

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES  
CAMPUS DE ERECHIM  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ARIANA SECCO POPIOLSKI**

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE  
BIODIESEL EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE  
ULTRASSOM**

**ERECHIM, RS – BRASIL  
JULHO DE 2011**

ARIANA SECCO POPIOLSKI

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE  
BIODIESEL EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE  
ULTRASSOM**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação *Stricto-Sensu*, em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito necessário à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

Orientadores: José Vladimir de Oliveira  
Débora de Oliveira

Erechim  
Julho/2011

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

# **OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM**

Ariana Secco Popiolski

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Débora de Oliveira, D. Sc.  
Orientador

---

José Vladimir de Oliveira, D. Sc.  
Orientador

---

Wagner Luis Priamo, D. Sc.  
IFET/Sertão

---

Clarissa Dalla Rosa, D. Sc.  
URI-Campus de Erechim

Erechim, 04 de julho de 2011

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais Sergio Popiolski e Cecilia Secco Popiolski, aos meus irmãos Ariel e Aline e a você Jailson, por toda ajuda, dedicação e apoio incondicional, pelas incontáveis vezes que sacrificaram os seus sonhos para que eu pudesse seguir os meus, pelas preocupações, angústias e dificuldades, que passaram por minha causa, por todo amor, carinho e incentivo dedicado a mim, dedico-lhes esta conquista, não só minha, mas nossa.*

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter segurado a minha mão e por ter guiado os meus passos, sempre, independente da situação em que eu me encontrava.

Agradeço o meu pai Sergio Popiolski e a minha maravilhosa mãe Cecilia Secco Popiolski, um exemplo de vida, de coragem, de persistência, de fé, um modelo a ser seguido, uma heroína, enfim, um exemplo de amor a vida. Aos meus queridos irmãos Ariel e Aline, a minha cunhada Andreia, ao Jailson, sempre companheiro e amigo, aos maravilhosos anjinhos (“Nêne”, Jaci e Emili) que iluminam a minha vida, enfim, a toda minha família que sempre esteve totalmente presente na minha vida, que me ensinaram, através da frase “... tem que ver se vale à pena...”, a lutar e refletir sobre a vida. Sempre tinham uma palavra de conforto que me permitia seguir em frente, e principalmente de cabeça erguida. Nunca mediram esforços para me ajudar e confortar-me em momentos de dificuldades. Sempre me incentivaram, me apoiaram e vibraram a cada conquista. Não posso deixar de agradecê-los, pela amizade, pela força, pela paciência em todas as vezes que precisei da ajuda de vocês e por terem me permitido poder contar com vocês, sempre.

Agradeço aos meus orientadores, Débora de Oliveira e José Vladimir de Oliveira, pela disponibilidade de ensinar, pela paciência e dedicação, e principalmente pela amizade.

A professora Helen Treichel pela ajuda e dedicação na realização deste trabalho.

Agradeço a Luciane Batistella pelas vezes que a acompanhei em seus experimentos tomando como partida o início do meu trabalho.

Em especial agradeço a Claudia Mara Trentin pela disponibilidade de estar sempre pronta para me ajudar, enfim, por todo o auxílio.

Enfim, a todos os colegas do Laboratório, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À URI - Campus de Erechim, que permitiu a realização deste trabalho e ofereceu condições e estrutura para alcançar estes resultados.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

A vocês, meu agradecimento, minha admiração, meu amor e minha dedicação. Obrigada por me ensinarem a lutar pelo que realmente “vale à pena”. Vocês foram, são, e sempre serão a razão da minha vida.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

## **OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM**

Ariana Secco Popiolski

Orientadores: José Vladimir de Oliveira  
Débora de Oliveira

O objetivo do presente trabalho foi otimizar o processo de produção de biodiesel enzimático em sistema livre de solvente em um banho de ultrassom. Foi realizado um estudo cinético nos intervalos de tempo de 15 minutos a 8 horas para determinar o melhor tempo. Após realizou-se um delineamento de Plackett & Burman com 12 ensaios, apresentando ponto central em triplicata, onde foi avaliada a influência de cinco variáveis (Temperatura 40 a 80°C; Razão Molar (óleo/etanol) 1:3, 1:6,5 e 1:10; Concentração da Enzima *Novozym 435* de 5 a 40% (p/p em relação aos substratos); Potência 40, 70 e 100% e Concentração de Água de 5% a 10% (p/p em relação aos substratos), mantendo-se fixo o tempo de contato em 1 hora de reação. Após observadas as variáveis significativas e não significativas realizou-se um delineamento composto central rotacional  $2^2$  (DCCR), totalizando 11 experimentos. O tempo total de reação foi de 1 hora e temperaturas de 60, 63, 70, 77 e 80°C. A condição otimizada correspondeu ao tempo de 1 hora de reação, razão molar 1:3, 70°C, 40% de potência de 132W e 20% (p/p em relação aos substratos) de concentração de enzima, atingindo conversões de aproximadamente 68% em Biodiesel. Após, realizou-se um estudo cinético para confirmar qual a melhor concentração de enzima a ser utilizada. Foi variado o tempo em 15 e 30 minutos e

em 1 a 6 horas e a concentração da enzima em 10%, 20%, 25%, 30% e 40% (p/p), para analisar em qual concentração de enzima a produção de ésteres etílicos apresentaria melhores conversões. E por fim, o estudo de reuso da enzima *Novozym 435* permitiu verificar que a mesma manteve sua atividade durante dois ciclos, perdendo sua atividade a partir do terceiro ciclo.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering.

## **OPTIMIZATION OF ENZYMATIC BIODIESEL PRODUCTION IN SOLVENT-FREE SYSTEM UNDER ULTRASOUND IRRADIATION**

Ariana Secco Popiolski

Advisors: José Vladimir de Oliveira

Débora de Oliveira

The aim of this work was to optimize the enzymatic production of biodiesel in solvent-free system in an ultrasonic bath. A kinetic study was performed at each 15 min up to 8 h to determine the best reaction time. Then, a Plackett & Burman design with 12 assays with triplicate at the central point was employed to evaluate the influence of five variables: temperature 40 to 80 ° C, oil to ethanol molar ratio of 1:3, 1:6,5 and 1:10, enzyme concentration - Novozym 435, from 50 to 40 wt% (by weight of substrates), irradiation power amplitude 40, 70 and 100%, water concentration from 5 to 10 wt% (by weight of substrates), keeping constant the contact time of 1 hour of reaction. After observing the significant variables, 2<sup>2</sup> central composite rotatable design (CCRD), totalizing 11 experiments was carried out. The reaction time was fixed to 1 hour at temperatures of 60, 63, 70, 77 and 80 ° C. The optimum condition was found to be oil to ethanol molar ratio of 1:3, 70 ° C, 40% irradiation amplitude (total power of 132 W) and 20wt% enzyme concentration, reaching conversions of approximately 68% FAEE. A kinetic study was henceforth conducted at 15 and 30 min and 1-6 hours at enzyme concentration of 10, 20, 25, 30 and 40 wt%. Finally, the study of enzyme reuse showed that it maintained its activity during two cycles, then gradually losing the activity after the third cycle.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IX</b>
<b>Capítulo 1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>Capítulo 2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>05</b>
<b>Capítulo 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>06</b>
<b>3.1. Enzimas.....</b>	<b>06</b>
<b>3.2. Enzimas imobilizadas.....</b>	<b>09</b>
<b>3.3. Lipases.....</b>	<b>10</b>
3.3.1 - Aspectos Gerais.....	10
3.3.2 – Histórico.....	15
3.3.3 - Lipases como catalisadores.....	15
3.3.4 - Esterificação catalisada por lípases.....	19
3.3.5 - Aplicações de lípases.....	20
<b>3.4. Óleos vegetais.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5. Reação de transesterificação.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6. Biocombustíveis.....</b>	<b>32</b>

<b>3.7. Histórico do biodiesel.....</b>	<b>34</b>
<b>3.8. Biodiesel.....</b>	<b>37</b>
<b>3.9. Técnicas de produção de biodiesel.....</b>	<b>43</b>
3.9.1 – Pirólise.....	44
3.9.2 – Micro-emulsificação.....	44
<b>3.10. Vantagens e desvantagens: Biodiesel x diesel.....</b>	<b>45</b>
<b>3.11. A importância industrial dos ésteres.....</b>	<b>47</b>
<b>3.12. Catálise enzimática em ultrassom.....</b>	<b>48</b>
<b>3.13. Produção enzimática de biodiesel em ultrassom.....</b>	<b>52</b>
<b>3.14. Considerações sobre o estado da arte.....</b>	<b>53</b>
<b>Capítulo 4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Materiais.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2. Procedimento experimental.....</b>	<b>56</b>
4.2.1 - Estudo cinético prévio (destrutivo).....	56
4.2.2 - Planejamento de experimentos.....	57
4.2.2.1 - Planejamento Plackett & Burman.....	57
4.2.2.2 - Delineamento composto central rotacional 2 <sup>2</sup> .....	57
4.2.3 - Estudo cinético em termos de concentração de enzima.....	58
4.2.4 – Avaliação do reuso do biocatalisador <i>Novozym 435</i> .....	58
4.2.5 - Determinação da atividade enzimática de lípases.....	59
4.2.6 - Quantificação dos ésteres etílicos de ácidos graxos.....	60

<b>Capítulo 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>5.1. Estudo cinético prévio para determinação do tempo reacional.....</b>	<b>62</b>
<b>5.2. Planejamento de experimentos.....</b>	<b>74</b>
5.2.1 - Planejamento Plackett & Burman .....	74
5.2.2 - Delineamento Composto Central Rotacional 2 <sup>2</sup> .....	78
<b>5.3 - Estudo cinético em termos da concentração de enzima.....</b>	<b>83</b>
<b>5.4. Reutilização da enzima <i>Novozym 435</i> na produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.....</b>	<b>85</b>
<b>5.5 - Considerações finais.....</b>	<b>91</b>
<b>Capítulo 6- CONCLUSÕES .....</b>	<b>92</b>
<b>Capítulo 7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>95</b>
<b>Capítulo 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol.....	11
<b>Figura 2:</b> Formação de uma molécula de triglicerídeo.....	24
<b>Figura 3:</b> Representação da reação de alcoólise de triglicerídeos.....	25
<b>Figura 4:</b> Representação das etapas da reação de transesterificação de óleos vegetais.....	26
<b>Figura 5:</b> Evolução energética dos biocombustíveis no Brasil.....	36
<b>Figura 6:</b> Banho de ultrassom.....	49
<b>Figura 7:</b> Ponteira ultrassônica.....	49
<b>Figura 8:</b> Aparato experimental utilizado para a produção enzimática de biodiesel enzimático em banho de ultrassom.....	56
<b>Figura 9:</b> Aparato experimental utilizado para a evaporação do álcool etílico não reagido e hexano após lavagem da enzima.....	60
<b>Figura 10:</b> Rendimento em ésteres etílicos obtidos na transesterificação enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.....	63
<b>Figura 11:</b> Atividade de esterificação da <i>Novozym 435</i> após cada ponto cinético, apresentado na Figura 10.....	68
<b>Figura 12:</b> Cinética da produção enzimática de MAG em sistema livre de solvente, na temperatura de 30°C, razão molar glicerol:óleo de 2:1, 10% (m/m) de enzima ( <i>Novozym 435</i> ) e 40% (m/m) de AOT em relação a mistura reacional.....	72

<b>Figura 13:</b> Valores de atividade de esterificação residual (%) da enzima <i>Novozym 435</i> em terc-butanol no ultrassom com frequência de 37 kHz e potência de 132 W.....	73
<b>Figura 14:</b> Cinética da conversão em ascorbil palmitato e atividade enzimática de esterificação residual em ultrassom. Reações realizadas com razão molar de ácido ascórbico e ácido palmítico de 1:9, 10 mL de solvente, 5% <i>m/m</i> de enzima e 70°C.....	74
<b>Figura 15:</b> Gráfico de Pareto para a produção enzimática de biodiesel utilizando a lipase <i>Novozym 435</i> em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função das variáveis independentes.....	76
<b>Figura 16:</b> Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função da temperatura e da concentração de enzima.....	82
<b>Figura 17:</b> Avaliação da cinética da reação em função da concentração de enzima em termos de conversão em biodiesel, na condição experimental otimizada no planejamento de experimentos.....	84
<b>Figura 18:</b> Atividade de Esterificação da <i>Novozym 435</i> após cada ciclo de uso para produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.....	86
<b>Figura 19:</b> Conversão em ésteres etílicos (%) após cada ciclo de uso para produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.....	87
<b>Figura 20:</b> Ciclos de reuso de lipase imobilizada na reação de produção de benzoato de 1-glicerila em 2-propanol. Reações realizadas com 5mM de substrato, 5mL de solvente, 5,5% (m/m) de enzima e 150rpm de agitação por 24 horas cada ciclo. ....	88

**Figura 21:** Reuso da enzima *Novozym 435*, nas seguintes condições: 27,1% de enzima, 63°C de temperatura, 40% de potência de ultrassom (132W), razão molar 1:3 (óleo/etanol), em sistema com solvente orgânico (n-hexano).....90

## LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1.....	59
EQUAÇÃO 2.....	61
EQUAÇÃO 3.....	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Processos industriais que utilizam lipases.....	22
<b>Tabela 2:</b> Aplicações de lipases de acordo com o tipo de reação catalisada.....	23
<b>Tabela 3:</b> Composição de ácidos graxos em óleos vegetais e gorduras.....	41
<b>Tabela 4:</b> Preços médios internacionais dos óleos vegetais virgens e usados como matéria-prima para a produção de biodiesel em 2007.....	42
<b>Tabela 5:</b> Variáveis e níveis estudados no planejamento Plackett & Burman para produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente orgânico e em banho de ultrassom.....	57
<b>Tabela 6:</b> Variáveis e níveis estudados no planejamento no planejamento fatorial completo $2^2$ , para otimização da produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente e em banho de ultrassom.....	58
<b>Tabela 7:</b> Valores de conversão de ascorbil palmitato em ultrassom (37 kHz e 132 W) com 5% m/m de enzima Novozym 435, razão molar de 1:9 (ácido ascórbico:ácido palmítico) e temperatura de 70°C em 2 horas de reação.....	67
<b>Tabela 8:</b> Matriz do planejamento fatorial do tipo Plackett & Burman com 12 ensaios (PB-12) com a resposta em termos do teor em ésteres etílicos (%)......	75
<b>Tabela 9:</b> Matriz do delineamento composto central rotacional $2^2$ (DCCR) para otimização da produção enzimática de biodiesel em ultrassom em sistema livre de solvente.....	78

**Tabela 10:** Análise dos efeitos das variáveis sobre a conversão em biodiesel, referente aos resultados apresentados na Tabela 8.....81

**Tabela 11:** Análise de Variância (ANOVA) das variáveis sobre a conversão em biodiesel, referente aos resultados apresentados na Tabela 8.....83

**Tabela 12:** Avaliação da cinética da reação em função da concentração de enzima em termos de conversão em biodiesel, na condição experimental otimizada no planejamento de experimentos.....85

## Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações ésteres presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases (Dalla-Vecchia, 2004). Estas são geralmente biocatalisadores eficazes devido à elevada atividade específica pelo substrato, baixo impacto ao ambiente, grupo funcional e estereoseletividade. As reações químicas podem ser conduzidas diretamente usando lipases em meio orgânico (Oliveira *et al.*, 2006).

São encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de micro-organismos, tais como os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Geotrichum*; as leveduras *Tulopsis* e *Candida*; e bactérias como *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Staphylococcus*. Do ponto de vista econômico e industrial, os micro-organismos são preferíveis em relação às lipases de fontes animais e plantas, devido ao alto custo do seu isolamento. As lipases podem catalisar uma ampla variedade de reações, incluindo hidrólise, interesterificação, alcoólise, acidólise, esterificação e aminólise (Dalla-Vecchia, 2004).

A maioria das lipases apresentam uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e não requerem cofator (Ghanem e Aboul-enein, 2005). A temperatura ótima para atividade máxima varia entre 30 e 40°C, embora sua termoestabilidade varie consideravelmente em função de sua origem (Macrae e Hammond, 1985). Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo micro-organismo. Estas variações também dependem do método e do substrato utilizados e das condições do ensaio, como pH e temperatura, tornando a comparação difícil (Freitas, 2006).

Recentemente, as pesquisas têm sido voltadas para utilização das lipases na transesterificação de moléculas de ácidos graxos de elevado peso molecular. A lipase catalisa a reação do álcool com óleos vegetais e gordura animal (Lee *et al.*, 2002). Os catalisadores enzimáticos como as lipases, podem catalisar eficazmente o processo de transesterificação dos triglicerídeos nos sistemas aquosos ou não

aquosos, superando os problemas relacionados ao conteúdo de água presente. Em particular, o subproduto, glicerol, pode facilmente ser removido sem nenhum processo complexo, e também os ácidos graxos livres contidos nos óleos e nas gorduras podem completamente ser convertidos a ésteres (Meher *et al.*, 2006).

O biodiesel (éster monoalquílico de ácido graxo) produzido a partir de óleos vegetais, gorduras animais e óleos de microalgas por transesterificação ou esterificação com álcoois de cadeia curta tem sido visto como promissora fonte renovável de combustíveis devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade, renovabilidade e menor dependência de produtos petrolíferos. O biodiesel é um éster de ácido graxo, renovável e biodegradável, obtido comumente a partir da reação química de óleos ou gorduras, de origem animal ou vegetal, com um álcool na presença de um catalisador (reação de transesterificação) (Encinar, 1999).

A transesterificação, também conhecida como alcoólise, provoca a diminuição da viscosidade do óleo vegetal e, assim, melhora o desempenho do mesmo em motores movidos a diesel. Atualmente, o biodiesel é obtido através de reações de transesterificação, onde um triglicerídeo reage com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador (enzimático, ácido forte ou base), produzindo uma mistura de ésteres e glicerol. Com relação aos catalisadores, a transesterificação pode ser realizada tanto em meio ácido quanto em meio básico, porém, ela ocorre de maneira mais rápida na presença de um catalisador alcalino do que na presença da mesma quantidade de catalisador ácido, observando-se maior rendimento e seletividade. Também pode ser realizada em meio enzimático, e sem a presença de catalisadores, em reações a altas pressões e temperaturas (Schuchardta *et al.*, 1998).

A catálise enzimática emprega enzimas como biocatalisadores efetivos por ter alta especificidade ao substrato, grupo funcional específico e estereo especificidade em meio aquoso (Mamuro *et al.*, 2001). A maior parte das pesquisas sobre a transesterificação de óleos vegetais, para a obtenção de biodiesel, utiliza a enzima comercial pura, em diversos meios reacionais (solventes, presença de aditivos, soluções polares-íons, fluidos supercríticos) ou fazendo uso da imobilização enzimática em suportes (Celite e polímeros, principalmente) (Du *et al.*, 2004). A transesterificação enzimática propicia temperaturas amenas de operação, facilidade

de separação do glicerol gerado como subproduto e a purificação dos ésteres produzidos é facilmente realizada (Fukuda *et al.*, 2001).

Tem sido relatado que o ultrassom exerce um efeito significativo sobre a transesterificação enzimática. A irradiação por ultrassom vem sendo estudada para produção de biodiesel utilizando enzimas, como a *Novozym 435* (Sinisterra, 1992; Yu *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 1995), bem como, o uso de catalisadores ácidos ou básicos (Deshmane *et al.*, 2009; Mahamuni *et al.*, 2009). Esta irradiação pode ser um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima, assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas (Liu *et al.*, 2008).

O processo de produção de biodiesel utilizando ultrassom vem como alternativa ao processo convencional de produção, uma vez que as cavitações (formação, aumento e implosão de bolhas no meio reacional) geradas pelo ultrassom aumentam a miscibilidade entre os reagentes, fornecem energia necessária para a reação, reduzem o tempo de reação, reduzem a quantidade de reagentes e aumentam o rendimento e a seletividade da reação (Yu *et al.*, 2010).

No entanto, até o presente momento não se conhece o verdadeiro potencial do ultrassom. A consecução de reações enzimáticas pode ser considerada uma tecnologia relativamente nova, não havendo muitos estudos acerca do comportamento das enzimas neste sistema. Não se conhece os exatos efeitos moleculares do ultrassom em enzimas e células vivas. Nas aplicações em enzimas, o ultrassom tem mostrado um aumento na estabilidade e atividade catalítica da enzima (Rokhina *et al.*, 2009).

As ondas de ultrassom podem interferir nas características da enzima, alterando sua estrutura em resposta à perturbação dinâmica provocada pelo ultrassom. Têm sido relatados resultados contraditórios de inativação e ativação da enzima após serem submetidas ao ultrassom. Diferente da tradicional inativação das enzimas em temperaturas elevadas, o processo de sonicação não destrói o sítio ativo das enzimas. Esta constatação tem sido claramente demonstrada com  $\alpha$ -amilase, peroxidase de raiz forte, lacase e fosfatase alcalina (Özbek e Ö Ülgen, 2000; Basto *et al.*, 2007).

Além disso, forças de cisalhamento que ocorrem no fluido durante a irradiação do ultrassom também podem ter um papel significativo na inativação da enzima (Özbek e Ö Ülgen, 2000).

Diversos trabalhos relatam a realização de síntese enzimática em ultrassom em sistemas reacionais livres de solvente e sistemas com solventes (Liu *et al.*, 2008; Babicz *et al.*, 2010; Ceni *et al.*, 2010), mostrando que o sistema reacional tem grande influência na síntese enzimática.

## Capítulo 2 - OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral otimizar o processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.

Para atingir este objetivo o trabalho foi dividido em cinco etapas, descritas a seguir:

- a) Estudo cinético prévio (destrutivo) para definição do tempo de reação a ser utilizado nas etapas posteriores;
- b) Planejamento proposto por Plackett & Burman, visando a verificação das variáveis de processo na conversão em biodiesel;
- c) Delineamento Composto Central Rotacional  $2^2$  (DCCR), para otimização do processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom;
- d) Estudo cinético para avaliação do efeito da concentração de enzima na conversão do processo, utilizando a condição experimental otimizada na etapa anterior;
- e) Estudo da reutilização da lipase imobilizada comercial Novozym 435 em sucessivos ciclos na condição experimental otimizada anteriormente, correspondente à maior conversão em biodiesel.

## Capítulo 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo tem por objetivo apresentar, de forma sucinta, a fundamentação teórica necessária ao desenvolvimento deste trabalho, incluindo tópicos sobre enzimas, mais especificamente lipases; métodos de produção de biodiesel; produção enzimática de biodiesel em sistemas orgânicos e livres de solvente; aplicação da tecnologia de ultrassom e, para finalizar, ênfase será dada à catálise enzimática para produção de biodiesel em ultrassom. A leitura do estado da arte mostrou a existência de poucos trabalhos na literatura versando sobre o emprego de lipases em ultrassom para a produção de biodiesel.

### 3.1. Enzimas

Enzimas são, na sua grande maioria, proteínas que catalisam com grande eficiência reações biológicas, acelerando reações metabólicas importantes para a vida sob condições fisiológicas de pH, temperatura, meio iônico, etc.

Toda enzima possui um centro ativo, local onde se processam as reações com determinados substratos. Este centro ativo é geralmente constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia de proteína e um grupo não-protéico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima. Algumas enzimas dependem somente da sua estrutura protéica (apoenzima) para exercer sua atividade, enquanto outras necessitam também de um ou mais componentes não-protéicos chamados de cofatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas denominadas de coenzimas. Muitas enzimas dependem de ambos. Outras enzimas possuem um grupo prostético que é similar ao cofator, mas está firmemente ligado à apoenzima. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado de haloenzima (Lehninger, 1986).

Em virtude de sua alta seletividade (em alguns casos, especificidade) e poder catalítico, a sua aplicação na produção de compostos assimétricos, vem sendo extensivamente relatada nos últimos anos. Os trabalhos de purificação de enzimas começaram a partir de 1920 (Lehninger, 1986). Em 1976 já era prevista a substituição dos métodos químicos por processos enzimáticos ou biocatalíticos, ou

mesmo que a simbiose entre a catálise enzimática e reações químicas assimétricas poderia ser vantajosa em muitos casos (Machado, 1999).

Assim, as enzimas vêm sendo muito empregadas em química analítica, agricultura, medicina, tecnologia de alimentos, estudos ambientais e síntese orgânica, com evidentes vantagens tecnológicas, econômicas e ambientais. Exemplo típico é a biocatálise ambiental, pois necessita de condições mais brandas de reação (pH, temperatura e pressão), resultando num menor consumo de energia e menor impacto ambiental (Filho e Vieira, 2002).

Algumas vantagens podem ser obtidas quando se utiliza enzimas como catalisadores. Devido à possibilidade de utilizá-las em condições moderadas de temperatura e pH, ocorre uma menor degradação de produtos alvos e, em função da sua especificidade, a formação de subprodutos é reduzida. Elas também são solúveis em meio aquoso gerando uma “tecnologia limpa”, diminuindo assim, em muitos casos, a necessidade do seu isolamento e purificação (Gonçalves, 2002).

As enzimas são catalisadores quirais, também capazes de produzir moléculas opticamente ativas, assim podem mediar transformações difíceis de serem estudadas através da química orgânica tradicional. Pode-se dizer que nos últimos anos, um dos avanços mais significativos na química orgânica tem sido a utilização de biocatalisadores, micro-organismos modificados ou não geneticamente e enzimas isoladas em síntese assimétrica. As oportunidades, quase sempre únicas, advindas das propriedades catalíticas quirais das enzimas e/ou micro-organismos, são hoje amplamente reconhecidas. A extraordinária regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade que caracterizam as enzimas, qualificam estes catalisadores como ferramentas imprescindíveis em estudos de síntese assimétrica (Gonçalves, 2002.)

Os biocatalisadores podem ser constituídos por células inteiras de animais, plantas ou micro-organismos e enzimas isoladas. As enzimas, idealmente, devem ser imobilizadas, a fim de se aumentar sua estabilidade frente às condições adversas do meio reacional e recuperar o biocatalisador, permitindo a sua reutilização (Gonçalves, 2002).

O Brasil tem uma grande variedade de vegetais que podem ser fontes inesgotáveis de enzimas para serem aplicadas nas mais diversas áreas do conhecimento. Porém, apesar da sua biodiversidade e enorme disponibilidade de

biomateriais, o qual lhe confere uma vocação para o desenvolvimento da biotecnologia, ocupa uma faixa inferior a 2% do mercado mundial de enzimas (Bon e Pereira, 1999)

A utilização de enzimas pelo homem pode ser atribuída a antigas civilizações. Importantes atividades humanas em comunidades primitivas como a produção de certos tipos de alimentos e bebidas, e o curtimento de peles para produzir couro para o vestuário, envolviam a aplicação de atividades enzimáticas, mesmo que inconscientemente. Contudo, apenas a partir do século XIX, a natureza das enzimas e a maneira como atuam começou a ser esclarecida. Durante o século XX, o reconhecimento das enzimas como proteínas juntamente com o *design* de técnicas para a sua purificação e análise, abriram caminho para o desenvolvimento de processos voltados à sua produção e utilização industrial (Lotti e Alberghina, 2007).

Até a década de 1960, as vendas totais de enzimas eram de apenas uns poucos milhões de dólares anuais, mas o mercado então cresceu de forma espetacular. Devido ao melhor entendimento da bioquímica de produção, dos processos fermentativos, e dos métodos de recuperação, tornou-se possível a produção de um crescente número de enzimas de forma acessível e sua introdução em produtos e processos industriais reais. Ainda, devido às diferentes transformações que as enzimas podem catalisar, o número de enzimas utilizadas comercialmente continua a se multiplicar (Sharma *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2002).

Cerca de 4000 enzimas são conhecidas, e destas, cerca de 200 são utilizadas comercialmente (Sharma *et al.*, 2001). Os benefícios oferecidos pelas enzimas são a especificidade (controle dos produtos produzidos e minimização de reações laterais indesejadas), as condições amenas (a planta industrial pode ser operada com menor capital e custos energéticos) e a menor produção de resíduos (menor custo no tratamento de resíduos e contribuição desprezível da enzima para a DBO) (Hasan *et al.*, 2006).

No mínimo 75% de todas as enzimas industriais (incluindo as lipases) são hidrolíticas, sendo usadas para a degradação de várias substâncias naturais. As proteases dominam o mercado, contando com aproximadamente 40% de todas as vendas de enzimas, devido à sua utilização ampla na indústria de detergentes e panificação. Várias carboidrases (amilases e celulasas), utilizadas em indústrias como as de amido, têxtil, de detergentes e panificação, representam o segundo

maior grupo (Sharma *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2002). No entanto, mesmo com uma vasta variedade de lipases microbianas, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é escasso, principalmente pelos elevados custos de produção (Paques e Macedo, 2006).

A maioria das enzimas industriais é de origem microbiana (Sharma *et al.*, 2001). Estas são normalmente mais úteis que as enzimas derivadas de plantas e animais, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, aos altos rendimentos possíveis, à facilidade de manipulação genética, ao fornecimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e ao rápido crescimento dos micro-organismos em meios de baixo custo. As enzimas microbianas são também mais estáveis e sua produção é mais conveniente e segura. Contudo, apenas cerca de 2% dos micro-organismos existentes foram testados como produtores de enzimas (Hasan *et al.*, 2006).

### **3.2. Enzimas imobilizadas**

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, que podem ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação e que poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (Villeneuve *et al.*, 2000; Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica. A seleção da técnica e suporte empregados depende da aplicação que o biocatalisador se destina. Apesar de ser objeto de estudo de pesquisas científicas há bastante tempo, a imobilização de lipases ainda demanda investigações adicionais sobre os efeitos exercidos pelas diferentes técnicas de imobilização sobre a estrutura destas enzimas, e sobre o emprego de novos materiais como suportes (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

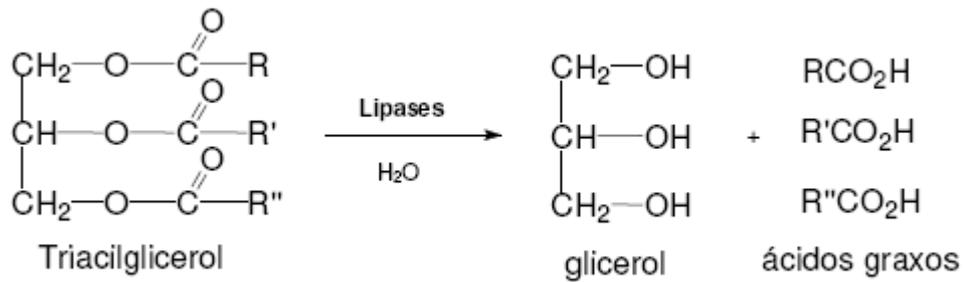
Os suportes utilizados para a imobilização das enzimas constituídos de material hidrofílico permitem a manutenção de um microambiente de alta atividade de água em torno das moléculas de enzima (Illanes, 1994). A imobilização geralmente aumenta a estabilidade térmica e química da lipase, permitindo melhor controle do processo e da qualidade do produto (Malcata *et al.*, 1990). Desta forma, o principal interesse em imobilizar enzimas está relacionado com a obtenção de um catalisador com atividade e estabilidade que não seja afetado durante o processo, como pode ocorrer com a enzima livre (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

### 3.3. Lipases

#### 3.3.1 - Aspectos Gerais

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que *in vivo* catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), sendo a trioleína o seu substrato padrão, aos ácidos graxos correspondentes e glicerol (Figura 1), constituindo uma classe especial de carboxil éster hidrolases (Diaz *et al.*, 2006; Jaeger e Eggert, 2002).

*In vitro*, as lipases também atuam como catalisadores em diversas reações, com alta especificidade, estabilidade e condições reacionais brandas, incluindo as reações de esterificação, transesterificação, lactonização, acilação regioseletiva e aminólise, quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (Foresti e Ferreira 2006; Rassy *et al.*, 2004; Gotor *et al.*, 2002, Krishna e Karanth, 2001).



**Figura 1.** Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol.

Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir lipases a partir de suas características cinéticas, utilizando como critério a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados. Este fenômeno, chamado de ativação interfacial, foi explicado quando foram determinadas as estruturas tridimensionais de algumas lipases, como a de *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990), *Geotrichum candidum* (Schrag *et al.*, 1991) e a lipase pancreática humana (Winkler *et al.*, 1979), quando verificou-se, em algumas lipases, a existência de uma tampa hidrofóbica (*lid*) cobrindo o sítio ativo da enzima. De acordo com Aloulou *et al.* (2006), a tampa hidrofóbica, que se move apenas quando encontra uma outra molécula hidrofóbica na interface, como um lipídeo, sofre uma mudança conformacional, expondo o seu sítio ativo e permitindo a catálise da reação. Do ponto de vista estrutural, existem evidências que sugerem que a *lid* pode propiciar a atividade catalítica e determina seletividade de algumas lipases. As lipases de *Candida antarctica* (Uppenberg *et al.*, 1994), *Geotrichum candidum* (Schrag *et al.*, 1991), *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* e *R. miehei* (Cajal *et al.*, 2000 a,b; Ollis *et al.*, 1992; Brady *et al.*, 1990) são exemplos de lipases que apresentam a tampa em suas estruturas e sofrem ativação interfacial. Entretanto, em outros casos, a existência da *lid* não implica necessariamente em ativação interfacial. Este é o caso das lipases de *P. aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *C. antarctica B* (Jaeger e Reetz, 1998 a; Jaeger *et al.*, 1994), que possuem a *lid* mas não sofrem ativação interfacial. Por outro lado, as cutinases, que são as menores lipases de estrutura conhecida (19kDa), não apresentam a tampa catalítica e não precisam da interface para exercer sua

atividade hidrolítica (Cygler e Schrag, 1997; Yao e Koller, 1994). Portanto, nem o critério de ativação interfacial, nem o da existência da tampa são suficientes para a caracterização de uma lipase.

As lipases têm sido definidas, nos trabalhos mais recentes, como carboxilesterases, que hidrolisam acilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono, enquanto que as enzimas que hidrolisam acilgliceróis compostos de ácidos graxos de cadeia curta (menos de dez átomos de carbono) são reconhecidas como as esterases-carboxil éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3 (Castro-Ochoa *et al.*, 2005; Bornscheuer, 2002; Nini *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 1999).

As lipases fazem parte de um grupo de enzimas hidrolíticas, com cerca de 300 resíduos de aminoácidos, que catalisam a quebra de ligações ésteres de acil gliceróis. Elas não requerem cofatores, são de baixo custo, regioespecíficas, atuam em uma larga faixa de pH e, além de efetuar reações de hidrólise, podem também exercer atividade catalítica.

As lipases são dotadas de uma especificidade pelo substrato que supera todas as outras enzimas conhecidas. Isso lhes confere uma aplicação de fronteiras. Elas podem ser empregadas na produção de fármacos, cosméticos, detergentes, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, resolução de racematos, produção de aromas e fragrâncias, modificações de gorduras e tratameto de couros (Bon e Pereira, 1999; Faber, 1997).

Considerando-se as transformações de óleos e gorduras em derivados ou matérias-primas industriais, o potencial de aplicações de enzimas nesse segmento ainda não está suficientemente difundido (Bon e Pereira, 1999). Segundo alguns trabalhos que fazem parte da literatura, as lipases têm sido empregadas em processos de extração de óleos, melhoramento das propriedades físicas e nutricionais de gorduras por interesterificação (Macrae, 1983; Facioli *et al.*, 1998), hidrólise e degomagem de óleos vegetais na indústria (Bon e Pereira, 1999).

As lipases pertencem a um grupo especial de esterases, são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando di- ou monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Atuam sobre substratos pouco solúveis em água, em interfaces de lipídeo/água, hidrolisando, por exemplo,

acilgliceróis de cadeia longa (acima de 8 átomos de carbono) (Ericsson *et al.*, 2008; Côté e Shareck, 2008).

A diferenciação entre uma lipase e uma esterase (EC. 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis.

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de micro-organismos, tais com os fungos *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, por leveduras do gênero *Tulopsis* e *Candida* e bactérias como *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Staphylococcus*. Do ponto de vista econômico e industrial, os micro-organismos são preferíveis ao invés das lipases de fontes animais e plantas, devido ao alto custo do seu isolamento.

As lipases podem catalisar uma ampla variedade de reações, incluindo hidrólise, interesterificação, alcoólise, acidólise, esterificação e aminólise. (Dalla-Vecchia, 2004).

i) Hidrólise



ii) Síntese:

a) Esterificação



b) Interesterificação



c) Alcoólise



d) Acidólise



e) Aminólise



A habilidade das lipases para realizar biotransformações altamente específicas vem tornando-as crescentemente populares em indústrias de alimentos, detergentes, cosméticos, síntese orgânica e farmacêutica (Castro e Anderson, 1995; Sharma *et al.*, 2001; Hasan *et al.*, 2006; Vakhlu e Kour, 2006; Shu *et al.*, 2010; Treichel *et al.*, 2010).

A maior vantagem do uso de lipases em relação a reações químicas convencionais reside no fato dessas enzimas apresentarem sempre algum tipo de seletividade, podendo ser divididas da seguinte forma:

i) Regiosseletivas:

- lipases não-específicas - catalisam a hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos, que divide-se em: primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2 e glicerol em qualquer posição da estrutura do grupo acil. Como exemplo, as lipases produzidas por: *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas* sp.;
- lipases 1,3-específicas - hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1,3 do triacilglicerol; 2-monoglicerídeos e 1-2 ou 2-4 diglicerídeos, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acil produzindo 1,3-diglicerídeos, ou 1- ou 3- monocerídeos. Como exemplo, as lipases produzidas por: *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii*.

ii) Tipo-seletivas com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturação do grupo acila. O caso mais clássico é o da lipase de *Geotrichum candidum* que hidrolisa preferencialmente ligações éster envolvendo ácidos graxos de cadeia longa, insaturados na posição 9 (Bertolini, 1995).

iii) Enantiosseletivas: algumas lipases apresentam a propriedade de reagir em diferentes velocidades com dois enantiômeros gerando, depois de determinado

tempo de reação, um excesso enantiomérico que possibilita a resolução de racematos e a obtenção de compostos opticamente puros. Alguns autores atribuem esta propriedade das lipases ao fato de serem as enzimas constituídas apenas por L-aminoácidos o que as tornaria catalisadores quirais (Margolin, 1996; Kamiya *et al.* 1995; Enzelberge *et al.*, 1997). Exemplos são as lipases produzidas por *Candida rugosa*.

### 3.3.2 - Histórico

Relatos prévios da produção de enzimas capazes de degradar substratos lipídicos por células bacterianas e eucarióticas – as enzimas lipolíticas, que incluem lipases, esterases e fosfolipases – datam de cerca de um século atrás (Lotti e Alberghina, 2007).

A presença de lipases tem sido observada desde 1901 para *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*), *B. pyocyaneus* (*Pseudomonas aeruginosa*) e *B. fluorescens* (*Pseudomonas fluorescens*), os quais representam as bactérias produtoras de lipases melhor estudadas atualmente.

A hidrólise de triglicerídeos por enzimas vêm sendo estudada há cerca de 300 anos e a habilidade das lipases em catalisar a hidrólise e também a síntese de ésteres já foi reconhecida há cerca de 70 anos.

### 3.3.3 - Lipases como catalisadores

A biotransformação pode ser aplicada às modificações específicas ou interconversões da estrutura química realizadas por catalisadores bioquímicos. O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente em áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais (Castro *et al.*, 2004).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Aproximadamente 4000 enzimas são conhecidas, e destas cerca de 200 são usadas comercialmente, sendo que a maioria das enzimas é de origem microbiana (Sharma *et al.*, 2001).

Duas classes de enzimas são as mais utilizadas em síntese orgânica: as desidrogenases - enzimas que atuam em reações de óxido-redução e as hidrolases - enzimas que atuam em reações de hidrólise/esterificação (Jones, 1986).

As desidrogenases são enzimas nicotinamídicas, isto é, dependem da presença do cofator, e atuam em reações de oxiredução envolvendo grupos CH-OH, C=O e CHO. Algumas desidrogenases NAD ou NADP dependentes têm um elevado potencial de aplicação em síntese orgânica devido ao seu amplo espectro de ação (Gonçalves *et al.*, 2000; Gonçalves *et al.*, 2003). Em alguns casos, micro-organismos íntegros podem ser usados (Ribeiro *et al.*, 2003).

As hidrolases, incluindo as lipases, consistem em uma das classes de enzimas mais utilizadas por não necessitarem de coenzimas, o que reduz o custo do processo (Schneider *et al.*, 1984). Alguns protocolos utilizam leveduras e outras preparações enzimáticas brutas, o que também contribui para viabilizar economicamente o uso deste grupo de enzimas.

Lipases (triacilglicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de gorduras e óleos liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Estas enzimas são encontradas em tecidos animais, vegetais e em micro-organismos, tendo papel fundamental no metabolismo de lipídios destes seres vivos: como enzimas digestivas, na deposição e mobilização dos tecidos de reservas energéticas e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares (Villeneuve *et al.*, 2000).

A maioria das lipases apresenta atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 40°C, embora sua termoestabilidade varie consideravelmente em função de sua origem (Macrae e Hammond, 1985). Apresentam massa molecular entre 20 e 60kDa (Carvalho *et al.*, 2003). Usualmente são ativas em uma ampla faixa de pH, apresentando alta atividade na faixa de pH 5 a 9, com um máximo situado entre 6 e 8 e não requerem cofator (Ghanem e Aboul-Enein, 2005).

As lipases são enzimas que são primeiramente responsáveis pela hidrólise de acilglicerídeos. Contudo, um número de diferentes ésteres de altas e baixas massas molares, tiol ésteres, amidas, etc., são utilizados como substratos por este único grupo de enzimas. O extenso campo para emprego, em uma variedade de reações, dotado de ampla especificidade do substrato, é também aumentado pelo fato destas lipases serem capazes de catalisar a reação reversa de síntese, de forma adequada

e eficientemente. De fato, algumas lipases são mais desejáveis para aplicações de síntese do que hidrólise (Kazlauskas e Bornscheuer, 1998; Gandhi, 1997; Yahya *et al.*, 1998).

As lipases são originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência (Saxena *et al.*, 2003). As lipases provenientes de micro-organismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática, especificidade pelo substrato e facilidade de produção em grandes quantidades (Hasan *et al.*, 2006; Villeneuve *et al.*, 2000, Palekar *et al.*, 2000).

Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas, e na sua grande maioria, não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como Generally Regarded As Safe (GRAS) (Gutarra *et al.*, 2005). Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação (Vulfson, 1994).

As lipases também podem apresentar como características a especificidade ou seletividade em relação a um substrato (químico), à posição (regio) e a isômeros (estéreo). A quimioespecificidade está relacionada com as diferentes taxas de atividade enzimática apresentada por uma mesma lipase em relação a substratos variados. As lipases podem apresentar especificidade por tri, di e monoacilgliceróis e outros ésteres de ácido graxo formados pela mesma molécula de ácido carboxílico, também podem diferenciar moléculas de ácido graxo de diferentes tamanhos de cadeia, de diferentes níveis e posição de insaturação entre outros (Pinheiro, 1992). A regioespecificidade se refere às diferentes atividades enzimáticas apresentadas pela mesma lipase sobre as distintas posições do ácido graxo no triacilglicerol (Villeneuve, 2003). Por outro lado, a estereoespecificidade está relacionada com as diferentes taxas de atividade enzimática apresentadas por uma mesma lipase sobre distintos isômeros de uma molécula (Pinheiro, 1992).

Em função dessas características, as lipases são de importância particular em biotecnologia com diversas aplicações em indústrias de alimentos, têxtil, detergentes biológicos, aplicações médicas, farmacêuticas, agroquímica, oleoquímica e na produção enzimática de substâncias químicas lipofílicas. Lipases termoestáveis

apresentam um importante papel em processos industriais cujas temperaturas empregadas excedam 50°C (Sinhaikul *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2002; De Paula *et al.*, 2005; Hasan *et al.*, 2006).

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. As lipases são divididas em 3 grupos baseados em sua especificidade:

- Lipases não específicas (ex. produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Cromobacterium viscosum* e *Pseudomonas* sp.) que catalisam a hidrólise das moléculas de acilglicerol de forma aleatória, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares aqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior.

- Lipases 1,3 específicas (ex. produzidas por *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roqueforti*) liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 e formam, por esta razão, produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não-regiosseletivas, ou mesmo pelo catalisador químico inferior.

- Lipases ácido-graxo específicas são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em *cis* no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos insaturados, ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum*. Esta habilidade de produzir novos tipos de misturas de triacilgliceróis utilizando lipases regioespecíficas é uma das características mais interessantes para a aplicação no setor de óleos e gorduras (CASTRO *et al.*, 2004).

A utilização de lipases como catalisadores para a obtenção de fármacos ou insumos para a indústria farmacêutica em sua forma enantiomérica com elevada pureza ótica tem merecido destaque. As lipases são enzimas com capacidade de reconhecer moléculas quirais e atuar seletivamente em um dos isômeros de uma mistura racêmica (Hasan *et al.*, 2006).

As áreas nas quais a aplicação das lipases vem tendo maior destaque são (Leal *et al.*, 2002; Baron, 2003; Bevilaqua, 2005):

- a) Farmacêutica: Síntese de intermediários de fármacos (ex. ibuprofeno e naproxeno, fármacos com atividade anti-inflamatória); resolução de misturas racêmicas (ex. síntese de atenolol, fármaco anti-hipertensivo).
- b) Alimentos: Síntese de aromas (ex. maturação de queijos); síntese de edulcorantes (ex. aspartame).
- c) Detergentes: Remoção de manchas de gorduras dos tecidos.
- d) Agroquímica: Síntese de inseticidas e pesticidas.
- e) Tratamento de efluentes: Redução do teor de gorduras em efluentes da indústria de laticínios.
- f) Oleoquímica: Hidrólise e interesterificação regioseletiva de óleos e gorduras.

A aplicação alternativa de lipase para a síntese de produtos puros, modificação de gorduras, óleos e a modificação de carboidrato tem sido bem documentada na literatura (Bornscheuer e Kazlauskas, 1999).

#### **3.3.4 - Esterificação catalisada por lipases**

A habilidade das lipases em catalisar a reação reversa da hidrólise pode ser aplicada na obtenção de inúmeros produtos de interesse. Misturas de esterificação geralmente contêm somente os substratos e enzimas sendo a água um subproduto da reação. Uma grande quantidade de trabalhos tem sido apresentada na literatura no sentido de elucidar os mecanismos cinéticos de reações de esterificação catalisadas por lipases (Gandhi, 1997).

A água gerada durante a reação de esterificação é considerada o mais importante parâmetro que precisa ser controlado. Mesmo sob condições de baixa concentração de água, durante o curso da reação, 1 mol de água é formado para cada mol de éster sintetizado. Como solventes hidrofílicos são geralmente evitados para prevenir a inativação da enzima, a formação desta fase aquosa pode ocorrer facilmente durante a reação. Remoção de água por diversas metodologias pode prevenir este fenômeno e ajudar na direção da reação para sua conclusão com altas conversões (Castro e Anderson, 1995).

Industrialmente, a esterificação empregando uma lipase foi comercializada pela Unichema International para a produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de pureza e qualidade, como o isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilexilpalmitato, que são ingredientes empregados na formulação de cremes cosméticos e outros produtos de higiene. O processo permite a recuperação da preparação enzimática e sua reutilização em bateladas subseqüentes (Bosley, 1997).

Os ésteres de glicerol apresentam, também, relevantes propriedades como agentes emulsificantes e, dependendo de sua composição, podem fazer parte de sistemas emulsificantes para uso em cremes, molhos e loções (Harwood, 1989). Outra aplicação importante desta tecnologia é a produção de ésteres aromatizantes, principalmente para o uso em diversos produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (Vulfson, 1993). Além disso, quando preparados por processos enzimáticos podem ser caracterizados como naturais ou idênticos ao natural, sendo, portanto, preferidos pelo mercado consumidor.

As lipases também podem catalisar a síntese de ésteres de poliglicerol. Esses tipos de ésteres são ingredientes multifuncionais, sendo usados como emulsificantes, substitutos de gorduras, como meio de solubilização de vitaminas lipossolúveis para facilitar a incorporação destas em sistemas lipofóbicos, podendo ser utilizados também como aditivos em sorvetes, margarinas, coberturas, sobremesas e produtos de panificação (Castro *et al.*, 2004).

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas por esta técnica, a síntese enzimática de ésteres apresenta dificuldades técnicas em função do complexo mecanismo da ação enzimática em meios orgânicos. Diversos parâmetros, como por exemplo, hidratação da enzima, temperatura, concentração do substrato, tamanho da cadeia e estrutura química, podem afetar o desempenho da síntese (Yahya *et al.*, 1998; Lotier, 1997).

### **3.3.5 - Aplicações de lipases**

Recentemente, o interesse em pesquisas com lipases, principalmente de origem microbiana, tem crescido devido ao seu grande potencial biotecnológico. Como biocatalisadores, as lipases apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos industriais. Efetivamente, suas características de

especificidade, regioseletividade e enantioseletividade, permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos requerem procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizam temperatura e pressão ambientes, condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente (Castro-Ochoa *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005; Villeneuve *et al.*, 2000). Conseqüentemente, uma considerável atenção vem sendo dada ao uso das lipases em aplicações industriais.

A indústria de enzimas como existe hoje é o resultado do rápido desenvolvimento das últimas quatro décadas, graças à evolução das técnicas biotecnológicas. O desenvolvimento dos processos de fermentação durante a última parte do século XX propiciou a produção de enzimas através do uso de cepas selecionadas e tornou possível a obtenção de enzimas purificadas e bem caracterizadas, mesmo em escala industrial. A produção em larga escala permitiu a introdução de enzimas em vários segmentos industriais como pode ser observado na Tabela 1.

Novas tecnologias como a recombinação gênica, a engenharia de proteínas e a evolução dirigida propiciaram a obtenção de enzimas com características (atividade, estabilidade, seletividade, especificidade) novas e mais dirigidas a 20 substratos e condições de interesse industrial, promovendo a expansão da aplicação de enzimas. Entre as maiores empresas produtoras de enzimas estão a Amano Pharmaceuticals (Japão), Novozymes (Dinamarca), Genencor International (USA), Unilever (Holanda), Biocatalysts (Inglaterra) e Meito Sankyo (Japão) (Krishna, 2002). As lipases termoestáveis, obtidas de diversas fontes microbianas como as de *Bacillus* e *Pseudomonas*, apresentam grandes vantagens em aplicações biotecnológicas, pois podem ser produzidas a baixo custo e são estáveis a elevadas temperaturas. As principais vantagens em utilizar biocatalisadores termoestáveis, ou seja, aqueles que catalisam reações a elevadas temperaturas são: maior reatividade (maior velocidade de reação e difusão); maior rendimento da reação (elevadas temperaturas aumentam a solubilidade dos substratos e produtos hidrofóbicos e favorecem o deslocamento do equilíbrio no sentido endotérmico); menor viscosidade do substrato e risco de contaminação microbiana (Hasan *et al.*, 2006).

**Tabela 1.** Processos industriais que utilizam lipases.

Companhia	Produtos (aplicações)	Processo e Enzima	Meio	Observações
BASF	Aminas quirais e álcoois (intermediários farmacêuticos, pesticidas)	Lipase imobilizada de <i>B. plantarii</i> ; hidrólise.	MTBE-etilmetoxiacetato	E > 500 (>100 ton)
Bristol-Myers-Squibb (BMS)	(3R, 4S)-acetato de azetidiona (Taxol)	Lipase imobilizada de <i>P. cepacia</i> ; hidrólise.	Aquoso	ee > 99 % (Kg)
Bristol-Myers-Squibb (BMS)	Hidroximetil coenzima A (anticoolesterol)	Lipase imobilizada de <i>P. cepacia</i> ; acetilação.	Tolueno	ee > 98 % (Kg)
Chiroscience	Intermediários anti-HIV; hipocolesteremico, antifúngico	Lipase (solúvel) de <i>P. fluorescens</i> ; hidrólise	Aquoso	ee > 92 % (Kg)
DSM ; Tanabe Seiyaku	Intermediário, Diltiazem (anti-hipertensivo)	Lipase imobilizada de <i>Serratia marascens</i> ; hidrólise.	Aquoso/Tolueno	ee > 99 % (Kg)
Sepracor	S-ibuprofen	Lipase imobilizada (membranas) de <i>C. cylindracea</i> ; hidrólise.	Multifásico	ee > 99 % (Kg)
Uniquema	Miristato e palmitato de isopropila (cremes e sabonetes)	imobilizada (membranas) de <i>C. antarctica</i> (Novo); esterificação.	Isopropanol	Rendimento 99 %

(Fonte: Krishna, 2002).

E = o coeficiente de enantiosseletividade; ee = excesso enantiomérico

Observa-se que os processos industriais já implantados tratam da produção de fármacos quirais, tanto em solventes orgânicos como em meio aquoso, em reações de hidrólise ou síntese, usando principalmente lipases imobilizadas, sendo as produzidas pelo gênero *Pseudomonas* utilizadas em três dos sete processos citados na Tabela 1.

Por sua vez, inúmeras são as aplicações potenciais de lipases, muitas delas já desenvolvidas em escala industrial, e que estão citadas na Tabela 2. As lipases têm sido freqüentemente utilizadas na resolução de misturas racêmicas, na formulação de detergentes e síntese de biosurfactantes; no tratamento de efluentes,

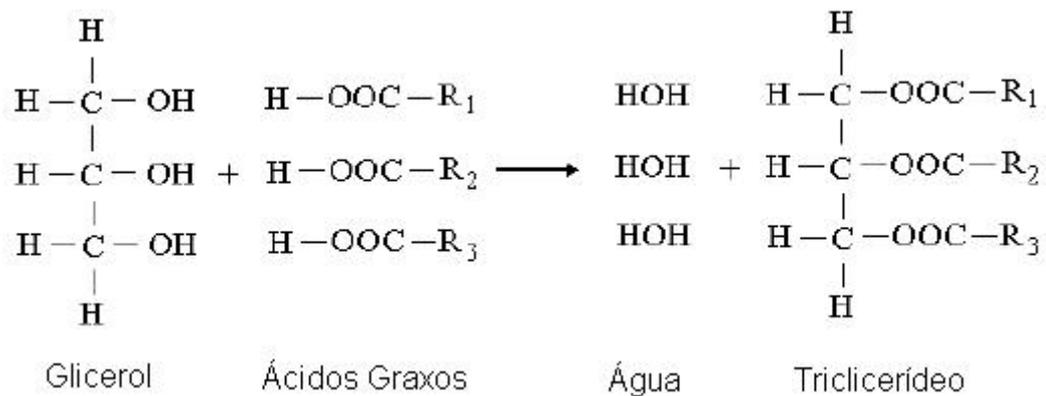
na indústria oleoquímica (bioconversão de óleos e gorduras) para a produção de biodiesel; na indústria agroquímica; na manufatura do couro e papel; na nutrição; na produção de aromas; na formulação de perfumes, fragrâncias e cosméticos; na fabricação de plásticos e fibras sintéticas; na síntese de sedativos e outros fármacos; dentre outras (Hassan *et al.*, 2006; Salis *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005; Jaeger e Eggert, 2002; Kirk *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002).

**Tabela 2.** Aplicações de lipases de acordo com o tipo de reação catalisada.

Tipos de Reações	Áreas de Aplicação	Aplicações	Produtos	Referências
<i>Hidrólise</i>				
	Alimentos (laticínios)	Hidrólise da gordura do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados	Hasan <i>et al.</i> , 2006; Villeneuve <i>et al.</i> , 2000.
	Química (Processamento do Óleo)	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos e monoglicerídeos (emulsificantes, reagentes para análise de lipídios)	Hasan <i>et al.</i> , 2006; Osório <i>et al.</i> , 2001; Undurraga <i>et al.</i> , 2001; Villeneuve <i>et al.</i> , 2000.
	Química (Detergente)	Remover manchas de óleo	Detergentes para lavanderias e uso doméstico	Hasan <i>et al.</i> , 2006; Kirk <i>et al.</i> , 2002; Sharma <i>et al.</i> , 2001.
	Medicina	Dosagem de triglicerídeos no sangue	Kits diagnósticos	Hasan <i>et al.</i> , 2006.
<i>Esterificação</i>				
	Química Fina	Síntese de ésteres	Intermediários quirais ésteres, emulsificantes	Bucalá <i>et al.</i> , 2006; Fernandes <i>et al.</i> , 2006; Foreti e Ferreira, 2006; Hasan <i>et al.</i> , 2006; Romero <i>et al.</i> , 2005; Fernandes <i>et al.</i> , 2004; Ghamgui <i>et al.</i> , 2004; Trubiano e Ferreira, 2004.
	Química Alimentos	Esterificação ou transesterificação	Óleos ou gorduras, Flavorizantes e aromatizantes.	Hasan <i>et al.</i> , 2006
	Química farmacêutica	Síntese de intermediários de medicamentos- preparação de intermediários homoquirais	Drogas antiinflamatórias como naproxeno, ibuprofeno, cetoprofen, suprofen.	Wilkinson e Bachmann, 2006; Jaeger e Eggert, 2002; Zhang <i>et al.</i> , 2002; Van Dyck <i>et al.</i> , 2001.
<i>Transesterificação</i>				
	Química Fina	Transesterificação de óleos vegetais	Biodiesel	Salis <i>et al.</i> , 2005; Hsu <i>et al.</i> , 2004; Salis <i>et al.</i> , 2003; Shimada <i>et al.</i> , 2002; Zhang <i>et al.</i> , 2002; Iso <i>et al.</i> , 2001; Abigor <i>et al.</i> , 2000.

### 3.4 - Óleos vegetais

Óleos e gorduras são ésteres de ácidos carboxílicos com o glicerol, denominados triglicerídeos (triacilgliceróis), substâncias constituídas por uma molécula de glicerol ligada a três moléculas de ácidos graxos. Na Figura 2 é apresentada a formação de uma molécula de triglicerídeo. A natureza física destes compostos é definida pelo comprimento da cadeia, pelo grau de insaturação e pela distribuição dos radicais. Os triglicerídeos são os principais componentes de qualquer gordura animal ou vegetal. Dependendo da origem do óleo, o conteúdo em triglicerídeos e ácidos graxos pode variar significativamente (Moretto e Fett, 1998).



**Figura 2** - Formação de uma molécula de triglicerídeo.

O Brasil dispõe de uma grande diversidade de espécies vegetais oleaginosas das quais pode se extrair óleos para vários fins. Algumas destas espécies são de ocorrências nativas (buriti, babaçu, mamona, etc.), outras são de cultivo de ciclo curto (soja, amendoim, etc.) e outras ainda de ciclo longo ou perene (dendê) (<http://www.petrobras.com.br/>).

Nos últimos anos tem surgido um grande interesse na transformação química e biotecnológica de óleos e gorduras para produção de compostos de maior valor de mercado e de uso potencial na indústria farmacêutica, de alimentos e oleoquímica (Lozano *et al.*, 2004). Tecnologias como fracionamento e hidrogenação, entre outras, tornaram possível o uso de óleos em diversas áreas da indústria de oleoquímicos (Schmid, 1987).

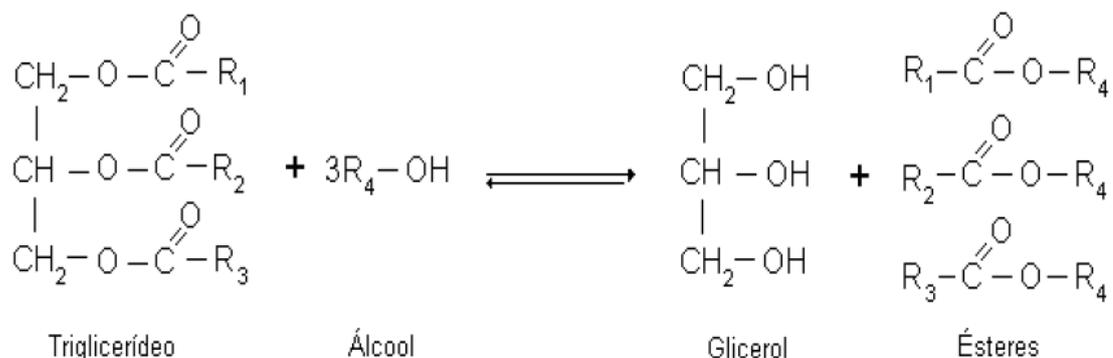
Diante disso, a busca por métodos de processamento alternativos que possam melhorar ou criar novos processos de industrialização de oleaginosas e de

obtenção de produtos de valor agregado cresce constantemente. Recentemente, pesquisas sobre extração e fracionamento de misturas de óleos e gorduras e reações utilizando solventes alternativos têm sido apresentadas na literatura (Réndon *et al.*, 2001; Oliveira e Oliveira, 2001; Oliveira e Costa, 2002; Machmudah *et al.*, 2007; Hamdam *et al.*, 2008).

### 3.5. Reação de transesterificação

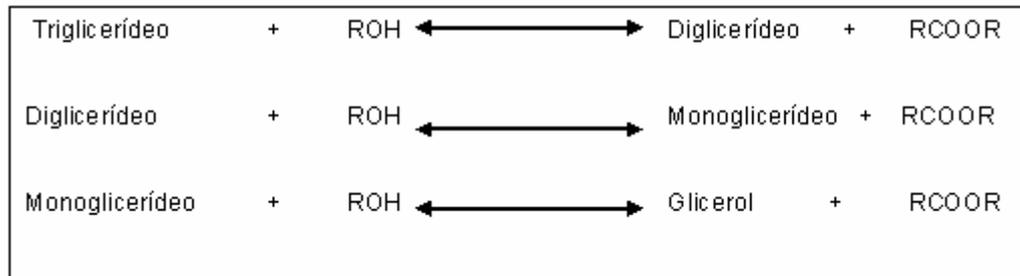
Segundo Demirbas (2003), o surgimento da transesterificação pode ser datado de 1846, quando Rochieder descreveu a produção de glicerol pela etanolise de óleo de mamona. Desde aquele momento, o processo de alcoólise tem sido largamente estudado.

Quimicamente, na reação de transesterificação dos óleos vegetais, um triglicerídeo reage com um álcool na presença de um catalisador (enzimático, ácido forte ou base) para promover e/ou acelerar a reação e, como resultado, obtém-se a glicerina (glicerol) e uma mistura de ésteres etílicos (biodiesel) (Demirbas, 2002). Conforme Meher *et al.* (2006) a reação estequiométrica exige 1 mol de um triglicerídeo e 3 moles do álcool, resultando na produção de 3 moles de ésteres e 1 mol de glicerol, conforme representação na Figura 3. Entretanto, um excesso do álcool é usado para aumentar os rendimentos dos ésteres. Diversos aspectos, incluindo o tipo de catalisador (enzimático, alcalino ou ácido), relação molar entre álcool/óleo vegetal, temperatura, pureza dos reagentes (principalmente índice de água) e de ácidos graxos livres afetam a taxa de reação (Schuchardt *et al.*, 1998).



**Figura 3:** Representação da reação de alcoólise de triglicerídeos.

Na transesterificação, acredita-se que três sucessivas e reversíveis reações aconteçam. O primeiro passo é a conversão de um triglicerídeo a um diglicerídeo, seguido pela conversão de um diglicerídeo a monoglicerídeo e de monoglicerídeo para glicerol, gerando uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada fase da reação (Srivastava e Prasad, 2000), conforme representado na Figura 4.



**Figura 4** - Representação das etapas da reação de transesterificação de óleos vegetais.

Os ésteres formados são relativos à conformação da cadeia do triglicerídeo. Por exemplo, uma trioleína poderá formar uma dioleína, uma monooleína ou etil oleato. Os triglicerídeos possuem cadeia de ácidos graxos de 8 a 20 átomos de carbono.

O processo de transesterificação reduz o peso molecular para aproximadamente 1/3 em relação aos triglicerídeos, diminuindo significativamente a viscosidade, melhorando a volatilidade. Após a reação, os produtos consistem em uma mistura dos ésteres de ácidos graxos, glicerol, álcool, catalisador e uma porcentagem baixa de tri-, di- e monoglicerídeos (Pinto *et al.*, 2005).

Segundo Kusdiana e Saka (2004 a, b), no processo convencional de transesterificação para a produção de biodiesel, os ácidos graxos livres e a água podem ocasionar efeitos negativos como a formação de sabão, pois eles consomem o catalisador diminuindo assim a sua eficácia e conseqüentemente a conversão em produto.

De acordo com Akgun e Iyscan (2007), dentre os fatores que interferem no rendimento da reação de transesterificação, pode-se citar: tipo e quantidade de catalisador, tempo e temperatura de reação, razão molar óleo:álcool, teor de ácidos graxos livres e água nos substratos, intensidade de agitação, solubilidade entre as

fases e natureza do álcool. No entanto, estas variáveis vão depender necessariamente da metodologia empregada.

Alguns parâmetros são de fundamental importância na reação de transesterificação, entre eles destacam-se:

- A concentração de ácidos graxos livres nos óleos é um fator importante na reação catalisada por bases (por exemplo, NaOH), pois será maior o rendimento para a neutralização. O conteúdo de água dos reagentes deve ser muito baixo, pois pode alterar a rota da reação (hidrólise), o que aumentaria a viscosidade final do produto, dificultando o processo de separação.
- O efeito da relação molar entre os reagentes está associado ao tipo de catalisador e ao tipo de óleo que é empregado na reação. Na catálise alcalina, utilizando óleo de soja e butanol, por exemplo, é requerida uma relação de óleo/etanol de 1:6, enquanto para atingir a mesma conversão com catalisador ácido, necessita-se de uma razão molar óleo:etanol de 1:30 (Fukuda *et al.*, 2001). Altas razões molares resultam em elevadas conversões em ésteres em curtos tempos de reação (Ma e Hanna, 1999).
- Os tipos de catalisadores possíveis são os ácidos ( $H_2SO_4$ , HCl e derivados,  $H_2PO_4$ ), alcalinos (KOH e NaOH) ou enzimáticos (lipases). Segundo Leung *et al.* (2010) a concentração de catalisador pode afetar o rendimento do produto em biodiesel. O catalisador mais comumente utilizado para a reação é o hidróxido de sódio. Cabe ainda salientar que a transesterificação por catálise básica, utilizando reagentes como hidróxido de sódio, é mais eficiente em relação à catálise ácida devido ao tempo bastante reduzido de reação.
- O tempo de reação é outro parâmetro importante e que, em geral, tem efeito positivo sobre a conversão da reação. As reações são rápidas se a dispersão é boa e atingem conversões superiores a 95% em cerca de 30 minutos quando catalisadas por álcalis (Oliveira *et al.*, 2005a). Para sistemas utilizando catalisadores químicos, a completa conversão do sistema é geralmente atingida em torno de 20 minutos de reação. No método enzimático com solventes orgânicos, a reação atinge conversão máxima em 5 horas de reação (Faccio, 2004). Dalla Rosa (2006) obteve conversão completa em 2 horas de reação, utilizando enzimas em fluidos pressurizados.

- O efeito da temperatura é variável em função dos tipos de óleos e do catalisador empregado, situando, em geral, o valor ótimo próximo à temperatura normal de ebulição do álcool, no caso das reações catalisadas por ácidos e bases. Segundo Darnoko e Cheryan (2000) e Leung *et al.* (2010), a temperatura ótima para a reação utilizando catalisadores químicos situa-se próxima a temperatura normal de ebulição do álcool a ser utilizado na reação, e ela influencia claramente na reação de produção de biodiesel. Temperaturas mais elevadas podem diminuir a viscosidade do óleo e resultar em um aumento da taxa de reação e um tempo de reação mais curto. Em relação a sistemas enzimáticos, a temperatura ótima de operação é função da enzima a ser utilizada como catalisador da reação (Nascimento *et al.*, 2004).

A transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais, também denominada de alcoólise, pode ser conduzida por uma variedade de rotas tecnológicas, em que diferentes tipos de catalisadores podem ser empregados (Ramos *et al.*, 2003). O objetivo do processo de transesterificação é diminuir a viscosidade do óleo (Demirbas, 2008b). Neste sentido, a seguir são apresentadas sucintamente algumas dessas rotas tecnológicas utilizadas para a produção de biodiesel.

A catálise enzimática emprega enzimas como biocatalisadores efetivos por ter alta especificidade ao substrato, grupo funcional específico e estereo especificidade em meio aquoso (Mamuro *et al.*, 2001). A maior parte das pesquisas sobre a transesterificação de óleos vegetais, para a obtenção de biodiesel, utiliza a enzima comercial pura, em diversos meios reacionais (solventes, presença de aditivos, soluções polares-íons, fluídos supercríticos) ou fazendo uso da imobilização enzimática em suportes (Celite e polímeros, principalmente) (Du *et al.*, 2004).

Nelson *et al.* (1996) foram os primeiros a estudar a alcoólise enzimática de triglicerídeos com o objetivo de produzir biodiesel. Um estudo da produção de ésteres etílicos de soja utilizando a enzima comercial Lipozyme IM e n-hexano como solvente é apresentado por Faccio (2004), tendo reportado 96% de conversão, utilizando uma razão óleo e solvente de 1:40, em aproximadamente 5 horas de reação.

Lai *et al.* (2005) estudaram a produção de ésteres metílicos do óleo de farelo de arroz utilizando duas lipases comerciais imobilizadas, a Novozym 435 e MI 60. A

enzima Novozym 435 mostrou-se mais eficaz, conduzindo à conversão superior a 98% em 6 horas de reação, utilizando 5% (m/m) da enzima.

Segundo Balat e Balat (2010), a alcoólise de triglicerídeos com uma lipase é considerada uma das reações mais eficazes para a produção de biodiesel. Embora processos de transesterificação catalisados por enzimas ainda não são comercialmente desenvolvidos, novos estudos foram relatados na literatura. Esses estudos consistem principalmente na otimização das condições de reação (temperatura, solvente, pH, razão molar álcool/óleo, o tipo de microrganismo que produz a enzima, etc) a fim de estabelecer as características adequadas para um processo de produção industrial. A síntese de biodiesel utilizando enzimas, tais como lipases de *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida sp.*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM), *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas sp.*, e *Thermomyces lanuginosus* é bem relatado na literatura (Jeong e Parck, 2007; Shao *et al.*, 2008; Shah e Gupta, 2007; Luo *et al.*, 2006).

Em relação à produção de biodiesel em sistemas enzimáticos utilizando solventes pressurizados, menores quantidades de solvente são utilizadas no processo, além da simples separação dos mesmos do meio reacional (Oliveira e Oliveira, 2000 e 2001; Dalla Rosa, 2006). Altas conversões em ésteres são relatadas para ambos os sistemas, no entanto, requer a utilização de altos percentuais de enzima no meio de reação em relação à massa dos substratos. Dalla Rosa (2006) apresenta a obtenção de biodiesel de soja em propano pressurizado com a enzima comercial *Novozym 435*. Conversões completas da reação são relatadas em tempo de reação de 6 horas, utilizando 3% e 5% (m/m) de enzima, porém quando visto pelo aspecto de um menor tempo de reação, a concentração de 20% de catalisador torna-se apreciável. No emprego de propano pressurizado, a razão solvente:substrato necessária para que boas conversões de ésteres sejam atingidas é de 2:1 promovendo assim conversão de até 82% em ésteres.

A transesterificação enzimática propicia temperaturas amenas de operação, facilidade de separação do glicerol gerado como subproduto e a purificação dos ésteres produzidos e facilmente realizada (Fukuda *et al.*, 2001).

Porém, a produção de biodiesel utilizando enzimas ocorre em velocidade consideravelmente menor que a catálise química por rota alcalina. Isso leva à

necessidade do uso de grandes quantidades de catalisadores, o que aumenta os custos de produção (Moreau, 2008).

A catálise química homogênea (ácida ou básica) é a técnica mais utilizada na reação de transesterificação, pois permite, no caso da catálise alcalina, a obtenção de altas conversões em baixos tempos de reação, como relatam estudos na literatura (Freedman *et al.*, 1986; Noureddini e Zhu, 1997; Darnoko e Cheryan, 2000; Faccio, 2004; Ferrari *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2007).

Na catálise ácida, os ácidos utilizados para a transesterificação incluem sulfúrico, fosfórico, hidrocloreto e ácidos sulfônicos orgânicos. Embora a transesterificação por catálise ácida seja mais lenta que a alcalina (Ma e Hanna, 1999; Srivastava e Prasad, 2000, Balat e Balat, 2010), ela é melhor quando o óleo usado tem alta concentração de ácidos graxos livres e água, como é o caso de óleos utilizados para frituras, uma vez que o catalisador ácido homogêneo pode promover a simultânea transesterificação do triglicerídeo e esterificação dos ácidos graxos livres para ésteres de ácidos graxos (Pinnarat e Savage, 2008). O rendimento obtido é muito elevado (99%), sendo necessárias temperaturas elevadas (acima de 100 °C) e mais de 24 horas para alcançar o referido rendimento (Knothe *et al.*, 2002; Knothe *et al.*, 2005).

Um grande número de catalisadores heterogêneos tem sido relatado na literatura para promover a reação de transesterificação, tal como o trabalho realizado por Kawashima *et al.* (2008), que utilizaram óxidos para promover a reação de produção de biodiesel do óleo de colza; suas atividades catalíticas foram testadas a 60°C, com uma relação molar metanol:óleo de 6:1 e um tempo de reação de 10 horas. Nestas condições, os catalisadores  $\text{CaTiO}_3$ ,  $\text{CaMnO}_3$ ,  $\text{Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$ ,  $\text{CaZrO}_3$  e  $\text{CaO-CeO}_2$  mostraram aproximadamente rendimento de 90% de ésteres metílicos.

Liu *et al.* (2008) utilizaram metóxido de cálcio para promover a transesterificação do óleo de soja, nas condições de 2 horas de reação a 65°C, usando 2% (m/m) de catalisador e proporção em volume de 1:1 de óleo:metanol obtendo um rendimento em ésteres de 98%.

Yang e Xie (2007) utilizaram metal alcalino terroso dopado em óxido de zinco como catalisador heterogêneo para a transesterificação do óleo de soja, sendo que a maior atividade catalítica foi obtida com  $\text{ZnO}$  impregnado com 2,5 mmol de

$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2/\text{g}$ , seguido de calcinação a  $600^\circ\text{C}$  por 5 horas. A reação de transesterificação foi realizada em refluxo de metanol a  $55^\circ\text{C}$ , razão molar óleo:metanol de 1:12, utilizando 5% de catalisador, obtendo uma conversão de 94,7% em biodiesel. Além disso, quando usado tetrahidrofurano como co-solvente a conversão alcançou 96,8%.

O uso de catalisadores químicos heterogêneos na reação de alcoólise de óleos vegetais diminui as dificuldades de separação dos produtos e do catalisador, ocorrendo a menor geração de efluente (Silva, 2009). A literatura indica a utilização de diferentes catalisadores ácidos e básicos (Antunes *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Trakarnpruk *et al.*, 2008), os quais podem ser reutilizados no processo. No entanto, geralmente a catálise química heterogênea apresenta baixos rendimentos de processo, quando comparada à catálise básica homogênea.

Na catálise alcalina, as bases empregadas no processo de transesterificação incluem NaOH, KOH, carbonatos e alcóxidos como metóxido de sódio e butóxido de sódio. Os alcóxidos são os catalisadores mais ativos, conduzindo a rendimentos muito elevados num reduzido tempo de reação (cerca de 30 minutos). No entanto, estes catalisadores são desativados pela água. A utilização de hidróxido de sódio ou potássio como catalisadores é uma boa alternativa aos alcóxidos, apesar de serem menos ativos. De fato, é possível alcançar as mesmas conversões, bastando apenas aumentar a quantidade de catalisador utilizado. No entanto, estes catalisadores apresentam o inconveniente de produzirem água na sua reação com o álcool, ocasionando a ocorrência da hidrólise de alguns ésteres, com posterior saponificação dos ácidos graxos livres. A reação de saponificação ocorre devido ao consumo parcial do catalisador, reduzindo o rendimento da produção de ésteres, além de tornar as etapas de separação e purificação dos produtos complexa, dificultando a recuperação do glicerol devido à formação de emulsões (Pinto *et al.*, 2005). Isto implica em altos custos de produção e energia (Kusdiana e Saka, 2001b), devido à restrição do método ao teor de água e ácidos graxos livres. Na transesterificação catalisada por bases o teor de água deve ser inferior a 0,06% (m/m) e de ácidos graxos livres menores que 0,5% (m/m) (Ma e Hanna, 1999; Zhang *et al.*, 2003).

A transesterificação alcalina ocorre aproximadamente 4000 vezes mais rápida do que a ácida e é a mais empregada comercialmente, pois permite a obtenção de

altas conversões em baixos tempos de reação, como relatam estudos na literatura (Freedman *et al.*, 1986; Nouredini e Zhu, 1997; Darnoko e Cheryan, 2000; Faccio, 2004; Martinez, 2005; Oliveira *et al.*, 2005). Embora a transesterificação química empregando catálise alcalina, resulte em altas taxas de conversão de triglicerídeos em seus respectivos ésteres, quando se trata de custos, tempos de reação, existem alguns inconvenientes ou desvantagens (Madras *et al.*, 2004), a citar:

- Altos gastos energéticos;
- A recuperação do glicerol é difícil e demorada;
- A remoção do catalisador é necessária;
- Requer o tratamento da água alcalina residual;
- Os substratos/reagentes devem ter baixa concentração de água e ácidos graxos livres.

Visando superar os inconvenientes da transesterificação via catálise alcalina e ácida, Kusdiana e Saka (2001a, b) propuseram a produção de biodiesel através da transesterificação não-catalítica com metanol supercrítico. Os autores verificaram que a conversão da reação é praticamente completa, com tempos de residência bastante curtos. Comparado com os processos catalíticos, a purificação dos produtos aparenta simplicidade e é ambientalmente correta. Entretanto, a reação requer temperaturas e pressões elevadas, que acabam conduzindo a elevados custos iniciais de fabricação, processamento e energia (Cao *et al.*, 2005).

### **3.6. Biocombustíveis**

Sabe-se que a maior parte de toda a energia consumida no mundo é proveniente do petróleo, do carvão e do gás natural. Essas fontes são limitadas e com previsão de esgotamento no futuro, portanto, a busca por fontes alternativas de energia é de suma importância. Neste contexto, os óleos vegetais aparecem como uma alternativa para substituição do óleo diesel em motores de ignição por compressão, sendo o seu uso testado no final do século XIX, produzindo resultados satisfatórios no próprio motor diesel. Esta possibilidade de emprego de combustíveis de origem agrícola em motores do ciclo diesel é bastante atrativa tendo em vista o aspecto ambiental, pois o biodiesel é menos poluente, reduzindo as emissões em 40% se comparado ao petróleo e em até 94% as emissões de substâncias

cancerígenas, por ser uma fonte renovável de energia e pelo fato do seu desenvolvimento permitir a redução da dependência de importação de petróleo.

De acordo com Ferrari *et al.* (2005) foi constatado, porém, que a aplicação direta dos óleos vegetais nos motores é limitada por algumas propriedades físicas dos mesmos, principalmente sua alta viscosidade, sua baixa volatilidade e seu caráter poliinsaturado, que implicam em alguns problemas nos motores, bem como em uma combustão incompleta. Assim, visando reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, diferentes alternativas têm sido consideradas, tais como diluição, micro-emulsão com metanol ou etanol, craqueamento catalítico e reação de transesterificação com etanol ou metanol. Entre essas alternativas, a transesterificação tem se apresentado como a melhor opção, visto que o processo é relativamente simples promovendo a obtenção de um combustível, denominado biodiesel, cujas propriedades são similares às do óleo diesel.

Combustíveis também podem ser denominados de biocombustíveis, pois utilizam como matéria-prima produtos naturais capazes de se reproduzir. Exemplos são a cana de açúcar utilizada na fabricação do álcool, vegetais como a mamona, o girassol, o pinhão manso, a canola, o babaçu, o milho e a soja utilizada para a produção do biodiesel, além de outros vegetais que podem também ser utilizados na fabricação do biodiesel. Além disto, o lixo orgânico também pode ser utilizado na produção de biogás, um biocombustível que é produzido a partir de uma mistura gasosa de dióxido de carbono com gás metano. A produção do biogás pode ocorrer naturalmente através da ação das bactérias em materiais orgânicos (lixo doméstico orgânico, resíduos industriais de origem vegetal, esterco de animal).

No trabalho de Srivastava e Prasad (2000) é relatado que os combustíveis alternativos ao diesel devem ser tecnicamente e economicamente competitivos, ambientalmente aceitáveis e facilmente disponíveis. Para atender a estas exigências, os triglicerídeos (óleos vegetais e gorduras animais) e seus derivados podem ser considerados como alternativa viável para substituir o diesel de petróleo. Óleos vegetais são obtidos a partir de uma grande variedade de fontes renováveis.

Os biocombustíveis são apresentados como alternativas aos combustíveis fósseis, pois reduzem significativamente as emissões de gases poluentes, são energias renováveis e o Brasil possui a capacidade para liderar o maior mercado de

energia renovável do mundo, porque o país dispõem de matéria prima renovável em abundância para a fabricação do biocombustível.

### **3.7. Histórico do biodiesel**

Sabe-se que a idéia de aproveitar os óleos vegetais como matéria-prima para combustíveis não é nova, sendo que as primeiras experiências com motores de combustão por compressão foram conduzidas com óleo de amendoim. No ano de 1900, Rudolph Diesel apresentou um protótipo de motor na Exposição Mundial de Paris, que foi acionado com óleo de amendoim, um tipo de combustível obtido através do processo de transesterificação. No entanto, a abundância da oferta de petróleo e o seu preço acessível, determinaram que, nos anos seguintes, os derivados do petróleo fossem os combustíveis preferidos, reservando os óleos vegetais para outros usos.

Em 1937, o cientista belga G. Chavenne descobriu e patenteou o processo de transesterificação, o qual diminuía a viscosidade do óleo vegetal e melhorava seu processo de combustão no interior do motor (Knothe, 2001). Assim, o nome “biodiesel” foi dado ao óleo vegetal transesterificado para descrever seu uso como combustível em motores do ciclo diesel (Cerbio, 2006).

Um dos primeiros usos do óleo vegetal transesterificado foi o abastecimento de veículos pesados na África do Sul, pois a Segunda Guerra Mundial cortou o abastecimento e causou escassez de combustíveis fósseis, estimulando assim a busca de sucedâneos. Porém, o desenvolvimento dos combustíveis de origem vegetal foi praticamente abandonado quando o fornecimento de petróleo foi restabelecido, no final da Guerra, a abundância de petróleo importado, especialmente do Oriente Médio, por preços muito acessíveis, desestimulou a utilização de combustíveis alternativos.

A crise do petróleo iniciada no final de 1973 afetou a todos os países importadores de petróleo, principalmente aqueles em desenvolvimento como o Brasil. Essa crise causou uma necessidade em se obter fontes alternativas de energia. Uma das alternativas colocadas em questão foi a utilização de óleo vegetal ao invés de óleo diesel. Várias universidades brasileiras se dedicaram a estudar a produção de combustíveis substitutivos do diesel, que aproveitassem diversas matérias primas de origem vegetal.

De acordo com Parente (2003), no Brasil, a transesterificação foi estudada pela primeira vez na Universidade Federal do Ceará (UFC), em 1979, que pesquisou um novo processo com base na biomassa para encontrar fontes alternativas de energia. As experiências acabaram revelando um novo combustível originário de óleos vegetais e com propriedades semelhantes às do óleo diesel fóssil, o biodiesel.

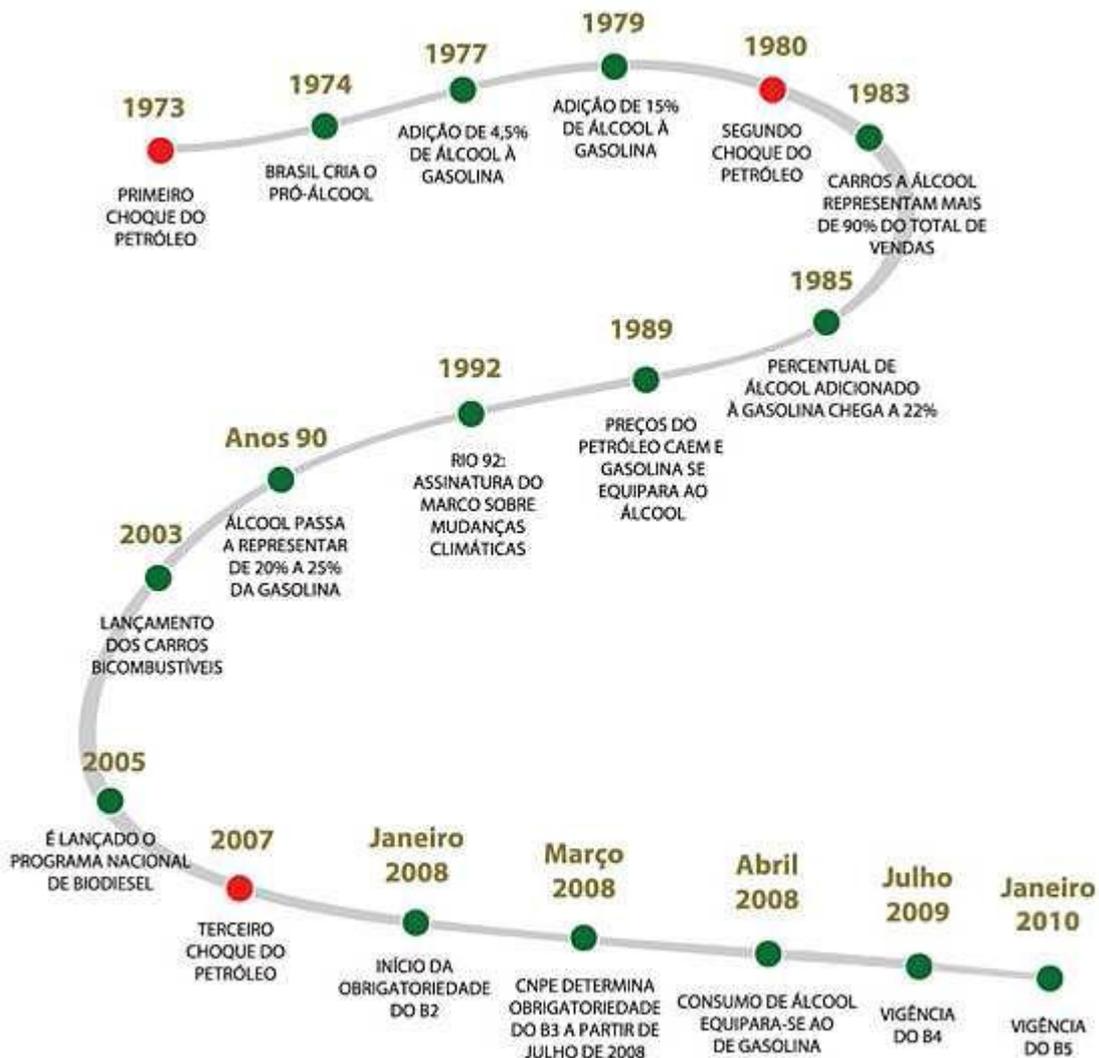
No entanto, a prioridade política foi concedida naquele momento ao Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL), que teve seu auge em meados da década de 80. O Programa Nacional do Álcool tornou realidade a substituição da gasolina pelo álcool combustível. Os testes realizados com diferentes proporções de mistura de biodiesel no diesel combustível mostraram resultados técnicos viáveis. Porém, a redução do preço do petróleo e o elevado custo de produção em relação ao diesel paralisaram o avanço do uso comercial do biodiesel no Brasil e no mundo. Atualmente, os problemas ligados à disponibilidade do petróleo com preços acessíveis e aos seus impactos no meio-ambiente reavivaram essa discussão em todo o mundo (Osaki e Batalha, 2008).

Para estimular a produção de biodiesel no país, o Governo Federal, criou em 2004 o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, por intermédio da lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005 que dispõe da introdução de biodiesel na matriz energética brasileira. Segundo a lei acima destacada, o prazo para o uso do biodiesel no diesel é de 8 anos após a sua publicação, sendo de 3 anos o período, após essa publicação, para se utilizar um percentual mínimo obrigatório intermediário de 2%, em volume ([www.biodiesel.gov.br](http://www.biodiesel.gov.br)).

A partir de 1º de julho de 2008, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil passou a conter, obrigatoriamente, 3% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 2 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicada em março de 2008, que aumentou de 2% para 3% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel (ANP, 2010).

O biodiesel é um combustível produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais que deve atender à especificação estabelecida pela Resolução ANP nº 07/2008. Desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética, publicada no Diário Oficial da União em 26 de outubro de 2009, que aumentou de 4% para 5% o percentual

obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel. A contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis (ANP, 2010). A Figura 5 mostra a evolução energética dos biocombustíveis no Brasil.



**Figura 5:** Evolução energética dos biocombustíveis no Brasil.

Fonte: ANP, 2010.

A venda de diesel B5 – nome da mistura de óleo diesel derivado do petróleo e um percentual (5%, atualmente) de biodiesel – é obrigatória em todos os postos que revendem óleo diesel, sujeitos à fiscalização pela ANP. A adição de até 5% de

biodiesel ao diesel de petróleo foi amplamente testada, dentro do Programa de Testes coordenado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia, que contou com a participação da Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. Os resultados demonstraram, até o momento, não haver a necessidade de qualquer ajuste ou alteração nos motores e veículos que utilizem essa mistura (ANP, 2010).

De acordo com a ANP, o Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2009, de 1,6 bilhões de litros e uma capacidade instalada, em janeiro de 2010, para cerca de 4,7 bilhões de litros. Atualmente o Brasil é o país com o maior potencial para produção de biodiesel, pois possui abundância em terras cultiváveis e etanol. Os brasileiros passaram a dar mais valor aos indícios ambientais e passaram a se conscientizar em relação ao aquecimento global, que está fazendo com que o tema biocombustível seja pauta novamente e foco de novos olhares curiosos e empreendedores.

Os maiores produtores de biodiesel são a União Europeia (UE), Estados Unidos, Brasil, Indonésia, utilizando 8,6 milhões de toneladas de óleo comestível em 2007 para a produção de biodiesel, em comparação à produção mundial de óleo comestível é de 132 milhões de toneladas (Balat e Balat, 2010).

### **3.8. Biodiesel**

O biodiesel é uma evolução na tentativa de substituição do óleo diesel por biomassa, iniciada pelo aproveitamento de óleos vegetais *in natura*. Biodiesel é um combustível biodegradável, renovável e ambientalmente correto, obtido através do processo de transesterificação.

Biodiesel (do grego, bio significa vida, e diesel de Rudolf Diesel) se refere a um diesel equivalente, combustível transformado derivado de fontes biológicas. Quimicamente, o biodiesel é definido como mono - alquil – éster de ácidos graxos de cadeia longa derivada biolípídios renováveis (Demirbas, 2008b). Biodiesel é tipicamente produzido através da reação de um óleo vegetal ou gordura animal com metanol ou etanol, na presença ou ausência de um catalisador, para produção de ésteres metílicos ou etílicos (biodiesel) e glicerina (Demirbas, 2002).

O óleo vegetal sempre foi considerado como uma opção para a substituição do óleo diesel, já que seu poder calorífico é similar. Porém os óleos vegetais *in*

*natura*, não modificados, quando utilizados em motores de compressão interna causam problemas sérios. A alta viscosidade, os ácidos graxos livres presentes nos óleos vegetais, bem como a formação de goma devido à oxidação e polimerização durante armazenamento e combustão, depósitos de carbono no motor e nos injetores e problemas com lubrificante são exemplos de algumas das dificuldades mais comuns.

Os altos pesos moleculares e viscosidade, 10 vezes superior à viscosidade do diesel, causam uma pobre atomização do combustível o que leva à combustão incompleta, baixa volatilidade e aumento da penetração do spray de combustível. Esse aumento da penetração do spray é considerado parcialmente responsável pelas dificuldades encontradas com os depósitos de carbono e o espessamento do óleo lubrificante. O uso prolongado resulta em eventual falha no motor. Em função destes problemas, surgiu então a necessidade de se modificar os óleos vegetais com o objetivo de reduzir sua viscosidade e sua tendência à polimerização. Diversos processos foram sugeridos e o biodiesel foi então produzido a partir de diferentes óleos vegetais e animais (Karaosmanoglu *et al.*, 1996; Muniyappa *et al.*, 1996; Encinar *et al.*, 1999; Ma e Hanna, 1999; Ranases *et al.*, 1999; Alcantara *et al.*, 2000; Fukuda *et al.*, 2001; Monyem e Van Gerpen, 2001; Encinar *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Dorado *et al.*, 2004; Knothe, 2005; Camargos da Silva, 2005).

O biodiesel é um éster de ácido graxo, renovável e biodegradável, obtido comumente a partir da reação química de óleos ou gorduras, de origem animal ou vegetal, com um álcool na presença de um catalisador (reação de transesterificação). Porém, a aplicação direta dos óleos vegetais nos motores é limitada por algumas propriedades físicas dos mesmos, principalmente sua alta viscosidade, sua baixa volatilidade e seu caráter poliinsaturado, que implicam em alguns problemas nos motores, bem como em uma combustão incompleta (Encinar, 1999). Visando reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, melhorar a qualidade de ignição e ajustar a densidade específica, diferentes alternativas têm sido consideradas, tais como diluição, micro-emulsão com metanol ou etanol, craqueamento catalítico e reação de transesterificação com etanol ou metanol (Ma e Hanna, 1999). Porém, os três processos mais investigados a fim de sobrepor os problemas encontrados na substituição do diesel por óleos vegetais são: a pirólise, a micro-emulsificação e a transesterificação.

A pirólise é a decomposição térmica de biomassa a altas temperaturas na ausência de ar. Os produtos formados geralmente são uma mistura de cinzas, líquidos (óleos oxigenados) e gases (metano, monóxido de carbono e dióxido de carbono). A pirólise do óleo vegetal produz diversos compostos que atendem a algumas das exigências para ser utilizado como combustível.

Entretanto, os compostos da pirólise possuem baixa viscosidade e um alto número de cetano comparados aos óleos vegetais puros. Porém, enquanto óleos vegetais que sofrem a pirólise possuem quantidades aceitáveis de enxofre e água, eles são inaceitáveis em termos de cinza, resíduos de carbono e ponto de névoa. Embora os produtos formados sejam quimicamente semelhantes aos derivados de petróleo, cabe salientar o difícil controle na composição do produto final obtido. É provável que os mecanismos de decomposição térmica dos triglicerídeos sejam complexos por causa das muitas estruturas e multiplicidade de possíveis reações que podem ocorrer nesse processo (Ma e Hanna, 1999). A decomposição térmica dos triglicerídeos produz compostos incluindo alcanos, alcenos, alcadienes, aromáticos e ácidos carboxílicos (Balat e Balat, 2010).

Micro-emulsão é definida como uma dispersão coloidal em equilíbrio de microestruturas fluidas e opticamente isotrópicas com dimensões da ordem de 1 a 150 nm, formadas espontaneamente por dois líquidos normalmente imiscíveis e por um ou mais anfifílicos iônicos ou não iônicos. A microemulsão de óleo vegetal com solventes como etanol, metanol e 1-butanol foi estudada e apresentou resultados satisfatórios no conteúdo de cinzas, de enxofre e de ácidos graxos livres, mas a grande quantidade de depósitos de carbono, o aumento da viscosidade do óleo lubrificante e a ocorrência de combustão incompleta em testes de laboratório com motores a diesel inviabilizaram a sua utilização (Ma e Hanna, 1999).

A transesterificação, também conhecida como alcoólise, provoca a diminuição da viscosidade do óleo vegetal assim como melhora o desempenho do mesmo em motores movidos a diesel. Atualmente, o biodiesel é obtido através de reações de transesterificação entre um óleo vegetal e um álcool de cadeia curta na presença de catalisador. Alcoóis de cadeia curta, como o metanol e etanol, também têm sido utilizados na tentativa de se excluir os catalisadores da reação. O Brasil apresenta uma vantagem em relação aos países europeus que utilizam metanol na produção do biodiesel, pois utiliza etanol que, além de apresentar menor toxidez, é

proveniente de fontes renováveis, e é produzido em larga escala no país por tecnologia altamente competitiva (Ma e Hanna, 1999; Fukuda *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Costa, 2004).

Com relação aos catalisadores, a transesterificação pode ser realizada tanto em meio ácido quanto em meio básico, porém, ela ocorre de maneira mais rápida na presença de um catalisador alcalino que na presença da mesma quantidade de catalisador ácido, observando-se maior rendimento e seletividade. Também, pode ser realizada em meio enzimático, e sem a presença de catalisadores, em reações a altas pressões e temperaturas.

O biodiesel pode substituir total ou parcialmente o óleo diesel de petróleo em motores ciclo diesel automotivos como por exemplo caminhões, tratores, camionetas, automóveis, ou estacionários como geradores de eletricidade e calor ([www.biodiesel.gov.br](http://www.biodiesel.gov.br)). Experiências diversas, muitas delas realizadas na década de 80 do século passado, mostram que não são necessárias mudanças nos motores, mesmo com a utilização de biodiesel puro (B100) e muito menos como aditivo, através da mistura em até 5% (B5).

No Brasil existem diversas fontes potenciais de oleaginosas para a produção de biodiesel, e isto se deve à ampla diversidade do ecossistema. A cadeia produtiva do biodiesel tem grande potencial de geração de empregos, promovendo assim a inclusão social. No Semi-Árido, por exemplo, a renda anual líquida de uma família a partir do cultivo de cinco hectares de mamona com uma produção média entre 700 e 1,2 mil quilos por hectare, varia em torno de R\$ 2,5 mil e 3,5 mil.

Para estimular ainda mais esse processo, o Governo Federal lançou o Selo Combustível Social, um conjunto de medidas específicas visando estimular a inclusão social da agricultura, nessa importante cadeia produtiva, conforme Instrução Normativa nº 01, de 05 de julho de 2005. Em 30 de Setembro de 2005, o MDA publicou a Instrução Normativa nº 02 para projetos de biodiesel com perspectivas de consolidarem-se como empreendimentos aptos ao selo combustível social. O enquadramento social de projetos ou empresas produtoras de biodiesel permite acesso a melhores condições de financiamento junto ao BNDES e outras instituições financeiras. As indústrias produtoras também terão direito a desoneração de alguns tributos, mas deverão garantir a compra da matéria-prima, preços pré-estabelecidos, oferecendo segurança aos agricultores familiares. Os agricultores

familiares também terão acesso a linhas de crédito do Pronaf, por meio dos bancos que operam com esse Programa, assim como acesso à assistência técnica, fornecido pelas próprias empresas detentoras do Selo Combustível Social ([www.biodiesel.gov.br/](http://www.biodiesel.gov.br/)).

A composição de alguns ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras é listada na Tabela 3. Como pode ser visto nesta tabela, palmítico (16:0) e esteárico (18:0) são os dois ácidos graxos saturados mais comuns. Da mesma forma, oléico (18:1) e linoléico (18:2) são os ácidos graxos insaturados mais comuns (Demirbas, 2008b).

**Tabela 3:** Composição de ácidos graxos em óleos vegetais e gorduras.

<b>Matéria - prima</b>	<b>16:0</b>	<b>16:1</b>	<b>18:0</b>	<b>18:1</b>	<b>18:2</b>	<b>18:3</b>	<b>Outros</b>
Algodão	28,7	0	0,9	13,0	57,4	0	0
Papola	12,6	0,1	4,0	22,3	60,2	0,5	0
Colza	3,8	0	2,0	62,2	22,2	9,0	0
Açafroa	7,3	0	1,9	13,6	77,2	0	0
Girassol	6,4	0,1	2,9	17,7	72,9	0	0
Gergelim	13,1	0	3,9	52,8	30,2	0	0
Linho	5,1	0,3	2,5	18,9	18,1	55,1	0
Trigo	20,6	1,0	1,1	16,6	56,0	2,9	1,8
Palma	42,6	0,3	4,4	40,5	10,1	0,2	1,1
Milho	11,8	0	2,0	24,8	61,3	0	0,3
Risino	1,1	0	3,1	4,9	1,3	0	89,6
Gordura	23,3	0,1	19,3	42,4	2,9	0,9	2,9
Soja	11,9	0,3	4,1	23,2	54,2	6,3	0
Amendoim	11,4	0	2,4	48,3	32,0	0,9	4,0
Avelã	4,9	0,2	2,6	83,6	8,5	0,2	0
Noz	7,2	0,2	1,9	18,5	56,0	16,2	0
Amêndoa	6,5	0,5	1,4	70,7	20,0	0	0,9
Oliva	5,0	0,3	1,6	74,7	17,6	0	0,8
Côco	7,8	0,1	3,0	4,4	0,8	0	65,7

Fonte: Demirbas (2008b).

Dentre as oleaginosas já investigadas para a produção de biodiesel, destacam-se a soja, o girassol, a mamona, o milho, a canola, o babaçu, o buriti, o dendê, o amendoim, entre outras (Ma e Hanna, 1999) e estudos recentes destacam a utilização de pinhão manso (Achten *et al.*, 2008; Berchmans e Hirata, 2008). No entanto, a escolha da oleaginosa a ser utilizada deve considerar o teor em óleo vegetal, produtividade e adaptação territorial (Ramos *et al.*, 2003). Observando-se os aspectos tecnológicos e econômicos, no âmbito nacional cada região apresenta potencialidade para diferentes tipos de oleaginosas. Por exemplo, no Estado do Rio Grande do Sul as oleaginosas potenciais são a mamona, colza/canola, girassol, soja, milho, nabo forrageiro, entre outras.

Um fato a ser considerado para baixar custos de fabricação e tornar o biodiesel competitivo, é a utilização de óleos degomados que apresentam menor custo que óleos refinados, além da possibilidade da reciclagem de óleos de fritura na produção deste biocombustível (Akgun e Iyscan, 2007; Silva, 2009). Conforme Demirbas (2009a), os custos de produção do biodiesel podem variar bastante conforme a matéria-prima, o processo de conversão, a escala da produção e a região. A média internacional dos preços dos óleos vegetais virgens e usados como matéria-prima para a produção de biodiesel em 2007 é apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4:** Preços médios internacionais dos óleos vegetais virgens e usados como matéria-prima para a produção de biodiesel em 2007.

Matéria – prima	E. U. \$/ton
Óleo de palma	703
Óleo de colza	824
Óleo de soja	771
Resíduos de óleo de cozinha	224

Fonte: Demirbas (2008a).

O custo da matéria-prima é um fator importante na viabilidade econômica da produção de biodiesel. Custos de matéria-prima tipicamente respondem por 80% dos custos totais de produção de biodiesel. No entanto, o preço dos óleos alimentares usados (ou óleos de fritura usados) é 2,5-3,0 vezes mais baratos do que os óleos vegetais virgens, portanto, pode reduzir significativamente o custo de

produção total de biodiesel (Demirbas, 2009b). Patil *et al.* (2010) apontam que um grande obstáculo na comercialização de produção de biodiesel a partir de óleo vegetal comestível é o seu alto custo de produção, devido ao alto custo da matéria prima, mostrando que uma alternativa promissora é o uso de resíduos de óleo de cozinha.

Com relação ao álcool a ser utilizado como agente de transesterificação, podem ser utilizados metanol, etanol, propanol ou butanol; sendo o metanol e o etanol os mais empregados (Macedo e Macedo, 2004).

Em termos nacionais, o etanol destaca-se como forte candidato para ser utilizado como substrato, devido à grande disponibilidade deste produto e por ser obtido de fontes renováveis. Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo (ANP), o Brasil está entre os principais produtores de etanol, e do ponto de vista econômico, a viabilidade do emprego do biodiesel está relacionada com o estabelecimento de um equilíbrio favorável na balança comercial brasileira, visto que o diesel é o derivado de petróleo mais consumido no Brasil, e que uma fração crescente desse produto vem sendo importada anualmente.

A entrada do novo combustível no mercado permitiria a redução da importação do diesel e o incentivo no desenvolvimento da pesquisa e da indústria nacional de equipamentos. Em termos ambientais, a adoção do biodiesel, mesmo que de forma progressiva, ou seja, em adições de 2% a 5% no diesel de petróleo, resultarão em uma redução significativa no padrão de emissões de materiais particulados, óxidos de enxofre e gases que contribuem para o efeito estufa (Ramos *et al.*, 2003 citado por Silva, 2009).

### **3.9. Técnicas de produção de biodiesel**

Na atualidade, o biodiesel é produzido mundialmente em larga escala através da transesterificação de óleos vegetais empregando catalisadores químicos homogêneos (ácidos e bases). Porém, as exigências de remoção do catalisador e a quantidade excessiva de energia empregada são as principais desvantagens de tal processo químico (Mamuro *et al.*, 2001).

Dentre os processos para produção de biodiesel, três deles têm sido mais intensamente investigados na tentativa de superar tais desvantagens e permitir a

utilização de óleos vegetais como matériaprima: a pirólise, a micro emulsificação e a transesterificação enzimática (Fukuda *et al.*, 2001).

### 3.9.1 - Pirólise

A pirólise ocorre pela mudança química causada pela aplicação de energia térmica na presença de ar ou nitrogênio. Muitos investigadores estudaram a pirólise de triglicerídeos com a finalidade de obter combustíveis satisfatórios para os motores diesel. A decomposição térmica dos triglicerídeos produz combinações de várias classes, incluindo alcanos, alquenos, alcadienos e ácidos carboxílicos. Diferentes tipos de óleos vegetais conduzem a diferenças significativas em composição, quando estes são submetidos ao tratamento térmico (Fukuda *et al.*, 2001).

Os produtos da pirólise possuem baixa viscosidade e um alto número de cetano comparados aos óleos vegetais puros. Porém, enquanto óleos vegetais que sofrem pirólise possuem quantidades aceitáveis de enxofre e água, eles são inaceitáveis em termos de cinza, resíduos de carbono e ponto de névoa. Embora os produtos formados sejam quimicamente semelhantes aos derivados de petróleo, cabe salientar o difícil controle da composição do produto final obtido. É provável que os mecanismos de decomposição térmica dos triglicerídeos sejam complexos por causa das muitas estruturas e multiplicidade de possíveis reações que podem ocorrer com os triglicerídeos neste processo (Ma e Hanna, 1999).

### 3.9.2 – Micro-emulsificação

O uso de micro emulsões com solventes como metanol, etanol e 1-butanol é utilizado como meio de resolver o problema de viscosidade alta dos óleos vegetais. As micro emulsões são isotrópicas, claras ou translúcidas, dispersões termodinamicamente estáveis de óleo, um surfactante e freqüentemente uma molécula anfifílica pequena, chamada de cosurfactante (Fukuda *et al.*, 2001).

Combustíveis a base de micro emulsões às vezes são também conhecidos pelo termo “combustíveis híbridos” (Knothe *et al.*, 2002). As micro emulsões podem ser classificadas como não-iônicas ou iônicas, dependendo do surfactante presente (Knothe *et al.*, 2002). O uso de micro emulsões tem a desvantagem de levar a formação de depósitos de carbono.

### 3.10. Vantagens e desvantagens: Biodiesel x diesel

Quando se fala em Biodiesel, uma das suas grandes vantagens é sua adaptabilidade aos motores do ciclo diesel, diferindo, assim, de outros combustíveis limpos como o gás natural ou biogás, que requerem adaptação dos motores. Sua viabilidade, do ponto de vista econômico, está relacionada à substituição das importações e às vantagens ambientais inerentes tais como a redução de emissão de materiais particulados, de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), e de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), os quais são gases responsáveis pelo efeito estufa e chuva ácida.

O biodiesel é um combustível que além de não conter enxofre, reduz significativamente as emissões de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's) e de aldeídos, cujas emissões são compensadas pelo aumento da emissão de acroleína, evitando custos com saúde pública, e podendo gerar recursos internacionais no mercado de carbono (Dermirbas, 2003; Holanda, 2004; Vicente *et al.*, 2004).

O biodiesel oferece diversas vantagens ambientais e de segurança quando comparado com o diesel. A densidade é similar, logo, mistura-se de modo excelente com o diesel e não requer novos postos de abastecimento. Também apresenta um ponto de fulgor muito mais alto, o que diminui a possibilidade de produzir vapor de ar/combustível, possui melhor qualidade de ignição, pois apresenta elevado teor de cetanos, que é um indicador importante na qualidade do combustível para motores de compressão interna (Knothe, 2005; Zappi *et al.*, 2003). Seu armazenamento e manipulação são, portanto, mais seguros que o do diesel. O biodiesel também é superior ao diesel no que diz respeito à sua natureza não tóxica e ao fato de ser biodegradável. O biodiesel é degradado aproximadamente em 95% num período de 30 dias, causando poucos problemas em caso de derramamento acidental e para a saúde do trabalhador. Por produzir menor quantidade de gases do efeito estufa por unidade de energia utilizável e, pela emissão de CO<sub>2</sub> ser inferior ao limite fixado pelas plantas que originaram o combustível, pode contribuir significativamente para a redução do efeito estufa. O biodiesel apresenta também conteúdo praticamente nulo de enxofre (Fukuda *et al.*, 2001; Bondioli, 2004).

Além das vantagens ambientais, a introdução de um novo mercado de biodiesel no mundo terá grande impacto econômico. Os países produtores serão beneficiados com a redução da dependência de importações de combustíveis fósseis, especialmente para o setor de transportes. Incentivos em impostos são compensados por um retorno de 60 a 70% através de redução na importação e do surgimento de novos impostos devido a novas atividades industriais. Atividades industriais essas, que também serão responsáveis pela oferta de novas vagas de emprego (Van Dyne *et al.*, 1996; Encinar *et al.*, 1999; Leung, 2001; Antolin *et al.*, 2002; Vicente *et al.*, 2004).

Além do surgimento de novos empregos na indústria, a expansão da demanda por produtos agrícolas deverá gerar oportunidades de emprego e renda também para a população rural, pois é vital uma reestruturação do sistema produtivo, demonstrando a necessidade por inovações produtivas, inserindo-se aí a constituição de uma cadeia competitiva do biodiesel como resposta de desenvolvimento local ante ao desafio global.

Dentre as desvantagens que o biodiesel apresenta, pode-se destacar:

- Ligeiro aumento no teor de NOX. Nos motores a diesel as emissões de NOx, estão relacionadas com baixos números de cetano, são mais elevadas quando biodiesel é utilizado, apesar de ésteres de ácidos graxos apresentarem valores relativamente altos de número de cetano. As emissões de NOx crescem com o aumento da insaturação dos ésteres e com a diminuição das cadeias, o que as relaciona com o número de cetano. (Knothe, 2005).

- Maior solubilidade em água o que aumenta o risco de corrosão.
- Excesso de glicerina no mercado.

Os usos mais comuns do glicerol no ramo alimentício incluem: bebidas, balas, doces, bolos e comida desidratada para animais. Como intermediário, também é utilizado na produção de margarinas, sobremesas congeladas e revestimento para alimentos. No ramo farmacêutico, o glicerol é amplamente utilizado em cápsulas, supositórios, medicamentos para infecção de ouvido, anestésicos, medicamentos para tosse, emoliente para pele e como veículo para antibióticos e anti-sépticos.

A indústria de cosméticos aproveita a não toxicidade, a capacidade de não provocar irritações e o fato de não possuir odor, utilizando o glicerol como agente umedecedor e emoliente em pasta de dente, cremes e loções para a pele, creme de

barbear, desodorante e maquiagem. É utilizado também para manter o tabaco úmido e macio durante o processamento para impedir a quebra de suas folhas, assim como para adicionar sabor em tabaco de cachimbo e na produção dos filtros de cigarros. Na indústria de papéis, ele é utilizado para reduzir o encolhimento durante a produção do mesmo, além de ser aplicada na produção de papéis à prova de graxa, embalagem para alimentos e na fabricação de tintas para impressoras (Zappi *et al.*, 2003; Bondioli, 2004; Bungay, 2004; Camargos da Silva, 2005).

### 3.11. A importância industrial dos ésteres

Os ésteres são considerados uma das classes mais importantes de compostos orgânicos e podem ser obtidos através de diferentes metodologias: 1) reação entre álcoois e ácidos carboxílicos (esterificação) com a eliminação de água; 2) reações de interesterificação, onde ocorrem trocas de grupos acilas entre ésteres e ácidos carboxílicos (acidólise), entre ésteres e álcoois (alcólise) ou gliceróis (glicerólise) e entre ésteres (transesterificação); 3) através de fontes naturais por destilação e extração com solventes adequados ou por processos químicos e mais recentemente por biocatálise (Adachi e Kobayashi, 2005; Güvença *et al.*, 2002; Chowdary *et al.*, 2001; Alvarez-Macarie e Baratti, 2000).

Os processos enzimáticos apresentam inúmeras vantagens em relação aos processos químicos industriais, conforme descrito anteriormente no item 2.1.5. Por isso, a síntese enzimática do oleato de etila e de outros ésteres do ácido oléico em solventes orgânicos têm sido estudada utilizando-se lipases de pâncreas de porco e de várias fontes microbianas, como as de *Mucor miehei*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus oligosporus*, *R. delemar*, *R. arrizus*, *Candida rugosa*, *Penicillium simplicissium* e *Pseudomonas cepacia* (*Burkholderia cepacia*) (Bucalá *et al.*, 2006; Foresti e Ferreira, 2005; Foresti *et al.*, 2005; Hazarika *et al.*, 2002; María *et al.*, 2002).

Os produtos resultantes de ácidos e álcoois de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são importantes componentes de aromas e flavorizantes utilizados nas indústrias de alimentos, bebidas, cosméticos e medicamentos. Já os produtos de esterificação de ácidos carboxílicos de cadeia longa (12-20 átomos de carbono) com álcoois de cadeia longa são utilizados como lubrificantes e plastificantes em máquinas de alta precisão. Os ésteres resultantes das reações entre ácidos de

cadeia longa com álcoois de cadeia curta (2-8 átomos de carbono) são utilizados nas indústrias como aditivos em alimentos, detergentes, cosméticos e em medicamentos (Güvença *et al.*, 2002). Os ésteres de sacarose, por exemplo, são conhecidos como bons emulsificantes no campo da indústria alimentar, farmacêutica e cosmética; o palmitato de *isopropila* é usado em preparações medicinais para cosméticos, nas quais é necessária uma boa absorção do produto através da pele. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, como os oleatos, palmitatos e linolenatos são os principais constituintes do biodiesel. O oleato de etila, estudado neste trabalho, é utilizado como aditivo biológico, plastificante do policloreto de vinila (PVC), agente resistente à água e como fluido hidráulico (Hazarika *et al.*, 2002).

### 3.12. Catálise enzimática em ultrassom

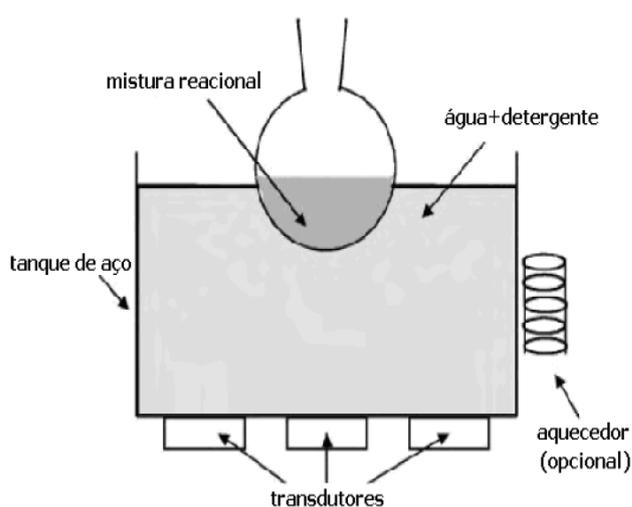
O ultrassom foi descoberto em 1880 por Curie enquanto estudava o efeito piezoelétrico e 14 anos depois Thornycroft e Barnaby observaram que, na propulsão de mísseis, uma fonte de vibração era gerada causando implosão de bolhas e cavidades na água, fenômeno que ficou conhecido como cavitação. Entretanto, somente em 1912 quando Langevin desenvolveu o SONAR (Sound Navigation And Ranging), um aparelho capaz de medir a profundidade do mar, que as ondas na frequência de ultrassom foram aplicadas comercialmente. Em 1927, os efeitos destas ondas foram observados em sistemas químicos e biológicos e em 1950 os primeiros aparelhos geradores de ultrassom foram comercializados (Martinez *et al.*, 2000).

O banho e a sonda de ultrassom ou ponteira ultrassônica são, basicamente, os dois tipos de aparelhos geradores de ondas ultrassônicas (Figuras 6 e 7). A fonte de energia ultrassônica é uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas, este sistema constitui o transdutor piezoelétrico. O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas; as chapas metálicas amplificam estes sinais; o transdutor transmite os impulsos ultrassônicos ao meio reacional (Barbosa e Serra, 1992).

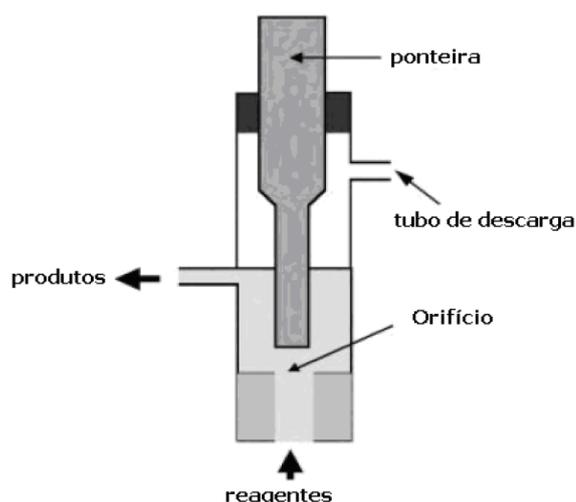
No banho, o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultrassônica é transmitida através de um líquido, normalmente água. Neste caso, há muita dispersão de energia ultrassônica, e conseqüentemente, menor influência nos sistemas reacionais. Na sonda, o transdutor é acoplado na

extremidade do equipamento e entra em contato direto com o sistema reacional, por isso geralmente é mais eficiente (Barbosa e Serra, 1992).

As ondas sonoras dos equipamentos de ultrassom são ondas mecânicas produzidas por deformações provocadas pela diferença de pressão em um meio elástico ou deformável como ar, metais, isolantes, água, entre outros. Estas ondas necessitam de um meio para se propagar, isto é, não se propagam no vácuo (Maia *et al.*, 2000).



**Figura 6:** Banho de ultrassom.



**Figura 7:** Ponteira ultrassônica.

Segundo Mason (2007), o ultrassom pode ser classificado de acordo com o nível de frequência em:

- a) Alta frequência e baixa potência (2-10MHz de ultrassom), utilizado em diagnóstico de imagem e análises químicas;
- b) Baixa frequência e alta potência (20-100kHz de ultrassom), utilizado para a sonoquímica.

Nos últimos anos têm sido relatados estudos com a utilização de ultrassom em reações químicas, bem como em outras áreas da ciência. Ultrassom é considerado uma tecnologia "verde" devido à sua alta eficiência, baixos requisitos instrumentais, redução significativa do tempo de processamento em comparação com outras técnicas convencionais e por, geralmente, possuir um desempenho economicamente viável (Mason, 2007).

A aplicação das ondas sonoras de alta potência se dá nas áreas da Biologia (homogeneização, rompimento de células), Engenharia (limpeza de metal, soldagem, refinamento de metal, perfuração), Industrial (filtração, degaseificação, cristalização, dispersão de sólidos, emulsificação, etc), Física (cavitação, fenômeno de ondas acústicas, velocidade do som), Polímeros (polimerização, despolimerização, degradação do peso molecular), entre outros (Martinez *et al.*, 2000).

Nas reações químicas, o ultrassom de alta potência é o mais usado, pois pode produzir cavitação e/ou formação de microfluxos em líquidos, aquecimento e ruptura de sólidos, além de conferir instabilidade nas interfaces líquido-vapor, líquido-líquido e líquido-sólido (Boldyrev, 1995).

A cavitação, fenômeno de formação e subsequente colapso de microbolhas de gás em um líquido, é a principal responsável pelos efeitos sonoquímicos (Mizukoshi *et al.*, 1999; Raso *et al.*, 1999). Quando atinge um tamanho crítico, a cavidade implode-se liberando calor e pressão muito elevados em intervalos curtos de tempo e em locais específicos do líquido (Korn *et al.*, 2003).

Na cavitação, dois tipos de bolhas são formados: as estáveis e as transitórias. As primeiras oscilam no meio e seu volume cresce com a penetração de gás dissolvido no líquido, na fase de descompressão. Elas precisam de vários ciclos de expansão e compressão para atingir o volume crítico e podem tornar-se transitórias, que são as bolhas com tempo de vida curto, de poucos ciclos, que implodem na fase de compressão, sendo, então, responsáveis pela cavitação (Sinisterra, 1992).

Existem muitos fatores que afetam a cavitação: presença de gás dissolvido, frequência de irradiação, temperatura, viscosidade, tensão superficial, pressão externa e presença de partículas em solução (Raso *et al.*, 1999).

Estudos em sistemas homogêneos indicam que existem duas regiões de reatividade. A primeira corresponde à fase gasosa dentro da bolha, denominada “ponto quente”, onde se inicia a implosão cuja eficiência depende da volatilidade do solvente. Já a segunda, trata-se de uma fina camada líquida em volta da bolha (Liu *et al.*, 2008).

Em sistemas heterogêneos, a destruição da bolha ocorre assimetricamente originando um jato de líquido em direção à superfície sólida, podendo causar erosão localizada. Mas existem também microfluxos de líquidos que acabam por favorecer o

transporte de massa entre a fase líquida e a superfície sólida, acelerando algumas reações químicas (Liu *et al.*, 2008).

Quando em sistemas com líquidos imiscíveis, este colapso das microbolhas pode promover uma eficiente agitação. Com o aumento na velocidade de formação de gotículas microscópicas, com aumento da superfície de contato e das forças coesivas podem ser formadas ainda microemulsões. Espécies reativas e a indução de mudanças conformacionais na estrutura de proteínas também podem ocorrer (Liu *et al.*, 2008).

A irradiação por ultrassom também pode ser um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima, assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas. O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do micro-ambiente em função do efeito cavitacional (Babicz, 2009).

Entretanto, a temperatura pode agir como o fator limitante mais comum para o uso de ultrassom nas reações bioquímicas, uma vez que as enzimas podem ser inativadas termicamente. É preciso destacar que a inativação não ocorre em todos os casos, pois o efeito do ultrassom pode ser destrutivo ou construtivo dependendo da intensidade das ondas.

No entanto, até o presente momento não se conhece o verdadeiro potencial do ultrassom, devido à falta de conhecimento sobre os exatos efeitos moleculares do ultrassom em enzimas e células vivas. Nas aplicações em enzimas, o ultrassom tem mostrado um aumento na estabilidade e atividade catalítica da enzima, bem como a longevidade de biocatalisadores enzimáticos. No entanto, uma melhor compreensão do efeito do ultrassom nas propriedades das enzimas torna-se necessária para desenvolver biocatalisadores mais eficientes com aumento da atividade e estabilidade em longo prazo (Rokhina *et al.*, 2009).

Nos últimos anos têm sido relatados estudos com a utilização de ultrassom em reações químicas, bem como em outras áreas da ciência visando à homogeneização, rompimento de células, emulsificação, esterilização, cavitação, limpeza, soldagem entre outros.

### 3.13. Produção enzimática de biodiesel em ultrassom

A utilização de ultrassom em reações químicas possui algumas vantagens, entre elas: redução do tempo de reação; redução da quantidade de reagentes; aumento de rendimento; seletividade e favorecimento de reações que normalmente não ocorrem em condições normais (MARTINEZ, 2000). Os efeitos físicos do ultrassom que devem ser considerados em processos biotecnológicos são o aumento da temperatura, a melhor transferência de massa e a cavitação (SINISTERRA, 1992).

Biodiesel (ésteres monoalquílicos de ácidos graxos), produzidos a partir de óleos vegetais, gorduras animais e óleos de microalgas por transesterificação ou esterificação com álcoois de cadeia curta, tem sido visto como promissora fonte renovável de combustível devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade, renovabilidade e menor dependência de produtos petrolíferos (Encinar, 1999).

O processo de produção de biodiesel utilizando ultrassom vem como alternativa ao processo convencional de produção, uma vez que as cavitações (formação, aumento e implosão de bolhas no meio reacional) geradas pelo ultrassom, aumentam a miscibilidade entre os reagentes, fornecem energia necessária para a reação, reduzem o tempo de reação e a quantidade de reagentes necessária e aumentam o rendimento e a seletividade da reação (Yu *et al.*, 2010).

Tem sido relatado que o ultrassom exerce um efeito significativo sobre a transesterificação enzimática. A irradiação de ultrassom vem sendo estudada para produção de biodiesel utilizando enzimas, como a Novozym 435 (Sinisterra, 1992; Yu *et al.*, 2010), bem como o uso de catalisadores ácidos ou básicos (Deshmane *et al.*, 2009; Mahamuni *et al.*, 2009). No entanto, pouca investigação tem sido apresentada até a presente data sobre as aplicações de irradiação de ultrassom na produção de biodiesel catalisada por lipases.

Yu *et al.* (2010) estudaram a produção de biodiesel com óleo de soja e metanol em sistema de ultrassom utilizando como catalisador a enzima Novozym 435. Nas condições ótimas de 50% da energia ultrassônica (500W e frequência de irradiação de 40 kHz), 50% de vibração, teor de água de 0,5%, razão molar de 1:1 álcool terc-

amil/volume de óleo, razão molar 6:1 metanol/óleo, 6% de Novozym 435 e 40°C, rendimentos de 96% em ésteres metílicos de ácidos graxos foram obtidos. Nestas condições, a enzima não apresentou perdas de atividade durante os reciclos.

Kumar *et al.* (2011) avaliaram a produção de ésteres metílicos através da metanólise do óleo de pinhão manso onde foi utilizada uma lipase imobilizada obtida a partir *Anterobacter aerogenes*, como catalisador e um sistema de ultrassom. Foi avaliado o efeito do tempo (20-35 min), da razão molar óleo/metanol (1:3 – 1:5), da concentração do catalisador (3 – 6%, com base no peso de óleo) e da amplitude e ciclo do ultrassom (30 – 60% para amplitude e 0.3 – 0.9s para o ciclo). A condição ótima obtida foi em 30 min de reação, razão molar óleo/metanol de 1:4, concentração do catalisador de 5 wt%, ultrassom com amplitude de 50% e ciclos de 0.7s (cada segundo). Nestas condições otimizadas obteve-se o rendimento máximo  $\geq 84,5\%$  de biodiesel.

### 3.14. Considerações sobre o estado da arte

Na revisão bibliográfica apresentada neste capítulo, procurou-se relatar o estado da arte a respeito da produção de biodiesel por transesterificação enzimática. As matérias-primas que são utilizadas na produção de biodiesel são o óleo de soja e o etanol, uma vez que o Brasil é auto-suficiente na produção de etanol e conforme dados da literatura, o Brasil possui tradição no cultivo da soja, além de capacidade de esmagamento e cadeia produtiva bem estabelecida, uma vez que o óleo de soja representa 89,2% da produção brasileira de óleos vegetais. Avalia-se que paralelo ao excedente do óleo de soja no mercado, verifica-se a crescente demanda de óleos vegetais para a produção de combustíveis alternativos, devido à necessidade emergente de implantação de unidades produtoras de biodiesel. Diante desse cenário, o uso do óleo de soja para a produção de biodiesel torna-se uma alternativa interessante no contexto nacional atual. A mesma situação se aplica à utilização de etanol como substrato para produção de biodiesel em substituição ao metanol, álcool convencionalmente utilizado para tal fim.

O emprego de enzimas como catalisadores nas reações de produção de biodiesel apresenta muitas vantagens em relação aos catalisadores químicos homogêneos. Vários pesquisadores relatam o uso de enzimas aplicadas às reações de transesterificação em solventes orgânicos. No entanto, poucos trabalhos têm sido

apresentados na literatura no que se refere à produção enzimática de biodiesel em meio orgânico, com auxílio de ultrassom, como tentativa a reduzir a resistência à transferência de massa neste sistema reacional. Este fato, aliado à fundamentação teórica apresentada neste capítulo, permite justificar plenamente a realização deste trabalho, cujo maior objetivo reside no estudo da produção enzimática de biodiesel sem solvente orgânico em banho de ultrassom, no que diz respeito à otimização das condições operacionais do processo fazendo uso da ferramenta do planejamento de experimentos e avaliação do reuso do catalisador na condição otimizada do processo.

## Capítulo 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo serão apresentados os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento de cada etapa deste trabalho, bem como os procedimentos laboratoriais adotados durante a fase experimental, englobando desde os testes preliminares até a estratégia adotada para a otimização do processo de obtenção de biodiesel enzimático em banho de ultrassom.

### 4.1. Materiais

Para a realização deste trabalho, nas reações de transesterificação utilizou-se como substratos óleo de soja comercial (Marca Soya) sem nenhum tratamento prévio, álcool etílico (Merck, 99,9 % de pureza) e a enzima comercial *Novozym 435*, produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, produzida pela Novozymes Brasil/ Araucária-PR. A enzima atua randomicamente nas 3 posições do triglicerídeo.

A lipase imobilizada é constituída por partículas de formato esferoidal, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9mm, e densidade de aproximadamente 430kg/m<sup>3</sup>. Esse produto é fornecido com quantidade de água entre 1 e 2% (NOVO NORDISK, 1992).

Na quantificação dos produtos da reação foram usados padrões comerciais dos ésteres majoritários do biodiesel de soja e o padrão interno heptadecanoato de metila, com procedência Sigma-Aldrich e como solvente n-heptano (Sigma-Aldrich, 99,9% de pureza).

Para a determinação da atividade enzimática os seguintes reagentes/solventes foram utilizados: acetona P.A ACS (Vetec, 99,5%), álcool etílico (Merck, 99,9 % de pureza) e hexano (Nuclear, P.A). Ácido láurico (Vetec, 98% CG) e álcool n-propílico normal (Nuclear, P.A 99,5%) foram utilizados como substratos para dosagem da atividade de esterificação das lipases.

## 4.2. Procedimento experimental

### 4.2.1 - Estudo cinético prévio (destrutivo)

Os experimentos para produção enzimática de biodiesel foram realizados em um banho de ultrassom (Unique ultraSonic Cleaner, modelo: USC-1800A, frequência US: 40KHz, potência US: 132W), conforme apresentado na Figura 8.



**Figura 8:** Aparato experimental utilizado para a produção enzimática de biodiesel enzimático em banho de ultrassom.

Inicialmente realizou-se um estudo cinético prévio (destrutivo), para determinar o melhor tempo de reação, onde os experimentos foram realizados em um balão de 50mL, onde foi colocado 20% da enzima *Novozym 435* (p/p em relação à massa de substratos) na razão molar óleo/etanol de 1:3, temperatura de 70°C e potência de ultrassom correspondente à 40% da capacidade máxima do equipamento (132W). Esta condição foi avaliada tendo em vista resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa, relativos às conversões satisfatórias em biodiesel, a partir de óleo de soja e etanol, em sistema orgânico (n-hexano), sem ultrassom.

Experimentos destrutivos foram realizados, sendo a amostragem realizada nos tempos de 15 e 30 minutos e 1, 2, 4, 6 e 8 horas de reação, em meio reacional livre de solvente orgânico.

#### 4.2.2 - Planejamento de experimentos

##### 4.2.2.1 - Planejamento Plackett & Burman

Após determinar o tempo a ser fixado nesta etapa do trabalho, realizou-se um delineamento de Plackett & Burman (PB-12) com 12 ensaios, apresentando ponto central em triplicata, onde foi avaliada a influência de cinco variáveis (Temperatura 40 a 70°C; Razão Molar (óleo/etanol) 1:3, 1:6,5 e 1:10; Concentração da Enzima *Novozym 435* de 5 a 20% (p/p em relação aos substratos); Potência 40, 70 e 100% e Concentração de Água de 5% a 10% (p/p em relação aos substratos), mantendo-se fixo o tempo de reação em 1 hora. As variáveis estudadas e os respectivos níveis são apresentados na Tabela 5. Os resultados foram analisados usando o software Statistica® 7.0 Statsoft Inc., e através do gráfico de Pareto, determinaram-se as variáveis significativas e não significativas.

**Tabela 5:** Variáveis e níveis estudados no planejamento Plackett & Burman para produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente orgânico e em banho de ultrassom.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	40	55	70
Razão molar óleo:etanol	1:3	1:6,5	1:10
[E] (%p/p, em relação à massa de substratos)	5	12,5	20
[H <sub>2</sub> O] (%p/p, em relação à massa de substratos)	0	5	10
Potência (%)	40	70	100

##### 4.2.2.2 - Delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>

Após análise estatística do planejamento experimental apresentado anteriormente, realizou-se um delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> (DCCR), totalizando 11 experimentos, visando otimizar a conversão em biodiesel no sistema reacional estudado. O tempo total de reação foi fixado em 1 hora e as faixas de temperatura e concentração de enzima estudadas nesta etapa são apresentadas na Tabela 6. Os resultados foram analisados usando o software Statistica® 7.0 Statsoft

Inc., e através da análise de superfície de resposta, determinaram-se os valores ótimos destas variáveis para máxima produção de biodiesel.

**Tabela 6:** Variáveis e níveis estudados no planejamento no planejamento fatorial completo  $2^2$ , para otimização da produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente e em banho de ultrassom.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura (°C)	60	63	70	77	80
[E] (%p/p, em relação à massa de substratos)	10	13	20	27	30

#### 4.2.3 - Estudo cinético em termos de concentração de enzima

Em seguida, realizou-se um estudo cinético para verificar a concentração de enzima que conduzisse à maior conversão em biodiesel. Com a condição já otimizada através do delineamento composto central rotacional  $2^2$  (DCCR), em 70°C, 40% de potência de 132W e razão molar (óleo:etanol) 1:3, foi variado o tempo em 15 e 30 minutos e em 1 a 6 horas e a concentração da enzima em 10%, 20%, 25%, 30% e 40% (p/p).

#### 4.2.4 – Avaliação do reuso do biocatalisador *Novozym 435*

Para realização do reuso da enzima *Novozym 435*, foi utilizada a condição experimental de 1 hora de reação, 70°C, 40% de potência de 132W, razão molar (óleo:etanol) 1:3 e concentração de enzima de 20% (p/p em da enzima *Novozym 435*, em relação à massa de substratos).

Para recuperar a enzima ao final de cada reação, o biocatalisador imobilizado foi separado do meio reacional por filtração com papel de filtro. Em seguida, realizou-se duas lavagens com 10mL de hexano e filtrou-se a vácuo a suspensão obtida. Este procedimento é uma variação do método desenvolvido por Castro e Anderson (1995), que utiliza heptano. Após este procedimento a amostra foi evaporada no rotavapor (marca Fisatom, modelo 550). Posteriormente secou-se a enzima em estufa (modelo JP 101, marca J. Prolab) a 40°C durante 1 hora. A enzima recuperada foi mantida em dessecador por 24 horas. Após este período, a

atividade da mesma foi determinada para verificar possíveis perdas durante a reação e torná-la apta para a reutilização.

A medida de atividade foi realizada no início e no final das reações com a enzima recuperada. Antes de iniciar o procedimento de medida de atividade, as enzimas imobilizadas foram secas em estufa a 40°C durante 1 hora (Oliveira, *et al.*, 2006), para eliminação de possível umidade livre.

#### 4.2.5 - Determinação da atividade enzimática de lipases

O procedimento adotado para a determinação da atividade da enzima *Novozym 435*, foi descrita por Feirhmann (2005). Sucintamente, a atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação entre o ácido láurico e álcool n-propílico, à temperatura de 60°C, com a enzima (0,195g) mantida sob agitação por 40 minutos. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator de vidro aberto de 20mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático. Alíquotas de 150µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e foram diluídas em 20mL de acetona-etanol (1:1) com finalidade de cessar a reação e a extração dos ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,01N. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1mmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas.

A Equação 1 abaixo foi empregada para o cálculo da atividade da lipase:

$$A = \frac{N(V_0 - V_40)}{m \cdot t}$$

Equação (1)

Onde:

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

V0 = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL)

V40 = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra após 40 minutos de reação (mL)

m = massa de enzima utilizada na reação (g)

t = tempo de reação (min)

#### 4.2.6 - Quantificação dos ésteres etílicos de ácidos graxos

Após a coleta das amostras procedia-se a evaporação do álcool etílico não reagido e do hexano utilizado para lavar a enzima em rotavapor (Marca Fisatom, modelo 550) na temperatura de 60°C, conforme Figura 9.



**Figura 9:** Aparato experimental utilizado para a evaporação do álcool etílico não reagido e hexano após lavagem da enzima.

Para a quantificação de ésteres de ácidos graxos as amostras foram previamente preparadas, transferindo-se 250mg das mesmas para um balão volumétrico de 10mL completando o volume até o menisco do mesmo com n-heptano. Após, transferia-se uma alíquota de 50µL desta solução para um balão volumétrico de 1mL e adicionava-se 50µL do padrão interno heptadecanoato de metila (C17:0) na concentração de 5000mg/L e completava-se o volume com n-heptano. As amostras de cada experimento foram preparadas em triplicata.

Preparo de padrão interno: Uma alíquota de 0,05 g de heptadecanoato de metila foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL e aferido o volume com heptano.

Em relação ao método cromatográfico utilizado para quantificação dos ésteres de ácidos graxos utilizou-se o método conforme a norma EN 14 103 (2001). Sendo que o mesmo consiste na injeção de amostras (1mL) em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG/FID Shimadzu modelo GC 2010) equipado

com injetor automático (Split) AOC-20i e uma coluna capilar RTX - Wax (30m x 0,25mm x 0,25mm) nas condições cromatográficas descritas pela norma EN 14103 (2001), do Comitê Europeu para Padronizações: temperatura inicial da coluna de 120 °C, permanecendo por 1 minuto nesta condição, aumentando-se a temperatura a uma taxa de 15°C/minuto até 180°C, permanecendo assim por 2 minutos, e aumentando novamente a uma taxa de 5°C/min até 250°C permanecendo 2 minutos nesta condição. Ar sintético e nitrogênio eram utilizados como gás de arraste e a temperatura do injetor e detector eram 250°C e a taxa de split de 1:50.

A solução preparada era então injetada em cromatógrafo gasoso em triplicata e o cálculo do teor de ésteres etílicos da amostra era obtido através da Equação 2, com base na EN 14103 (2001):

$$Esteres (\%) = \left( \frac{\sum A - API}{API} \frac{CPI}{C_{amostra}} \right) * 100 \quad \boxed{\text{Equação (2)}}$$

onde:

$\sum A$  = Somatório das áreas correspondentes aos picos dos ésteres (C14:0 à C24:0) e do padrão interno (C17:0);

$A_{PI}$  = Área do padrão interno (C17:0 – Heptadecanoato de metila);

$C_{PI}$  = Concentração do Padrão Interno na amostra injetada [mg/L];

$C_{amostra}$  = Concentração da amostra injetada [mg/L].

A conversão do triglicerídeo em ésteres (rendimento em ésteres) foi calculada conforme exposto por Silva *et al.* (2009), que considera a estequiometria da reação, mais precisamente a relação entre a concentração de ésteres obtida via análise cromatográfica com o teor de glicerol para 100% de conversão em ésteres.

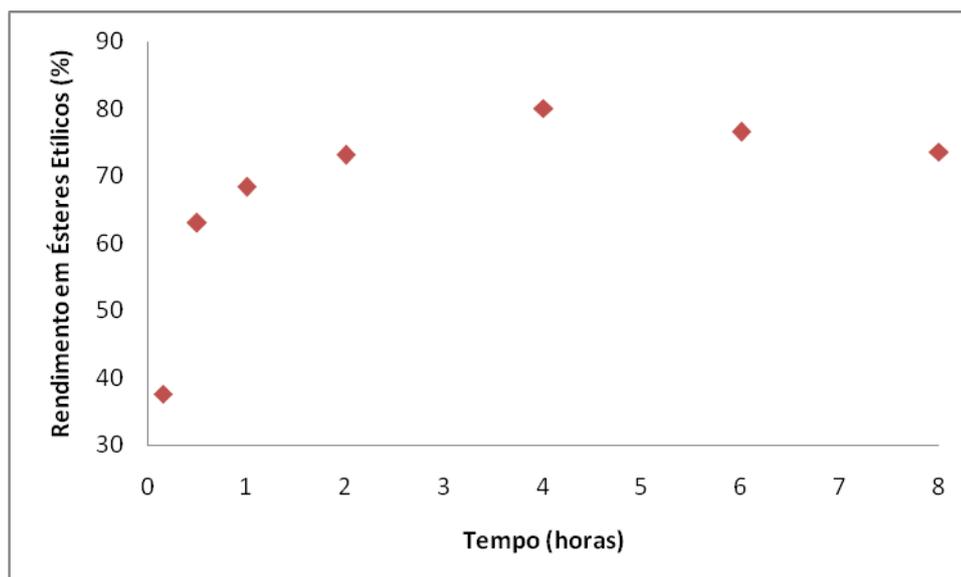
## Capítulo 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos no decorrer deste trabalho. Serão discutidos os resultados obtidos desde os testes cinéticos preliminares até a otimização do processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom. Para encerrar o estudo serão apresentados os resultados relativos ao estudo da avaliação da reutilização da enzima *Novozym 435*.

### 5.1. Estudo cinético prévio para determinação do tempo reacional

Nas reações de transesterificação enzimática em ultrassom foi avaliado o rendimento em ésteres etílicos produzidos durante a avaliação cinética do processo de produção de biodiesel em sistema livre de solvente. Este estudo teve como objetivo determinar o tempo para consecução dos experimentos visando a otimização da conversão do processo. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 10.

Os experimentos foram realizados em um balão de 50mL, onde foi colocado 20% da enzima *Novozym 435* (p/p em relação à massa de substratos), na razão molar óleo/etanol de 1:3, temperatura de 70°C e potência de ultrassom correspondente à 40% da capacidade máxima do equipamento (132W).



**Figura 10:** Rendimento em ésteres etílicos obtidos na transesterificação enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.

De acordo com a Figura 10 pode-se observar que o rendimento em ésteres etílicos foi de 37,60% em 15 minutos, 62,98% em 30 minutos, 68,38% em 1 hora, 73,10% em 2 horas, 80,04% em 4 horas, 76,56% em 6 horas e 73,59% em 8 horas. O tempo de 4 horas de reação conduziu ao maior teor de ésteres etílicos. Nos intervalos de tempos de 6 e 8 horas observa-se uma pequena queda em relação ao teor de ésteres. Analisando os resultados obtidos, percebe-se que não há uma diferença considerável no rendimento em ésteres etílicos obtidos a partir de 30 minutos de reação, permitindo concluir que não existe a necessidade, neste momento, de se realizar os experimentos em um tempo maior (4 horas) de reação, já que em 1 hora o resultado obtido é assumido como satisfatório, uma vez que é melhor e economicamente viável trabalhar com um tempo menor de reação. Desta forma, as etapas posteriores deste trabalho, relacionadas à otimização da produção de biodiesel, foram conduzidas em tempo fixo de 1 hora de reação. Conversão satisfatória, em torno de 70%, foi obtida neste teste prévio, demonstrando o potencial de aplicação do ultrassom para este sistema, mesmo em sistema livre de solvente.

Poucos trabalhos foram encontrados na literatura relacionados à produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.

Liu *et al.* (2008) estudaram o efeito do ultrassom na hidrólise de óleo de soja em sistema livre de solvente, utilizando lipase de *Candida lipolytica*. Os autores relataram que, comparando com a reação conduzida em shaker, as taxas de reação aumentaram em 94% para a reação realizada em 1 hora, 64% na reação de 2 horas, 58% na reação de 3 horas, 41% na reação em 4 horas e de 34% na reação de 5 horas. A taxa de reação em 5 horas em banho ultrassônico foi 2,3 vezes maior que a obtida em 12 horas de reação em shaker. Os autores concluíram que estes resultados podem ter sido verificados provavelmente devido ao fato de o ultrassom induzir a uma melhor dispersão e diminuir a aglomeração da enzima.

Ceni (2010) em seu trabalho apresenta valores de conversão de benzoato de 1-glicerila em reação conduzida em ultrassom (37kHz e 132W) com 5,5% (m/m) de enzima *Novozym 435*, razão molar de 1:1 (benzoato de metila:glicerol) e temperatura de 50°C. A maior conversão foi na condição de adição de solvente e agitação, com tempo reacional de 6 horas. Nesta condição alcançou-se uma conversão de 10,9%. Nos três tempos reacionais estudados (2, 4 e 6 horas) a condição livre de solvente foi a que apresentou as menores percentagens de conversão. Entretanto, no tempo de 2 horas, a reação livre de solvente conduzida com agitação obteve a melhor conversão (7,4%) quando comparada com as conversões obtidas com adição de solvente, com e sem agitação, e com a condição livre de solvente sem agitação. Nas reações conduzidas por tempo de 4 horas, os melhores resultados foram alcançados com adição de solvente e com adição de solvente com agitação mecânica.

No trabalho realizado por Faccio (2004) foi estudada a produção de biodiesel com duas lipases (*Novozym 435* e *Lipozyme IM*) onde os ensaios foram realizados em Erlenmeyers e incubados em agitador rotativo (shaker) à 200rpm por 8 horas e em todos os experimentos foi utilizado 40 mL de solvente n-hexano. Foi observado para o sistema contendo óleo de soja-*Lipozyme IM* a condição otimizada foi 35°C, 20%p/p de enzima, razão molar óleo-etanol de 1:3 e 10% p/p de água adicionada. A maior conversão observada experimentalmente foi de 95,6%. Utilizando o mesmo procedimento, a condição otimizada para o sistema óleo de soja-*Novozym 435*, foi: temperatura de 65°C, concentração de enzima 5% p/p, 0% p/p de água adicionada e razão molar óleo-etanol de 1:3. A maior conversão observada experimentalmente foi de 11,8%.

Oliveira e Oliveira (2001), Oliveira e Alves (2000) e Oliveira e Alves (1999) realizaram estudo da alcoólise enzimática do óleo de dendê e etanol em solvente orgânico (n-hexano). Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 125 mL onde uma concentração pré-estabelecida de enzima foi adicionada à mistura óleo-etanol e 40 mL de n-hexano, os frascos foram mantidos sob agitação de 200 rpm por 6 horas em shaker com controle de temperatura. Na reação catalisada pela enzima Lipozyme IM obteve-se 77,5% de conversão em etil éster na condição experimental de 40°C, concentração de enzima de 5%, sem adição de água e razão molar óleo-etanol de 1:3. Já para a enzima Novozym 435 obteve-se conversão de 58,3% de conversão na condição experimental de 40°C, concentração de enzima de 20%, sem adição de água e razão molar de 1:10.

Conforme citado no trabalho de Batistella (2011), na transesterificação de óleo de soja utilizando solvente orgânico (n-hexano) e por meio de sistema ultrassônico, houve uma tendência ascendente para os catalisadores (enzimas *Lipozyme RM IM* e *Novozym 435*). Ocorreu um aumento no rendimento nas primeiras 4 horas de reação, utilizando a enzima *Lipozyme RM IM* o rendimento foi de aproximadamente 55% e para a *Novozym 435* o rendimento foi de aproximadamente 37%. As condições dos experimentos foram: razão molar (1:3) (óleo/etanol) (R.M), temperatura de 65°C (T), concentração da enzima de 5% (p/p) [E], sem adição de água e 100% de potência de ultrassom (frequência de 37 kHz e potência de 132 W).

Yu *et al.* (2010) estudaram a produção de biodiesel com óleo de soja e metanol em sistema de ultrassom utilizando como catalizador a enzima *Novozym 435*. Os autores obtiveram, nas condições ótimas [50% da energia ultrassônica (500W e frequência de irradiação de 40 kHz), 50% de vibração, teor de água 0,5%, razão molar de 1:1 álcool terc-amílico/volume de óleo, razão molar 6:1 metanol/óleo, 6% de *Novozym 435* e 40°C], 96% de conversão de ésteres metílicos de ácidos graxos e a enzima não apresentou perdas de atividade durante os vários ciclos de uso estudados.

Shishir *et al.* (2010) compararam a conversão de metil ésteres utilizando a ponteira ultrassônica e o método de agitação convencional. Para tanto foi utilizado como catalizador hidróxido de potássio 1%, razão molar metanol/óleo 6:1, potência do ultrassom de 200W, agitação de 1000rpm e 40 minutos de reação, onde foi

obtido com o sistema de ultrassom 89,5% de conversão e com o método convencional 57,5%.

Comparando este trabalho com os resultados do teste cinético realizado, onde utilizou-se razão molar etanol/óleo 3:1, temperatura de 70°C, potência do ultrassom 40% de 132W e 20% de enzima (p/p em relação à massa de substratos) em 30 minutos e 1 hora de reação, obteve-se um teor de ésteres etílicos de 62,98% e 68,38%, respectivamente, demonstrando desta maneira que em menores níveis de razão molar e potência de ultrassom, resultados promissores também foram obtidos.

Em estudo cinético da hidrólise de óleo de soja catalisada por *Lipozyme TL IM* em ultrassom, Babicz *et al.* (2010) observaram que o rendimento de diacilglicerídeos foi de 40% em 1,5 horas e após o rendimento não foi superior a 23, 26, 26% (3, 4,5 e 6 horas, respectivamente). Também avaliaram a produção de diacilglicerol, em reação catalisada por *Novozym 435* em ultrassom, com frequência de 47kHz e potência de 125W, agitação mecânica de 700rpm, 1% m/m de enzima e tempo reacional de 90 minutos, onde foi observada conversão de 32% de diacilglicerol.

Xiao *et al.* (2005) investigaram a transesterificação enzimática de glicose e divinilbutanodioato utilizando as enzimas protease alcalina de *Bacillus subtilis*, *Novozym 435*, *Lipozyme (Mucor miehei)*, lipase AY30, lipase de pâncreas de porco e protease de *Aspergillus oryzae* em banho de ultrassom. A protease alcalina apresentou conversão de 78% e a *Novozym 435* 8,5% depois de 2 horas nas mesmas condições reacionais (100W e 20Hz). As demais enzimas não apresentaram formação do produto após 8 horas de reação.

Quando comparado a influência de diferentes ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia em protease alcalina de *Bacillus subtilis* em piridina e a lipase *Novozym 435* em terc-butanol realizadas em ultrassom, observa-se que a protease tem maior afinidade por ácidos graxos com cadeias curtas apresentando conversões de aproximadamente 85% de éster de glicose. Já a lipase apresentou afinidade com ácidos graxos de cadeias curtas e médias com conversões de aproximadamente 80 e 65%, respectivamente (Xiao *et al.*, 2005).

Ribeiro *et al.* (2001) avaliaram a resolução enzimática em ultrassom de etil 3-hidroxi-3-fenilpropanoato utilizando esterase de fígado de porco, lipase de *Pseudomonas cepacia* e lipase de *Candida rugosa*. Os autores compararam a conversão do produto em ultrassom e agitação magnética, observando que em

todos os experimentos ocorreu uma redução no tempo de reação da hidrólise enzimática quando utilizado o ultrassom, mas sem mudanças significativas nos rendimentos ou no excesso enantiomérico do produto.

Zhu *et al.* (2010), estudando a produção de ésteres de frutose utilizando a lipase *Novozym 435* em ultrassom, observaram a intensidade do som de 10KHz, 0,16W.m<sup>-2</sup> e 40KHz, 1W.m<sup>-2</sup> como sendo as melhores condições para a produção de ésteres de frutose, havendo um aumento exponencial da conversão até 8 horas, e após observou-se um rápido aumento na produção de monoésteres. Este resultado ressalta o fato de que o ultrassom pode melhorar a transferência de massa, “limpar” o canal das enzimas, e promover a remoção do produto ao redor ou dentro do lipase imobilizada.

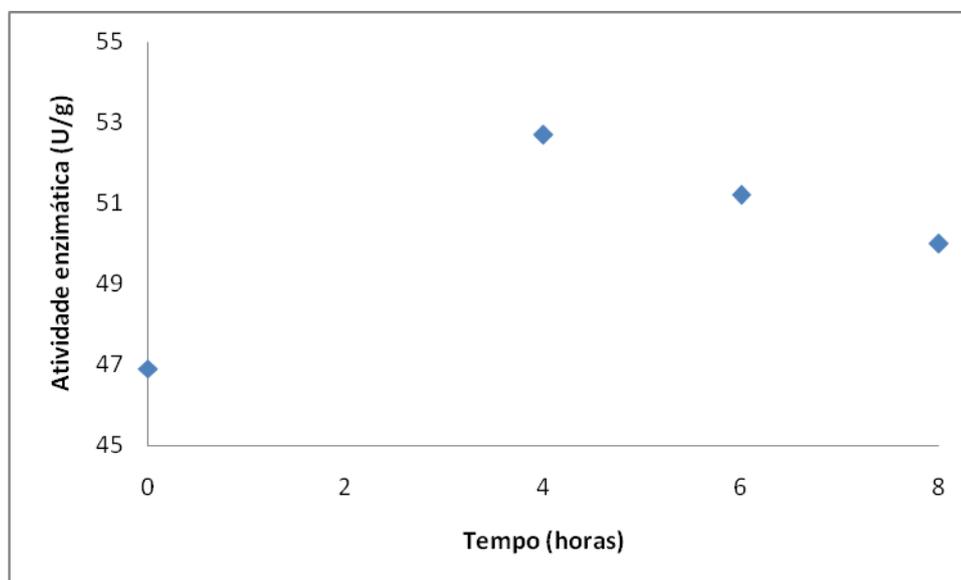
Santos *et al.* (2010) avaliaram a produção de éster metílico a partir de óleo de *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) e metanol, utilizando ultrassom. Os autores relataram 98% de conversão após 90 minutos com frequência de 40kHz e temperatura de 30°C. Hanh *et al.* (2009) estudaram a produção de ésteres etílicos de ácidos graxos. A condição ótima do processo de esterificação foi com razão molar de álcool e ácido oléico de 3:1, 5% de ácido sulfúrico a 60°C de temperatura por 2 horas de reação. Foram obtidas conversões de cerca de 80% utilizando n-propanol, cerca de 70% utilizando n-butanol e cerca de 60% utilizando 2-propanol como solvente.

Podemos observar na Tabela abaixo apresentada por Lerin (2010) os valores obtidos de conversão em ascorbil palmitato em ultrassom (37 kHz e 132 W) com 5% m/m de enzima *Novozym 435*, razão molar de 1:9 (ácido ascórbico:ácido palmítico) e temperatura de 70°C em 2 horas de reação.

**Tabela 7:** Valores de conversão de ascorbil palmitato em ultrassom (37 kHz e 132 W) com 5% m/m de enzima *Novozym 435*, razão molar de 1:9 (ácido ascórbico:ácido palmítico) e temperatura de 70°C em 2 horas de reação.

Condição reacional	Conversão em ascorbil palmitato (%)
Terc-butanol	25,07
Terc-butanol + agitação	20,86
Sem solvente	0
Sem solvente + agitação	0

A Figura 11 apresenta os resultados da atividade enzimática obtidos durante a avaliação cinética preliminar do processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.



**Figura 11:** Atividade de esterificação da *Novozym 435* após cada ponto cinético, apresentado na Figura 10.

Conforme a Figura 11 pode-se verificar que a enzima não apresentou perdas de atividade no final de cada reação, onde obteve-se aproximadamente 52,7U/g em 4 horas, 51,2U/g em 6 horas e 50U/g em 8 horas de reação, demonstrando potencial para ser utilizada em sucessivos ciclos de uso. Após 8 horas de irradiação pode-se observar uma pequena perda na atividade enzimática devido a provável colapso cavitacional.

A atividade inicial da *Novozym 435* foi de aproximadamente 46,9U/g. Conforme relatam os autores, Zhu *et al.* (2010) e CHISTI (2003) a aplicação de ultrassom para a síntese enzimática catalisada em uma fase não aquosa pode aumentar a atividade da enzima e também pode melhorar a transferência entre o substrato e o sítio ativo da enzima. Tendo em vista estes aspectos, a tecnologia ultrassônica tem começado a ser explorada mais largamente no campo da biotecnologia, através da combinação da tecnologia ultrassônica e biotecnologia,

usando a energia física do ultrassom sobre as células para criar mudanças conformacionais na estrutura das enzimas, alterando assim a atividade da enzima.

Estudos de Ishimori *et al.* (1981) e Sakakibara *et al.* (1996) observaram aumento de atividade de enzimas conduzidas em reações com o auxílio do ultrassom, em meio contendo tampão. O primeiro trabalho relatou o aumento da atividade de  $\alpha$ -quimotripsina, enquanto o segundo demonstrou que a atividade da invertase aumentou com o uso de baixas intensidades de ultrassom.

De acordo com o trabalho de Batistella (2011), a atividade relativa da *Novozym 435* em sistema de ultrassom com o uso de etanol como solvente levou a uma atividade relativa de 55% após 10 horas de contato. Os solventes iso-propanol, terc-butanol e n-hexano levaram a um aumento na atividade de esterificação de cerca de 20%, mantendo essa atividade após 10 horas de contato. O uso de iso-octano conduziu a um aumento gradual na atividade da lipase em relação ao tempo de contato, atingindo um valor máximo de atividade relativa de 126%. Os solventes que apresentaram aumento na atividade da lipase foram terc-butanol ( $\log P = 0,8$ ) e n-hexano ( $\log P = 3,50$ ), são mais eficazes, pois conseguiram manter a atividade das enzimas durante o tratamento com ultrassom. Com base nos resultados apresentados por Batistella (2011), pode-se dizer que o solvente exerce influência direta sobre a atividade, estabilidade e especificidade da enzima (De Paula *et al.*, 2005).

Tsukamoto (2006) afirma que os solventes com  $\log P < 2$  não são adequados para fins biocatalíticos, enquanto aqueles com  $\log P > 4$  (apolares) podem ser considerados ideais. Esse comportamento, entretanto, não foi observado neste trabalho, uma vez que os melhores resultados foram obtidos com solventes de valores extremos de  $\log P$ .

Ceni *et al.* (2010) também mostraram que a atividade residual de esterificação da *Novozym 435* após o tratamento com 2-propanol ( $\log P = 0,05$ ) por seis horas sob o sistema de ultrassom em um meio de reação contendo glicerol e benzoato de metila apresentou um incremento de cerca de 50% comparado ao seu valor inicial de atividade enzimática. Como em outros trabalhos apresentados na literatura, neste caso, a atividade enzimática foi determinada após a consecução de uma reação, não após o contato direto da enzima com o solvente orgânico em sistema de ultrassom.

Em outro sistema de reação constituído por glicerol e ácido ascórbico, Lerin *et al.* (2010) obtiveram valores mais expressivos de atividade residual para Novozym 435 e Lipozyme RM IM quando foi utilizado como solvente o terc-butanol ( $\log P = 0,80$ ).

Com base nestes aspectos, outros parâmetros devem ter influenciado os resultados como, por exemplo, a utilização do sistema de ultrassom, onde a conversão de energia ultrassônica para líquidos orgânicos depende da viscosidade, pressão da superfície e pressão de vapor. Outros parâmetros importantes podem ser os grupos funcionais dos solventes. A atividade de lipases em solventes orgânicos não é apenas dependente da hidrofobicidade ( $\log P$ ), mas também do grupo funcional dos solventes. Como exemplo, terc-butanol possui uma função OH- e n-hexano -C-C (Liu *et al.*, 2008).

O trabalho de Secundo e Carrea (2002) corrobora este fato. Os autores demonstraram que *Novozym 435* apresentou atividades diferentes, quando tratadas com solventes orgânicos, com diferentes grupos funcionais. Uma provável explicação é atribuída à variação de água retida no microambiente do sítio catalítico ativo, o que é necessário para manter as propriedades dinâmicas da enzima.

As ondas de ultrassom podem interferir nas características da enzima, alterando sua estrutura em resposta à perturbação dinâmica provocada pelo ultrassom (Hoshino *et al.*, 2006). Existem poucos estudos relacionando o efeito do ultrassom com a atividade das enzimas e têm sido relatados resultados contraditórios de inativação e ativação da enzima após serem submetidas ao ultrassom. Diferente da tradicional inativação das enzimas em temperaturas elevadas, o processo de sonicação não destrói o sítio ativo das enzimas. Esta constatação tem sido claramente demonstrada com  $\alpha$ -amilase, peroxidase de raiz forte, lacase e fosfatase alcalina (Ozbek e Ulgen, 2000; Rehorek *et al.*, 2004; Basto *et al.*, 2007; Tauber *et al.*, 2008).

Estudos mostram que o ultrassom provocou a inativação de algumas enzimas, incluindo fosfatase alcalina, glicose-6-fosfato desidrogenase e tripsina. A inativação foi observada quando utilizada potência de ultrassom de 500W, mas, de modo geral, utiliza-se potência de 25 a 150W para reações enzimáticas. A inativação provavelmente ocorreu devido à reação de radicais hidroxila ou de hidrogênio formadas com a estrutura da proteína (Basto *et al.*, 2007). Este fato pode levar à

obstrução dos sítios ativos, e ao mesmo tempo, diminuir a estabilidade da proteína (Tian *et al.*, 2004). Além disso, forças de cisalhamento que ocorrem no fluido durante a irradiação do ultrassom também podem ter um papel significativo na inativação da enzima (Ozbek e Ulgen, 2000).

Vulfson *et al.* (1991) realizaram interesterificação com potência de 150W, com temperatura mantida por reator encamisado, em que a enzima perdeu 50% da atividade em 2 horas, quando utilizado tampão fosfato, enquanto nenhum efeito foi observado utilizando álcool t-amílico. Ozbek e Ulgen (2000) investigaram o efeito do ultrassom em seis enzimas (desidrogenases, fosfatase alcalina e  $\beta$ -galactosidade) em tampão aquoso. Todas as enzimas mostraram inativação, sendo o tratamento ultrassônico conduzido em temperatura de 5°C. Os autores constataram que quanto maior o tempo de exposição ao ultrassom ou maior a potência, maior inativação foi verificada.

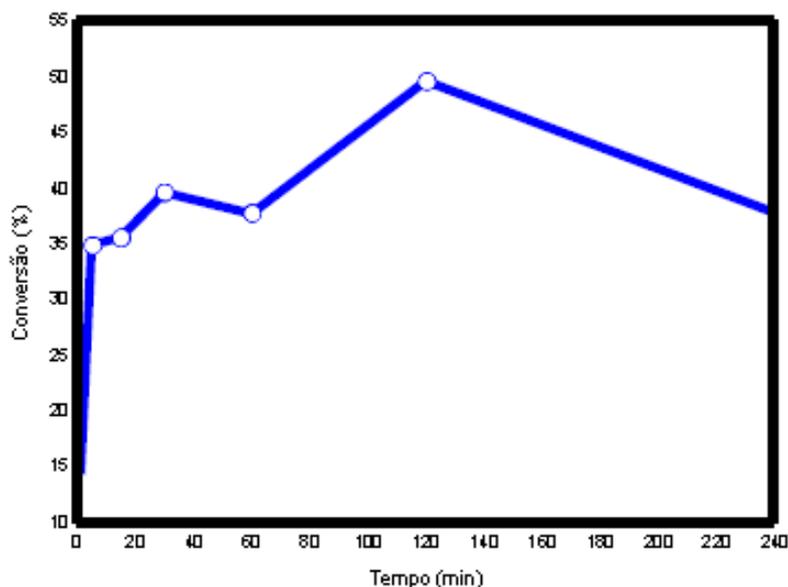
Chen *et al.* (2008) avaliaram várias lipases e proteases para a acilação de glucomannan Konjac em terc-butanol; a *Novozym 435* apresentou alta atividade de acilação em ultrassom e a regioseletividade não foi alterada quando exposta ao ultrassom. Os autores estudaram a influência do comprimento da cadeia de doadores de acila na acilação enzimática de glucomannan Konjac em ultrassom e constataram que as maiores conversões foram obtidas com cadeias curtas ou médias de doador de acila. Este fato sugere que cadeias mais curtas facilitam o acesso ao sítio ativo da enzima (*Novozym 435*).

Alguns trabalhos relatam a realização de síntese enzimática em ultrassom em sistemas reacionais livres de solvente e sistemas com solventes (Liu *et al.*, 2008; Babicz *et al.*, 2010; Ceni, 2010), mostrando que o sistema reacional tem grande influência na síntese enzimática.

Liu *et al.* (2008) observaram que na hidrólise do óleo de soja em sistema livre de solvente em ultrassom o rendimento das reações foi aumentado sem 94, 64, 58, 41 e 34% em tempos de 1, 2, 4, 4 e 5 horas, respectivamente, quando comparado ao rendimento obtido nas condições de agitação em banho termostaticado, provavelmente devido ao fato de o ultrassom induzir a uma melhor dispersão e diminuir a aglomeração da enzima.

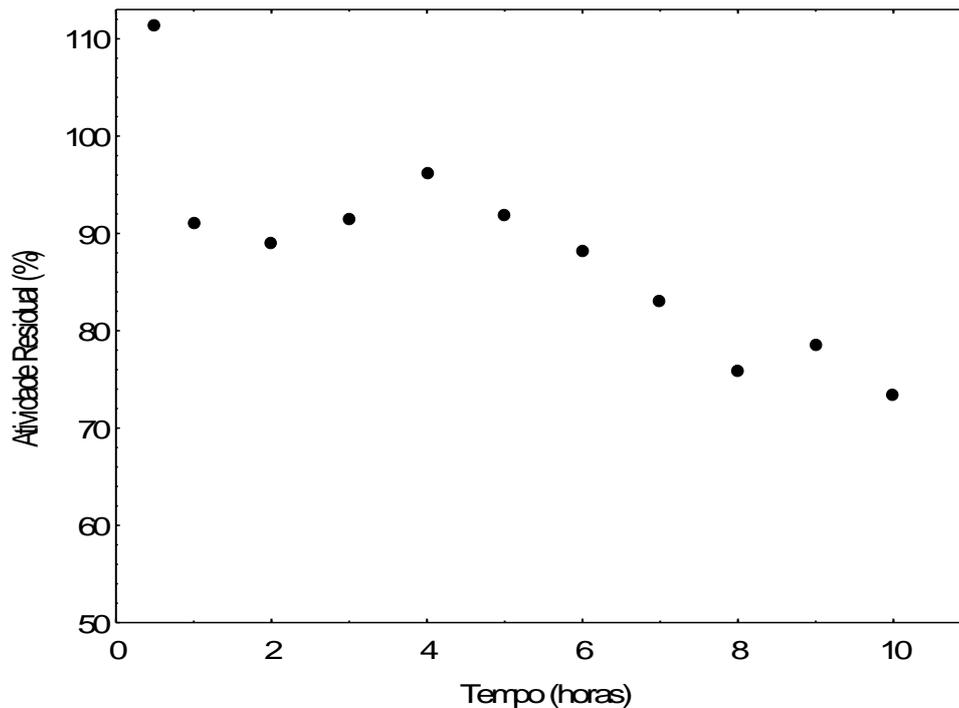
A partir da Figura 12, citada por Fiametti (2008), pode-se verificar que a atividade enzimática (*Novozym 435*) aumenta com o tempo, fato este não observado

apenas no tempo de 60min, onde se verifica um decréscimo e logo após, em 120 min, um ponto máximo. A atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido láurico e álcool n-propílico com a razão molar ácido:álcool de 3:1, à temperatura de 60°C, com 5% (m/m) de enzima, mantida pela adição da enzima ao meio reacional em um reator de vidro aberto de 50mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático.



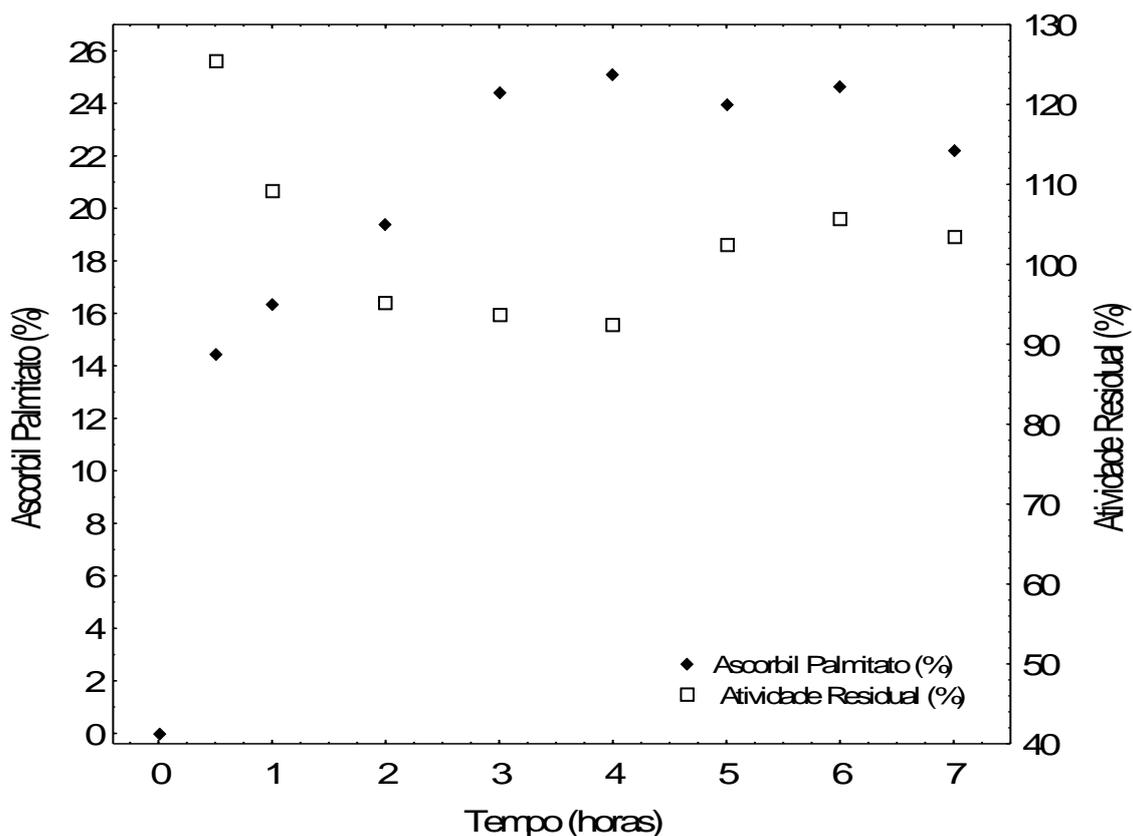
**Figura 12:** Cinética da produção enzimática de MAG em sistema livre de solvente, na temperatura de 30°C, razão molar glicerol:óleo de 2:1, 10% (m/m) de enzima (*Novozym 435*) e 40% (m/m) de AOT em relação a mistura reacional.

De acordo com o trabalho de Lerin (2010), são apresentados na Figura abaixo os resultados da atividade residual de esterificação da enzima *Novozym 435* utilizando terc-butanol como solvente em 10 horas a 70°C com frequência de 37 kHz e potência de 132 W. A atividade residual da *Novozym 435* em ultrassom manteve-se estável em 6 horas de exposição, a partir desta até 10 horas observou-se uma perda de atividade residual, de cerca de 35%.



**Figura 13:** Valores de atividade de esterificação residual (%) da enzima *Novozym 435* em terc-butanol no ultrassom com frequência de 37kHz e potência de 132W.

A Figura abaixo, de acordo com o trabalho de Lerin (2010), apresenta a relação entre a atividade enzimática e a conversão em ascorbil palmitato. Verifica-se que o rendimento da reação aumenta com o tempo e atinge o ponto máximo (25,11%) em 4 horas. Na atividade enzimática de esterificação residual, pôde-se verificar que a *Novozym 435* não apresentou grandes perdas da atividade, apresentando uma perda máxima de 20,75%. Mesmo considerando esta perda de atividade, a conversão em ascorbil palmitato não foi afetada.



**Figura 14** - Cinética da conversão em ascorbil palmitato e atividade enzimática de esterificação residual em ultrassom. Reações realizadas com razão molar de ácido ascórbico e ácido palmítico de 1:9, 10 mL de solvente, 5%*m/m* de enzima e 70°C.

## 5.2. Planejamento de experimentos

### 5.2.1 - Planejamento Plackett & Burman

A partir dos resultados preliminares obtidos anteriormente, um planejamento de experimentos utilizando o modelo proposto por Plackett & Burman com 12 ensaios, com triplicata do ponto central, foi realizado para avaliar o efeito das variáveis temperatura, razão molar, concentração de enzima, concentração de água e potência de ultrassom na produção enzimática de biodiesel utilizando como catalizador a enzima *Novozym 435*, em meio livre de solvente orgânico, mantendo-se fixo o tempo de contato em 1 hora de reação.

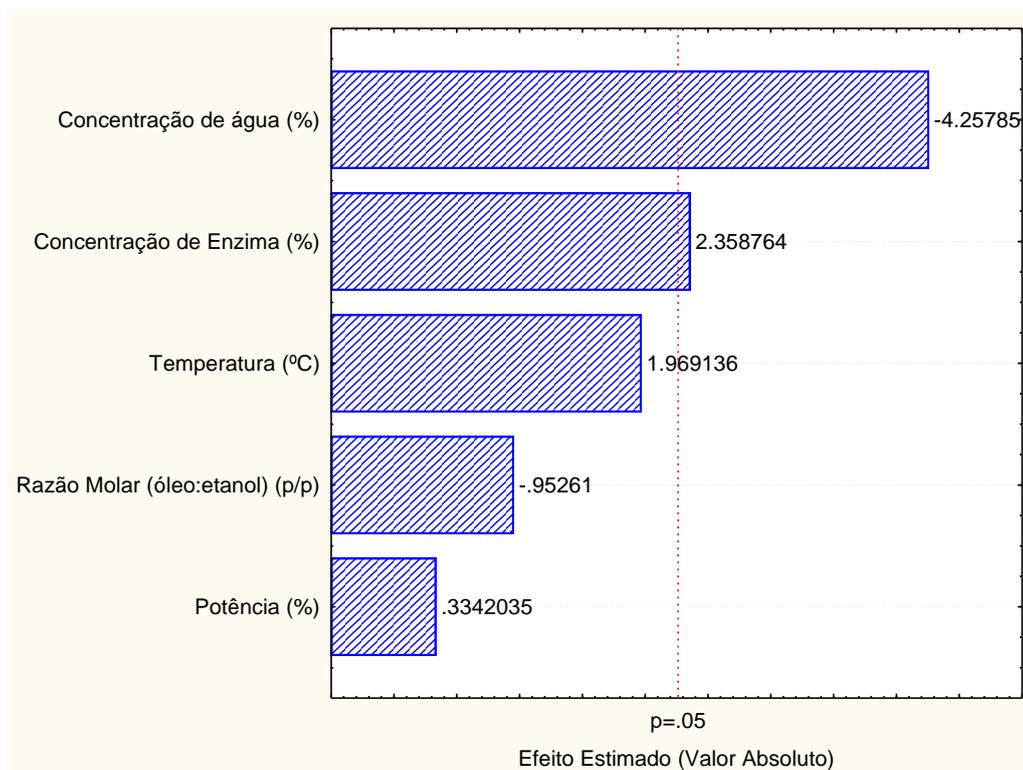
A Tabela 8 apresenta a matriz do planejamento de experimentos e as respostas em termos de conversão em ésteres etílicos. A partir desta tabela pode-se verificar que a conversão mais elevada foi obtida no experimento 1 (68,38%),

correspondendo à temperatura mais elevada (70°C), razão molar entre os substratos de 1:3, 20% (p/p) de enzima e 40% de potência de ultrassom.

**Tabela 8:** Matriz do planejamento fatorial do tipo Plackett & Burman com 12 ensaios (PB-12) com a resposta em termos do teor em ésteres etílicos (%).

Ensaio	Temperatura	Razão molar	[E]	[H <sub>2</sub> O]	Potência	Conversão (%)
1	1 (70)	-1 (1:3)	1 (20)	-1(0)	-1(40)	68,38
2	1 (70)	1 (1:10)	-1(5)	1(10)	-1(40)	0,38
3	-1 (40)	1(1:10)	1(20)	-1(0)	1(100)	38,51
4	1 (70)	-1(1:3)	1(20)	1(10)	-1(40)	6,59
5	1 (70)	1(1:10)	-1(5)	1(10)	1(100)	0,49
6	1 (70)	1(1:10)	1(20)	-1(0)	1(100)	34,60
7	-1(40)	1(1:10)	1(20)	1(10)	-1(40)	0,30
8	-1 (40)	-1(1:3)	1(20)	1(10)	1(100)	1,83
9	-1 (40)	-1(1:3)	-1(5)	1(10)	1(100)	0,35
10	1 (70)	-1(1:3)	-1(5)	-1(0)	1(100)	31,51
11	-1 (40)	1(1:10)	-1(5)	-1(0)	-1(40)	5,73
12	-1 (40)	-1(1:3)	-1(5)	-1(0)	-1(40)	11,74
13	0 (55)	0(1:6,5)	0(12,5)	0(5)	0(70)	5,26
14	0 (55)	0(1:6,5)	0(12,5)	0(5)	0(70)	2,74
15	0(55)	0(1:6,5)	0(12,5)	0(5)	0(70)	3,00

Os dados obtidos na Tabela 8 foram tratados estatisticamente e o efeito das variáveis sobre a conversão em ésteres pôde ser determinada. Os resultados são apresentados na forma de Gráfico de Pareto (Figura 15).



**Figura 15:** Gráfico de Pareto para a produção enzimática de biodiesel utilizando a lipase *Novozym 435* em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função das variáveis independentes.

Conforme a Figura 15 pode-se observar que a variável concentração de água apresentou efeito significativo negativo e a variável concentração de enzima apresentou efeito significativo positivo, considerando com 95% de confiança. Por outro lado, as variáveis temperatura, razão molar e potência ultrassônica não apresentaram influência significativa na conversão em ésteres.

O conteúdo de água na reação é um fator determinante no rendimento da síntese enzimática de biodiesel. Um pouco de água é necessária para manter a enzima ativa em solventes orgânicos. Por outro lado, a água pode tomar parte na transesterificação, influenciando assim o equilíbrio (Antczak *et al.*, 2009). As lipases possuem a característica única de atuar na interface entre uma solução aquosa e uma fase orgânica, por isso a atividade da lipase geralmente depende da área interfacial. A água facilita o aumento da área interfacial disponível, assim ajuda a manter a atividade da lipase. No entanto, o excesso de água pode tornar a lipase

mais flexível e levar a algumas reações colaterais indesejadas, como a hidrólise, especialmente no processo de transesterificação (Kaieda et al., 1999).

No teor de água ideal, a hidrólise de éster é mantida no nível mínimo, o que assegura o maior grau de transesterificação e produção de biodiesel. Baixa atividade de água (baixo teor de água livre) em reações afeta positivamente a síntese de ésteres de ácidos graxos, mas o efeito deste parâmetro sobre a produtividade de transesterificação não é tão inequívoco (Antczak et al., 2009; Bajaj et al., 2010).

Ognjanovic et al. (2009) observaram durante seus estudos de conversão em biodiesel com a lipase *Novozym 435*, que a concentração de água apresentou efeitos negativos na conversão. Os melhores rendimentos (95% metil ésteres) foram obtidos nas menores concentrações de água, ou seja, sem adição de água na reação.

De acordo com Hsieh et al. (2006) a razão molar dos substratos normalmente é um dos parâmetros mais importantes nas reações de esterificação enzimática. Desde que a reação é reversível, um aumento na concentração de um substrato pode deslocar o equilíbrio químico, resultando em maiores conversões. Por outro lado, altas concentrações podem reduzir a taxa de reação devido ao efeito de inibição.

A razão molar de óleo e etanol é uma das variáveis mais importantes que afeta o rendimento dos ésteres etílicos. A relação estequiométrica de transesterificação requer três moles de álcool e um mol de triglicerídeos para produzir os três moles de ésteres etílicos e um mol de glicerol. No entanto, a transesterificação é uma reação de equilíbrio em que uma alta proporção molar é usada para conduzir a reação para a direita (produtos). Ao usar o sistema de ultrassom, a quantidade de álcool requerida pode ser reduzida (Yu et al., 2010).

Segundo o trabalho de Batistella (2011) realizado em ultrassom, a maior conversão em ésteres etílicos utilizando a enzima *Novozym 435* (66,9%) foi obtida no ensaio de maior temperatura (70°C) e concentração de enzima (20%) e nas menores concentrações de água (5%), razão molar (óleo/etanol) (1:3) e potência 40% de 132W.

Conforme o trabalho de Ceni (2010) a melhor conversão (15,93%) foi alcançada com 65°C, razão molar entre os substratos de 1:1, concentração

enzimática de 15% (m/m), adição de 7mL de 2-propanol e 40% de potência do banho de ultrassom (132W).

### 5.2.2 - Delineamento Composto Central Rotacional 2<sup>2</sup>

Após a determinação das variáveis significativas realizou-se um delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup>, totalizando 11 experimentos, para verificar a influência das variáveis temperatura e concentração de enzima. Como no planejamento PB-12 a concentração de água apresentou efeito significativo negativo, esta variável foi mantida constante em seu nível inferior (0%) neste segundo planejamento. A razão molar óleo:etanol foi mantida fixa em 1:3 e a potência de ultrassom em 40%. A temperatura, apesar de não ter apresentado efeito significativo, foi também investigada nesta etapa tendo em vista o fato de saber-se que a mesma afeta diretamente a atividade enzimática.

A Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento de experimentos 2<sup>2</sup> para a produção enzimática de ésteres etílicos em ultrassom em sistema livre de solvente.

**Tabela 9:** Matriz do delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> (DCCR) para otimização da produção enzimática de biodiesel em ultrassom em sistema livre de solvente.

Ensaio	Temperatura	[E]	Conversão (%)
1	-1 (63)	-1 (13)	49,26
2	1 (77)	-1 (13)	52,08
3	-1 (63)	1 (27)	77,98
4	1 (77)	1 (27)	76,97
5	-1,41 (60)	0 (20)	69,66
6	1,41 (80)	0 (20)	66,78
7	0 (70)	-1,41 (10)	45,41
8	0 (70)	1,41 (30)	76,96
9	0 (70)	0 (20)	62,07
10	0 (70)	0 (20)	65,21
11	0 (70)	0 (20)	61,90

De acordo com a tabela acima pode-se observar que as conversões mais elevadas foram obtidas nos experimentos 3 (77,98%); 4 (76,97%) e 8 (76,96%), nas temperaturas de 63; 77 e 70°C, nas concentrações de enzima de 27; 27 e 30% (p/p), respectivamente. A razão molar dos substratos foi mantida em 1:3 (óleo/etanol).

Como a diferença nos resultados pode ser considerada pequena, optou-se por trabalhar com a temperatura de 70°C e com a concentração de 20% (p/p) de enzima, levando em consideração os resultados aqui obtidos com os resultados do estudo cinético prévio e do planejamento Plackett & Burman, onde foi encontrado um rendimento de aproximadamente 70% em ésteres etílicos utilizando 20% (p/p) de enzima. A semelhança entre as conversões obtidas fez-nos definir a concentração de enzima de 20% (p/p) como satisfatória, levando em consideração o custo da enzima.

Batistella (2011) obteve em seu trabalho um rendimento de 57% em ésteres etílicos utilizando a enzima *Novozym 435* em sistema com solvente orgânico (n-hexano), utilizando ultrassom, nas seguintes condições: 27,1% (p/p) de enzima e temperatura de 63°C.

Conforme Kristensen *et al.* (2005) um aumento na temperatura pode reduzir a viscosidade da mistura, aumentar a solubilidade e melhorar o processo de difusão dos substratos, reduzindo assim as limitações de transferência de massa e favorecendo a interação entre as partículas de enzima e substratos. Além disso, as enzimas em geral têm uma temperatura ideal de trabalho, e, no caso de *Novozym 435*, está situado na faixa de 40 - 70°C.

Song e Wei (2002) avaliaram o efeito da temperatura na síntese do éster de vitamina C e verificaram que conversões mais elevadas (18,5g/L) foram obtidas na temperatura de 55°C. Lv *et al.* (2007) realizaram um estudo sobre o papel da temperatura na produção de ascorbil benzoato e observaram que a conversão aumentou com o aumento da temperatura até 70°C, mas diminuiu em temperaturas mais altas.

Estudo de Liu *et al.* (2008) avaliou a influência da temperatura na reação de hidrólise de óleo de soja, catalisada por lipase de *C. lipolytica* em sistema livre de solvente utilizando ultrassom. Os autores relataram que bons resultados de atividade hidrolítica foram alcançados na faixa de temperatura de 30 a 55°C; com 65°C a lipase perdeu 50% da atividade e a 65°C a lipase perdeu toda a atividade hidrolítica. Segundo os autores, em ultrassom, a lipase não apresentou atividade na temperatura de 65°C.

Yu *et al.* (2010) variaram a concentração de enzima (*Novozym 435*) para a produção de biodiesel em sistema de ultrassom, de 0 a 10% baseada no peso do

óleo, e verificaram que aumentando a concentração de enzima também houve um aumento na conversão em biodiesel (96% metil ésteres de ácidos graxos).

De acordo com Karra-Châabouni *et al.* (2006) um excesso de enzima no meio reacional poderia não contribuir para o aumento de conversão, uma vez que a enzima pode formar agregados, não tornando o sítio ativo disponível para os substratos. As moléculas da enzima na superfície externa de tais partículas são expostas a altas concentrações de substrato, mas o transporte de massa poderia limitar drasticamente a concentração de substrato no interior das partículas. Baixas atividades do biocatalisador reduzem a eficiência da enzima, não aumentando a conversão da reação.

Babicz *et al.* (2010) avaliaram o efeito da concentração de enzima (1 e 2% m/m) na hidrólise de óleo de soja em ultrassom (frequência de 47kHz e potência de 125W) e observaram que quando utilizado 1% (m/m) de *Lipozyme TL IM* em 1,5 horas o rendimento foi de 40% e quando utilizado 2% (m/m) da mesma enzima, o rendimento foi de 32% em 3 horas. Os autores avaliaram o efeito da concentração de enzima utilizando as enzimas *Lipozyme RM IM* e *Novozym 435*. Com a *Lipozyme RM IM* a concentração de 1% (m/m) apresentou um rendimento de 41% enquanto 2% (m/m) de enzima 34%. A *Novozym 435* apresentou rendimento de 32% quando utilizado 1% (m/m) de enzima e 30% com 2% (m/m) de enzima, mostrando que com menores concentrações de enzima melhores rendimentos com as duas enzimas testadas foram obtidos.

Liu *et al.* (2008) avaliaram o efeito da concentração de enzima na hidrólise de óleo de soja, estudaram os intervalos de 0,1, 0,55, 1, 2 e 3% de lipase de *C. lipolytica* em sistema livre de solvente utilizando ultrassom. A taxa de reação mostrou aumento rápido seguido por um ligeiro aumento, juntamente com o aumento da concentração de 0,1% para 0,55% e de 0,55% para 3%, respectivamente. Não foi observada diminuição da taxa de reação com o aumento da concentração da enzima. Com base nestes resultados, os autores acreditam que haja uma concentração de enzima crítica (0,55%, neste caso), acima do qual a interface de reação está saturada.

Os resultados apresentados (Tabela 9) referentes à produção enzimática de biodiesel foram tratados estatisticamente para a avaliação dos efeitos de cada

variável independente sobre a resposta. A Tabela 10 apresenta os coeficientes de regressão e os respectivos erros obtidos para o modelo matemático.

**Tabela 10:** Análise dos efeitos das variáveis sobre a conversão em biodiesel, referente aos resultados apresentados na Tabela 8.

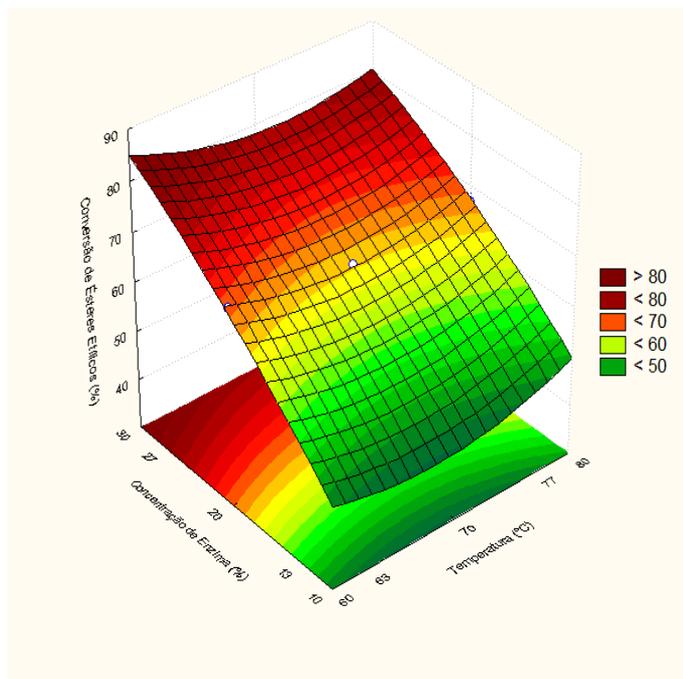
	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	63,06254	1,207528	52,22448	0,000000
Temperatura (L)	-0,28219	0,740568	-0,38104	0,718824
Temperatura (Q)	2,43326	0,883691	2,75352	0,040142
[E] (L)	12,29853	0,740568	16,60688	0,000014
[E] (Q)	-1,10530	0,883691	-1,25077	0,266357
Temperatura L x [E] L	-0,95750	1,045763	-0,91560	0,401877

A Equação 3 apresenta o modelo codificado gerado pela análise de regressão:

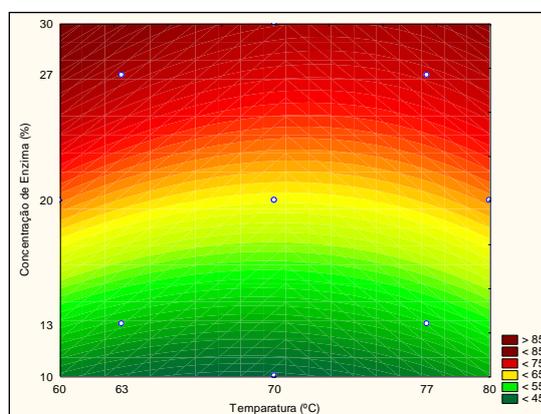
$$Y = 63,06 - 0,28.T + 2,43.T^2 + 12,29[E] - 1,10[E]^2 - 0,95.T.[E] \quad \text{Equação (3)}$$

onde Y é a conversão em Ésteres etílicos (%), T e [E] são os valores codificados de temperatura e concentração de enzima, respectivamente.

O modelo codificado de 2ª ordem representado pela Equação 3, validado pela análise de variância, foi usado para gerar a superfícies de resposta e curva de contorno para a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função da temperatura e da concentração de enzima, as quais estão apresentadas na Figura 16 (a e b).



(a)



(b)

**Figura 16:** Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função da temperatura e da concentração de enzima.

Através da Figura 16 (a e b) pode-se observar claramente que a temperatura e a concentração de enzima mostram o efeito positivo destas variáveis na conversão em ésteres etílicos, conforme explanação já apresentada anteriormente.

Foi realizada a Análise de variância (ANOVA) para verificar a validade do modelo matemático a 95% de confiança, apresentada na Tabela 11, que mostra a soma dos quadrados (SQ), os graus de liberdade (GL) e os quadrados médios (QM) do tratamento (termos do modelo), dos resíduos (diferença entre experimentos e

termos do modelo) e do total (experimentos) e o F calculado (quociente entre os quadrados médios dos tratamentos e dos resíduos).

**Tabela 11:** Análise de Variância (ANOVA) das variáveis sobre a conversão em biodiesel, referente aos resultados apresentados na Tabela 8.

	SQ	GL	QM	F calc
Regressão	1264,048	5	252,8097	57,79197
Resíduo	21,872	5	4,374478	
Total	1285,921	10		

$R^2=0,98$ ;  $F_{\text{tab}}=5.05$

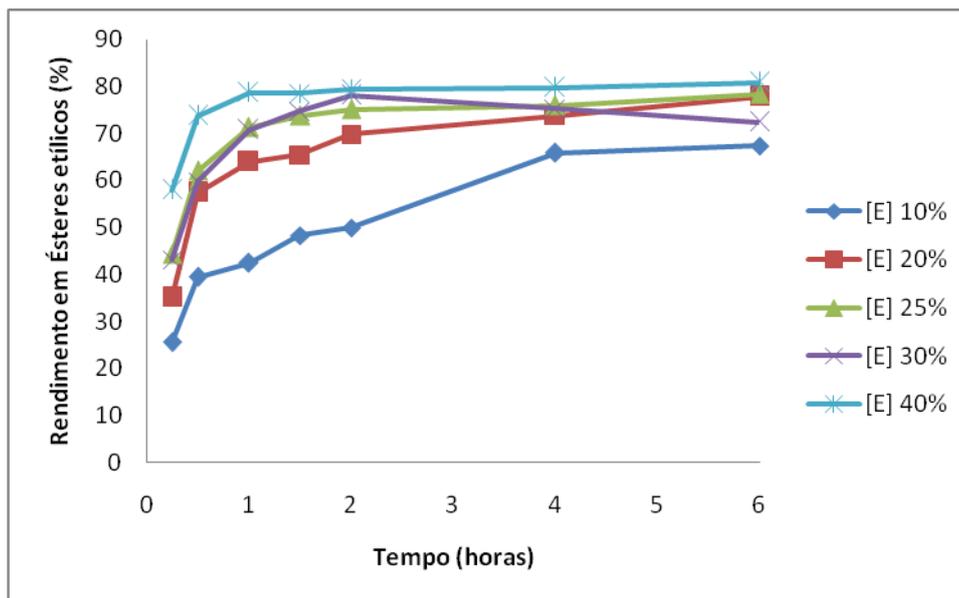
O valor de F reflete a razão da soma quadrática média devido à regressão pela soma quadrática média devido ao erro e indica a significância de cada fator do modelo. Na Tabela 10 o valor calculado de F foi 57,79, o qual é aproximadamente 11 vezes maior que o valor tabelado, mostrando que o modelo é estatisticamente significativo. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,98 sugere que o modelo gerado a partir dos dados da Tabela 9 pode explicar 95% da variação total dos resultados.

De acordo com os resultados obtidos neste planejamento e o discutido anteriormente, pode-se afirmar que a condição ótima de trabalho permanece com a temperatura de 70°C, razão molar 1:3 (óleo/etanol), potência 40% de 132W e 20% de enzima (p/p em relação à massa de substratos).

### 5.3 - Estudo cinético em termos da concentração de enzima

Após realizar o delineamento composto central rotacional  $2^2$ , realizou-se um estudo cinético para verificar a melhor concentração de enzima a ser utilizada.

Com a condição já otimizada em 70°C, 40% de potência de 132W e razão molar (óleo:etanol) 1:3, variando o tempo em 15 e 30 minutos, 1 a 6 horas, a concentração da enzima foi avaliada nas concentrações de 10, 20, 25, 30 e 40% (p/p). Os resultados obtidos em termos de conversão em biodiesel são apresentados na Figura 17.



**Figura 17:** Avaliação da cinética da reação em função da concentração de enzima em termos de conversão em biodiesel, na condição experimental otimizada no planejamento de experimentos.

De acordo com a Figura 17 observa-se que após 1 hora de reação, nas concentrações de enzima de 10, 20, 25, 30 e 40% obteve-se um teor de ésteres etílicos de 42,44; 64,03; 70,71; 71,39 e 78,65%. Após 1,5 horas de reação, estes teores foram de 48,37; 65,5; 73,77; 74,76 e 78,6%, respectivamente.

Ainda de acordo com a Figura 17, nota-se uma pequena diferença no rendimento em ésteres etílicos nas condições testadas, o que nos permite determinar a concentração de enzima em 20% (p/p) num tempo de 1 hora, admitindo que não há necessidade de usar uma concentração maior de enzima, nem um tempo maior de reação, já que a variável tempo e as concentrações testadas apresentam um resultado semelhante, considerando também o alto custo da enzima. Os resultados são apresentados de uma maneira mais clara na tabela abaixo.

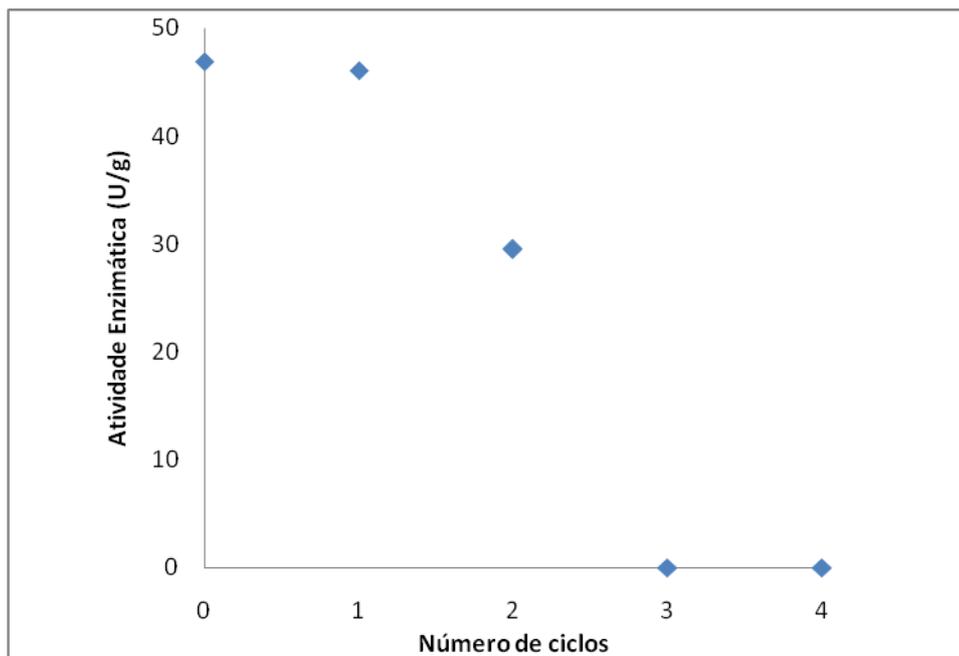
**Tabela 12** - Avaliação da cinética da reação em função da concentração de enzima em termos de conversão em biodiesel, na condição experimental otimizada no planejamento de experimentos.

Tempo (horas)	[E] 10% (p/p)	[E] 20% (p/p)	[E] 25% (p/p)	[E] 30% (p/p)	[E] 40% (p/p)
0,25	25,57	35,17	43,11	44,34	57,92
0,5	39,54	57,4	59,75	62,08	73,76
1	42,44	64,03	70,71	71,39	78,65
1,5	48,37	65,5	73,77	74,76	78,6
2	49,99	69,87	75,2	78,13	79,3
4	65,93	73,81	75,33	75,93	79,72
6	67,36	72,41	77,84	78,45	80,88

#### 5.4. Reutilização da enzima *Novozym 435* na produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom

A utilização de enzimas imobilizadas em reações de síntese apresenta como principal vantagem a possibilidade de reutilização das mesmas. Tendo como base este argumento, foram avaliados os ciclos de reutilização da enzima *Novozym 435* na condição otimizada nas etapas anteriores produção de ésteres etílicos.

Devido ao custo elevado da enzima, a reutilização da mesma é um fator essencial para a produção de biodiesel em nível industrial. Os estudos de reutilização do catalisador foram realizados para investigar a estabilidade da enzima sob a radiação ultrassônica após sucessivos ciclos de uso. As Figuras 18 e 19 apresentam os resultados experimentais de conversão de ésteres etílicos e a respectiva atividade enzimática residual após cada ciclo. Como mostrado na Figura 15, a enzima *Novozym 435* manteve atividade durante 2 ciclos, perdendo a sua atividade a partir do terceiro ciclo.

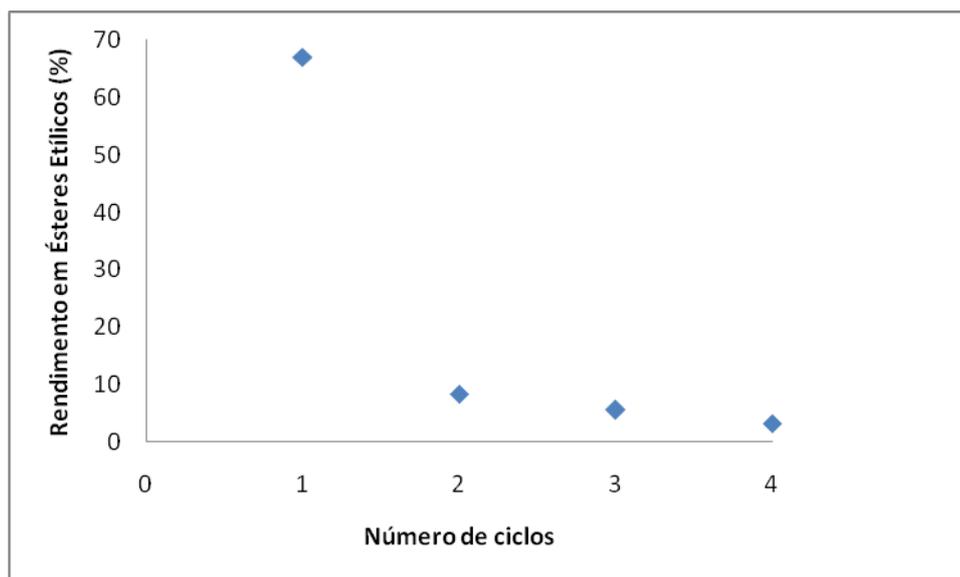


**Figura 18:** Atividade de Esterificação da *Novozym 435* após cada ciclo de uso para produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.

Analisando os resultados obtidos, pode-se afirmar através da Figura 18 que a atividade enzimática diminui consideravelmente conforme cada etapa de reuso da enzima. A atividade inicial foi de 46,9 U/g, no primeiro ciclo a atividade se manteve em 46,1 U/g, no segundo ciclo ficou em torno de 29,5 U/g e no terceiro e quarto ciclos a enzima não apresentou atividade.

Esta queda na atividade é resultado do processo de produção de biodiesel enzimático em sistema livre de solvente. Wescott e Klivanov (1993) afirmam que a hidrofobicidade dos solventes orgânicos influencia a atividade da enzima e a especificidade dos substratos. Alguns autores relatam a redução ou até mesmo a perda da atividade enzimática em altas intensidades de ultrassom utilizando as enzimas  $\alpha$ -quimotripsina e invertase (Sakakibara *et al.*, 1996; Ishimori *et al.*, 1981).

A Figura 19 apresenta a conversão em ésteres étilícos (%) obtido após cada ciclo de uso.

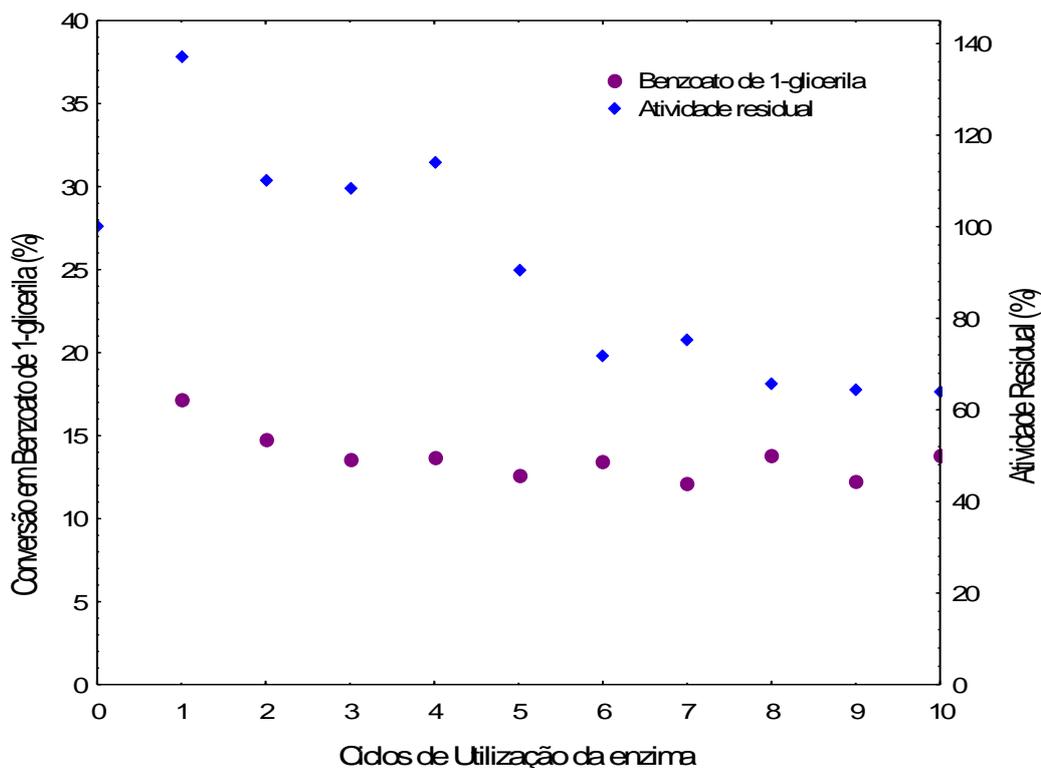


**Figura 19:** Conversão em ésteres etílicos (%) após cada ciclo de uso para produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.

De acordo com as Figuras 18 e 19 pode-se verificar que conforme a atividade de esterificação diminui, também observa-se uma queda na conversão em ésteres etílicos. Por exemplo, no primeiro reuso obteve-se 46,10U/g de atividade e 67,05% de ésteres etílicos. Já no segundo reuso obteve-se uma atividade de 29,5U/g e 8,43% em ésteres etílicos. No terceiro e quarto ciclos obteve-se conversões em ésteres etílicos de 5,67% e 3,33%, respectivamente.

Para a determinação de ciclos de reuso da lipase Novozym 345 na reação de produção de benzoato de 1-glicerila, Ceni (2010) mostra em seu trabalho que os experimentos foram conduzidos em *shaker* com agitação constante 150rpm, temperatura de 50° C, 5mL de solvente, razão molar de 1:1 e 5,5% (m/m) de enzima. Antes do início da reação ativou-se a enzima em estufa a 40°C durante 60 minutos. Os experimentos foram conduzidos por 24 horas cada. Após o término da reação as enzimas foram recuperadas conforme descrito anteriormente e mantidas em dessecador por no mínimo 24 horas, para serem reutilizadas em uma nova batelada. Realizou-se medida de atividade no início e no final das reações com a enzima recuperada, conforme descrito anteriormente.

Na Figura abaixo estão demonstrados os resultados experimentais de conversão de produto e de atividade residual da enzima, segundo o trabalho de Ceni (2010).



**Figura 20:** Ciclos de reuso de lipase imobilizada na reação de produção de benzoato de 1-glicerila em 2-propanol. Reações realizadas com 5mM de substrato, 5mL de solvente, 5,5% (m/m) de enzima e 150rpm de agitação por 24 horas cada ciclo.

Nos experimentos realizados por Ceni (2010) pode ser observado que a lipase *Nozozym 435* apresentou atividade residual estável nos 5 primeiros ciclos de utilização. A partir do 6º ciclo, a enzima apresentou redução de cerca de 30 a 40% de atividade, e mesmo após 240 horas de reação a redução da atividade da lipase não foi superior a 40%. A conversão de benzoato de 1-glicerila manteve-se constante nos 10 ciclos de utilização (cerca de 13,5%), mesmo após redução da atividade enzimática. Uma possível hipótese para tentar elucidar este fato pode estar relacionada ao excesso de enzima nas condições iniciais, pois mesmo com redução de 30 a 40% da atividade inicial da enzima foi possível a manutenção da conversão. O estudo de ciclos de reuso da lipase nas condições experimentais investigadas foi conduzido por um tempo de 24 horas, ao que se deve a menor conversão obtida, cerca de 18% no primeiro ciclo e em torno de 13,5% nos demais, do que quando comparada aos resultados obtidos com tempo reacional de 36 horas.

Com o mesmo procedimento, Hajar *et al.* (2009) avaliaram os ciclos de reuso da enzima *Nozozym 435* na metanólise enzimática de óleo de canola em sistema livre de solvente. A reação foi conduzida por 5 ciclos, totalizando 432 horas, e a conversão foi mantida em cerca de 97%. Os autores não avaliaram a atividade enzimática residual.

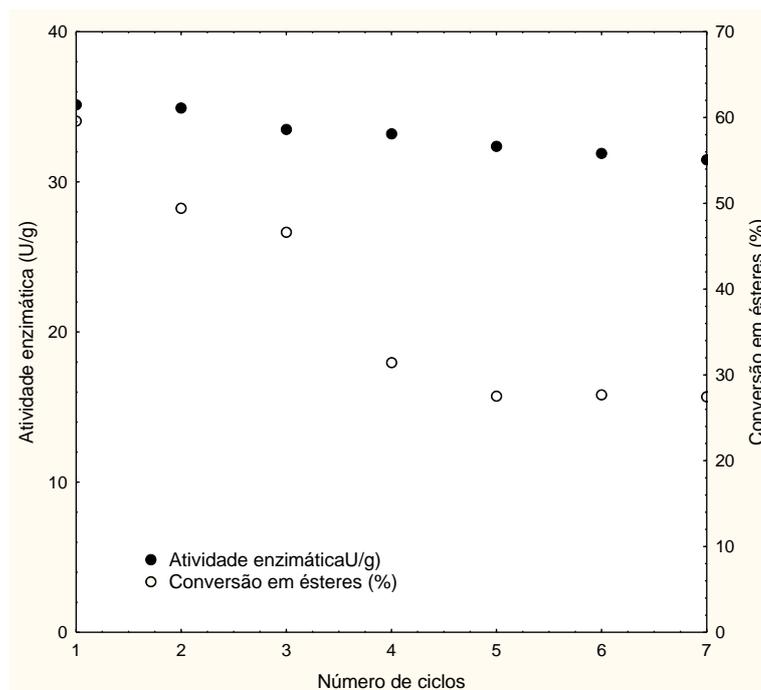
Ghamgui *et al.* (2006) avaliaram os ciclos de reuso de lipase de *Staphylococcus simulans*, imobilizada em carbonato de cálcio. Após 4 ciclos de utilização não ocorreu diferença significativa na produção de isoamil acetato, em temperatura de 37°C. Após 10 ciclos, a conversão foi de cerca de 50% e a atividade enzimática residual de 76%.

Brígida *et al.* (2008) avaliaram a utilização de resíduo de coco verde como suporte para a lipase de *Candida antarctica* tipo B (CAL B). Os autores avaliaram os ciclos de reuso da enzima imobilizada comparando com os resultados obtidos com *Novozym 435*. A enzima imobilizada em resíduo agroindustrial, após o terceiro ciclo de hidrólise, apresentou atividade residual inferior a 50% da atividade inicial, enquanto a *Novozym 435* manteve mais de 70% de atividade após o décimo ciclo. No entanto, na síntese do butirato de butila, a CAL B imobilizada em fibra de coco mostrou boa estabilidade operacional quando comparada à *Novozym 435*, mantendo 80% de sua atividade inicial após o sexto ciclo de reação.

Ceni (2010) em seu trabalho também apresenta a produção de benzoato de 1-glicerila em sonda de ultrassom a 30°C, potência da sonda de 125W, razão molar dos substratos de 1:1, 5mL de 2-propanol e 5,5% m/m de enzima (*Novozym 435*), observou conversão de 8,5% em reação conduzida por 20 minutos.

A utilização de solventes orgânicos em síntese enzimática possibilita a fácil recuperação do produto e em muitos casos ainda pode ser observado um aumento da atividade catalítica da enzima, uma vez que o solvente pode torná-las mais ativas (Gotor-Fernández *et al.*, 2006).

Conforme o trabalho de Batistella (2011), quando realizado o reuso com a mesma enzima para todos os ciclos, a atividade enzimática para a *Novozym 435* se manteve estável e quanto à conversão em ésteres o uso da enzima conduziu a significativas quedas na conversão após cada sucessivo ciclo, conforme mostra a Figura abaixo.



**Figura 21:** Reuso da enzima *Novozym 435*, nas seguintes condições: 27,1% de enzima, 63°C de temperatura, 40% de potência de ultrassom (132W), razão molar 1:3 (óleo/etanol), em sistema com solvente orgânico (n-hexano).

Desta forma, verifica-se que solventes orgânicos com polaridade adequada são importantes para o substrato e a solubilidade do produto e para a transferência de massa no sistema reacional (Lv *et al.*, 2007). Diferentes solventes orgânicos têm capacidade diferente de distorcer a camada de água essencial em torno da lipase imobilizada. O log P (constante de polaridade, definido como o coeficiente de partição do solvente entre octanol e água) é amplamente utilizado para representar as características da fase orgânica e prever a atividade enzimática (Laane *et al.*, 1987; Cui *et al.*, 1997).

Em um estudo realizado por Dahai e Yu *et al* (2010), observou-se que o uso de solvente orgânico ajudou a manter a atividade enzimática durante cinco ciclos. Uma queda (4%) na atividade da enzima foi observada após cinco usos. Segundo o autor, as reações foram realizadas com álcool terc-amílico (4mL), óleo de soja (4mmol), metanol (24mmol), potência ultrassônica de 50% (500W e frequência de irradiação de 40 kHz), enzima *Novozym 435* (6% baseado no peso do óleo), conteúdo de água de 0,5%, temperatura de 40°C e vibração 50rpm sob irradiação ultrassônica em 2 horas. Cumpre mencionar que os autores apresentam apenas

resultados em termos de atividade enzimática e não em termos de conversão do processo.

No trabalho realizado por Raita *et al.* (2010), foi desenvolvido um biocatalisador heterogêneo (PCMCs – proteína revestida de microcristais) que foi preparada através de uma enzima comercial de *Aspergillus* recombinante e uma lipase de *Thermomyces lanuginosus*, para síntese de biodiesel a partir de óleo de palma por etanólise. As reações continham 500 mg de óleo de palma e razão molar óleo:álcool de 1:4, com 20% (p/p baseado em TAG) de lipase-PCMC, razão molar 1:1 de óleo:solvente. As reações foram mantidas a 45°C por 24 h. Foi aumentada a estabilidade do catalisador através da lavagem do mesmo com terc-butanol (resultados não obtidos sem a lavagem ou utilizando acetona). Isso permitiu a reutilização do biocatalisador por 8 ciclos consecutivos com 77,5 – 84,8% de rendimento em produto. Os mesmos autores utilizaram a *Novozym 435* nas mesmas condições e obtiveram rendimentos de 79,5-86,2%.

### 5.5 - Considerações finais

Os resultados apresentados nesta seção visaram avaliar a influência das variáveis no processo e otimizar a produção enzimática de ésteres etílicos em sistema livre de solvente orgânico em banho de ultrassom. De uma forma geral, após a consecução deste trabalho, pôde-se verificar que as estratégias utilizadas neste trabalho foram avaliadas visando à produção enzimática de ésteres etílicos. As estratégias apresentam potencialidade para serem utilizadas em diferentes sistemas reacionais, para obtenção de compostos de alto valor agregado. Tratando-se de um novo sistema sob investigação, o estudo realizado utilizando a metodologia do planejamento experimental mostrou relevância na avaliação do efeito das variáveis significativas do processo. O estudo cinético foi de fundamental importância para o melhor entendimento do processo.

## Capítulo 6- CONCLUSÕES

Neste trabalho foi estudada a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.

A metodologia analítica se mostrou eficaz na quantificação de ésteres etílicos produzido pela reação de transesterificação enzimática.

O presente trabalho avaliou a influência das seguintes variáveis: concentração de enzima, razão molar entre os substratos, temperatura, concentração de água e potência, podendo-se concluir que:

- No estudo cinético prévio (destrutivo), o teor de ésteres etílicos foi de 37,60% em 15 minutos, 62,98% em 30 minutos, 68,38% em 1 hora, 73,10% em 2 horas, 80,04% em 4 horas, 76,56% em 6 horas e 73,59% em 8 horas. O tempo de 4 horas de reação apresentou o maior teor de ésteres etílicos. Já nos intervalos de tempos de 6 e 8 horas observou-se uma pequena queda em relação ao teor de ésteres, sendo 76,56% e 73,59% respectivamente. Analisando os resultados obtidos, percebe-se que não há uma diferença consideravelmente grande no teor de ésteres etílicos obtidos, o que permitiu a escolha do tempo das reações em 1 hora. Concluiu-se que não é viável realizar os experimentos em um tempo maior (4 horas) de reação, já que em 1 hora o resultado não é muito diferente do que em 4 horas, então, torna-se viável trabalhar com um tempo menor (1 hora).
- A atividade inicial da enzima *Novozym 435* foi de aproximadamente 46,9U/g antes das reações. A enzima não apresentou perdas de atividade no final de cada reação, onde obteve-se aproximadamente 52,7U/g em 4 horas, 51,2U/g em 6 horas e 50U/g em 8 horas de reação, podendo ser reutilizada em ciclos. Após 8 horas de irradiação pode-se observar uma pequena perda na atividade enzimática devido a provável colapso cavitacional.
- No planejamento proposto por Plackett & Burman o rendimento máximo (68,38% de ésteres etílicos) foi encontrado na condição de 70°C, razão molar 1:3 (óleo/etanol), potência 40% de 132W e 20% de enzima (p/p em relação à massa de substratos). Os experimentos foram realizados com um tempo de 1 hora de reação, demonstrando assim, neste planejamento, ser a condição ótima de trabalho.

- De acordo com o delineamento composto central rotacional  $2^2$  (DCCR) foi possível observar claramente que um aumento nas variáveis temperatura e a concentração de enzima pode conduzir ao aumento da conversão de ésteres etílicos, observando que as conversões mais elevadas foram obtidas nos experimentos 3 (77,98%); 4 (76,97%) e 8 (76,96%), nas temperaturas de 63°C; 77°C e 70°C, nas concentrações de enzima de 27%; 27% e 30%, respectivamente. A razão molar dos substratos foi mantida em 1:3 (óleo/etanol). Como a diferença nos resultados foi considerada pequena, optou-se por trabalhar com a temperatura de 70°C e com a concentração de 20% (p/p) de enzima, levando em consideração os resultados obtidos no DCCR  $2^2$ , com os resultados do estudo cinético prévio e do planejamento Plackett & Burman, onde foi encontrado um rendimento de aproximadamente 70% em ésteres etílicos utilizando 20% (p/p) de enzima. A semelhança entre as conversões obtidas fez-nos definir a concentração de enzima de 20% (p/p) como satisfatória, levando em consideração o custo da enzima.
- Na avaliação cinética do efeito da concentração da enzima na conversão do processo, observou-se que em 1 hora e em 1 hora e 30 minutos, nas concentrações de enzima de 10, 20, 25, 30 e 40% obteve-se um teor de ésteres etílicos de 42,44; 64,03; 70,71; 71,39 e 78,65% e para o tempo de 1 hora e 30 minutos observou-se conversões de 48,37; 65,5; 73,77; 74,76 e 78,6%, respectivamente. Portanto, notou-se uma pequena diferença no teor de ésteres etílicos nas condições testadas, o que nos permitiu determinar a concentração de enzima em 20% num tempo de 1 hora, admitindo que não há necessidade de usar uma concentração maior de enzima, nem um tempo maior de reação, já que a variável tempo e as concentrações testadas apresentam um resultado semelhante, considerando também o alto custo da enzima.
- Devido ao custo elevado da enzima, a reutilização da mesma é um fator essencial para a produção de biodiesel na indústria. Os estudos de reutilização do catalisador foram realizados para investigar a estabilidade da enzima sob a radiação ultrasônica. A enzima *Novozym 435* manteve atividade durante 2 ciclos, perdendo a sua atividade a partir do terceiro ciclo.
- Analisando os resultados obtidos, pode-se afirmar que a atividade enzimática diminui consideravelmente conforme cada etapa de reuso da enzima. Esta queda na

atividade é resultado do processo de produção de biodiesel enzimático em sistema livre de solvente.

## Capítulo 7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- Avaliação de outras lipases para a síntese de ésteres etílicos, incluindo enzimas não comerciais.
  
- Estudar a produção de ésteres etílicos a partir de outros óleos vegetais.
  
- Propor metodologia para viabilizar o reuso da enzima por vários ciclos.
  
- Avaliação do tipo e da quantidade de solvente orgânico adicionado ao meio reacional na conversão em biodiesel;
  
- Modelagem cinética dos dados experimentais obtidos.

## Capítulo 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHTEN, W. M. J.; VERCHOT, L.; FRANKEN, Y. J.; MATHIJS, E.; SINGHE, V. P.; AERTSA, R.; MUYSA, B. **Jatropha biodiesel production and use**. Biomass and Bioenergy, v. 32, pp. 1063-1084, 2008.

ADACHI, S.; KOBAYASHI, T. **Synthesis of ester by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvents**. Review. J. Biosc. Bioeng., v. 99 (2), p. 87-94, 2005.

AKGUN, N.; IYSCAN E. **Effects of process variables for biodiesel production by transesterification**. Eur. J. Lipid Sci. Technol., v. 109, pp. 486- 492, 2007.

ALCANTARA, R.; AMORES, J.; CANOIRA, L.; FIDALGO, F.; FRANCO, M. J.; NAVARRO, A. **Catalytic production of Biodiesel from Soy-bean Oil, Used Frying Oil and Tallow**. Biomass e Bioenergy, v. 18, pp. 515-527, 2000.

ALOULOU, A.; RODRIGUEZ, J. A.; FERNANDES, S.; VAN OOSTERHOUT, D. **Exploring the specific features of interfacial enzymology base on lipase studies**. Review. Biochim. Biophys. Acta., v. 176, p. 995-1013, 2006.

ALVAREZ-MACARIE, E.; BARATTI, J. **Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis***. J. Mol. Catalysis B: Enzymatic., v. 10, p. 377-383, 2000.

ANP: **Agência Nacional de Petróleo**. [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). Acessado em julho de 2010.

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

ANTOLIN, G.; TINAUT, F. V.; BRICENO, Y.; CASTANO, V.; PEREZ, C.; RAMIREZ, A. I. **Optimisation of Biodiesel Production by Sunflower Oil Transesterification**. *Bioresource Technology*. v. 83, pp. 111-114. 2002.

ANTUNES, W. M.; VELOSO, C. O.; HENRIQUES, C. A. **Transesterification of soybean oil with methanol catalyzed by basic solids**. *Catalysis Today*, v. 133, pp. 548-554, 2008.

BABICZ, I. **Produção de diacilglicerois via hidrólise enzimática do óleo de palma**. 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química – EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

BABICZ, I.; LEITE, S. G. F.; DE SOUZA, R. O. M. A.; ANTUNES, O. A. C. **Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 17, n. 1, p. 4–6, 2010.

BAJAJ, A.; JOHAN, P.; JHA, PN.; MEHROTRA, R., **Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.62, p.9-14, 2010.

BALAT, M.; BALAT, H. **Progress in biodiesel processing**. *Applied Energy*, v. 87, pp. 1815-1835, 2010.

BARBOSA, J. C. S.; SERRA, A. A. **Ultra-som (I): influencia do ultra-som na química**. *Química Nova*, v. 14, n. 4, p. 302-316, 1992.

BARON, A. M. **Biocatálise em ambientes aquo-restrictos: comparação de diferentes sistemas reacionais**. 2003. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

BASTO, C.; SILVA, C. J.; GÜBITZB, G.; CAVACO-PAULO, A. **Stability and decolouration ability of Trametes villosa laccase in liquid ultrasonic fields.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 14, p. 355-362, 2007.

BATISTELLA, L. **Produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em banho de ultrassom.** Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2011.

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

BERTOLINI, M. C.; SCHRAG, J. D.; CYGLER, M.; ZIOMEK, E.; THOMAS, D. Y.; VERNET, T. 1995. **Expression and Characterization of *Geotrichum Candidum* Lipase I Gene: Comparison of Specificity Profile with Lipase II.** *European Journal of Biochemistry*. 228: 863-869.

BEVILAQUA, J. V. **Estudo da catálise enzimática em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático.** 2005. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

BOLDYREV, V. V. **Mechanochemistry and sonochemistry.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 2, n. 2, p. 143-145, 1995.

BOM, E. P. S.; PEREIRA, JR. N. **Tecnologia Enzimática.** 1999.

BONDIOLI, P. **The Preparation of Fatty Acid Ethers by Means of Catalytic Reactions.** *Topics in Catalysis*, v. 27, pp. 77-82, 2004.

BORNSCHEUER, U. T. **Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis.** *FEMS Microbiol. Review.*, v. 733, p. 1-9, 2002.

BORNSCHEUER, U. T.; KAZLAUSKAS, R. J. **Hydrolases in Organic Synthesis – Regio and Stereoselective Biotransformations**. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.

BOSLEY, J. **Turning lipases into industrial biocatalysts**. Biochemical Society Transactions, v. 25, p. 174-178, 1997.

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; MENGE, U. **A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase**. Nature., v. 343, p. 767-770, 1990.

BRÍGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A.D.T.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by adsorption to green coconut fiber**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 146, p. 173-187, 2008.

BUCALÁ, V.; FORESTI, M. L.; TRUBIANO, G.; FERREIRA, M. L.; BRIOZZO, M.; BOTTINI, S. **Analysis of solvent-free ethyl oleate enzymatic synthesis at equilibrium conditions**. Enzyme Microbial Technol., v. 38, p. 914-920, 2006.

BUNGAY, H. R. **Confessions of a Bioenergy Advocate**. TRENDS in Biotechnology. v. 22. nº. 2. Fevereiro, 2004.

CAJAL, Y.; SVENDSEN, A.; GIRONA, V.; PATKAR, S. A.; ALSINA, M. A. **Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase**. Biochem., v. 39, p.413-423, 2000 a.

CAJAL, Y.; SVENDSEN, A.; DE BOLÓS, J.; PATKAR, S. A.; ALSINA, M. A. **Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic of a fungal lipase**. Biochimie, v. 82, p. 1053-1061, 2000 b.

CAMARGOS DA SILVA, R. R. **Avaliação da viabilidade de se produzir biodiesel através da transesterificação de óleo de grãos de café defeituosos**. Dissertação

(Mestre em Engenharia Química) – Escola de engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

CAO, W.; HAN, H.; ZHANG, J. **Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and CO<sub>2</sub> as co-solvent.** Process Biochemistry, v. 40, pp. 3148-3156, 2005.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. **Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados.** Química Nova, v. 26, p. 75-80, 2003.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. **Fine chemicals by biotransformation using lipase.** Química Nova, v. 18, p. 544-554, 1995.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** Química Nova, v. 27, p. 146-156, 2004.

CASTRO-OCHOA, L. D.; RODRIGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. **Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11.** Enzyme Microbial Technol., v. 37, p. 648-654, 2005.

CENI, G. C. **Produção enzimática de benzoato de 1-glicerila em diferentes meios reacionais.** 2010. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Bioquímica – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro – RJ, 2010.

CERBIO - CENTRO BRASILEIRO DE REFERÊNCIA EM BIOCOMBUSTÍVEIS. **O biodiesel, Publicação da Divisão de Biocombustíveis – DBIO,** Ano II, Ed. 12, Maio, 2006.

CHEN, Z. G.; ZONG, M. H.; GU, Z. X.; HAN, Y. B. **Effect of ultrasound on enzymatic acylation of konjac glucomannan.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 31, p. 351-356, 2008.

CHISTI Y. **Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity.** *Trends in Biotechnology*, v. 21, p. 89-93, 2003.

CHOWDARY, G. V.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. **Enzymatic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis.** *Process Biochem.*, v. 36, p. 331-339, 2001.

COSTA, R. C. A. **Potential for producing bio-fuel in the Amazon deforested areas.** *Biomass and Bioenergy*, v. 26, pp. 405, 2004.

CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Cloning, **Purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolors A3(2)*.** *Enzyme Microb. Technol.*, v.42, n. 5, 4. P. 381 – 388, 2008.

CUI, Y. M.; WEI, D. Z.; YU, J. T. **Lipase-catalyzed esterification in organic solvent to resolve racemic naproxen.** *Biotechnology Letters*, v. 19, p. 865-868, 1997.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. **Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases.** *Methods Enzymol.*, v. 284 (A), p. 3-27, 1997.

DAHAI YU, LI TIAN, HAO WU, SONG WANG, YE WANG, DONGXIAO MA, XUEXUN FANG. **Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435.** *Process Biochemistry* 45 (2010) 519–525.

DALLA ROSA, C. **Produção de ésteres etílicos a partir de óleos de soja utilizando lípase em propano.** Dissertação de Msc., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2006.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros**. Química Nova, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DARNOKO, D.; CHERYAN, M. **Kinetics of palm oil: Transesterification in a Batch Reactor**. JAOCS, v. 77, pp. 1263-1266, 2000

DEMIRBAS, A. **Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol**. Energy Conversion and Management, v. 43, p. 2349-2356, 2002.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey**. Energy Conversion and Management, v. 44, p. 2093-2109, 2003.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines**. Springer-Verlag London Limited, 2008b.

DEMIRBAS A. **Progress and recent trends in biodiesel fuels**. Energy Convers Manage, v. 50, pp. 14–34, 2009a.

DEMIRBAS A. **Biodiesel from waste cooking oil via base-catalytic and supercritical methanol transesterification**. Energy Conversion and Management, v. 50, pp. 923–927, 2009b.

DE PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S.; CASTRO, H. F., **Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares**. Química Nova, v.28, p.792-796, 2005.

DESHMANE, V. G.; GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. **Ultrasound-assisted synthesis of biodiesel from palm fatty acid distillate**. Ind Eng Chem Res. 48(17): 7923–7, 2009.

DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, S.; ROUSSOS, J.; CORDOVA, A.; ABOUSALHAM.; CARRIÈRE, F.; BARATTI, J. **Lipases from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures.** *Enzyme Microbial Technol.*, v. 39, p. 1042-1050, 2006.

DORADO, M. P.; BALLESTEROS, E., LÓPEZ, F. J.; MITTELBACH, M. **Optimization of Alkali-Catalyzed Transesterification of Brassica Carinata Oil for Biodiesel Production.** *Energy and Fuels*, v. 18, pp. 77-83, 2004.

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

ENCINAR, J. M.; GONZALEZ, J. F.; SABIO, E.; RAMIRO, M. J. **Preparation and Properties of Biodiesel from *Cynara cardunculus* L. Oil.** *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 38, pp. 2927-2931, 1999.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; RODRIGUEZ, J. J.; TEJEDOR, A. **Biodiesel Fuels from Vegetable Oils: Transesterification of *Cynara cardunculus* L. Oils with Ethanol.** *Energy and Fuels*, v. 16, pp. 443-450, 2002.

ENZELBERGE, M. M.; BORNSCHEUER, U. T.; GATFIELD, I.; SCHMID, R. D. 1997. **Lipase Catalysed Resolution of  $\gamma$ - And  $\delta$ -Lactones.** *Journal of Biotechnology*. 56: 129-133.

ERICSSON, D. J.; KASRAYAN, A. JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTROM, A. G.; BACKVALL, J. E.; MOWBRAY, S. L. **X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel. Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation.** *J. Mol. Biology*, v. 376, n.1, p. 109 – 119, 2008.

FABER, K., Ed. **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**; 3<sup>rd</sup> ed.; Springer Produktions- Gesellschaft: Berlin, 1997, cap.2.

FACCIO, C. **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais**. Dissertação de Mestrado. Sc., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2004.

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G.; **Química Nova** 1998, 21, 16.

FEIHRMANN, A. **Avaliação da atividade enzimática de lipases imobilizadas em fluidos pressurizados**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim – RS, 2005.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. da S.; SCABIO, A. **Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia**. *Quim. Nova*, v. 28, No. 1, pp. 19-23, 2005.

FIAMETTI, K. G. **Produção enzimática de monoglicerídeos a partir de Óleo de oliva na presença de surfactante**. Tese de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2008.

FILHO, O. F., VIEIRA, I. C., “Uso Analíticos de Tecidos e de Extratos Brutos Vegetais como Fonte Enzimática”. **Química Nova**, v. 25, n. 3, PP. 445-464, 2002.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. **Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterification**. *Enzyme Microb. Technol.*, 2006.

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

FORESTI, M. L.; ERRAZU, A.; FERREIRA, M. L. **Effect of several reaction parameters in the solventfree ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene powder**. *Biochem. Eng. J.*, v. 25 (1), p. 69-77, 2005.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. **Transesterification kinetics of soybean oil**. J. Am. Oil Chem. Soc., v. 63, pp. 1375-1380, 1986.

FREITAS, L., **Seleção de Rota Enzimática para Produção de Monoglicerídeos empregando Lipase Imobilizada em Matriz obtida pela Técnica Sol-Gel**. Mestrado em Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo – Lorena SP, 2006.

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

GANDHI, N. N. **Applications of lipases**. Journal of the American Oil Chemists Society, v. 74, p. 621-634, 1997.

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. **Application of Lipase in Kinetic Resolution of Racemates**. Chirality, v. 17, p. 1-15, 2005.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; BEZZINE, S.; MILED, N.; GARGOURI, Y. **Production of isoamyl acetate with immobilized Staphylococcus simulans lipase in a solvent-free system**. Enzyme and Microbial Technology, v. 38, p. 788-794, 2006.

GONÇALVES, L. P. B.; ANTUNES, O. A. C.; PINTO, G. F.; OESTREICHER, E. G. **Simultaneous enzymatic synthesis of (S)-3-fluoroalanine and (R)-3-fluorolactic acid**. Tetrahedron: Asymmetry, v. 11, p. 1465-1468, 2000.

GONÇALVES, L. P. B., **Sistema enzimático acoplado para produção simultânea da (S)-3 fluoroalanina e do ácido (R)-3 fluorolático**. Tese de Doutorado, Instituto de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2002.

GONÇALVES, L. P. B.; ANTUNES, O.A.C.; PINTO, G. F.; OESTREICHER, E. G. **Kinetic aspects involved in the simultaneous enzymatic synthesis of (S)-3-fluoroalanine and (R)-3-fluorolactic acid.** Journal of Fluorine Chemistry, v. 124, p. 219-227, 2003.

GOTOR, V. **Lipases and (R)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis.** J. Biotechnol., v. 96 (1), p. 35-42, 2002.

GOTOR-FÉRNANDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. **Lipases: Useful biocatalystis for the preparation of pharmaceuticals.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 40, p. 111-120, 2006.

GUTARRA, M. L. E.; CAVALCANTI, E. D. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. 2005. **Lipase Production by solid-state fermentation.** Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 121-124, p. 105-116, 2005.

GÜVENÇA, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOGLU, U. **The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system.** Process Biochem., v. 38, p. 379-386, 2002.

HAJAR, M.; SHOKROLLAHZADEH, S.; VAHABZADEH, F.; MONAZZAMI, A. **Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa.** Enzyme and Microbial Technology, v. 45, p. 188-194, 2009.

HAMDAM, S.; DAOOD, H.; TOTH-MARKUS, M.; ILLÉS, V. **Extraction of cardamom oil by supercritical carbon dioxide and sub-critical propane,** The Journal of Supercritical Fluids, v. 44, issue 1, p. 25-30, 2008.

HAMMOND, D. A.; KAREL, M.; KLIBONOV, A. M.; KRUKONIS, V. J. **Enzymatic reactions in supercritical gases.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 11, p. 393-398, 1985.

HANH, H. D.; DONG, N. T.; OKITSU, K.; NISHIMURA, R.; MAEDA, Y. **Biodiesel production by esterification of oleic acid with short-chain alcohols under ultrasonic irradiation condition**. Renewable Energy, v. 34, p. 780-783, 2009.

HARWOOD, J. **The versatility of lipases for industrial uses**. Trends in Biochemical Sciences, v. 14, p. 125-126, 1989.

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

HAZARIKA, S.; GOSWAMI, P.; DUTTA, N. N.; HAZARIKA, A. K. **Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents**. Chemical Eng. J., v. 85 (1), p. 61-68, 2002.

HOLANDA, A. **Biodiesel e Inclusão Social**. Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações, 2004, 200p (Série cadernos de altos estudos; n.1).

HOSHINO, Y.; KAWASAKI, T.; OKAHATA, Y. **Effect of ultrasound on DNA polymerase reactions: monitoring on a 27-MHz quartz crystal microbalance**. Biomacromoleculares, v. 7, p. 682-685, 2006.

HSIEH, H. J.; NAIR, G.R.; WU, W. T. **Production of ascorbyl palmitate by surfactant-coated lipase in organic media**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 54, p. 5777-5781, 2006.

HUMEAU, C.; GIRARDIN, M.; COULON, D.; MICLO, A. **Synthesis of 6-O-palmitoyl L-ascorbic acid catalyzed by *Candida antártica* lipase**. Biotechnology Letters, v. 17, p. 1091-1094, 1995.

ILLANES, A. **Biotecnología de enzimas**. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 1994.

ISHIMORI, Y.; KARUBE, I.; SUZUKI, S. **Acceleration of immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin activity with ultrasonic irradiation.** Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, v. 12, p. 253-259, 1981.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. **Lipases for biotechnology.** Current Op. Biotechnol., v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; DIJSTRA, B. W.; REETZ, M. T. **Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases.** Annual Rev. Microbiol., v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. **Microbial lipases form versatile tools for biotechnology.** Trends Biotechnol., v. 16, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K. E.; RANASK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. **Bacterial lipases.** EMS Microbiol. Rev., v. 15, p. 29-63, 1994.

JEONG G. T; PARK D. H. **Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert – Butanol.** Appl Biochem Biotechnol, v. 148, pp. 131-9, 2007.

JONES, J. B. **Enzyme in organic synthesis.** Tetrahedron: Asymmetry, v. 42, p. 3351-3403, 1986.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; MATSUMOTO, T.; BAN, K.; KONDO, A.; SHIMADA, Y.; NODA, H.; NOMOTO, F.; OHTSUKA, K.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H., **Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by Rhizopus oryzae lipase in a watercontaining system without an organic solvent.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v.88, p.627-631, 1999.

KAMIYA, N.; GOTO, M.; NAKASHIO, F. 1995. **Surfactant-Coated Lipase Suitable for the Enzymatic Resolution of Menthol as a Biocatalist in Organic Media.** Biotechnology Process. 11: 270-275.

KARAOSMANOGLU, F.; CIGIZOGLU, K. B.; TÜTER, M.; ERTEKIN, S. **Investigation of the Refining Step of Biodiesel Production.** *Energy & Fuels*. v. 10, pp. 890-895, 1996.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; GHAMGHI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI, Y. **Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system.** *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1692-1698, 2006.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. **In: A Multi-Volume Comprehensive Treatise Biotechnology.** REHM, H.J.; STADER, P. (eds.), v. 8A, p. 38, 1998.

KAWASHIMA, A.; MATSUBARA, K.; HONDA, K. **Development of heterogeneous base catalysts for biodiesel production.** *Bioresource Technology*. n 99, pp. 3439-3443, 2008.

KIRK, O; BORCHERT T. V.; FUGLSANG C. C. **Industrial Enzymes applications.** *Current Op. Biotechnol.*, v. 13, p.345–351, 2002.

KNOTHE, G. **Perspectivas históricas de los combustibles diesel basados em aceites vegetales.** *Revista A&G*, 47, Tomo XII, No. 2, 2001.

KNOTHE, G.; DUNN, R. O.; BAGBY, M. O. **Biodiesel: The use of Vegetable Oils and Their Derivatives as Alternative Diesel Fuels.** National Center for Agricultural Utilization Research, U.S. Department of Agriculture, 2002.

KNOTHE, G. **Dependence of Biodiesel Fuel Properties on the Structure of Fatty Acid Alkyl Esters.** *Fuel Processing Technology*, v. 86, pp. 1059-1070, 2005.

KORN, M.; ANDRADE, M. V. A. S.; BORGES, S. S. **Procedimentos analíticos assistidos por ultrassom.** *Revista Analytica*, n. 3, p. 34-39, 2003.

KRISHNA, S. H.; KARANTH, N. G. **Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A Kinetic study.** Biochim. Biophys. Acta., v. 1547, p. 262-267, 2001.

KRISHNA, S. H. **Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media.** Biotechnology Advances., 20, p. 239–267, 2002.

KRISTENSEN, J. B.; XU, X.; MU, H. **Process optimization using response surface design and pilot plant production of dietary diacylglycerols by lipase-catalyzed glycerolysis.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, v. 53, p. 7059-7064, 2005.

KUMAR, G.; KUMAR, D.; POONAM; JOHARI, R.; SINGH, C. P., **Enzymatic transesterification of *Jatropha curcas* oil assisted by ultrasonication.** Ultrasonics Sonochemistry, 2011, doi: 10.1016/j.ultsonch. 2011.03.004.

KUSDIANA, D.; SAKA, S. **Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol.** Fuel, v. 80, pp. 225-231, 2001a.

KUSDIANA, D.; SAKA, S. **Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol.** Fuel, v. 80, pp. 693-698, 2001b.

KUSDIANA, D.; SAKA, S. **Two-Step preparation for catalyst-free biodiesel fuel production.** Applied biochemistry and biotechnonology, v. 113, pp. 781- 791, 2004a.

KUSDIANA, D.; SAKA, S. **Effects of water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment.** Bioresource Technology. v. 91, pp. 289- 295, 2004b.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. **Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents.** Biotechnology and Bioengineering. v. 30, p. 81-87, 1987.

LAI, C. C.; ZULLAIKAH, S.; VALI, S. R.; JU, Y. **Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. nº. 80, pp. 331-337, 2005.

LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA Jr., G. L. **Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.

LEE, K.; FOGLIA, T. A.; CHANG, K. **Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease**. JAOCS, v.79, 191-195, 2002.

LEHNINGER, A. L., **Princípios de Bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 1986.

LERIN, L. A. **Síntese enzimática de ascorbil palmitato em diferentes sistemas reacionais**. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

LERIN L. A.; RICHETTI A.; DALLAGO R.; TREICHEL H.; MAZUTTI M. A.; OLIVEIRA J.V.; ANTUNES O. A. C.; OESTREICHER E. G.; OLIVEIRA D., **Enzymatic Synthesis of Ascorbyl Palmitate in Organic Solvents: Process Optimization and Kinetic Evaluation**. Food Bioprocess Technol, 2010, DOI 10.1007/s11947-010-0398-1.

LEUNG D. Y. C.; WU X.; LEUNG M. K. H. **A review on biodiesel production using catalyzed transesterification**. Applied Energy, v. 87, pp. 1083-1095, 2010.

LIMA, J. R. O., SILVA, R. B., SILVA, C. C. M., SANTOS, L. S. S., SANTOS JR. J. R., MOURA, E. M., MOURA, C. V. R. **Biodiesel de babaçu (*Orbignya Sp.*) obtido por via etanólica**. Quim. Nova, v. 30, pp. 600-603, 2007.

LIN, G.; LIU, H. **Ultrasound promoted lipase catalyzed reactions**. Tetrahedron Lett 1995;36(34):6067–8.

LIU, Y.; JIN, Q.; SHAN, L.; LIU, Y.; SHEN, W.; WANG, X. **The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system**. Ultrasonics Sonochemistry, v.15, p. 402-407, 2008.

LOTTI, M.; ALBERGHINA, L. **Lipases: Molecular Structure and Functions**. In: Polaina J and MacCabe A P. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Dordrecht:Springer, 2007, 263-282.

LOTIER, R. **Enzyme catalysed esterification**. Biotechnology Advances, v. 15, p. 1-15, 1997.

LOZANO, P.; DIEGO, T.; CARRIÉ, D.; VAULTIER, M.; IBORRA, J. L. **Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide**. Journal of Molecular Catalysis. A. Chemical. v.214, p.113-119, 2004.

LUO, Y.; ZHENG, Y.; JIANG, Z.; MA, Y.; WEI, D. **A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification**. Appl Microbiol Biotechnol, v. 73, pp. 349-55, 2006.

LV, L. X.; PAN, Y.; LI, Y. Q. **Biosynthesis of ascorbyl benzoate in organic solvents and study of its antioxygenic and antimicrobial properties**. Food Chemistry, v. 101, p. 1626-1632, 2007.

MA, F.; HANNA, M. **Biodiesel production: a review**. Biresource technology, v. 70, pp. 1-15, 1999.

MACEDO, G. A., MACEDO, J. A. **Biodiesel: Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 32, pp. 38-46, 2004.

MACHADO, G. D. C., **Novos Métodos para Estimativa da Razão Enantiomérica e dos parâmetros cinéticos de reações enzimáticas enantioespecíficas**. Tese de Mestrado, Instituto de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1999.

MACHMUDAH, S.; KAWAHITO, Y; SASAKI, M; GOTO, M. **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of rosehip seed oil: Fatty acids composition and process optimization**. The Journal of Supercritical Fluids, v. 41, issue 3, p. 4

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. **Present and future applications of lipases**. Biotechnology and Genetic Reviews, 3, Intercept Ltd., 1985.

MACRAE, A. R. **Extracellular Microbial Lipases In: Microbial Enzymas and Biotecnol.**, Fogarty, W. M. (Ed) Appl. Sci. Publishers, London, 1983, 225 – 250.

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

MAHAMUNI, N. N.; ADEWUYI, Y. G. **Optimization of the synthesis of biodiesel via ultrasound-enhanced base-catalyzed transesterification of soybean oil using a multifrequency ultrasonic reactor**. Energy Fuels 2009; 23 : 2757 - 66.

MAIA, D. J.; DEPAOLI, M. A.; ALVES, O. L. **Síntese de Polímeros Condutores em Matrizes Sólidas Hospedeiras**. Química Nova, v. 23, p. 204-215, 2000.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G. Jr.; AMUNDSON, C. H. **Immobilized lipase reactors for modification of fat and oils: a review**. Journal of the American Oil Chemists Society, v. 67, p. 890-910, 1990.

MAMURO, I. A.; CHENB, B.; EGUCHI, M. KUDO, T.; SUREKHA, S. **Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 16, p. 53-58, 2001.

MARGOLIN, A. L. 1996. **Enzymes in the Synthesis of Chiral Drugs**. Enzyme and Microbial Technology. 7: 113-119.

MARÍA, P. D.; XENAKIS, A.; STAMATIS, H.; SINISTERRA, J. V. **Lipase factor (LF) as a characterization parameter to explain the catalytic activity of crude lipases from *Candida rugosa*, free or immobilized in microemulsion-based organogels**. 2002.

MARTINEZ, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JAFELICCI, M. J. **O efeito do ultra-som em reações químicas**. Química Nova, v. 23, p. 251-256, 2000.

MARTINEZ, M.; VICENTE, G.; ARACIL, J.; ESTEBAN, A. **Kinetics of Sunflower oil methanolysis**. Ind. Eng. Chem. Res., v. 44, pp. 5447-5454, 2005.

MARTINEZ, M., VICENTE, G., ARACIL, J. **Kinetics of Brassica carinata oil methanolysis**. Energy & Fuels, v. 20, pp. 1722-1726, 2006.

MASON, T. J. **Developments in ultrasound – non-medical**. Progress in Biophysics and Molecular Biology, v. 93, p. 166-175, 2007.

MEHER, L. C., SAGAR, D. V., NAIK S. N. **Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review**, Renewable and Sustainable Energy Reviews 10 (2006) 248–268.

MIZUKOSHI, Y.; NAKAMURA, H.; BANDOW, H.; MAEDA, Y.; NAGATA, Y. **Sonolysis of organic liquid: effect of vapour pressure and evaporation rate**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 6, p. 203-209, 1999.

MONYEM, A.; VAN GERPEN, J. H. **The Effect of Biodiesel Oxidation on Engine Performance and Emissions**. Biomass and Bioenergy, v. 20, pp. 317- 325, 2001.

MOREAU, V. H. **Producao experimental de biodiesel por transesterificacao enzimática**. Revista da Rede de Ensino Ftc, Salvador, PP 1-14, 2008.

- MORETTO, E.; FETT, R., **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos**. Livraria Varela, São Paulo, 1998.
- MUNIYAPPA, P. R.; BRAMMER, S. C.; NOUREDDINI, H. **Improved Conversion of Plant Oils and Animal Fats into Biodiesel e Co-product**. Bioresource Technology, v. 56, pp. 19 -24, 1996.
- NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. M. **Biotransformação de óleos e gorduras: Utilização de lipases para obtenção de biocombústíveis**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 33, pp. 27-38, 2004.
- NELSON, L. A.; FOGLIA, A.; MARMER, W. N. **Lipase-catalyzednproduction of biodiesel**. J. Am. Oil Chem. Soc., v. 73, pp. 1191-1195, 1996.
- NINI, L.; SARDA, L.; LOUIS-CLAUDE,C.; BOITARD, E.; JEAN-PAUL, D.; CHAHINIAN, H. **Lipase catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study**. Biochim. Biophys. Acta., v. 1534, p. 34-44, 2001.
- NOUREDDINI, H.; ZHU, D. **Kinetics of transesterification of Soybean Oil**. JAOCS, v. 74, pp. 1457-1461, 1997.
- NOVO NORDISK. **Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions**. Technical Report A-05948, 1992.
- OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JUGOVIC, Z. K., **Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability**. Bioresource Technology. v.100, p. 5146-5154, 2009.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Kinetics of the enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO<sub>2</sub>**. Ind. Eng. Chem. Res., v. 39, pp. 4450, 2000.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V., **Enzymatic Alcoholysis of Palm Kernel Oil in n-hexane and in SCCO<sub>2</sub>**. The Journal of Supercritical Fluids, v. 19, n. 2, p. 141 - 148, 2001.

OLIVEIRA, D.; ALVES, T. L. M. **“Enzymatic alcoholysis of palm and palm kernel oils”**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 77-79, pp. 835-844, 1999.

OLIVEIRA, D.; ALVES, T. L. M. **“A kinetic study of lipase catalysed alcoholysis of palm kernel oil”**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 84-86, pp. 59-68, 2000.

OLIVEIRA, L. B.; COSTA, A. O., **Biodiesel – Uma Experiência de Desenvolvimento Sustentável**. IX CBE , v. 4, p. 1772, Rio de Janeiro. 2002.

OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; AMROGINSKI, C.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. **Optimization of alkaline transesterificação of soybean oil and castor oil for biodiesel production**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 553 – 559, 2005.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids**. The Journal of Supercritical Fluids, v. 38, n. 3, p. 373-382, 2006.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H. G.; GOLDMAN, A. **The a/b hidrolase fold**. Protein Eng., v. 5, p. 197-211, 1992.

OSAKI, M.; BATALHA, M., O. **Produção de biodiesel e óleo vegetal no Brasil: realidade e desafio.** Trabalho apresentado ao 44º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Rio Branco, Acre, 2008.

OZBEK, B.; ULGEN, K. O. **The stability of enzymes after sonication.** *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1037-1043, 2000.

PALEKAR, A. A.; VASUDIVAN, P. T.; YAN, S. **Purification of Lipase: a Review.** *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 18, p. 177-200, 2000.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. **Plant lipases from latex: properties and industrial applications.** *Química Nova*, vol. 29, nº 1, p. 93-99, 2006. São Paulo, 2006.

PARENTE, Expedito de Sá. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado.** Tecbio, Fortaleza, CE, 2003.

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

PATIL, P.; DENG, S.; RHODES, I. J.; LAMMERS, P. J. **Conversion of waste cooking oil to biodiesel using ferric sulfate and supercritical methanol processes.** *Fuel*, v. 89, pp. 360-364, 2010.

PINHEIRO, D. M. **Produção de lipase por *Penicillium restrictum*.** 1992. 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1992.

PINNARAT, T.; SAVAGE, P. **Assessment of non-catalytic biodiesel synthesis using supercritical reaction conditions.** *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 47, pp. 6801-6808, 2008.

PINTO, A. C.; GUARIEIROA, L. L. N.; REZENDEA, M. J. C.; RIBEIROA, N. M.; TORRES, E. A.; LOPESC, W. A.; PEREIRAC, P. A. P.; ANDRADE, J. B. **Biodiesel: An Overview**. J. Braz. Chem. Soc.,v. 16, pp. 1313-1330, 2005.

RAITA, M.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOIANA, N., **Biocatalytic ethanolysis of palm oil for biodiesel production using microcrystalline lipase in tert butanol system**. Processes Biochemistry. v.45, p.829-834, 2010.

RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMIGOS, A. K.; WILHEIM, H. M. **Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 31, pp. 27-37, 2003.

RANESES, A. R.; GLASER, L. K.; PRICE, J. M.; DUFFIELD, J. A. **Potential Biodiesel Markets and their Economic Effects on the Agricultural Sector of the United States**. Industrial Crops and Products. v. 9. pp. 151-162. 1999.

RASO, J.; MANAS, P.; PAGÁN, R.; SALA, F.J. **Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 5, p. 157-162, 1999.

REHOREK, A.; TAUBER, M.; GÜBITZ, G. **Application of power ultrasound for azo dye degradation**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 11, p. 177-182, 2004.

RENDÓN, X.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; CASTILLO, E., **Solvent Engineering Applied to Lipase-Catalized Glycerolysis of Triolein**. Journal American Oil Chemists' Society, v. 78, n. 10, p. 1061 - 1066, 2001.

RIBEIRO, C. M. R.; PASSAROTO, E. N.; BRENELLI, E. C. S. **Ultrasound in enzymatic resolution of ethyl 3-hydroxy-3-phenylpropanoate**. Tetrahedron Letters, v. 42, p. 6477-6479, 2001.

RIBEIRO, J. B.; RAMOS M. C. K. V.; LEITE, S. G. F.; NETO, F. R. A.; ANTUNES O. A. C. **Microbiological enantioselective reduction of ethyl acetoacetate**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 24-25, p. 121-124, 2003.

ROKHINA, E. V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. **Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art**. Trends in Biotechnology, v. 27, p. 298-306, 2009.

SAKAKIBARA, M.; WANG, D.; TAKAHASHI, R.; TAKAHASHI, K.; MORI, S. **Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase**. Enzyme and Microbial Technology, v. 18, p. 444-448, 1996.

SALIS, A.; PINHA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. **Biodiesel production from triollin and short chain alcohols through biocatalysis**. J. Biotechnol., v. 119, n.3, p. 291 – 299, 2005.

SANTOS, F. F. P.; MALVEIRA, J. Q.; CRUZ, M. G. A.; FERNANDES, F. A. N. **Production of biodiesel by ultrasound assisted esterification of Oreochromis niloticus oil**. Fuel, v. 89, p. 275-279, 2010.

SARDA, L. E.; DESNUELLE, P. **Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion**. Biochim. Biophys. Acta., 30, 513-521, 1958.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. **Purifications strategies for microbial lipases**. Journal Microbiology Methodology, v. 52, p. 1-18, 2003.

SCHMID, R. D. **Biotechnology: application to oleochemistry**. Journal of American Oil Chemists' Society, v.64, n.4, p.563-570, 1987.

SCHNEIDER, M.; ENGEL, N.; BOENSMANN, H. **Enzymatische Synthesen chiraler Bausteine aus prochiralen Substraten: Herstellung von Malonsäuremonoalkylestern**. Angewandte Chemie, v. 96, p. 54-55, 1984.

SCHRAG, J. D., LI, Y., WU, S. E CYGLER, M. **Ser-His-Glu triad form the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum***. *Nature*, 351, 761-764, 1991.

SCHUCHARDTA. U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. **Transesterification of vegetable oils: a review**. *Journal of Braziliam Chemical Society*, v.9, n.1, p. 199 – 210, 1998.

SECUNDO F.; CARREA G., **Lipase activity and conformation in neat organic solvents**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* p. 93-102, 2002.

SHAH S.; GUPTA M. N. **Lipase catalyzed preparation of biodiesel from jatropha oil in a solvent free system**. *Process Biochem*, v. 42, pp. 409-14, 2007.

SHAO P.; MENG X.; H. E. J.; SUN P. **Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soap stock**. *Food Bioprod Proces*, v. 86, pp. 283-9, 2008.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. **Production, purification, characterization and applications of lipases**. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHISHIR, M. H.; PARAG, R. G.; VIRENDRA, K. R. **Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using sonochemical reactors**. *Ultrasonics Sonochemistry* 17 (2010) 827–832.

SHU, Z. Y.; JIANG, H.; LIN, R. F.; JIANG, Y. M.; LIN, L. E.; HUANG, J. Z. **Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010;62:1-8.

SILVA, C. **Produção Contínua de Biodiesel por Transesterificação não catalítica de Óleo de Soja**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil, 2009.

SILVA, C.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. **Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae***. *Process Biochem.*, v. 40, p. 321 - 326, 2005.

SINCHAIKUL, S.; SOOKKHEO, B.; PHUTRAKUL, S.; PAN, F. M.; CHEN, S. T. **Optimization of a Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, Purification, and Characterization**. *Protein Expression and Purification*, v. 22, p. 388-398, 2001.

SINISTERRA, J. V. **Application of ultrasound to biotechnology: an overview**. *Ultrasonics*, v. 30, p. 180-184, 1992.

SONG, Q. X.; WEI, D. Z. **Study of Vitamin C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 18, p. 261–266, 2002.

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

TAUBER, M. M.; GÜBITZ, G. M.; REHOREK, A. **Degradation of azo dyes by oxidative precesses – laccase and ultrasound treatment**. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4213-4220, 2008.

TIAN, Z. M.; WAN, M. X.; WANG, S. P.; KANG, J. Q. **Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 11, p. 399-404, 2004.

TRAKARNPRUK, W.; PORNTANGJITLIKIT, S. **Palm oil biodiesel synthesized with potassium loaded calcined hydrotalcite and effect of biodiesel blend on elastomers properties**. *Renewable Energy*, v. 33, pp. 1558-1563, 2008.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. **A review on microbial lipases production.** *Food and Bioprocess Technology*. 2010; 3:182-196.

TSUKAMOTO, J. **Esterificação enzimática direta de carboidratos com ácido acrílico em meio orgânico.** Dissertação de doutorado- Unicamp, Campinas - SP, BR, 2006.

VAKHLU, J. E KOUR, A. **Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning.** *Eletronic Journal of Biotechnology*. 2006;9.

VAN DYNE, D. L.; WEBER, J. A.; BRASCHLER, C. H. **Macroeconomic Effects of a Community-Based Biodiesel Production System.** *Bioresource Technology*, v. 56. pp. 1-6, 1996.

VICENTE, G.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. **Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems.** *Bioresource Technology*, v. 92, pp. 297-305, 2004.

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

VILLENEUVE, P. **Plant lipases and their applications in oils and fats modification.** *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 105, p. 308-317, 2003.

VULFSON, E. N. **In: Lipases: Their structure, biochemistry and Application:** WOOLEY, P.; PETERSEN, S. B. (eds.), Cambridge University Press: Great Britain, 1994.

VULFSON, E. N. **Enzymatic synthesis of food ingredients in low water media.** Trends in Food Science & Technology, v. 4, p. 209-215, 1993.

VULFSON, E. N.; SARNEY, B. D.; LAW, B. A. **Enhancement of subtilisin catalysed interesterification in organic solvents by ultrasound irradiation.** Enzyme and Microbial Technology, v. 13, p. 23-126, 1991.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. **Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*.** J. Bacteriol., v. 3, p. 663-670, 1979.

XIAO, Y. M.; WU, Q.; CAIA, Y.; LIN, X. **Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents.** Carbohydrate Research, v. 340, p. 2097-2103, 2005.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. **Ester synthesis in lipase catalyzed reaction.** Enzyme and Microbial Technology, v. 23, p. 438-450, 1998.

YANG, Z.; XIE, W. **Soybean oil transesterification over zinc oxide modified with alkali earth metals.** Fuel Processing Technology, v. 88, pp. 631-638, 2007.

YAO, C.; KOLLER, W. **Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi-cloning and characterization of a cutinase gene from *Alternaria brassicicola*.** Physiol. Mol. Plant Pathology., v. 44, p. 81, 1994.

YU, D.; TIAN, L.; WU, H.; WANG, S.; WANG, Y.; MA, D.; FANG, X. **Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by *Novozym 435*.** Process Biochemistry, v. 45, pp. 519–525, 2010.

ZAPPI, M.; HERNANDEZ, R.; SPARKS, D.; HORNE, J.; BROUGH, M.; ARORA, S. M.; MOTSENBOCKER, W. D. **A Review of the Engineering Aspects of the Biodiesel Industry.** MSU E-TECH Laboratory Report ET - 03 - 003, 2003.

ZHANG, Y.; DUBÉ, M. A.; MCLEAN, D. D.; KATES M. **Biodiesel Production from Waste Cooking Oil: 1. Process Design and Technology Assessment.** Bioresource Technology, v. 89, pp. 1-16, 2003.

ZHANG, X.; KOBAYASHI, T.; ADACHI, S.; MATSUNO, R. **Lipase-catalyzed synthesis of 6 - 0- vinylacetyl glucose in acetonitrile.** Biotechnol. Lett. , v.24, p. 1097 – 1100, 2002.

ZHU, K.; LIU, H.; HAN, P.; WEI, P. **Study of ultrasound-promoted, lipase-catalyzed synthesis of fructose ester.** Frontiers of Chemical Engineering in China, 2010. DOI 10.1007/s11705-009-0312-4

[\(http://www.petrobras.com.br/\)](http://www.petrobras.com.br/)

([www.biodiesel.gov.br](http://www.biodiesel.gov.br))