



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

**JOSÉ CLEITON SOUSA DOS SANTOS**

**ESTUDO DE PARÂMETROS NAS REAÇÕES DE SÍNTESE ENZIMÁTICA DE  
BIODIESEL POR INTERMÉDIO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS**

FORTALEZA – CE  
2011



**JOSÉ CLEITON SOUSA DOS SANTOS**

**ESTUDO DE PARÂMETROS NAS REAÇÕES DE SÍNTESE ENZIMÁTICA DE  
BIODIESEL POR INTERMÉDIO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS**

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

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar  
Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana

FORTALEZA – CE  
2011

S233e Santos, José Cleiton Sousa dos  
Estudo de parâmetros nas reações de síntese enzimática de biodiesel por intermédio de fluidos supercríticos / José Cleiton Sousa dos Santos. -- Fortaleza, 2011.  
102 f. ; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar  
Co-orientador: Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana  
Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2011.

1. Biodiesel. 2. Lipase. I. Aguiar, Rílvia Saraiva de Santiago (Orient.). II. Sant'Ana, Hosiberto Batista de (Co-orient.). III. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDD 660

JOSÉ CLEITON SOUSA DOS SANTOS

**ESTUDO DE PARÂMETROS NAS REAÇÕES DE SÍNTESE ENZIMÁTICA DE  
BIODIESEL POR INTERMÉDIO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração em Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovado em 25 / 02 / 2011.

BANCA EXAMINADORA

Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar  
Prof.ª. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

Hosiberto Batista de Sant'Ana  
Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana (Co-orientador)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

Adriano Aguiar Mendes  
Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes  
Universidade Federal de São João Del-Rei - UFSJ

Wellington Sabino Adriano  
Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano  
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

*A minha Mãe Maria Sousa, aos meus irmãos  
Lucélio Sousa e Auricélia Sousa, pessoas que  
sempre estiveram ao meu lado, pelo apoio  
admiração e amores incondicionais que foram  
imprescindíveis em minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter me concedido saúde e disposição para os estudos execução deste trabalho.

À minha família, pelo apoio moral, compreensão, atenção e incentivo na minha formação pessoal e profissional.

Aos professores Profa. Dra. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar, Prof. Dr. Hosiberto Batista de Sant'Ana e Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela orientação do trabalho, pela confiança creditada a mim e pela contribuição para o meu desenvolvimento profissional. Agradeço, também pela oportunidade, paciência e dedicação em fazer de sua experiência profissional e pessoal parte do meu crescimento.

Ao Prof. Dr. Wellington Sabino Adriano, que dedicou sua experiência e seu tempo em minha formação pessoal e profissional, quando do início dos trabalhos no Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos (GPBio) na Universidade Federal do Ceará.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química – DEQ/UFC, Prof<sup>a</sup>. Dra. Andrea Ferreira, Prof<sup>a</sup>. Dra. Sueli Rodrigues, Prof. Dr. Fabiano Fernandes, Prof. Dr. Gustavo Saavedra, Prof. Dr. Samuel Cartaxo, pelos conhecimentos adquiridos no curso de mestrado.

À Profa. Dra. Nadja Maria Sales de Vasconcelos, com quem iniciei na carreira acadêmica, minha eterna gratidão pela experiência repassada, um exemplo de profissional a ser seguida, uma homenagem especial.

A Ana Michele pela paciência, compreensão e carinho.

Aos companheiros do Grupo de Pesquisa em Termofluidodinâmica Aplicada – GPTA, Francisca Maria, Filipi, Caju, Natan, Aline, Marcelo, Rodrigo, pelo auxílio e colaboração.

À família GPBIO por ter me adotado e acolhido.

Aos meus amigos do GPBio (Enzimas), Bete, Cristiane, Ulisses, Leonardo, Karine, Gerla e demais bolsistas e integrantes, que fazem desse grupo um ambiente descontraído e agradável de trabalhar, pela saudosa convivência, meu carinho por todo o conhecimento e paciência repassados no desenvolvimento dos experimentos.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, Darlane, Tigressa, Marylane, Kamilly, Camilla, Janaina, Jefferson, Kerolaine, Assis, Milena, Tatiane, Valeria, Manuella, Márcio, Álvaro, Rosana, Diego que contribuíram para minha formação, trocando experiências, cada um dando sua contribuição para o melhor aprendizado do grupo.

Aos meus amigos de Graduação da Universidade Estadual do Ceará, Ana Paula, Cicera, Maraiza, Mário, Lane, Jouciane, José Antônio, Vívian, Diôgo, dentre outros, que contribuíram para minha formação, trocando experiências, cada um dando sua contribuição para o melhor aprendizado e por ainda permanecerem com laços de amizades.

Aos amigos que não fazem parte da vida acadêmica: Carol, Roberto, Juliana, Kátia, Walmira, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do DEQ/UFC, destacando à secretária do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Maria Nogueira, por atender prontamente às nossas solicitações.

À Universidade Federal do Ceará e Departamento de Engenharia Química, por possibilitar a realização desse trabalho e obtenção do título de mestre.

Ao CNPq pela bolsa de pesquisa fomentada.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

*“A humildade exprime, uma das  
raras certezas de que estou certo:  
a de que ninguém é superior a  
ninguém.”*  
*(Paulo Freire)*



## RESUMO

A produção de biodiesel pela reação de esterificação enzimática por intermédio de fluidos supercríticos pode ser usado na síntese de biocombustíveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros operacionais de síntese enzimática de oleato de etila em meio supercrítico. A primeira etapa foi a preparação do biocatalisador através da imobilização da lipase de *Candida antarctica* tipo B (CalB), por ligação covalente, utilizando quitosana como suporte. No procedimento de imobilização, realizou-se a ativação do suporte, utilizando como agentes ativantes: glicidol, glutaraldeído e/ou etilenodiamina (EDA). O segundo passo consistiu da medida da hidrólise da enzima imobilizada, que foi avaliada pela hidrólise do butirato de para-nitrofenila (pNPB). Em ordem para determinar a melhor condição operacional da reação, foi conduzido um planejamento experimental ( $2^3$ ), com os seguintes parâmetros: razão molar álcool:ácido graxo, temperatura, e tempo de reação, então o melhor resultado foi obtido usando quitosana 5% (m/V) - Glioxil-EDA-Glutaraldeído, de 18,95 U/g. No terceiro passo, realizou-se as reações de esterificação utilizando ácido oleico, álcool etílico e dióxido de carbono como fluido supercrítico. A quantidade de óleo usada nestas reações foi constante, com 1,0 g de biocatalisador correspondendo a 10% da massa de óleo. Um planejamento experimental foi realizado para se avaliar as condições operacionais (razão molar, tempo de reação e temperatura). O maior valor de conversão foi de 46,9% para uma temperatura de 29,9 °C, razão molar etanol: ácido oleico igual 4,50: 1 e tempo reacional de 6,5 horas. O aumento da temperatura influenciou a conversão positivamente, dentro do intervalo estudado. O parâmetro razão molar álcool: ácido oleico nos intervalos estudados (2,5:1; 4,5:1; 6,5:1) mostrou que os valores com a menor relação de razão molar possuem as maiores taxas de conversão. Ocorreu a perda de atividade catalítica durante os procedimentos de reciclo. Adicionalmente, a baixa conversão de ésteres etílicos pode ser solucionada com o uso de zeólita para remoção de água do meio, uma vez que se acredita que a presença de água impossibilita a máxima conversão.

**Palavras chave:** Lipase, imobilização, quitosana, biodiesel, esterificação, fluido supercrítico.

## ABSTRACT

Biodiesel production by enzymatic esterification reaction using supercritical fluids can be used for the synthesis of biofuel. The objective of this study was to evaluate the operational parameters of enzymatic synthesis in supercritical medium. The 1<sup>st</sup> step was the preparation of the biocatalyst by immobilization of lipase from *Candida antarctica* type B (Calb) by covalent bond using chitosan as support. In the immobilization procedure, it was the following as activating agents: glycidol, glutaraldehyde and ethylenediamine (EDA). The 2<sup>nd</sup> step was the measurement of hydrolysis of the immobilized enzyme, this was evaluated by hydrolysis of butyrate p,nitrophenyl butyrate (pNPB). In order to determine the best operational conditions of the reacton, it was enzyme suport conducted a experimental design (2<sup>3</sup>), in the following parameters: molar rather alcohol oil, temperature, and then the best result was obtained when using chitosan 5% (w/v) - glyoxyl -EDA-glutaraldehyde, of 18.95 U / g. In Step 3, we carried out the esterification reactions using oleic acid, ethanol and carbon dioxide as supercritical fluid. It should be noticed that the amount of oleic acid used in these reactions was constant, with 1 g of immobilized enzyme, corresponding to 10% by weight oleic acid. An experimental design was conducted to evaluate the operational conditions molar ratio, reaction time and temperature. The highest rate was 46.9% at a temperature of 29.9 °C, molar ratio ethanol: oleic acid equal to 4.50:1, and a reaction time of 6.50 hours. The temperature affected the conversion within the range studied. The parameter molar ratio alcohol: oleic acid in the intervals studied (2.5:1, 4.5:1, 6.5:1) showed that the values with the lowest ratio of molar ratio with the highest conversion rates. It was observed a lost of catalytic activity during the recycling procedure. Additionally, it should be mentioned that a low conversion of ethyl esters, might be solved with the use of zeolite to remove water from medium, once it believed that that the presence of water precludes the maximum conversion.

**Keywords:** Lipase, immobilization, chitosan, biodiesel, esterification, supercritical fluids.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Diagrama de Fases (gás/sólido/líquido/fluido supercrítico); onde PT= ponto triplo, PC= é o ponto crítico, Pc= é a pressão crítica e Tc= é a temperatura crítica (CARRILHO et al., 2001).....	19
<b>Figura 2 -</b>	a) um sistema bifásico é observado a temperaturas inferiores com menisco entre as fases líquido e gás. (b) com o aumento da temperatura, o menisco entre as duas fases começa a ficar menos nítido. (c) a uma temperatura superior, um fluxo supercrítico é observado. O processo é revertido pela diminuição da temperatura.....	20
<b>Figura 3 -</b>	Sítio ativo da lipase tipo B de <i>Candida antarctica</i> com (a) vista superior e (b) seção transversal (Uppenberg <i>et al.</i> , 1994).....	23
<b>Figura 4 -</b>	Métodos de imobilização de enzimas (Dalla-Vecchia <i>et al.</i> , 2004).....	26
<b>Figura 5 -</b>	Ligação do suporte a enzima pela formação de base de Schiff.....	29
<b>Figura 6 -</b>	Representação esquemática das estruturas primárias de (a) celulose, (b) quitina e (c) quitosana (MUZZARELLI, 1973).....	30
<b>Figura 7 -</b>	Reação de esterificação.....	37
<b>Figura 8 -</b>	Reação de transesterificação.....	38
<b>Figura 9 -</b>	Fluxograma mostrando a medida da atividade hidrolítica da enzima solúvel.....	44
<b>Figura 10 -</b>	Fluxograma mostrando a determinação da atividade hidrolítica da enzima imobilizada.....	46
<b>Figura 11 -</b>	Fluxograma mostrando a preparação do gel de quitosana. Observa-se no esquema apresentado a ordem na qual os reagentes foram colocados para a realização do ensaio.....	47
<b>Figura 12 -</b>	Fluxograma mostrando a ativação via glutaraldeído dos géis preparados.....	47
<b>Figura 13 -</b>	Fluxograma mostrando a ativação via glicidol dos suportes preparados. O procedimento acima requereu tempo de 18 h.....	49
<b>Figura 14 -</b>	Fluxograma do suporte Glioxil-Etilenodiamina-Glutaraldeído. Esse esquema apresenta a etapa final de ativação do suporte para posterior recebimento da enzima.....	50
<b>Figura 15 -</b>	Fluxograma do procedimento de obtenção da enzima imobilizada.....	51
<b>Figura 16 -</b>	Esquema do sistema operacional, montado no Laboratório de Termofluidodinâmica Aplicada (LTA) no Departamento de Engenharia Química da UFC, onde foram realizadas as reações de esterificação enzimática por intermédio de fluido supercrítico.....	52
<b>Figura 17 -</b>	Fluxograma do procedimento das reações de esterificação utilizando fluido supercrítico.....	54
<b>Figura 18 -</b>	Cromatograma obtido por CG/MS para o ácido oleico.....	65
<b>Figura 19 -</b>	Influência da temperatura na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio de fluido supercrítico na razão molar álcool:óleo de 6,5:1.....	66

<b>Figura 20 -</b>	Influência da razão molar álcool:ácido na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio de fluido supercrítico na temperatura de 35°C.....	68
<b>Figura 21 -</b>	Influência da razão molar álcool:ácido na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio de fluido supercrítico na temperatura de 50°C.....	69
<b>Figura 22 -</b>	Ciclos de atividade do biocatalizador nas reações de esterificação enzimática do ácido oleico por intermédio de fluido supercrítico na temperatura de 50°C e razão molar álcool:ácido oleico de 1:1 após vários de ciclos de reação.....	71
<b>Figura 23 -</b>	Comparação dos valores de conversão obtidos com a utilização e sem utilização de zeólita do tipo A. Os ensaios foram realizados variando tempos de reação entre 1h e 10hs, com temperatura de 29,9 °C, razão molar etanol: óleo igual 4,5: 1.....	73
<b>Figura 24 -</b>	Diagrama de Pareto indicando o efeito dos valores estimados para as variáveis estudadas no planejamento experimental 2 <sup>3</sup> com duplicata do ponto central da esterificação enzimática do ácido oleico utilizando fluido supercrítico.....	74
<b>Figura 25 -</b>	Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais da conversão em ésteres etílicos obtidos pelo planejamento experimental 2 <sup>3</sup> com duplicata do ponto central da esterificação enzimática do ácido oleico por intermédio de fluido supercrítico.....	76
<b>Figura 26 -</b>	Superfície de resposta representando a conversão em função do tempo e temperatura para uma razão molar álcool: óleo de 4,5.....	77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Temperatura e pressão críticas de algumas substâncias utilizadas como solventes supercríticos.....	20
<b>Tabela 2 -</b>	Propriedades físico-químicas de gás, líquido e fluido supercrítico.....	20
<b>Tabela 3 -</b>	Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial.....	32
<b>Tabela 4 -</b>	Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.....	34
<b>Tabela 5 -</b>	Níveis para a determinação das condições experimentais da reação de esterificação por intermédio de fluido supercrítico.....	55
<b>Tabela 6 -</b>	Matriz das variáveis do Planejamento Experimental para a reação de esterificação utilizando fluido supercrítico.....	55
<b>Tabela 7 -</b>	Condições reacionais determinadas pelo planejamento estatístico para a reação de esterificação enzimática por intermédio de fluido supercrítico utilizando 1g de biocatalisador para todos os ensaios.....	56
<b>Tabela 8 -</b>	Condições de Operação do Cromatógrafo para identificação do ácido oleico.....	60
<b>Tabela 9 -</b>	Avaliação dos parâmetros de imobilização de CALB em quitosana ativada com Gluteraldeido-Glioxil-Etilenodiamina-Glutaraldeido.....	63
<b>Tabela 10 -</b>	Parâmetros físico-químicos do ácido oleico.....	64
<b>Tabela 11 -</b>	ANEXO C.....	100
<b>Tabela 12 -</b>	ANEXO C.....	100
<b>Tabela 13 -</b>	ANEXO C.....	100
<b>Tabela 14 -</b>	Resultados do planejamento experimental 2 <sup>3</sup> para a conversão do ácido oleico nas reações de esterificação enzimática por intermédio de fluido supercrítico.....	72
<b>Tabela 15 -</b>	ANEXO C.....	101
<b>Tabela 16 -</b>	Estimativa dos efeitos principais e suas interações na conversão do ácido oleico a ésteres etílicos utilizando fluido supercrítico.....	74
<b>Tabela 17 -</b>	Coefficiente de regressão para a resposta conversão do ácido oleico a ésteres etílicos utilizando fluido supercrítico.....	75
<b>Tabela 18 -</b>	ANOVA para conversão de biodiesel em meio supercrítico.....	76

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Fluidos Supercríticos.....	19
2.2	Lipase.....	22
2.3	Métodos de imobilização.....	26
2.4	Quitosana.....	29
2.5	Biodiesel.....	31
2.5.1	Matérias – Primas.....	33
2.5.2	Métodos de obtenção do Biodiesel.....	36
2.5.2.1	Esterificação.....	36
2.5.2.2	Transesterificação.....	37
2.5.2.3	Produção de Biodiesel pela rota enzimática.....	39
2.5.2.4	Fluidos Supercríticos: Estratégia para a Produção de Bicomustível.....	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1	Materiais.....	42
3.1.1	Enzima.....	42
3.1.2	Suportes para imobilização.....	42
3.1.3	Agentes ativantes.....	43
3.1.4	Substratos.....	43
3.1.5	Fluido Supercrítico.....	43
3.2	Métodos.....	43
3.2.1	Medida da atividade hidrolítica da enzima solúvel.....	43
3.2.2	Determinação da atividade hidrolítica da enzima imobilizada.....	45
3.3	Preparação de hidrogéis de quitosana.....	46
3.4	Protocolos de ativação de hidrogéis de quitosana.....	47
3.4.1	Ativação do suporte via glutaraldeído.....	47
3.4.2	Ativação de glutaraldeído-Quitosana via glicidol.....	48
3.4.3	Preparação do suporte glioxil-EDA-glutaraldeído.....	49
3.5	Imobilização da enzima ao suporte.....	50
3.6	Reações de esterificação em meio supercrítico.....	52
3.7	Influência da razão molar, tempo e temperatura na conversão de	

	<b>biodiesel.....</b>	<b>54</b>
<b>3.8</b>	<b>Caracterização Físico-Química da Matéria-Prima e do Biodiesel.....</b>	<b>57</b>
<b>3.8.1</b>	<b>Índice de acidez.....</b>	<b>57</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Densidade e Viscosidade.....</b>	<b>58</b>
<b>3.8.3</b>	<b>Teor de Umidade.....</b>	<b>58</b>
<b>3.8.4</b>	<b>Índice de Iodo.....</b>	<b>59</b>
<b>3.9</b>	<b>Cálculo da Conversão em Ésteres Etílicos.....</b>	<b>59</b>
<b>3.10</b>	<b>Caracterização Cromatográfica.....</b>	<b>60</b>
<b>3.11</b>	<b>Recuperação do Biocatalisador.....</b>	<b>61</b>
<b>3.12</b>	<b>Esterificação com Zeólita.....</b>	<b>61</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1</b>	<b>Atividade hidrolítica da enzima solúvel.....</b>	<b>62</b>
<b>4.2</b>	<b>Atividade hidrolítica da enzima imobilizada.....</b>	<b>62</b>
<b>4.3</b>	<b>Caracterização Físico-Química da Matéria-Prima.....</b>	<b>64</b>
<b>4.4</b>	<b>Caracterização Cromatográfica da Matéria-Prima.....</b>	<b>65</b>
<b>4.5</b>	<b>Efeito da Temperatura.....</b>	<b>66</b>
<b>4.6</b>	<b>Efeito da Razão Molar Álcool: Ácido oleico.....</b>	<b>68</b>
<b>4.7</b>	<b>Ciclos de Atividade.....</b>	<b>71</b>
<b>4.8</b>	<b>Esterificação Enzimática Utilizando Fluido Supercrítico.....</b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>96</b>
	<b>ANEXO B.....</b>	<b>99</b>
	<b>ANEXO C.....</b>	<b>100</b>
	<b>ANEXO D.....</b>	<b>102</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

Uma alternativa à utilização de solventes convencionais na produção de compostos de alto valor econômico é o uso de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) em meio supercrítico ( $\text{scCO}_2$ ). Essa substância possui características úteis para seu uso, como: atóxico, não inflamável, baixo custo, disponibilidade em grandes quantidades, propriedades sintonizáveis entre solvente e solvatação, além de possuir pressão crítica de 73,8 bar (7,38 MPa), considerada moderada e sua temperatura crítica de 31,1 °C que é relativamente baixa (MADRAS, 2010).

O dióxido de carbono em condições supercríticas ( $\text{scCO}_2$ ), apresenta propriedades semelhantes aos solventes orgânicos mas com capacidade adicional de transporte aumentada devido à sua elevada difusividade que é a capacidade que as substâncias possuem de se misturar. A difusividade indica como uma substância se difunde através de um material e facilidade nas reações de separação por solvente, o que o torna mais atraente para serem utilizados como "solventes" (LOZANO *et al.*, 2004).

Uma das aplicações desses fluidos supercríticos é na síntese de biocombustíveis como o biodiesel (MADRAS, 2010). O biodiesel é obtido, geralmente, pela reação de transesterificação dos triglicerídeos de origem vegetal ou animal com um álcool de cadeia curta, tipicamente metanol ou etanol, na presença de um catalisador, produzindo uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos e glicerol, onde o catalisador pode ser ácido, básico ou enzimático, homogêneo ou heterogêneo (RODRIGUES *et al.*, 2007). A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP define biodiesel pela Resolução 42 de 24/11/2004 como um combustível composto de uma mistura de monoalquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais. O emprego do biodiesel pode ser puro ou misturado ao óleo diesel, sem a necessidade de modificações nas estruturas de motores. Por ser um combustível renovável, produzido a partir de insumos disponíveis no País, o uso de biodiesel possibilita a economia de divisas, geração de emprego, e a redução da emissão de gases que provocam o efeito estufa (KARRA; VELTMAN; KONG, 2008).

O biodiesel reduz as emissões de dióxido de carbono em 78% em uma base do ciclo de vida quando comparado ao diesel convencional (TYSON, 2001). Foi verificado



também que pode ter grandes melhorias no motor em relação às emissões de escape. Por exemplo, a combustão do biodiesel puro diminui a emissão de monóxido de carbono (CO) por 46,7%, a emissão de partículas por 66,7% e de hidrocarbonetos não queimados por 45,2% (SHUMAKER *et al.*, 2007).

A catálise enzimática foi à rota de produção de biodiesel empregada neste estudo. As enzimas são proteínas que atuam como biocatalizadores versáteis, requerendo um processo equivalente para cada tipo de reação orgânica. Do ponto de vista energético, as enzimas são muito eficientes, uma vez que operam a temperaturas e pressões moderadas, assim como em condições brandas de valores de pH.

Uma das mais importantes enzimas empregadas em biocatálise é a lipase, que tem sido aplicada na modificação de óleos e gorduras, síntese de compostos orgânicos, suplementos de detergentes, procedimentos analíticos, tratamento de resíduos ricos em gorduras, indústria farmacêutica, entre outras e biocombustíveis (CONTESINI *et al.*, 2009). O interesse pela utilização de biocatalizadores em  $scCO_2$  tem crescido rapidamente nos últimos anos, principalmente em aplicações industriais e piloto (RATHORE; MADRAS, 2007, MADRAS, 2010). As enzimas, como a lipase, podem ser usadas para catalisar processos de transesterificação e esterificação (foco deste trabalho) na forma imobilizada em um suporte adequado. A vantagem da imobilização é que a enzima pode ser reutilizada. Além disso, a temperatura de operação do processo é baixa (50 °C) em comparação com outras técnicas de produção de biodiesel (MUTHUKUMAR *et al.*, 2008). Por apresentar as seguintes propriedades: alta eficiência catalítica, alto grau de especificidade e a capacidade de acelerar reações químicas específicas sem a formação de subprodutos indesejáveis, tais características contribuem para o emprego crescente desses biocatalisadores em todos os campos da indústria, inclusive na produção de biocombustíveis (CONTESINI *et al.*, 2009).

Assim, esta dissertação tem como objetivo geral estudar os parâmetros nas reações de síntese enzimática de biodiesel por intermédios de fluidos supercríticos ( $scCO_2$ ), visando o desenvolvimento de um processo sustentável, tecnologicamente eficiente, ambientalmente adequado e que possibilite uma alternativa aos processos químicos tradicionais, estudando as condições ideais para a realização da síntese desses processos.

Levando em consideração este aspecto o objetivo global foi alcançado mediante as seguintes etapas:

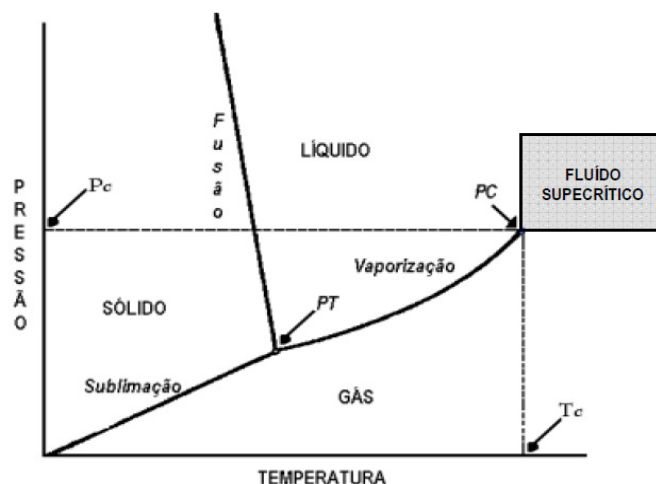
- 
- Produção e avaliação de um biocatalisador preparado de *C. antarctica* imobilizada covalentemente em quitosana.
  - Produção de biodiesel de óleos vegetais sob condições supercríticas por esterificação de ácido oleico e etanol.
  - Purificação das amostras de biodiesel e determinar os percentuais de conversão.
  - Caracterização das amostras de substratos e biodiesel através de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR).
  - Obtenção de condições ideais de reações de sínteses utilizando fluidos supercríticos.

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fluidos Supercríticos

Os fluidos supercríticos são definidos como um elemento ou um composto acima de sua pressão crítica,  $P_c$ , e sua temperatura crítica  $T_c$ . A temperatura crítica pode ser definida como a temperatura máxima na qual um gás pode ser convertido em um líquido por aumento de pressão. A pressão crítica é a pressão máxima na qual um líquido pode ser convertido em um gás por um aumento de temperatura. Acima da região crítica, há uma mistura de propriedades da fase gasosa a líquida. No ponto crítico, a distinção não pode ser feita nitidamente, pois as duas fases se tornam indistinguíveis (BRUNNER, 1994; SMITH, 1999).

Os fluidos supercríticos exibem várias propriedades incomuns, quer atribuída a gases, quer a líquidos, tais como difusividade e solvatação, respectivamente (DAMBISKI, 2007). Na Figura 1, é apresentada a região de existência de fluidos supercríticos. Uma comparação entre temperatura e pressão críticas de algumas substâncias utilizadas como solventes supercríticos é mostrada na Tabela 1 a seguir. Verifica-se que o dióxido de carbono apresenta moderada pressão crítica e considerável valor de pressão crítica.



**Figura 1:** Diagrama de Fases (gás/sólido/líquido/fluido supercrítico); onde PT= ponto triplo, PC= é o ponto crítico, Pc= é a pressão crítica e Tc= é a temperatura crítica (CARRILHO et al., 2001).

**Tabela 1** - Temperatura e pressão críticas de algumas substâncias utilizadas como solventes supercríticos.

Solvente	Tc (°C)	Pc (bar)
Dióxido de Carbono	31,1	73,8
Etano	32,3	48,8
Propano	96,7	42,5
Etanol	243,1	63,8
Água	374,2	220,5

Fonte: SMITH *et al.*, 2005.

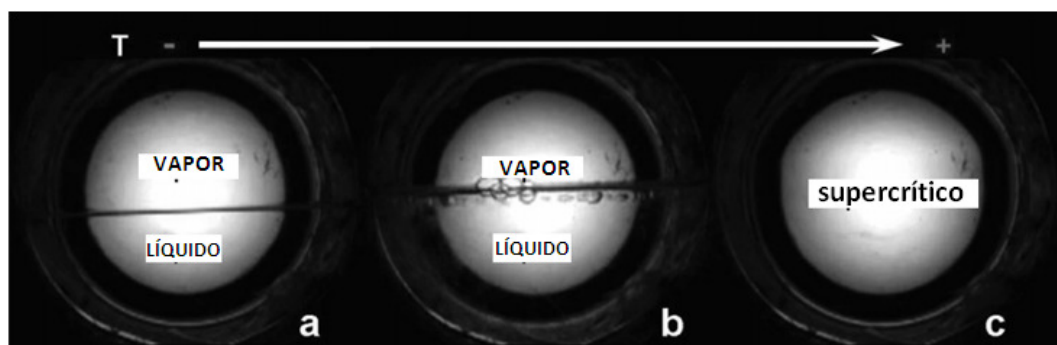
É possível notar características intermediárias entre gás e líquido em fluidos supercríticos. Na Tabela 2 a seguir é mostrada uma comparação entre algumas propriedades físico-químicas de gás, líquido e fluido supercrítico.

**Tabela 2** - Propriedades físico-químicas de gás, líquido e fluido supercrítico.

Propriedade	Gás	Fluido supercrítico	Líquido
Densidade (g/mL)	$10^{-4}/10^{-3}$	0,9	1
Difusibilidade (cm <sup>2</sup> /seg)	$10^{-2}/1$	$10^{-4}/10^{-3}$	$<10^{-5}$
Viscosidade (poise)	$10^{-4}$	$10^{-4}/10^{-3}$	$10^{-2}$

Fonte: CARRILHO *et al.*, 2001.

A Figura 2 apresentada abaixo, representa o comportamento de fase durante a formação de um fluido supercrítico.



**Figura 2.** a) um sistema bifásico é observado a temperaturas inferiores com menisco entre as fases líquido e gás. (b) com o aumento da temperatura, o menisco entre as duas fases começa a ficar menos nítido. (c) a uma temperatura superior, um fluxo supercrítico é observado. O processo é revertido pela diminuição da temperatura.

Fonte: HOBBS; THOMAS, 2007.

Em geral, quando uma mistura de líquido e gás em equilíbrio é aquecida, a expansão térmica faz com que o líquido torne-se menos denso. Ao mesmo tempo, o gás torna-se mais denso à medida que aumenta a pressão. No ponto crítico, as densidades das duas fases tornam-se idênticas e a distinção entre eles desaparece (Figura 2C). O estado supercrítico apresenta uma combinação de propriedades de gases e líquidos, o que os torna muito apropriado para o desenvolvimento de novos processos que não podem ser realizados convencionalmente com fluidos líquidos ou gasosos (WEN; JIANG; ZHANG, 2009).

Devido à criação de um ambiente de reação homogênea, os fluidos supercríticos possuem algumas vantagens, incluindo aumento da mistura entre as substâncias, da transferência de massa e calor, reação rápida, normalmente em nível de alguns minutos, são ambientalmente atóxicos, e por serem simples e de fácil aplicação para a produção contínua (HODES; MARRONE; HONG, 2004). As propriedades únicas em condições supercríticas, ou seja, aumento da solubilidade de um material em um fluido supercrítico, a sua densidade facilita o contato entre os reagentes, isso os torna ideais para a separação e extração de produtos úteis e para a oxidação da matéria orgânica. (MARRONE; HODES; SMITH, 2004). No entanto, estes apresentam algumas limitações relacionadas com o ambiente de operação e seus efeitos sobre os materiais. A corrosão e deposição de sal são os dois principais desafios para a maioria das aplicações industriais, especialmente para a água supercrítica (BERMEJO; COCERO, 2006; WEN; JIANG; ZHANG, 2009).

Apesar das limitações, o emprego de fluidos supercríticos mostra-se ser ambientalmente atóxico quando comparado aos processos químicos convencionais. Muitos dos novos processos, incluindo o fracionamento de produtos, tingimento de fibras, tratamento de sólidos contaminados, produção de pós de tamanhos micro/nanômetros e novas reações também têm sido desenvolvidas baseadas nas propriedades físicas e químicas únicas de fluidos supercríticos (MARR; GAMSE, 2000; AYMONIER; LOPPINET-SERANI; REVERON, 2006; MADRAS *et al.*, 2010).

Recentemente, têm surgido várias técnicas que empregam os fluidos supercríticos para a produção de biocombustíveis. Comparado com processos químicos convencionais e métodos bioquímicos, a tecnologia empregando fluidos supercríticos possui uma série de vantagens, tais como uma alta taxa de conversão de combustível, reação rápida, produção limpa, fácil eliminação de operação contínua e da necessidade de catalisadores (ZHANG, 2009; MADRAS *et al.*, 2010).

A principal técnica que emprega fluidos supercríticos para sintetizar biodiesel é através da transesterificação de óleos vegetais sem o uso de catalisadores. Comparado com o processo convencional catalítico, a técnica utilizando fluidos supercríticos possui um número de vantagens notáveis, tais como: a separação fácil, rápida reação e ser ambientalmente amigável. Isto se deve principalmente porque álcoois e óleos podem coexistir em uma única fase em condições supercríticas. A maioria desses estudos são conduzidos em laboratório, e ainda há uma falta de consenso sobre a mecanismos da reação, poucos são os processos baseados na produção contínua de biodiesel. A solubilidade aumentada dos reagentes possibilita um ambiente homogêneo e faz a transesterificação um processo favorável (HE; WANG; ZHANG, 2007; WEN; JIANG; ZHANG, 2009; MADRAS *et al.*, 2010).

## 2.2 Lipase

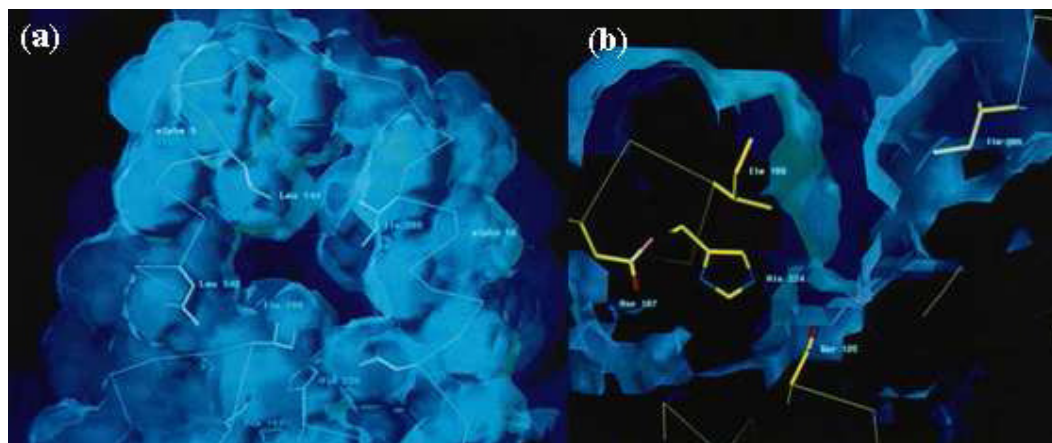
O uso de biocatalisadores em fluidos supercríticos para a transformação de óleos vegetais tem crescido significativamente nos últimos anos, dentre eles as lipases.

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas encontradas em diversos organismos, como animais, plantas, fungos e bactérias. São enzimas, que atuam na hidrólise de triacilgliceróis, por meio de reações sequenciais, a formação de diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos (COSTA; AMORIM, 1999; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

O uso de lipases na bioconversão de óleos e gorduras tem muitas vantagens sobre os catalisadores químicos clássicos. Lipases operam sob condições brandas de reação em uma faixa de temperaturas e pressões que minimizam a formação de produtos laterais. Tanto em meios aquosos ou não aquosos, lipases catalisam muitas reações como hidrólise, síntese de ésteres, transesterificação e interesterificação (HOU, 2002).

Em química orgânica, as lipases são as enzimas mais utilizadas devido à sua especificidade por um grande número de substratos, além de apresentar uma elevada enantioseletividade (KOELLER; WONG, 2001; REETZ *et al.*, 2002). Estas propriedades tornaram as lipases as enzimas com maior uso em biocatálise, por exemplo, em resolução de misturas racêmicas, na síntese ésteres aromatizantes, emulsificantes (MAG e DAG), polímeros, diagnósticos clínicos e outros (CONDE *et al.*, 1998; SALAZAR *et al.*, 1999;

PALOMO *et al.*, 2002). No entanto, a especificidade da enzima frente a substratos não naturais pode ser menor que a requerida para fins industriais.



**Figura 3.** Sítio ativo da lipase tipo B de *Candida antarctica* com (a) vista superior e (b) seção transversal (Uppenber *et al.*, 1994).

Neste estudo foi utilizada a lipase tipo B de *Candida antarctica* (CalB), que possui estrutura globular, constituída de 317 resíduos de aminoácidos, tem dimensões de 30 Å × 40 Å × 50 Å, massa molecular (MM) de 33 kDa e ponto isoelétrico (pI) de 6,0 (Figura 3), a sequência e a estrutura cristalina da CalB foi previamente determinada por Uppenber *et al.* (1994). Inicialmente foi proposto que uma pequena hélice  $\alpha 5$  presente na estrutura poderia atuar como uma tampa devido a observação de estruturas cristalinas em desordem, indicando uma possível região de alta mobilidade.

O pH ótimo desta enzima é 7,0, embora ela permaneça estável em uma ampla faixa de pH alcalino (7,0 a 10,0). Com relação à temperatura, mesmo a CalB não sendo tão estável na forma solúvel, na forma imobilizada esta enzima apresenta elevada estabilidade, podendo ser utilizada em altas temperaturas por várias horas sem perdas significativas de sua atividade (UPPENBERG *et al.*, 1994, KIRK; CHRISTENSEN, 2002).

O mecanismo de ação da lipase é chamado de ativação interfacial: as lipases podem se apresentar sob duas diferentes conformações, uma aberta (ativa) e uma fechada (inativa). Em meio aquoso homogêneo essas formas estão em equilíbrio, no entanto esse equilíbrio está deslocado para a conformação fechada. Na presença de superfícies hidrofóbicas (por exemplo, gotas de óleo) a lipase é adsorvida movendo o equilíbrio para a conformação aberta. A forma fechada exibe uma cadeia oligopeptídica helicoidal chamada

“tampa” ou *lid* isolando o sítio ativo do meio reacional. Na forma aberta, a “tampa” é deslocada por mudanças conformacionais e o sítio ativo é exposto ao meio reacional tornando a enzima ativa (SARDA; DESNUELLE, 1958; VERGER, 1997; PALOMO *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2009).

A CalB é um biocatalisador com uso bem diversificado e tem sido alvo de diversos estudos, pois exhibe elevada região-seletividade e enantioseletividade com relação às demais lipases. Na forma imobilizada opera em uma ampla faixa de condições experimentais. Diversos trabalhos têm mostrado a capacidade das lipases de atuação em variados meios com polaridades muito distintas, por exemplo, na catálise de reações de transesterificação em solventes orgânicos, meios aquosos e sistemas livres de solventes. Estas enzimas vêm sendo intensamente investigadas para uma série de aplicações, dentre elas na transesterificação de óleos e gorduras para a produção de biodiesel (COSTA; AMORIM, 1999; FUKUDA *et al.*, 2001; BAN *et al.*, 2002; NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005; TALUKDER *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007; TAMALAMPUDI *et al.*, 2008; DA CUNHA *et al.*, 2009).

As propriedades catalíticas das lipases podem ser facilmente moduladas pelas condições de reação e pequenas variações na estrutura da enzima podem causar significativas mudanças em suas propriedades, essa modulação pode ser realizada também com a imobilização por diferentes suportes e protocolos. Com o objetivo de alcançar um bom rendimento do produto de reação, faz-se necessário realizar a escolha certa dos parâmetros de reação que irão influenciar na atividade, seletividade e estabilidade da enzima (PALOMO, 2009).

O uso de enzimas livres não é favorável devido à perda de suas propriedades específicas como a atividade catalítica e consequente inativação. No entanto, esse empecilho pode ser solucionado através da imobilização da enzima em um suporte. Dentre esses suportes, destaca-se a quitosana, que é um polímero obtido principalmente a partir da desacetilação alcalina da quitina, a qual é o segundo polímero natural mais abundante depois da celulose e é encontrado nos exoesqueletos de artrópodes e alguns fungos (MANSUR; COSTA JR., 2008).

A principal vantagem da imobilização de uma enzima é que por possuírem um custo elevado, elas podem ter seu uso repetido. Enzimas imobilizadas podem ser separadas por processos de decantação após o término da reação e não necessitam de métodos especiais



de separação (ISO *et al.*, 2001). Por tanto, a fácil separação é outra vantagem apresentada para utilização de enzimas imobilizadas na produção de biodiesel.

As lipases imobilizadas estão tornando-se cada vez mais úteis para os processos biotecnológicos. A imobilização assegura o reuso das enzimas, pois permite a remoção da enzima do meio reacional, e minimiza o custo de separação dos produtos, desta forma superando o inconveniente econômico associado ao seu uso. A imobilização também fornece a flexibilidade operacional devido à melhora das estabilidades térmica e química das enzimas através da estabilização da estrutura terciária da proteína. Portanto, a enzima necessita ser altamente estável ou tornar-se altamente estabilizada durante a imobilização para ser aplicada em um processo industrial (BALCÃO *et al.*, 1996; VILLENEUVE, 2000; MATEO *et al.*, 2007).

O uso de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, devido à alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais, a sua alta especificidade, o fato de atuarem com alta eficiência em condições reacionais bastantes suaves (DALLA-VECCHIA, 2004).

Os ésteres obtidos por biocatálise podem ter diversas aplicações. Os produzidos a partir de ácidos graxos de cadeia curta têm aplicações na indústria alimentícia, de bebidas, cosméticos e medicamentos. Ésteres de ácidos graxos de cadeia longa têm sido usados como aditivos em combustíveis, alimentos, detergentes e cosméticos. Além disso, estes últimos são os principais constituintes do biodiesel (FERNANDES, 2007).

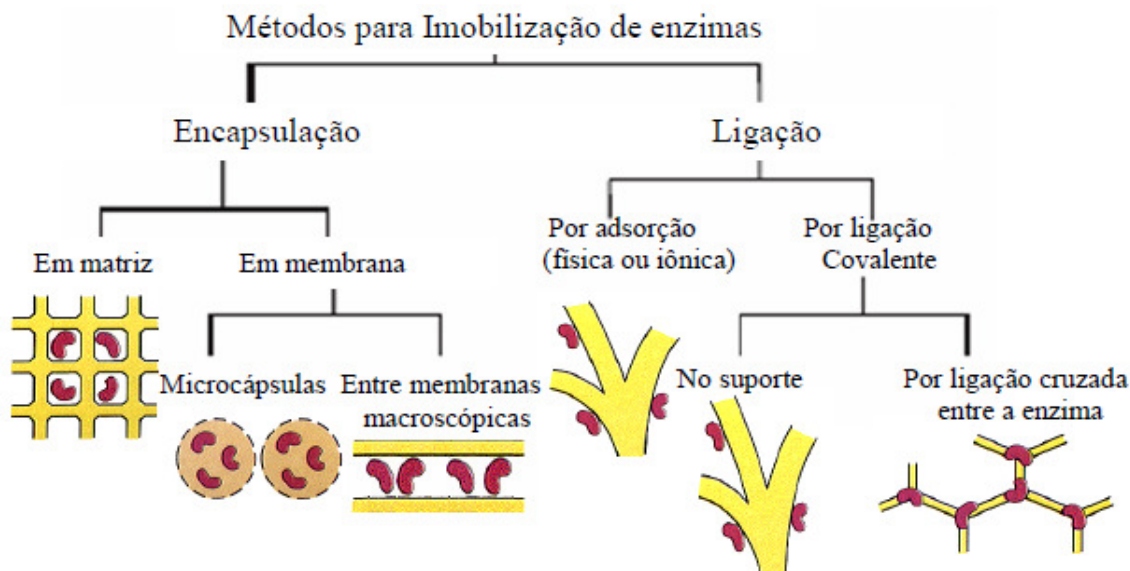
Na indústria cosmética, por exemplo, ésteres como o miristato e o palmitato de isopropila são utilizados como emolientes em cremes e óleos de banho (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Os ésteres de aroma e triacilgliceróis modificados são utilizados na indústria alimentícia, como por exemplo, triacilgliceróis enriquecidos com ácidos linoleicos conjugados (ABBAS; COMEAU, 2003; VILLENEUVE, 2007).

Diversos medicamentos têm ésteres como princípio ativo ou reações de síntese de ésteres são utilizadas durante a síntese de drogas quirais (GOTOR-FERNANDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006). Outros tipos de ésteres que têm recebido bastante atenção por serem biodegradáveis e produzidos de fontes naturais e renováveis são os biopolímeros (poliésteres). Alguns ésteres são também herbicidas, como o (S)-indanofan (JAEGER; EGGERT, 2002).

### 2.3 Métodos de imobilização

Os métodos de imobilização mais empregados são adsorção ou ligação covalente da enzima a um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional por de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulamento em membrana polimérica em micelas reversas. Convencionalmente, enzimas são imobilizadas em matrizes sólidas, embora sejam também utilizados alguns polímeros que podem ser solúveis ou insolúveis dependendo do pH, temperatura ou adição de espécies químicas, como mostrado na Figura 4 (VILLENEUVE, 2000; MONDAL *et al.*, 2006).



**Figura 4:** Métodos de imobilização de enzimas (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

A escolha do método de imobilização é feita pela avaliação de parâmetros como atividade enzimática global, efetividade de utilização de lipase, inativação e características de regeneração, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e as propriedades finais desejadas da enzima imobilizada ao suporte (MALCATA *et al.*, 1990).

Os métodos classificados como “ligação ao suporte” se baseiam na ligação da enzima ao suporte por meio de ligações covalentes, iônicas ou adsorção (por interações

iônicas, forças de “van de Waals”, pontes de hidrogênio, interações dipolo-dipolo ou interações hidrofóbicas), sendo esta última a mais amplamente utilizada (BALCÃO *et al.*, 1996). O método consiste em colocar em contato a solução aquosa da enzima e o suporte. Entre todos os métodos, o de adsorção é o mais utilizado para lipases devido a facilidades no preparo, na recuperação do suporte e ao baixo custo relativo. Este método tem sido muito útil em sistemas não aquosos, em que a dessorção consegue ser evitada devido à baixa solubilidade da enzima nos solventes hidrofóbicos (BALCÃO *et al.*, 1996; SECUNDO *et al.*; 2008).

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema, cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas como substratos e produtos, se difundem com velocidade maior. Os métodos baseados no confinamento da enzima envolvem a polimerização de materiais orgânicos ao redor da proteína, resultando no confinamento da enzima em uma matriz física. Apesar de ser um bom método para manter a conformação das enzimas, tem a desvantagem de dificultar a difusão dos substratos por entre os poros da matriz do suporte. A encapsulação em meios porosos como sol-géis tem sido utilizado para melhorar a atuação de enzimas em meio orgânico. A síntese destes géis envolve a hidrólise de siloxanos, que polimerizam e condensam gerando um sólido. A enzima é adicionada ao meio reacional e é encapsulada no gel quando ele é formado (WEHTJE *et al.*, 1993; REETZ *et al.*, 1996; VILLENEUVE *et al.*, 2000; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Os métodos baseados em ligações inter cruzadas (*crosslinking*) entre a enzima e o suporte pressupõem o estabelecimento de ligações covalentes. O reagente mais comumente utilizado para o *crosslinking* intermolecular é o glutaraldeído. A enzima é retida no suporte através da ligação covalente entre os grupos funcionais reativos do suporte e os grupos terminais da enzima. O procedimento envolve a modificação química de um resíduo de aminoácido, através da formação de uma ligação covalente da enzima com um material insolúvel em água, pela fixação da enzima em matriz por ligação covalente ou pela formação de ligações cruzadas numa matriz, contendo a enzima e usando vários agentes bifuncionais (GUISÁN, 1988, FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1993; CÁRDIAS, 1996).

A ligação covalente de enzimas a suportes sólidos pré-existentes é uma das estratégias mais utilizadas devido, principalmente, as seguintes propriedades conferidas aos derivados enzimáticos obtidos por este sistema (LÓPEZ-GALLEGUO *et al.*, 2005):

- 1) Caráter covalente, portanto a estabilidade da ligação.
- 2) Estabilização adicional que se pode obter quando a interação for multipontual, levando a uma maior resistência à inativação por efeito de temperatura, solventes orgânicos ou pH.
- 3) Fácil manipulação do derivado, e com isso a possível modificação das propriedades químicas ou catalíticas.
- 4) A carga de enzima permanece constante após a imobilização.
- 5) Os derivados podem ser utilizados em reatores contínuos, empacotados ou fixo, leito fluidizado ou tanque agitado.

A imobilização unipontual de enzimas acontece quando a interação entre a enzima e o suporte ocorre por uma única ligação. Este método pode ser realizado utilizando suporte de agarose ativado com brometo de cianogênio (CNBr), gerando uma ligação covalente entre a enzima e o suporte (GUISÁN, 1988). Esta imobilização se realiza a baixa temperatura e a pH 7, onde a interação da enzima sobre o suporte possivelmente ocorre pelo grupo amino mais reativo da proteína (o amino terminal), deste modo praticamente não existe rigidificação da enzima. Essa técnica pode produzir uma enzima imobilizada com propriedades muito similares às da enzima solúvel, permitindo o estudo da enzima livre de fenômenos intermoleculares (MATEO *et al.*, 2006).

A formação de ligações multipontuais entre a enzima e o suporte o que provoca mudanças conformacionais e, conseqüentemente, deformações no sítio ativo da enzima. Imobilizações em pH 10 favorecem a ocorrência de ligações multipontuais e quanto maior o tempo de incubação a tendência é ocorrerem cada vez mais interações (MATEO *et al.*, 2007). Este valor de pH é necessário para que os grupos aminos dos resíduos lisina ( $pK_a=10,7$ ) estejam desprotonados e conseqüentemente mais reativos favorecendo a formação das bases de Schiff entre a enzima e suporte, em condições alcalinas as proteínas tornam-se mais hidrofílicas (GUISÁN, 1988). Desta forma, os grupos amino terminais da enzima ligam-se aos grupos aldeído presentes no suporte (Figura 5), previamente ativado. A partir desta reação são formadas bases de Schiff entre a enzima e o suporte (PEDROCHE *et al.*, 2007).

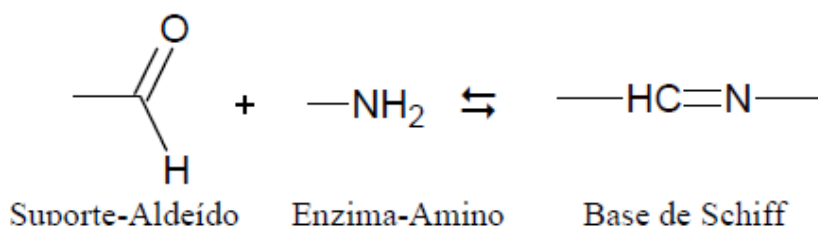


Figura 5: Ligação do suporte a enzima pela formação de base de Schiff.

## 2.4 Quitosana

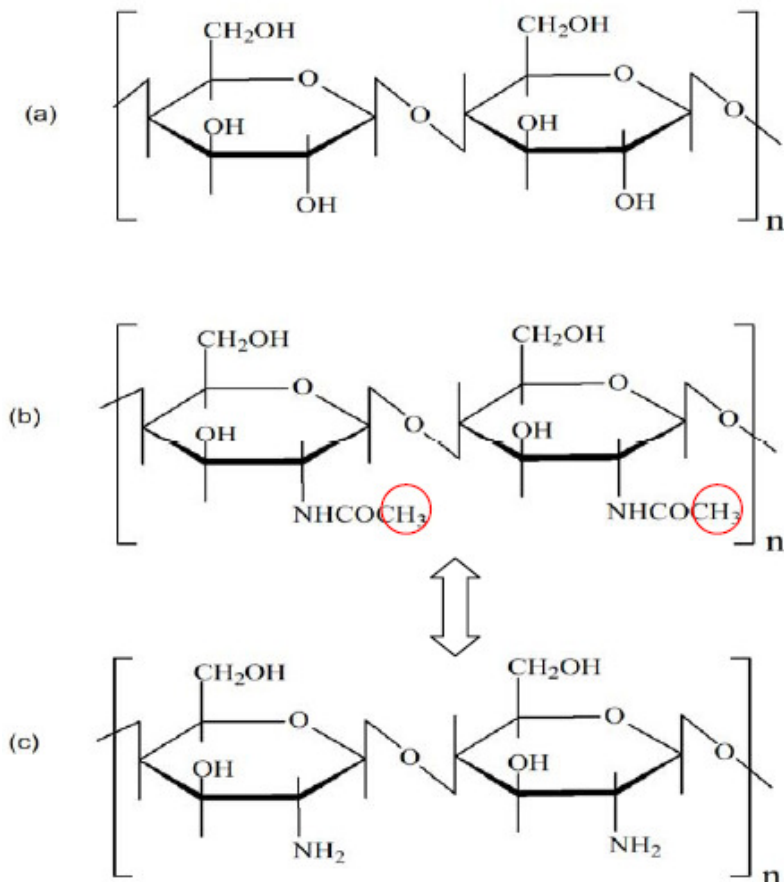
Dentre os diferentes suportes testados na imobilização de enzimas, quitosana tem sido amplamente empregada devido seu baixo custo, disponibilidade em grandes quantidades, e possibilidade de aplicação em diversos processos industriais. Quitosana é um polímero derivado do processo de desacetilação da quitina, que é tido como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, depois da celulose, obtida exclusivamente de exoesqueletos de crustáceos como, por exemplo, de caranguejo e camarão (KRAJEWSKA, 2004; BERGER *et al.* 2004).

A quitosana é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. Apresenta uma cadeia polimérica quimicamente similar à da celulose em que sua estrutura é formada pela repetição da unidade  $\beta$  (1,4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose. A Figura 6 apresenta as estruturas primárias da celulose, quitina e quitosana (KRAJEWSKA, 2004; GEORGE; ABRAHAM, 2006).

Grupos hidroxil (OH) estão dispostos na estrutura geral dos biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (NH<sub>2</sub>) na estrutura da quitosana. Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais (KRAJEWSKA *et al.*, 2004).

Devido a sua alta percentagem de nitrogênio (6,89%) comparado à celulose sintética substituída (1,25%), a quitosana é um potente agente geleificante, propriedade que é responsável por muitas aplicações desta em diversos setores de síntese e produção industrial,

ou seja, suas propriedades atóxicas e sua fácil formação de géis são de grande interesse industrial (BERGER *et al.*, 2004).



**Figura 6.** Representação esquemática das estruturas primárias de (a) celulose, (b) quitina e (c) quitosana (MUZZARELLI, 1973).

Na indústria química, a quitosana é largamente utilizada para aplicações em cosméticos, por sua natureza fungicida, na produção de filmes fotográficos, por sua resistência à abrasão, características ópticas e facilidade de obtenção de filmes, na indústria papelreira, aumentando a resistência mecânica e a impermeabilidade do papel e também na curtimento e acabamento de artefatos de couros (KUMAR, 2000; KRAJEWSKA, 2004).

A quitosana possui propriedades químicas e biológicas distintas. Sua cadeia linear de poliglicosamina com alta massa molecular e a presença de grupos amino e hidroxila reativos susceptíveis à modificações químicas, é uma característica desejável na utilização

como suporte para imobilização de enzimas. Propriedades biológicas incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade dentre outros. Isso justifica o fato dela ser utilizada como suporte por vários autores (ÇETINUS; ÖZTOP; 2000; SPAGNA *et al.*, 2001; ADRIANO *et al.*, 2005).]

## 2.5 Biodiesel

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) define o biodiesel como um biocombustível derivado de biomassa renovável para o uso em motores de combustão interna com ignição por compressão ou para geração de outro tipo de energia, que pode substituir total ou parcialmente o combustível fóssil (ANP, 2011).

A forma mais comum de produção de biodiesel é a transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais. A transesterificação não é um processo novo. Foi realizado no ano de 1853 por dois cientistas E. Duffy e J. Patrick. Desde essa época vários estudos têm sido realizados utilizando diferentes óleos (ROYON, 2007).

Na década de 1940, no Brasil, foram feitas as primeiras tentativas do uso de óleos e gorduras em motores de combustão interna. Na verdade, existem muitos relatos de estudos sobre o uso de alguns triacilgliceróis (óleos vegetais e gorduras animais), como: babaçu, coco, mamona e algodão, como também a produção de hidrocarbonetos por craqueamento termocatalítico (KRAUSE 2008).

No Brasil, na década de 1980, surgiu a primeira patente mundial de produção industrial de biodiesel por transesterificação, de autoria do engenheiro químico Expedito José de Sá Parente (OLGA, 2010).

Recentemente, o Governo Brasileiro retomou o programa de substituição de diesel por derivados de triacilgliceróis (óleos vegetais e gorduras animais) ressalta-se que o sebo bovino é a segunda matéria prima mais utilizada na produção de biodiesel no Brasil aproximadamente 17%, tendo autorizado o uso comercial do biodiesel por meio da Lei nº 11.097, de 13/01/2005, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira.

A principal estratégia é desenvolver o biocombustível a partir da produção de oleaginosas e etanol nacional, gerando emprego e renda nas diferentes regiões do País. Além de segurar maior autonomia no suprimento de combustíveis líquidos, contribui para melhorar a inserção internacional do Brasil nas questões ambientais globais, estabelece vanguarda no desenvolvimento de mercados novos para produtos potenciais subaproveitados (agricultura), cria mercados alternativos de expressão para commodities brasileiras (petróleo/gás, complexo soja, setor sucro-alcooleiro) com excesso de ofertas no mercado externo e desenvolver tecnologias nacionais para produção de combustíveis (MCT, 2002).

A Tabela 3 a seguir mostra propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial.

**Tabela 3.** Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial.

<b>Características</b>	<b>Propriedades Complementares</b>
Características químicas apropriadas	<i>Livre de enxofre e compostos aromáticos, alto número de cetano, ponto de combustão apropriado, excelente lubrificidade, não tóxico e biodegradável.</i>
Ambientalmente benéfico	<i>Nível de toxicidade compatível ao sal ordinário, com diluição tão rápida quanto a do açúcar.</i>
Menos poluente	<i>Reduz sensivelmente as emissões de (a) partículas de carbono (fumaça), (b) monóxido de carbono, (c) óxidos sulfúricos e (d) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.</i>
Economicamente competitivo	<i>Complementa todas as novas tecnologias do diesel com desempenho similar e sem a exigência da instalação de uma infraestrutura ou política de treinamento.</i>
Reduz aquecimento global	<i>O gás carbônico liberado é absorvido pelas oleaginosas durante o crescimento, o que equilibra o balanço negativo gerado pela emissão na atmosfera.</i>
Economicamente atraente	<i>Permite a valorização de subprodutos de atividades agro-industriais, aumento na arrecadação regional de ICMS, aumento da fixação do homem no campo e de investimentos complementares em atividades rurais.</i>
Regionalização	<i>Pequenas e médias plantas para produção de biodiesel podem ser implantadas em diferentes regiões do país, aproveitando a matéria prima disponível em cada local.</i>

Fonte: RAMOS, 1999; ANP 2011.



Apesar do biodiesel não possa substituir o diesel completamente, há pelo menos cinco razões que justificam seu desenvolvimento: 1) a formação de um mercado alternativo para produção de óleos vegetais e gorduras animais; 2) a redução da dependência da importação do petróleo; 3) é um combustível renovável; 4) redução das emissões de dióxido de carbono em 78% v/v em comparação ao diesel; 5) a emissão de monóxido de carbono, resultante da queima incompleta dos hidrocarbonetos e de material particulado, são inferiores ao diesel. Por outro lado, muitos testes comprovam o aumento das emissões de óxidos de nitrogênio (NOx) (GERPEN, 2005).

Com o intuito de garantir as metas de misturas de biodiesel ao diesel, 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; SANTOS; SUAREZ, 2007).

Desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 26 de outubro de 2009, que aumentou de 4% para 5% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel. A contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis. O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2009, de 1,6 bilhões de litros e uma capacidade instalada, em janeiro de 2010, para cerca de 4,7 bilhões de litros (ANP, 2011).

### **2.5.1 Matérias - Primas**

As matérias-primas para a produção de biodiesel são óleos vegetais, gordura animal e óleo de fritura. No Brasil, as principais matérias-primas para a produção do biocombustível são: soja (84%), sebo bovino (17%) e óleo de algodão (2%), entre outras oleaginosas existentes no País (ANP, 2011). O combustível também pode ser obtido a partir

de óleos residuais (provenientes de cozinhas industriais) e de gorduras animais (sebo bovino, óleos de peixes, banha de porco, entre outros) (MELLO; PAULILLO; VIAN, 2007).

Os óleos e gorduras são constituídos predominantemente de substâncias conhecidas como triglicerídeos (também chamadas de triacilgliceróis ou triacilglicerídeos), que são ésteres formados a partir de ácidos carboxílicos de cadeia longa (ácidos graxos) e glicerol (STREITWIESER; HEATHCOCK; KOSOWER; 1992).

Apesar de o Brasil possuir uma grande diversidade de insumos agrícolas para a produção de óleos vegetais e, conseqüentemente, de biodiesel, muitas culturas ainda tem caráter extrativista, não havendo plantios comerciais que permitam avaliar suas reais potencialidades. Diante deste aspecto, a soja, que representa 90% da produção brasileira de óleos vegetais, o dendê, o coco, o girassol e a mamona são as principais opções (MELLO; PAULILLO; VIAN 2007).

Soja, a matéria prima mais utilizada é uma das que apresentam menos rendimento e isto demanda grandes extensões de terras agricultáveis. Dendê, *Jatropha*, algas e macaúba são mais promissoras (SUAREZ *et al.*, 2009). Na Tabela 4 existe um quadro comparativo entre as produtividades, por hectare, de diversas fontes de óleos e gorduras tradicionais e também de algas.

**Tabela 4** - Comparação de algumas fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel.

Fonte de biodiesel	Produtividade de óleo (L ha <sup>-1</sup> )	Área necessária (Mha) <sup>a</sup>
Milho	172	1540
Soja	446	594
Canola	1190	223
Coco	2689	99
Óleo de palma	5950	45
Microalga <sup>b</sup>	136900	2
Microalga <sup>c</sup>	58700	4,5

<sup>a</sup> Área suficiente para atender a 50% da demanda de combustível nos EUA; <sup>b</sup> variedades com 70% óleo (por peso) na biomassa; <sup>c</sup> variedades com 30% óleo (por peso) na biomassa.

Fonte: SUAREZ *et al.*, 2009

A utilização energética dos óleos vegetais como combustíveis, além dos benefícios ambientais já comprovados, podem favorecer lugares menos favorecidos com o aumento da oferta de empregos, resultando na valorização do campo e do trabalhador rural. E no Nordeste principalmente, contribuirá para erradicar ou diminuir a miséria do campo por

meio de assentamentos familiares. Onde a demanda mundial por biocombustíveis de origem renovável será crescente, e o Brasil tem potencial para ser um grande exportador mundial, principalmente no contexto atual de mudanças climáticas, daí a possibilidade das regiões mais carentes do Brasil se tornar grandes produtoras de biodiesel (HOLANDA, 2004; COSTA FILHO, 2008).

Outra matéria-prima que pode ser utilizada para produção de biodiesel são as gorduras animais. A utilização da gordura para a produção de biodiesel se configura como uma alternativa promissora, visto que possibilita a conversão de um resíduo altamente impactante em uma fonte de energia renovável, além de criar novas alternativas de renda para pequenos produtores, tanto pelo surgimento de demanda por insumos (etanol anidro - cana-de-açúcar) e disponibilização do subproduto (glicerol - sabonetes), como pela utilização do biodiesel em sistemas de aquecimento de aves e suínos (ABREU; HIGARASH; CUNHA JÚNIOR, 2008).

Destaca-se, além dos óleos e gorduras virgens, como matéria prima para a produção de biodiesel, os óleos e gorduras residuais, resultantes de processamentos domésticos, comerciais e industriais. Os óleos de frituras representam um potencial de oferta surpreendente, superando, as mais otimistas expectativas. Tais óleos têm origem em determinadas indústrias de produção de alimentos, nos restaurantes comerciais e institucionais, e ainda, nas lanchonetes.

Os óleos residuais sofrem diversas transformações químicas e físicas durante a fritura, daí a necessidade de uma modificação das tecnologias existentes para a produção de um biodiesel de qualidade aceitável. E como matéria-prima ácida, requer um processamento distinto do emprego em óleos e gorduras refinadas para a síntese de biodiesel (COSTA FILHO, 2008; CHEN, 2009).

As microalgas são promissoras matérias primas para a produção de biocombustíveis. Apresentam alta produtividade e diversas vantagens tais como: um ciclo de vida de poucos dias, permitindo colheitas contínuas e diminuindo as necessidades de logística de armazenagem necessárias para o caso de culturas anuais e, a possibilidade de utilizar como insumo para a fotossíntese das algas o CO<sub>2</sub> oriundo de empresas poluidoras, assim diminuindo as emissões que contribuem para o efeito estufa. Contudo, a produção industrial de óleos a partir de microalgas ainda apresenta uma série de problemas tecnológicos. Dificuldades essas que fazem o custo de produção de óleo a partir do cultivo de algas sejam

hoje até 20 vezes superior ao custo a partir da soja, não havendo previsão para que nos anos próximos esta tecnologia possa ser usada em larga escala. Daí a necessidade de muita pesquisa e desenvolvimento para viabilizar o processo de obtenção de óleo a partir de algas para abastecer a indústria de biodiesel (SUAREZ *et al.* 2009).

Neste trabalho foi utilizado ácido oleico (C 18:1) para a realização das reações de esterificação devido a sua presença na maioria dos óleos que são utilizados para produção do biodiesel. Em especial, o óleo de canola, palma e colza que possuem este óleo como componente majoritário. O ácido oleico é um dos ácidos carboxílicos que ocorre em grandes quantidades na maioria dos lípidios, portanto, em matérias-primas será um dos ácidos graxos responsáveis pela acidez livre existente (VISENTAINER; FRANCO, 2006).

## 2.5.2 Métodos de obtenção do Biodiesel

Destaca-se a seguir os principais métodos de obtenção de biodiesel, a esterificação e a transesterificação.

### 2.5.2.1 Esterificação

A esterificação consiste na reação de um ácido graxo com um álcool, a elevadas temperaturas, e é auxiliada por um catalisador ácido, geralmente ácido sulfúrico, fornecendo como subprodutos água e ésteres alquílicos. Tradicionalmente, os catalisadores homogêneos, ácidos fortes, são utilizados nessas reações. No entanto, os ácidos sólidos tem muitas vantagens sobre os ácidos líquidos. Eles fazem menos danos ao meio ambiente e não apresenta problemas de corrosão ou descarte de efluentes. Eles são reutilizáveis e fácil de serem separados de produtos líquidos (ARANDA *et al.*, 2008; SHU 2007).

Três fatores principais afetam a taxa e a eficiência da conversão numa reação de esterificação são eles: temperatura de reação, razão molar de álcool e óleo, e a quantidade de catalisador (CANAKCI; GERPEN, 2001).

A esterificação de ácidos graxos (Figura 7) apresenta-se como uma solução viável para alguns problemas relacionados à produção de biodiesel. Nessa reação, não há formação de glicerol e a matéria prima utilizada tem custo menor (borra ácida e óleo bruto com alto teor de ácidos graxos livres).

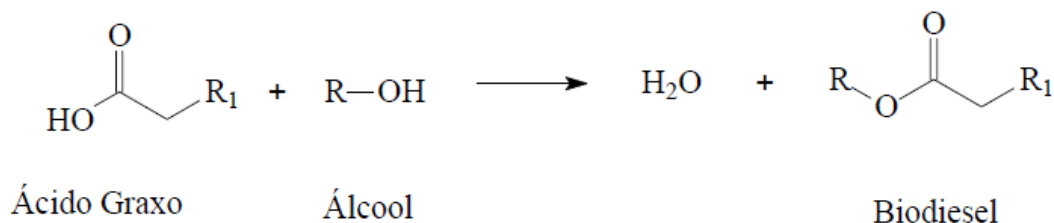


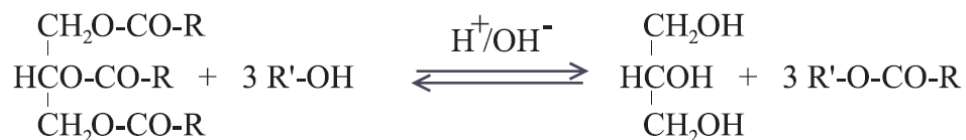
Figura 7. Reação de esterificação.

Nesse contexto surge a hidroesterificação. O processo de hidroesterificação (hidrólise seguida de esterificação) é uma boa alternativa na produção de biodiesel. A produção de biodiesel pela rota de hidroesterificação é realizada em duas fases. A primeira etapa é a hidrólise de tri, di e monoacilgliceróis, produzindo ácidos graxos livres e glicerol. Após esta etapa, a fase orgânica que contém os ácidos graxos livres é separada da fase aquosa que contém o glicerol. Na segunda etapa, os ácidos graxos são esterificados com um álcool para obtenção de biodiesel. O processo de hidroesterificação também permite o uso de qualquer matéria-prima graxa (gordura animal, óleo vegetal, óleo de cozinha usado, resíduos ácidos provenientes da produção de óleos vegetais, entre outros), independentemente da sua acidez e teor de água. Isto dá-lhe um vantagem sobre o processo de transesterificação convencional, que inevitavelmente gera sabões, na presença de ácidos graxos, inativa o catalisador e, o que torna difícil separar o biodiesel a partir do glicerol, que afeta o rendimento das plantas (FREIRE *et al.*, 2010).

### 2.5.2.2 Transesterificação

O método mais empregado para a síntese de biodiesel é através da reação de transesterificação. A transesterificação (Figura 8) é a reação de óleos vegetais ou gordura

animal com um álcool, o metanol, na maioria dos casos, para formar ésteres e glicerol. A reação de transesterificação é afetada pelo tipo de álcool, razão molar de glicerídeos de álcool, tipo e quantidade de catalisador, temperatura de reação, tempo de reação e os ácidos graxos livres, teor de água, de óleos vegetais ou gorduras animais. A reação transesterificação ocorre com ou sem um catalisador, utilizando álcoois alifáticos primários ou secundários, monohídricos com 1-8 átomos de carbono (DEMIRBAS, 2006).



**Figura 8.** Reação de transesterificação.

Transesterificação pode ser catalisada tanto por ácidos e bases. Industrialmente, os catalisadores homogêneos utilizados são bases, incluindo hidróxidos de sódio ou de potássio ou alcóxidos. A catálise básica é preferível à utilização de catalisadores ácidos como o ácido sulfúrico ou sulfônico, dada a corrosividade e menor atividade dos últimos. Contudo, a remoção da base após a reação é problemática, pois a prática atual de arrefecimento aquoso com ácido resulta em um grau de saponificação (ou seja, a hidrólise de ésteres e formação do correspondente carboxilato), bem como a formação de emulsões que tornam a separação dos ésteres de ácidos graxos difícil, além de um fluxo de água alcalina residual é gerada (MA; HANNA, 1999).

O uso de metóxidos nas reações de transesterificação também tem a vantagem de promover apenas a neutralização dos ácidos graxos livres, enquanto os hidróxidos, além da neutralização, também causam a saponificação dos triglicerídeos diminuindo o rendimento dos ésteres etílicos obtidos. As principais desvantagens dos alcóxidos são a dificuldade de manipulação uma vez que são mais higroscópicos que os hidróxidos, além do custo (MARQUES *et al.*, 2008).

Os catalisadores heterogêneos, por serem reutilizáveis, contribuem com a diminuição dos custos de produção, além de permitirem a realização de duas reações simultâneas (transesterificação e esterificação). Os catalisadores heterogêneos são facilmente separados do produto final e têm como vantagem a capacidade de gerar produtos de maior qualidade, uma vez que atuam sobre substratos específicos. A sua utilização possibilita a

recuperação de grandes quantidades de produto formado, sem a necessidade de recorrer a estratégias de separação caras. Por estas razões, recentemente, têm sido publicados na literatura estudos sobre a utilização de catalisadores heterogêneos, básicos e ácidos, capazes de proporcionar uma reação de transesterificação eficiente, com elevada taxa de conversão e que possibilite um menor custo de produção possível. Para contornar problemas da catálise básica, o uso de catalisadores heterogêneos tem sido explorado. Os catalisadores heterogêneos eliminam a necessidade de extinguir uma solução aquosa e em grande parte a formação de sais metálicos, simplificando as etapas de separação, conseqüentemente, a produção de biodiesel pode ser mais facilmente realizada como um processo contínuo. Com base na sua pronta disponibilidade, os catalisadores ácidos sólidos como zeólitas, argilas e resinas de troca iônica são atrativos para esse fim. No entanto, as taxas de reação são geralmente consideradas inaceitavelmente baixas (SHUMAKER, 2007).

### 2.5.2.3 Produção de Biodiesel pela rota enzimática

A busca industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente. As enzimas são catalisadores biológicos de altíssima eficiência catalítica, em geral muito maior que a dos catalisadores sintéticos, pois têm alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas e, em alguns casos, podem funcionar tanto em soluções aquosas quanto em solventes orgânicos (REDA; CARNEIRO, 2007).

Assim, o processo enzimático é uma ótima metodologia para a produção de biodiesel, pois não há corrosão dos equipamentos, o gasto de energia é reduzido, o custo no tratamento de resíduos é mais baixo e, além disso, raramente ocorrem reações colaterais que levam ao desperdício (devido à formação de produtos secundários).

A produção de biodiesel pode ocorrer pela reação de transesterificação catalisada por lipases. As lipases mais utilizadas em trabalhos científicos são *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mucor miehei* (Lipozyme®), *Thermomyces lanuginosus*, *Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae* (KAIEDA *et al.* 2001; BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2003; SALIS *et al.* 2005; HAMA, 2007; ROYON; 2007; FORESTI; 2008).

Biocatalisadores, como as lipases também estão sendo empregados na produção de biodiesel. Entre outras vantagens, a catálise enzimática pode ser conduzida em condições amenas, é quimiosseletiva e leva ao produto com bons rendimentos (MARQUES *et al.*, 2008).

A produção de biodiesel por catálise enzimática deve considerar alguns fatores como: origem da enzima, quantidade de enzima, razão molar entre os reagentes óleo e álcool, tipo de álcool, uso de solvente orgânico na reação, temperatura da reação, quantidade de água adicionada na mistura e reuso da enzima (RODRIGUES, 2009).

A catálise enzimática é uma alternativa que atende aos apelos atuais da Química Verde, reduzindo o impacto ambiental pela minimização dos resíduos gerados no processo (MACEDO; MACEDO, 2004).

#### **2.5.2.4 Fluidos Supercríticos: Estratégia para a Produção de Bicomcombustível**

A aplicação de fluidos supercríticos (SFC) é uma técnica emergente para a produção de bicomcombustível limpo e de alto rendimento. Comparado com processos termoquímicos convencionais e métodos bioquímicos, essa tecnologia possui uma série de vantagens, tais como uma alta taxa de conversão de combustível, reação rápida, produção limpa, fácil operação contínua, e a eliminação da necessidade de catalisadores (WEN; JIANG; ZHAN, 2009).

A maioria dos estudos com fluidos supercríticos tem empregado como solvente o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O CO<sub>2</sub> em condições supercríticas (scCO<sub>2</sub>) tem potencial interesse para a síntese enzimática, pois não é tóxico, não inflamável e facilmente disponível. Além disso, a enzima não se dissolve em dióxido de carbono, e a separação pode ser facilmente alcançada por redução da pressão (MADRAS *et al.*, 2004).

A técnica empregando fluido supercrítico pode ser usada para sintetizar o biodiesel através da transesterificação de óleos vegetais sem a utilização de catalisadores. Em comparação com os processos convencionais de catálise, a técnica com fluidos supercríticos possui uma série de vantagens notáveis, como a separação fácil, rápida reação e ser ambientalmente amigável. Isto é principalmente porque alcoóis e óleos podem coexistir em uma única fase, nas condições supercríticas (WEN; JIANG; ZHAN, 2009).



A transesterificação catalítica na presença de solventes orgânicos é limitada devido à transferência de massa, logo os fluidos supercríticos são apontados para ser uma alternativa a essa problemática. A síntese de biodiesel utilizando reações com metanol e etanol em estado de fluidos supercríticos, o catalisador não é necessário e a conversão pode ser alcançada quase completamente, além de o tempo reacional ser curto (MADRAS, KOLLURU; KUMAR, 2004).

Reações enzimáticas em dióxido de carbono supercrítico têm sido consideradas como uma forma prática de conseguir uma melhor taxa de produção de bicompostíveis. A exigência de consumo de energia e do equipamento é muito menor para SCFs CO<sub>2</sub> do que a SFC metanol e etanol. A separação também pode ser facilmente alcançada através da redução da pressão, como os produtos e enzima não se dissolvem em dióxido de carbono em condições ambientais (MADRAS, KOLLURU; KUMAR, 2004). No entanto, uma investigação mais aprofundada do efeito da enzima sobre o consumo total de energia e os benefícios é ainda necessária para avaliar este método.

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentados os materiais e métodos empregados no desenvolvimento deste trabalho. Serão descritos a metodologia para a caracterização do óleo utilizado, os procedimentos experimentais envolvendo as etapas de preparação do biocatalisador e o seu emprego na reação de esterificação utilizando fluido supercrítico e o dispositivo experimental concebido para realização desses experimentos.

#### 3.1 – Materiais

##### 3.1.1 Enzima

A enzima utilizada para catalisar as reações de esterificação enzimática foi a lipase (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3) de *Candida antarctica* tipo B (CalB), Lipozyme CalB. L., adquirida junto à CODEXIS. A atividade hidrolítica foi  $126 \pm 10$  U/mL. A quantidade de proteína medida no extrato foi de 4,9 mg/mL (método de Bradford). A atividade específica foi de 25,9 U/mL do extrato.

##### 3.1.2 Suportes para imobilização

Foi utilizado como suporte para imobilização quitosana em pó com grau de desacetilação (quantidade de grupos aminos livres no polissacarídeo) de 85,2 % adquirido junto a POLYMAR IND LTDA, Fortaleza, Ceará.

### 3.1.3 Agentes ativantes:

Para a ativação dos suportes foram utilizados os seguintes reagentes: glicidol (2,3-epóxi-1-propanol) 96 % (v/v) da Sigma-Aldrich, glutaraldeído 25 % (v/v) da Vetec/SP e etilendiamina (EDA) da J.T. Baker/SP.

### 3.1.4 Substratos:

Foram utilizados para a reação de esterificação ácido oleico comercial para síntese (VETEC) e álcool etílico comercial (VETEC, 99, 8% de pureza) como substrato em todos os experimentos. Para a dosagem da atividade hidrolítica da enzima solúvel e do derivado foi empregado, butirato de p-nitrofenila (pNPB) da Sigma-Aldrich. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 3.1.5 Fluido Supercrítico:

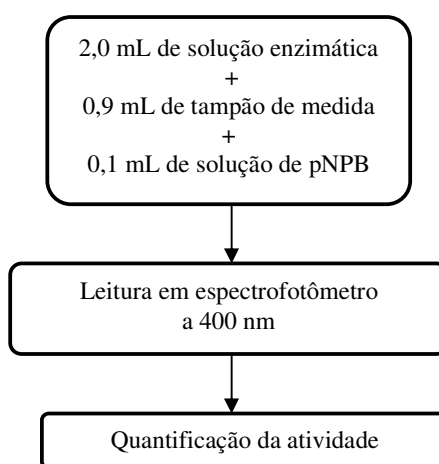
Como fluido supercrítico foi empregado dióxido de carbono ou gás carbônico (CO<sub>2</sub>) industrial, massa molecular 44,01 g/mol; pressão de vapor a 20° C e 838 psig; densidade do vapor (ar = 1) 1,522 a 21 °C; massa específica 1,833 kg/m<sup>3</sup> contido num cilindro de gás proveniente da White Martins.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Medida da atividade hidrolítica da enzima solúvel

A atividade hidrolítica da lipase foi quantificada pela concentração de p-nitrofenol formada, quantificada espectrofotometricamente a 400 nm, conforme metodologia descrita por BHATNAGAR *et al.* (2005).

Para as análises de enzima livre, retiraram-se alíquotas de 2,0 mL da solução de enzima. Realizaram-se diluições da enzima livre, e 2 mL da solução enzimática foram adicionados a 0,9 mL do tampão de medida (fosfato de sódio 25 mM pH 7,0) e 0,1 mL da solução de pNPB a 25 °C. Fez-se a leitura em espectrofotômetro a 400 nm com o auxílio do programa Reaction Kinetics<sup>®</sup>, o procedimento empregado está esquematizado na Figura 9.



**Figura 9** - Fluxograma mostrando a medida da atividade hidrolítica da enzima solúvel.

Para a determinação da atividade enzimática foi previamente obtida uma taxa de consumo (hidrólise) do pNPB a partir da construção de uma curva de calibração com diferentes concentrações do precursor deste éster, o pNP. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1  $\mu$ mol de pNPB por minuto em pH 7,0 e temperatura ambiente. Assim, foi possível avaliar a atividade da enzima solúvel e das alíquotas do sobrenadante no decorrer do processo de imobilização da enzima (Equação 1). A solução de pNPB foi realizada utilizando 26  $\mu$ L deste éster em 10 ml de álcool isopropílico (diluição feita em balão volumétrico).

$$A_t = \frac{\alpha \cdot f_c \cdot V_r \cdot D}{V_{enzima}} \quad (1)$$

Onde:

$A_t$  = Atividade enzimática (U.mL<sup>-1</sup>)

$\alpha$  = (*slope* solução enzima – *slope* branco) (abs.min<sup>-1</sup>)

$f_c$  = fator da curva de calibração do pNP ( $f_c = 0.092281 \mu\text{mol}/(\text{mL abs})$ )

$V_r$  = volume de reação (mL)

$D$  = diluição da amostra

$V_{enzima}$  = volume da solução de enzima (mL)

### 3.2.2 Determinação da atividade hidrolítica da enzima imobilizada

A atividade hidrolítica da lipase na forma imobilizada foi quantificada pela concentração de pNP formada pela hidrólise do pNPB, quantificado espectrofotometricamente a 400nm. No esquema mostrado a seguir (Figura 10) está sumarizado o procedimento de dosagem da atividade da lipase imobilizada. A determinação da atividade de hidrólise da enzima imobilizada foi realizada da seguinte forma, foi adicionado 2,9 mL tampão fosfato 25 mM, pH = 7,0, junto com 0,1 mL sol pNPB 15mM em isopropanol sendo a reação iniciada com a adição de 0,03 g de biocatalisador. A leitura da absorbância a 400 nm foi realizada, alíquotas de 2 mL do sobrenadante foram retiradas a cada 2 minutos e foram lidas imediatamente no espectrofotômetro. Como referência para o espectrofotômetro foi utilizada uma alíquota retirada do meio reacional antes da adição do biocatalisador. A reação de hidrólise foi monitorada durante 12 min. A atividade de hidrólise do derivado foi dada em unidades por grama de biocatalisador (U/g), como mostrado na Equação 2.

$$A_t = \frac{\alpha \cdot f_c \cdot V_r}{M_s} \quad (2)$$

Onde:

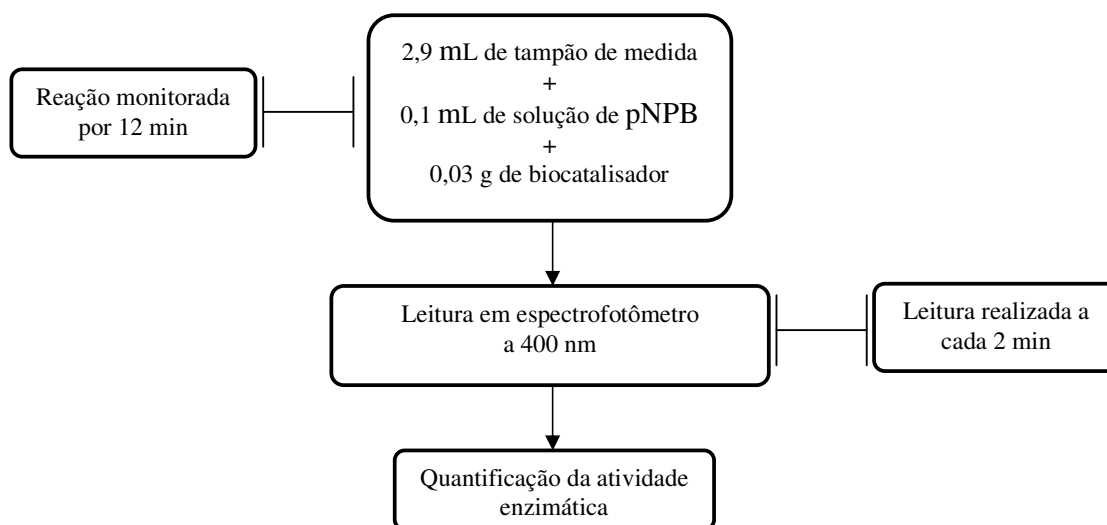
$A_t$  = Atividade enzimática ( $U \cdot g^{-1}$ )

$\alpha$  = (*slope* solução enzima – *slope* branco) ( $abs \cdot min^{-1}$ )

$f_c$  = fator da curva de calibração do pNP ( $f_c = 0.092281 \mu mol / (mL \ abs)$ )

$V_r$  = volume de reação (mL)

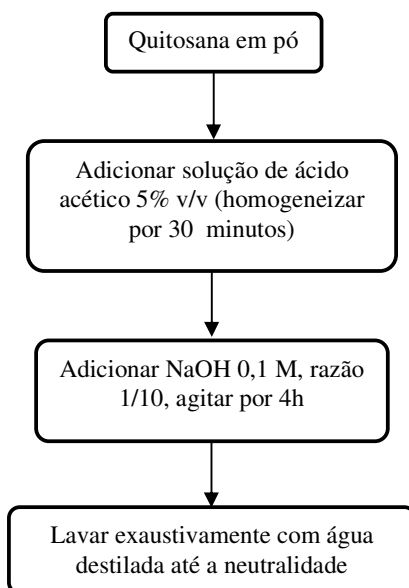
$M_s$  = Massa do suporte (g)



**Figura 10** - Fluxograma mostrando a determinação da atividade hidrolítica da enzima imobilizada.

### 3.3 Preparação de hidrogéis de quitosana

A Quitosana em pó foi dissolvida em solução de ácido acético 5% v/v. A solução resultante foi mantida em homogeneização por 30 minutos. O sistema foi adicionado lentamente à solução de NaOH 0,1M na razão de 1/10 e mantido sob agitação moderada por 4h a temperatura ambiente. Após este procedimento o hidrogel obtido foi filtrado e lavado exaustivamente com água destilada até a neutralidade. Na figura 11, está esquematizado o procedimento de preparação dos hidrogéis empregando diferentes concentrações de quitosana 5% (m/v).

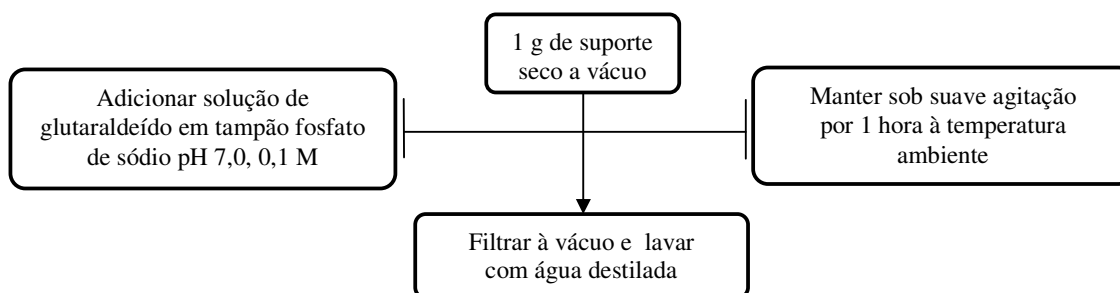


**Figura 11** - Fluxograma mostrando a preparação do gel de quitosana. Observa-se no esquema apresentado a ordem na qual os reagentes foram colocados para a realização do ensaio.

### 3.4 Protocolos de ativação de hidrogéis de quitosana

#### 3.4.1. Ativação do suporte via glutaraldeído

A ativação dos suportes foi realizada com solução de glutaraldeído 5% v/v em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 por 1h a 25°C (razão  $V_{gel}/V_{total}$  de 1/10). Após a ativação, as partículas foram lavadas com excesso de água destilada para retirar o excesso de glutaraldeído (Figura 12).



**Figura 12** - Fluxograma mostrando a ativação via glutaraldeído dos géis preparados.

### 3.4.2 Ativação de gluteraldeído-Quitosana via glicidol

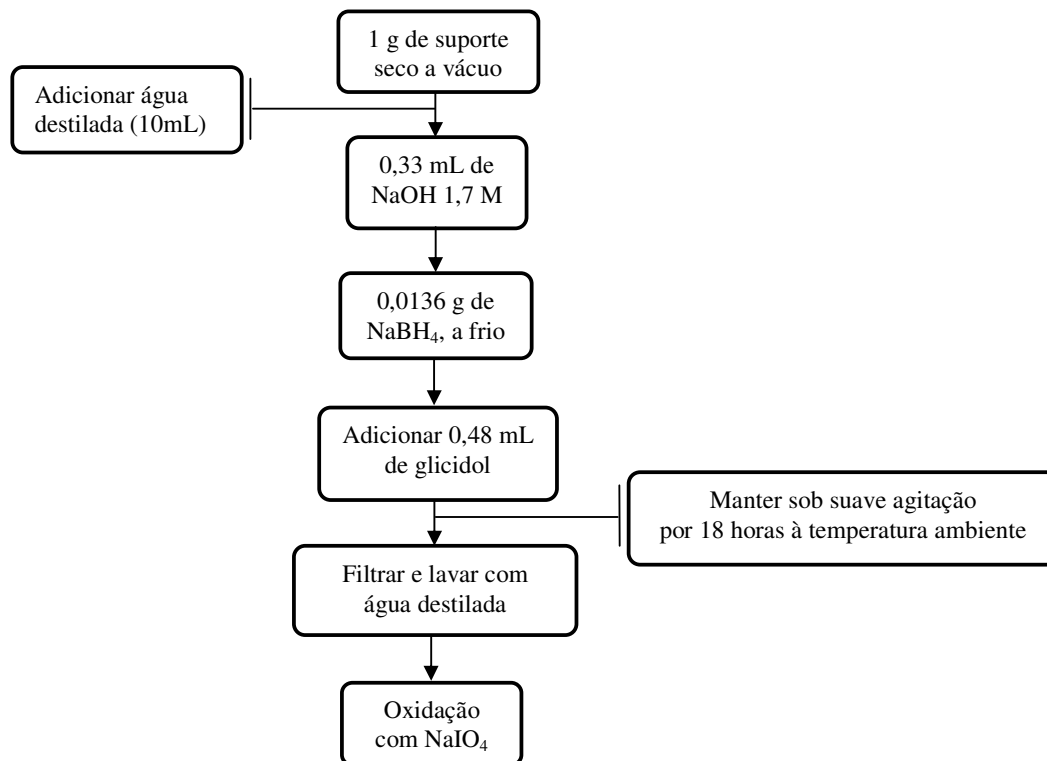
A Figura 13 mostra o fluxograma do procedimento adotado de preparação gluteraldeído-glioxil-quitosana, de acordo com metodologia adaptada de Adriano (2008). O suporte preparado gluteraldeído-quitosana (item 3.4.1) suspenso em água e mantido sob suave agitação em banho de gelo. Foi preparada uma solução de NaOH 1,7 M e borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) 0,75 M equivalente a 1/3 (m/v) da massa do suporte. Acrescentou-se a solução básica de NaBH<sub>4</sub> a suspensão do suporte em água destilada e o sistema foi mantido sob agitação e em banho de gelo para evitar a perda do agente redutor por liberação de H<sub>2</sub>. Em seguida, foi adicionado lentamente, 48 % (m/v) do suporte de glicidol, lentamente, em temperatura próxima de 5-10 °C. A suspensão foi mantida sob agitação mecânica em recipiente aberto por 18 h à temperatura ambiente para liberação de H<sub>2</sub> formado no meio reacional. Os grupos hidroxilas presentes no suporte foram ativados a gliceril, para a realização da etapa de oxidação. O suporte gliceril foi seco a vácuo e lavado com água destilada até pH neutro.

Na etapa seguinte, os grupos gliceril formados na superfície do suporte foram oxidados a glioxil, por suspensão de gliceril-suporte em água destilada na razão 1/10 (m/v) e ao qual foram adicionados 300 μmols de periodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>) por grama de suporte. Um μmol de NaIO<sub>4</sub> oxida um μmol de OH do suporte, portanto, dependendo do grau de ativação desejado (quantidade de grupos aldeídos/quantidade de hidroxilas na superfície do suporte) a quantidade de periodato necessária deve ser calculada utilizando a Equação 3. A oxidação foi mantida sob suave agitação por 2 h à temperatura ambiente. O suporte oxidado foi lavado exaustivamente com água destilada, para eliminar formaldeído produzido e foi estocado a 4 °C.

$$M_{NaIO_4} (g) = \frac{(\mu\text{moles aldeído} / g \text{ de suporte}) \cdot m_{\text{suporte}} \cdot MM_{NaIO_4}}{1 \cdot 10^6} \quad (3)$$

Onde:  $M_{NaIO_4}$  é a massa de periodato de sódio utilizada (g),  $MM_{NaIO_4}$  é o massa molecular do periodato de sódio (g/gmol),  $m_{\text{suporte}}$  é a massa do suporte utilizado (g) e a relação μmols aldeído/g de suporte é a concentração de grupos aldeído presentes por massa de suporte.





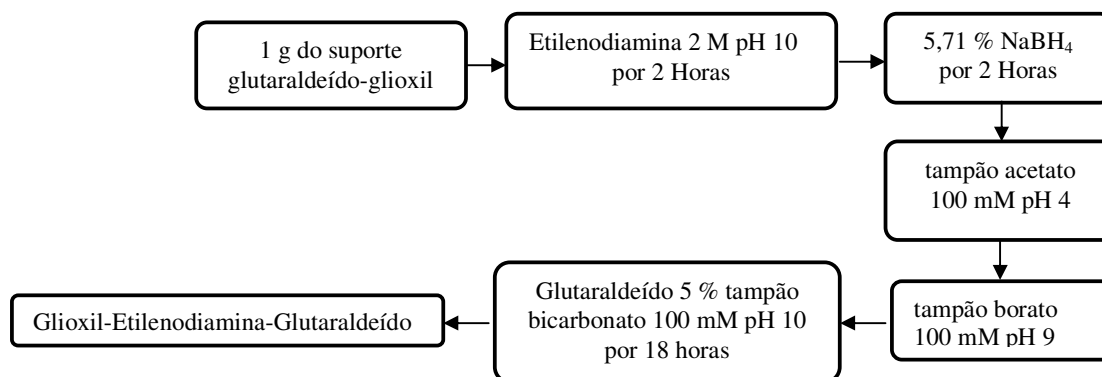
**Figura 13** - Fluxograma mostrando a ativação via glicidol dos suportes preparados. O procedimento acima requereu tempo de 18 h.

### 3.4.3 Preparação do suporte glioxil-EDA-glutaraldeído

Para obtenção do suporte glioxil-EDA-glutaraldeído utilizou-se o suporte glutaraldeído-glioxil obtido após a realização do procedimento descrito no item 3.4.2. O procedimento foi iniciado com a preparação do suporte glioxil-amino seguindo metodologia proposta por FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.* (1993) com modificações, cujo fluxograma pode ser observado na Figura 14. Etilenodiamina (EDA) possui dois grupos amino, um dos seus grupos liga-se ao suporte previamente ativado com glicidol e glutaraldeído e o outro grupo amino é disponibilizado para a ligação do glutaraldeído, para posterior imobilização da enzima.

Para cada 1 g de suporte glutaraldeído-glioxil, foram adicionados 4 mL de solução de EDA 2M pH 10. Este sistema foi submetido à agitação por 2 h a temperatura ambiente. Em

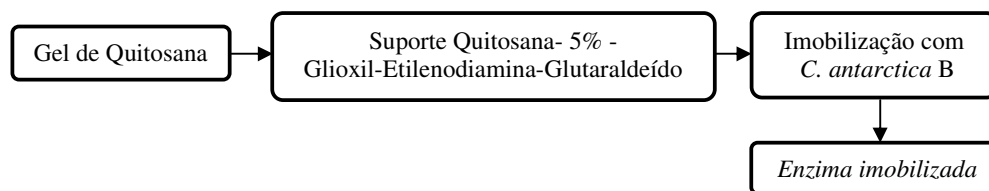
seguida, foi adicionado à suspensão sob agitação 5,71 % (m/m) de  $\text{NaBH}_4$ , da massa inicial do suporte. O sistema foi mantido por mais 2 h sob agitação branda em frasco aberto a temperatura ambiente. Após este período, o suporte foi lavado com 1 L de solução tampão acetato 100 mM, pH 4,0, para remoção do borohidreto residual e, posteriormente, lavado com 1 L de solução tampão borato 100 mM, pH 9,0, para o restabelecimento das cargas, pois em pH 4,0 os grupos amino se encontram protonados. O suporte glutaraldeído-glioxil-amino foi lavado com água destilada até pH neutro e seco sob vácuo. Finalmente, adicionou-se ao suporte glutaraldeído-glioxil-amino solução de glutaraldeído 5 % (v/v) em tampão bicarbonato 100 mM, pH 10,0 a uma razão de 1/10 (m/v), a suspensão foi mantida a temperatura ambiente e sob agitação por aproximadamente 18 h e, ao final, o suporte foi lavado com água destilada em abundância para a remoção do glutaraldeído residual.



**Figura 14** - Fluxograma do suporte Glioxil-Etilenodiamina-Glutaraldeído. Esse esquema apresenta a etapa final de ativação do suporte para posterior recebimento da enzima.

### 3.5 Imobilização da enzima ao suporte

Após a preparação e ativação dos hidrogéis de quitosana, realizou-se o procedimento de imobilização da lipase, conforme esquematizado na Figura 15.



**Figura 15** - Fluxograma do procedimento de obtenção da enzima imobilizada.

A imobilização da lipase nesse suporte foi efetuada adicionando-se 1,0 g do gel em 10 mL de solução-tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH = 10,0 contendo 80  $\mu$ L da solução de *C. antarctica* B (Carga oferecida de 20 U.g<sup>-1</sup> suporte), proporção  $V_{\text{gel}}/V_{\text{solução}}$  de 1:10. O sistema de imobilização foi mantido sob agitação moderada por 5 h.

Alíquotas da solução enzimática sobrenadante no início (branco) e ao término da imobilização foram retiradas para a quantificação da atividade hidrolítica inicial e residual. Ao final, o derivado preparado foi lavado com tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 para a remoção de enzima residual que poderia estar adsorvida. Em seguida, o derivado foi lavado com água destilada em abundância até pH neutro e em seguida seco para medida de sua atividade hidrolítica. As Equações 4, 5 e 6 foram utilizadas para a realização dos cálculos dos parâmetros de imobilização, como rendimento de imobilização, atividade teórica e atividade de recuperada.

Rendimento de imobilização:

$$RI(\%) = \frac{(At_b - At_r)}{At_b} \times 100 \quad (4)$$

Em que:  $At_b$  = atividade do branco (U/mL) e  $At_r$  = atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização (U/mL)

Atividade teórica (U/g):

$$At_{\text{teórica}} = \frac{RI \cdot At_0 \cdot V_{\text{enzima}}}{100 \cdot m_{\text{supORTE}}} \quad (5)$$

Onde:  $At_0$  = atividade oferecida no início da imobilização (U/mL),  $RI$  = rendimento de imobilização,  $V_{enzima}$  = volume de enzima utilizado na imobilização e  $m_{suporte}$  = massa de suporte utilizado para imobilização.

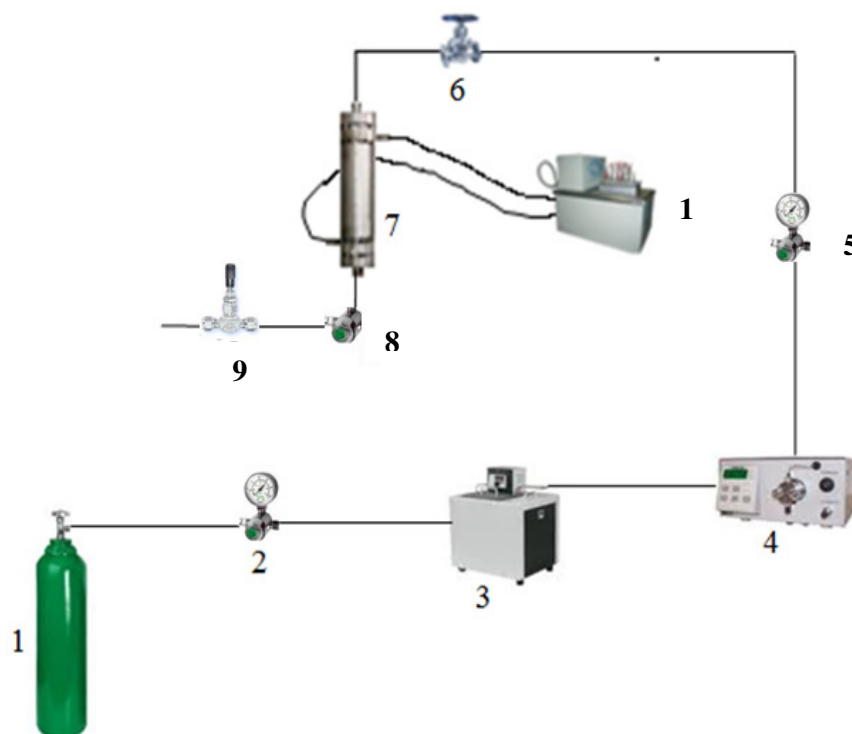
Atividade recuperada:

$$At_{recuperada} (\%) = \frac{At_d}{At_{teórica}} * 100 \quad (6)$$

Segue:  $At_d$  = atividade hidrolítica do derivado (U/g).

### 3.6 Reações de esterificação em meio supercrítico

A Figura 16 abaixo mostra o fluxograma do sistema de reação:

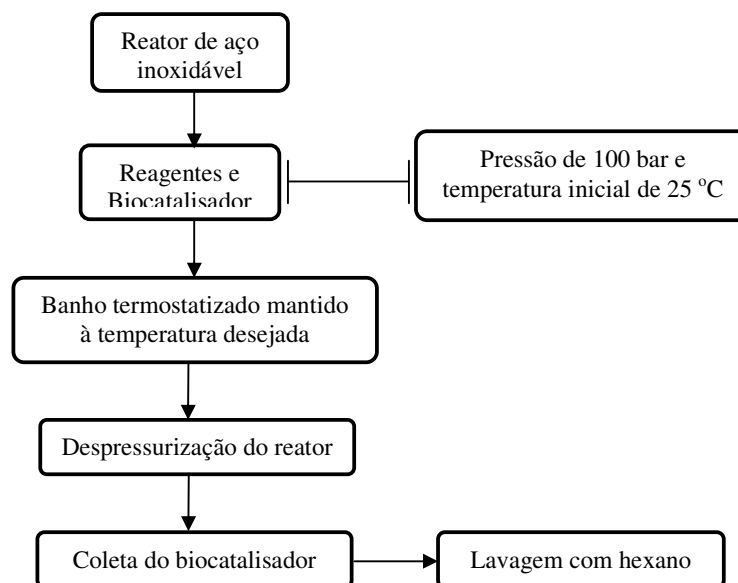


**Figura 16** – Esquema do sistema operacional, montado no Laboratório de Termofluidodinâmica Aplicada (LTA) no Departamento de Engenharia Química da UFC, onde foram realizadas as reações de esterificação enzimática por intermédio de fluido supercrítico.

Legenda:

- 1 – Cilindro de gás (CO<sub>2</sub>);
- 2 – Válvula acoplada ao manômetro;
- 3 – Banho termostaticado;
- 4 – Bomba de HPLC;
- 5 – Válvula acoplada ao manômetro;
- 6 – Válvula;
- 7 – Célula reacional;
- 8 – Válvula;
- 9 – Válvula micrométrica;
- 10 - Banho termostaticado.

Oleato de etila foi sintetizado por Calb imobilizada em hidrogéis de quitosana previamente ativados em meio de dióxido de carbono supercrítico. Para as reações de esterificação, foi usado um reator de aço inoxidável de 13 mL. A quantidade de ácido graxo foi mantida fixa em 10 g em todos os experimentos, bem como a quantidade de lipase foi fixada em 10% m/m, baseada na massa de ácido graxo empregada. O reator, carregado com reagentes e o biocatalisador, foi pressurizado a uma pressão inicial de 100 bar a 25°C, utilizando CO<sub>2</sub> e uma bomba de alta pressão. Ao reator pressurizado, foi conectado um banho termostaticado onde à temperatura foi ajustada conforme as condições reacionais desejadas. O volume total do reator foi constante e o número de mols de dióxido de carbono alimentada no reator também foi constante em toda a reação. Assim, embora a pressão fosse maior a cada incremento de temperatura, a densidade do sistema manteve-se constante. Após o tempo desejado, o reator foi despressurizado, e os conteúdos foram coletados para determinação do índice de acidez. O biocatalisador foi removido e lavado com hexano. As reações foram conduzidas em triplicata. Os procedimentos estão esquematizados na Figura 17.



**Figura 17-** Fluxograma do procedimento das reações de esterificação utilizando fluido supercrítico.

### 3.7 Influência da razão molar, tempo e temperatura na conversão de biodiesel

Para a realização dos experimentos, realizou-se um planejamento experimental, avaliando-se a razão molar, o tempo de reação e a temperatura reacional, esses parâmetros foram estabelecidos a partir dos estudos de literatura específica (MADRAS *et al.*, 2004; RATHORE; MADRAS, 2007; VARMA; MADRAS, 2007; COSTA FILHO, 2008; MADRAS *et al.*, 2010).

O tipo escolhido para o delineamento experimental foi o de composto central rotacional, neste trabalho. Nos experimentos do tipo 2K, os níveis dos fatores são codificados em -1 (valor mais baixo da variável), 0 (valor central) e +1 (valor mais alto da variável) e dos pontos axiais - 1,68 e 1,68. Todos os experimentos foram realizados de maneira inteiramente aleatória com duplicata no ponto central (valor médio de cada variável estudada). A utilização de repetições no ponto central teve como objetivo viabilizar o cálculo do erro experimental e, conseqüentemente, a verificação do ajuste do modelo (RODRIGUES; LEMMA, 2009).

A Tabela 5 apresenta os valores numéricos e codificados das variáveis adotadas para a reação de esterificação utilizando fluido supercrítico. A Tabela 6 apresenta a matriz das variáveis do Planejamento Experimental para a reação de esterificação utilizando fluido

supercrítico. A quantidade de ácido graxo foi mantida fixa em 10 g em todos os experimentos, bem como a quantidade de lipase foi fixada em 10% m/m, baseada na massa de ácido/óleo medida.

**Tabela 5** - Níveis para a determinação das condições experimentais da reação de esterificação por intermédio de fluido supercrítico.

Variáveis	Código	- 1,68	- 1	0	+ 1	+ 1,68
Temperatura (°C)	x <sub>1</sub>	29,9	35	42,5	50	55,1
Tempo de reação (horas)	x <sub>2</sub>	0,6	3	6,5	10	12,4
Razão molar Etanol : Ácido graxo	x <sub>3</sub>	1,1	2,5:1	4,5:1	6,5:1	7,9

**Tabela 6** - Matriz das variáveis do Planejamento Experimental para a reação de esterificação utilizando fluido supercrítico.

Experimental	Variáveis Codificadas		
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15 (C)	0	0	0
16 (C)	0	0	0

Foram escolhidas as temperaturas de 35 e 50 °C porque a temperatura deve ser superior a temperatura crítica do dióxido de carbono (T<sub>c</sub> = 31,1 °C) para se considerar o meio supercrítico e, além disso, essa temperatura não deve ser superior a 50 °C, pois acarreta inativação da enzima, tendo como consequência direta a perda de atividade do biocatalisador (MADRAS *et al.* 2010).

Os tempos de reação escolhidos de 3 e 10 h baseado em informações de literatura específica (MADRAS *et al.*, 2004; RATHORE; MADRAS, 2007; VARMA; MADRAS, 2007; COSTA FILHO, 2008; MADRAS *et al.*, 2010).

Os valores de razão molar álcool: óleo foram escolhidos em função da quantidade mínima de reagentes necessária para as reações de esterificação enzimática do ácido oleico. Diversos pesquisadores do processo, de esterificação para produção de biodiesel, informam que a razão molar mínima 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 (KULKARNI; DALAI, 2006; COSTA FILHO, 2008).

Na Tabela 7, encontra-se o número total de experimentos realizados nas condições descritas.

**Tabela 7** - Condições reacionais determinadas pelo planejamento estatístico para a reação de esterificação enzimática por intermédio de fluido supercrítico utilizando 1g de biocatalisador para todos os ensaios.

<b>Experimental</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (horas)</b>	<b>Razão Molar (Álcool : Óleo)</b>
<b>1</b>	35,0	3,0	2,5: 1
<b>2</b>	35,0	3,0	6,5: 1
<b>3</b>	35,0	10,0	2,5: 1
<b>4</b>	35,0	10,0	6,5: 1
<b>5</b>	50,0	3,0	2,5: 1
<b>6</b>	50,0	3,0	6,5: 1
<b>7</b>	50,0	10,0	2,5: 1
<b>8</b>	50,0	10,0	6,5: 1
<b>9</b>	29,9	6,5	4,5: 1
<b>10</b>	55,1	6,5	4,5: 1
<b>11</b>	42,5	0,6	4,5: 1
<b>12</b>	42,5	12,4	4,5: 1
<b>13</b>	42,5	6,5	1,1: 1
<b>14</b>	42,5	6,5	7,9: 1
<b>15 (C)</b>	42,5	6,5	4,5: 1
<b>16 (C)</b>	42,5	6,5	4,5: 1



### 3.8 Caracterização Físico-Química da Matéria-Prima e do Biodiesel

Para serem considerados como biodiesel, os ésteres provenientes da esterificação de uma matéria-prima lipídica devem atender a algumas exigências, ou seja, estarem dentro das especificações regulamentadas pela Agência Nacional de Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Nesse sentido, empregaram-se várias metodologias analíticas descritas pela American Oil Chemists Society (A.O.C.S.) e pela American Society for Testing and Materials (ASTM) para verificar se o produto obtido estava dentro das especificações. A seguir, são apresentadas análises realizadas na caracterização da matéria-prima e dos ésteres etílicos obtidos pela síntese enzimática por intermédio de fluido supercrítico.

#### 3.8.1 Índice de acidez

Para a verificação do índice de acidez, neutralizou-se inicialmente o solvente (álcool etílico comercial) com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,25 molar, utilizando uma solução de fenolftaleína 1% em álcool como indicador (A.O.C.S., 1997). Após esse procedimento, mediu-se cerca de 2 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 molar, até que uma coloração levemente rósea persistisse por 15 segundos. Em seguida, realizado esse procedimento e anotado a massa da amostra analisada e o volume de NaOH gasto na titulação, os cálculos foram realizados de acordo com as Equações 7 e 8.

$$IA(mgKOH / g) = \frac{V_x F_x M_x 56,11}{m} \quad (7)$$

$$AG(\%) = \frac{V_x F_x M_x 28,2}{m} \quad (8)$$

em que:  $IA$  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);  $M$  é a molaridade da solução de NaOH (mol/L);  $m$  é a massa da amostra utilizada, 56,11 representa a massa molar de KOH, 28,2 representa a massa molar do ácido oleico/ 100 e  $AG$  é a porcentagem de ácidos graxos livres, expressa como ácido oleico, em óleos comuns, brutos e refinados.

### 3.8.2 Densidade e Viscosidade

Determinou-se a densidade relativa a 20 °C das amostras segundo a norma ASTM D-4052, utilizando-se um viscodensímetro digital da marca Anton Paar, modelo SVM 3000. Utilizaram-se 5 mL de amostra e preencheu-se a célula do densímetro para a determinação da densidade relativa e viscosidade. A leitura foi realizada diretamente no visor do equipamento a 20 °C em  $\text{g/cm}^3$ , cuja incerteza para medidas de densidade e viscosidade são, respectivamente  $0,0005 \text{ g/cm}^3$  e 0,35%.

### 3.8.3 Teor de Umidade

Seguiu-se o método ASTM D-1744A para medir a quantidade de água presente nas amostras de substratos e ésteres etílicos, utilizando um titulador Karl-Fischer da marca Metrohm, modelo 795 KTF Titrimo, com capacidade de detectar umidade na ordem de ppm com precisão de  $\pm 0,03\%$ . A técnica consistiu, primeiramente, em calibrar a solução Karl-Fischer com água destilada para determinação do fator de solução. Em seguida, adicionou-se aproximadamente 1 g da amostra a ser analisada e, após um determinado período de tempo, o teor de umidade foi determinado pelo software Vesuv datalogger 1999.

### 3.8.4 Índice de Iodo

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), conforme metodologia da A.O.C.S., (1997). A mistura foi mantida reagir ao abrigo da luz à temperatura ambiente por 1 h. 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 tiosulfato de sódio 0,1 M 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 tiosulfato de sódio até o desaparecimento da coloração azul. O índice de iodo foi calculado de acordo com a Equação 9:

$$II = \frac{(V_B - V_T) \times 1,27 \times F}{M} \quad (9)$$

Em que:  $V_B$  é o volume gasto na titulação do branco;  $V_T$  o volume gasto na titulação com tiosulfato de sódio 0,1 N; 1,27 significam a massa molar do Iodo/ 100.  $F$  é o fator da solução de tiosulfato de sódio e  $M$  é a massa da amostra em gramas.

### 3.9 Cálculo da Conversão em Ésteres Etílicos

A conversão em ésteres etílicos foi calculada acompanhando a redução do índice de acidez de acordo com a Equação 10. Essa medição é possível porque à medida que os ésteres vão sendo formados, a quantidade de ácidos graxos livres diminui e, portanto, o índice de acidez decresce, COSTA FILHO (2008). Com essa metodologia consegue-se prever bem a conversão em ésteres, obtendo-se valores bem próximos quando comparados aos dados obtidos com cromatografia gasosa, LUCENA (2008).

$$X (\%) = \left( \frac{IA_o - IA_F}{IA_o} \right) \times 100 \quad (10)$$

Onde:  $IA_o$  o índice de acidez do ácido/óleo e  $IA_F$  é o índice de acidez do biodiesel.

### 3.10 Caracterização Cromatográfica

A caracterização do ácido oleico comercializado pela VETEC e os ésteres etílicos obtidos pela esterificação do ácido oleico foi realizada a análise química por cromatografia de fase gasosa (CG). O perfil cromatográfico do ácido oleico foi obtido no cromatógrafo a gás modelo Varian Termo dsq-II acoplado a um espectrômetro de massa SATURN 2000 MS/MS (Laboratório de Química do IFET-CE). As dimensões da coluna capilar RTX-5MS 15M foram: 15 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e 0,25  $\mu$ m de espessura do filme líquido. As condições de operação do cromatógrafo para a caracterização do ácido oleico estão apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8** - Condições de Operação do Cromatógrafo para identificação do ácido oleico.

Parâmetros	Valores
Temperatura Inicial do Forno	120 °C
Temperatura Final do Forno	210 °C
Temperatura do Injetor	255 °C
Fluxo de Split*	50 mL/min
Tempo de Splitless*	1 min
Gás Hélio	1 mL/min
Linha de Transferência	200 °C

\* injetores com e sem divisão de fluxo (*split/splitless*)

O cálculo dos teores de cada substância foi determinado correlacionado as áreas relativas de cada pico característico com a área total de picos do cromatograma, segundo a Equação 11.

$$X \% = \frac{\text{ÁreaPico}_{\text{Substância}}}{\text{ÁreaTotal}} \quad (11)$$

### 3.11 Recuperação do Biocatalisador

Ao final de cada ciclo, cerca de 1 g de biocatalisador foi coletado em béqueres, recolhendo-se o biodiesel num tubo de ensaio. 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 esterificação do material lipídico.

### 3.12 Esterificação com Zeólita

A fim de se verificar a eficiência da esterificação do ácido oleico realizada com a remoção da água por adsorção, foram conduzidos experimentos com a remoção de água ao longo da reação. O procedimento adotado para as reações de esterificação com a remoção da água formada no processo envolveu primeiramente o preenchimento da célula de reação com zeólita 3A devidamente ativada. A montagem do aparato experimental após pesagem do ácido oleico foi realizada o mais rápido possível para evitar umidificação do material adsorvente. As quantidades de álcool e de catalisador seguiram os valores otimizados pelo planejamento experimental (Tabela 7, p. 56). Também, realizou-se ao final da reação análise do índice de acidez de amostras coletadas em tempos previamente determinados.

As zeólitas do tipo A exibem uma grande afinidade pela água bem como uma capacidade de adsorção alta (em torno de 20% em relação ao seu peso). Portanto, calculou-se a partir dessa relação a quantidade em gramas de zeólita necessária para adsorver toda a água formada durante a reação de esterificação de 10 g de ácido oleico puro, supondo uma conversão de 100% dos ácidos graxos livres em ésteres etílicos. A quantidade de água formada na reação foi determinada a partir de um cálculo estequiométrico da reação nessas condições, no Anexo D encontra-se o cálculo detalhado.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, serão apresentados os resultados e as discussões referentes aos experimentos realizados.

Inicialmente serão apresentados os resultados da preparação dos derivados obtidos no processo de imobilização de enzimas em quitosana. Segue-se com a caracterização do ácido graxo utilizado nas reações de esterificação. Em seguida, apresentam-se os resultados do planejamento experimental realizado para a produção de biodiesel, onde são apresentadas as variáveis de maior interferência dessas reações. Finalmente, apresentam-se os resultados das reações de esterificação.

### 4.1. Atividade hidrolítica da enzima solúvel

A atividade hidrolítica da enzima solúvel, extrato comercial bruto de lipase do tipo B de *C. antarctica*, apresentou um valor de  $126 \pm 10$  U/mL, determinado em triplicata utilizando o pNPB como substrato. A escolha deste método de quantificação da atividade deve-se por sua sensibilidade, pois permite a determinação de pequenas variações na concentração do substrato e, conseqüentemente, a utilização de baixas concentrações de enzima. Outro fator que influenciou a escolha desta reação modelo foi a maior afinidade da lipase de *C. antarctica* tipo B por monoésteres de cadeia curta (MARTINELLE *et al.*, 1995; CARNEIRO, 2008).

### 4.2 Atividade hidrolítica da enzima imobilizada

Para a preparação do suporte foram empregados os métodos descritos no item 3.4., de acordo com Adriano (2008). Assim, procedeu-se a imobilização da lipase, para

avaliação dos parâmetros de imobilização. Os resultados obtidos no processo de imobilização estão listados na Tabela 9.

**Tabela 9** - Avaliação dos parâmetros de imobilização de CALB em quitosana ativada com Glutaraldeído-Glioxil-Etilenodiamina-Glutaraldeído.

Parâmetro de Imobilização	Valor
Carga oferecida (U/g)	20,00 ± 0,10
Atividade remanescente (U/g)	0,85 ± 0,07
% Enzima não imobilizada (%NI)	5,26 ± 0,45
Rendimento de imobilização R (%)	94,70 ± 1,37
Atividade teórica (U/g)	18,95 ± 0,92
Atividade derivado (U/ggel)	5,73 ± 0,59
Atividade recuperada (%)	30,20 ± 2,86

Observa-se que a quantidade de enzima imobilizada no suporte foi de 94,7% o que mostra uma grande quantidade de enzima presente no biocatalisador.

Neste trabalho escolheu-se o tempo de 5 horas para fixação da enzima ao suporte baseado em estudos anteriores e nos perfis de imobilização em função do tempo para a CalB em suportes com os mesmos reagentes de ativação (SILVA, 2007; CARNEIRO, 2008). Realizou-se a imobilização da enzima em pH 10, pois para esse valor de pH os resíduos lisina da enzima são mais reativos o que favorece a ligação da enzima ao suporte pela formação das bases de Schiff (MATEO *et al.* 2000; CARNEIRO, 2008).

A ativação do suporte foi realizada com glutaraldeído. Segundo os estudos de SILVA (2007) a utilização de glutaraldeído na ativação ocasiona um aumento do rendimento de imobilização e da atividade da enzima imobilizada, pois este agente ativante é bastante reativo, assim uma maior quantidade de enzima liga-se ao suporte, além disso, a molécula de glutaraldeído é grande, reduzindo os efeitos estéricos, inerentes aos processos de imobilização. Para esta estratégia, SILVA (2007) obteve maiores valores de rendimento de imobilização. Vale ressaltar que devido à alta reatividade deste reagente faz-se necessário a imobilização imediata após o preparo destes suportes (SILVA, 2007).

O reagente EDA tem a função de tornar a distância entre os grupos aldeído e o suporte maior, com o intuito de aumentar a capacidade do suporte em imobilizar enzimas

atuando na redução direta dos efeitos estéricos, através da redução de limitações difusionais, e no aumento da hidrofiliidade do suporte. Os resultados indicam que a enzima, ao se ligar ao suporte Quitosana-Glioxil-EDA-Glutaraldeído, sofreu distorções em sua estrutura, levando a uma perda de atividade catalítica, apesar do baixo valor obtido para a atividade recuperada (30,2%) deste suporte. A distorção da enzima é consequência da alta reatividade das moléculas de glutaraldeído, reatividade essa capaz da formação de dímeros, trímeros ou grandes polímeros insaturados alfa e beta entre suas moléculas. O extenso braço de ligação confere a enzima imobilizada uma maior mobilidade, dando uma maior acessibilidade dos sítios ativos ao substrato. Neste estudo empregaram-se compostos que aumentam a distância entre a enzima e o suporte, assim ocasionando um efeito direto no aumento da atividade hidrolítica e nos rendimentos de imobilização dos derivados, Tabela 9. Quanto maior o espaço entre a enzima e o suporte melhores são os resultados exibidos pelos parâmetros de imobilização (CARNEIRO, 2008).

#### 4.3 Caracterização Físico-Química da Matéria-Prima

Os parâmetros físico-químicos determinados para amostra de ácido oleico comercializado pela VETEC e utilizados nas reações de esterificação são apresentados na Tabela 9. As análises (índice de acidez, densidade, viscosidade, umidade e índice de iodo) foram realizadas conforme apresentado na seção 3.8, capítulo 3.

**Tabela 10** - Parâmetros físico-químicos do ácido oleico.

<b>Parâmetros físico-químicos</b>	<b>Ácido oleico</b>
Índice de Acidez (mgKOH/g)	196,60
Densidade 20°C (kg/L)	0,8806
Viscosidade Cinemática 40°C (mm <sup>2</sup> /s)	20,26
Teor de Umidade (%)	0,04
Índice de Iodo (g/100g)	92,50



Como esperado, devido à presença de ácidos graxos, observa-se na Tabela 10 um elevado índice de acidez para amostra analisada (196,60 mgKOH/g). Verifica-se também um baixo teor de umidade e um alto índice de iodo que confirma a presença de compostos insaturados (ácido oleico), uma vez que o índice de iodo indica o grau de insaturação da matéria-prima. Neste estudo, utilizou-se o ácido oleico uma vez que ele é um reagente modelo, escolhido para representar os ácidos carboxílicos presentes nos óleos vegetais. A elevada viscosidade determinada está associada à capacidade que os ácidos graxos têm de formar ligações de hidrogênio uns com os outros devido ao grupo carboxílico que os compõe.

#### 4.4 Caracterização Cromatográfica da Matéria-Prima

A Figura 18 apresenta o perfil cromatográfico gerado na caracterização do ácido oleico a partir da análise de cromatografia gasosa (CG/MS).

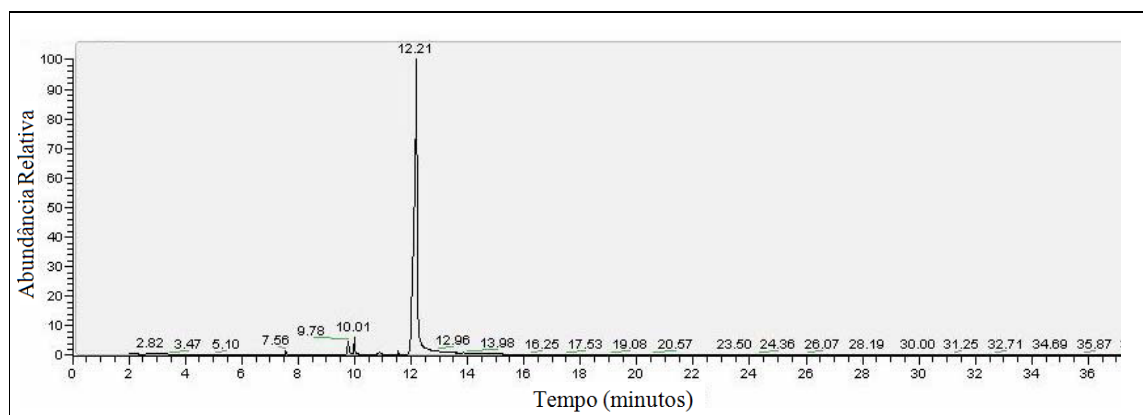


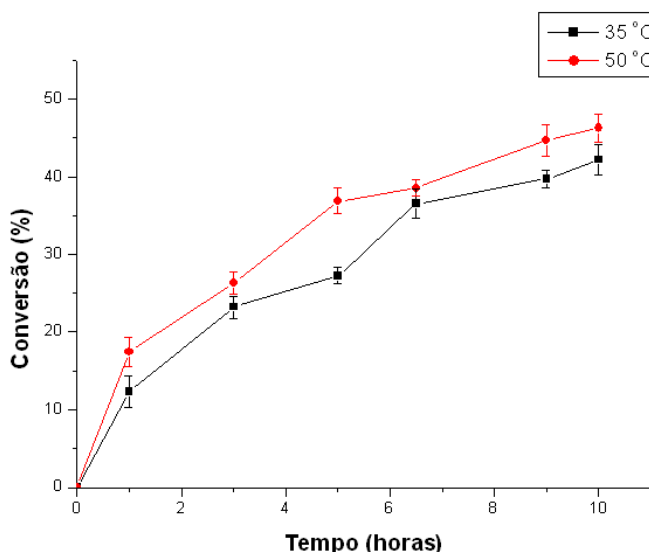
Figura 18 - Cromatograma obtido por CG/MS para o ácido oleico.

O cromatograma (Figura 18) revela um pico bem definido para o ácido oleico ou ácido 9-octadecenóico, com tempo de retenção ( $t_R$ ) de 12,2 minutos. No entanto, a análise por CG/MS identificou ainda outros tipos de ácidos graxos de cadeia carbônica saturada e insaturada. Entre estes compostos, estão o ácido mirístico ou ácido tetradecanóico ( $t_R = 7,56$  min); o ácido palmitoleico ou ácido 9-hexadecenóico ( $t_R = 9,78$  min) e o ácido palmítico ou ácido hexadecanóico ( $t_R = 10,01$  minutos) como contaminantes. Assim, o teor de ácido oleico calculado conforme a Equação 7, seção 3.8.1, capítulo 3, foi de 94,4 %.

A pureza determinada para a amostra de ácido oleico não apresentou problemas para as reações de esterificação realizadas, uma vez que antes de qualquer corrida experimental analisava-se não apenas o índice de acidez, mas também a porcentagem de ácidos graxos livres em termos do ácido oleico. Dessa forma, a quantidade de ácido oleico exigido pelo dimensionamento da célula de reação (10 g de ácido oleico puro) sempre foi proporcional a pureza da respectiva amostra utilizada.

#### 4.5 Efeito da Temperatura

A Figura 19 mostra os valores de conversão (Tabela 11, anexo C) utilizados no estudo cinético, obtidos na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio da utilização de dióxido de carbono em região supercrítica na razão molar álcool:ácido graxo de 6,5:1, nas temperaturas de 35 e 50 °C.



**Figura 19-** Influência da temperatura na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio de fluido supercrítico na razão molar álcool:óleo de 6,5:1.

A literatura mostra (FACCIO, 2004) que a temperatura ótima de utilização em processos reacionais da lipase é abaixo de 70 °C. 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 ideal de reação de uma lipase imobilizada

foi 40 °C. Acima desse valor a taxa de conversão de biodiesel diminui rapidamente devido à inativação da enzima. Assim, utilizou-se neste estudo valores de temperatura reacional na faixa de 30 a 55 °C considerando as informações contidas em literatura (FACCIO, 2004; GAO *et al.* 2006; SILVA, 2007).

Segundo MADRAS *et al.* (2010) a temperatura ótima para reação de transesterificação enzimática em CO<sub>2</sub> supercrítico envolvendo lipase é em torno de 50 °C, que é semelhante ao relatado em trabalhos desenvolvidos por RATHORE; MADRAS (2007), VARMA; MADRAS (2007), VARMA; MADRAS (2008).

A Figura 19 mostra a influência da temperatura na conversão, dentro do intervalo estudado, o que pode ser observado pela a cinética da reação na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio de fluido supercrítico na razão molar álcool:ácido graxo de 6,5:1. Percebe-se um ligeiro favorecimento da conversão nos primeiros minutos de reação com o aumento da temperatura. A conversão apresenta comportamento semelhante para as temperaturas de 35°C e 50°C, atingindo o equilíbrio depois de 10 h para as temperaturas estudadas. Pela Figura 19 observa-se que para ambas as temperaturas uma conversão acima de 40 % é atingida com 10 h de reação. Portanto, não é necessário um alto gasto energético com o aumento da temperatura. Um aumento maior na temperatura pode ocasionar a inativação e, conseqüente, perda de atividade do derivado, portanto reduzindo a índice de conversão.

Silva (2007) estudou a inativação térmica a 60 °C e pH 8,0, da CALB onde o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima imobilizada ao suporte foi de 1,13 horas. Daí a escolha neste trabalho das temperaturas de reação de 35 °C e 50 °C .

A temperatura ideal para um processo eficiente de síntese enzimática de biodiesel resulta da interação entre a estabilidade operacional da enzima, do biocatalisador e a taxa de conversão. Ela também depende da razão molar álcool: óleo, do tipo de solvente orgânico e da termoestabilidade enzimática (ANTCZAK *et al.*, 2009).

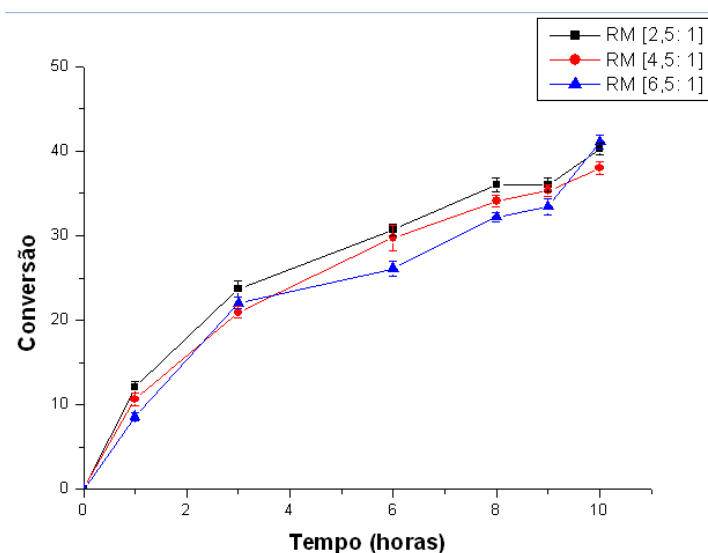
Pela análise da Figura 19 percebe-se que a conversão aumenta com a temperatura. Este processo é limitado, uma vez que, em torno de certa temperatura, ocorre a inativação da enzima, e a atividade catalítica diminui. A temperatura é uma grande vantagem que o processo enzimático apresenta frente o processo utilizando catalisadores químicos, visto que neste processo altas temperaturas são necessárias para a reação, enquanto que quando se usa enzimas temperaturas mais baixas são utilizadas e há um ganho econômico com energia.

Em ensaios utilizando lipase para catalisar reação envolvendo álcool: óleo XU (2004), percebeu que uma temperatura elevada é necessária para aumentar a conversão quando se utiliza grandes valores de razão molar (álcool: óleo) durante o processo reacional, no entanto isso causou inativação da enzima.

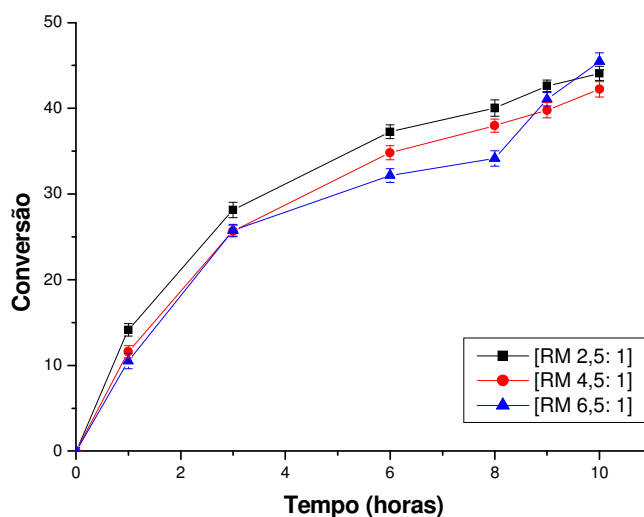
Toda enzima apresenta seu ótimo de atividade quando submetida a sua temperatura ideal. Assim, a temperatura para a realização de um processo enzimático deve considerar o comportamento desses biocatalisadores nessas condições. Com os resultados obtidos neste trabalho, a temperatura a ser selecionada para as reações de esterificação nas condições estudadas deve ser de 35 °C por economia em energia. Além disso, em reciclos possivelmente a temperatura de 50 °C pode aumentar a inativação do biocatalisador.

#### 4.6 Efeito da Razão Molar Álcool: Ácido oleico

As figuras 20 e 21 apresentam o perfil cinético e os valores de conversão (Tabelas 12 e 13, anexo C) obtidos na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio de fluido supercrítico nas razões molares de álcool:óleo de 2,5:1, 4,5:1, 6,5:1, na temperatura de 35 e 50°C, respectivamente.



**Figura 20** - Influência da razão molar álcool:ácido na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio de fluido supercrítico na temperatura de 35°C.



**Figura 21-** Influência da razão molar álcool:ácido na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio de fluido supercrítico na temperatura de 50°C.

Analisando as Figuras 20 e 21, verifica-se que os valores de conversão quando variando a razão molar são bem próximos. No entanto, é possível notar que os valores com a menor relação de razão molar possuem as maiores taxas de conversão, indicando a não necessidade de um excesso estequiométrico, tornando o processo enzimático, nesse aspecto, mais vantajoso do que a catálise química convencional. Observa-se também que após 9 h de reação, há uma acentuada conversão para as duas temperaturas estudadas, quando da utilização da razão molar 6,5:1, isso provavelmente se deve ao fato de que após esse tempo já atingiu o equilíbrio. Além disso, comparando as Figuras 20 e 21, confirma-se a escolha da temperatura de 35 °C para a realização das reações de esterificação nas condições estudadas, pois os valores de conversão obtidos com a temperatura de 50 °C são próximos aos valores

MADRAS *et al.* (2004) estudaram a síntese enzimática de biodiesel em dióxido de carbono supercrítico, variando a razão molar de álcool e óleo. Nesse estudo os autores analisaram várias razões molares e verificaram que à medida que a quantidade de álcool aumentava, a conversão em ésteres progredia mais lentamente e a conversão no equilíbrio aumentava. Os autores verificaram a existência de uma razão molar máxima na qual acima desse valor a velocidade inicial de reação é menor, o que sugere a existência de uma razão molar ótima. Percebe-se pelas Figuras 20 e 21 que a variação da razão molar para as

condições estudadas não contribuiu expressivamente para os valores de conversões obtidos. Embora, fica evidente um favorecimento para a formação de ésteres etílicos quando da utilização de baixos valores de razão molar (2,5: 1).

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. De acordo com vários autores, esse comportamento da lipase frente ao excesso estequiométrico de álcool pode ser explicado por efeitos inibitórios, uma vez que, devido à elevada polaridade de alcoóis 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, o álcool remove a camada de hidratação da enzima o que pode rigidificá-la, deixando o sítio ativo da enzima inacessível.

Pelas Figuras 20 e 21 verifica-se que a razão molar ótima para o processo reacional em estudo foi 2,5:1 de álcool/ ácido oleico. A razão molar ótima de substratos utilizados para síntese enzimática de biodiesel tem de ser determinado separadamente para um dado sistema: álcool - lipase - óleo. Normalmente, os sistemas que utilizam solventes orgânicos requerem um ligeiro excesso de álcool (quantidade de álcool maior que o estabelecido na razão molar) necessário para alcançar um rendimento satisfatório nos processos de transesterificação.

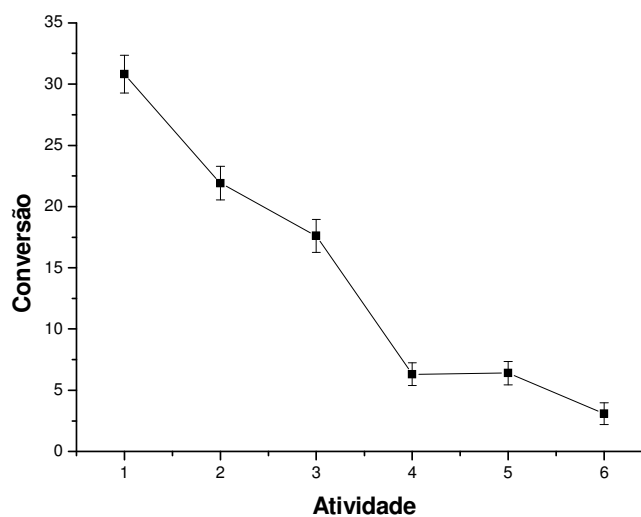
Álcool em excesso da razão estequiométrica de 3:1 é usado para assegurar uma alta velocidade de reação e minimizar as limitações de difusão, por isso da escolha dos valores de razão molar 2,5: 1; 4,5:1; 6,5: 1 neste trabalho. No entanto, quantidades excessivas de álcool podem inibir a atividade da enzima e assim diminuir sua atividade catalítica ao longo da reação de transesterificação (NOUREDDINI; PHILKANA, 2005). Nesse contexto, Salis *et al.* (2005) reportaram que uma alta razão álcool:triglicerídeo significa uma maior polaridade do meio, produzida pelo álcool e pela água. Uma alta polaridade é freqüentemente associada com a inativação do biocatalisador. A diminuição na atividade enzimática e rendimento de alquil ésteres a altas concentrações de álcool, refletem a habilidade do excesso de álcool em distorcer a camada de água essencial que estabiliza as enzimas imobilizadas (KOSE; TUTER; AKSOY, 2002).

Assim, para um processo eficiente, em que seja possível obter altas conversões para biodiesel, a razão molar álcool: óleo deve ser considerado. Haja vista que o aumento da

concentração de álcool no meio reacional favorece a conversão, no entanto diminui a atividade catalítica do biocatalisador, quando num processo enzimático. A grande concentração de álcool também favorece a conversão, pois contribui para sua solubilidade no meio reacional.

#### 4.7 Ciclos de Atividade

A Figura 22 apresenta os valores dos ciclos de atividade do biocatalisador nas reações de esterificação. Observando a Figura 22 verifica-se uma diminuição na capacidade de conversão do biocatalisador nas reações de esterificação enzimática do ácido oleico por intermédio de fluido supercrítico. Essa diminuição da atividade pode estar relacionada a inativação da enzima pelas condições experimentais ou acúmulo de água, visto que a quitosana é hidrofílica, assim diminuindo a capacidade de conversão deste derivado.



**Figura 22-** Ciclos de atividade do biocatalisador nas reações de esterificação enzimática do ácido oleico por intermédio de fluido supercrítico na temperatura de 50°C e razão molar álcool:ácido oleico de 1:1 após vários de ciclos de reação.

#### 4.8 Esterificação Enzimática Utilizando Fluido Supercrítico

A análise estatística dos dados experimentais obtidos foi realizada utilizando o software STATISTICA<sup>®</sup> (versão 7.0). Os experimentos foram executados no Laboratório de Termofluidodinâmica Aplicada no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará. A Tabela 14 apresenta os resultados experimentais de conversões obtidos pelo delineamento experimental composto central rotacional (DCCR), planejamento fatorial 2<sup>3</sup> realizado para avaliar a reação de esterificação enzimática utilizando fluido supercrítico.

**Tabela 14** - Resultados do planejamento experimental 2<sup>3</sup> para a conversão do ácido oleico nas reações de esterificação enzimática por intermédio de fluido supercrítico.

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Razão Molar (Álcool: Ácido Graxo)	Conversão (%)
1	35,0	3,0	2,5: 1	23,82 ± 1,7
2	35,0	3,0	6,5: 1	22,74 ± 1,6
3	35,0	10,0	2,5: 1	39,44 ± 1,6
4	35,0	10,0	6,5: 1	41,17 ± 1,4
5	50,0	3,0	2,5: 1	28,08 ± 1,7
6	50,0	3,0	6,5: 1	25,57 ± 1,7
7	50,0	10,0	2,5: 1	44,09 ± 1,8
8	50,0	10,0	6,5: 1	45,29 ± 1,9
9	29,9	6,5	4,5: 1	46,87 ± 1,9
10	55,1	6,5	4,5: 1	25,49 ± 1,7
11	42,5	0,6	4,5: 1	3,35 ± 1,8
12	42,5	12,4	4,5: 1	44,37 ± 1,7
13	42,5	6,5	1,1: 1	43,97 ± 1,6
14	42,5	6,5	7,9: 1	45,26 ± 1,4
15 (C)	42,5	6,5	4,5: 1	32,43 ± 1,2
16 (C)	42,5	6,5	4,5: 1	32,95 ± 1,2

O melhor resultado obtido foi de 46,87 % de conversão para uma temperatura de 29,9 °C, razão molar etanol: óleo igual 4,5: 1 e tempo reacional de 6,5 horas.

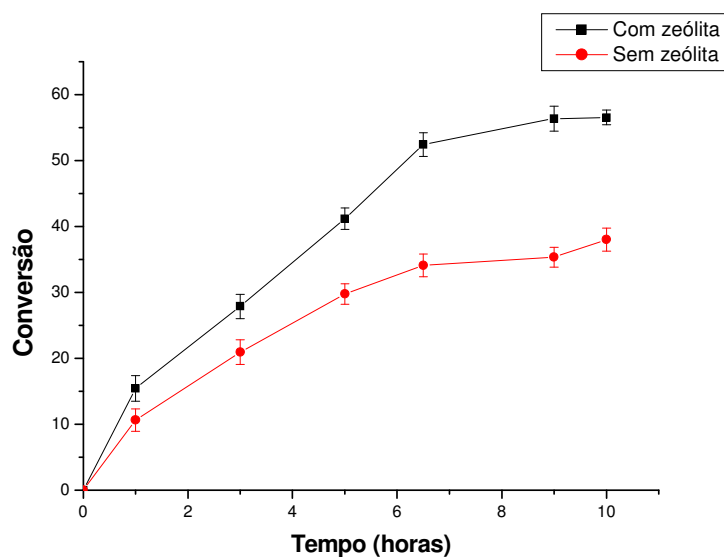
Realizou-se um teste nas condições ótimas citadas acima utilizando uma peneira molecular zeólita do tipo A, uma vez que esta exibe uma grande afinidade pela água, em torno de 20% em relação ao seu peso. Portanto, calculou-se (Anexo D) a partir dessa relação à quantidade em gramas de zeólita (3,18 g) necessária para adsorver toda a água formada durante a reação de esterificação de 10 g de ácido oleico puro, entretanto a conversão obtida com o uso da peneira foi de 53% para o tempo de 6,5 horas, portanto não houve uma melhora tão substancial como esperava-se, pois a retirada da água que é produzida durante o processo



de esterificação no meio reacional favorece a conversão de ésteres etílicos. Nesse teste foi feita uma secagem do biocatalisador com hexano por 24 h.

A fim de se montar a cinética da reação de esterificação para estudo de comparação com uso e sem uso da zeólita, foram realizados experimentos utilizando as condições otimizadas com o planejamento experimental, assim os ensaios foram realizados variando tempos de reação entre 1h e 10 hs, com temperatura de 29,9 °C, razão molar etanol: óleo igual 4,5: 1. Os valores de conversão podem ser verificados na Figura 23 a seguir.

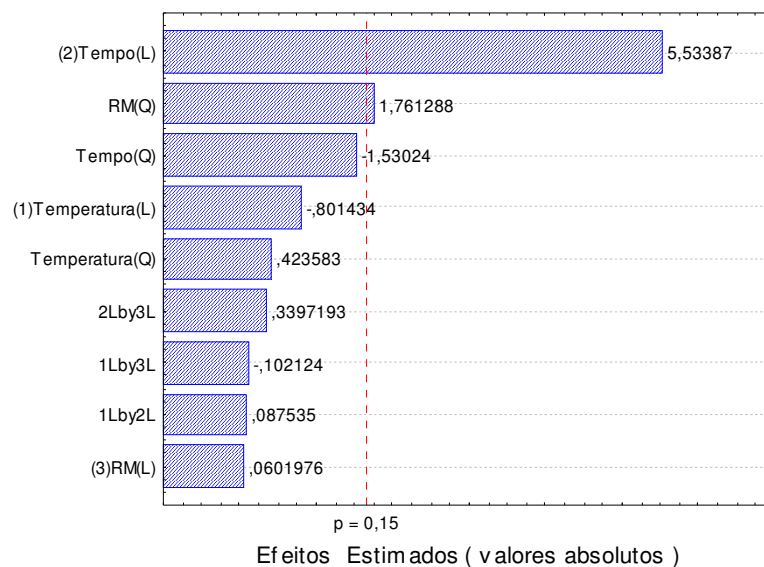
A Figura 23 apresenta os valores obtidos com a utilização e sem utilização de zeólita do tipo A. Percebe-se o aumento da conversão com o aumento do tempo de contato entre os reagentes. Assim, evidencia-se a influência positiva do tempo reacional nos valores de conversão. Os dados são apresentados na Tabela 15 (Tabela 15, anexo C),



**Figura 23** – Comparação dos valores de conversão obtidos com a utilização e sem utilização de zeólita do tipo A. Os ensaios foram realizados variando tempos de reação entre 1h e 10hs, com temperatura de 29,9 °C, razão molar etanol: óleo igual 4,5: 1.

Ao analisar a Figura 24 percebe-se um aumento dos valores de conversão quando da utilização da peneira molecular. No entanto, os valores de conversão não atende as especificações exigidas pela ANP, cujo teor de ésteres mínimo seja de 96,5%.

Através do Diagrama de Pareto, mostrado na Figura 20, pode-se observar que a variável tempo cruza a linha de nível de significância de 85 % que é um limite aceitável para processos biotecnológicos. Portanto, o tempo reacional teve efeito estatisticamente significativo na conversão em ésteres, dentro do intervalo estudado para cada variável, resultados também evidenciados por COSTA FILHO, 2008.



**Figura 24** - Diagrama de Pareto indicando o efeito dos valores estimados para as variáveis estudadas no planejamento experimental  $2^3$  com duplicata do ponto central da esterificação enzimática do ácido oleico utilizando fluido supercrítico.

A Tabela 16 mostra a estimativa dos efeitos do planejamento experimental realizado. Na Tabela 17 verificam-se os coeficientes de regressão para a resposta conversão do ácido oleico a ésteres etílicos utilizando fluido supercrítico.

**Tabela 16** – Estimativa dos efeitos principais e suas interações na conversão do ácido oleico a ésteres etílicos utilizando fluido supercrítico.

Fatores	Efeitos	Desvio Padrão	p
Média	<b>32,80995</b>	<b>4,784017</b>	<b>0,000473</b>
(1)Temperatura (L)	-2,94310	3,672290	0,453441
Temperatura (Q)	1,88864	4,458717	0,686634
(2)Tempo (L)	<b>20,32198</b>	<b>3,672290</b>	<b>0,001468</b>
Tempo (Q)	-6,82292	4,458717	0,176831
(3) Razão Molar (L)	0,22106	3,672290	0,953953
Razão Molar(Q)	<b>7,85308</b>	<b>4,458717</b>	<b>0,128666</b>
1L com 2L	0,42000	4,798079	0,933095
1L com 3L	-0,49000	4,798079	0,921986
2L com 3L	1,63000	4,798079	0,745644

Observa-se pela Tabela 16 que os parâmetros que apresentam maiores valores de efeito no processo reacional são o tempo e a razão molar. Essa informação é confirmada pela análise dos valores  $p$  mostrados na citada. Pode-se observar que os valores de  $p$  (nível de significância estatística, representa um índice decrescente da confiabilidade de um resultado) obtidos para os fatores analisados são maiores que 0,15 (limite aceitável de erro), exceto para o tempo reacional e a razão molar. Os valores de  $p$  obtidos para a variável temperatura são maiores que 0,15. Logo, confirma-se que os únicos parâmetros com efeito significativo dentro das faixas experimentais estudadas foram o tempo reacional e a razão molar.

**Tabela 17** – Coeficiente de regressão para a resposta conversão do ácido oleico a ésteres etílicos utilizando fluido supercrítico.

Fatores	Coeficiente de regressão	Desvio Padrão	$p$	Estimativas por intervalo (85%)	
				Limite inferior	Limite superior
<b>Média</b>	<b>32,80995</b>	<b>4,784017</b>	<b>0,000473</b>	<b>24,91549</b>	<b>40,70440</b>
(1) <b>Temperatura (L)</b>	-1,47155	1,836145	0,453441	-4,50151	1,55841
<b>Temperatura (Q)</b>	0,94432	2,229358	0,686634	-2,73451	4,62315
(2) <b>Tempo (L)</b>	<b>10,16099</b>	<b>1,836145</b>	<b>0,001468</b>	<b>7,13103</b>	<b>13,19095</b>
<b>Tempo (Q)</b>	-3,41146	2,229358	0,176831	-7,09029	0,26737
(3) <b>Razão Molar (L)</b>	<b>0,11053</b>	<b>1,836145</b>	<b>0,953953</b>	<b>-2,91943</b>	<b>3,14049</b>
<b>Razão Molar(Q)</b>	3,92654	2,229358	0,128666	0,24771	7,60537
<b>1L com 2L</b>	0,21000	2,399039	0,933095	-3,74883	4,16883
<b>1L com 3L</b>	-0,24500	2,399039	0,921986	-4,20383	3,71383
<b>2L com 3L</b>	0,81500	2,399039	0,745644	-3,14383	4,77383

O modelo de regressão completo, obtido através dos valores dos coeficientes de regressão calculado para a conversão na reação de esterificação enzimática do ácido oleico por intermédio de fluido supercrítico, forneceu a Equação 12.

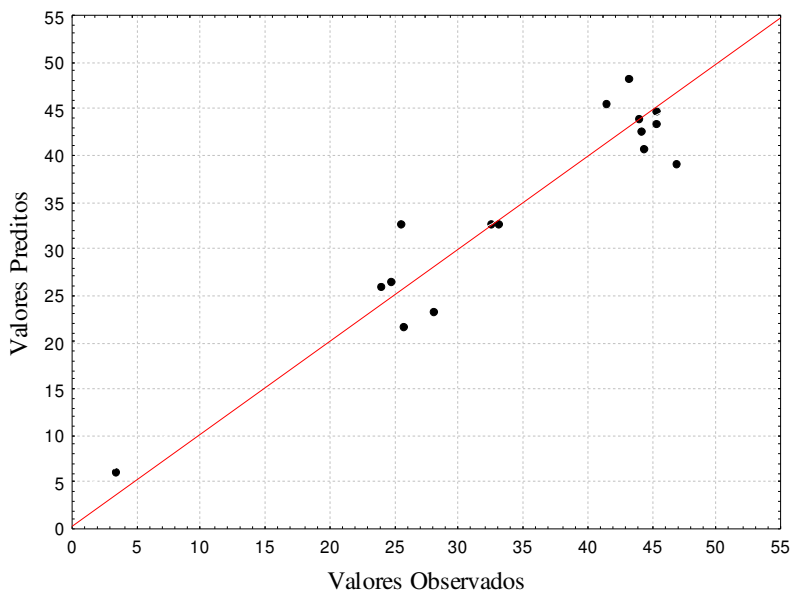
$$\text{Conversão} = 32,81*TR - 1,47*TR + 0,94*TR^2 + 10,16*TO - 3,41*TO^2 + 0,11*RM + 3,93*RM^2 + 0,21*TR*TO - 0,24*TR*TO + 0,81 TO*RM \quad (12)$$

Em que: **TR** significa temperatura de reação;

**TO** significa tempo de reação;

**RM** significa razão molar.

A adequação desse modelo pode ser observada pela incerteza dos pontos à reta, como mostrado na Figura 25, bem como pelo valor do coeficiente de determinação  $R^2 = 0,87$ , valor considerado bom, pois se aproxima de 1.



**Figura 25**– Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais da conversão em ésteres etílicos obtidos pelo planejamento experimental  $2^3$  com duplicata do ponto central da esterificação enzimática do ácido oleico por intermédio de fluido supercrítico.

A análise de variância (ANOVA - Tabela 18) indicou uma porcentagem de variação explicada de 87% para a conversão de ácido oleico em éster por intermédio de fluido supercrítico. O F calculado (Tabela 18) foi consideravelmente superior ao tabelado ( $F = 2,11$ ), para o processo em estudo foi 2,15 vezes maior. Ante o demonstrado, vê-se que o modelo ajusta-se satisfatoriamente aos dados experimentais.

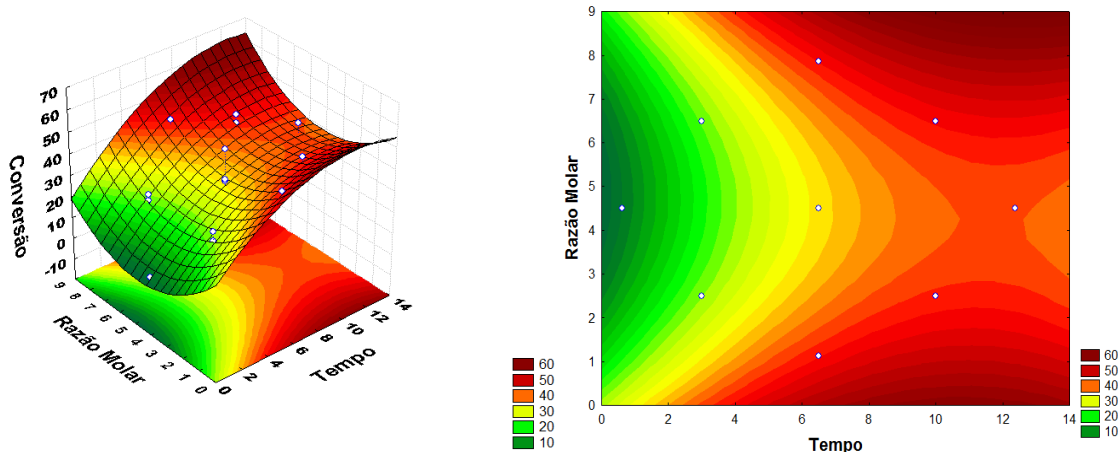
**Tabela 18** - ANOVA para conversão de biodiesel em meio supercrítico.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal	p-valor
Regressão	1885,27	9	209,47	4,55	<0,0001
Resíduos	276,26	6	46,04		
Total	2161,53	15			

% variação explicada ( $R^2$ ) = 87,0       $F;16;0,15 = 2,11$

A Figura 26 mostra a superfície de resposta para variável dependente conversão em função do tempo e da razão molar. Através da análise da superfície de resposta, pode-se

verificar que os maiores valores de conversão são obtidos com o acréscimo em conjunto do tempo e da razão molar, fato justificado pela intensidade da região vermelha na figura.



**Figura 26** - Superfície de resposta representando a conversão em função do tempo e temperatura para uma razão molar álcool: óleo de 4,5.

O tempo de contato entre os reagentes e o biocatalisador no processo enzimático é fundamental na eficiência do processo. É fato que quanto maior o tempo de contato, maior serão os valores de conversões obtidos nos processos reacionais.

O tempo reacional também influencia na atividade das enzimas. Deve-se considerar o tempo de vida do biocatalisador, um maior tempo de vida útil das lipases significará um decréscimo dos custos de processo que acelerará aplicações industriais de lipases em reações de biotransformação (DENG *et al.*, 2003).

## 5 - CONCLUSÕES

O biocatalisador produzido apresentou uma quantidade de enzima imobilizada no suporte de 94,7% o que mostra uma grande concentração de enzima presente, apresentando uma atividade catalítica de 18,95 U/g.

O estudo da produção de biodiesel via esterificação enzimática por intermédio de fluido supercrítico apresentou baixas conversões, inferiores a 96,5% (especificação exigida pela ANP), com uso de ácido oleico, álcool etílico e lipase de *Candida antarctica* Tipo B imobilizada em quitosana como catalisador. Assim, não atendendo as especificações da ANP.

A partir do planejamento experimental, observou-se que o tempo reacional é a variável que mais influência na reação e, através dos experimentos, as curvas cinéticas foram elaboradas. O maior valor de conversão encontrado com a realização dos experimentos foi de 46,9 % de conversão para uma temperatura de 29,9 °C, razão molar etanol: ácido graxo igual 4,5: 1 e tempo reacional de 6,5 horas. Os parâmetros tempo de reação e razão molar mostraram-se os parâmetros com grau de significância de 85 % influenciando diretamente no rendimento reacional. Através da análise da superfície de resposta, pode-se verificar que os maiores valores de conversão são obtidos com o acréscimo em conjunto do tempo e da razão molar. A temperatura influenciou a conversão, dentro do intervalo estudado, verificou-se que, apesar de um ligeiro favorecimento da conversão nos primeiros minutos de reação com o aumento da temperatura, a conversão é maior para a temperatura de 50 °C. O parâmetro razão molar álcool:óleo nos intervalos estudados (2,5:1; 4,5:1; 6,5:1) mostrou que os valores com a menor relação de razão molar possuem as maiores taxas de conversão. Indicando a não necessidade de um excesso estequiométrico, tornando o processo enzimático, nesse aspecto, mais vantajoso do que a catálise química convencional.

Verificou-se na avaliação do número de ciclos em que a enzima imobilizada poderia ser utilizada sem perda considerável de atividade, que a enzima pode ser reutilizada, no entanto ocorreu a perda de atividade catalítica. Apesar disso, a reutilização não acontece com os catalisadores químicos convencionais que, sendo homogêneos, não são separados ao final do processo.

Logo, os resultados apresentados nessa dissertação indicam a possibilidade do uso de lipases em reações de esterificação enzimática por intermédio de fluido supercrítico objetivando a produção de biodiesel, contribuindo, dessa forma, para redução dos impactos

ambientais, devido a não produção de subprodutos poluentes. No entanto, outros estudos devem ser realizados, pois o índice de conversão são inferiores ao exigido pela legislação vigente, necessitando de mais aprimoramento para o emprego da técnica.

---

## 6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visando complementar o estudo realizado neste trabalho, sugere-se para trabalhos futuros:

- Propor um modelo cinético para a reação de esterificação enzimática utilizando  $\text{SCO}_2$  como fluido supercrítico.
- Estudar a influência de outros gases (ex: proprano), em estado supercrítico, nas reações de enzimática.
- Testar o uso de triglicérides tais como: residuais, gorduras animais e de origem vegetal.
- Estudar a influência de outros parâmetros nas reações de síntese enzimática por intermédio de fluido supercrítico como quantidade de biocatalisador e pressão.
- Estudar outras enzimas nas reações de síntese por intermédio de fluido supercrítico.



---

**7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 589-595, 2003.

ABREU, P.G.; HIGARASHI, M.M; CUNHA JÚNIOR, A. Produção de Biodiesel a Partir de Gordura Animal. **EMBRAPA**. Disponível em:  
<[http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod\\_publicacao=1070](http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=1070).> Acesso em: 01 nov. 2009.

ADRIANO, W. S.; FILHO, E. H. C.; SILVA, J. A.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Stabilization of penicillin G acylade by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 4, p. 529-538, 2005.

ADRIANO, W.S. **Preparação e Caracterização de Derivados de Enzimas Industriais em Quitosana**. 2008. 161 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

ALI, Y.; HANNA, M. A. Durability testing of a diesel fuel, methyl tallowate and ethanol blend in a Cummins N14 410 diesel engine. **Transactions of the ASAE**, v. 39, n. 3, p. 793-797, 1996.

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 Boob of ASTM , Section 5 – Petroleum Products, Lubricants and Fossil Fuels**, 2001.

ANTCZAK, M.S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, n. 34, p.1185–1194, 2009.

ANP - Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 20 janeiro de 11.

ARANDA, D.A.G.; SANTOS, R.T.P. TAPANES, N.C.O. RAMOS A.L.D. and ANTUNES, O.A.C. **Catalysis Letters**. n. 122, p. 20–25, 2008.

AYMONIER, C. LOPPINET-SERANI, A. REVERON, H. Review of supercritical fluids in inorganic materials science. **Journal of Supercrit Fluids**. n.38, p.242–51, 2006.

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

BAN, K. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.17, p.157-165. 2007.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER L. W.H. **Biochemistry**, Freeman and Co. New York, 2003.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34, 2004.

BERMEJO, M.D. and COCERO, M.J. Supercritical water oxidation: a technical review, **AIChE Journal**. n. 52 p. 3393–3451, 2006.

BHATNAGAR, T.; BOUTAIBA, S.; HACENE, H., CAYOL, J.L.; FARDEAU, M.L., OLLIVIER, B.; BARATTI, J.C. Lipolytic activity from *Halobacteria*: Screening and hydrolase production, **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, p. 133-140, 2005.

BIODIESELBR. Resultado de todos os Leilões de Biodiesel. Disponível em: <[www.biodieselbr.com/.../leilao/leilao-biodiesel.htm](http://www.biodieselbr.com/.../leilao/leilao-biodiesel.htm)> Acesso em: 01 nov. 2009.

BRUNNER, G. Gas extraction: **An introduction to fundamentals of supercritical fluids and application to separation processes**. New York; Springer, 396 p. 1994.

CANAKCI, M; GERPEN, J. V. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids, **Transactions of the ASAE**, n.44 pp. 1429–1436, 2001.

CARDIAS, H.C.T. **Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com glutaraldeído**. 1996. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 1996.

CARRILHO, E.; TAVARES, M.C.H.; LANÇAS, F.M. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. **Química Nova**, v.24, n.4, p.509-515, 2001.

CARNEIRO, ELIZABETE ARAÚJO. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* tipo B em Toyopearl**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnológica, Universidade Federal Ceará, Fortaleza, 2008.

ÇETINUS, S. A.; ÖZTOP, H. N. Immobilization of catalase on chitosan film. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 497-501, 2000.

CHEN, Y., XIAO, B.; CHANG, J.; FU, Y.; LV, P. AND WANG, X. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. **Energy Conversion and Management**. v. 50, n. 3, p. 668-673, 2009.

CONDE, S.; FIERROS, M.; RODRÍGUEZ-FRANCO, M.I.; PUIG, C. Resolution of 1-(4-amino-3-chloro-5-cyanophenyl)-2-bromo-1-ethanol by lipase mediated enantioselective alcoholysis, hydrolysis and acylation. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 9, p. 2229-2232, 1998.

CONTESINI, F.J.; SILVA, V.C.F; MACIEL, R.F.; LIMA R.J.; BARROS, F.F.C; CARVALHO, P.O. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspegillus niger* by solid-state fermentation. **The Journal of Microbiology**, v. 47, p. 563-571, 2009.

CORDEIRO, S.C. **Síntese e Caracterização de Biodiesel Etilico para Utilização em Motores do Ciclo- Diesel**. 2003. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2003.

COSTA FILHO, EDILSON HOLANDA. **Estudo da produção enzimática de Biodiesel utilizando óleo residual e etanol**. 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnológica, Universidade Federal Ceará, Fortaleza, 2008.

COSTA, F.C.; HOESCHL, H.C.. Gestão do Conhecimento na Cadeia Produtiva de Biodiesel. Disponível em: <[http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso\\_2006/agricultura/GestaoConhecimento.pdf](http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso_2006/agricultura/GestaoConhecimento.pdf)>. Acesso em: 01 nov. 2009.

COSTA, V.E.U; AMORIM, H.L.N. de. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v.22 , n.6, 1999.

DA CUNHA, M.E.; KRAUSE, L.C.; MORAES, M.S.A.; FACCINI, C.S.; JACQUES R.A.; ALMEIDA, S.R. Beef tallow biodiesel produced in a pilot scale. **Fuel Processing Technology**, n.90, p.570–5, 2009.

DALLA-VECCHIA, R; NASCIMENTO, M.G; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. **Química Nova**, v.27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DAMBISKI, L. **Síntese de Biodiesel de Óleo de Nabo Forrageiro Empregando Metanol Supercrítico**. 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais), Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Curitiba, 2007.

DEMIRBAS, A. Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel characteristics, **Energy Conversion and Management**, n. 47, p. 2271–2282, 2006.

DEMIRBAS, M.F. Pyrolysis of vegetable oils and animal fats for the production of renewable fuels, **Energy Education Science and Technology**, n. 22.p. 59–67, 2008.

DOMINGOS, A.K.; VECCHIATTO, W.; WILHWLM, H.M.; RAMOS, L.P. The influence of BHA, BHT and TBHQ on oxidation stability of soybean oil ethyl esters (Biodiesel). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v 18, p 416-423, 2007.

DENG, L.; TAN, T. W.; WANG, F. e XU, X. B. Enzymatic production of fatty acid alkyl esters with a lipase preparation from *Candida* sp 99-125. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 105, p. 727-734, 2003.

FACCIO, C. **Estudo da Produção de Ésteres Etilicos a partir da Alcoólise de óleos Vegetais**. 2004. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Ciências Agrárias, URI, Erechim, RS, 2004.

FELIZARDO, P.; CORREIA, M.J.N.; RAPOSO, I.; MENDES, J.F.; BERKMEIE, R. and BORDADO, J.M. Production of biodiesel from waste frying oils. **Waste Management**, v.26, p. 487–494, 2005.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C.M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISÁN, J.M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, no. 7, p. 546-550, 1993.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 1, p. 8-13, 2007.

FOLHA ONLINE. ANP sugere aumento do percentual de biodiesel que é misturado ao diesel. Disponível em: <[www1.folha.uol.com.br/folha/.../ult91u497571.shtml](http://www1.folha.uol.com.br/folha/.../ult91u497571.shtml)>. Acesso em: 02 fev. 2009.

FORESTI, M. L.; PEDERNERA, M.; FERREIRA, M. L.; BUCALÁ, V. **Applied Catalysis A: General**. n.334, p. 65-72, 2008.

FREIRE, D.M.G.; SOUSA, J. S.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; ARANDA, D. A. G. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. n. 65, p.133–137, 2010.

FUKUDA, H., KONDO, A., NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, n.92, 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 Biotechnology**, v. 22, p. 114-118, 2006.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1-14, 2006.

GERPEN J. V; Biodiesel Processing and Production. **Fuel Processing Technology**. n.86, p. 1097-1107, 2005.

GOTOR-FERNANDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. n. p. 111-120, 2006.

GUISÁN, J.M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization stabilization of enzymes, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, no. 6, p. 375-382, 1988.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. **Biochemical Engineering Journal**, n.34, p.273-278, 2007.

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

HE, H.; WANG, T.; ZHU, S.; Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process. **Fuel**. n.86, p.442–7, 2007.

HOBBS, H.R; THOMAS, N.R. Biocatalysis in supercritical fluids, in fluoruous solvents, and under solvent-free conditions. **Chemical Reviews**, n. 107, v.6, n. 2786-2820, 2007.

HODES, M.; MARRONE, P.; HONG, G. Salt precipitation and scale control in supercritical water oxidation (A): fundamentals and research. **Journal of Supercritical Fluids**, n. 29, p.265–88, 2004.

HOLANDA, A. **Biodiesel e inclusão social**. Brasília: Câmara dos deputados, Coordenação de Publicações. 200p, 2004.

HOU, C. T. Industrial uses of lipase. In: KUO, T. M. and GARDNER, H. W. **Lipid Biotechnology**. New York: Marcel Dekker. 2002.

ISO, M.; CHEN, B.X.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. n.16, p.53-58, 2001.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal Of Bioscience and Bioengineering**, n.91, p.12-15, 2001.

KARRA, P. K.; VELTMAN, M. K.; KONG, S. C. Characteristics of engine emissions using biodiesel blends in low-temperature combustion regimes. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 3763 – 3770, aug. 2008.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M.W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin, **Organic Process Research & Development**, v. 6, p. 446-451, 2002.

KOELLER, K.M; WONG C.H. Enzymes for chemical synthesis. **Nature**, v. 409, p. 232-240, 2001.

KOSE, O.; TUTER, M.; AKSOY, H. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. **Bioresource Technology**. n.83, p.125-129, 2002.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.126-139. 2004.

KRAUSE, L. C. **Desenvolvimento do processo de produção de biodiesel de origem animal**. 2008, 147p. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KUCEK, K.T.; RAMOS, K.T.; DOMINGOS, A.K., WILHELM, H.M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia**, 2005. Disponível em: <[www.biotecnologia.com.br/revista/bio31/biodiesel.pdf](http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio31/biodiesel.pdf)> Acesso em: 03 nov. 2009.

KULKARNI, M.G., DALAI, A.K. Waste cooking oil – An economical source for biodiesel: A Review, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 2901-2913, 2006.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

LIMA, D.G, SOARES, V.C.D, RIBEIRO B.E., CARVALHO D.A., CARDOSO E.C.V., RASSI F.C, Diesel-like fuel obtained by pyrolysis of vegetable oils. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. n.71, p.987–96, 2004.

LIMA, L.P. **Produção de ácidos graxos assistida por ultrassom visando à produção de biodiesel / Larissa Pinto de Lima**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2010.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTES., R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v.116, p.1-10. 2005.

LOZANO P. ; VILLORA G. ; GOMEZ D. ; GAYO A. B. ; SANCHEZ-CONESA J. A.; RUBIO M. ; IBORRA J. L. Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, n. 29, p.121–128, 2004.

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.

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

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, n. 1, p. 38-46. 2004.

MADRAS, G.; KOLLURU, C.; KUMAR, R. Synthesis of biodiesel in supercritical fluids. **Fuel**, v. 83, p. 2029-2033, 2004.

MADRAS, G.; VARMA, M.N.; DESHPANDE, P. Synthesis of biodiesel in supercritical alcohols and supercritical carbon dioxide. **Fuel**, v. 89, p. 1641-1646. 2010.

MALCATA, F.X.; REYES, H.R.; GARCIA, H.S.; HILL JR., C.G.; AMUNDSON, C.H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils. A review. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 67, n. 12, p. 890-910, 1990.



MANSUR, H.S., COSTA JR, E.S.; Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v.31,n.6, 2008.

MARQUES, M.V.; SILVA, C.F.G; NACIUK, F.F.; FONTOURA, L.A.M. A Química, os Processo de Obtenção e as Especificações do Biodiesel. **Revista Analytica**, n. 33, 2008.

MARR, R.; GAMSE, T.; Use of supercritical fluids for different processes including new developments – a review. **Chemical Engineering and Processing**. n.39, p.19–28, 2000.

MARRONE, P.A; HODES, M; SMITH, K.A. Salt precipitation and scale control in supercritical water oxidation – Part B: Commercial/full-scale applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, n. 29, pp. 289–312, 2004.

MARTINELLE, M.; HOLMQUIST, M.; HULT, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1258, p. 272-276, 1995.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE R.; GUISÁN, J.M.; Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, no. 7, p. 509-515, 2000.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LOPEZ-GALLEGO, F.; PESSELA, B.C.C.; HIDALGO, A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 274-280, 2006.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40 p. 1451–1463, 2007.

MATOS, S.A. De acordo com a ANP, potencial colocará Brasil em novo patamar. **Jornal do Brasil**. Disponível em: <<http://www.jb.com.br/>>. Acesso em: 30 de nov. de 2010.

MELLO, F. O.T.; PAULILLO, L. F.; VIAN, C.E.F. O biodiesel no Brasil: Panorama, perspectivas e desafios. **Informações Econômicas**, v.37, n.1, 2007.

Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT. PROGRAMA BRASILEIRO DE BIOCOMBUSTÍVEIS. Brasília, 2002. Disponível em: <<http://dabdoub-labs.com.br/pdf/probiodiesel.pdf>> Acesso em: 01 nov. 2009.

MONDAL, K.; MEHTA, P.; MEHTA, B. R.; VARANDANI, D.; GUPTA, M. N. A. bioconjugate of *Pseudomonas cepacia* lipase with alginate with enhanced catalytic efficiency. **Biochimica et Biophysica Acta: Proteins and Proteomics**, v. 1764, n. 6, p. 1080-1086, 2006.

MUTHUKUMAR, K., RANGANATHAN, S.V., NARASIMHAN, S.L., An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, n. 99, p.3975-3981, 2008.

MUZZARELLI, R. A. A. **Natural chelating polymers**. New York: Pergamon Press. 1973.

NOUREDDINI H, G.X.; PHILKANA, R.S., Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**. n.96, p.769-777, 2005.

OLGA, B. A Fabulosa Vida de Expedito Parente, **Agência Brasil**, Fortaleza, 2005. Disponível em: < [http://zapper.xitizap.com/xitizap%2031/index\\_files/Page566.htm](http://zapper.xitizap.com/xitizap%2031/index_files/Page566.htm)>. Acesso em: 02 nov. 2010.

PALOMO, J.M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FUENTES, M.; GUI SAN J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzymatic production of (3S,4R)-(-)-4-(4'-fluorophenyl)-6-oxopiperidin-3-carboxylic acid using a commercial preparation from *Candida Antarctica A*: the role of a contaminant esterase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 13, p. 2653-2659, 2002.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUI SAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447-454, 2005.

PALOMO, J.M. Modulation of enzymes selectivity via immobilization. **Current Organic Synthesis**, v. 6, *in press*, 2009.

PARK, K. H. Projeto Biodiesel e a Inclusão Social. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/ProjetoBiodiesel.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2009.

PEDROCHE J.; YUST M. M.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GIRÓNCALE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; GUISÁN, J.M., MILLÁN, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p.1160–1166, 2007.

PINTO, A.C.; GUARIERO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C., Biodiesel: an overview. **Journal of Brazilian Chemical Society**, n.16 , p.1313-1330. 2005.

POUSA, G.P.A.G; SANTOS, A.L.F. and SUAREZ, P. A.Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**. v. 35, n. 11, p. 5393-5398, 2007.

RAMOS, L. P.; **Anais do Congresso Brasileiro de Soja**; Centro Nacional de Pesquisa de Soja; Empresa Nacional de Pesquisa Agropecuária; Londrina, PR, 17 a 20 de maio, p. 233, 1999.

RATHORE, V.; MADRAS, G. Synthesis of biodiesel from edible and non-edible oils in supercritical alcohols and enzymatic synthesis in supercritical carbon dioxide. **Fuel**. v. 86, p. 2650-2659, 2007.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**, n.27, p. 60-67, 2007.

REETZ, M.T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 527, 1996.

REETZ, M. T.; RÜGGERBERG, C. J.; DRÖGE, M. J.; QUAX, W. J. Immobilization of chiral enzyme inhibitors on solid supports by amide-forming coupling and olefin metathesis. **Tetrahedron**, v. 58, p. 8465-8473, 2002.

REIS, P.; HOLMBERG, K. MILLER, R.; LESER, M.E.; RAAB, T.; WATZKE, H. J.; Lipase reaction at interfaces as self-limiting processes. **Comptes Rendus Chimie**, n. 12, p.163-170, 2009.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A.V. e SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: Uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p.1374-1380, 2007.

ROCHA FILHO, G. N. ; BRODZKI, D. ; DJÉGAMARIADASSOU, G. . Formation of alkanes, alkylcycloalkanes and alkylbenzenes during the catalytic hydrocracking of vegetable oils. **Fuel**, v. 72, n. 4, p. 543-549, 1993.

RODRIGUES D.S. **Estudo da imobilização de lipase B de *Candida antarctica* em carvão ativado e quitosana**, 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnológica, Universidade Federal Ceará, Fortaleza, 2005.

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

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2a Ed. Campinas, São Paulo, 2009.

RODRIGUES, R.C. **Síntese de Biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalizada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. 2009, 183 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

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. and LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**. n.98 p. 648–653, 2007.

SALAZAR, L.; BERMUDEZ, J.L.; RAMÍREZ, C.; LLAMA, E.F.; SINISTERRA, J.V. Resolution of 3-naphthoxy-1,2-propanediol using *Candida antarctica* lipase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 3507-3514, 1999.

SALIS, A., PINNA, M., MONDUZZI, M. AND SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**. v.119, n.3 p.291-299. 2005.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancreatique sur les esters em emulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, n. 3, p. 513-521, 1958.

SECUNDO, F.; MIEHÉ-BRENDELÉ, J.; CHERALU, C.; FERRANDI, E.E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, p. 350-361, 2008.

SCHUCHARDT, U; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M.; Transesterification of vegetable oils: A review. **Journal the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p.199-210, 1998.

SHAHID, E. M. AND JAMAL, Y. A review of biodiesel as vehicular fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 12, n. 9, p. 2484-2494, 2008.

SHAY, E.G. Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. **Biomass and Bioenergy**. v.4, n.4, p. 227–242. 1993.

SHU, Q.; YANG, B.; YUAN,.; QING; H. S. AND ZHU, G; Synthesis of biodiesel from soybean oil and methanol catalyzed by zeolite beta modified with La<sup>3+</sup>. **Catalysis Communications**. n.8, v.8, p. 2159–2165, 2007.

SHUMAKER, J.L.C.; CROFCHECK, S.A.; TACKETT, E.S.; JIMENEZ, M.; Biodiesel production from soybean oil using calcined Li–Al layered double hydroxide catalysts. **Catalysis Letters**. v.115, n. 1-2, p.56–61. 2007.

SILVA, C.; WESCHENFELDER, T.A.; ROVANI, S.; CORAZZA, F.C.; CORAZZA, M.L.; DARIVA, C.; Continuous production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed ethanol. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.46, p.5304–9, 2007.

SILVA, J.A. **Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada para a síntese de ésteres de vitamina A**, 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnológica, Universidade Federal Ceará, Fortaleza, 2007.

SMITH, J.M., VAN NESS, H.C., ABBOTT, M.M. “**Introduction to Chemical Engineering Thermodynamics**”, 7<sup>a</sup> Ed., McGraw – Hill International Edition (2005).

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R. N.; CASARINI, D.; PIFFERI, P.G. A novel chitosan derivate to immobilize  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 427-438, 2001.

STEPHAN, M. F. A worldwide review of the commercial production of biodiesel – a technological, economic and ecological investigation based on case studies. Viena, 2004. Disponível em: <<http://bio.freelogy.org/wiki/User:Jeffrey>>, Acesso em: 02 nov. 2009.

STREITWIESER, A.; HEATHCOCK, C. H.; KOSOWER, E. M.; **Introduction to Organic Chemistry**, New York, Macmillan: 4th ed., 1992.

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.

SUAREZ, P.A.Z.; MENEGHETTI, S.M.P.; MENEGHETTI, M.R.; WOLF, C.R. Transformação de triglicérides em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: Algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, v. 30, p. 667-676, 2007.

SUAREZ, P.A.Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B.; Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.768-775, 2009.

TALUKDER, M.M.R.; PUAH, S.M.; WU, J.C.; WON, C.J.; CHOW, Y. Lipase-catalyzed methanolysis of palm oil in presence and absence of organic solvent for production of biodiesel. **Biocatalysis and Biotransformation**. n.24, p.257-62, 2006.

TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M.R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H.; Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: a comparative study of immobilized whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**. v.39, n.1, p.185-9, 2008.

TYSON, K.S. Biodiesel Handling and Use Guidelines, **NREL: Nonpetroleum Based Fuels**, Golden CO, n.22 2001.

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, n. 4, p. 293-308, 1994.

VARMA, M. N. and MADRAS, G. Synthesis of biodiesel from castor oil and linseed oil in supercritical fluids. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 46, n.1, p. 1-6, 2007

VARMA M.N, MADRAS G. Kinetics of synthesis of butyl butyrate by esterification and transesterification in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.83, n.8, p.1135-44, 2008.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 32-38, 1997.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 515-536, 2007.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. e HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B- Enzymatic**. v. 9, p. 113-148, 2000.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos graxos em óleos de gorduras: Identificação e quantificação**, São Paulo: Varela, p. 14-17, 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.D; AL-SHEMMERI, T.; EAMES, P; MCMULLAN, J; HEWITT, N. and HUANG, Y. An experimental investigation of the performance and gaseous exhaust emissions of a diesel engine using blends of a vegetable oil. **Applied Thermal Engineering**. n.26 p. 1684–1691, 2006.

WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Improved activity retention of enzymes deposited on solid supports. **Biotechnol. Bioeng.** v. 41, n. 5, p. 171, 1993.

WEN, D.; JIANG H. AND ZHANG, K. Supercritical fluids technology for clean biofuel production. **Progress in Natural Science**. v.19, n. 3, p. 273-284, 2009.

## ANEXO A

## RESOLUÇÃO ANP Nº 7, DE 19.3.2008 - DOU 20.3.2008

REGULAMENTO TÉCNICO ANP Nº 1/2008 (Especificações do Biodiesel-B100).

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m <sup>3</sup>	850-900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 - EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	Mm <sup>2</sup> /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	15764	-	EN 14103
Resíduo de carbono (4)	% massa	0,050	15586	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 (5)	-	Anotar	-	613 6890 (6)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19 (7)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	-
			-	-	EN 14104 (8)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341	6584 (8)	-
				-	EN 14105 (8)
					EN 14106 (8)
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344	6584 (8)	-
			-	-	EN 14105 (10)
Mono, di, triacilglicerol (5)	% massa	Anotar	15342	6584 (8)	-
			15344		-
					EN 14105 (8)
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de Iodo (5)	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.(2)	h	6	-	-	EN 14112 (8)

Nota:

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

(5) 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.

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

(7) 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.

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

## ANEXO B

## Cromatograma obtido pela análise de cromatografia gasosa (CG/MS)

## 1- Ácido Oleico

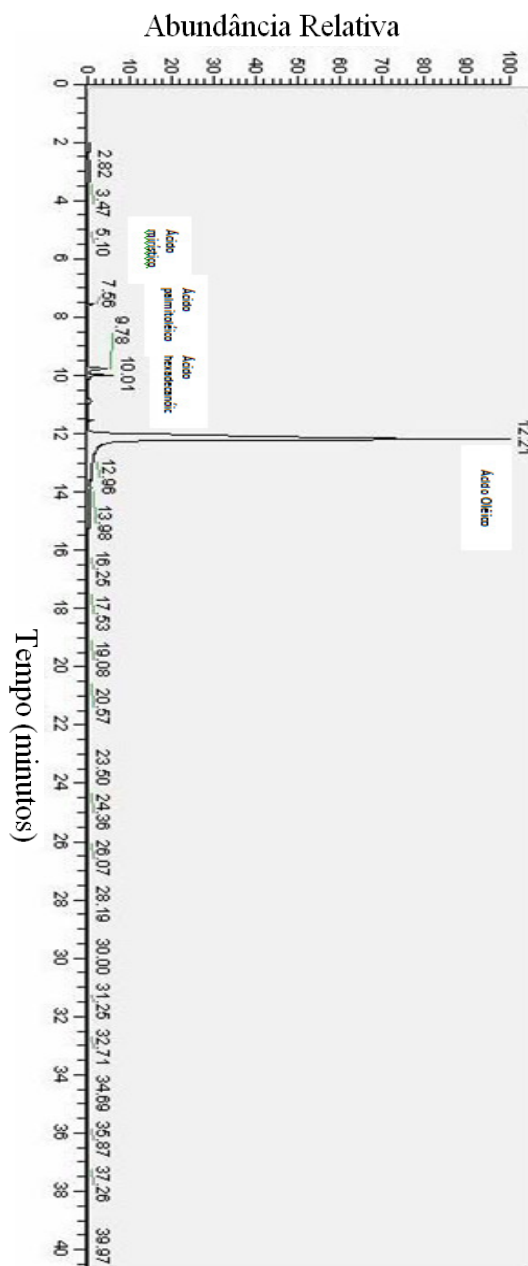


Figura B. 1 – Cromatograma da amostra de Ácido Oleico.

## ANEXO C

**Tabela 11** – Valores de conversão obtidos na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio de fluido supercrítico na razão molar álcool:óleo de 6,5:1, nas temperaturas de 35 e 50 °C, para realização do estudo cinético.

Tempo (horas)	Conversão (%)	
	Temperatura (°C)	
	35	50
1	11,3 ± 1,9	17,9 ± 1,8
3	22,7 ± 1,4	26,6 ± 1,4
5	27,1 ± 1,1	36,2 ± 1,6
7	36,2 ± 1,8	38,1 ± 1,1
9	40,9 ± 1,1	44,7 ± 1,9
10	41,2 ± 1,8	45,3 ± 1,8

**Tabela 12** – Valores de conversão obtidos na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio de fluido supercrítico nas razões molares de álcool:óleo de 2,5:1, 4,5:1, 6,5:1, na temperatura de 35 °C.

Tempo (horas)	Conversão (%)		
	Razão molar		
	2,5:1	4,5:1	6,5:1
1	11,5 ± 0,7	10,15 ± 0,6	8,7 ± 0,5
3	23,82 ± 0,9	21,7 ± 0,6	22,74 ± 0,6
5	31,19 ± 0,6	29,11 ± 0,5	26,63 ± 0,8
7	35,72 ± 8	33,84 ± 0,7	32,51 ± 0,5
9	36,17 ± 8	34,97 ± 0,7	34,48 ± 0,9
10	39,44 ± 7	37,29 ± 0,7	41,17 ± 0,8

**Tabela 13** – Valores de conversão obtidos na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio de fluido supercrítico nas razões molares de álcool:óleo de 2,5:1, 4,5:1, 6,5:1, na temperatura de 50 °C.

Tempo (horas)	Conversão (%)		
	Razão molar		
	2,5:1	4,5:1	6,5:1
1	14,76 ± 0,7	11,9 ± 0,7	10,24 ± 0,8
3	28,08 ± 0,8	26,1 ± 0,6	25,57 ± 0,6
5	37,41 ± 0,7	35,17 ± 0,8	32,25 ± 0,7
7	40,92 ± 0,9	38,59 ± 0,7	34,86 ± 0,8
9	43,08 ± 0,6	40,23 ± 0,8	41,35 ± 0,7
10	44,09 ± 0,8	42,55 ± 0,9	45,29 ± 0,9

**Tabela 15** – Valores de conversão obtidos na esterificação enzimática do ácido oleico com etanol por intermédio de fluido supercrítico na razão molar álcool: óleo de 4,5: 1, temperatura de 29,9°C , com a utilização de zeólita do tipo A.

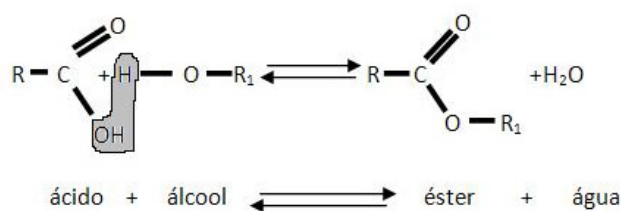
<b>Tempo (horas)</b>	<b>Conversão (%)</b>
1	15,4 ± 1,9
3	28,7 ± 1,8
5	41,1 ± 1,6
6,5	53,2 ± 1,7
9	56,8 ± 1,9
10	57,5 ± 1,1

## ANEXO D

**Cálculo da quantidade de zeólita para as reações de esterificação.**

Supondo uma conversão de 100 % para a reação de esterificação com 200 g de ácido oleico puro, temos que a quantidade de água formada na reação será:

Cálculo estequiométrico da reação: (MM Ácido Oleico = 282,46 g/mol e MM Água = 18 g/mol).



$\frac{10\text{g}}{282,46\text{g/mol}} = 0,0354\text{mol} \times 18\text{g/mol} \approx 0,6372\text{gH}_2\text{O}$  formada para 100 % de conversão dos ácidos graxos.

Como a capacidade de adsorção da zeólita 3 A para o sorbato água é de 20% em relação ao seu peso, temos que a quantidade necessária de zeólita ativada para adsorção de toda água formada na reação será:

$$\begin{array}{l}
 20\% \rightarrow 0,6372\text{ g de H}_2\text{O} \\
 100\% \rightarrow X\text{ g de zeólita}
 \end{array}$$

X = 3,18 g de zeólita ativada para adsorver toda a água da reação de esterificação.