que para a Novozym 435, ou seja, a carga do derivado de quitosana é menor, tornando a velocidade de reação mais lenta. Uma outra explicação possível é o problema difusional causado pela ativação do derivado com glutaraldeído. Segundo Foresti *et al* (2007), as baixas conversões

obtidas com os derivados tratados com glutaraldeído podem ser explicadas pelo fato do acesso ao sítio ativo da lipase ter ficado bloqueado pela ligação química estabelecida entre a lipase e a quitosana ativada durante o processo de imobilização, que pode ter envolvido aminoácidos do sítio ativo, provocando restrições estéricas, ou mudanças conformacionais impróprias, levando a uma redução da atividade enzimática.

4.5. Alcoólise Enzimática do Óleo de Coco Residual Utilizando Novozym 435 como Catalisador

A Figura 4.14 mostra uma comparação do comportamento da Novozym 435 na reação de esterificação do ácido oléico e do óleo de coco residual ácido.

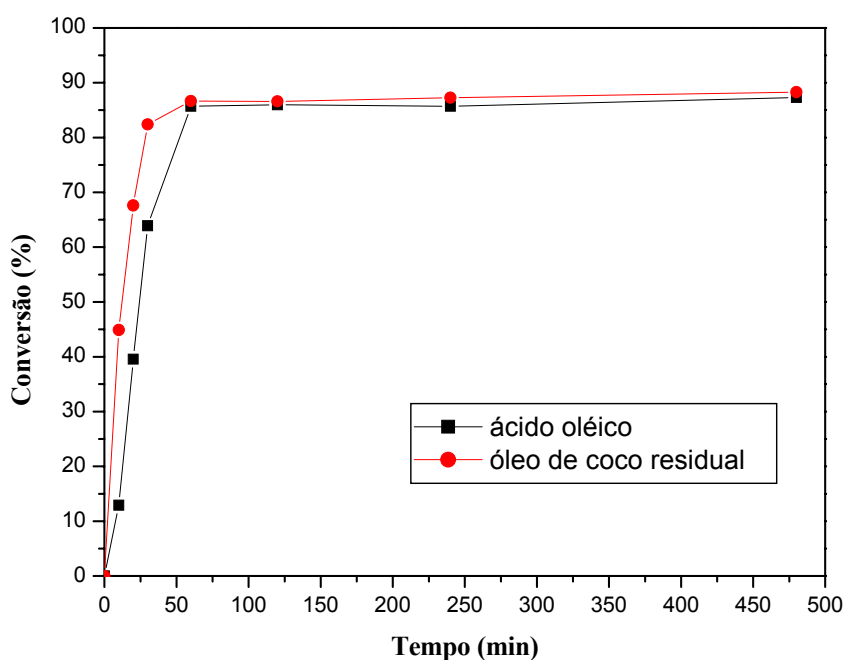


Figura 4.14- Comparação do comportamento da Novozym 435 na reação de etanolise do ácido oléico com a etanolise do óleo de coco residual na temperatura de 30 °C, razão molar ácido:álcool 1:1 e sem adição de água.

Essa comparação foi realizada para observar se o óleo residual não desnaturava a enzima, e como se pode observar pela Figura 4.14, a Novozym 435 comportou-se de maneira

semelhante na reação de esterificação do óleo de coco residual com etanol, provando a potencialidade do uso dessa lipase para obtenção de ésteres a partir de matérias-primas ácidas.

4.6.Ciclos de Atividade

A Figura 4.15 mostra as conversões obtidas após 11 reações de etanólise do óleo de coco residual utilizando a mesma amostra de enzima, tanto para a Novozym 435 como para o derivado de quitosana. Ambas as lipases foram apenas lavadas com hexano e secadas a vácuo antes da reutilização.

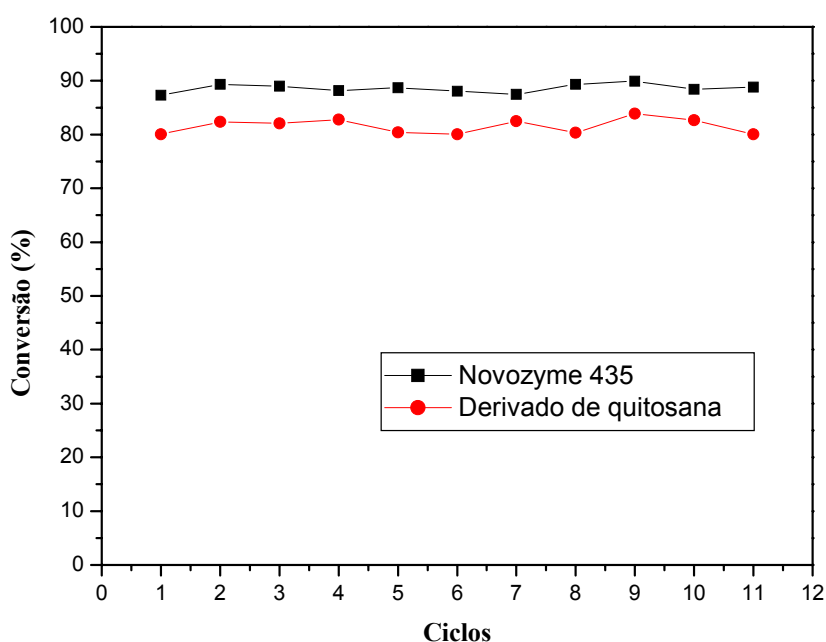


Figura 4.15- Estabilidade operacional da Novozym 435 e da Lipase de *Candida Antarctica* Tipo B Imobilizada em Quitosana na reação de etanólise do óleo de coco residual na temperatura de 30 °C, razão molar ácido:álcool 1:1 e sem adição de água.

Os resultados mostram a estabilidade das lipases, comprovando a viabilidade da catálise enzimática para produção de biodiesel a partir de substratos de elevada acidez livre, uma vez que o alto custo da enzima é um dos fatores mais importantes na catálise enzimática, restringindo a produção industrial de biodiesel por essa rota alternativa. Esses resultados

também estão de acordo com o que outros autores observaram. Wang *et al* (2007), verificaram a manutenção da atividade da Novozyme 435 após dez ciclos consecutivos.

4.7. Alcoólise Enzimática do Óleo de Algodão Residual Utilizando Novozym 435 como Catalisador

Os resultados obtidos no planejamento de experimentos encontram-se na Tabela 4.8. Baseado nesses valores, o erro experimental foi de aproximadamente 2,19%, mostrando uma boa reprodutibilidade dos experimentos. Observando a Tabela 4.7, pode-se ver que a maior conversão de biodiesel foi de 82,66 % em 72 horas de reação nas condições de menor temperatura (30 °C) e na menor razão molar álcool:óleo (3:1).

Tabela 4.8 – Conversões obtidas na alcoólise enzimática do óleo de algodão residual de baixa acidez livre utilizando uma lipase comercial de *Candida antarctica* tipo B (Novozym 435).

Experimento	Razão Molar	Temperatura	Tempo	Conversão
	R	T R(°C)	TO (h)	(%)
1	1:3	30,0	24	45,00 ± 2,19
2	1:3	50,0	24	79,00 ± 2,19
3	1:9	30,0	24	41,70 ± 2,19
4	1:9	50,0	24	31,79 ± 2,19
5	1:3	30,0	72	82,66 ± 2,19
6	1:3	50,0	72	76,19 ± 2,19
7	1:9	30,0	72	73,89 ± 2,19
8	1:9	50,0	72	50,35 ± 2,19
9 (c)	1:6	40,0	48	68,87 ± 2,19
10 (c)	1:6	40,0	48	64,51 ± 2,19
11 (c)	1:6	40,0	48	62,88 ± 2,19

A partir dos dados da Tabela 4.8, fez-se a análise estatística utilizando o *software* Statistica 6.0. Através do Diagrama de Pareto, mostrado na Figura 4.16, podemos observar que a variável razão molar, tempo reacional e as interações entre razão e temperatura e entre temperatura e tempo cruzam a linha de nível de significância de 95 %. Portanto, razão molar álcool:óleo e o tempo reacional, bem como as interações entre a temperatura e o tempo e entre razão molar e temperatura tiveram efeito estatisticamente significativo na conversão em ésteres. Apesar de não significativa, a temperatura teve um efeito negativo, indicando que esta enzima tem um comportamento ótimo em condições brandas de temperatura. A razão molar também apresentou um efeito negativo, apontando para uma possível inativação enzimática pelo excesso de álcool. Já o tempo reacional apresentou um efeito positivo, o que leva a conclusão de que quanto maior o tempo de reação maior a conversão.

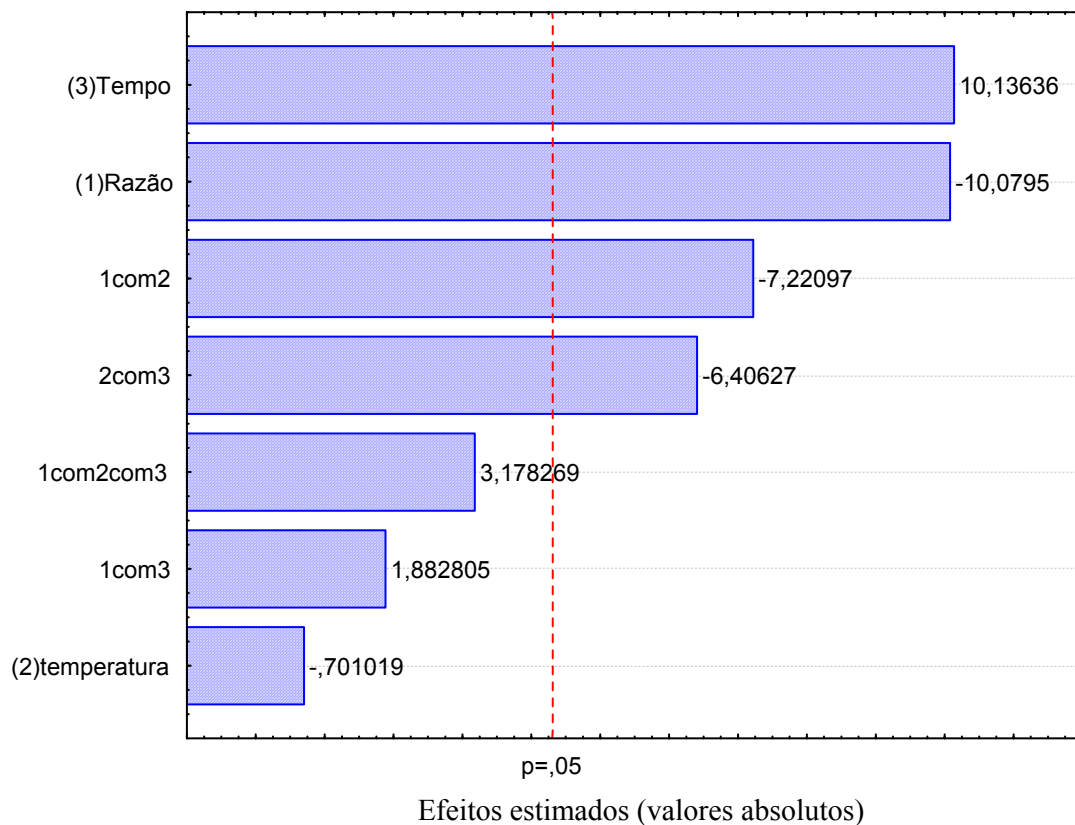


Figura 4.16- Diagrama de Pareto indicando o efeito dos valores estimados para as variáveis independentes para o Planejamento fatorial 2^3 da reação de alcoólise enzimática do óleo de algodão residual.

Nesse momento já se pode observar que, apesar de um tempo bem maior ser necessário para se alcançar boas conversões com o óleo de algodão, os efeitos das variáveis estudadas foram semelhantes aos efeitos dos fatores analisados no planejamento experimental com o ácido oléico. A Tabela 4.9 mostra a estimativa dos efeitos do planejamento experimental realizado com o óleo de algodão. Pode-se observar que os valores de p obtidos para os fatores analisados são menores que 0,05, exceto para a temperatura e para a interação entre razão molar e tempo e para a interação entre as três variáveis. Logo, confirma-se que o único parâmetro sem efeito significativo dentro das faixas experimentais estudadas foi a temperatura.

Tabela 4.9 – Estimativa dos efeitos principais e suas interações na conversão do óleo de algodão a ésteres etílicos.

Fatores	Efeitos	Desvio padrão	p
Média	61,51	0,90	0,000214
R	-21,28	2,11	0,009700
TR (°C)	-1,48	2,11	0,555875
TO (h)	21,40	2,11	0,009593
TR * R	-15,24	2,11	0,018644
R*TO	3,975	2,11	0,200430
TR*TO	-13,52	2,11	0,023510
TR*R*TO	6,71	2,11	0,086365

TR – Temperatura; R – Razão molar entre reagentes; TO – Tempo

Considerando os coeficientes de regressão linear obtidos, intervalo de confiança de 95% e quatro casas decimais, foi possível escrever o modelo matemático de primeira ordem correspondente a variável resposta (conversão) de acordo com a Equação 4.3.

$$\begin{aligned}
 \text{Conversão}(\%) = & -96,4573 + (14,2383 \times R) + (4,1450 \times TR) + (2,5256 \times TO) & (4.3) \\
 & \pm 21,7548 \quad \pm 3,2440 \quad \pm 0,5278 \quad \pm 0,4055 \\
 & - (0,4778 \times R \times TR) - (0,1588 \times R \times TO) - (0,0561 \times TR \times TO) + (0,0047 \times TR \times R \times TO) \\
 & \pm 0,0786 \quad \pm 0,0604 \quad \pm 0,0098 \quad \pm 0,0014
 \end{aligned}$$

sendo TR a temperatura de reação, R a razão molar entre os reagentes e TO o tempo reacional.

O ajuste do modelo escolhido pode ser confirmado pela Figura 4.17, que mostra a comparação entre os valores reais e aqueles obtidos pelo modelo, observando-se uma aglomeração dos pontos próximo a reta representativa.

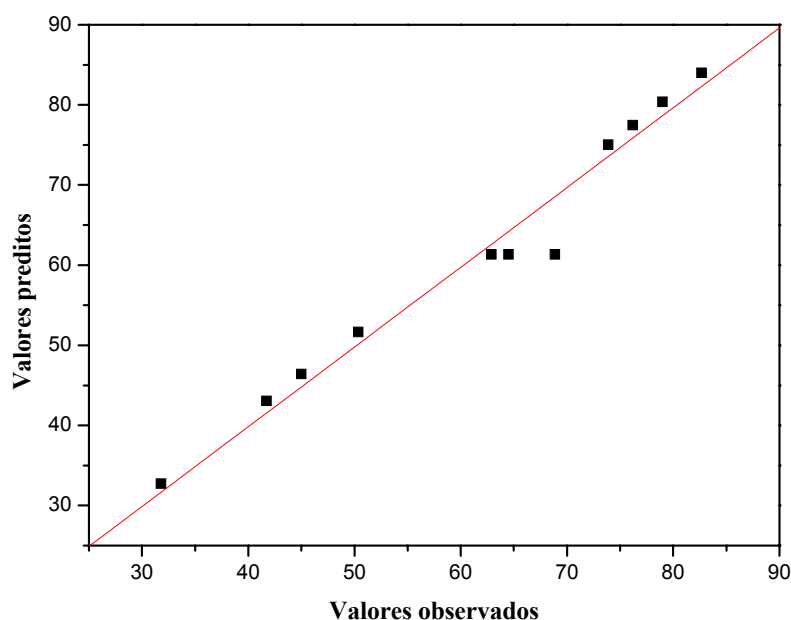


Figura 4.17 – Valores previstos pelo modelo *versus* valores experimentais obtidos pelo planejamento experimental fatorial 2^3 com triplicata do ponto central para a reação de alcoólise enzimática do óleo de algodão.

Tabela 4.10 – ANOVA para a reação de alcoólise enzimática do óleo de algodão utilizando Novozym 435 como catalisador.

Fonte de Variação	Soma Quadrática SQ	Graus de Liberdade d.f.	Média Quadrática MQ	F
Regressão	2839,143	8	354,89	39,83
Erro	17,829	2	8,91	
Total SS	2856,972	10		

$$R^2 = 0,97246; F_{8;2;0,05} = 19,37$$

Pela Tabela 4.10 (ANOVA), que mostra a análise de variância e o teste F, novamente confirma-se que o modelo escolhido representa os dados experimentais, uma vez que o valor de F da regressão foi maior que o valor de F tabelado (19,37).

A seguir, analisou-se a superfície de resposta, Figura 4.18, para se avaliar o efeito da razão molar óleo:álcool na conversão da reação. Por ela, percebe-se que os melhores resultados foram conseguidos nas condições de menor razão molar, o que está de acordo com o que vem sendo reportado na literatura (Kose *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2004). Isso acontece porque, provavelmente, o excesso de álcool provoca inativação da enzima.

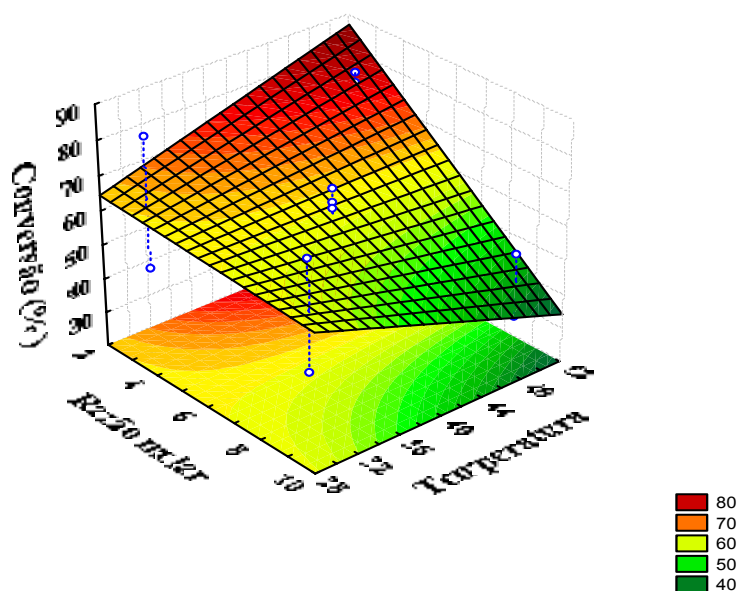


Figura 4.18- Superfície de resposta para a conversão em função da temperatura e razão molar óleo:álcool para alcoólise enzimática de óleo de algodão utilizando Novozymes 435 como catalisador.

Segundo Chen e Wu (2003), ao estudarem métodos de regeneração da atividade de uma lipase de *Candida antarctica*, que fora inativada pelo excesso de álcool durante a reação de alcoólise de óleo de soja, essa inativação pode ser explicada pela imiscibilidade entre triglicerídeos e álcoois de cadeia curta (metanol e etanol). Além disso, o suporte no qual a enzima foi imobilizada pode ter adsorvido compostos polares como o etanol, o que, em elevadas concentrações desse álcool, promove a formação de uma camada estagnada desse reagente em torno da partícula de enzima imobilizada, impedindo a entrada de triglicerídeo ao sítio ativo da enzima.

A Figura 4.19 mostra o efeito do tempo reacional na conversão da reação. Por ela percebe-se que as maiores conversões ocorreram nos maiores tempos e nas menores temperaturas, o que era esperado, uma vez que quanto mais tempo os reagentes permaneceram em contato, maior foi a conversão. No entanto, o tempo necessário para se obter boas conversões ainda foi alto se comparado com a catálise química e com a esterificação de substratos de elevada acidez livre.

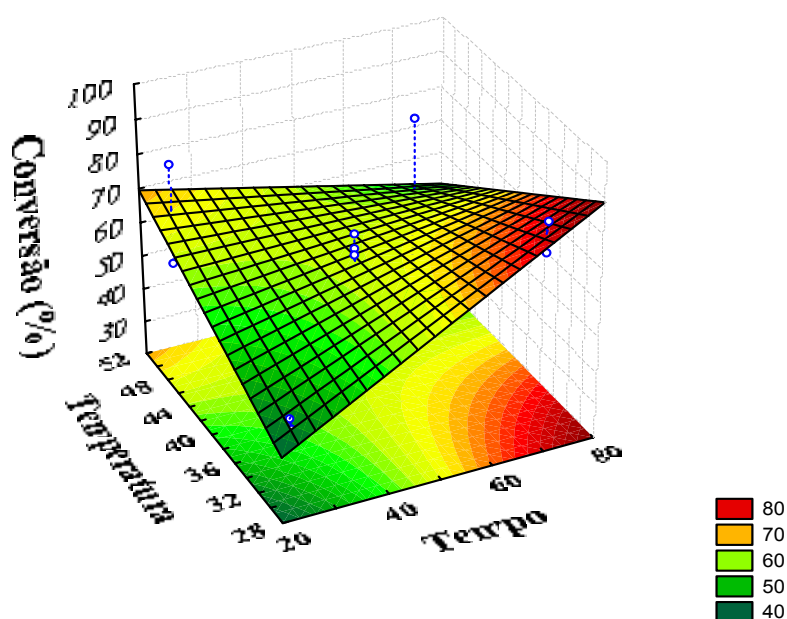


Figura 4.19- Superfície de resposta para a conversão em função da temperatura e do tempo reacional para a alcoólise enzimática de óleo de algodão utilizando Novozymes 435 como catalisador.

4.8. Caracterização dos Ésteres Etilícos

Como o interesse dessa dissertação foi a obtenção de ésteres etílicos a partir de uma matéria-prima residual, e diante dos bons resultados conseguidos com a esterificação do óleo de coco residual ácido utilizando o derivado de quitosana, a Tabela 4.11 apresenta a caracterização dos ésteres produzidos pela reação de alcoólise do óleo de coco utilizando uma lipase de *Cândida antarctica* tipo B imobilizada em quitosana como catalisador, na condição de menor temperatura (30°C), menor razão molar óleo:álcool (1:1) e sem adição de água.

Tabela 4.11- Caracterização físico-química dos ésteres etílicos.

PROPRIEDADES	Ésteres etílicos	Limite ANP
Índice de acidez (mg KOH/g)	25,40	0,50
Densidade a 20 °C (Kg/m ³)	879,96	850-900
Índice de iodo (g/100g)	6,74	**
Teor de umidade (%)	0,05	0,05
Glicerina livre (%)	0,015	0,02
Glicerina total (%)	0,204	0,25

**Vide anexo A

Comparando a caracterização dos ésteres etílicos obtidos com os limites permitidos pela resolução 7 da Agência Nacional de Petróleo (ANP), percebe-se que o único parâmetro que não ficou dentro da especificação foi o índice de acidez. Entretanto, após submeter a mistura de ésteres etílicos a uma neutralização com a glicerina resultante do processo de produção de biodiesel por transesterificação com catalisador básico, o índice de acidez reduziu para 0,76 mg KOH/g, ficando muito próximo do limite exigido pela ANP.

4.9. Conclusões Parciais

Tendo por base os resultados apresentados e discutidos nesse capítulo, uma conclusão que se pode chegar é que a utilização da lipase de *Cândida antarctica* tipo B imobilizada para produção de biodiesel é mais viável quando da utilização de substratos ácidos, uma vez que os melhores resultados foram conseguidos com matérias-primas desse tipo e com uma taxa de reação comparável a esterificação com catalisador ácido.

Segundo Lucena (2008), uma conversão em torno de 87 % em éster metílico a partir da metanólise de ácido oléico comercial com ácido sulfúrico foi conseguida com 60 minutos de reação, a uma temperatura de 90° C, razão molar ácido:álcool de 1:3 e com adsorção da água formada durante o processo. Já com os ensaios sem adsorção de água, uma conversão máxima de 88,18 % em éster metílico foi atingida a uma temperatura de 110° C e razão molar entre reagentes de 1:9. Enquanto isso, os resultados dessa dissertação mostram que a

esterificação enzimática do ácido oléico comercial com etanol forneceu uma conversão de 87,3 % com 60 minutos de reação, a uma temperatura de 30° C, na proporção estequiométrica e sem adsorção de água.

5. CONCLUSÕES

Esse trabalho teve como objetivo verificar a potencialidade do uso de lipase imobilizada, especialmente uma lipase imobilizada pelo Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos (GPBIO) do Departamento de Engenharia Química da UFC, na reação de modificação de óleos vegetais residuais, verificando a influência das variáveis do processo e a cinética de reação, bem como uma comparação do comportamento da lipase em dois óleos com características físico-químicas diferentes.

De acordo com o estudo realizado, algumas conclusões podem ser apresentadas, dependendo do catalisador e do substrato utilizado.

Os resultados dessa dissertação demonstraram que ambos os biocatalisadores utilizados apresentaram boa eficiência na esterificação de matérias-primas ácidas, com a enzima imobilizada em um suporte de quitosana pelo GPBIO apresentando atividade comparável a lipase comercial.

O emprego do planejamento experimental fatorial mostrou-se eficiente no estudo das variáveis que influenciam a conversão da reação. Nos dois planejamentos empregados, os efeitos das variáveis foram praticamente os mesmos, com exceção de um tempo de reação maior quando da utilização do óleo de algodão, cuja principal diferença em relação aos outros substratos foi o seu baixo índice de acidez livre. Esse resultado nos levou a concluir que é mais viável o emprego de lipase para produção de biodiesel quando se utiliza resíduos gordurosos com altos teores de ácidos graxos livres.

Os resultados dos planejamentos e da cinética de reação encontrados nessa dissertação demonstram que, dentro do intervalo estudado, a temperatura, a razão molar entre os substratos e a concentração de água adicionada ao meio tiveram um efeito negativo na conversão em ésteres.

As condições amenas exigidas pela catálise enzimática tornam essa rota alternativa promissora, apesar dos custos da aquisição do biocatalisador ainda serem elevados. Entretanto, diante dos bons resultados obtidos com o derivado de quitosana, os insumos com a produção do catalisador podem diminuir, uma vez que a quitosana é um suporte barato.

Os resultados dos planejamentos possibilitaram a proposta de um modelo empírico que demonstrou uma boa concordância com os dados experimentais, obtendo-se, em 8 horas de reação, uma conversão máxima de 88,36% para a esterificação do ácido oléico e, em 72 horas de reação, 82,66% de conversão para a transesterificação do óleo de algodão residual.

A avaliação do número de ciclos em que a enzima imobilizada poderia ser utilizada sem perda considerável de atividade foi realizada, concluindo que a enzima pode ser reutilizada por no mínimo 10 vezes após o primeiro uso, o que não acontece com os catalisadores químicos convencionais que, sendo homogêneos, não são separados ao final do processo.

Sendo assim, os resultados dessa dissertação indicam a possibilidade do uso de lipases em reações de alcoólise de óleos vegetais residuais ácidos objetivando a produção de biodiesel, tornando possível o uso de matérias-primas de baixo valor agregado, contribuindo, dessa forma, para redução da poluição ambiental, tanto por produzir um combustível ambientalmente correto como por dar um destino mais nobre a um produto sem serventia e que é despejado no meio ambiente indiscriminadamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOH, C.C., CHANG, S., LEE, G., SHAW, J. Enzymatic Approach to Biodiesel Production, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8995-9005, 2007.

AL-ZUHAIR, S. Production of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of Vegetable Oils: A Kinetics Study, **Biotechnology Prog.**, v.21, p. 1442-1448, 2005.

AL-ZUHAIR, S., JAYARAMAN, K.V., KRISHNAN, S., CHAN, W. The Effect of Fatty Acid Concentration and Water Content on the Production of Biodiesel by Lipase, **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 212-217, 2006.

AL-ZUHAIR, S., LING, F.W., JUN, L.S. Proposed Kinetic Mechanism of Production of Biodiesel from Palm Oil Using Lipase, **Process Biochemistry**, v. 42, p. 951-960, 2007.

American Oil Chemists Society. AOCS. **Official Method Ca- 5a-40- Free Fatty Acids**, 1997. 2p.

American Oil Chemists Society. AOCS. **Official Method Cd- 1-25- Iodine Value of Fats and Oils Wijs Method**, 1997. 4p.

American Oil Chemists Society. AOCS. **Official Method Cd- 3d-63- Acid Value**, 1997. 2p.

American Society for Testing and Materials. ASTM. **Annual Book of ASTM, Section 5 – Petroleum Products, Lubricants and Fossil Fuels**, 2001.

ARAÚJO, F. D. S. ; MOURA, C. V. R. ; Chaves, M. H. Caracterização do óleo e biodiesel de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.), In: II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, Brasília, p. 1-6, 2007.

BONETTI, T.M., BUCCO, S., SKORONSKI, E., FURÍGIO JÚNIOR, A., JOÃO, J.J. **Síntese Enzimática de Biodiesel a partir de Resíduos de Indústrias de Laticínios**, In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba, PR, 2007

CANAKCI, M. The Potencial of Restaurant Waste Lipids as Biodiesel Feedstocks, **Bioresource Technology**, v. 98, p. 183-190, 2007.

CARVALHO, P.O., CAMPOS, P.R.B., NOFFS, M.D., OLIVEIRA, J.G., SHIMIZU, M.T., SILVA, D.M. Aplicação de Lipases Microbianas na Obtenção de Concentrados de Ácidos Graxos Poliinsaturados, **Química Nova**, v. 26, p. 75-80, 2003.

CASTRO, H.F., MENDES, A.A., SANTOS, J.C. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação, **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

CHEN, J., WU, W. Regeneration of Immobilized *Candida Antarctica* Lipase for Transesterification, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, p. 466-469, 2003.

COSTA NETO, P.R., ROSSI, L.F.S., ZAGONEL, G.F., RAMOS, L.P. Produção de Biocombustível Alternativo ao Óleo Diesel Através da Transesterificação de Óleo de Soja Usado em Frituras, **Química Nova**, v. 23, p. 531-537, 2000.

CRUZ JÚNIOR, A., PACHECO, S.M.V., RUZZA, A.A., STRELAU, J.R., FURIGO JÚNIOR, A. Produção e Caracterização de Biodiesel Produzido Através de Alcoólise Enzimática de Óleo de Mamona, In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, Curitiba, PR, 2007.

DALLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M.G., SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros, **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DANTAS, H. J. Estudo Termoanalítico, Cinético e Reológico de Biodiesel Derivado do Óleo de Algodão (*Gossypium hisutum*). 2006. 122 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2006.

DEMIRBAS, A. Importance of Biodiesel as Transportation Fuel, **Energy Policy**, v. 35, p. 4661-4670, 2007.

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, p. 194-200, 1999.

ENCINAR, J.M., GONZÁLEZ, J.F., RODRIGUEZ-REINARES, A. Ethanolysis of Used Frying Oil. Biodiesel Preparation and Characterization, **Fuel Processing Technology**, v. 88, p. 513-522, 2007.

FACCIO, C., ROSA, C.D., BENDER, J.P., LIPKE, N., MENONCIN, S., AMROGINSKI, C., OLIVEIRA, D., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, J.V, Utilização de Óleo de Mamona como Substrato para a Produção Enzimática de Biodiesel em n-Hexano. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis, Santa Catarina, 2003.

FACCIO, C. Estudo da Produção de Ésteres Etílicos a partir da Alcoólise de óleos Vegetais. **2004**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Ciências Agrárias, URI, Erechim, RS, 2004

FELIZARDO, P.; CORREIA, M.J.N.; RAPOSO, I.; MENDES, J.F.; BERKEMEIER, R.; BORDADO, J.M. Production of Biodiesel from Waste Frying Oils, **Waste Management**, v. 26, p. 487-494, 2006

FORESTI, M.L.; PEDERNERA, M.; BUCALÁ, V.; FERREIRA, M.L. Mutiple Effects of Water on Solvent-free Enzymatic Esterifications, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 62-70, 2007.

FORESTI, M.L.; PEDERNERA, M.; FERREIRA, M. L.; BUCALÁ, V. Kinetic Modeling of Enzymatic Ethyl Oleate Synthesis Carried Out in Biphasic Systems, **Applied Catalysis**, v. 334, p. 65-72, 2008.

FUKUDA, H., KONDO, A., NODA, H. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, no. 5, p. 405-416, 2001

GAO, Y.; TAN, T.; NIE, K.; WANG, F. Immobilization of Lipase on Macroporous Resin and Its Application in Synthesis of Biodiesel in Low Aqueous Media, **Chinese Journal of Biotechninology**, v. 22, p. 114-118, 2006.

HOLANDA, A. Biodiesel e Inclusão Social, Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, 200p, 2004.

ISO, M., CHEN, B., EGUCHI, M., KUDO, T., SURESTHA, S. Production of Biodiesel Fuel From Triglycerides and Alcohol Using Immobilized Lipase, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, p. 53-58, 2001.

KNOTHE, G., GERPEN, J.V., KRAHL, J., RAMOS, L.P. Manual do Biodiesel, **Edgard Blücher**, São Paulo, 2006.

KULKARNI, M.G., DALAI, A.K. Waste Cooking Oil – An Economical Source for Biodiesel: A Review, **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 45, p. 2901-2913, 2006.

KOSE, 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, p. 125-129, 2002.

LEBEDEVAS, S., VAICEKAUSKAS, A. Use of Waste Fats of Animal and Vegetable Origin for the Production of Biodiesel Fuel: Quality, Motor Properties and Emissions of Harmful Components, **Energy & Fuels**, v. 20, p. 2274-2280, 2006.

LIN, Y., WU, Y., CHANG, C. Combustion Characteristics of Waste-oil Produced Biodiesel/Diesel Fuel Blends, **Fuel**, v. 86, p. 1772-1780, 2007.

LINKO, Y.Y., LAMSA, M., WU, X., UOSUKAINEN, E., SEPPALA, J., LINKO, P. Biodegradable Products by Lipase Biocatalysis, **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 41-50, 1998.

LUCENA, I. L. **Otimização do Processo de Obtenção de Biodiesel Através da Adsorção de água Formada Durante a Reação de Esterificação**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2008.

LU, J., NIE, K., XIE, F., WANG, F., TAN, T. Enzymatic Synthesis of Fatty Acid Methyl Esters From Lard With Immobilized *Candida* sp. 99-125, **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1367-1370, 2007

MA, F.; HANNA, M.A. Biodiesel Production: a review, **Bioresource Technology**, v. 70, p. 1-15, 1999.

MALTA, G., SPONQUIADO, R., FERRAZ, V.P., SEGALL, S.D. Avaliação entre Catalisadores Biológicos e Químicos na Produção de Biodiesel Utilizando Resíduos da Indústria de Carnes, In: **XII Congresso Latinoamericano de Óleos e Gorduras**, Florianópolis, Sc, 2007.

MARCHETTI, L.M., MIGUEL, V.U., ERRAZU, A.F. Possible Methods for Biodiesel Production, **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 1300-1311, 2007.

MEHER, L.C., SAGAR, D.V., NAIK, S.N. Technical Aspects of Biodiesel Production by Transesterification – A Review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, p. 248-268, 2006.

MENZEL, A. **NTB A-0104 e NTB A-0204. Normas TECBIO de Determinação da Glicerina pelo método do periodato de sódio e Determinação da Glicerina Livre , combinada e total em amostras de Biodiesel**, Adaptado de United States Pharmacopoeia (USP XXI), p. 465, 2004.

MOREIRA, A.B.R., PEREZ, V.H., CASTRO, H.F. Avaliação da Lipase Pancreática Imobilizada em Polissiloxano-Álcool Polivinílico na Alcoólise do Óleo de Palma e Etanol, **In: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 24-27 de Setembro, Santos, São Paulo, 2006.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; FACCIO, C.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C. Influência das Variáveis de Processo na Alcoólise Enzimática de Óleo de Mamona, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 178-182, 2004.

OLGA, B. A Fabulosa Vida de Expedito Parente, **Agência Brasil**, Fortaleza, 2005. Disponível em: <http://zapper.xitizap.com/xitizap%2031/index_files/Page566.htm>. Acesso em: 01 de Abr. 2007.

PETKAR, M., LALI, A., CAIMI, P., DAMINATI, M. Immobilization of Lipases for Non-aqueous Synthesis, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 83-90, 2006.

POUSA, G.P.A.G., SANTOS, A.L.F., SUAREZ, P.A.Z. History and Policy of Biodiesel in Brazil, **Energy Policy**, 2007, doi:10.1016/j.enpol.2007.05.010

PREÇO do óleo de soja sobe. **Jornal Nacional Online**, Rio de Janeiro, 10 de março de 2008. Disponível em: <<http://www.jornalnacional.globo.com>>. Acesso em 10 de março de 2008.

RAMOS, L.P., KUCEK, K.T., DOMINGOS, A.K., WILHEIM, H.M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil, **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ed. 31, p. 28-37, 2003.

RANGANATHAN, S.V., NARASIMHAN, S.L., MUTHUKUMAR, K. An Overview of Enzymatic Production of Biodiesel, **Bioresource Technology**, 2007, doi:10.1016/j.biortech.2007.04.060.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma Estratégia Sequencial de Planejamentos, Ed. 1, **Casa do Pão editora**, 2005.

RODRIGUES, R.C., MACHADO, D.B., VOLPATO, G., AYUB, M.A.Z., WADA, K. Otimização da Etanolise de Óleo de Soja por Lipozyme TL- IM Através da Metodologia de Superfície de Resposta, **In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Curitiba, PR, 2007.

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, p. 648-653, 2007.

SAAD, E.B. Etanolise do óleo de Milho Empregando Catalisadores Alcalinos e Enzimáticos. 2005. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.

SALIS, A., PINNA, M., MONDUZZI, M., SOLINAS, V. Biodiesel Production from Triolein and Short Chain Alcohols Through Biocatalysis, **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 291-299, 2005.

SAMUKAWA, T., KAIEDA, M., MATSUMOTO, T., BAN, K., KONDO, A., SHIMADA, Y., NODA, H., FUKUDA, H. Pretreatment of Immobilized *Candida Antarctica* Lipase for Biodiesel Production from Plant Oil, **Journal of Biocience and Bioengineering**, v. 90, p. 180-183, 2000.

SHIEH, C.J., LIAO, H.F., LEE, C.C. Optimization of Lipase-catalyzed Biodiesel by Response Surface Methodology, **Bioresource Technology**, v. 88, p. 103-106, 2003.

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, **Jaocs**, v. 76, no. 7, 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: Enzymatic**, v. 17, p. 133-142, 2002.

SILVA, C. L. M **Obtenção de Ésteres Etilicos a partir da Transesterificação do Oleo de Andiroba com Etanol**. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química Inorganica) – Departamento de Química Inorganica, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

SILVA, G.S., VIEIRA, F.C.V., CASTRO, H.F. Transformação Enzimática do Óleo de Palma Visando a Obtenção de Biodiesel, In: **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Campinas, São Paulo, 2004.

SILVA, J.A. **Preparação de Biocatalisadores Utilizando Lipase de *Candida antarctica* Tipo B Imobilizada para Síntese de Ésteres de Vitamina A**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2007.

SOUSA, L.L. **Otimização da Produção de Biodiesel Através da Reação de Transesterificação do Óleo de Mamona Utilizando um Catalisador Básico Homogêneo.** 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2008.

SUAREZ, P.A.Z.; MENEGHETTI, S.M.P., FERREIRA, V.F. O Biodiesel e a Política de C & T Brasileira, **Química Nova**, v. 29, p. 1157, 2006.

TING, W.J., TUNG, K.Y., GIRIDHAR, R., WU, W.T. Application of Binary Immobilized *Candida Rugosa* Lipase for Hydrolysis of Soybean Oil, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 32-38, 2006.

TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the Operating Conditions and the External Mass Transfer Limitations on the Synthesis of Fatty Acid Esters Using a *Candida antarctica* Lipase, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 716-722, 2007.

UPPENBERG J., HANSEN, M.T., PATKAR, S., JONES, T.A. The Sequence, Crystal Structure Determination and Refinement of Two Crystal Forms of Lipase B From *Candida Antarctica*, **Structure**, v. 2, p. 293-308, 1994.

URIOSTE, D. **Produção de Biodiesel por Catálise Enzimática do Óleo de Babaçu com Álcoois de Cadeia Curta.** 2004. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, SP, 2004.

UTLU, Z., KOÇAK, M.S. The Effect of Biodiesel Fuel Obtained From Waste Frying Oil on Direct Injection Diesel Engine Performance and Exhaust Emissions, **Renewable Energy**, 2007, doi:10.1016/j.renene.2007.10.006.

VIEIRA, F.C.V.; MENDES, A.A.; CASTRO, H.F. Produção de Biodiesel por Interesterificação de Óleo de Babaçu e Butanol Catalisada por Lipase Imobilizada em Suporte Híbrido, In: **XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 24-27 de Setembro, Santos, São Paulo, 2006.

WANG, J.; HUANG, Q.; HUANG, F.; WANG, J.; HUANG, Q. Lipase-catalyzed Production of Biodiesel from High Acid Value Waste Oil Using Ultrasonic Assistant, **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 1121-1128, 2007.

WANG, Y., OU, S., LIU, P., XUE, F., TANG, S. Comparison of Two Different Processes to Synthesize Biodiesel by Waste Cooking Oil, **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 252, p. 107-112, 2006.

WANG, Y., OU, S., LIU, P., ZHANG, Z. Preparation of Biodiesel from Waste Cooking Oil via Two-step catalyzed Process, **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 184-188, 2007.

YAGIZ, F., KAZAN, D., AKIN, A.N. Biodiesel Production From Waste Oils by Using Lipase Immobilized on Hydrotalcite and Zeolites, **Chemical Engineering Journal**, v. 134, p. 262-267, 2007.

YAHYA, A.R.M., ANDERSON, W.A., MOO-YOUNG, M. Ester Synthesis in Lipase-Catalyzed Reactions, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 438-450, 1998.

ANEXO

Resolução ANP Nº 7, de 19.3.2008 - DOU 20.3.2008

REGULAMENTO TÉCNICO Nº 7/2008 (Especificação do Biodiesel-B100).

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m ³	850-900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 - EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0-6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de Água, máx. (2)	mg/kg	500	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	EN ISO 12662
Ponto de fulgor, mín. (3)	°C	100,0	14598	93 -	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15342 (4) (5)	-	EN 14103
Resíduo de carbono (6)	% massa	0,050	-	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	50	- -	5453	- EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160

Número de Cetano (7)	-	Anotar	-	613 6890 (8)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19 (9)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	- EN 14104 (10)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 (5)	6584 (10)	- EN 14105 (10) EN 14106 (10)
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344 (5)	6584 (10)	- EN 14105 (10)
Mono, di, triacilglicerol (7)	% massa	Anotar	15342 (5) 15344 (5)	6584 (10)	- EN 14105 (10)
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de Iodo (7)	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.(2)	h	6	-	-	EN 14112 (10)

Nota:

- (1) LII – Límpido e isento de impurezas com anotação da temperatura de ensaio.
- (2) O limite indicado deve ser atendido na certificação do biodiesel pelo produtor ou importador.
- (3) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130°C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.
- (4) O método ABNT NBR 15342 poderá ser utilizado para amostra oriunda de gordura animal.

(5) Para biodiesel oriundo de duas ou mais matérias-primas distintas das quais uma consiste de óleo de mamona:

a) teor de ésteres, mono-, diacilgliceróis: método ABNT NBR 15342;

b) glicerol livre: método ABNT NBR 15341;

c) glicerol total, triacilgliceróis: método ABNT NBR 15344;

d) metanol e/ou etanol: método ABNT NBR 15343.

(6) O resíduo deve ser avaliado em 100% da amostra.

(7) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da tabela de especificação a cada trimestre civil. Os resultados devem ser enviados pelo produtor de biodiesel à ANP, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de matéria-prima, o produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de matérias-primas utilizadas.

(8) Poderá ser utilizado como método alternativo o método ASTM D6890 para número de cetano.

(9) O limite máximo de 19°C é válido para as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Bahia, devendo ser anotado para as demais regiões. O biodiesel poderá ser entregue com temperaturas superiores ao limite supramencionado, caso haja acordo entre as partes envolvidas. Os métodos de análise indicados não podem ser empregados para biodiesel oriundo apenas de mamona.

(10) Os métodos referenciados demandam validação para as matérias-primas não previstas no método e rota de produção etílica.