



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

EDILANE DE SOUSA GOMES RIOS

CATÁLISE ENZIMÁTICA NA SÍNTESE DO BIODIESEL DE MAMONA

FORTALEZA

2013

EDILANE DE SOUSA GOMES RIOS

CATÁLISE ENZIMÁTICA NA SÍNTESE DO BIODIESEL DE MAMONA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestrado.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte.

Coorientador: Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção.

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R453c Rios, Edilene de Sousa Gomes.

Catálise enzimática na síntese do biodiesel de mamona / Edilene de Sousa Gomes Rios. – 2013.
95 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2013.

Orientação: Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte.

Coorientação: Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção.

1. Enzimas. 2. Biodiesel. 3. Transesterificação. 4. Óleo de mamona. I. Título.

CDD 540

EDILANE DE SOUSA GOMES RIOS

CATÁLISE ENZIMÁTICA NA SÍTESE DO BIODISEL DE MAMONA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestrado em Química
Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 29/07/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Artur Silva Filho
Universidade Estadual do Piauí (UESPI)

A Deus.

A meu filho amado, Vinícius e meu marido
Jeison que estiveram ao meu lado durante esta
caminhada compartilhando momentos de
alegrias e dificuldades.

AGRADECIMENTOS

À Instituição CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. Francisco Monte e ao Prof. Dr. João Carlos da Costa Assunção pela orientação, pela excelente orientação.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos e Prof. Dr. Francisco Artur Silva Filho pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos meus pais, Antônio e Raimunda pelo amor, carinho, dedicação e pelo apoio em todos os momentos da vida.

A meu marido, Jeison e meu pequeno filho, Vinícius, pela companhia durante o desenvolvimento deste trabalho, pelo carinho e atenção nos momentos bons e difíceis da vida.

A todos os meus amigos e colegas de laboratório pela amizade e companheirismo, em especial a: minha querida amiga Emanuela pelos longos anos de amizade, a Nara Tavares pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, aos amigos do departamento de bioquímica, Nara e Rafael pela colaboração no laboratório de fisiologia vegetal. Ao meu querido amigo Edangelo pelas inúmeras vezes que se disponibilizou a me ajudar, a Jack pela amizade.

Universidade Federal do Ceará e aos professores do curso de pós-graduação em química pela contribuição na minha formação. Ao professor Enéas Gomes do laboratório de fisiologia vegetal por ter cedido equipamentos para as análises químicas.

Agradeço a Deus, por ter me presenteado com a amizade e o carinho de pessoas especiais, que tornaram essa caminhada mais feliz.

RESUMO

O presente estudo visou o desenvolvimento de um método para obtenção de biodiesel, via rota metílica, a partir do óleo de mamona utilizando enzimas comerciais e/ou células íntegra como biocatalisadores através de reações de transesterificação. Para o desenvolvimento do trabalho foram testadas sete variedades de enzimas comerciais e sete fontes enzimáticas de origem vegetal (látex das espécies *Ficus benjamina*, *Manihot glaziovii* Muell. Arg., *Calotropis procera*, *Jatropha curcas* L., *Ficus pumila*, *Euphorbia tirucalli* L. e as sementes de *Lens culinaris*). A composição química do óleo de mamona foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (CG-EM). Os resultados revelaram a predominância de cinco ácidos graxos, palmítico, linoléico, oléico, esteárico e ricinoléico, identificados e quantificados na forma de seus ésteres metílicos. Praticamente, 95% do óleo foi composto por ácido ricinoléico (ácido 12-hidróxi-9-octadecenóico). As fontes enzimáticas de origem vegetal foram submetidas a testes de atividade hidrolítica para avaliar seus potenciais como biocatalisadores. A partir dos resultados, foram selecionadas duas amostras para prosseguir com os experimentos de síntese do biodiesel. As análises das amostras de biodiesel obtidos por síntese enzimática foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (CG-EM). A validação do método cromatográfico para análise do biodiesel de mamona por via metílica foi feita utilizando soluções multielementares de padrões dos ésteres metílicos previamente sintetizados. Cinco curvas de calibração foram obtidas, utilizando o método do padrão interno, para quantificação de cada éster. Dentre as fontes enzimáticas utilizadas na síntese do biodiesel a que apresentou melhor resultado foi a enzima comercial Novozym 435 com formação de 55,33 % de biodiesel nos testes iniciais. Foram realizados testes para otimizar os seguintes parâmetros reacionais: pH, co-solvente, razão álcool: óleo, quantidade de enzima e solvente para recuperação da enzima.

Palavras-chave: Enzimas. Biodiesel. Transesterificação. Óleo de Mamona.

ABSTRACT

The present study aimed to develop a method of obtaining biodiesel by methyl route, from castor oil using commercial enzymes and / or whole cells as biocatalysts through transesterification reactions. In developing this research were tested seven varieties of commercial enzymes and enzymatic some sources of plant (latex species *Ficus benjamina*, *Manihot glaziovii* Muell. Arg., *Calotropis procera*, *Jatropha curcas* L., *Ficus pumila*, *Euphorbia tirucalli* L. and seeds *Lens culinaris*). The chemical composition of castor oil was determined by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS). The results showed the presence of fatty acids, palmitic, linoleic, oleic, stearic and ricinoleic identified and quantified in the form of their methyl esters. Almost 95% of the oil was composed of ricinoleic acid acid (12-hydroxy-9-octadecenoic). The enzymatic sources of plant origin were tested for hydrolytic activity to assess their potential as biocatalysts. From the results, two samples were selected to proceed with the experiments of biodiesel synthesis. The analysis of the biodiesel samples obtained by enzymatic synthesis was performed by GC-MS. The chromatographic method validation to analysis of castor bean biodiesel was done using solutions of previously synthesized methyl esters. Five calibration curves were obtained using the internal standard method for quantitation of each ester. Among the sources used in the enzymatic synthesis of biodiesel showed the best result was a commercial enzyme Novozym 435 forming 55.33% of biodiesel in the initial tests. Tests were conducted to optimize the following reaction parameters: pH, co-solvent ratio alcohol: oil, the amount of solvent to enzyme and recovering the enzyme. Keywords: Enzymes. Biodiesel. Transesterification. Castor Oil.

Keywords: Enzymes. Biodiesel. Transesterification. Castor Oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Desempenho dos principais países produtores de biodiesel no ano de 2010.....	20
Figura 2	– Capacidade nominal autorizada pela ANP, demanda compulsória e produção de biodiesel por região para o ano de 2012.....	23
Figura 3	– Moléculas de glicerídeos: I- monoglicerídeo, II- diglicerídeo e III- triglicerídeo, em que R1, R2 e R3 são cadeias carbônicas longas que constituem os ácidos graxos.....	24
Figura 4	– Distribuição de culturas de oleaginosas no território brasileiro.....	26
Figura 5	– <i>Ricinus communis</i>	27
Figura 6	– Molécula do ácido ricinoléico.	28
Figura 7	– Viscosidade de óleos antes e depois da transesterificação.....	30
Figura 8	– Reação de transesterificação de triglicerídeos.....	31
Figura 9	– Etapas da transesterificação de um triglicerídeo.....	32
Figura 10	– Mecanismo de transesterificação catalisada por base.....	33
Figura 11	– Mecanismo de transesterificação por catálise ácida.....	35
Figura 12	– Reações catalisadas por lípases.....	41
Figura 13	– Ativação de um éster promovida por resíduos de aminoácidos pertencentes a um tipo de lipase.....	42
Figura 14	– Mecanismo catalítico de uma lipase. Atuação frente a um éster.....	43
Figura 15	– Mecanismo de liberação do produto reacional após a catalise de uma lipase.....	44
Figura 16	– Número de artigos publicados por ano e as citações associadas às palavras-chave “Biodiesel and enzyme”, entre os anos 2000 e 2013.....	45
Figura 17	– Cromatoplaça das frações obtidas após cromatografia em coluna do produto obtido a partir do ácido oleico. 1-Fração hexânica, 2-Fração Hexano/Acetato 5%, 3-Fração Hexano/acetato 10 % e 4-Fração Acetato.	49
Figura 18	– Reação de saponificação.....	55
Figura 19	– Tratamento da fase saponificável da reação de saponificação seguida da esterificação com metanol com catalisador ácido.....	56
Figura 20	– Cromatograma de íons totais dos ésteres metílicos do óleo de mamona refinado.	57
Figura 21	– Gráfico do desempenho na atividade hidrolítica para espécies vegetais.....	62
Figura 22	– Rendimentos de ricinolato de metila obtidos por transesterificação do óleo de mamona com fontes enzimáticas.	63
Figura 23	– Cromatograma da reação de obtenção de biodiesel de mamona catalisada por Novozyme 435.....	65
Figura 24	– Comparação do desempenho de algumas enzimas comerciais e os potenciais fontes enzimáticas frente a transesterificação do ácido	66

	ricinoléico.	
Figura 25	– Cromatograma da reação de obtenção de biodiesel de mamona catalisada por Novozyme 435(CAL-B) e utilizando Hexano como co-solvente.....	68
Figura 26	– Cromatograma dos padrões cromatográficos analisados na forma de solução multielementar 1500ppm.....	81
Figura 27	– Cromatograma do padrão cromatográfico ricinolato de metila analisado juntamente com padrão interno em solução 1000ppm.....	81
Figura 28	– Espectro de RMN H1 (300 MHz, CDCl3) do Estearato de Metila....	82
Figura 29	– Espectro de RMN C13 BB (75 MHz, CDCl3) do Estearato de Metila.	83
Figura 30	– Espectro de RMN C 13 DEPT 135° (75 MHz, CDCl3) do Estearato de Metila.....	84
Figura 31	– Espectro de RMN H1 (300 MHz, CDCl3) do Linoleato de Metila....	85
Figura 32	– Espectro de RMN C 13 BB (75 MHz, CDCl3) do Linoleato de Metila.....	86
Figura 33	– Espectro de RMN C13 DEPT 135° (75 MHz, CDCl3) do Linoleato de Metila.....	87
Figura 34	– Espectro de RMN H1 (300 MHz, CDCl3) do Oleato de Metila.....	88
Figura 35	– Espectro de RMN C 13 BB (75 MHz, CDCl3) do Oleato de Metila.....	89
Figura 36	– Espectro de RMN C13 DEPT 135° (75 MHz, CDCl3) do Oleato de Metila.	90
Figura 37	– Espectro de RMN H1 (300 MHz, CDCl3) do Palmitato de Metila.	91
Figura 38	– Espectro de RMN C 13 BB (75 MHz, CDCl3) do Palmitato de Metila.....	92
Figura 39	– Espectro de RMN C13 DEPT 135° (75 MHz, CDCl3) do Palmitato de Metila.	93
Figura 40	– Espectro de RMN H1 (300 MHz, CDCl3) do Ricinolato de Metila...	94
Figura 41	– Espectro de RMN C 13 BB (75 MHz, CDCl3) do Ricinolato de Metila.....	95
Figura 42	– Espectro de RMN C13 DEPT 135° (75 MHz, CDCl3) do Ricinolato de Metila.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Distribuição das usinas regulamentadas pela ANP no território brasileiro e suas respectivas capacidades de produção.....	20
Tabela 2	– Ácidos graxos mais comuns na natureza.....	25
Tabela 3	– Características dos catalisadores ácidos e básicos empregados em transesterificação.....	36
Tabela 4	– Atividade hidrolítica em espécies vegetais.....	39
Tabela 5	– Rendimentos de obtenção de biodiesel utilizando lípases comerciais.....	45
Tabela 6	– Quantidades de metanol e óleo usadas nos testes de razão molar álcool:óleo.....	53
Tabela 7	– Quantidades de enzima usadas nos testes para avaliar a melhor proporção de enzima.....	54
Tabela 8	– Rendimentos das reações de síntese dos padrões cromatográficos.....	57
Tabela 9	– Equações de curva de calibração e coeficientes de linearidade para os ésteres metílicos do óleo de mamona.....	59
Tabela 10	– Resultados da recuperação de padrões de ésteres metílicos adicionados ao óleo de mamona.....	59
Tabela 11	– Resultados de reprodutibilidade da análise de soluções 100 µg/mL de padrões de ésteres metílicos do óleo de mamona.....	60
Tabela 12	– Atividades hidrolíticas de fontes vegetais (látex e sementes de lentilha)	61
Tabela 13	– Rendimentos de ésteres metílicos (biodiesel) obtidos por transesterificação do óleo de mamona com fontes enzimáticas.....	63
Tabela 14	– Resultados da avaliação do melhor co-solvente.....	67
Tabela 15	– Resultado do teste de avaliação da melhor razão álcool:óleo.....	69
Tabela 16	– Resultado do teste de avaliação da melhor quantidade de enzima.....	70
Tabela 17	– Resultado do teste de avaliação do pH.....	70
Tabela 18	– Resultado dos testes de avaliação do melhor solvente de recuperação da enzima.....	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Aspectos históricos do Biodiesel.....	24
2.2	Matéria prima para produção do biodiesel.....	24
2.2.1	<i>Óleos e Gorduras.....</i>	24
2.1.2	<i>Óleo de mamona</i>	27
2.3	Reação de transesterificação como tecnologia de produção do biodiesel.....	30
2.3.1	<i>Catalisadores Homogêneos Básicos.....</i>	33
2.3.2	<i>Catalisadores Homogêneos Ácidos.....</i>	34
2.3.3	<i>Catalisadores Heterogêneos.....</i>	36
2.4	Lipáses.....	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	Especificação dos reagentes e equipamentos	46
3.1.1	<i>Biocatalisadores.....</i>	46
3.1.2	<i>Determinação da atividade lipásica.....</i>	47
3.1.3	<i>Síntese do Biodiesel.....</i>	46
3.1.4	<i>Padrões cromatográficos.....</i>	47
3.1.5	<i>Equipamentos.....</i>	47
3.2	Procedimento experimental	47
3.2.1	<i>Determinação da composição em ácidos graxos do óleo de mamona.....</i>	47
3.2.2	<i>Síntese dos padrões cromatográficos.....</i>	48
3.2.3	<i>Curva de Calibração.....</i>	49
3.2.4	<i>Determinação da atividade lipásica de fontes enzimáticas vegetais.....</i>	50
3.2.5	<i>Reação de Transesterificação Enzimática.....</i>	51
3.2.6	<i>Otimização das reações de transesterificação enzimática.....</i>	52
3.2.6.1	<i>Có-solventes e adição de metanol em etapas.....</i>	52
3.2.6.2	<i>Razão molar álcool/óleo.....</i>	52
3.2.6.3	<i>Quantidade de enzima.....</i>	55

3.2.6.4	Avaliação do pH.....	54
3.2.6.5	Solvente para recuperação do biocatalisador.....	55
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	55
4.1	Determinação da composição em ácidos graxos do óleo de mamona.....	55
4.2	Síntese dos padrões cromatográficos.....	58
4.3	Curva de Calibração.....	59
4.4	Determinação da atividade lipásica de fontes enzimáticas vegetais.....	61
4.5	Reação de Transesterificação Enzimática.....	63
4.6	Otimização das reações de transesterificação enzimática.....	67
4.6.1	<i>Có-solventes e adição de metanol em etapas.....</i>	68
4.6.2	<i>Razão molar álcool/óleo.....</i>	69
4.6.3	<i>Quantidade de enzima.....</i>	70
4.6.4	<i>Avaliação do pH.....</i>	71
4.6.5	<i>Solvente para recuperação do biocatalisador.....</i>	72
5	CONCLUSÃO.....	73
6	REFERÊNCIAS	76
	ANEXO A – CROMATOGRAMS E ESPECTROS	82

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a busca por combustíveis alternativos vem ganhando destaque no cenário mundial motivada, sobretudo, por questões ambientais e econômicas provocadas pelo uso dos combustíveis fósseis. Deste modo, os biocombustíveis surgem como alternativa de fonte de energia renovável, que podem ser obtidos a partir da biomassa e que liberam na atmosfera quantidades de poluentes significativamente menores que os combustíveis fósseis (LOBO, FERREIRA, 2009). Entre os biocombustíveis, o biodiesel constitui um derivado obtido a partir de óleos vegetais e que representa uma alternativa em relação ao uso do diesel derivado do petróleo. O uso deste biocombustível foi relatado já no século XIX, quando Rudolph Diesel, inventor do motor a diesel, utilizou além do óleo derivado do petróleo, o óleo de amendoim como combustível de alimentação do motor em seus experimentos. Entretanto, naquela época, o baixo custo e à alta disponibilidade do petróleo, associados com os problemas técnicos resultantes do uso de óleo vegetal in natura diretamente nos motores, influenciaram decisivamente na escolha do petróleo como matéria prima para produção de combustível. (GAZZONI, 2012; OLIVEIRA et al., 2008). Os óleos vegetais brutos são constituídos por ésteres de peso molecular relativamente alto, portanto com alta viscosidade, tornando-os inviáveis para uso como combustível. Além disso, a presença de ácidos e produtos formados por oxidação, entre outros problemas, dificulta o funcionamento dos motores. Entretanto, vários estudos demonstraram que muito destes problemas técnicos são minimizados, ou até mesmo eliminados, quando o óleo é submetido a determinados processos de derivação. Um desses processos é a reação de transesterificação com álcoois de cadeia curta, geralmente etanol ou metanol. Neste processo, o óleo torna-se menos “pesado” de modo que sua utilização como combustível é viabilizada (CHRISTOFF, 2006). A transesterificação é um processo em que as moléculas de triglicerídeos encontradas no óleo reagem com o álcool, na presença de um catalisador, para formar ésteres de baixo peso molecular. Desta forma, o biodiesel produzido atualmente pode ser definido como uma mistura de monoalquil ésteres de ácidos graxos derivado de óleos vegetais ou animal (FROEHNER, S.; LEITHOLD, 2007).

A reação transesterificação utilizada na obtenção do biodiesel é efetuada na presença de catalisadores, classificados como homogêneos ou heterogêneos. Os catalisadores homogêneos permanecem dissolvidos no meio reacional, e devem ser removidos após a reação por processo de separação com solventes e não podem ser reutilizados. Na catalise homogênea, geralmente se utiliza bases, como hidróxidos e alcóxidos, ou ácidos inorgânicos,

como o HCl (ácido clorídrico). Já na catalise heterogênea, os catalisadores não se dissolvem, são removidos do meio reacional por simples filtração e podem ser reutilizados (ATADASHI, *et al.*, 2012). Como exemplos de catalisadores heterogêneos podem ser citados as enzimas (SANCHEZ; VASUDEVAN, 2006), as zeólitas (RAMOS, *et al.*, 2008), complexos inorgânicos dentre outros.

Testes de ignição demonstraram que os biocombustíveis, como o biodiesel, apresentam elevada eficiência de combustão, são biodegradáveis, não possui em sua composição enxofre e compostos aromáticos e, dessa forma, emitem menor quantidade de gases tóxicos que o diesel derivado do petróleo (SOUZA, 2010). Tal fato é relatado em diversos estudos, tornando evidente que a combustão do biodiesel diminui significativamente a emissão de poluentes como hidrocarbonetos, monóxido de carbono, dióxido de carbono, materiais particulados e óxidos de enxofre (DELATORRE *et al.*, 2011).

Quanto ao desempenho como combustível, o biodiesel apresenta algumas características (número de cetano, viscosidade, massa molecular, densidade etc.) que o tornam similar ao diesel de petróleo, possibilitando, assim, sua utilização como combustível puro ou, na forma de mistura como complemento ao diesel de petróleo (DELATORRE *et al.*, 2011; GHESTI *et al.*, 2012; MOREIRA 2007). No Brasil, a lei 11.097 aprovada pelo congresso nacional em 13 de janeiro de 2005, determinou a adição de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo e estabeleceu prazos para que sejam feitas adições de alíquotas maiores ao longo do tempo. De modo que, em 2013 percentual de biodiesel adicionado ao diesel mineral alcance uma alíquota de 5% (SANTOS *et al.*, 2009).

Devido à grande diversidade de espécies oleaginosas, o Brasil é considerado um dos países que apresenta grande potencial para a produção de biodiesel. Entretanto, grande parte da produção de óleo vegetal é destinada a alimentação, o que limita, em parte, a produção de biodiesel. Alternativamente, recentes estudos estão sendo direcionados a investigações de plantas oleaginosas não comestíveis como fonte de matéria prima para a produção de biodiesel. A utilização destas oleaginosas é economicamente viável, pois suas sementes geralmente apresentam elevados teores de óleo. Além disso, o cultivo de oleaginosas não comestíveis não compete com o cultivo de sementes para fins alimentícios, pois as mesmas podem ser cultivadas em terras pouco férteis, as quais não são adequadas para a maioria das oleaginosas comestíveis (KUMAR *et al.*, 2007).

Tendo em vista a relevância do tema e o que foi exposto anteriormente, o presente estudo teve como objetivo principal o desenvolvimento de um método para obtenção de biodiesel, via rota metálica (utilização do álcool metílico para a reação de transesterificação), a

partir do óleo de mamona cultivadas na cidade de Quixadá-Ceará, utilizando enzimas comerciais e/ou células integras (tecido vegetal in natura) como biocatalisadores através de reações de transesterificação.

O método de análise foi desenvolvido utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a espectroscopia de massas e a validação do método foi conduzida pelo desenvolvimento de cinco curvas de calibração, utilizando o conceito de padronização interna.

Os padrões de composição das curvas de calibração foram obtidos através preparação de soluções multielementares dos padrões de ésteres metílicos previamente sintetizados.

Para a síntese do biodiesel, inicialmente, foi avaliado o desempenho de sete enzimas comerciais e duas possíveis fontes enzimas de origem vegetal (látex da espécie *Calotropis procera*, e as sementes de *Lens culinaris*, popularmente conhecidas como lentilha). As fontes vegetais foram selecionadas após testes de atividade hidrolítica (lipásica) feitos em diferentes vegetais.

Visando a obtenção de produtos com rendimentos aceitáveis e a diminuição dos custos reacionais, foram otimizados vários parâmetros, tais como co-solvente, razão metanol/óleo, quantidade de enzima, pH e solvente para recuperação da enzima.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos históricos do combustível biodiesel

Conforme mencionado anteriormente, a história do biodiesel teve início no século XIX quando o alemão Rudolph Diesel, inventor do motor a diesel, descobriu que poderia utilizar óleos vegetais como uma alternativa de combustível. O primeiro protótipo do motor a diesel foi apresentado em 1900 durante a exposição universal de Paris. Na ocasião, Diesel utilizou como combustíveis de alimentação do motor óleo de amendoim e petróleo. Após os experimentos foi constatado que o consumo de óleo vegetal resultou em um aproveitamento de calor similar ao do petróleo (GRAZZONI, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Em 1911, após conduzir novos testes com óleo de amendoim, Diesel declarou que o motor a diesel poderia ser alimentado com óleos vegetais. Isso ajudaria consideravelmente no desenvolvimento da agricultura dos países que utilizassem esta tecnologia (FALCÃO, 2011), porém, naquela época, o baixo custo, a alta disponibilidade do petróleo e alguns problemas técnicos relacionados com o uso direto do óleo vegetal nos motores, influenciaram decisivamente na escolha do petróleo como matéria prima para produção de combustível consolidando-o no cenário mundial como a matriz energética mais explorada (GRAZZONI, 2012; Oliveira *et al.*, 2008).

Na década de 70, com a crise do petróleo, o interesse pelos biocombustíveis aumentou. A grande demanda por derivados do petróleo e os conflitos políticos tornaram-no escasso e drasticamente caro. Segundo a Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP) o preço do barril passou de US\$ 2,5 para US\$ 11,0 entre outubro de 1973 e dezembro de 1974 (BORGES; PRIEB, 2008). Os preços elevados aliado a crescente preocupação com possíveis danos ambientais causados pelo uso de combustíveis fósseis, fizeram com que se intensificassem as buscas por fontes energéticas alternativas. Com isso o interesse pelos óleos vegetais como alternativa ao diesel mineral se renovou.

A utilização direta de óleo vegetal in natura nos motores a diesel ocasionava problemas, em parte decorrentes da alta viscosidade, baixa volatilidade e do elevado teor de ácidos graxos livres. Isso comprometia a vida útil dos motores devido à ocorrência de excesso de depósitos de carbono no motor, a corrosão de algumas peças e a obstrução dos filtros de óleo e bicos injetores (CHRISTOFF, 2006). Dessa forma, foram desenvolvidos vários processos físico-químicos (diluição, micro emulsificação, craqueamento catalítico e transesterificação) que visavam obter derivados com menor viscosidade e maior volatilidade.

Dentre os processos desenvolvidos, a transesterificação foi apontada até os dias atuais como sendo a melhor opção para a utilização dos óleos vegetais como alternativa ao diesel derivado do petróleo (SOUZA, 2010; FALCÃO, 2011).

A iniciativa de submeter óleos vegetais ao processo de transesterificação, é atribuída ao pesquisador belga Charles George Chavanne. A primeira patente sobre esse processo foi depositada antes mesmo da crise do petróleo da década de 70. Na patente intitulada “Procédé de transformation d’huiles végétales em vue de leur utilisation comme carburants”, depositada em 31 de agosto de 1937, Chavanne já sugeria o uso da transesterificação para viabilizar a utilização dos óleos vegetais como combustível. No ano seguinte, destaca-se o primeiro registro da utilização de óleo vegetal transesterificado em escala comercial. Há relatos de que na Bélgica, o ônibus de passageiros da linha Bruxelas-Lovaina era abastecido com este biocombustível (DABDOUB, 2009).

No Brasil, as pesquisas com óleo vegetal tiveram início por volta de 1920 no Instituto Nacional de Tecnologia, mas só ganharam destaque a partir dos anos 70, durante a crise do petróleo. Em 1975, foi criado o Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energético (Pró-óleo), e em 1980 o plano passou a ser um Programa nacional instituído pela Resolução nº 7 do Conselho Nacional de Energia. Os principais objetivos do Pró-óleo eram substituir o diesel por óleos vegetais em misturas de até 30% em volume (diesel: óleo), incentivar as pesquisas tecnológicas para promover a produção de óleos vegetais nas diferentes regiões do país e buscar a substituição integral do óleo diesel por óleos vegetais a longo prazo. A meta previa produzir 1,6 milhões de metros cúbicos de óleos para fins energéticos em 5 anos.

A partir de 1883 a transesterificação passou a ser utilizada no Brasil como alternativa tecnológica para a produção de combustíveis derivados de óleos. Embora tenham sido realizados vários testes, cujos resultados constatavam a viabilidade técnica da utilização do biodiesel, os elevados custos de produção e a estabilização dos preços do petróleo em 1985, impediram a produção do mesmo em escala comercial (GAZZONI, 2012; FARIAS *et al.*, 2010). Dessa forma, o programa foi desacelerado e o Governo Federal só voltaria a discutir a utilização do biodiesel no final do século XX com a criação de um novo programa, o PROBIODIESEL embasado na Portaria MCT nº 702, de 30 de outubro de 2002. Neste programa, a transesterificação de óleos vegetais foi considerada como a rota principal para a produção do biodiesel (SUAREZ; MENEGHETTI, 2007).

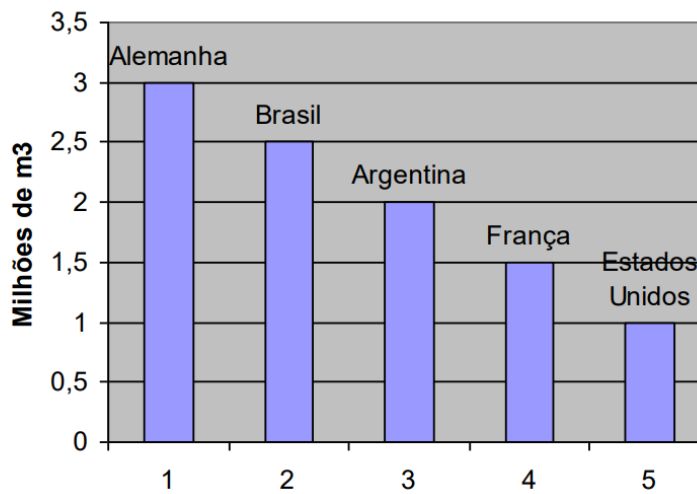
Na década de 1990 o petróleo sofreu novo abalo devido aos conflitos políticos entre os países produtores de petróleo, durante a primeira guerra do golfo. Este fato

impulsionou a comercialização e a introdução do biodiesel na matriz energética de vários países. Além disso, nesta época a poluição ambiental atingiu níveis preocupantes, aumentando ainda mais a pressão pelo processo produtivo de combustíveis alternativos. Assim, em 1992 o processo de industrialização do biodiesel teve início na Europa, que se tornou o principal mercado produtor e consumidor de biodiesel em grande escala (BIODIESELBR, 2012; GAZZONI, 2012).

Segundo a comunidade econômica europeia, em 1998 foram produzidas 500 mil toneladas de biodiesel. Já em 2002 a produção mais que dobrou, foram produzidos 1,06 milhões de toneladas de biodiesel, principalmente na Alemanha, Áustria, França, Itália Dinamarca e Reino Unido (BIODIESELBR, 2012; BOZBAS, 2008; GOES, 2012). Apesar dos grandes avanços alcançados pela Europa na industrialização do Biodiesel, a produção mundial só apresentou crescimento mais expressivo a partir de 2005. Segundo DEMIRBAS (2007), neste ano a união européia respondeu por 89% de toda a produção mundial.

A introdução do biodiesel na matriz energética do Brasil só ocorreu efetivamente a partir de 13 de janeiro de 2005, quando o governo decretou e sancionou a Lei nº 11.097, que além de dar incentivo às empresas produtoras de biodiesel, fixou em dois por cento em volume o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado, em qualquer parte do território nacional. A partir da citada lei a Agência Nacional de Petróleo (ANP) assumiu a responsabilidade de regularizar e fiscalizar as atividades relativas à produção, controle de qualidade, distribuição e comercialização do biodiesel e da mistura óleo diesel-biodiesel (BX). Desde então a ANP passou a ser denominada Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (FARIAS, *et al.* 2010). Em 2009 o percentual de biodiesel no óleo diesel aumentou para 4% e, em janeiro de 2010 essa percentagem passou para 5%, superando as expectativas iniciais do governo brasileiro que era de alcançar esse índice somente em 2013. Esta contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel aumentou a demanda pelo bicomcombustível e conseqüentemente a produção nacional, de modo que, em 2010 o Brasil se consolidou como o segundo maior produtor mundial de biodiesel (MEDEIROS, *et al.* 2013; FARIAS, *et al.* 2010). Este dado pode ser verificado na Figura 1, na qual se encontra ilustrado o desempenho dos países provedores na produtividade do biodiesel no ano de 2010.

Figura 1 – Desempenho dos principais países produtores de biodiesel no ano de 2010;



Fonte: adaptado de MEDEIROS, *et al.* 2013.

Atualmente, no Brasil existem 61 plantas de produção regulamentadas e autorizadas pela ANP para produção e comercialização de biodiesel, correspondendo a uma capacidade total de produção de aproximadamente 19.009,04 m³ /dia. Estas plantas estão distribuídas nas cinco regiões do país e pertencem as empresas discriminadas na Tabela 01, na qual se encontra a capacidade produtiva de cada usina (NEVES, 2012).

Tabela 1 – Distribuição das usinas regulamentadas pela ANP no território brasileiro e suas respectivas capacidades de produção.

Empresa	Capacidade autorizada (m³/dia)	UF	Região
AGROPALMA	80,00	PA	Norte
AMAZONBIO	90,00	RO	
OURO VERDE	9,00		
GRANOL	360,00	TO	
BIOTINS	91,00		
PETROBRAS BIOCOMBUSTÍVEIS	301,71	CE	Nordeste
BRASIL ECODIESEL	360,00	MA	
BIOBRAX	98,00	BA	

V-BIODIESEL	360,00		
COMANCHE	335,00		
PETROBRAS BIOCOMBUSTÍVEIS	603,42		

GRANOL	1.033,00	GO	Centro-Oeste
MINERVA	45,00		
BIONASA	653,00		
CARAMURU	625,00		
ARAGUASSÚ	100,00	MT	
BIO BRAZILIAN ITALIAN OIL	98,00		
BARRALCOOL	190,46		
ADM	1,35		
AGRENCO	660,00		
BEIRA RIO	12,00		
BIO ÓLEO	150,00		
BIO VIDA	18,00		
BIOCAMP	300,00		
BIOPAR	100,00		
BUNGE	413,19		
COOMISA	12,00		
COOPERBIO	460,00		
COOPERFELIZ	10,00		
FIAGRIL	563,00		
GRUPAL	120,00		
TRANSPORTADORA CAIBIENSE	100,00		
JBS	100,00		
RONDOBIO	10,00		
SSIL	50,00		

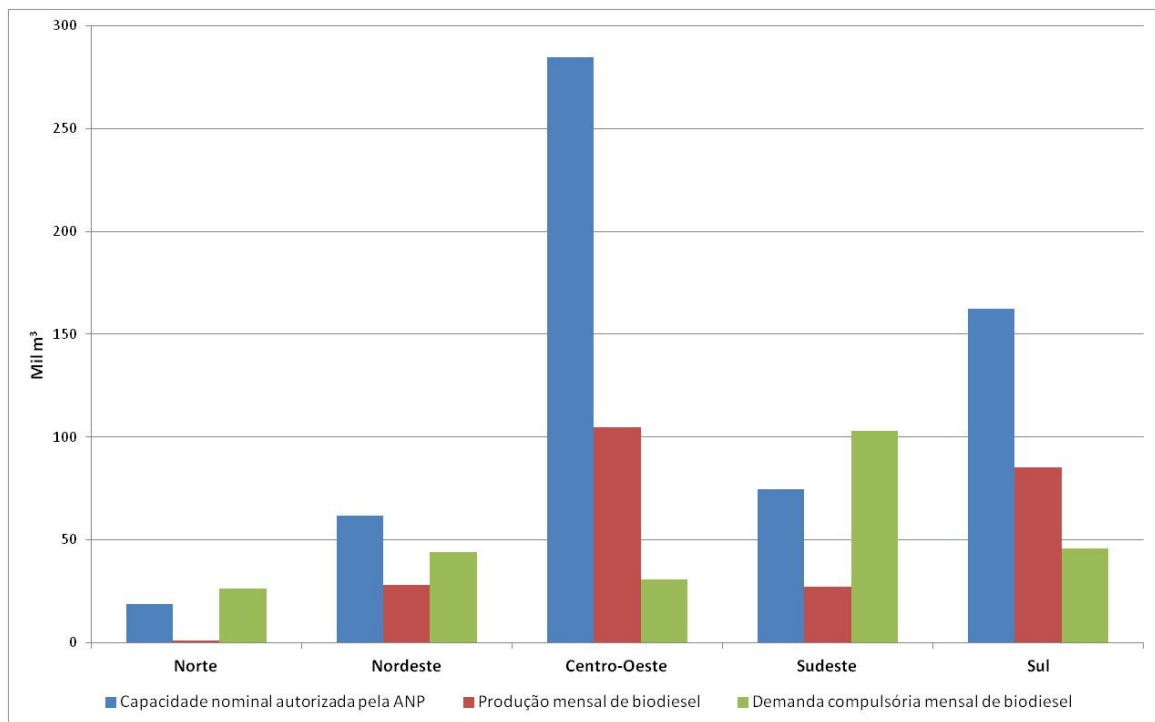
BIOCAR	30,00	MS	
CARGILL	700,00		
DELTA	300,00		
SPBIO	83,28	MG	Sudeste
PETROBRAS BIOCOMBUSTÍVEIS	422,73		
PETROBRAS BIOCOMBUSTÍVEIS	422,73		
BIOSEP	36,00		
ABDIESEL	6,00		
ABDIESEL	2,40		
BIOVERDE	503,27		
INNOVATTI	30,00	SP	
JBS	560,00		
ORLÂNDIA	150,00		
FERTIBOM	333,30		
BIO PETRO	194,44		
CESBRA	166,70	RJ	
BIOPAR	120,00	PR	
BSBIOS MARIALVA	353,00		
GRANOL	933,33	RS	
OLEOPLAN	1.050,00		
OLFAR	600,00		
BIANCHINI	900,00		
BSBIOS	444,00		
CAMERA	650,00		
CAMERA	360,00		

Fonte: adaptado de NEVES 2012

De acordo com a Tabela 1, pode-se verificar que a região centro-oeste possui a maior capacidade produtiva do país devido ao grande número de usinas instaladas nesta região. Este dado também pode ser verificado no gráfico ilustrado na Figura 2 em que se

observa que o centro-oeste junto ao sudeste possui capacidade produtiva e produção mensal maior que a demanda pelo biocombustível. As regiões norte, nordeste e sudeste apresentam demanda maior que a produção mensal.

Figura 2 – Capacidade nominal autorizada pela ANP, demanda compulsória e produção de biodiesel por região para o ano de 2012.



Fonte: agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).

Com a crescente demanda, estas usinas produtoras possuem a importante missão de suprir a demanda pelo biodiesel no país e diminuir a dependência do diesel importado. Mas, apesar de possuírem capacidade produtiva, estas usinas esbarram na questão da disponibilidade de matéria prima, pois grande parte das oleaginosas produzidas no país é destinada para fins alimentícios. Neste contexto, deve-se atuar com políticas de incentivo a produção de matéria-prima não comestível, como a mamona e pinhão manso que não competem com a cultura de oleaginosas comestíveis e se adaptam a solos pouco usuais a produção de fontes alimentícias.

2.2 Matéria prima para a produção do biodiesel

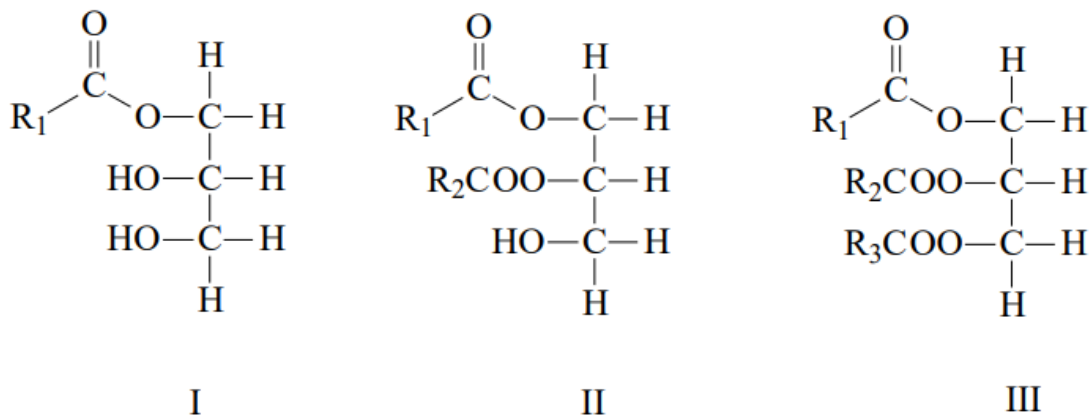
2.1.1 Óleos e Gorduras

Os óleos e as gorduras são substâncias de origem vegetal ou animal, utilizadas como matérias prima pelas indústrias química, farmacêutica e alimentícia. São constituídas, principalmente, por moléculas de ácidos graxos e seus derivados, monoglicerídeo, diglicerídeo ou triglicerídeos. Os triglicerídeos compreendem a parte majoritária, podendo apresentar composição superior a 95% em massa (REDA; CARNEIRO, 2007).

Os triglicerídeos (III) são ésteres formados por três moléculas de ácidos graxos, ligadas a uma molécula de glicerol (1, 2, 3 - propanotriol).

Os monoglicerídeos (I) e os diglicerídeos (II) são formados por uma e duas moléculas de ácidos graxos, respectivamente, ligadas ao glicerol (Figura 3). É importante destacar que os triglicerídeos e os diglicerídeos podem ser formados por ácidos graxos iguais ou diferentes entre si (MILINSK, 2007).

Figura 3 – Moléculas de glicerídeos: I- monoglicerídeo, II- diglicerídeo e III- triglicerídeo, em que R1, R2 e R3 são cadeias carbônicas longas que constituem os ácidos graxos.



Fonte: BRUICE, 2006, CLAYDEN, *et al.* 2000

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos que diferem entre si pelo tamanho da cadeia carbônica, pela presença e número de insaturações, bem como pela posição das insaturações. Alguns dos ácidos graxos mais comumente encontrados na natureza estão ilustrados na Tabela 2.

O tamanho da cadeia carbônica e o grau de insaturação são fatores que podem determinar algumas propriedades dessas substâncias. Por exemplo, o ponto de fusão aumenta com o aumento do tamanho da cadeia carbônica e, diminui drasticamente com o aumento do número de insaturações (Tabela 2). O último caso ocorre porque os ácidos graxos saturados se encontram em uma conformação linear permitindo uma maior interação entre suas unidades

moleculares. Já os insaturados, apresentam dobramentos na cadeia carbônica e ângulos de ligação que dificultam as interações entre as moléculas. Conseqüentemente, os ácidos graxos insaturados apresentam menores valores de ponto de fusão que as moléculas saturadas (MILINSK, 2007). Dessa forma, as gorduras de origem animal, como a banha e o sebo comestível, assim como, a manteiga (gordura parcialmente hidrogenada) são constituídas principalmente por misturas de triacilglicerídeos, que contém um número de insaturações inferior aos óleos vegetais. Portanto, na temperatura ambiente, as gorduras animais se apresentam sólidas, enquanto os óleos vegetais são líquidos (REDA; CARNEIRO, 2007).

Tabela 2 – Ácidos graxos mais comuns na natureza

Ácido graxo	Nome sistemático	Fórmula mínima	Número de insaturações	Ponto de Fusão (°C)
Láurico	Dodecanóico	$C_{12}H_{24}O_2$	1	44,8
Palmítico	Hexadecanóico	$C_{16}H_{32}O_2$	1	62,9
Palmitoleico	cis-9-hexadecenóico	$C_{16}H_{30}O_2$	2	0,5
Estearico	Octadecanóico	$C_{18}H_{36}O_2$	1	70,1
Oléico	cis-9-octadecenóico	$C_{18}H_{34}O_2$	2	16,0
Linoléico	cis-9,cis-12-Octadecadienóico	$C_{18}H_{32}O_2$	3	-5,0
Linolênico	cis-9,cis-12,cis-15-Octadecatrienóico	$C_{18}H_{30}O_2$	4	-17,0

Fonte: adaptado de OLIVEIRA, *et al.*, 2008.

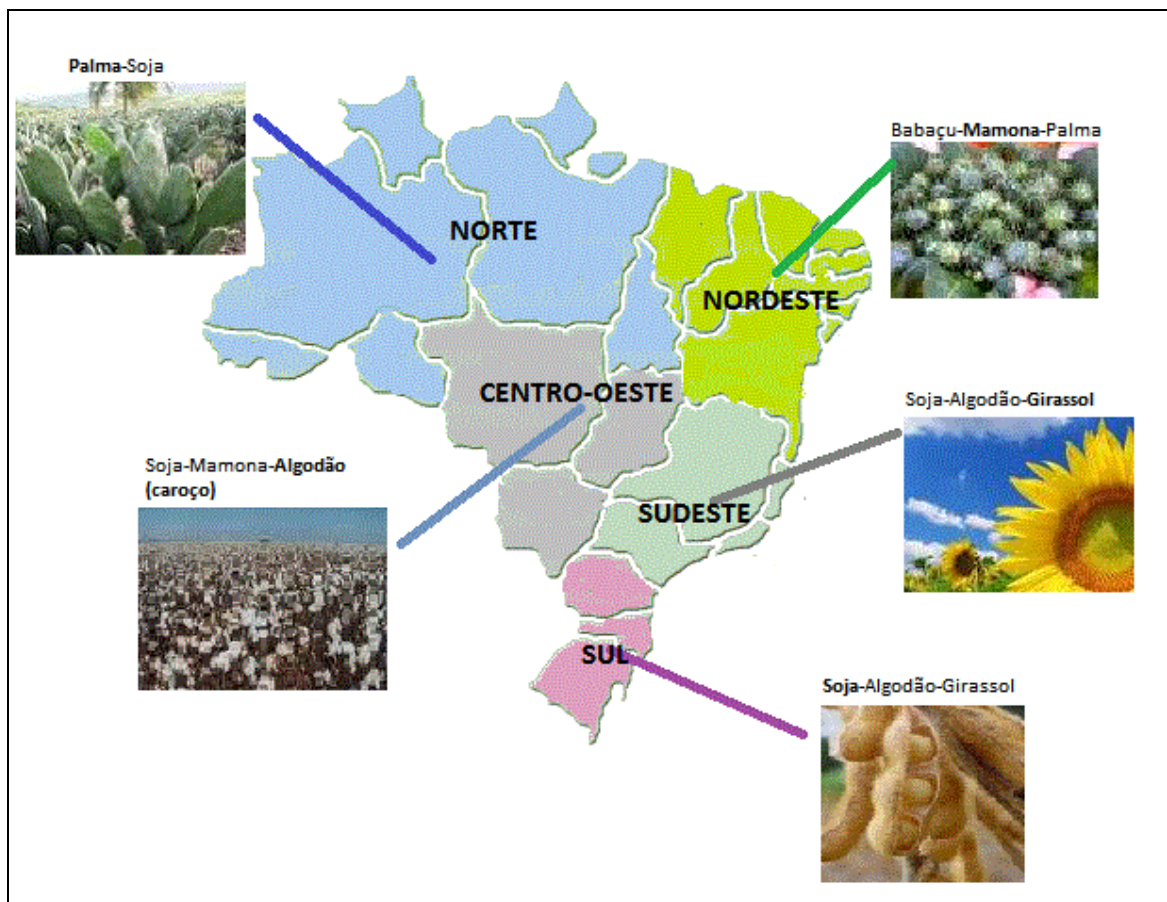
Por sua natureza, os óleos e as gorduras podem ser utilizados como matéria prima para a produção de biodiesel. Os glicerídios (ésteres de ácidos graxos de alto peso molecular do glicerol) presentes nestes materiais reagem com álcoois de cadeia curta (por exemplo, o metanol), em um processo químico chamado de transesterificação, formando os ésteres alquílicos de ácido graxos, originando um tipo de biodiesel.

O Brasil, devida a sua elevada extensão territorial e grande variedade de espécies oleaginosas, apresenta elevado potencial para a produção de óleo vegetal e, conseqüentemente, elevado potencial para a produção de biodiesel. Estudos divulgados pela “National Biodiesel Board”, dos Estados Unidos, afirmaram que o Brasil tem condições de liderar a produção mundial de biodiesel (SOUZA, 2010).

As principais oleaginosas produzidas no Brasil são: algodão, amendoim, dendê, girassol, mamona, pinhão manso e soja. Segundo dados do SEBRAE (2008), a produção diversificada de oleaginosa no território brasileiro deve-se a grande extensão territorial, bem como, dos mais variados tipos de climas e solos do país.

A Figura 4 ilustra o potencial brasileiro para a produção diversificada de oleaginosas, bem como a distribuição das oleaginosas no território brasileiro.

Figura 4 – Distribuição de culturas de oleaginosas no território brasileiro.



Fonte: adaptado de SEBRAE, 2008.

As características específicas de produtividade por hectare e de percentagem de óleo obtido, a partir de cada espécie de oleaginosa, dependem de condições de clima e de solo. A produtividade também está diretamente associada às tecnologias de cultivo, à qualidade da semente e às tecnologias de processamento praticadas (SEBRAE, 2008).

Apesar da grande diversidade de oleaginosas existentes no Brasil, grande parte da produção de óleo vegetal é destinada à alimentação, o que limita, em parte, a produção do biodiesel. Simultaneamente, existe a preocupação com o deslocamento de áreas destinadas à

produção de óleo comestível para a produção do biocombustível. No sentido de minimizar esta problemática, estudos são destinados a investigar e incentivar a cultura de oleaginosas com produção de óleos não comestíveis tais como a mamona (*Ricinus communis*), o pinhão manso (*Jatropha curcas*), a karanja (*Pongamia pinnata*), dentre outras (DABDOUB, 2009). Como já mencionado anteriormente, a utilização destas oleaginosas é economicamente viável uma vez que, as sementes geralmente apresentam elevados teores de óleo. Além disso, o cultivo de oleaginosas não comestíveis não compete com o cultivo de sementes para fins alimentícios, pois as sementes podem ser cultivadas em terras pouco férteis, as quais não são adequadas para a maioria das oleaginosas comestíveis (KUMAR *et al*, 2007).

2.2.2 Óleo de Mamona

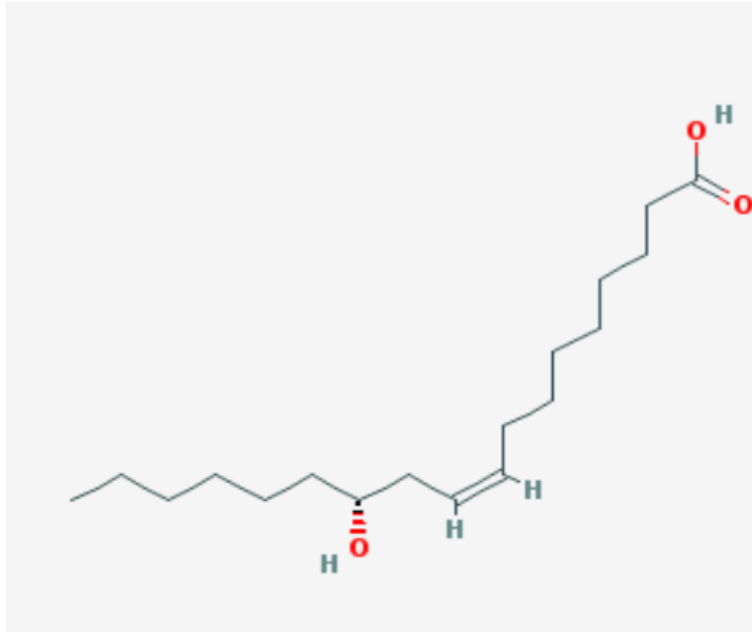
A mamona é o fruto de uma planta oleaginosa da família Euforbiáceas (Figura 5), cientificamente denominada de *Ricinus communis*. Devido a facilidade de adaptação as mais variadas condições climáticas esta planta é encontrada e cultivada em variadas regiões do mundo (EMBRAPA, 2012).

Figura 5 – *Ricinus communis*



A composição química do óleo de mamona é bastante peculiar. Diferente da maioria dos óleos vegetais, o óleo de mamona é composto quase que exclusivamente por glicerídeo derivado de um único ácido graxo, o ácido ricinoléico (Figura 6).

Figura 6 – Molécula do ácido ricinoléico



Fonte: Base de dados PubChem, disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Este ácido graxo é o único que apresenta uma hidroxila, isso confere ao óleo maior solubilidade em solventes polares (EMBRAPA, 2012). Permitindo assim, a sua utilização em processos reacionais diversos. Como exemplo, pode ser citado a obtenção de ácidos graxos de alto valor agregado como é o caso do ácido linoleico (NOGUEIRA 2010). Além disso, a presença da hidroxila proporciona ao óleo uma maior viscosidade e devido a estas características, o óleo de mamona é empregado como matéria prima para a produção de lubrificantes e aditivos automobilísticos (PINA, *et al.*, 2005; NOGUEIRA, 2010).

Nos tempos primórdios o óleo das sementes da mamona era empregado como fonte energética para gerar luz e para fins medicinais (purgantes). Atualmente este óleo é uma matéria prima de grande importância para a indústria química. De tal modo, que é de costume denominar as indústrias que o utilizam como “ricinoquímica”, em referência ao principal constituinte do óleo de mamona, o ácido ricinoléico. A lista de produtos gerados pela ricinoquímica é bastante extensa, pois o óleo é utilizado na composição de inúmeros produtos, tais como: tintas, vernizes, cosméticos, lubrificantes, plásticos, biocombustíveis, fármacos entre outros (EMBRAPA, 2012; PINA, *et al.*, 2005).

A produção de biodiesel a partir do óleo de mamona criou um mercado para este produto, com a perspectiva de absorver grande parte da produção dos países que cultivam esta matéria prima (EMBRAPA, 2012). Atualmente, Índia se destaca no cenário mundial como o principal produtor. Em 2010 a produção indiana alcançou a marca de 1.150.000 toneladas de mamona, ficando em primeiro lugar na produção mundial. A China encontra-se em segundo

lugar com 180.000 toneladas/ano e em terceiro o Brasil com 93.025 toneladas do fruto por ano (BARROS & RAMOS, 2012). Quanto ao consumo do óleo, destacam-se os países que apresentam atividade industrial intensa, dentre os quais podem ser destacados Estados Unidos, França, Alemanha e China (NOGUEIRA, 2010).

A utilização do óleo mamona para fins energéticos apresenta uma série de vantagens. Do ponto de vista técnico, o óleo apresenta elevada capacidade suportar altas temperaturas, sem perder a viscosidade, baixa produção de resíduos durante sua queima, e representa uma fonte energética renovável. Quanto à produção as sementes de mamona apresentam elevados teores de óleo garantindo assim uma boa produtividade por hectare plantado (PINA, *et al.*, 2005; NOGUEIRA, 2010). Apesar de apresentar as vantagens citadas, o biodiesel de óleo de mamona enfrenta desafios. Um deles é gerado pela resolução número 7 da ANP. Segundo esta resolução devido a alta viscosidade do óleo, seria inviável a produção de biodiesel B100 a partir da mamona. Entretanto, deve-se levar em consideração que a produção atual de biodiesel no Brasil ainda se encontra na ordem do B3, ou seja, 3% de biodiesel adicionado ao diesel de petróleo. Além disso, esse mito vem sendo confrontado por pesquisadores que estudam a viabilidade deste óleo para fins energéticos. Alguns especialistas destacam que o biodiesel do óleo de mamona suporta com boa viscosidade até a produção do B40. Também se faz necessário relatar a opinião destes especialistas que destacam que, não existe óleo que, isoladamente, seja perfeito para a produção do biodiesel. Qualquer que seja a matéria prima sempre haverá algum desafio a ser enfrentado (BIODIESEL BRASIL, 2012).

Com relação aos resíduos gerados após a extração do óleo, é importante destacar que a torta de mamona constitui um bom adubo orgânico e, quando desnitrificada, pode ser aproveitada como ração para animais. Pesquisadores em nutrição animal têm constatado que a torta de mamona atoxicada pode substituir as tortas de algodão, amendoim e soja na alimentação do gado leiteiro (EMBRAPA, 2012; SEBRAE, 2008).

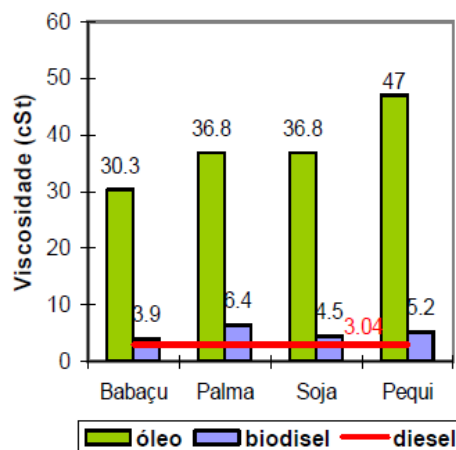
No Brasil, a soja é a principal matéria prima utilizada para a produção de biodiesel. Entretanto, ela não deve permanecer dominante neste mercado, devida a baixa produtividade de óleo por área plantada. A produtividade anual para a soja varia de 0,2 a 0,4 toneladas de óleo por hectare plantado, enquanto a mamona apresenta produtividade anual de 0,5 a 0,9 toneladas de óleo por hectare plantado (COSTA; SANTOS, 2008). Essa maior produtividade de óleo é uma das vantagens que tem despertado o interesse da utilização da cultura de mamona para fins energéticos. Além disso, a produção de biodiesel de mamona não compete com a produção de óleos para fins alimentícios como no caso da soja (EMBRAPA, 2012; SEBRAE, 2008; COSTA; SANTOS, 2008). Mas, o biodiesel do óleo de mamona ainda não

é uma realidade expressiva quando comparado ao biodiesel de soja, pois as culturas dessa oleaginosa estão concentradas principalmente no nordeste do país, onde a produção é feita por pequenos produtores. De modo que, a produção ainda não atingiu a escala necessária para atender a demanda do mercado e, assim a pequena oferta da mamona encarece o produto. Para mudar essa realidade é necessário maior investimento em políticas de incentivo, mais eficazes, a produção e comercialização desta oleaginosa para que o biodiesel de mamona se destaque no mercado (BIODIESEL BRASIL, 2012; COSTA & SANTOS, 2008).

2.3 Reação de transesterificação como tecnologia de produção do biodiesel

As reações de transesterificação são amplamente empregadas em processos industriais como tecnologia de obtenção do biodiesel. Este processo é considerado a melhor alternativa para viabilizar a utilização de óleo vegetal como alternativa ao diesel mineral. Isso porque, na transesterificação a matéria prima adquire características, tais como ponto de nevoa, viscosidade e densidade bastante similares ao diesel de petróleo e, dessa forma podem ser utilizados nos motores sem causar danos (BORGES; DÍAZ, 2012). A Figura 7 demonstra a variação da viscosidade de alguns óleos antes e depois de serem submetidos ao processo de transesterificação. Como ilustrado, a viscosidade cai bruscamente quando o óleo é transesterificado (MOREIRA, 2010).

Figura 7 – Viscosidade de óleos antes e depois da transesterificação (MOREIRA, 2010).



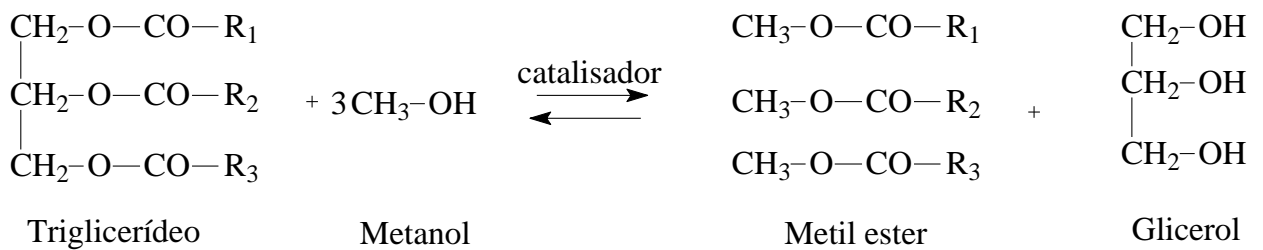
Fonte: (MOREIRA, 2010).

De modo geral, a transesterificação é uma reação química em que um éster reage com álcool, na presença de um catalisador, cujo principal objetivo é produzir um novo éster diferente do original. A reação é reversível e ocorre através da troca de grupamentos alcóxi (-

OH) entre o álcool e o éster de partida. Este processo funciona como uma hidrólise de ésteres em que se utiliza um álcool ao invés de água e, por esse motivo a reação é também denominada alcoólise (MOREIRA, 2007; SOUZA, 2010).

Na transesterificação de óleos, os triglicerídeos reagem com moléculas de um álcool para produzir uma mistura de ésteres (biodiesel) e glicerol, conforme a reação ilustrada na Figura 8. Após a reação, os ésteres são separados do glicerol para que se possa utilizá-los como biocombustível. Já o glicerol é um subproduto que pode ser recuperado e utilizado como matéria prima da indústria química e farmacêutica. Devido à reversibilidade reacional, costuma-se utilizar um excesso de álcool para deslocar o equilíbrio da reação e facilitar a posterior separação de fases entre ésteres e glicerol (MOREIRA, 2007).

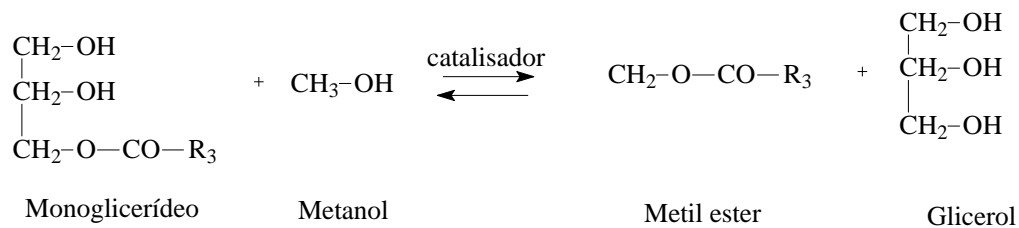
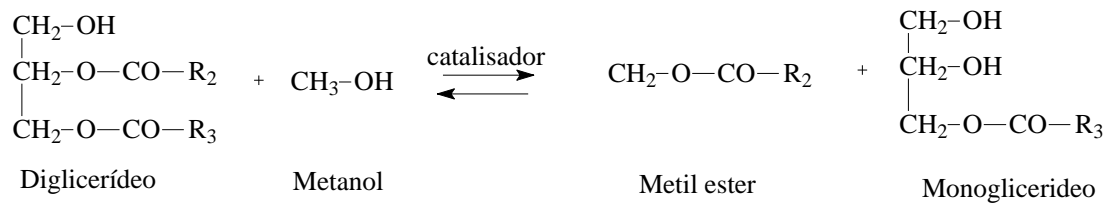
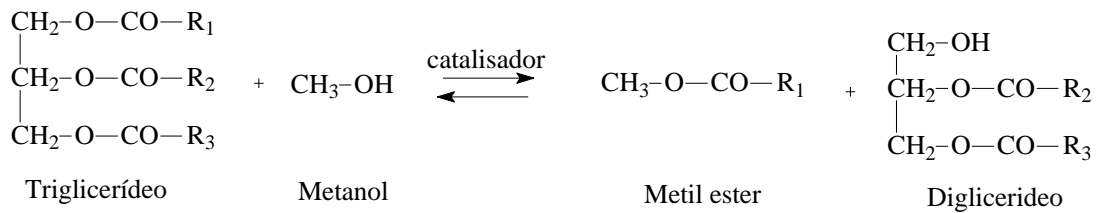
Figura 8 – Reação de transesterificação de triglicerídeos



Fonte: BORGES;DÍAZ, 2012; BRUICE, 2006, CLAYDEN, *et al.* 2000.

A reação de transesterificação de triglicerídeos ocorre em três etapas consecutivas e reversíveis. Inicialmente ocorre a conversão do triglicerídeo para diglicerídeos, seguida pela conversão do diglicerídeos para monoglicerídeos e, por fim, o monoglicerídeo é convertido para glicerol. Cada etapa fornece um mol de éster, de modo que no fim da reação se obtém uma mistura de ésteres de ácido graxo e, como subproduto, o glicerol (BORGES e DÍAZ, 2012; FALCÃO, 2011). A Figura 9 ilustra as três etapas da transesterificação de um triglicerídeo genérico.

Figura 9 – Etapas da transesterificação de um triglicerídeo



Fonte: BORGES e DÍAZ, 2012; BRUCE, 2006, CLAYDEN, *et al.* 2000

Diferentes tipos de álcoois podem ser utilizados no processo reacional de transesterificação. Entretanto, na produção de biodiesel os mais utilizados são os álcoois de cadeia curta como, metanol, etanol e propanol. Destes, o mais empregado é o metanol, devido a fatores químicos, tais como tamanho da cadeia carbônica e polaridade que possibilita uma elevada reatividade.

Os catalisadores empregados em transesterificação podem ser homogêneos, quando permanecem dissolvidos no meio reacional, ou heterogêneos quando se encontram no meio reacional em fase diferente dos reagentes (ATADASHI *et al.*, 2012). Devido ao baixo custo e alta reatividade, os catalisadores homogêneos são os mais empregados no processo industrial de obtenção do biodiesel. Entretanto, estes apresentam a desvantagem de não serem reutilizados e, além disso, o fato de permanecerem dissolvidos no meio reacional dificulta a purificação do produto (HELWANI *et al.*, 2009). Já os catalisadores heterogêneos são removidos do meio reacional por simples filtração, e podem ser reutilizados (ATADASHI *et al.*, 2012). Como exemplos de catalisadores heterogêneos podem ser citados as enzimas

(SANCHEZ; VASUDEVAN, 2006), as zeólitas (RAMOS, *et al.*, 2008), complexos inorgânicos, dentre outros.

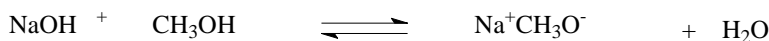
2.3.1 Catalisadores homogêneos básicos

Os catalisadores homogêneos básicos mais empregados em transesterificação de triglicerídeos são hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH), dissolvidos em metanol. Estes catalisadores apresentam vantagens como baixo custo, alta eficiência e promove a reação em um curto intervalo de tempo, mesmo a temperatura ambiente. (NOGUEIRA, 2010).

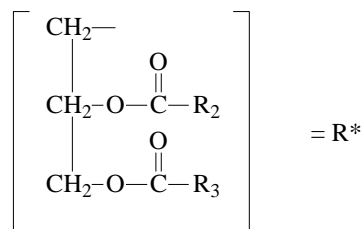
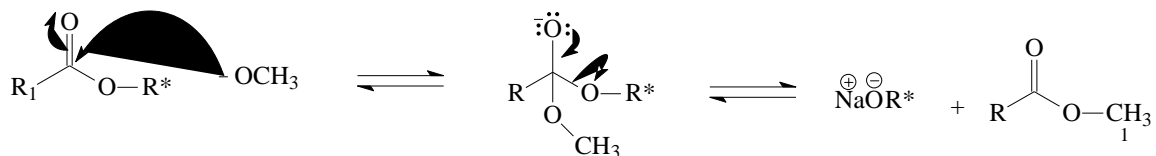
Na reação de transesterificação por catalise básica ocorre inicialmente a formação de um intermediário alcóxido oriundo da reação entre a base e o álcool. Posteriormente ocorre o ataque nucleofílico do íon alcóxido ao carbono carbonílico da molécula do triacilglicerol, resultando na formação de um intermediário tetraédrico. O rompimento da ligação entre carbono e oxigênio deste intermediário da origem a um éster metílico e a um diacilglicerol. Este diacilglicerol reage da mesma forma, até que ao final do processo se obtém três moléculas de ésteres e uma molécula de glicerol. O mecanismo para a transesterificação por catalise básica para um triglicerídeo genérico com metanol encontra-se ilustrada na Figura 10.

Figura 10 – Mecanismo de transesterificação catalisada por base.

ETAPA 1 :



ETAPA 2:



Apesar de oferecer as vantagens já citadas anteriormente, deve-se evidenciar que o uso dos catalisadores básicos apresenta limitações, quando se trata da transesterificação de óleos com índice de acidez superior a 1% ou quando os reagentes não são anidros. Nestes casos, devido ao elevado teor de ácidos graxo livre e a presença de água no meio reacional há o favorecimento de reações de saponificação. Como consequência, a taxa de transesterificação é reduzida e a separação do glicerol se torna muito difícil devido a formação de sabão.

Outras desvantagens dos catalisadores homogêneos básicos são: difícil remoção do catalisador do meio reacional, custo adicional com o tratamento da água residual alcalina e para obtenção de reagentes anidridos, pois a presença de água no meio reacional também contribui para a reação de saponificação (FALCÃO, 2011). Apesar desta desvantagem os catalisadores homogêneos básicos são os mais empregados na produção do biodiesel e para inibir ou minimizar a saponificação, os óleos que apresentam elevados teor de ácidos graxos livres são submetidos a um pré-tratamento com álcool e ácido sulfúrico antes da transesterificação básica. Além disso, geralmente são utilizados reagentes anidros para evitar a presença de água no sistema (HELWANI et.al., 2009).

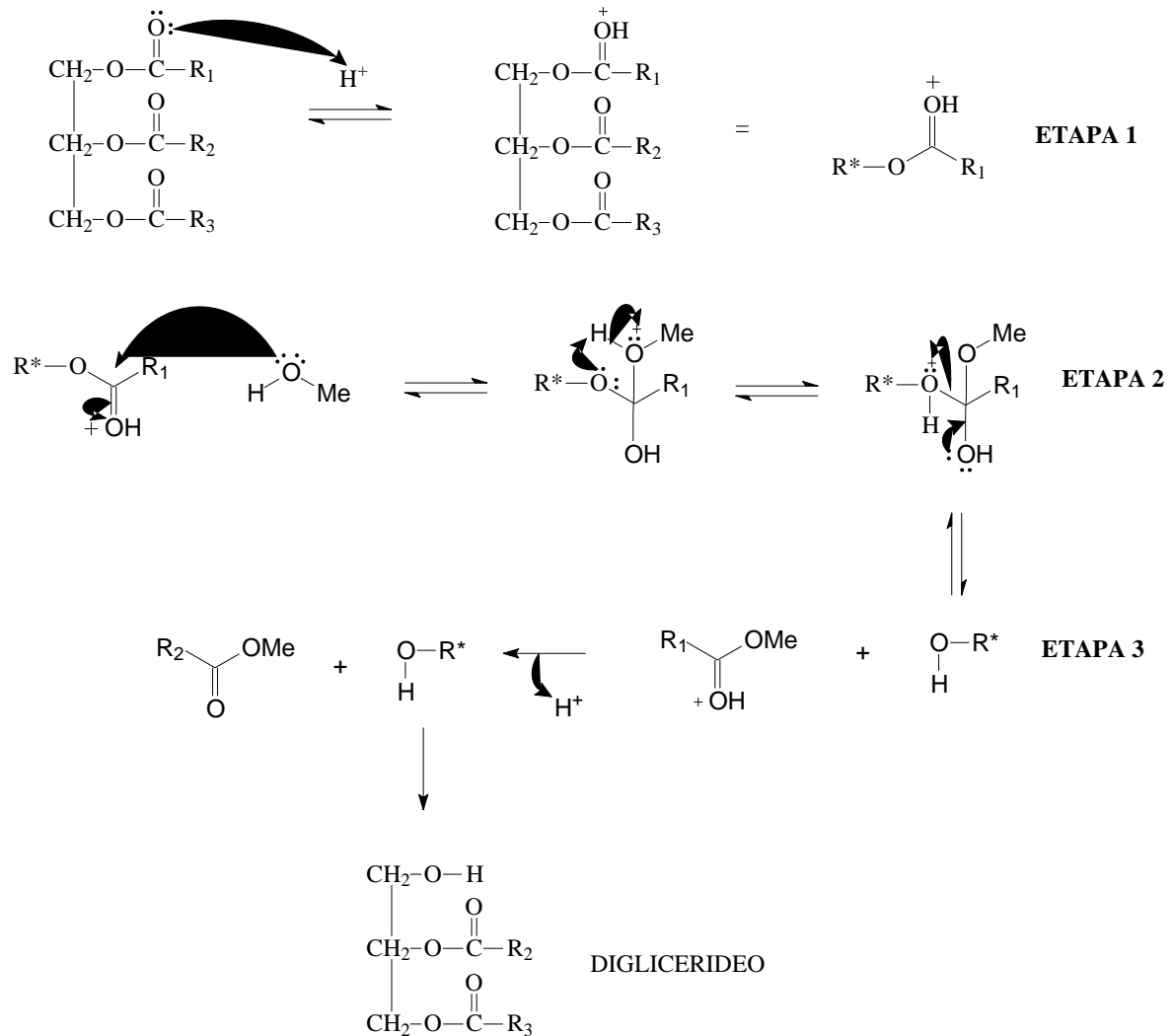
2.3.2 Catalisadores *Homogêneos Ácidos*

A transesterificação por catálise ácida apresenta rendimentos elevados (99%), entretanto é mais lenta que a catálise alcalina, necessitando de altas temperaturas e maior tempo de reação para alcançar rendimentos expressivos. Todavia, estes catalisadores são a melhor alternativa quando se trata de óleos com elevados índice de acidez. Os catalisadores homogêneos ácidos mais empregados em reação de transesterificação são: ácidos sulfúrico e clorídrico (SOUZA, 2010).

O mecanismo envolvido no processo de transesterificação de um triglicerídeo por catalise ácida ocorre da seguinte forma: na primeira etapa da reação ocorre a protonação de um dos grupos carbonílicos do triglicerídeo, formando um carbocátion, conforme ilustrado na Figura 11 etapa 1. Em seguida ocorre o ataque nucleofílico do álcool ao carbono carbonílico resultando na formação de um intermediário tetraédrico. Neste intermediário o hidrogênio pertencente ao oxigênio correspondente ao álcool, que promoveu o ataque nucleofílico, é abstraído pelo e o oxigênio correspondente a ligação de éster, em um mecanismo denominado prototropismo. Em seguida, ocorre a regeneração do catalisador e a eliminação do diacilglicerol pela reconstituição da carbonila que dará origem ao éster metílico (Etapa 3).

Esta reação se estende para os di e monoacilgliceróis de modo que no fim da reação são obtidos os ésteres metílicos e o álcool 1,2,3-propanotriol, também conhecido como glicerina.

Figura 11 – Mecanismo de transesterificação por catálise ácida



Fonte: BRUICE, 2006; CLAYDEN, et al. 2000; NOGUEIRA, 2010; SKOOG et al. 2005.

A razão molar álcool:óleo é um dos principais fatores que influenciam nesse processo. Um pequeno excesso de álcool favorece a formação de produtos, mas uma quantidade excessiva dificulta a recuperação de glicerina. Portanto, a proporção ideal entre reagentes deve ser determinada empiricamente considerando cada tipo de processo individualmente (FALCÃO, 2011).

Outra limitação da catalise ácida é a necessidade da utilização de reagentes anidros, pois a presença de água no meio reacional pode favorecer a hidrólise dos ésteres e a

consequente diminuição nos rendimentos. Além, disso esse tipo de reagente encarece o processo devido ao elevado valor de aquisição.

2.3.3 Catalisadores Heterogêneos

Os catalisadores heterogêneos são os que durante a reação de transesterificação permanecem em fase distinta a dos reagentes. Estes catalisadores apresentam uma série de vantagens ao processo quando comparados aos catalisadores homogêneos. Dentre as vantagens podem ser citadas: facilidade na separação dos produtos no final da reação, utilização de condições brandas, possibilidade de recuperação e reutilização dos catalisadores, redução significativa no volume de efluentes líquidos gerados e redução da quantidade de água, que é empregada em grandes quantidades nos processos por catalise homogênea (SARMA; CHOUHAN, 2011).

Entre os catalisadores heterogêneos empregados na obtenção do biodiesel, as enzimas, em especial as lipases, apresenta um grande potencial e, por isso, tem sido os mais investigados em pesquisas dos últimos anos. Segundo SOUZA (2010), estima-se que a soma de artigos e patentes referentes a obtenção desse biocombustível, por catálise enzimática, é numericamente maior que para todos os outros processos.

A utilização de enzimas na produção de biodiesel é atrativa em função das seguintes características desse catalisador:

- São biodegradáveis e atendem aos apelos atuais da Química Verde.
- Podem ser utilizados mesmo quando a matéria prima apresenta alto índice de acidez.
- Utiliza condições brandas levando à redução do consumo energético.
- Possui alta especificidade e, dessa forma, há uma facilidade de separação do produto e aumento da qualidade do glicerol.
- Podem ser reutilizadas quando na forma imobilizada.

A Tabela 3 apresenta dados experimentais de transesterificação por catalise básica, ácida e enzimática. Comparando os dados observa-se que a catálise via enzimática, como já mencionado anteriormente, utiliza condições brandas de reação, propicia a reciclagem do catalisador, facilita o processo de purificação e evita contaminação do biodiesel.

Tabela 3 – Características dos catalisadores ácidos e básicos empregados em transesterificação.

Catalisador	Catalise Homogênea		Catalise Heterogênea
	Básica	Ácida	Enzimática
	NaOH, KOH	H ₂ SO ₄ , H ₂ PO ₄	Lipase
Tempo de reação para conversão de 99%	3-4 h	3-50 h	3,5-144 h
% catalisador	0,5-1%	0,5-3,5%	4-30%
Purificação do produto	N., F. e C.	N., F. e C.	F. e C.
Temperatura (C)	40-70	55-120	30-40
Sub-produto	glicerina, e sabões	glicerina	Glicerina
Recuperação do catalisador	não	não	95%

N=Neutralização; F=Filtração C=Centrifugação;

Fonte: MOREIRA, 2007

Embora a produção de biodiesel por catálise enzimática ofereça uma série de vantagens, a utilização deste biocatalisador ainda não foi adotada em escala industrial, devido ao alto custo de produção das enzimas. Entretanto, diversos esforços têm sido realizados de modo a tornar viável o processo industrial de obtenção do biodiesel por catalise enzimática. Para se assegurar a viabilidade econômica dessa rota, deve-se otimizar alguns parâmetros como pH, razão enzima/óleo, temperatura, seleção de solventes apropriados de modo a evitar a inativação das enzimas e possibilitar a sua recuperação com atividade enzimática elevada.

2.4 Lipases

As lipases são enzimas hidrolíticas que "in vivo" catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa. Estas enzimas são classificadas de acordo com a definição clássica como hidrolases (glicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3), pois atuam sobre ligações de éster presentes em acilgliceróis, liberando diglicerois ou monogliceróis, ácidos graxos e glicerol. Estes biocatalisadores elevam consideravelmente a velocidade de algumas reações químicas e podem ser obtidas a partir de fontes animais (lípase pancreáticas, hepáticas e gástricas), vegetais ou de microrganismos (bactérias e fungos).

A principal forma de produção industrial de lipases ocorre por processos fermentativos, com a utilização de microrganismos que oferecem uma elevada capacidade produtiva. Os principais microrganismos utilizados para produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor*, bactérias do gênero *Pseudomonas* e leveduras do gênero *Cândida* (MOREIRA, 2007).

Embora a produção lipases por microrganismos se destaque no cenário industrial, o interesse por enzimas de origens vegetais tem aumentado nos últimos anos. Em parte, devido ao custo de produção das enzimas de origem microbiana que exigem um elevado grau de purificação. Além disso, várias pesquisas têm demonstrado a viabilidade da utilização de látex e tecidos de algumas espécies vegetais (sementes, folhas e caules), como fonte de enzimas em processos biotecnológicos. Apesar de pouco exploradas em escala industrial, várias lipases produzidas por vegetais foram purificadas e estudadas quanto às suas características bioquímicas e quanto a potenciais aplicações na biotransformação de lipídeos. Dentre as enzimas lipolíticas vegetais estudadas estão as triacilglicerol lipases, as acil-hidrolases não específicas como as fosfolipases A1, A2 e B, as glicolipases, as sulfolipases e monoacilglicerol lipases, além das fosfolipases C e D (MUKHERJEE, 1994). Entre as espécies vegetais estudadas podem ser citadas *Ricinus communis*, *Vernonia*, *Pinus*, *Brassica napus*, *Cuphea racemosa*, *Euphorbia characias* e *E. wulfenii*, dentre outras (PALOCCI *et al*, 2003).

O uso dessas fontes enzimáticas pode contribuir com a diminuição dos custos dos processos, pois as lipases de origem vegetal não exigem purificação em alto grau, podem ser utilizadas na forma de extratos brutos, não representa riscos à saúde humana e são amplamente disponíveis. Desta forma as lipases de fontes vegetais podem ser uma boa alternativa para exploração industrial (SOUSA, *et al.* 2010, AVELAR, *et. al.* 2013). Como exemplos de enzimas de origem vegetal que desempenham papel comercialmente importante, podem ser citados a bromelina e a papaína, enzimas extraídas do abacaxi (*Ananas comosus* (L)) e do látex do mamão (*Carica papaya*), respectivamente (PAQUES; MACEDO. 2006; PALOCCI, 2003; SAAD, 2006).

Com o intuito de encontrar novas fontes de lipases vários estudos vêm sendo desenvolvidos para investigar a atividade enzimática em algumas espécies vegetais. A atividade enzimática (lipásica) pode ser avaliada por meio da quantificação da atividade hidrolítica das lipases. De modo geral, essa atividade é determinada pela detecção dos ácidos graxos liberados, ao longo do tempo, a partir da reação entre a enzima e um substrato lipídico. A quantificação dos ácidos graxos livres pode ser realizada por métodos titulométricos,

colorimétricos, turbidimétricos ou fluorimétricos, sendo os primeiros os mais comuns. Deste modo, o teste da atividade lipásica ou hidrolítica é amplamente empregado tanto para avaliar o desempenho de enzimas comerciais, como para identificar novas fontes potenciais de lípases. (FARIA, 2010; PAULA, *et al.*, 2008; SOUZA, 2010).

Dados da literatura relatam aplicação do teste de atividade lípásica para avaliar a presença desta enzima em várias espécies vegetal. Como exemplo pode ser citado o estudo de Palocci, *et al* (2003) que investigou a atividade hidrolítica em látex de várias espécies de *Euphorbia*. Dentre as espécies estudadas, *E. characias* e *E. wulfenii* apresentaram altos índices de hidrólise de substratos lipídicos sob diferentes temperaturas e pH tanto com o látex bruto como em extratos enzimáticos parcialmente purificados.

AVELAR, *et al.*, (2013) avaliou a atividade hidrolítica de extrato enzimático obtido a partir das sementes de mamona, pelo método titulométrico. Neste estudo o extrato enzimático apresentou maior atividade para os óleos ricos em ácidos linoleico e oleico, como a canola e a soja, que apresentaram valores de atividade hidrolítica de 83,3 U/g e 86,1 U/g respectivamente. Com base nos dados apresentados no estudo, concluiu-se que de modo geral o extrato enzimático da mamona tem potencial biocatalítico para produção de ácidos graxos.

Outro estudo baseado em dados de atividade hidrolítica foi realizado por POLIZELLIA *et al.* (2008), que caracterizaram uma lípase presente em sementes oleaginosas de *Pachira aquática*, fonte enzimática mostrou estabilidade em pH alcalino e exibiu atividade máxima a 40°C e pH 8,0. Neste estudo o extrato enzimático bruto foi eficiente quando submetido a reações de hidrólise do óleo de soja. Assim como os estudos relatados anteriormente há vários outros que demonstram a presença de lípases em espécies vegetais. A Tabela 4 apresenta algumas espécies vegetais que já foram relatadas atividades hidrolítica em folhas, caule e látex.

Tabela 4 – Atividade hidrolítica em espécies vegetais

Família	Espécie	Atividade (UI/mL)
Asclepiadaceae	<i>Araujia serilofera</i>	1375
	<i>Asclepias curassavica</i>	6000
	<i>Asclepias syriaca</i>	6000
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia characias</i> *	10295
	<i>Euphorbia. pinea</i>	334

Caricaceae	<i>Carica papaya</i> *	1590
	<i>Carica pentagona</i> *	1010
Bromeliaceae	<i>Ananas comosus</i> *	64

* Atividade determinada em UI/g de látex seco ou extrato enzimático seco.

Fonte: PAQUES *et al.* 2006.

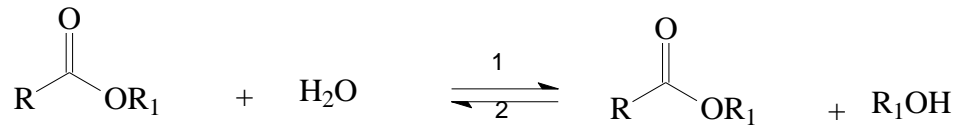
As lípases apresentam a peculiaridade de serem ativadas quando o meio reacional apresenta uma interface lipídeo/água. Assim, a atividade hidrolítica é baixa em meios reacionais compostas somente de substratos lipídicos, mas é fortemente aumentada quando são formadas interfaces lipídeos/água. Essa ativação da enzima em meios que apresentam essa interface é denominada ativação interfacial e durante muito tempo esse fenômeno foi utilizado para classificar as lípases como verdadeiras.

As explicações para a ativação interfacial das lípases são controversas. Uma delas baseia-se em técnicas de difração de raios-X e defende que o centro ativo dessas enzimas é recoberto por uma superfície hidrofóbica, denominada de “tampa” (ou “lid”) que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional expondo o sítio ativo. Assim, a presença desta “tampa” e a ativação interfacial caracterizaria as enzimas como lípases verdadeiras. Entretanto, para algumas lípases observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial. Pois, algumas lípases de origem microbiana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B) e uma lipase pancreática, não apresentaram ativação interfacial, embora apresentem uma “tampa” anfífila cobrindo seus sítios ativos. Estas observações sugerem que a presença da “lid” e a ativação interfacial não são critérios para caracterizar lípases como verdadeiras ou não. Deste modo, a definição atual de lipase é bastante simples: lípases são carboxil-esterase que catalisam a hidrólise de acilglicerois (CASTRO, *et al.*, 2008; BARROS *et al.* 2010; PAQUES; MACEDO, 2006).

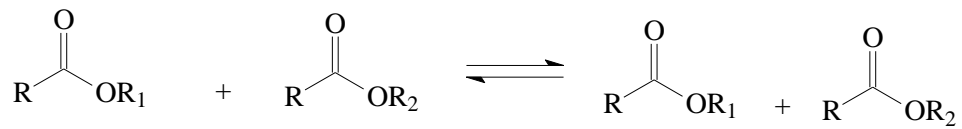
Apesar de serem classificadas como enzimas que catalisam hidrólises, dependendo das condições reacionais (meio aquoso-restrito) as lípases também são capazes de catalisar reações de síntese, tais como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular) (CASTRO, *et al.*, 2008; BARROS *et al.* 2010; PAQUES; MACEDO, 2006).

As principais reações catalisadas por lípases encontram-se listadas na Figura 12.

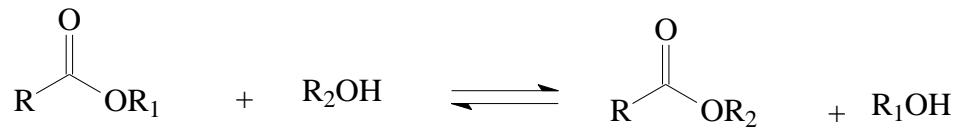
Figura 12 – Reações catalisadas por lípases



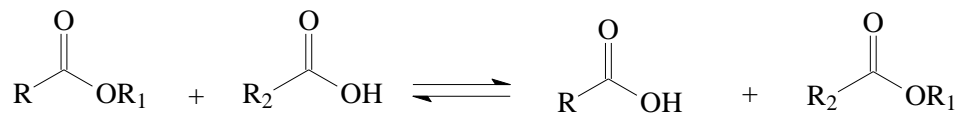
Hidrólise (1) e Esterificação (2)



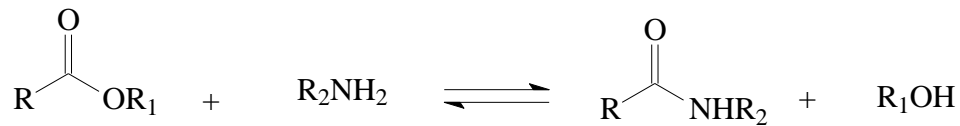
Interesterificação



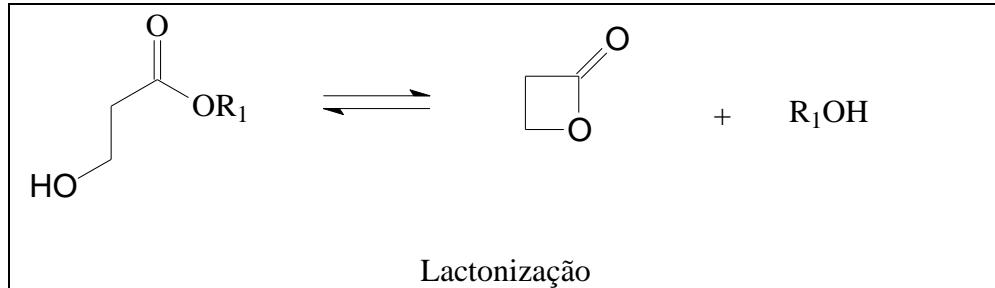
Alcólise



Acidólise



Aminólise

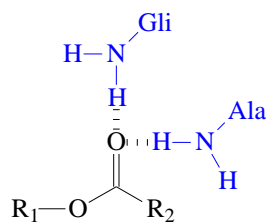


CASTRO, *et al*, 2008

As lípases possuem um sítio ativo constituído por uma tríade catalítica formada pela combinação de aminoácidos. Estes aminoácidos se combinam tipicamente em tríades de Ser-His-Glu (serina – histidina – ácido glutâmico ou ácido aspártico). Nesse sítio ativo ocorre o mecanismo catalítico que permite a formação dos produtos reacionais.

De acordo com dados da literatura científica o mecanismo catalítico, típico de transesterificação ou esterificação, promovido por lípases se inicia com a ativação do substrato promovida por resíduos de aminoácidos (Figura 13). No sítio ativo da enzima o mecanismo segue conforme a descrição que exemplifica a reação de transesterificação promovido pela lípase de *Candida rugosa*: inicialmente os aminoácidos glicina (Gly) e alanina (Ala) participam da ativação do grupo carbonila (C=O) que irá sofrer a reação de esterificação ou transesterificação próximo ao sítio catalítico da lípase (MEDEIROS, *et al*, 2011).

Figura 13 – Ativação de um éster promovida por resíduos de aminoácidos pertencentes a um tipo de lípase

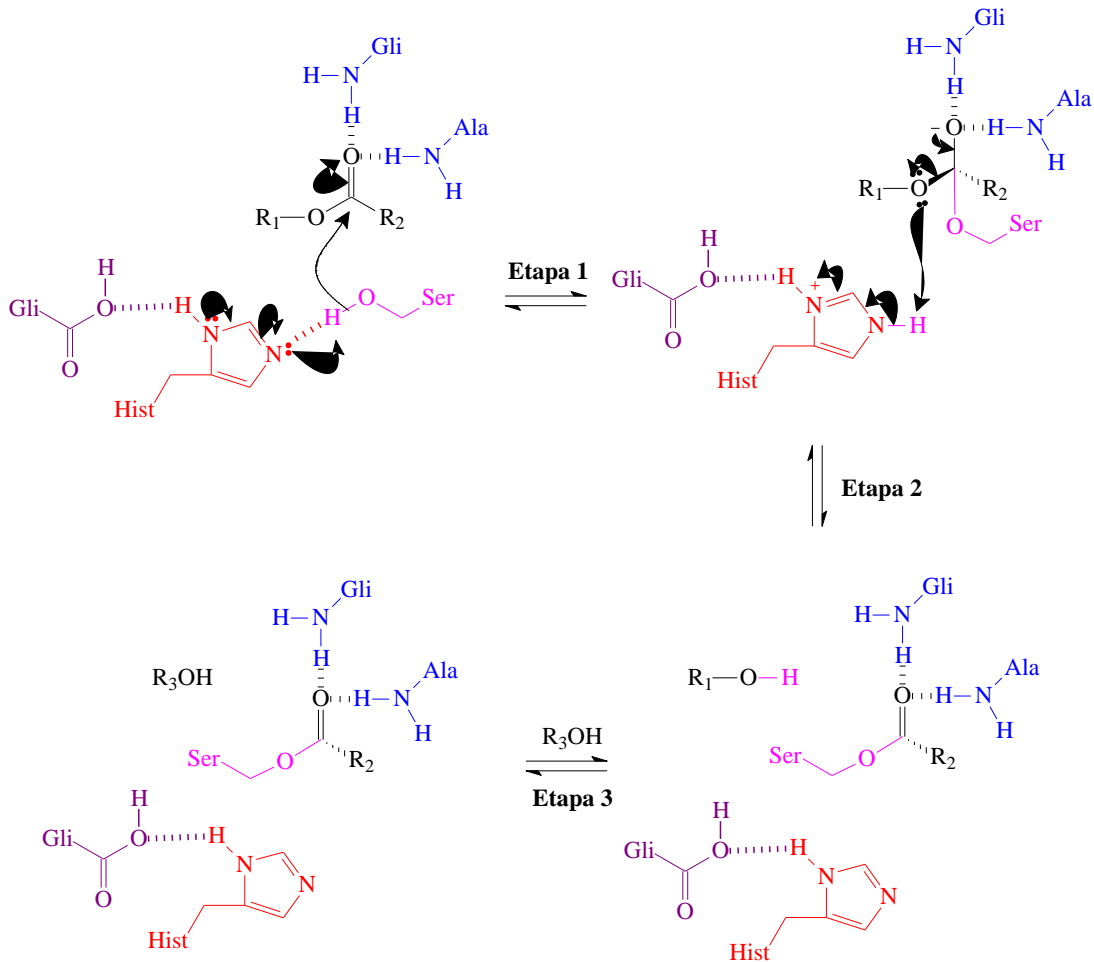


Fonte: elaborada pelo autor. adaptado de MEDEIROS, 2011

No sítio catalítico da lípase ocorre a desprotonação da hidroxila pertencente ao aminoácido serina, que conseqüentemente, assume um caráter mais nucleofílico. Em seguida a serina promove o ataque ao carbono carbonílico do substrato. Tudo isso ocorre por meio de um mecanismo concertado e em equilíbrio, conforme indicado na etapa 1 do esquema ilustrado na Figura 14. Na etapa 2 ocorre a eliminação do álcool (ou água, quando R1 = H) do

substrato, e ele permanece unido no sítio catalítico da enzima, até que seja trocado na etapa 3 pela nova porção alcoólica que se deseja inserir no substrato (R3-OH), a qual se encontra, normalmente, em excesso no meio reacional.

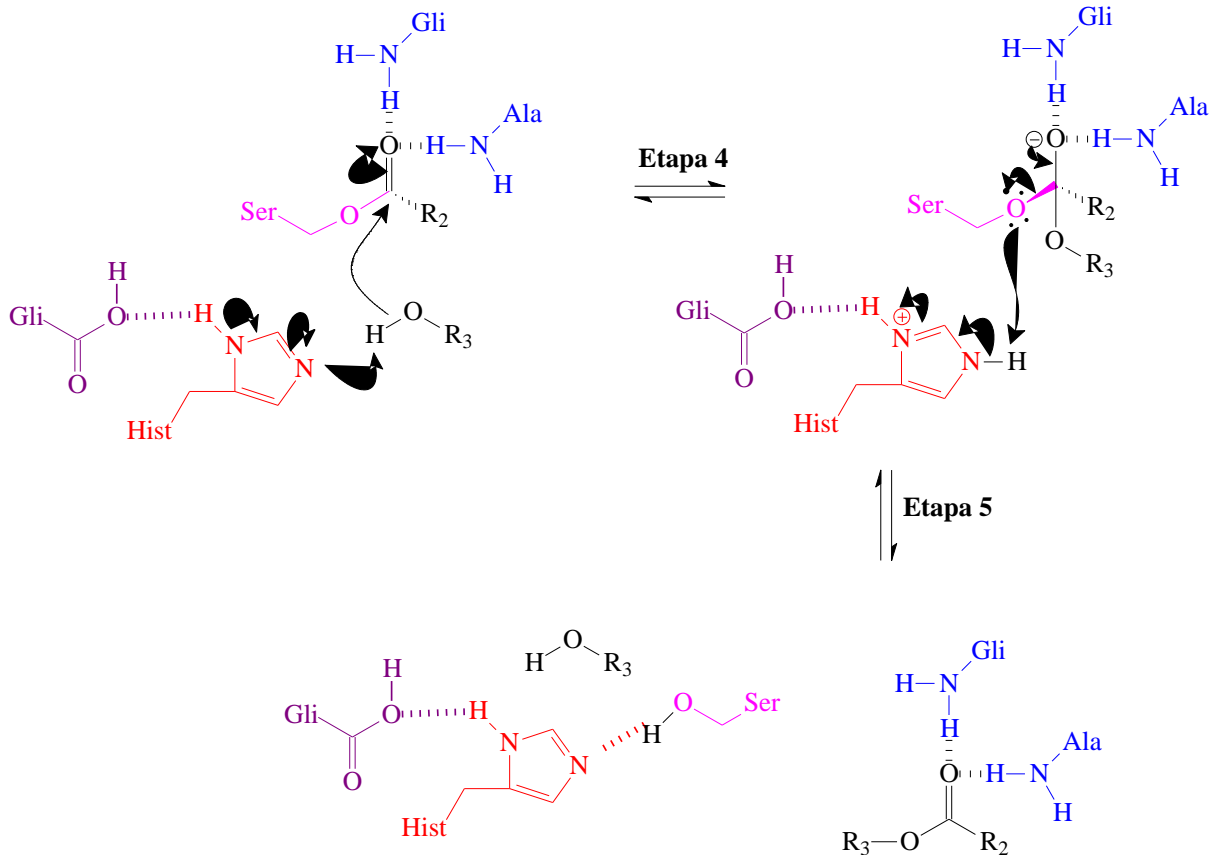
Figura 14 – Mecanismo catalítico de uma lípase. Atuação frente a um éster.



Fonte: elaborada pelo autor. adaptado de MEDEIROS, 2011

A liberação do produto ocorre num processo inverso como ilustrado nas etapas 4 e 5 da Figura 15 (CASTRO *et al* 2003; MEDEIROS *et al.*2013; SOUZA 2010).

Figura 15: Mecanismo de liberação do produto reacional após a catalise de uma lípase.



Fonte: elaborada pelo autor. adaptado de MEDEIROS, 2011

As lipases apresentam a vantagem de serem catalisadores que atuam sob condições brandas, não requerem cofatores, atuam em uma ampla faixa de pH e apresentam seletividade e especificidade.

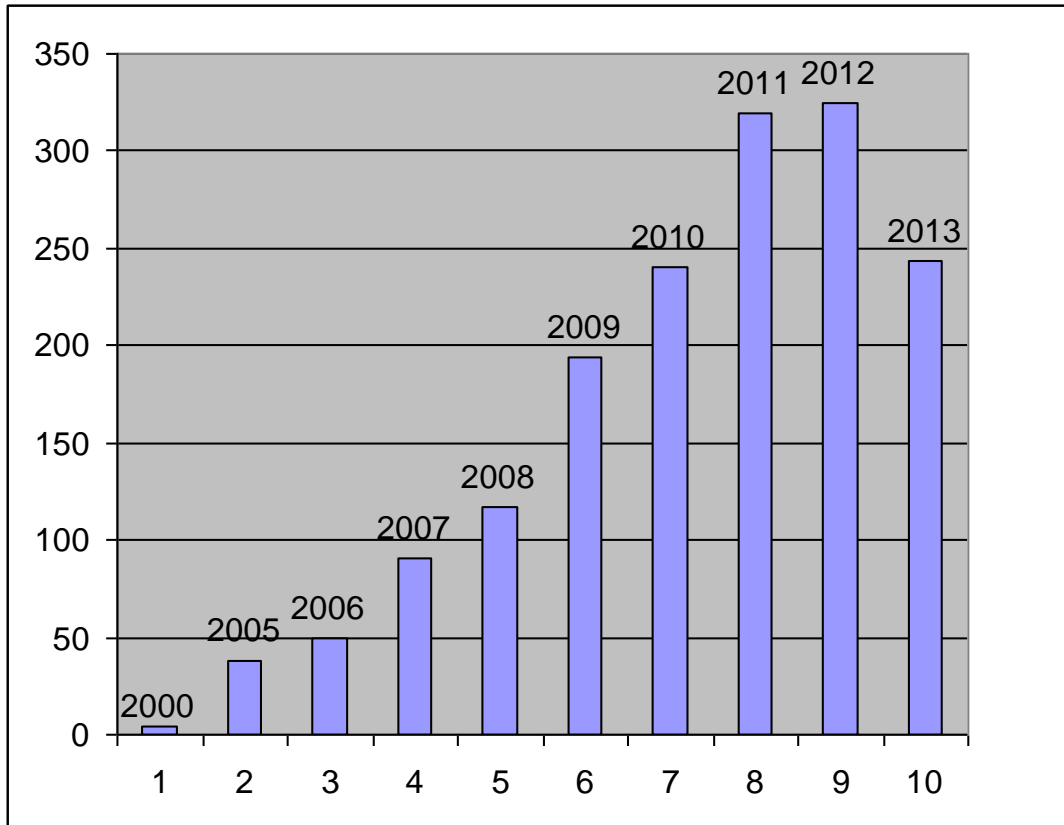
A seletividade consiste na capacidade da enzima distinguir entre dois ou mais substratos diferentes, e a especificidade pode ser entendida como a capacidade que a enzima tem de gerar um único produto a partir de um determinado substrato, sendo que algumas enzimas podem gerar diferentes produtos a partir de um substrato (RICHETTI, 2009; SOUZA, 2010).

Devido a sua versatilidade as lipases são amplamente empregadas em vários setores da indústria, incluindo os setores de óleos e gorduras, alimentos, resolução de misturas racêmicas, detergentes, indústria de papel, entre outros. Uma área que vem ganhando destaque nos últimos anos é a produção de biodiesel utilizando lipases como catalisadores.

O crescente interesse pelo assunto pode ser verificado pelo número de trabalho científicos publicados nos últimos anos (Figura 16). Nestes podem ser verificados relatos de

inúmeras vantagens quanto à utilização desses biocatalisadores em reações de obtenção do biodiesel.

Figura 16 – Número de artigos publicados por ano e as citações associadas às palavras-chave “Biodiesel and enzyme”, entre os anos 2000 e 2013.



Fonte: ISI Web of Science em 05/04/2013

Dentre as vantagens já citadas anteriormente do uso de lípases, ainda podem ser citadas: facilidade de separação dos produtos reacionais, reutilização do biocatalizador (quando imobilizados) e altos rendimentos reacionais. Quanto ao rendimento vários estudos têm demonstrado que as lípases são bastante eficientes, podendo oferecer rendimentos reacionais superiores a 90% de conversão (Tabela 5).

Tabela 5 – Rendimentos de obtenção de biodiesel utilizando lípases comerciais.

Lipase	Óleo	Rendimento	Referencia
Cândida Antarctica	-	90.4	Li, <i>et al.</i> 2012
	-	97	GOG, <i>et al.</i> ,2012
Novozymes 435	Soja	88	Li, <i>et al.</i> 2012

	Óleo de fritura	98	KIAKALAIIEH, <i>et al.</i> , 2013
	Soja	97	SAMUKAWA, <i>et al.</i> , 2000.
	Palma	89,9	HAIGH <i>et al.</i> , 2012.
Pseudomonas cepacia	Jatropha	70	GOG <i>et al.</i> , 2012
Pseudomonas cepacia Mahua		98	
<i>Rhizopus oryzae</i>	Soja	50	HAMA <i>et al.</i> (2007)

Fonte: elaborada pelo autor.

Devido à relevância do assunto o presente estudo teve por objetivo específico desenvolver um método de análise quantitativo de obtenção do biodiesel de óleo de mamona empregando enzimas comerciais ou potenciais fontes vegetais de enzimas (látex) nas reações de transesterificação via rota metílica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Especificação dos Reagentes e Equipamentos

3.1.1. Biocatalisadores

Os testes iniciais foram realizados utilizando como biocatalisadores enzimas livres ou imobilizadas de *Candida antarctica* lipase B (Novozima 453 ou CAL-B), *Aspergillus oryzae* (Lipozyme RM), Amano Lipase PS de *Burkholderia cepacia*, Amano Lípase OS de *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea, Lipozyme, lipase de *Candida rugosa* e lipase do pâncreas do porco (LPP) de origem microbiana, disponíveis comercialmente e com elevada atividade catalítica. Outras fontes enzimáticas de origem vegetal também foram testadas, látex da espécie *Calotropis procera* (bombardeira) e as sementes de *Lens culinaris* (lentilha), selecionadas a partir de testes de atividade hidrolítica (lipásica) de várias fontes vegetais.

3.1.2. Determinação da atividade lipásica

Azeite de oliva comercial, goma arábica, fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) e fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4), hidróxido de potássio (KOH), biftalato de potássio ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$), acetona e etanol.

3.1.3. Síntese do Biodiesel

Para a síntese do biodiesel, foi utilizado como substrato o óleo de mamona refinado (*Ricinus communis* L.), cedido gentilmente pela OLVEQ (Industria e Comercio de Óleos Vegetais de Quixadá), empresa que trabalha com beneficiamento deste produto na cidade de Quixadá. Para caracterização do conteúdo de ácidos graxos do óleo de mamona foram utilizados metanol, hexano, acetato de etila, hidróxido de potássio (KOH) e ácido clorídrico (HCl), de grau PA. Para a síntese do biodiesel por catalise enzimática foram utilizados os catalisadores já descritos anteriormente. Para otimização das condições reacionais foram utilizados os solventes orgânicos: éter de petróleo, acetona, acetonitrila, dimetil sulfoxido (DMSO), acetato de etila, dioxano, etanol e hexano, todos de grau PA.

3.1.4. Padrões cromatográficos

Para a síntese dos ésteres metílicos utilizados como padrões cromatográficos foram utilizados os seguintes ácidos graxos: palmítico, esteárico, linoléico, oléico e ricinoléico. Outro padrão cromatográfico utilizado foi oleato de etila obtido comercialmente.

3.1.5. Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: Balança analítica, centrífuga, chapa de aquecimento, evaporador rotativo, pHmetro e agitador mecânico. Para a determinação e quantificação dos produtos reacionais (biodiesel) foi utilizado cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas (CG-EM), equipado com coluna capilar OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados no Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREM).

3.2. Procedimento experimental

3.2.1. Determinação da composição em ácidos graxos do óleo de mamona

Para a determinação da composição em ácidos graxos, o óleo de mamona foi submetido a uma reação de saponificação seguida de uma reação de esterificação conforme descrito a seguir:

- **Reação de saponificação:** A reação de saponificação foi realizada com 4,0 g de óleo e 4,0 g de hidróxido de potássio (KOH) dissolvidos em 30 mL de metanol. Os reagentes foram acondicionados em balão de fundo redondo de 125 mL. A reação foi mantida por uma hora, sob refluxo (60°C) e agitação magnética. Decorrido o tempo determinado a mistura reacional foi concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo, dissolvida em 30 mL de H₂O e transferida para um funil de separação. Posteriormente, foram adicionados 50 mL de hexano para separação das fases orgânica (insaponificáveis) e aquosa. O procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após o processo de extração, adicionou-se alíquotas de uma solução a 20% de ácido clorídrico (HCl) à fase aquosa, até que seu pH estivesse entre 4-5. Depois de acidificada, a fase orgânica foi transferida para funil de separação, adicionou-se 50 mL de acetato de etila para extração dos saponificáveis. O processo foi repetido por mais duas vezes. O material foi concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e reservado para a reação de esterificação.

- **Reação de esterificação:** Para a reação de esterificação 2,0 g do material saponificável foi dissolvido em 20 mL de metanol e transferido para um balão de fundo redondo de 100 mL. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. A reação foi mantida por uma hora, sob refluxo (60°C) e agitação magnética. Decorrido o tempo de reação, o material foi concentrado em evaporador rotativo até total remoção do solvente. Posteriormente, o material foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária gel de sílica e como fase móvel hexano e acetato de etila na proporção de 9:1. O produto reacional da esterificação, purificado na coluna cromatográfica, foi analisado por CG-EM para determinação da composição de ácidos graxos do óleo de mamona, na forma de ésteres metílicos.

3.2.2. Síntese dos padrões cromatográficos

Para a síntese dos padrões cromatográficos, 2,0 g do ácido graxo foram dissolvidos em 20 mL de metanol, transferidos para um balão de fundo redondo de 100 mL, adicionado 1,0 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado, seguido de agitação magnética sob refluxo (60°C) por 1 h. Decorrido o tempo de reação, o material foi concentrado em evaporador rotativo até a total remoção do solvente. Posteriormente, o material foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária gel de sílica e fase móvel hexano/acetato de etila em proporções que 0 a 100% de acetato de etila. As frações obtidas foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) para avaliar a pureza das

frações. A Figura 17 mostra a cromatoplaca das frações obtidas após a cromatografia em coluna do produto obtido a partir do ácido oléico. Nela verifica-se que a fração 1 é a mais pura, portanto uma alíquota dessa amostra foi encaminhada para análise com o objetivo de verificar a identidade do produto obtido.

Figura 17– cromatoplaca das frações obtidas após cromatografia em coluna do produto obtido a partir do ácido oleico. 1-Fração hexanica, 2-Fração Hexano/Acetato 5%, 3- Fração Hexano/acetato 10 % e 4-Fração Acetato.



Fonte: elaborado pelo autor.

O procedimento foi realizado com cinco ácidos graxos padrões diferentes: palmítico, esteárico, linoléico, oléico e ricinoléico. Estes ácidos graxos foram selecionados tomando como referência a composição do óleo a ser utilizado. Para comprovar a identidades dos ésteres obtidos, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e por ressonância magnética nuclear.

3.2.3. Curva de Calibração

Inicialmente, foi realizado a otimização do método cromatográfico. Para isso, uma solução multielementar em metanol (1,0 g/L) dos padrões dos ésteres sintetizados, e do padrão interno, foi injetada no CG-EM para determinação do tempo de retenção de cada composto e ajuste das condições de separação e operação do aparelho (otimização do método

de separação). Estabelecido o melhor método cromatográfico de análise, curvas de calibração utilizando soluções padrões dos ésteres metílicos foram obtidas em intervalos de concentração de 50 a 1500 µg/mL. Oleato de etila foi utilizado como padrão interno. Uma alíquota de 5 µL de cada solução padrão foi misturada a 100 µL da solução do padrão interno (500 µg/mL), sendo 1 µL desta mistura injetada no CG-MS. As curvas de calibração foram construídas através de regressão linear, plotando-se a área do pico do analito/área do pico do padrão interno versus a concentração do analito.

O método analítico foi validado para cada éster metílico identificado no biodiesel do óleo de mamona. Os parâmetros avaliados foram linearidade, exatidão e precisão.

3.2.4. Determinação da atividade lipásica de fontes enzimáticas vegetais

- Seleção dos possíveis biocatalisadores vegetais

Inicialmente, foram coletadas seis amostras de látex provenientes de diferentes espécies vegetais (*Ficus benjamina*, *Manihot glaziovii* Muell. Arg., *Calotropis procera*, *Jatropha curcas* L., *Ficus pumila* e *Euphorbia tirucalli* L.). Os látex das espécies *Ficus benjamina*, *Manihot glaziovii* Muell. Arg., *Calotropis procera* e *Jatropha curcas* L. foram coletados nas proximidades do campus do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE-campus de Quixadá), localizado na cidade de Quixadá-Ceará e das espécies *Ficus pumila* e *Euphorbia tirucalli* L. no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza-Ceará. A coleta foi realizada a partir de pequenas incisões feitas em diferentes partes do vegetal, previamente lavada com água destilada e esterilizada com o auxílio de algodão embebido com etanol (P.A). Após a coleta, o látex foi armazenado em frízer até o momento de sua utilização. As sementes de lentilha (*Lens culinaris*) frescas foram compradas no Mercado central de Fortaleza. As sementes foram trituradas e submetidas à assepsia com hipoclorito de sódio 5% por 10 minutos, sendo posteriormente lavadas com água destilada (3 x 20 mL).

- Determinação da atividade lipásica

Para a determinação da atividade hidrolítica foi utilizado como substrato azeite de oliva (5% m/v), emulsionado em goma arábica (10% m/v) em 100 mL de uma solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, segundo metodologia adotada de MOREIRA (2007). Em erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 20 mL do substrato (emulsão) e aproximadamente 0,5 g do biocatalisador (látex ou sementes de lentilha). Os experimentos foram conduzidos em

triplicata e, paralelamente, foram realizados ensaios em branco com 0,5 g de água destilada, em substituição ao biocatalisador. Posteriormente, os recipientes foram lacrados e submetidos à agitação por 30 minutos a 37 °C e 150 rpm. Decorrido o tempo de reação, foram adicionados 20 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1). Em seguida, adicionou-se algumas gotas de fenolftaleína e as amostras foram tituladas (em triplicata) com uma solução de NaOH 0,05 M.

O procedimento foi realizado com todas as amostras (látex e sementes de lentilha), e a atividade hidrolítica foi determinada utilizando fórmula expressa pela Equação 1.

$$A_H = (V_a - V_b) \cdot M \cdot 1000 / t \cdot m$$

Equação 1

Onde:

AH= Atividade hidrolítica (U/g);

Va= Volume de titulante usado para a amostra (mL);

Vb= Volume do titulante usado para o branco (mL);

M=Molaridade da solução de NaOH;

t= Tempo de reação (min);

m= Massa da amostra usada na reação (g)

3.2.5 Reação de Transesterificação Enzimática.

Nestes experimentos foram utilizadas sete enzimas comerciais e duas fontes enzimáticas selecionadas a partir dos resultados dos testes de atividade lipásica. As enzimas comerciais utilizadas foram: *Candida antarctica* lipase B (Novozima 453 ou CAL-B), *Aspergillus oryzae* (Lipozyme RM), Amano Lípase PS de *Burkholderia cepacia*, Amano Lípase OS de *Burkholderia cepacia* imobilizada em terra diatomácea, Lipozyme, lipase de *Candida rugosa* e lipase do pâncreas de porco (PPL). As fontes enzimáticas de origem vegetal, selecionadas a partir dos testes de atividade hidrolítica, foram Látex de *Calotropis procera* e sementes de *Lens culinari*.

Para a reação de transesterificação, 50 mg do biocatalisador foram adicionados a 200 mg do óleo de mamona, previamente dissolvidos em 2,0 mL de metanol.

O sistema reacional foi submetido à agitação através de um agitador mecânico orbital (150 rpm), em temperatura ambiente (~28°C). Ao final da reação, o sistema enzimático

foi separado por filtração e o filtrado foi centrifugado (12000 rpm, 10 minutos), e uma alíquota (5µL) da fase superior foi misturada a 100 µL de uma solução de padrão interno (oleato de etila, 500 µg/mL), sendo 1 µL desta mistura injetada no CG-EM. Os ésteres metílicos foram quantificados através de curvas de calibração obtidas a partir de soluções de padrões comerciais dos mesmos, injetadas da mesma forma que as amostras.

3.2.6. Otimização das reações de transesterificação enzimática

O biocatalisador que apresentou melhor desempenho na reação de transesterificação foi selecionado para ser utilizado em novas reações, sendo determinadas algumas condições ideais para sua reação de transesterificação. Dessa forma, foram estudados os efeitos da variação de alguns parâmetros relacionados à atividade enzimática, através do monitorando o rendimento reacional.

Assim, parâmetros como: pH, có-solvente, razão molar álcool/óleo, quantidade de enzima e melhor solvente para recuperação do biocatalisador foram testados.

3.2.6.1 Có-solventes e adição de metanol em etapas

Foram avaliados os seguintes có-solventes: éter de petróleo, acetona, DMSO, acetato de etila, dioxano, etanol e hexano. Em erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 2,0 mL do có-solvente, 200 mg de óleo de mamona, 50 mg do biocatalisador (Novozym 435) e 0,5 mL de metanol. O sistema foi lacrado e submetido à agitação através de um agitador mecânico orbital (150 rpm), em temperatura ambiente (~28°C). A cada 1 h de reação foram adicionados mais 0,5 mL de metanol até um volume total de 2,0 mL de álcool no sistema reacional. A reação foi conduzida por 48 h e, após esse tempo, a enzima foi separada por filtração e o filtrado foi centrifugado (12000 rpm, 10 minutos). Em seguida, uma alíquota (5µL) da fase superior foi misturada a 100 µL de uma solução de padrão interno (oleato de etila, 500 µg/mL), sendo 1 µL desta mistura injetada no CG-EM. Os ésteres metílicos foram quantificados através de curvas de calibração.

3.2.6.2. Razão molar álcool/óleo

Para determinar a melhor razão molar álcool:óleo, foram realizados cinco experimentos diferentes, com as razões 3:1, 8:1, 10:1, 100:1, e 240:1.

Em erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 2,0 mL de hexano, 200 mg de óleo de mamona, cada sistema foi preparado com 50 mg do biocatalisador (Novozym 435) e a quantidade de metanol calculada para cada razão molar (Tabela 6).

Tabela 6 – Quantidades de metanol e óleo usadas nos testes de razão molar álcool:óleo.

Razão Molar Álcool:Óleo	Metanol (μL)	Óleo (mg)
3:1	26	200
8:1	69	200
10:1	87	200
100:1	500	200
240:1	500	200

O sistema foi lacrado e submetido à agitação através de um agitador mecânico orbital (150 rpm), em temperatura ambiente ($\sim 28^\circ\text{C}$). Após 1 h de reação foram adicionados 467 μL e 500 μL de metanol aos sistemas reacionais que correspondiam, respectivamente, as razões molares de 100:1 e 240:1. A reação foi mantida por um tempo total de 48 h e, após esse tempo, a enzima foi separada por filtração e o filtrado foi centrifugado (12000 rpm, 10 minutos). Em seguida, uma alíquota (5 μL) da fase superior foi misturada a 100 μL de uma solução de padrão interno (oleato de etila, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sendo 1 μL desta mistura injetada no CG-EM. Os ésteres metílicos foram quantificados através de curvas de calibração.

3.2.6.3. Quantidade de enzima

Para avaliar o efeito da variação da quantidade de enzima em relação à quantidade de óleo, foram realizados cinco experimentos diferentes, em que as proporções de enzima em relação ao óleo foram de 5%, 10%, 15%, 25% e 30%. Em erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 2,0 mL de hexano, 200 mg de óleo de mamona, a massa de biocatalisador (Novozym 435) necessária para cada proporção (Tabela 7) e 0,5 mL de metanol.

Tabela 7 – Quantidades de enzima usadas nos testes para avaliar a melhor proporção de enzima

Proporção biocatalisador (%)	Massa de Óleo (mg)	Massa biocatalisador (mg)
5	200	10
10	200	20
15	200	30
25	200	50
30	200	60

O sistema foi lacrado e submetido à agitação através de um agitador mecânico orbital (150 rpm), em temperatura ambiente (~28°C). A cada 1 h de reação foram adicionados mais 0,5 mL de metanol até um volume total do álcool no sistema reacional de 2 mL. A reação foi mantida por 48 h e após esse tempo o produto reacional foi tratado como descrito anteriormente (filtração, centrifugação).

Em seguida, uma alíquota de 5 µL da fase superior foi misturada a 100 µL da solução de padrão interno (oleato de etila, 500 µg/mL), sendo 1 µL desta mistura injetada no CG-EM. Os ésteres metílicos foram quantificados através de curvas de calibração.

3.2.6.4. Avaliação do pH

Para avaliar o pH ótimo de atuação da enzima os sistemas reacionais foram preparados em tampão fosfato de sódio pH 5,2; 6,1; 7,2 e 7,8. Para cada reação foram adicionados 2 mL do tampão e 0,05g da enzima. A cada 1 h de reação foram adicionados mais 0,5 mL de metanol até um volume total do álcool no sistema reacional de 2 mL. A reação foi mantida por 48 h e após esse tempo o produto reacional foi tratado e analisadas por CG-EM, como descrito anteriormente.

3.2.6.5. Solvente para recuperação do biocatalisador

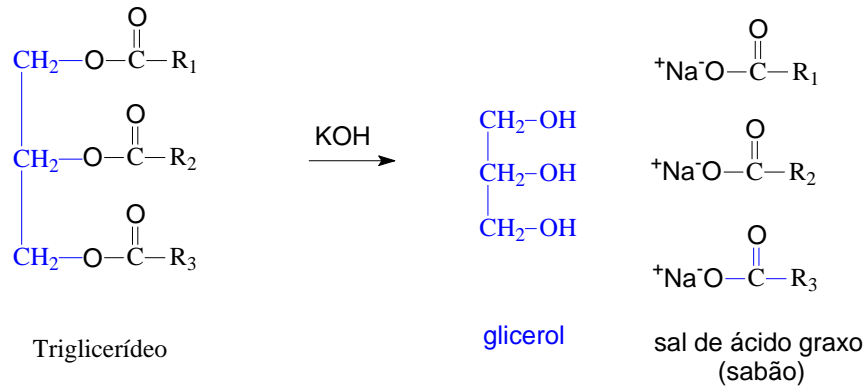
As enzimas utilizadas nos experimentos anteriores foram separadas em três grupos, A, B e C. As enzimas do grupo A foram lavadas com hexano, as do grupo B com etanol e as do grupo C com acetona. Depois de evaporado todo o solvente as enzimas foram reutilizadas em novas reações de transesterificação do óleo de mamona, utilizando para cada grupo 50 mg de enzima, 2,0 mL de hexano, 200 mg de óleo e 2,0 mL de metanol (adicionados em etapas), conforme metodologia adotada anteriormente (3.2.6.3). Após o tratamento do produto reacional (filtração e centrifugação), uma alíquota de 5 μL da fase superior foi misturada a 100 μL da solução de padrão interno (oleato de etila, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sendo 1 μL desta mistura injetada no CG-EM. Os ésteres metílicos foram quantificados através de curvas de calibração.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da composição em ácidos graxos do óleo de mamona.

Para avaliar a composição química do óleo de mamona foi realizada uma reação de saponificação seguida de uma reação de esterificação. Optou-se por este método devido indisponibilidade de reagentes anidros e devido ao fato de o óleo de mamona apresentar um pequeno índice de acidez. Como já relatado no item tecnologias de produção de biodiesel, somente a catalise ácida ou a catalise básica não seria viável nas condições existentes. Pois para óleos que apresentam índice de acidez ou na presença de água ambas as catalises favorecem a hidrolise do produto e, no caso da catalise básica, além da hidrolise pode também ocorrer a formação de sabão que dificulta a separação do produto. Na etapa de saponificação os triglicerídeos e os ácidos graxos livres presentes no óleo são transformados em sal de ácidos graxos (sabão) (Figura 18).

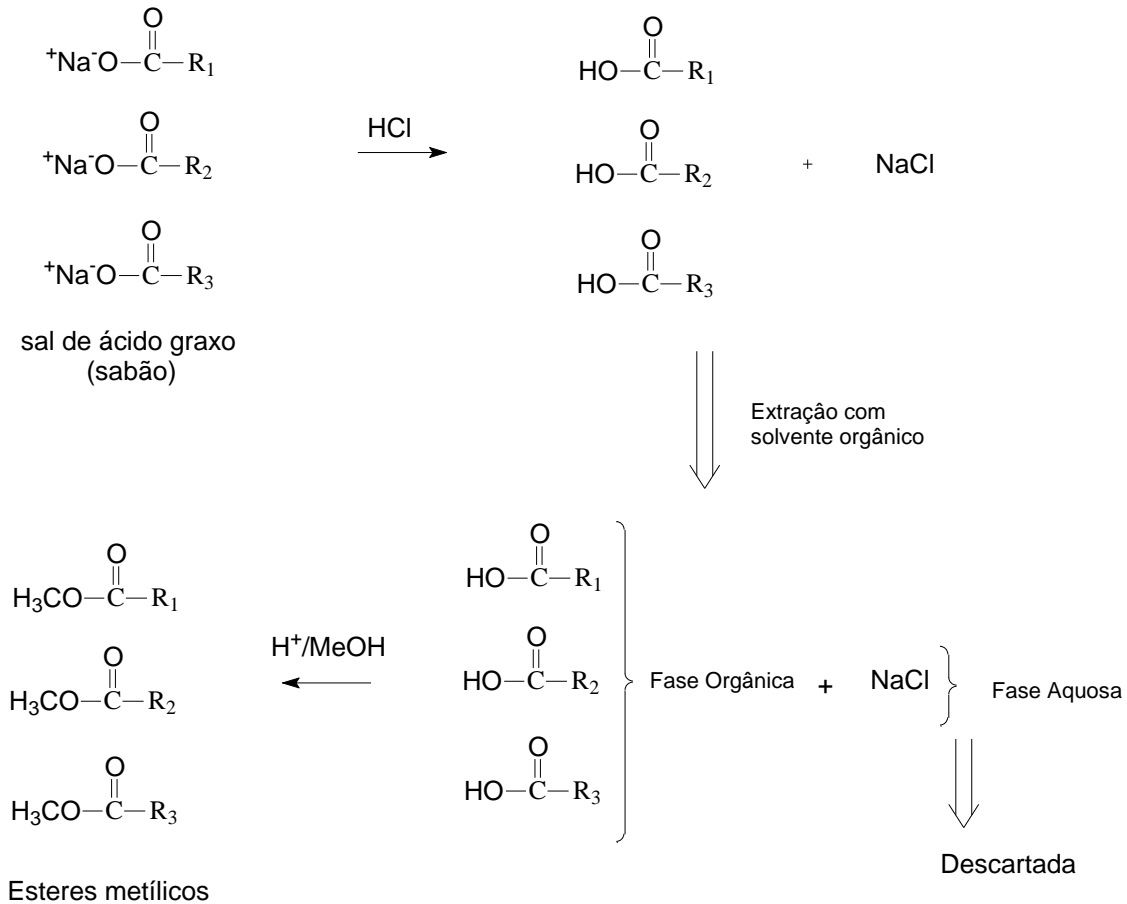
Figura 18 –Reação de saponificação



Fonte: BRUICE, 2006.

Após a saponificação é necessário fazer uma extração com solvente orgânico separando os insaponificáveis dos saponificáveis (fase aquosa). A fase aquosa na qual se encontram os saponificáveis é acidificada até pH em torno de 4 para garantir que os sais de ácidos graxos passem para a forma ácida. Em seguida, os ácidos graxos são extraídos com solvente orgânico e submetidos à reação de esterificação com álcool, por catálise ácida conforme ilustrado no esquema da Figura 19.

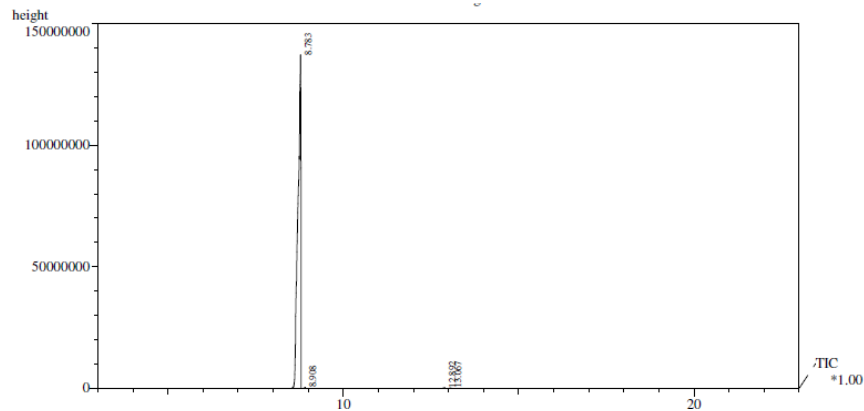
Figura 19 – Tratamento da fase saponificável da reação de saponificação seguida da esterificação com metanol com catalisador ácido.



A análise dos produtos obtidos após a esterificação revelou a presença de cinco ácidos graxos presentes no óleo de mamona: palmítico, linoléico, oléico, esteárico e ricinoléico, identificados e quantificados na forma de ésteres metílicos. Nesta análise foi possível observar que praticamente 95% do óleo é composto pelo ácido ricinoléico (ácido 12-hidróxi-9-octadecenóico). A literatura reforça essa informação através de artigos que relatam um percentual acima dos 80% para o ácido ricinoléico no óleo de mamona (BERMAN, *et al* 2011; NOGUEIRA, 2010).

O percentual calculado para os outros componentes graxos não atingiu 5% da composição do óleo de mamona refinado. O cromatograma da análise dos ésteres metílicos do óleo de mamona obtido por CG-EM é mostrado na Figura 20.

Figura 20 – Cromatograma de íons totais dos ésteres metílicos do óleo de mamona refinado.



4.2. Síntese dos padrões cromatográficos

Após as reações os rendimentos reacionais foram calculados e os resultados obtidos para cada substância foram compilados na tabela 8.

Tabela 8 – Rendimentos das reações de síntese dos padrões cromatográficos.

Ésteres	Massa do produto (g)	Rendimento (%)
Palmitato de metila	1,3482	67,41
Linoleato de metila	0,9759	48,79
Oleato de metila	1,1250	56,25
Estearato de metila	1,2018	60,09
Ricinolato de metila	1,0450	52,00

Inicialmente, a formação dos produtos reacionais foi confirmada por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando o reagente de partida como padrão cromatográfico. Em todos os casos observou-se a formação de uma mancha intensa e azulada com índice de retenção superior aos do reagente de partida, indicando que os reagentes foram transformados durante a reação química.

As estruturas dos ésteres obtidos foram confirmadas pela análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CGMS) e pela análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN 13C) e hidrogênio (RMN 1H).

Para a análise por CGMS os padrões cromatográficos foram injetados na forma de solução multielementar na concentração de 1500ppm. O cromatograma obtido confirma a identidade dos padrões. Para o ricinolato de metila também foi realizado uma análise em que se optou por analisá-lo juntamente com um padrão interno. Mais uma vez a identidade e a pureza do padrão obtido por via química foram confirmadas. Em todos os espectros de RMN ¹H observam-se a presença de singletos intensos em torno de δ H 3,6-3,8, com integração para 3 hidrogênios indicativo da presença de grupos metoxilas. Nos espectros de RMN ¹³C, de todos os produtos reacionais obtidos, verificou-se que em torno de δ C 174,33-174,31 há sinais bem pequenos que não aparecem no DEPT indicando a presença de carbonila de éster. Com base nos espectros foi possível confirmar a formação dos ésteres para todas as reações. Os espectros e os cromatogramas que confirmam a identidade de cada padrão cromatográfico, encontram-se ilustrados em anexo.

4.3. Curva de Calibração

Para a construção das curvas de calibração, foram utilizadas soluções multielementares dos padrões dos ésteres metílicos, em intervalos de concentração de 50 a 1500 μ g/mL. Também foi utilizada uma solução de oleato de etila 500 g/mL como padrão interno. As curvas de calibração foram construídas através de regressão linear, plotando-se a área do pico do analito/área do pico do padrão interno versus a concentração do analito. Deste modo, foram obtidas cinco curvas de calibração. A linearidade do método foi avaliada através do coeficiente de regressão linear (R). Quanto mais próximo de 1 for R mais linear é a resposta do detector em relação a concentração do respectivo éster. Os resultados deste estudo estão na Tabela 9.

Tabela 9: Equações de curva de calibração e coeficientes de linearidade para os ésteres metílicos do óleo de mamona.

Éster metílico	Equação da reta	R
-----------------------	------------------------	----------

Palmitato	$y=0,0002x - 0,0062$	0,9972
Linoleato	$y=0,00003x + 0,0019$	0,9989
Oleato	$y=0,00009x - 0,0038$	0,9993
Estearato	$y=0,0002x - 0,0109$	0,9987
Ricinoleato	$y=0,00007x - 0,0056$	0,9958

De acordo com os valores de R, podemos observar que a resposta do detector é linear a concentração de ésteres metílicos no intervalo de concentração estudado. A exatidão do método foi avaliada através da determinação da recuperação do analito na matriz da amostra, utilizando soluções multielementares dos ésteres em concentrações de 100 e 200 µg/mL. As quantidades recuperadas, o percentual de recuperação e o desvio padrão das medidas pode ser verificados na Tabela 10.

Tabela 10: Resultados da recuperação de padrões de ésteres metílicos adicionados ao óleo de mamona.

Éster metílico	100 µg/mL		200 µg/mL	
	Quantidade recuperada (µg/mL)	%Recuperação (±DP) (n=3)	Quantidade recuperada (µg/mL)	%Recuperação (±DP) (n=3)
Palmitato	95,02	95,02±5,99	171,76	85,88±6,27
Linoleato	83,74	83,74±2,05	153,28	76,65±5,42
Oleato	122,19	122,19±3,08	202,24	101,12±7,30
Estearato	108,95	108,95±3,98	181,01	90,51±4,57
Ricinoleato	123,35	123,35±3,02	166,77	83,39±1,91

Para todos os ésteres metílicos foram obtidos altos valores de recuperações, indicando uma boa exatidão do método e uma pobre influência da matriz da amostra (óleo).

A exatidão do método é avaliada pela concordância entre o valor da concentração do analito obtido pelo método aplicado e o estimado pelos cálculos estequiométricos. Quanto mais próximo do valor calculado, mais exato é o método. Quando o teste de recuperação é realizado na matriz da amostra e os valores de recuperação são elevados, indica que a matriz da amostra não influencia no método analítico (SILVA;ALVES, 2006; SKOOG, 2006).

A precisão do método foi avaliada pela reprodutibilidade, medida pelo coeficiente de variância (CV) e obtida por análises em dias diferentes. Soluções 100 µg/mL foram

injetadas em quadruplicata, e os CV foram calculados. Os desvios padrões e os CV podem ser verificados na Tabela 11.

Tabela 11– Resultados de reprodutibilidade da análise de soluções 100 µg/mL de padrões de ésteres metílicos do óleo de mamona.

Éster metílico	Concentração calculada (µg/mL)	DP (n=4)	CV (%)
Palmitato	98,02	3,99	4,07
Linoleato	93,23	2,02	2,17
Oleato	120,02	3,01	2,51
Estearato	106,85	3,68	3,44
Ricinoleato	121,35	3,12	2,57

DP= Desvio padrão; CV= Coeficiente de variação

Os dados mostraram uma boa precisão dos resultados, indicando que análises em dias diferentes pouco irão alterar a resposta do equipamento.

4.4. Determinação da atividade lipásica de fontes enzimáticas vegetais

Alguns trabalhos da literatura relatam a presença de lipases em diversas fontes vegetais tais como, látex e sementes de oleaginosas, de acordo com dados já citados anteriormente (BARROS, FLEURI; MACEDO, 2010; PALOCCI *et al.*, 2003; PAQUES, 2006). Por esse motivo, foram selecionadas algumas amostras que foram submetidos a testes para verificação do indício da presença de lipase nestes materiais.

Portanto, buscando novas fontes potenciais de lipases para aplicação em transesterificação de óleos vegetais, foi determinada a atividade hidrolítica de seis látex de diferentes espécies vegetais (*Ficus benjamina*, *Manihot glaziovii* Muell. Arg., *Calotropis procera*, *Jatropha curcas* L., *Ficus pumila*, *Euphorbia tirucalli* L., *Ficus benjamina* e *Manihot glaziovii* Muell. Arg., *Calotropis procera* e *Jatropha curcas* L.) e das sementes de lentilha (*Lens culinaris*). A atividade enzimática foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia adotada de MOREIRA (2007). De modo geral, este método baseia-se na detecção dos ácidos graxos liberados, ao longo do tempo, a partir da ação das enzimas sobre as moléculas dos glicerídeos presentes no substrato lipídico (azeite). A quantificação dos ácidos graxos livres pode ser realizada por titulação com solução alcalina, previamente padronizada, e a atividade hidrolítica é determinada pela fórmula expressa pela equação 1 (pág. 54). Em que uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de

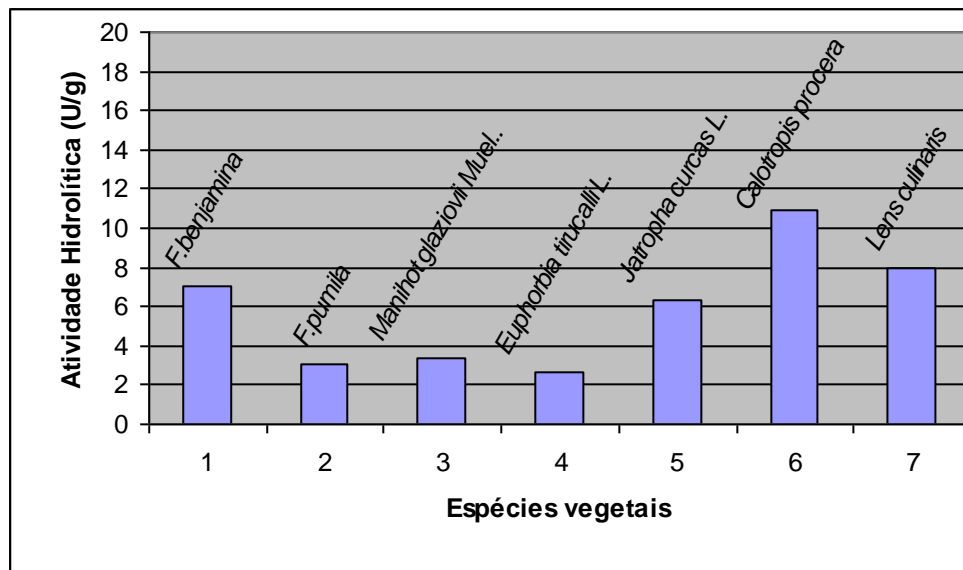
enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. Vale ressaltar que este teste é aplicado não só para identificar potenciais fontes lipásicas, mas também para avaliar o desempenho de entre lipases comerciais. Os resultados obtidos nos experimentos desenvolvidos foram expressos em $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$ (U/g) e encontram-se ilustrados na Tabela 12 e Figura 21.

Tabela 12 – Atividades hidrolíticas de fontes vegetais (látex e sementes de lentilha).

Família	ESPÉCIE VEGETAL	ATIVIDADE HIDROLÍTICA (U/g)
<i>Moraceae</i>	<i>Ficus benjamina</i>	6,99±0,50 ^a
	<i>Ficus pumila</i>	3,10±0,90
<i>Euforbiaceae</i>	<i>Manihot glaziovii</i> Muell. Arg.	3,40±1,67
	<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	2,64±0,42
	<i>Jatropha curcas</i> L.	6,29±0,99
<i>Apocynaceae</i>	<i>Calotropis procera</i>	10,96±0,62
<i>Leguminosae</i>	<i>Lens culinaris</i>	8,99±0,82

a=Média da atividade \pm desvio padrão

Figura 21 – Gráfico do desempenho na atividade hidrolítica para espécies vegetais.



Dados da literatura relatam que algumas espécies da família Euforbiaceae apresentam atividade hidrolítica. No presente estudo três espécies (*Manihot glaziovii* Muell. Arg, *Euphorbia tirucalli* L. e *Jatropha curcas* L.) pertencentes a essa família foram submetidos ao mesmo teste de atividade hidrolítica e apresentaram resultados positivos estando de acordo com dados literais e contribuindo com as investigações de lípases em espécies dessa família. Os maiores valores de atividade foram encontrados para as espécies *Calotropis procera* e *Lens culinaris*. Entretanto não foram encontrados dados literais para comparar os resultados obtidos. Como os resultados mais expressivos de atividade foram obtidos para estas espécies (Figura 21), elas foram utilizadas nas reações com óleo de mamona a fim de avaliar o desempenho das mesmas frente a reações de transesterificação. Pois valores positivos de atividade hidrolítica são um indício da existência de lípase em materiais.

4.5. Reação de Transesterificação Enzimática

As reações de transesterificação do óleo de mamona foram realizadas utilizando como biocatalisadores sete amostras de enzimas comerciais e duas amostras que se apresentaram como potenciais fontes de lipases de origem vegetal, no teste de atividade hidrolítica. De modo geral, objetivo foi à seleção de uma fonte enzimática cataliticamente eficiente na obtenção de biodiesel a partir de óleo de mamona. As condições reacionais preliminares foram descritas no item 3.2.5, pág. 54 (200 mg de óleo de mamona, 50 mg do

biocatalisador, 2mL de metanol, 72 horas, 28°C e 150 rpm de agitação). A partir dos dados das curvas de calibração foi possível fazer a quantificação dos ésteres metílicos (biodiesel) obtidos nas reações para cada biocatalisador. Os resultados desses experimentos estão ilustrados na Tabela 13.

Tabela 13: Rendimentos de ésteres metílicos (biodiesel) obtidos por transesterificação do óleo de mamona com fontes enzimáticas.

Fonte enzimática	Palmitato (%) ^b	Linoleato (%)	Oleato (%)	Estearato (%)	Ricinoleato (%)	Biodiesel (%) ^a
1	0,10±0,00	0,25±0,04	0,32±0,01	0,14±0,00	0,87±0,20	1,68±0,49
2	0,07±0,00	-	0,21±0,02	0,12±0,00	0,21±0,01	0,61±0,17
3	0,26±0,01	1,18±0,02	0,59±0,02	0,22±0,00	3,16±0,04	5,40±0,29
4	0,18±0,00	0,72±0,01	0,43±0,08	0,18±0,00	2,46±0,11	3,97±0,45
5	0,40±0,01	5,46±0,22	1,80±0,07	0,38±0,02	47,29±4,23	55,33±2,14
6	0,07±0,00	-	0,20±0,01	0,12±0,00	0,45±0,08	0,81±0,30
7	0,07±0,00	-	0,12±0,01	0,11±0,00	0,29±0,01	0,57±0,13
8	0,07±0,00	-	0,20±0,01	-	0,20±0,01	0,47±0,12
9	0,07±0,00	-	0,19±0,02	-	0,25±0,02	0,51±0,18

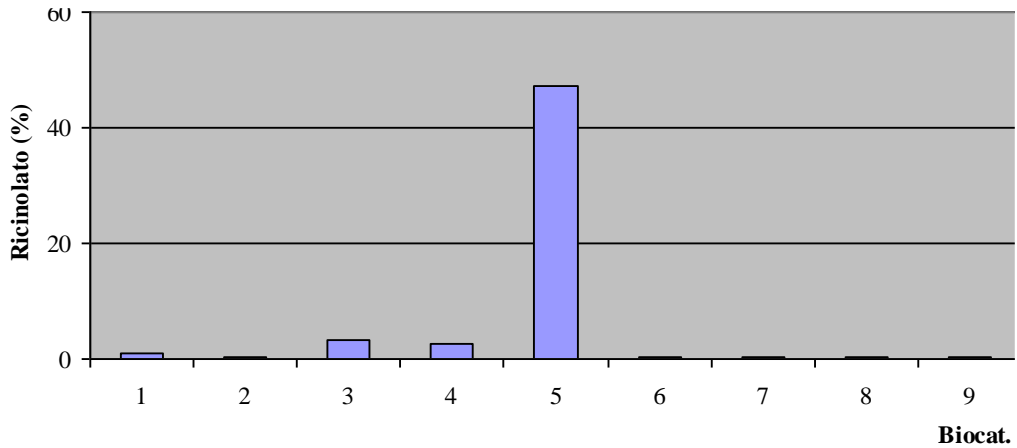
^asoma do teor dos ésteres metílicos; ^bmédia±desvio padrão (n=3);

(1) PPL; (2) Lípase de *Candida rugosa*; (3) Amano lípase de OS *cepacea*; (4) Amano lípase OS imobilizada em diatomácea; (5)

Novozym 435; (6) Lipozyme; (7) Lipozyme RM; (8) Látex de *Calotropis procera*; (9) Sementes de *Lens culinaris*.

Neste teste inicial foi possível verificar baixos valores de conversão do óleo de mamona pelas fontes enzimáticas testadas, exceto para a enzima 5 [Novozyme 435 (CAL B)] com formação de 55,33% de biodiesel (Figura 19). Entretanto, dados da literatura relatam rendimentos bem superiores quando se trata da Novozyme 435. Como mencionado anteriormente há relatos de obtenção de biodiesel com rendimentos superiores a 90% quando se trata desta enzima (HAIGH *et al.*, 2012.; KIAKALAIEH, *et al.*, 2013; LI, *et al.* 2012; SAMUKAWA, *et al.*, 2000).

Figura 22– Rendimentos de ricinolato de metila obtidos por transesterificação do óleo de mamona com fontes enzimáticas.

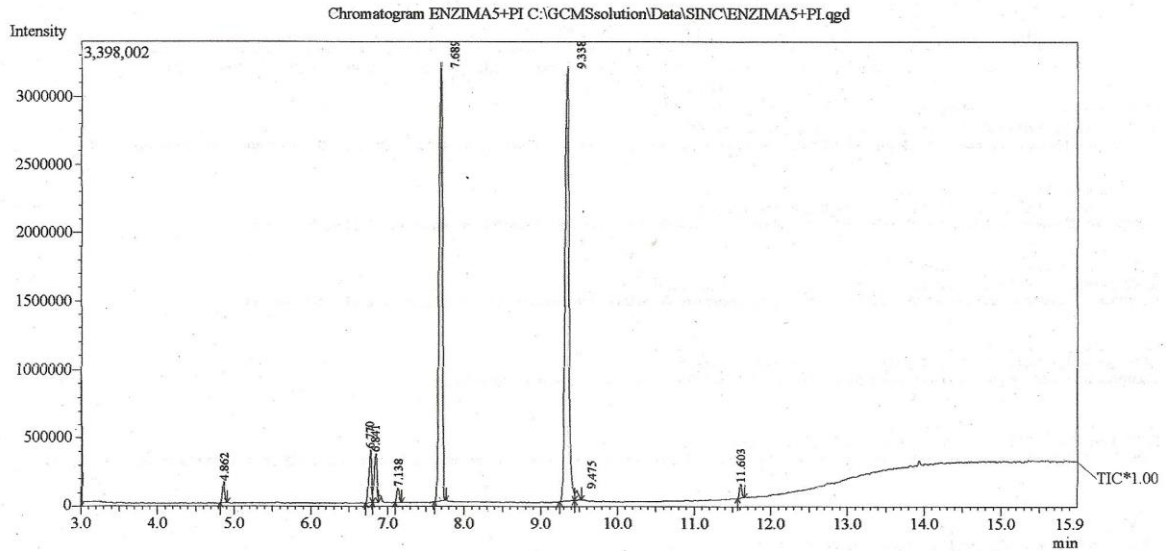


(1)PPL; (2) Lípase de *Candida rugosa*; (3) Amano lípase de *OS cepacea*; (4) Amano lípase OS imobilizada em diatomácea; (5) Novozym 435; (6) Lipozyme; (7) Lipozyme RM; (8) Látex de *Calotropis procera*; (9) Sementes de *Lens culinaris*.

O baixo rendimento reacional observado, mesmo para as enzimas comerciais, pode ser justificado pela elevada quantidade de metanol utilizada de uma única vez. Isso pode estar reduzindo a atividade das enzimas (geralmente, o metanol diminui a camada de hidratação da estrutura interna da enzima, desativando-a ou reduzindo sua atividade). Para contornar essa limitação alguns estudos têm sido realizados com a adição do álcool em etapas à reação de transesterificação catalisada por lípases. Como exemplo pode ser citado o estudo realizado por Salum, et al. (2010), que reportaram melhor desempenho da lípase do tipo B. cepacia, quando se adicionou o álcool em etapas nas reações de trans esterificação do óleo de soja. Os resultados obtidos foram de 77% quando o etanol foi adicionado em uma única etapa e 92 % quando adicionado ao meio reacional em três etapas. Com base nestas informações, os experimentos posteriores foram realizados com a adição do metanol em etapas para reduzir o impacto do álcool sobre a camada de hidratação da enzima.

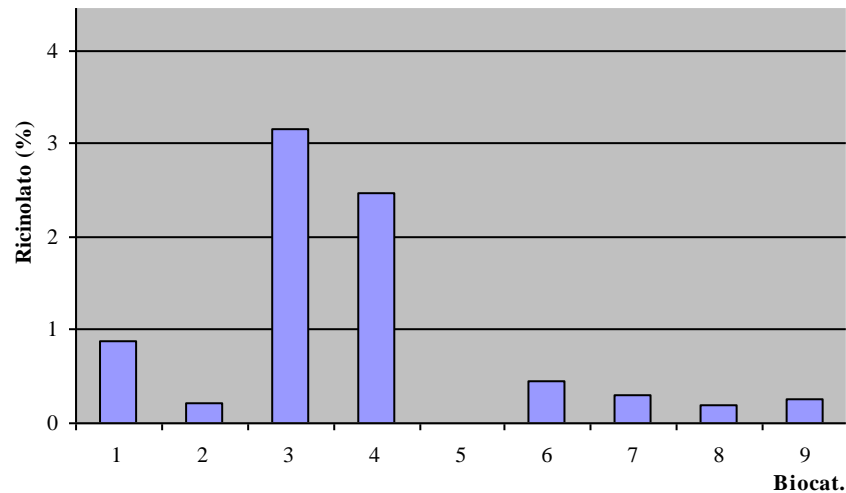
Também, optou-se em trabalhar apenas com a enzima que apresentou melhor resultado no teste inicial (Novozym 435). A Figura 23 mostra o cromatograma para análise do biodiesel de mamona obtido a partir da catalise por Novozym 435, em que o pico em 7,68 minutos é referente ao padrão interno.

Figura 23 – Cromatograma da reação de obtenção de biodiesel de mamona catalisada por Novozyme 435



Devido ao superior desempenho da lipase de número 5 (Novozym 435) e para uma melhor visualização do desempenho dos demais biocatalisadores foi construído um gráfico em que se exclui o rendimento obtido pela Novozym 435. Neste gráfico podemos verificar que os biocatalisadores que apresentaram segundo e terceiro melhor desempenho neste teste inicial foram as enzimas Amano lipase de OS cepacea (3) e Amano lipase OS imobilizada em diatomácea (4), respectivamente. Entretanto deve-se lembrar que os valores obtidos são extremamente baixos. E mais uma vez pode-se destacar a questão da inativação da enzima pelo excesso de metanol adicionado em uma única etapa.

Figura 24 – comparação do desempenho de algumas enzimas comerciais e os potenciais fontes enzimáticas frente a transesterificação do ácido ricinoléico.



(1)PPL; (2) Lípase de *Candida rugosa*; (3) Amano lípase de *OS cepacea*; (4) Amano lípase OS imobilizada em diatomácea; (5) -; (6) Lipozyme; (7) Lipozyme RM; (8) Látex de *Calotropis procera*; (9) Sementes de *Lens culinaris*.

Com relação às fontes enzimáticas alternativas, é importante destacar os rendimentos de conversão encontrados para o látex de *Calotropis procera* e semente de *Lens culinaris*, que apesar de apresentarem baixo desempenho, merecem atenção em estudos futuros. Pois de certo modo, se mostraram ativos frente ao substrato utilizado.

4.6. Otimização das reações de transesterificação enzimática

O biocatalisador que apresentou melhor desempenho na reação de transesterificação, (Novozym 435), foi selecionado para ser utilizado em novas reações, das quais visavam a otimização das condições reacionais da transesterificação. Dessa forma, foram estudados os efeitos da variação de alguns parâmetros relacionados à atividade enzimática, através do monitorando o rendimento reacional. Deve-se ressaltar que devido aos baixos rendimentos observados nos resultados do experimento de transesterificação enzimática (item 4.5, pág.66) os experimentos subsequentes foram realizados com a adição de metanol em etapas, para minimizar os danos causados pelo álcool a camada de hidratação da lipase. Os parâmetros có-solvente, razão molar álcool/óleo, quantidade de enzima, pH e solvente para recuperação do biocatalisador foram testados visando obter maiores rendimentos em biodiesel.

4.6.1 Co-solventes e adição de metanol em etapas.

Para minimizar o impacto do metanol sobre a camada de hidratação da enzima foram realizadas reações de transesterificação em meio a solventes orgânicos de baixa ou nenhuma polaridade e com a adição do metanol em etapas. Dados literais reportam que os solventes apolares podem proteger a camada de hidratação através da interação com a porção hidrofóbica da enzima. Deste modo, os solventes apolares (hidrofóbicos) formam uma proteção impedindo a interação dos solventes hidrofílicos com a camada de hidratação enzimática, evitando assim a sua desidratação e tornando-a mais estável e ativa (SALUM, *et al.* 2010; SHIMADA *et al.* 2002). Com base no que foi reportado, foram avaliados os seguintes có-solventes: éter de petróleo, acetona, DMSO, acetato de etila, dioxano e hexano. Os resultados encontram-se ilustrados na Tabela 14.

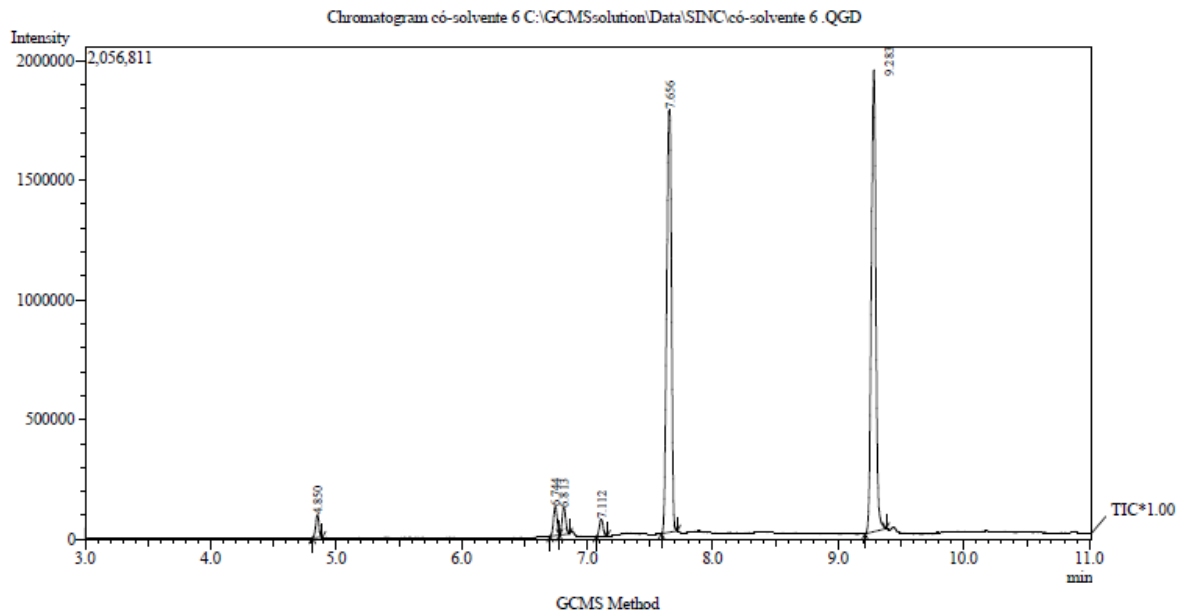
Tabela 14: Resultados da avaliação do melhor co-solvente

Có-solvente	Palmitato (%)^b	Linoleato (%)	Oleato (%)	Estearato (%)	Ricinoleato (%)	Biodiesel^a (%)
Hexano	1,65±0,21	22,74±1,06	6,62±0,29	1,67±0,13	39,09±1,89	71,78±0,01
Dioxano	0,22±0,00	1,71±0,05	0,58±0,01	0,21±0,01	14,61±0,27	17,33±0,00
Éter etílico	0,08±0,01	1,45±0,13	0,48±0,04	0,08±0,01	9,16±0,34	11,25±0,00
Acetato de etila	0,06±0,00	1,21±0,04	0,46±0,02	0,09±0,00	10,73±0,39	12,55±0,00
Acetona	0,16±0,02	0,04±0,15	0,78±0,35	0,24±0,01	0,27±1,39	3,42±0,01
DMSO	0,21±0,03	1,18±0,31	0,51±0,08	0,24±0,03	8,45±2,17	10,59±0,01

^asoma do teor dos ésteres metílicos; ^bmédia±desvio padrão (n=3);

Os resultados obtidos neste experimento mostraram que o hexano foi o melhor có-solvente para a reação de transesterificação do óleo de mamona utilizando a enzima Novozym 435. O cromatograma obtido para o experimento encontra-se ilustrado na Figura 25.

Figura 25 – Cromatograma da reação de obtenção de biodiesel de mamona catalisada por Novozyme 435(CAL-B) e utilizando Hexano como co-solvente.



Como já mencionado anteriormente, solventes de elevada polaridade podem ocasionar a inativação das lipases. Isso explica os baixos rendimentos obtidos para a primeira reação de transesterificação (item 4.5) em que se utilizou apenas metanol como solvente da reação. Com base nas informações obtidas na literatura, era de se esperar que os melhores resultados fossem obtidos quando utilizados nos meios reacionais solventes apolares e a adição do álcool (metanol) fosse realizada de modo gradativo. De fato, a enzima mostrou maior desempenho quando reação foi processada em meio à hexano e com a adição do metanol em três etapas. Alguns estudos reforçam o resultado obtido, pois também relatam bons rendimentos reacionais quando se utiliza esse solvente em reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipases (FALCÃO, 2011; RAMPIN, 2007).

4.6.2. Razão molar álcool/óleo

A quantidade de álcool no meio reacional é uma variável que influencia os rendimentos na reação de síntese do biodiesel. Se considerarmos a reação do triglicerídeo com o álcool, a razão estequiométrica dos reagentes é de 3 mols de álcool para 1 mol de triglicerídeo. Mas é comum encontrar relatos da utilização de razões maiores que 3:1 para garantir altos rendimentos reacionais. Entretanto, no caso de reações enzimáticas um excesso de álcool pode reduzir os rendimentos devido à desnaturação da enzima. Assim, faz-se

necessário o estudo da melhor proporção a ser utilizada nas reações em que se utiliza lípase como catalisadores. Deste modo, foram realizados cinco experimentos diferentes para determinar a melhor razão molar álcool: óleo. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Tabela 15 na qual pode-se observar que o melhor rendimento reacional foi obtido quando aplicado a razão molar álcool:óleo de 100:1.

Tabela 15 – Resultado do teste de avaliação da melhor razão álcool:óleo.

Razão álcool-óleo	Palmitato (%)^b	Linoleato (%)	Oleato (%)	Estearato (%)	Ricinoleato (%)	Biodiesel^a (%)
3:1	0,10±0,02	1,17±0,18	0,42±0,06	0,11±0,01	8,65±0,98	10,44±0,00
8:1	0,22±0,02	0,73±0,32	0,96±0,09	0,25±0,01	33,13±0,84	37,28±0,01
10:1	0,28±0,03	5,22±0,16	1,40±0,08	0,28±0,01	41,32±1,06	48,49±0,01
100:1	1,00±0,22	17,74±2,73	4,75±0,95	1,64±1,15	58,17±0,39	83,31±0,01
240:1	1,65±0,21	22,74±1,06	6,62±0,30	1,67±0,13	39,09±1,88	71,78±0,00

^asoma do teor dos ésteres metílicos; ^bmédia±desvio padrão (n=3);

Analisando a Tabela 15, de imediato, os dados obtidos podem parecer incoerentes com os dados mencionados anteriormente de que solventes muito polares podem ocasionar baixos rendimentos em reação de transesterificação devido a inativação enzimática. Assim, era de se esperar que razões molares de álcool:óleo muito altas resultasse em baixos rendimentos. Entretanto, o que se observou foi um alto rendimento para as razões 100:1 e 240:1. Isso pode ser explicado pelas adições de metanol em etapas que pode minimizar os danos causados pelo álcool sobre a enzima (SOUSA, 2010). Outro fato que deve ser relatado é o fato de o metanol utilizado não ser anidro, ou seja, neste caso o metanol pode conter pequenas quantidades de água, sendo que estudos têm mostrado que a presença de pequenas quantidades de água no meio reacional pode formar uma camada de hidratação na enzima, protegendo-a da desnaturação pelo solvente (SAAD, 2005).

4.6.3. Quantidade de enzima

Para avaliar o efeito da variação da quantidade de enzima em relação à quantidade de óleo, foram realizados cinco experimentos diferentes, em que as proporções de enzima em relação ao óleo foram de 5%, 10%, 15% e 30%.

Tabela 16 – Resultado do teste de avaliação da melhor quantidade de enzima

% Enzima (g/100 g de óleo)	Palmitato (%)^b	Linoleato (%)	Oleato (%)	Estearato (%)	Ricinoleato (%)	Biodiesel^a (%)
5	0,04±0,00	0,08±0,03	0,13±0,02	0,07±0,00	3,00±0,25	3,31±0,00
10	3,09±0,19	3,11±0,11	9,62±1,15	3,00±0,18	50,38±1,59	69,22±0,01
15	0,89±0,08	15,96±0,93	4,69±0,26	0,95±0,06	64,85±2,84	87,36±0,01
30	0,65±0,05	12,95±0,30	3,82±0,08	0,75±0,02	80,66±4,31	98,84±0,01

Com exceção do experimento em que se utilizou 5% (%m/m) de enzima, todos os resultados obtidos foram satisfatórios. Em todos os casos houve rendimentos de biodiesel superiores a 50%. De um modo geral os rendimentos reacionais aumentam com o aumento do catalisador.

4.6.4. Avaliação do pH

A atividade das lipases depende do pH do meio para expressar sua atividade catalítica. O pH ótimo das lipases é normalmente entre 6,0 e 8,0. Entretanto há enzimas que conseguem atuar em meio extremamente ácidos ou extremamente básicos como é o caso das enzimas de origem bacteriana. Para avaliar o efeito da variação do pH no desempenho de lipases em reações químicas são realizados experimentos em meio reacional tamponado. Deste modo, foram realizados quatro experimentos para avaliar o desempenho da enzima Novozym 435 frente a reação de transesterificação do óleo de mamona em tampão fosfato de sódio com diferentes valores de pH. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultado do teste de avaliação do pH.

pH	Palmitato (%)^b	Linoleato (%)	Oleato (%)	Estearato (%)	Ricinoleato (%)	Biodiesel^a (%)
5,2	1,08±0,18	16,23±1,67	4,76±0,41	1,11±0,13	46,37±1,25	69,56±0,10
6,1	1,47±0,09	20,43±0,78	5,96±0,25	1,51±0,09	48,26±0,75	77,63±0,01

7,2	1,40±0,10	19,92±1,39	6,97±1,18	1,46±0,14	54,89±1,50	84,65±0,10
7,8	1,45±0,22	21,19±1,42	5,98±0,27	1,50±0,17	64,07±1,40	94,20±0,01

a= soma do teor dos ésteres metílicos; bmédia±desvio padrão (n=3);

Com base nos resultados obtidos, observa-se que a enzima apresentou melhor desempenho quando empregado o tampão de pH 7,8. Tal resultado encontra-se de acordo com dados da literatura que relatam para esta enzima valores ótimos de pH em torno de 7 quando se utiliza tampão fosfato.

4.6.5. Solvente para recuperação do biocatalisador

A utilização de enzimas imobilizadas apresenta a vantagem da reutilização dela em outra reação. Entretanto, em reações de transesterificação com metanol existe a possibilidade da inativação da enzima, tanto durante como após a reação, mesmo quando se utiliza co-solventes e adição do álcool em etapas. Além disso, a enzima também pode ficar contaminada com resquícios de óleo e de glicerol, que é um subproduto da reação e para reutilizar estas enzimas é necessário remover todos os possíveis contaminantes. Assim, faz-se necessário averiguar qual o melhor tratamento de recuperação da enzima empregada após cada batelada de produção de biodiesel. Para isso, as enzimas são tratadas com solventes de lavagem e posteriormente empregadas em novas reações para averiguar o desempenho delas.

No presente estudo, as enzimas utilizadas anteriormente em reações de transesterificação foram separadas em três grupos, A, B e C. As enzimas do grupo “A” foram lavadas com hexano, as do grupo “B” com etanol e as do grupo “C” com acetona. Após o solvente ser evaporado, as enzimas foram reutilizadas em reações de transesterificação do óleo de mamona. O biodiesel obtido foi quantificado para avaliar o desempenho de cada enzima tratada e os resultados obtidos foram ilustrados na Tabela 18.

Tabela 18 – Resultado dos testes de avaliação do melhor solvente de recuperação da enzima

Enzima	Palmitato (%)	Linoleato (%)	Oleato (%)	Estearato (%)	Ricinoleato (%)	Biodiesel (%)
A	1,91±0,20	20,45±0,80	6,06±0,36	1,86±0,07	25,86±1,38	56,16±0,01
B	1,51±0,08	17,82±0,92	5,32±0,36	1,49±0,11	26,20±3,15	52,39±0,01
C	1,60±0,18	21,32±1,47	5,88±0,45	1,48±0,11	58,25±1,40	88,54±0,01

a = soma do teor dos ésteres metílicos; b média±desvio padrão (n=3);

Com base nos rendimentos obtidos, verifica-se que o melhor solvente para recuperação da enzima foi acetona. Como relatado anteriormente, os solventes muito polares podem remover a camada de hidratação das enzimas diminuindo a atividade enzimática. Por outro lado, o uso de solventes muito apolares na lavagem da enzima pode não ser eficiente devido a presença de contaminantes polares como o glicerol. Deste modo, os resultados obtidos na reutilização das enzimas lavadas com hexano, etanol e acetona foram coerentes. O melhor rendimento foi observado quando se reutiliza a enzima lavada com acetona, um solvente de polaridade intermediária.

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi desenvolvido um estudo sobre a obtenção de biodiesel via rota metílica, a partir do óleo de mamona, utilizando enzimas comerciais e/ou células íntegra como biocatalisadores através de reações de transesterificação. Os resultados obtidos foram satisfatórios, podendo-se concluir que: A análise da composição em ácidos graxos do óleo de mamona revelou a presença de cinco ácidos graxos: palmítico, linoléico, oléico, esteárico e ricinoléico, sendo 95% do óleo composto por ácido ricinoléico (ácido 12-hidróxi-9-octadecenóico). Com base neste resultado foram realizadas as sínteses desses ésteres metílicos com o objetivo de utilizá-los em curvas de calibração para quantificação dos ésteres obtidos por via enzimática.

Nas Reações de síntese dos padrões (palmítico, linoléico, oléico, esteárico e ricinoléico) foram obtidos bons rendimentos reacionais, ficando todos em torno de 50% de rendimento. A análise destes padrões inicialmente por CGEM e posteriormente por RMN H1 e RMN C13 permitiu a conclusão da identidade e pureza desses padrões. Com o objetivo de obter um método de análise dentro dos parâmetros aceitáveis foi realizado uma validação do

método cromatográfico, para análise do biodiesel de mamona por via metílica. A validação foi feita utilizando soluções multielementares dos padrões dos ésteres metílicos sintetizados, em intervalos de concentração de 50 a 1500 $\mu\text{g/mL}$ e utilizando o oleato de etila 500 $\mu\text{g/mL}$ como padrão interno. Para cada éster metílico foi obtida uma curva de calibração construída a partir de regressão linear. A análise dos dados permitiu a conclusão das seguintes equações de reta para cada éster metílico: Palmitato de metila - $y=0,0002x - 0,0062$; Linoleato de metila - $y=0,00003x + 0,0019$; Oleato de metila - $y=0,00009x - 0,0038$; Estearato de metila - $y=0,0002x - 0,0109$ e Ricinoleato de metila - $y=0,00007x - 0,0056$. Através do coeficiente de regressão linear (R) foi possível concluir que a resposta do detector é linear a concentração de ésteres metílicos no intervalo de concentração estudado. Pois para todas as curvas obtidas o valor de R foi aproximadamente igual a 1. Através do teste de recuperação foi possível concluir que o método cromatográfico adotado também é exato e que a matriz da amostra pouco influencia na determinação da análise. Neste teste foram utilizadas duas soluções multielementares dos ésteres em concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ na presença do óleo de mamona nas mesmas concentrações. A avaliação das possíveis fontes enzimáticas de origem vegetal foi realizada por teste da atividade hidrolítica, com base em dados da literatura. Das sete espécies vegetais testadas concluímos que os valores mais significantes foram apresentados pelas espécies *Calotropis procera* e *Lens culinaris*. Porém não foram encontrados dados literais para comparação de dados. Com base nos resultados obtidos foram selecionadas estas duas espécies para avaliar seu potencial biocatalítico frente a reação de transesterificação do óleo de mamona em paralelo as reações com enzimas comerciais. Nesta avaliação concluímos que as possíveis fontes vegetais apresentaram baixos percentuais de transesterificação. Entretanto, dados literais relatam que o teste de atividade hidrolítica não é definitivo quanto à possibilidade síntese. Deste modo, o teste de atividade hidrolítica é apenas um indício da presença de lípases no material testado em determinadas condições. Por esse motivo concluímos que novos testes, tais como capacidade sintética, extração enzimática e identificação das enzimas por eletroforese devem ser realizadas em trabalhos futuros.

Das enzimas comerciais utilizadas na transesterificação do óleo de mamona a que concluímos que a que apresentou melhor desempenho Novozima 453, propiciando um rendimento de 55,33% em biodiesel. Por este motivo a citada enzima foi selecionada para novas reações que visavam otimizar os seguintes parâmetros reacionais: pH, co-solvente, razão álcool:óleo, quantidade de enzima e solvente para recuperação da enzima. Pós a análise das reações foi possível concluir que as melhores condições reacionais para a reação enzimática de transesterificação do óleo de mamona, via rota metílica, foram: có-solvente:

hexano; razão metanol/óleo: 100/1; razão enzima/óleo 30g/100g, Melhor pH 7,8 e melhor solvente para recuperação da enzima: acetona. Como sugestão de trabalhos futuros pode-se sugerir uma cinética reacional utilizando todos os parâmetros otimizados no presente estudo. De um modo geral, pôde-se concluir que os resultados obtidos foram satisfatórios e corroboram com o desenvolvimento de pesquisas por fontes energéticas alternativas. Entretanto, o trabalho desenvolvido nesta dissertação não encerra as possibilidades de investigações adicionais sobre o tema estudado. Deste modo pode-se sugerir para trabalhos futuro a investigação da catalise enzimática para obtenção de biodiesel através de rota etílica, avaliar parâmetros tais como melhor temperatura, o efeito da água no meio reacional, número de ciclos reacionais após o tratamento de recuperação da enzima com acetona.

REFERÊNCIAS

- ATADASHI, I. M. et al. The effects of water on biodiesel production and refining technologies: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 3456–3470, jun. 2012.
- BARROS, M.A.L.; RAMOS, G.A. **Árvore do conhecimento da cultura da mamona para a agricultura familiar nordestina. - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/896237/arvore-do-conhecimento-da-cultura-da-mamona-para-a-agricultura-familiar-nordestina>>. Acesso em: 17 jul. 2022.
- BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties - a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15–29, mar. 2010.
- BERMAN, P.; NIZRI, S.; WIESMAN, Z. Castor oil biodiesel and its blends as alternative fuel. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2861–2866, jul. 2011.
- BORGES, A. D. ; PRIEB, R. P. Implicações Econômicas e Socioambientais do Biodiesel: Perspectivas da Inserção Gaúcha na Produção. **Artigo Submetido para apresentação oral no 79 XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**, 2008.
- BORGES, M. E.; DÍAZ, L. Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2839–2849, jun. 2012.
- BOZBAS, K. Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 2, p. 542–552, fev. 2008.
- BRAGA, P. R. S. et al. Structural effects of WO₃ incorporation on USY zeolite and application to free fatty acids esterification. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 147, n. 1, p. 142–148, jan. 2012.
- CASSIMIRO, D. M. J. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 452–458, 1 jan. 2013.

CHRISTOF, F. P. **Produção de Biodiesel a Partir do Óleo Residual de Fritura Comercial**. Dissertação—Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento – LACTEC e Instituto de Engenharia do Paraná – IEP, na área Desenvolvimento de Tecnologia.: [s.n.].

CLAYDEN, J.; AL, E. **Organic chemistry**. New York: Oxford University Press, 2004.

COSTA, R. C. Biodiesel production in Brazil: barriers and opportunities to produce biofuels in degraded lands. *Deforestation research progress*. Nova York: Nova Publishers.

Deforestation research progress. Nova York, v. 1, n. 5, p. 110–150, 2008.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776–792, 2009.

DE SOUSA, J. S. et al. Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1-4, p. 133–137, ago. 2010.

DELATORRE, A. B. et al. PRODUÇÃO DE BIODIESEL: CONSIDERAÇÕES SOBRE AS DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS E ROTAS TECNOLÓGICAS DE PROCESSOS. **Biológicas & Saúde**, v. 1, n. 1, 24 jun. 2011.

DEMIRBAS, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. **Energy Policy**, v. 35, n. 9, p. 4661–4670, set. 2007.

EMBRAPA. **Embrapa Algodão**. Disponível em:

<<http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/index.html>>. Acesso em: maio. 2012.

FACCIO, C. **Estudo da Produção de Ésteres Etilícos a partir da Alcoólise de Óleos Vegetais**. Dissertação. Dissertação—Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da URICampus de Erechim-RS-Brasil. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Rio Grande do Sul, Brasil: [s.n.].

FALCÃO, P. W. C. **Produção de biodiesel em meio supercrítico**. Tese—Ciências em Engenharia Química, Instituto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COOPPE) da Universidade Federal do Rio de Janeiro: [s.n.].

FARIA, L. A. **Hidrólise do Óleo de Amêndoa da Macaúba com Lípase Extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* Produzida por Fermentação em Substrato Líquido**.

Dissertação—Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais: [s.n.].

FROEHNER, S.; LEITHOLD, J.; LIMA JÚNIOR, L. F. Transesterificação de óleos vegetais: caracterização por cromatografia em camada delgada e densidade. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2016–2019, 2007.

GHESTI, G. F. et al. Produção de biodiesel via transesterificação etílica com zeólitas básicas. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 119–123, 2012.

GUARIEIRO, L. L. N.; SANTOS, A. P. B.; PINTO, A. C. Biodiesel: Uma Alternativa de Combustível Limpo. **Química Nova na Escola**, v. 31, n. 1, p. 58–62, 2009.

HAIGH, K. F. et al. Kinetics of the Pre-Treatment of Used Cooking Oil Using Novozyme 435 for Biodiesel Production. **Procedia Engineering**, v. 42, p. 1106–1113, 2012.

HAMA, S. et al. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 3, p. 273–278, jun. 2007.

HELWANI, Z. et al. Solid heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides with methanol: A review. **Applied Catalysis A: General**, v. 363, n. 1, p. 1–10, 1 jul. 2009.

KUMAR TIWARI, A.; KUMAR, A.; RAHEMAN, H. Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 8, p. 569–575, ago. 2007.

LI, J. et al. Research Development on Lipase-catalyzed Biodiesel. **Energy Procedia**, v. 16, p. 1014–1021, 2012.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. DA. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596–1608, 2009.

LOPES, J. S. **Análise de Culturas Energéticas Oleaginosas para a Produção de Biodiesel no Território de Irecê no Semi-Árido Baiano**. Dissertação—Regulação da Indústria de Energia da Universidade de Salvador: [s.n.].

MEDEIROS, G. A. et al. Enzymes and Ionic Liquids: a Promising Combination Towards a

Clean Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, 2013.

MILINSK, M. C. **Análise Comparativa entre Oito Métodos de Esterificação na Determinação Quantitativa de Ácidos Graxos em Óleo Vegetal**. Tese—Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, [s.n.].

MOREIRA, A. B. R. **Seleção de Fonte de Lipase para Síntese de Biodiesel por Trasterificação Enzimática do Óleo de Palma com Etanol**. Dissertação—Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo: [s.n.].

NEVES, L. P. **Boletim Mensal de Biodiesel, Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Bicomcombustíveis, Superintendência de Refino e Processamento de Gás Natural-SRP, 2012**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel/if/bmb/2012/boletim-biodiesel-02.pdf>>. Acesso em: jan. 2013.

NOGUEIRA, N. S. **Análise Delphi e SWOT das Matérias-primas de Produção de Biodiesel: Soja, Mamona e Microalgas**. Dissertação—Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro: [s.n.].

OLIVEIRA, F.; SUAREZ, P.; DOS SANTOS, W. **Biodiesel: Possibilidades e Desafios QUÍMICA NOVA NA ESCOLA N° 28, MAIO 2008 QUÍMICA E SOCIEDADE**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://zeus.qui.ufmg.br/~qgeral/downloads/material/biodiesel.pdf>>. Acesso em: nov. 2012.

PALOCCI, C. et al. Lipolytic isoenzymes from Euphorbia latex. **Plant Science**, v. 165, n. 3, p. 577–582, set. 2003.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, fev. 2006.

PAULA YURKANIS BRUICE. **Química orgânica : Paula Yurkanis Bruice. Traduzido por Debora Omena Futuro ... [et al.]**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

PAULA, A. V. et al. Comparação do desempenho da lipase de candida rugosa imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias.

Química Nova, v. 31, n. 1, p. 35–40, 2008.

PINA, M. et al. De Nouvelles Voies de Valorisation pour Redynamiser la Filière Ricin au Brésil. **periódico Cahiers d'études et de recherches francophones / Agricultures**, v. 14, n. 1, p. 169–171, 2005.

POLIZELLI, P. P. et al. A New Lipase Isolated from Oleaginous Seeds from *Pachira aquatica* (Bombacaceae). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, n. 3, p. 233–242, 22 fev. 2008.

RAMOS, M. J. et al. Transesterification of sunflower oil over zeolites using different metal loading: A case of leaching and agglomeration studies. **Applied Catalysis A: General**, v. 346, n. 1-2, p. 79–85, ago. 2008.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e Gorduras: Aplicações e Implicações. **Revista Analytica**, v. 25, n. 1, p. 67–67, 2007.

RICHETTI, A. **Esterificação Enzimática de Palmitato de 2- etilexila em Sistema Livre de Solvente. Dissertação (mestrado)**,. Dissertação—Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro: [s.n.].

SAAD, E. B. **Etanolise do Óleo de Milho Empregando Catalisadores Alcalinos e Enzimáticos. Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração: Química Orgânica, Universidade Federal do Paraná, 2005. 84** SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE P.; BAREA B.; Dissertação—Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração: Química Orgânica, Universidade Federal do Paraná: [s.n.].

SALUM, T. F. C. et al. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1348–1354, ago. 2010.

SAMUKAWA, T. et al. Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 2, p. 180–183, jan. 2000.

SANCHEZ, F.; VASUDEVAN, P. T. Enzyme Catalyzed Production of Biodiesel From Olive Oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 135, n. 1, p. 1–14, 2006.

SARMA, A. K.; CHOUHAN, A. P. S. Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4378–4399, 1 dez. 2011.

SEBRAE. **Cartilha do biodiesel**. Disponível em: <<http://www.biblioteca.sebrae.com.br>>. Acesso em: 20 jan. 2012.

SHIMADA, Y. et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 133–142, jun. 2002.

SILVA, , A. P.; ALVES, M. C. C. **Como Iniciar a Validação de Métodos Analíticos**. Rede Metrológica do Estado de São Paulo (REMESP). **Anais...Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia (ENQUALAB)**.: 2006.

SILVA, J. A. C. **Obtenção de um Lubrificante Biodegradável a partir de Ésteres do Biodiesel da Mamona via Catálise Enzimática e Estudos de Estabilidade Oxidativa e Térmica**. Tese—Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro: [s.n.].

SKOOG, D. A.; AL, E. **Fundamentos de química de analítica**. Madrid, Espanha: Thomson, 2005.

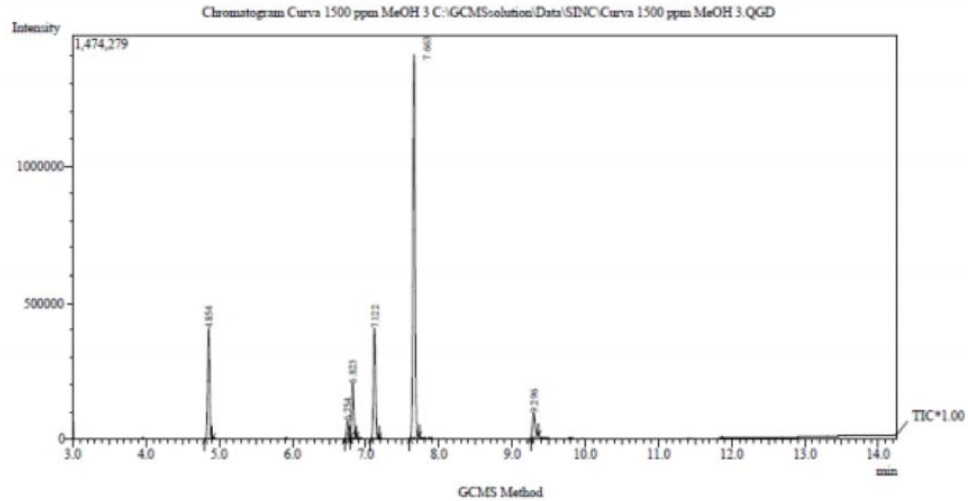
SOUZA, L. T. A. **Síntese Enzimática do Biodiesel de *Jatropha curcas* pela Rota Etílica**. Dissertação—Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, área de concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos. Lorena: [s.n.].

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. 70º aniversário do biodiesel em 2007: evolução histórica e situação atual no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2068–2071, 2007.

TALEBIAN-KIAKALAIEH, A.; AMIN, N. A. S.; MAZAHERI, H. A review on novel processes of biodiesel production fro

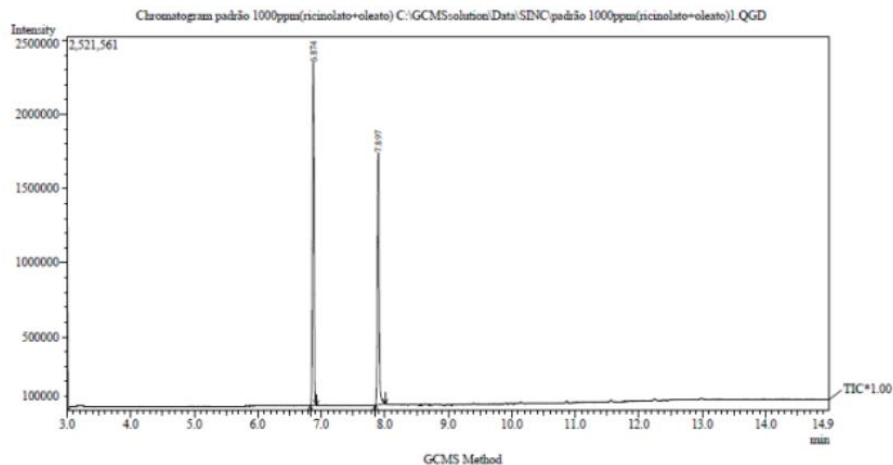
ANEXO A – CROMATOGRAMS E ESPECTROS

Figura 26 – Cromatograma dos padrões cromatográficos analisados na forma de solução multielementar 1500ppm



Pico	Tempo de retenção	Composto
1	4,807	Palmitato de metila
2	6,717	Linoleato de metila
3	6,787	Oleato de metila
4	7,067	Estearato de metila
5	7,603	Oleato de etila (PI)
6	9,250	Ricinoleato de metila

Figura 27 – Cromatograma do padrão cromatográfico ricinolato de metila analisado juntamente com padrão interno em solução 1000ppm.



Pico	Tempo de retenção	Composto
1	6,825	Oleato de etila(PI)
2	7,850	Ricinolato de metila

Figura 28 – Espectro de RMN H1 (300 MHz, CDCl3) do Estearato de Metila.

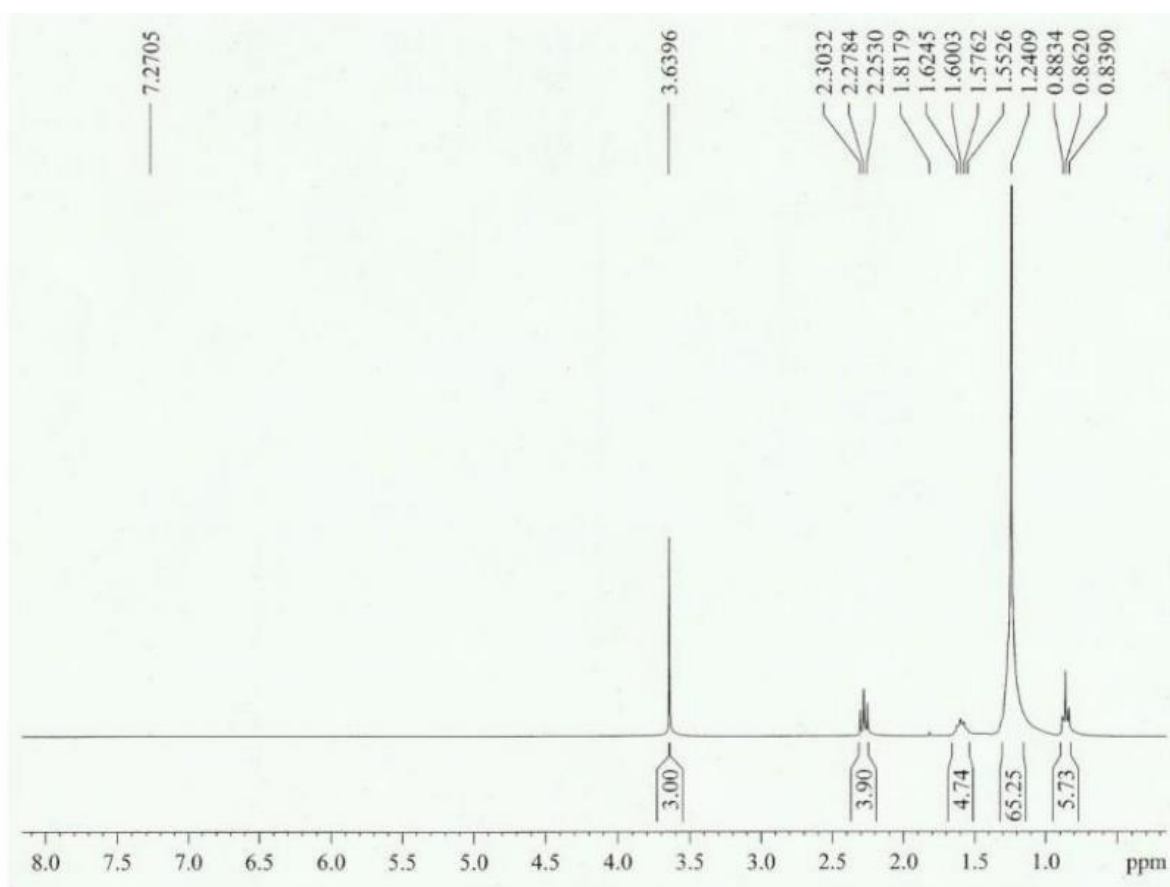


Figura 29 – Espectro de RMN C13 BB (75 MHz, CDC13) do Estearato de Metila.

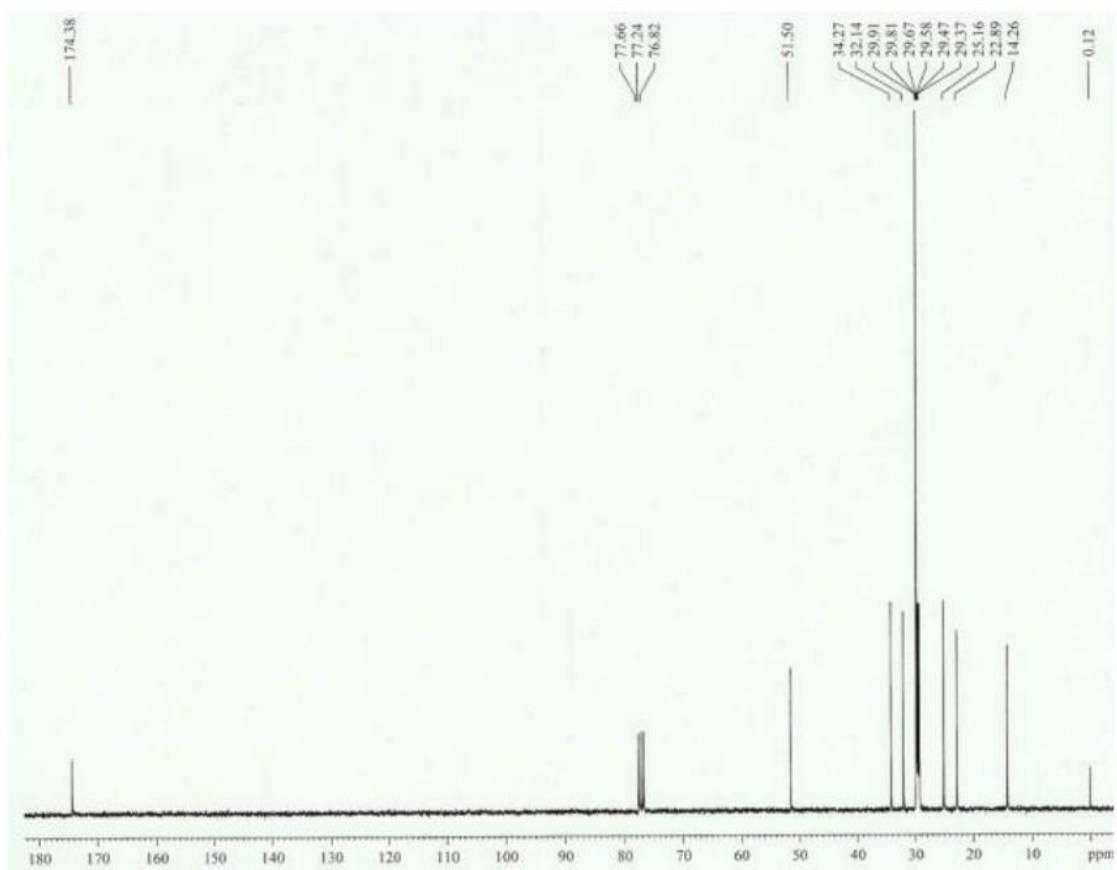


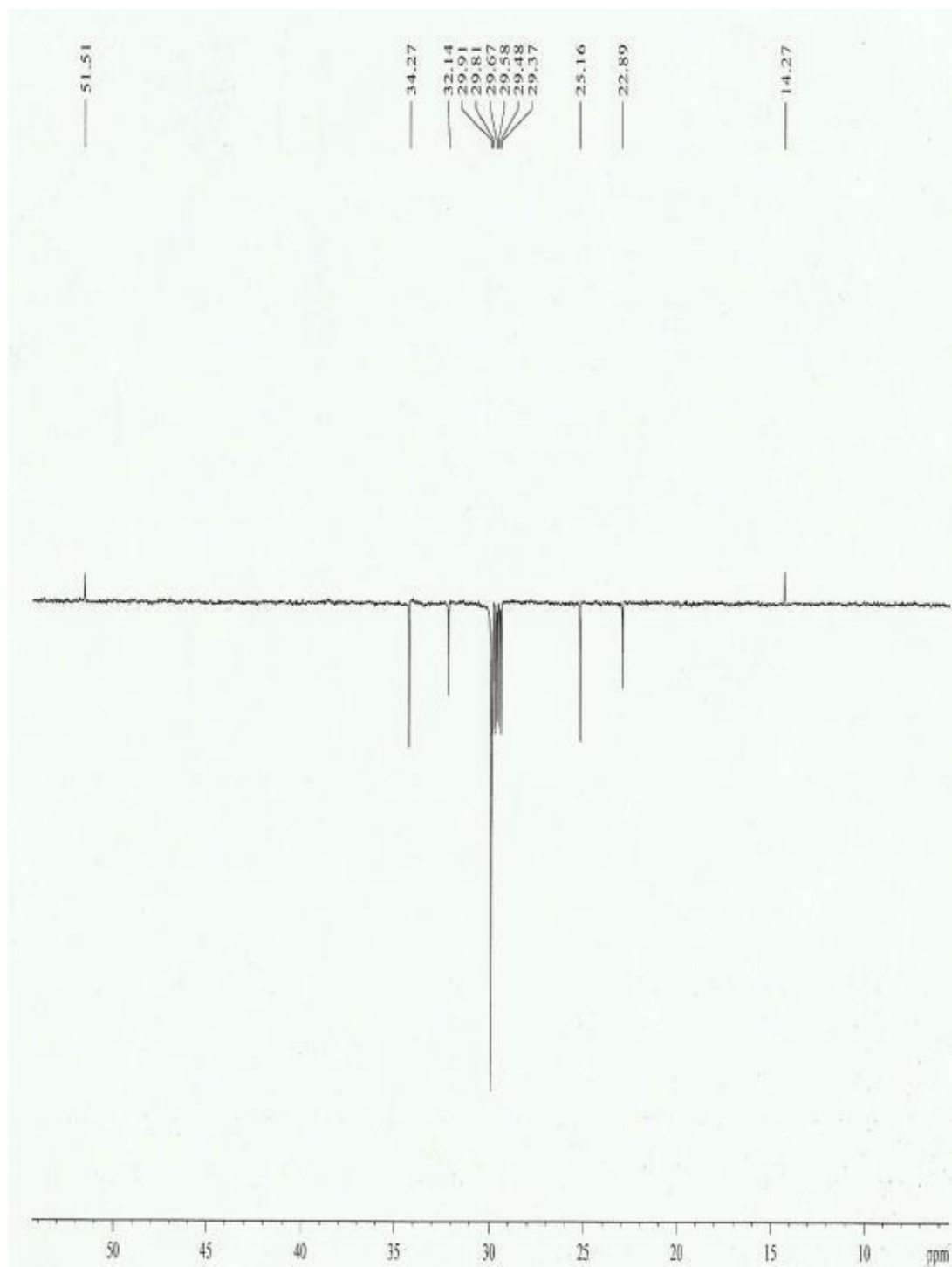
Figura 30 – Espectro de RMN C 13 DEPT 135° (75 MHz, CDCl₃) do Estearato de Metila

Figura 31 – Espectro de RMN H1 (300 MHz, CDCl3) do Linoleato de Metila

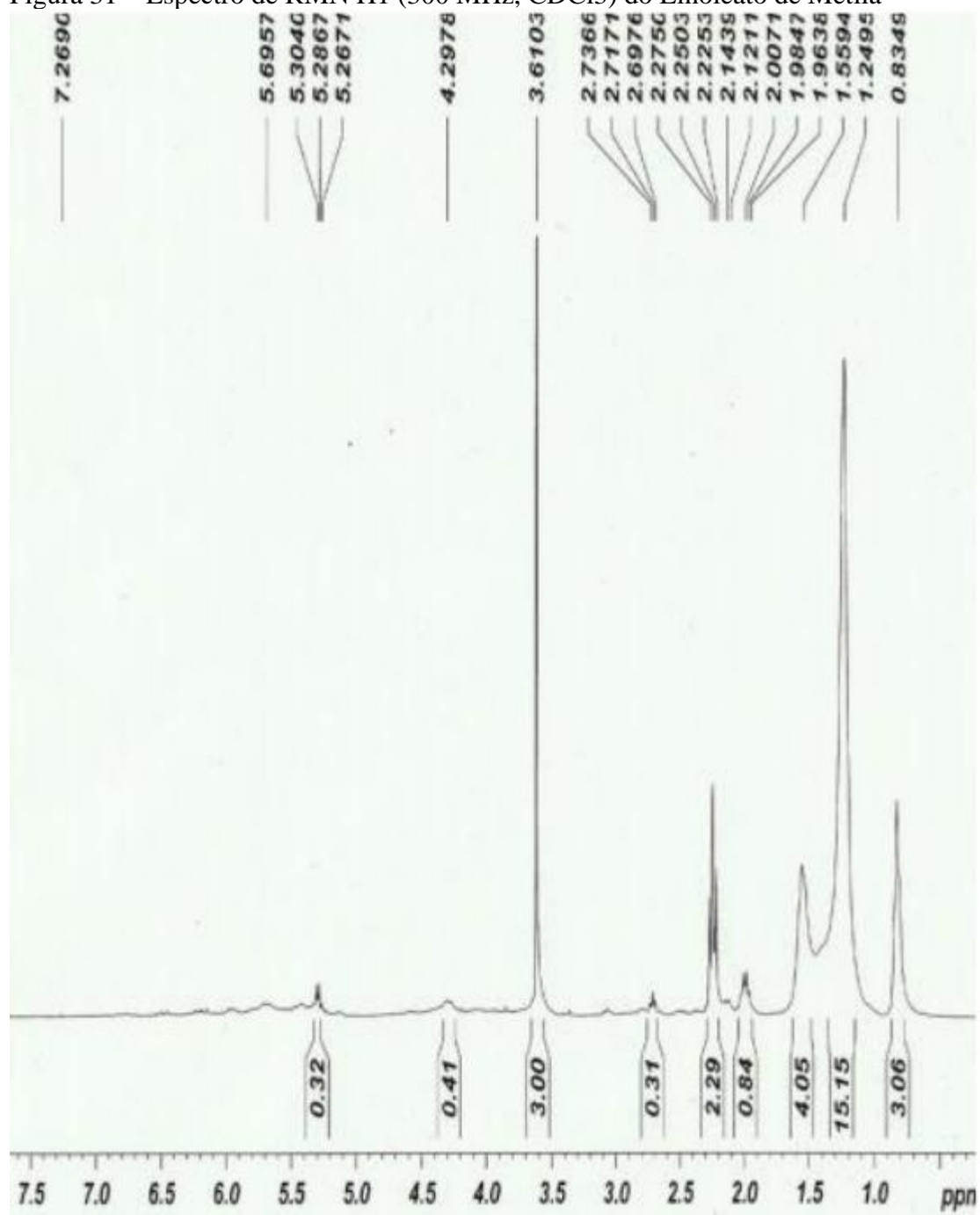


Figura 32 – Espectro de RMN C 13 BB (75 MHz, CDCl3) do Linoleato de Metila

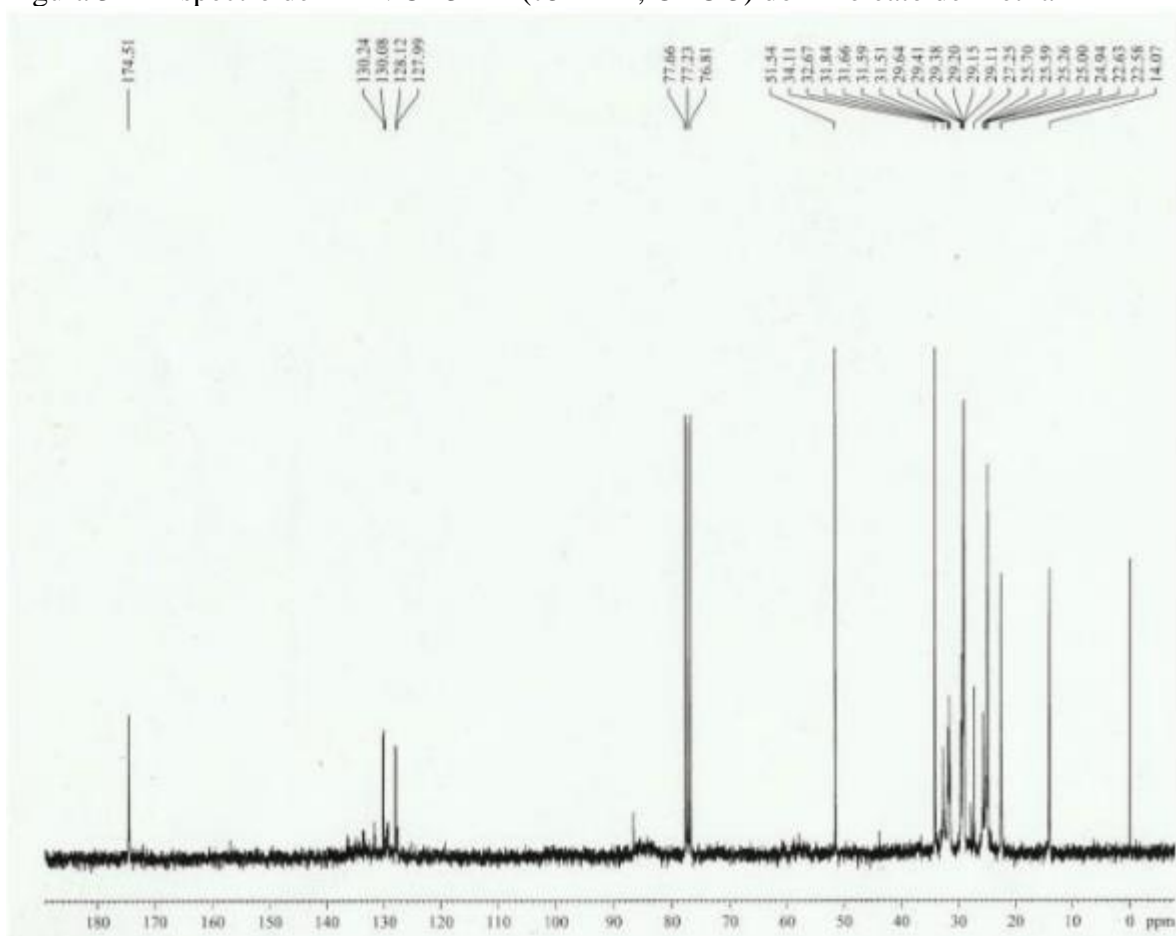


Figura 33 – Espectro de RMN C13 DEPT 135° (75 MHz, CDCl3) do Linoleato de Metila

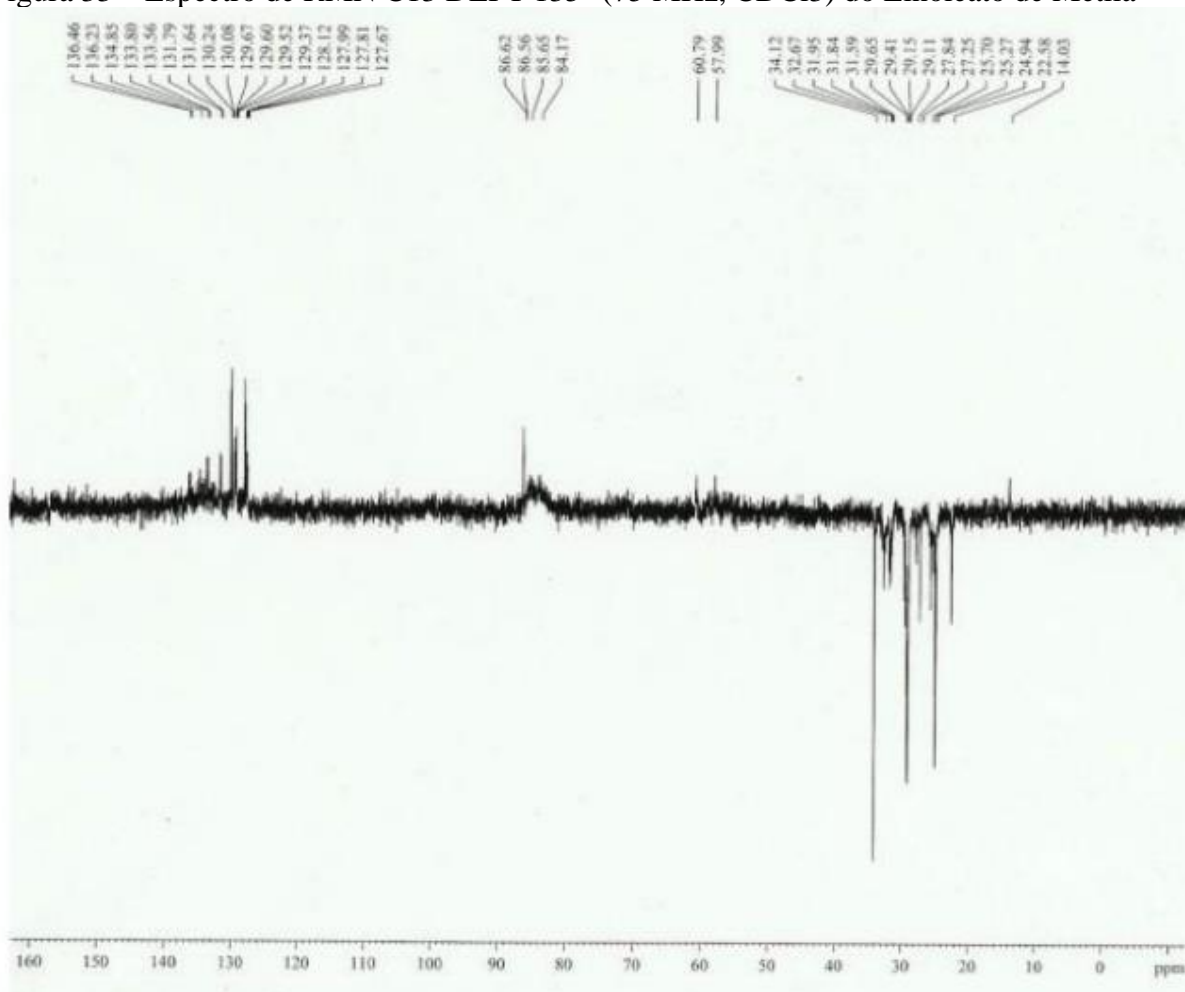


Figura 34 –Espectro de RMN H1 (300 MHz, CDCl3) do Oleato de Metila

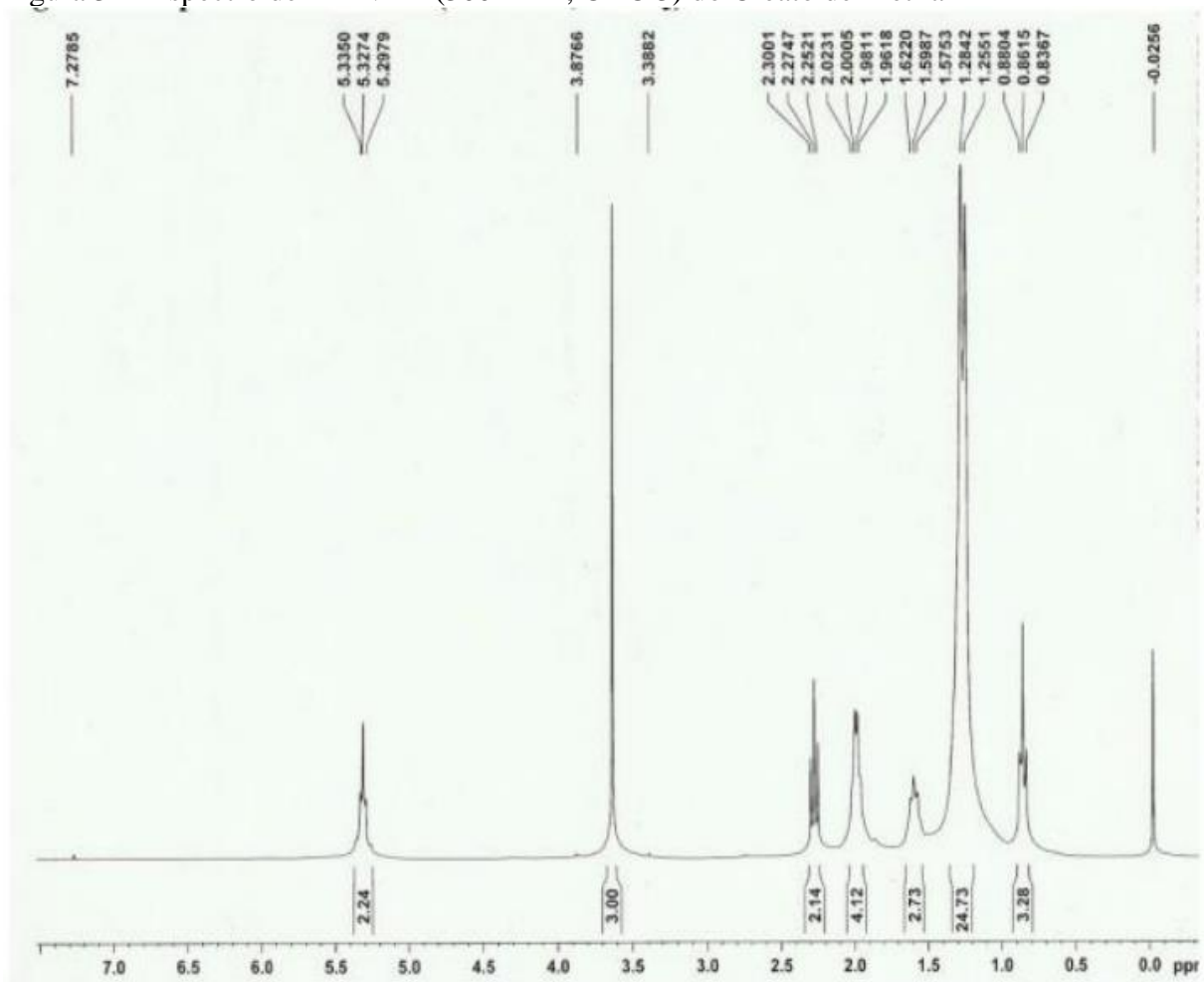


Figura 35 – Espectro de RMN C 13 BB (75 MHz, CDCl3) do Oleato de Metila

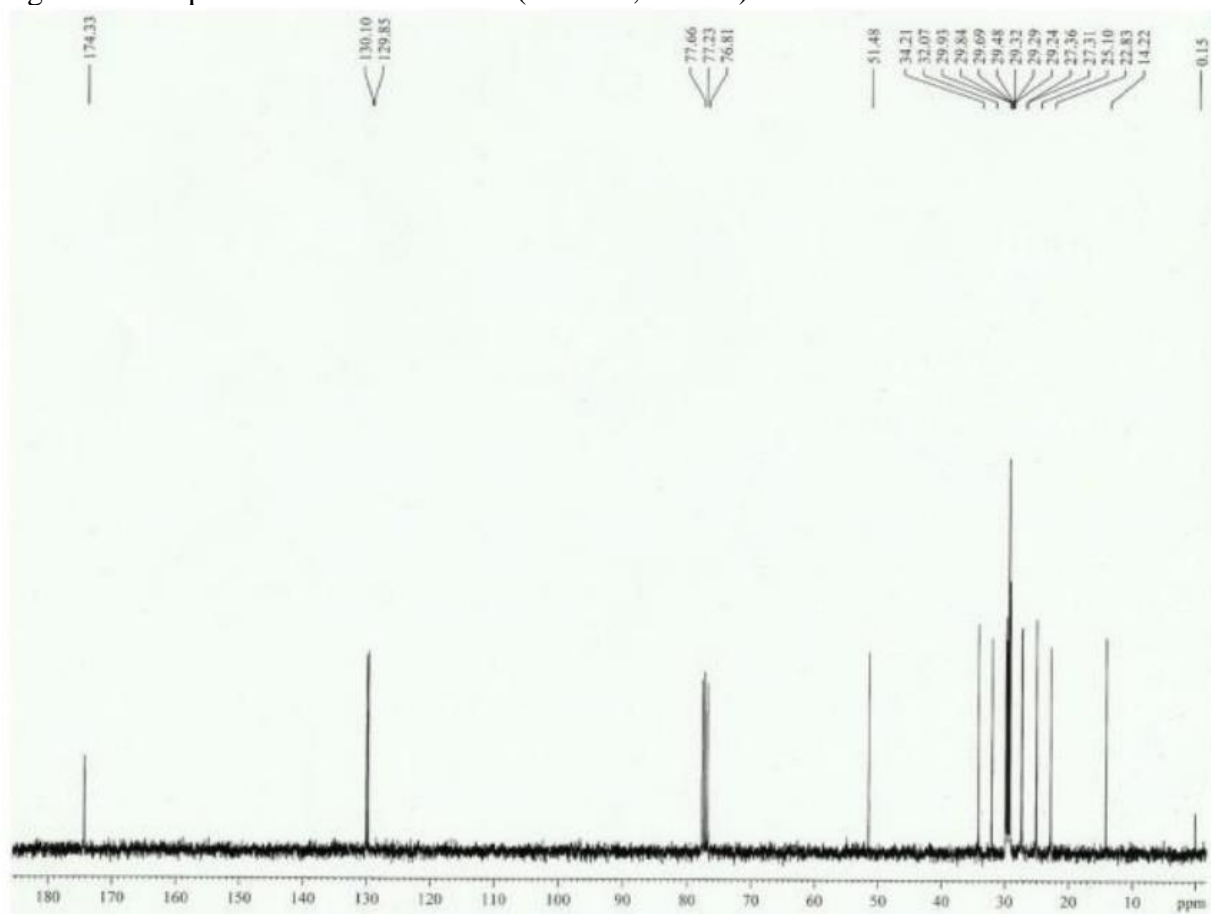


Figura 36 – Espectro de RMN C13 DEPT 135° (75 MHz, CDCl3) do Oleato de Metila

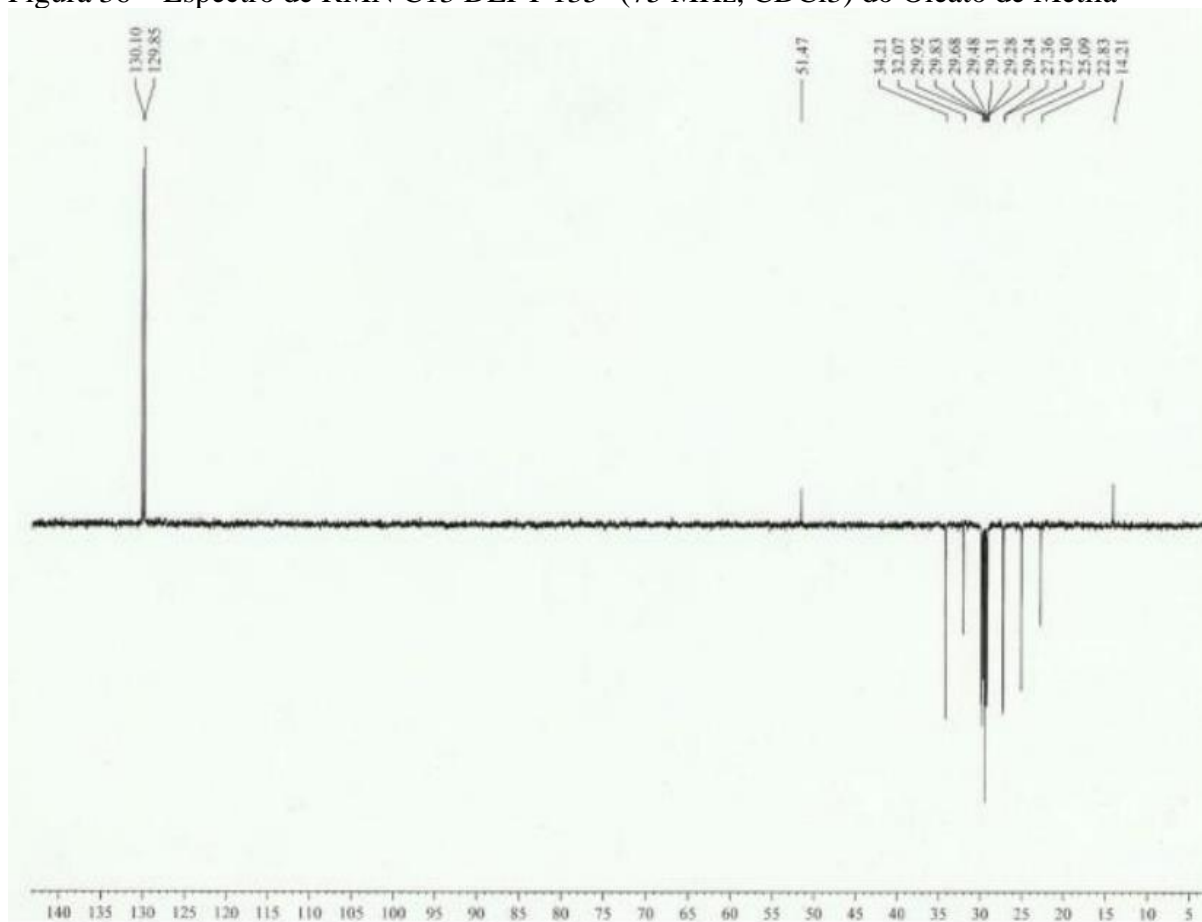


Figura 37 – Espectro de RMN H1 (300 MHz, CDCl3) do Palmitato de Metila

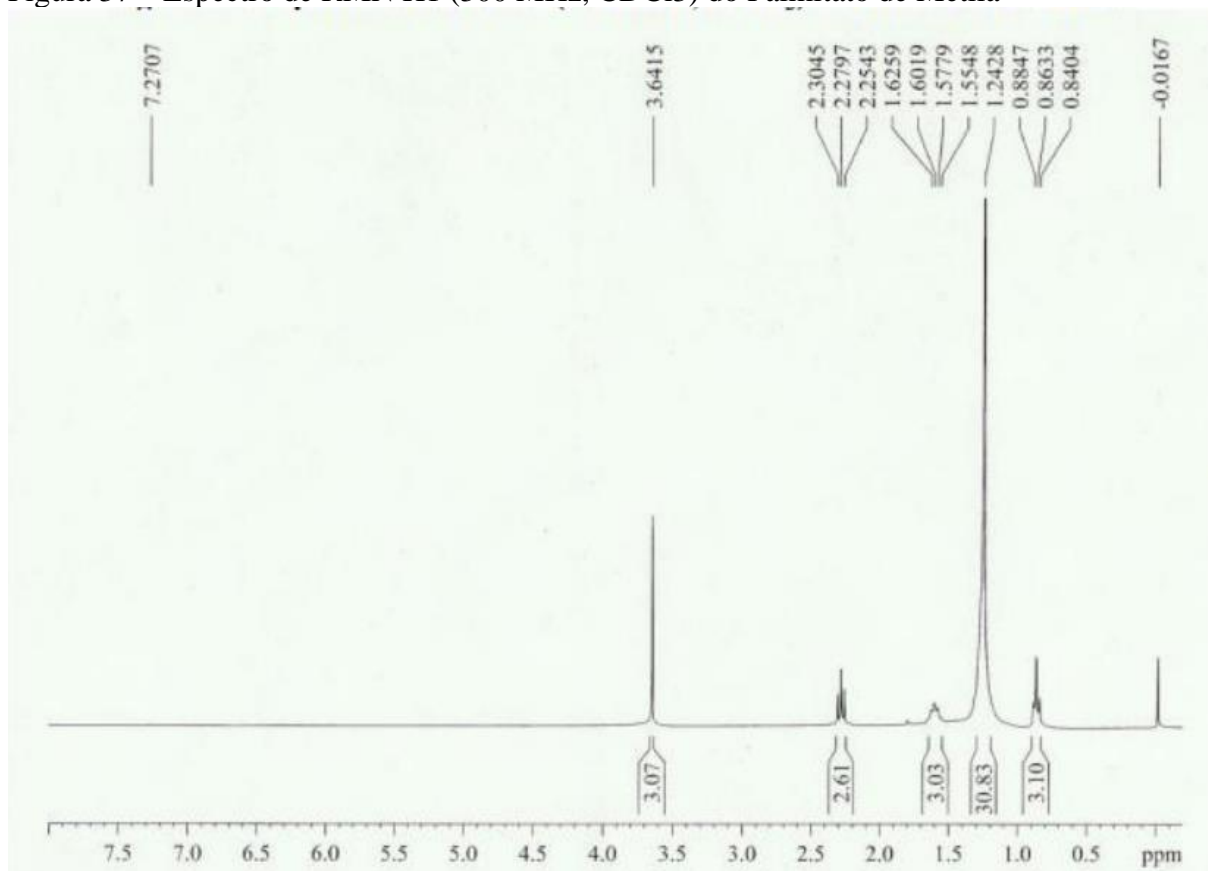


Figura 38 – Espectro de RMN C 13 BB (75 MHz, CDCl3) do Palmitato de Metila

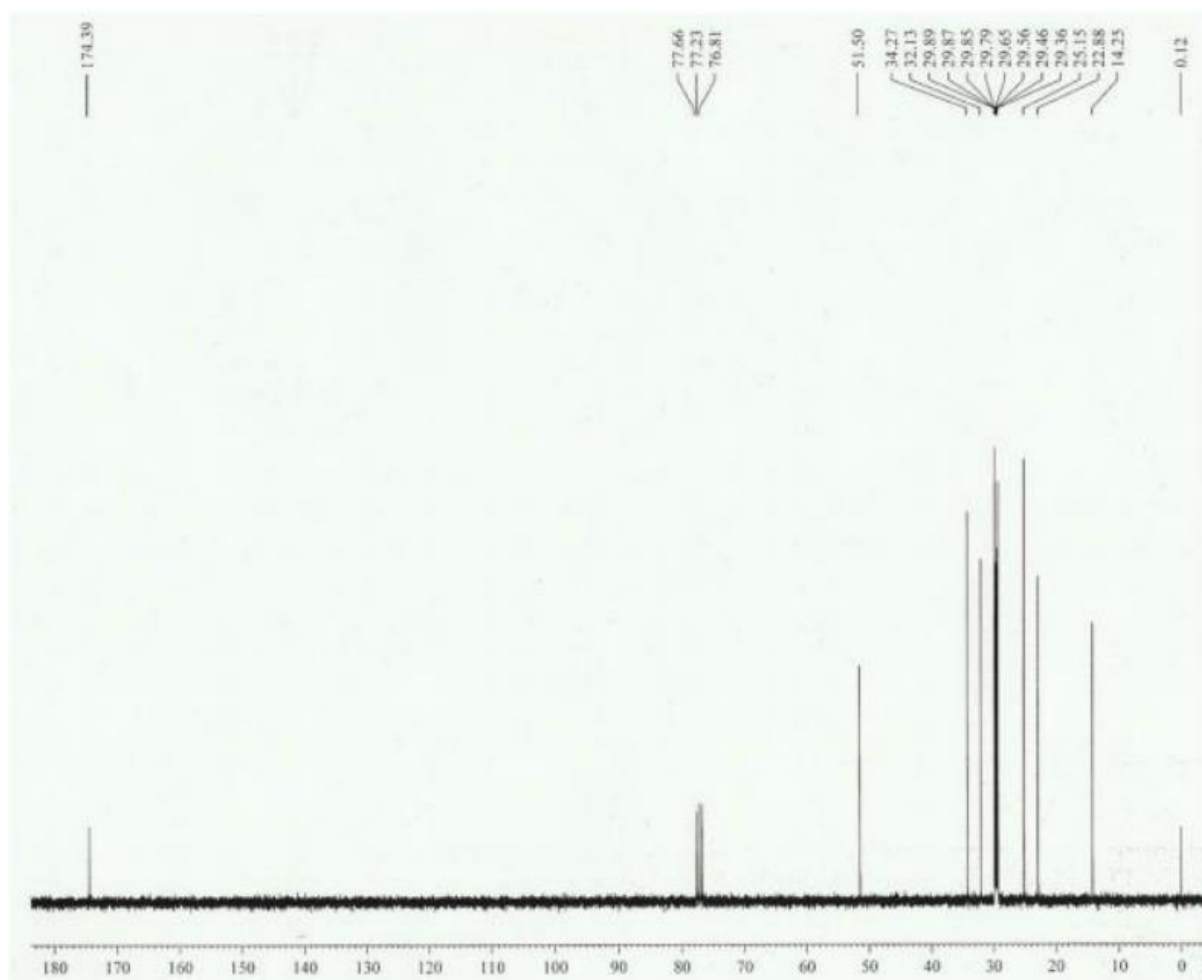


Figura 39 – Espectro de RMN C13 DEPT 135° (75 MHz, CDCl3) do Palmitato de Metila

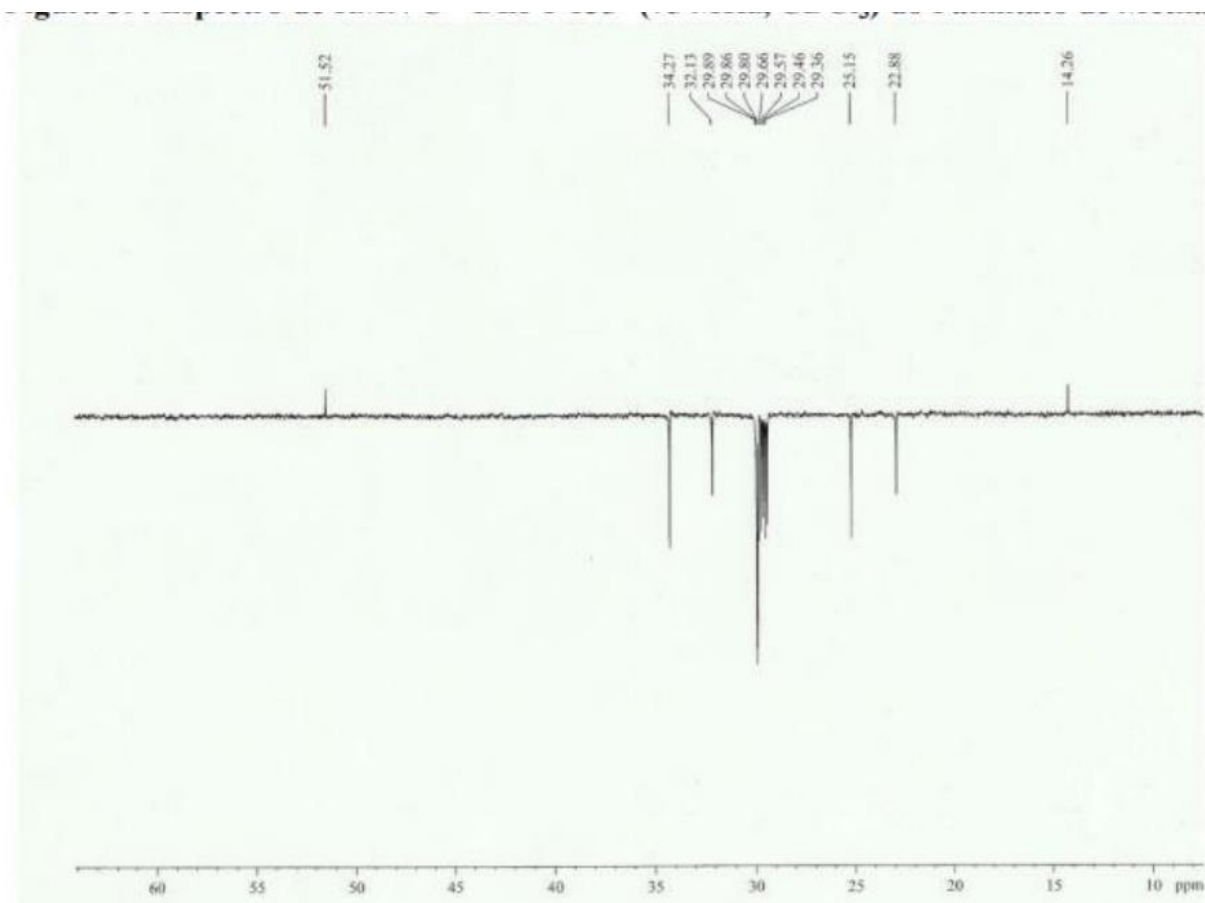


Figura 40 – Espectro de RMN H1 (300 MHz, CDC13) do Ricinolato de Metila

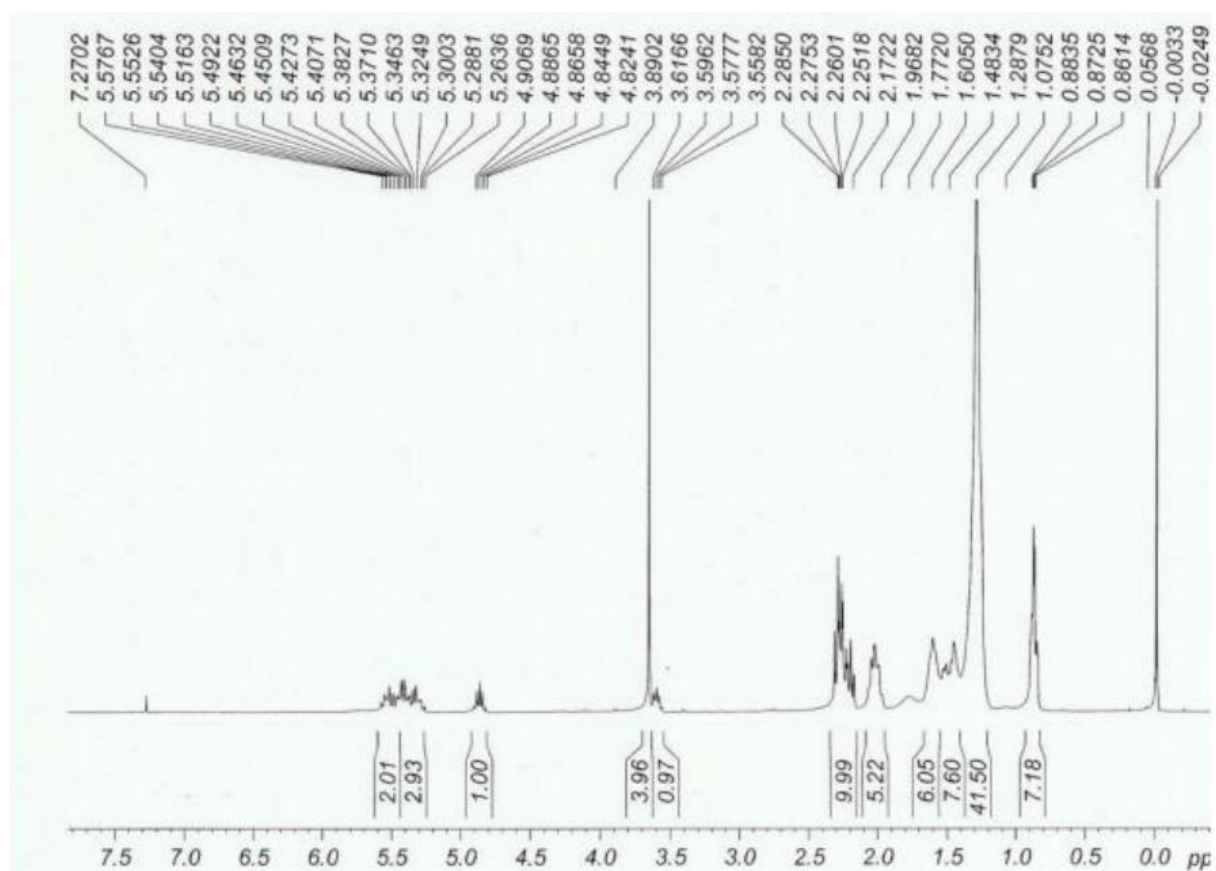


Figura 41 – Espectro de RMN C 13 BB (75 MHz, CDCl3) do Ricinolato de Metila

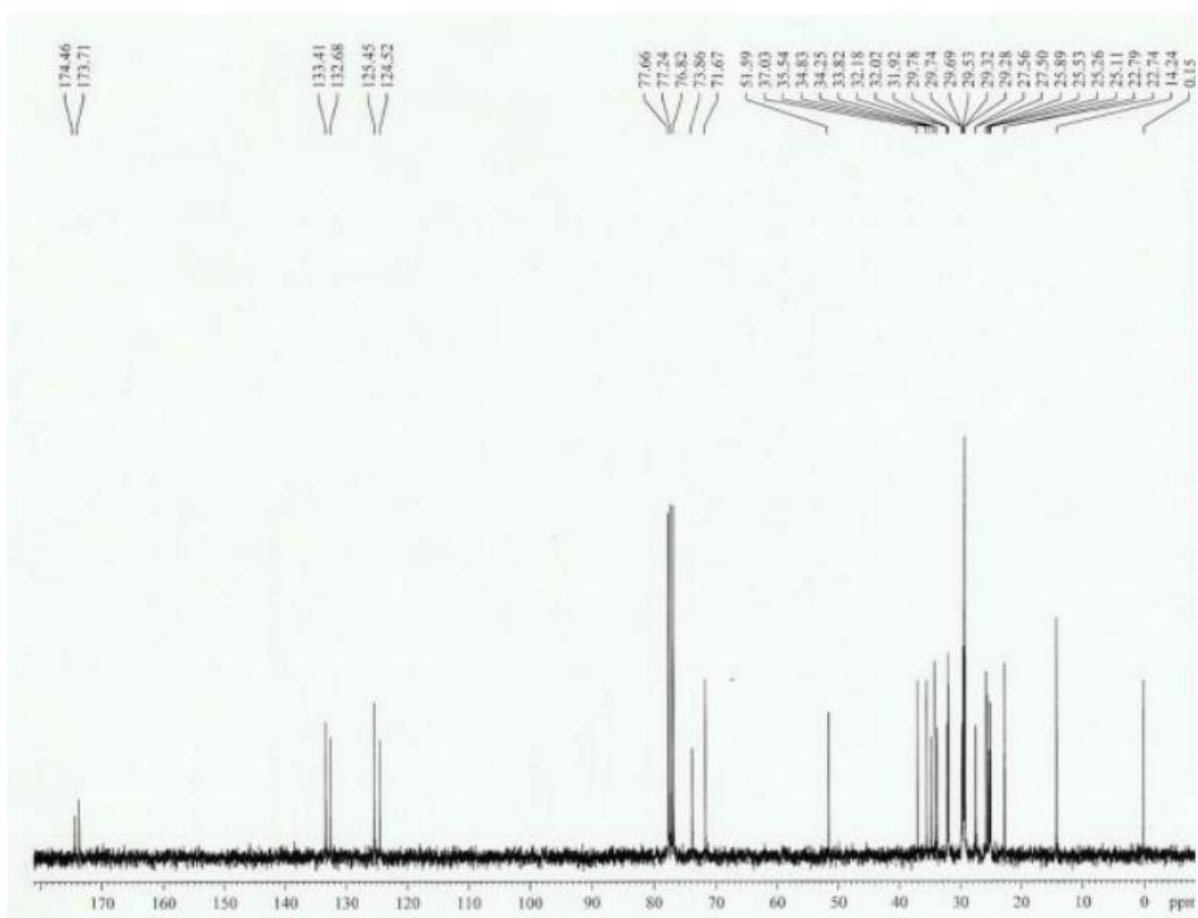


Figura 42 – Espectro de RMN C13 DEPT 135° (75 MHz, CDCl3) do Ricinolato de Metila

