

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

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM SOLVENTE  
ORGÂNICO EM BANHO DE ULTRASSOM**

Luciane Batistella

Erechim, RS, Brasil

Junho de 2011

**LUCIANE BATISTELLA**

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

Erechim, RS, Brasil

Junho de 2011

# **PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM SOLVENTE ORGÂNICO EM BANHO DE ULTRASSOM**

**LUCIANE BATISTELLA**

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:

---

Profa. Débora de Oliveira, D. Sc.

Orientador

---

Prof. José Vladimir de Oliveira, D. Sc.

Orientador

---

Prof. Agenor Furigo Jr, D. Sc.

(UFSC)

---

Profa. Clarissa Dalla Rosa

URI-Campus de Erechim

Erechim, 29 de junho de 2011.

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.

*Dedico esta conquista aos meus pais,  
Olinto e Albani e ao meu irmão, Giovanni, pela  
compreensão, incentivo e amor que me deram.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amparo constante.

Aos meus pais, Olinto e Albani, pelo incentivo e amor demonstrados em todos os momentos.

Ao meu irmão, Giovanni.

Às minhas dindas, Joana, Mari Helena e Sônia, por todo o apoio que me deram.

Aos meus familiares.

Aos meus orientadores, Prof<sup>a</sup> Débora de Oliveira e Prof<sup>o</sup> José Vladimir de Oliveira, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo imenso aprendizado durante o trabalho de pesquisa, pela paciência e pelos conselhos.

À Prof<sup>a</sup> Helen Treichel, por todas as ajudas.

Ao Lindomar Lerin, por emprestar o equipamento de ultrassom e principalmente pela grande amizade.

À Patrícia Brugnerotto e Angélica Danielli, pela disponibilidade em me ajudar e pela amizade.

Às amigas e colegas de laboratório, Aline Richetti, Viviane Astolfi, Mara Zenevitz, Ieda Rotava, pela amizade, pelos inúmeros momentos de descontração e valiosos conselhos.

Às minhas grandes amigas, Sibeles Zulian, Caroline Casanova, Alessandra Smaniotto, pelo incentivo, conselhos e pela grandiosa amizade.

Aos demais colegas e amigos do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI Campus de Erechim e dos Laboratórios de Termodinâmica, Biotecnologia de Alimentos e Vegetal, pelos momentos de alegrias e descontração, e pelas experiências compartilhadas.

Aos demais professores do Curso de Engenharia de Alimentos, especialmente Geciane Toniazzo, Eunice Valduga, Clarissa Dalla Rosa, Marco Di Luccio e aos ex-professores Alexandre Cichoski e Marcio Mazutti.

À Prof<sup>a</sup> Sibeles Pergher, pela disponibilidade em ajudar sempre que foi pedido e pela amizade.

Aos professores do Curso de Química da URI-Campus de Erechim, especialmente Rogério Marcos Dallago e Fábio Garcia Penha, pelas

oportunidades e dispor-se sempre em transmitir os seus conhecimentos, e também aos professores Daniel Emmerich, Natália Paroul, Luciana Venquiaruto e Maria Carolina Esmelindro.

À URI – Campus de Erechim e ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos, por possibilitarem minha formação.

À CAPES, órgão financiador deste projeto, e que possibilitou a realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

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.

## **PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM SOLVENTE ORGÂNICO EM BANHO DE ULTRASSOM**

Luciane Batistella

Orientadores: Débora de Oliveira

José Vladimir de Oliveira

O potencial de aplicações de lipases em processos tecnológicos para a modificação de óleos e gorduras tem sido objeto de grande interesse nos meios científicos e industrial nos últimos anos. O principal objetivo deste trabalho foi o estudo comparativo da reação de transesterificação do óleo de soja através do uso de catalisadores enzimáticos utilizando sistema de ultrassom. Os experimentos foram realizados de acordo com planejamentos de experimentos pré-estabelecidos, variando a temperatura, concentração de água e de enzima, razão molar óleo-etanol e potência do ultrassom, onde foi usado n-hexano como solvente e duas lipases comerciais (Lipozyme RM IM, Novozym 435). A conversão da reação foi determinada pela análise das amostras em GC/FID. Um modelo empírico foi construído para avaliar a influência das variáveis de processo, bem como determinar as condições que maximizam a conversão para cada enzima estudada. Os resultados mostraram que o uso do sistema de ultrassom com enzimas e solvente orgânico conversões próximas a 90% para a Lipozyme RM IM e 60% para Novozym 435. O reuso da enzima Novozym 435 apresentou uma boa estabilidade da atividade enzimática e conversão em ésteres durante os ciclos estudados. Já a Lipozyme RM IM não demonstrou a mesma tendência.

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

## **ENZYME-CATALYZED PRODUCTION OF BIODIESEL IN ORGANIC SOLVENT UNDER ULTRASOUND IRRADIATION**

Luciane Batistella

Advisors: Débora de Oliveira

José Vladimir de Oliveira

There has been a growing interest in the use of lipases for oil biotransformation over the last decade, both from the academia and industrial sectors. The main goal of this work was study the transesterification of soybean oil in organic solvent under ultrasound irradiation. For this purpose, the experiments were performed in an ultrasonic water bath, following a sequence of experimental designs to assess the effects of temperature, enzyme and water concentrations, oil to ethanol molar ratio and output irradiation power on the reaction yield. Results show that ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil with ethanol might be a potential alternative route to conventional alkali-catalyzed method, as high reaction yields (~ 90 wt%) were obtained at mild irradiation power supply (~ 100 W), and temperature (60 °C) in a relatively short reaction time, 4h, using Lipozyme RM IM as catalyst. The repeated use of the catalyst under the optimum experimental condition resulted in a decay in both enzyme activity and product conversion after two cycles. The use of Novozym 435 led to lower conversions (about 57%) but the enzyme activity was stable after eight cycles of use, showing, however, a reduction in product conversion after the forth cycle.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>V</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>VII</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 Enzimas</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 Lipases</b> .....	<b>5</b>
2.2.1 Histórico.....	5
2.2.2 Aspectos gerais .....	6
2.2.3 Características cinéticas e físico-químicas das lipases .....	8
2.2.4 Estrutura tridimensional e mecanismo catalítico das lipases .....	9
2.2.5 Aplicações industriais das lipases .....	11
<b>2.3 Biodiesel</b> .....	<b>12</b>
2.3.1 Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel .....	13
2.3.2 Técnicas para produção de biodiesel .....	16
2.3.3 Transesterificação catalisada por enzimas .....	19
2.3.4 Produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico .....	21
2.3.5. Escolha de solventes para reação enzimática .....	22
<b>2.4. Ultrassom</b> .....	<b>23</b>
2.4.1 Equipamentos ultrassônicos .....	25
2.4.2 Produção de biodiesel em sistema de ultrassom.....	26
<b>CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>

<b>3.1 Material.....</b>	<b>29</b>
3.1.1 Enzimas .....	29
3.1.2 Reagentes .....	29
3.1.3 Substratos e solvente para a reação de transesterificação .....	30
3.1.4 Equipamentos.....	30
<b>3.2 Metodologia .....</b>	<b>30</b>
3.2.1 Estudo da influência dos solventes orgânicos sobre a atividade enzimática em banho de ultrassom .....	30
3.2.2 Produção de biodiesel em sistema de ultrassom utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM .....	31
3.2.2.1 Determinação do tempo reacional.....	31
3.2.2.2 Otimização da conversão na reação de produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em sistema de ultrassom .....	33
3.2.3 Estudo de sucessivos ciclos de uso das enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM na produção de biodiesel em sistema de ultrassom .....	35
3.2.3 Metodologia analítica .....	36
3.2.3.1 Determinação da atividade de esterificação das lipases.....	36
3.2.3.2 Metodologia analítica para determinação da conversão em ésteres .....	37
<b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Influência do solvente e da energia ultrassônica sobre a atividade de esterificação das lipases imobilizadas.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Produção de biodiesel em sistema de ultrassom utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM .....</b>	<b>49</b>
4.2.1 Determinação do tempo reacional .....	49
4.2.2 Avaliação das variáveis de processo para produção de biodiesel.....	50
<b>CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1: Esquema geral para a reação de esterificação. ....	17
Figura 2. 2: Esquema geral da reação de transesterificação de um triglicerídio. .....	17
Figura 2. 3: Representação das etapas da reação de transesterificação de óleos vegetais. ....	18
Figura 2. 4: Ilustração esquemática do banho de ultrassom. ....	25
Figura 2. 5: Ilustração esquemática da ponteira ultrassônica.....	26
Figura 3. 1: Vista geral do aparato experimental utilizado para produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em sistema de ultrassom. ....	32
Figura 3. 2: Fluxograma do procedimento experimental para a reação de transesterificação enzimática em solvente orgânico em sistema de ultrassom. .....	33
Figura 4. 1: Atividade relativa da Novozym 435 em diferentes solventes orgânicos tratados em sistema de ultrassom (atividade da enzima não tratada de U/g foi de 36,79, equivalente a 100%). ....	39
Figura 4. 2: A atividade relativa do Lipozyme RM IM em diferentes solventes orgânicos tratados em sistema de ultrassom. (atividade da enzima não tratada de U/g foi de 29,42 equivalente a 100%). ....	41
Figura 4. 3: MEV da Novozym 435 não-tratada (a) e tratada em sistema de ultrassom usando diferentes solventes orgânicos e tempos de contato (b). ....	44

Figura 4. 4: MEV da Lipozyme RM IM não tratada (a) e tratada em sistema de ultrassom usando diferentes solventes orgânicos e tempos de contato (b). ....	46
Figura 4. 5: Estabilidade em baixas temperaturas da Novozym 435 (a) e Lipozyme IM (b) usando diferentes solventes orgânicos, sob o sistema de ultrassom.....	48
Figura 4. 6: Cinética reacional da produção de biodiesel utilizando as enzimas (♦) Lipozyme RM IM e (■) Novozym 435.....	49
Figura 4. 7: Diagrama de Pareto para o Delineamento Plackett & Burman (PB-12). Diagrama (a) enzima Lipozyme RM IM e (b) enzima Novozym 435. ....	52
Figura 4. 8: Superfícies de resposta e curvas de contorno para conversão em ésteres (%). (a) utilizando Lipozyme RM IM e (b) utilizando Novozym 435. ...	60
Figura 4. 9: (a) enzima Novozym 435, (c) enzima Lipozyme RM IM, reuso das enzimas com enzima nova a cada batelada. (b) enzima Novozym 435 e (d) enzima Lipozyme RM IM reuso com a mesma enzima.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2. 1: Características de culturas oleaginosas no Brasil com potencial de uso energético.....	15
Tabela 2. 2: Comparação entre os métodos de catálise alcalina e catálise enzimática na produção de biodiesel (Fuduka <i>et al.</i> , 2001). .....	20
Tabela 3. 1: Níveis dos fatores investigados nos planejamentos experimentais seqüenciais. ....	34
Tabela 4. 1: Resumo das atividades de esterificação da Novozym 435 e Lipozyme RM IM em diferentes solventes e tempos de contato após o tratamento em sistema de ultrassom. ....	46
Tabela 4. 2: Matriz do primeiro planejamento experimental (valores codificados) com as respostas em termos de conversão em ésteres. ....	51
Tabela 4. 3: Matriz do segundo planejamento experimental realizado para produção de biodiesel utilizando a enzima Lipozyme RM IM. ....	56
Tabela 4. 4: Matriz do segundo planejamento experimental realizado para produção de biodiesel utilizando a enzima Novozym 435. ....	56
Tabela 4. 5: Coeficientes de regressão para a resposta conversão em ésteres etílicos (%) utilizando Lipozyme RM IM. ....	57
Tabela 4. 6: Coeficientes de regressão para a resposta conversão em ésteres etílicos (%) utilizando Novozym 435. ....	57
Tabela 4. 7: Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo para conversão em ésteres etílicos utilizando a Novozym 435 e Lipozyme RM IM. ....	58

Tabela 4. 8: Conversão em ésteres etílicos utilizando a enzima Novozym 435 e Lipozyme RM IM: valores experimentais, preditos pelo modelo e desvios relativos.....	60
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Capítulo 1 – Introdução

Há algumas décadas o mundo tem buscado um desenvolvimento sustentável, ambientalmente correto, socialmente justo e economicamente viável. A preocupação com diversas questões ambientais não se limita à preservação do planeta. Estudos apontam para a necessidade de adoção imediata de medidas mitigadoras ou de reversão dos danos já causados ao meio-ambiente. Neste contexto, o biodiesel tem chamado a atenção como uma fonte combustível e, de uma forma geral, de energia não-tóxica, biodegradável e renovável, com emissões significativamente menores de partículas e gases do efeito estufa como o CO, CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> e SO<sub>x</sub> (Tan *et al.*, 2010; Atadashi *et al.*, 2010). Sendo assim, o biodiesel vem sendo considerado uma alternativa importante e ambientalmente correta de produção de energia.

O biodiesel é definido como o derivado mono-álquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais, gorduras animais e até mesmo óleos de cozinha (Hu *et al.*, 2004; Thanh *et al.*, 2010; Issariyakul *et al.*, 2008). A transesterificação de um óleo com monoálcoois, especificamente metanol ou etanol, promove a quebra da molécula dos triglicerídeos, gerando uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos correspondentes, liberando glicerina como subproduto.

A reação pode ser realizada por diferentes processos catalíticos, usando catalisadores homogêneos (ácido ou base), onde o glicerol produzido contém quantidades significativas de sal como contaminante, ou catalisadores heterogêneos (base, ácido ou enzimas imobilizadas) (Medina *et al.*, 2009).

As enzimas, em particular as lipases, são capazes de catalisar o processo de transesterificação, produzindo glicerol mais limpo e livre de contaminantes, não sendo necessária a neutralização dos mesmos, constituindo, assim, uma opção ambientalmente mais atrativa que os processos convencionais (Nogueira *et al.*, 2010).

Um grande problema relacionado ao uso de enzimas como catalisadores para a produção de biodiesel é que a reação é mais lenta quando comparada à aplicação de catalisadores alcalinos, pode ocorrer a inativação da enzima pelo álcool utilizado (metanol ou etanol) e, principalmente, o alto custo das enzimas

(Shah *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2009). A reutilização de enzimas imobilizadas vem como uma alternativa, minimizando os custos, podendo tornar estes processos economicamente viáveis. Deve-se, no entanto, levar em consideração que a enzima pode ter sua atividade diminuída após sucessivos ciclos de uso devido, principalmente, à dessorção da enzima do suporte ou mesmo inativação por excesso de substratos e de produtos (Bajaj *et al.*, 2010).

Com relação às menores taxas de reação para reações enzimáticas comparadas às reações catalisadas quimicamente, alternativas têm sido propostas na literatura. Neste sentido, o sistema de ultrassom tem sido referenciado como potencial para aumentar a estabilidade enzimática e a atividade catalítica, possibilitando o reuso do catalisador por sucessivas bateladas e/ou seu emprego em processos contínuos (Elie *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011).

Os efeitos químicos e físicos do ultrassom originados pelo colapso cavitacional, produz localmente condições extremas e, portanto, induz a formação de espécies químicas que não são facilmente atingidas em condições convencionais, dirigindo uma reatividade particular (Cintas *et al.*, 1999). Quando as bolhas formadas pela cavitação rebentam perto do limite de fase de dois líquidos imiscíveis, a onda de choque resultante fornece uma agitação muito eficiente/mistura das camadas. Como consequência, o fenômeno de cavitação pode aumentar as taxas de reação em reações heterogêneas e, portanto, pode se tornar uma ferramenta útil em reações enzimáticas (Yachmenev *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005).

Apesar dos aspectos apontados anteriormente, poucas investigações têm sido apresentadas na literatura até a presente data sobre a aplicação do ultrassom para produção de biodiesel catalisada por lipases.

Com base no exposto anteriormente, o principal objetivo deste trabalho foi a avaliação da produção enzimática de biodiesel a partir da utilização de óleo de soja e etanol como substratos, n-hexano como solvente e duas lipases imobilizadas comerciais (Novozym 435 e Lipozyme RM IM) em sistema de ultrassom. O desenvolvimento do presente trabalho constou de duas partes distintas, constituindo os principais objetivos específicos:

- 1) Avaliação do comportamento da atividade das lipases comerciais em solvente orgânico em banho de ultrassom;

2) Otimização do processo de produção enzimática de biodiesel em banho de ultrassom.

Como forma de apresentação, o presente trabalho foi dividido em capítulos. O Capítulo 2 apresenta uma revisão da literatura sobre os principais assuntos abordados neste trabalho. São apresentados temas como a importância e aplicação das lipases para as indústrias, a produção de biodiesel por via enzimática, e a utilização do sistema de ultrassom para a produção de biodiesel. O Capítulo 3 apresenta os materiais e metodologias empregadas para o desenvolvimento de todas as etapas do trabalho. No Capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados relacionados ao comportamento das enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM em diferentes solventes orgânicos em sistema de ultrassom bem como os relativos à síntese enzimática de biodiesel em solvente orgânico em banho de ultrassom. O Capítulo 5 apresenta as principais conclusões obtidas a partir da consecução deste trabalho juntamente com as sugestões para trabalhos futuros. No Capítulo 6 são apresentadas as principais referências citadas para o embasamento científico deste trabalho.

## Capítulo 2 – 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; 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.

### 2.1 Enzimas

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 19, a natureza das enzimas e a maneira como atuam começou a ser esclarecida. Durante o século 20, 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 carbohidrases (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, pelos elevados custos de produção (Paques e Macedo, 2006).

A maioria das enzimas industriais é de origem microbiana (Sharma *et al.*, 2001). As enzimas microbianas 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).

## **2.2 Lipases**

### **2.2.1 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).

Em 1856, Claude Bernard descobriu uma lipase no suco pancreático com uma enzima que hidrolisava gotas de óleo insolúvel e as convertia em produtos solúveis.

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.

### 2.2.2 Aspectos gerais

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) pertencem a um grupo especial de esterases, 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 lipídio/água, hidrolisando, por exemplo, acilgliceróis de cadeia longa (acima de 8 átomos de carbono), (Côté e Shareck, 2008; Ericsson *et al.*, 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* e *Geotrichum*; pelas leveduras *Tulopsis* sp. e *Candida* sp. e pelas bactérias dos gêneros *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp. e *Staphylococcus* sp. Do ponto de vista econômico e industrial, os micro-organismos são preferíveis em comparação as fontes animais e vegetais, devido ao alto custo do seu isolamento.

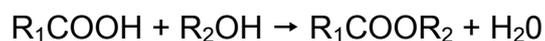
As lipases podem catalisar uma ampla variedade de reações, incluindo hidrólise, interesterificação, alcoólise, acidólise, esterificação e aminólise. (Dalla-Vecchia, 2004; Reis *et al.*, 2008):

i. Hidrólise

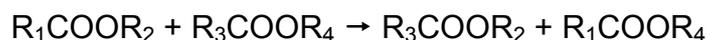


ii. Síntese:

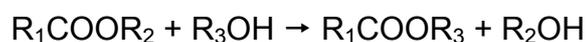
(a) Esterificação



(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; Hasan *et al.*, 2009; 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 triglicerídios em ácidos graxos, que dividem-se em: primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2 e glicerol em qualquer posição da estrutura do grupo acila. 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-monoglicerídios e 1-2 ou 2-4 diglicerídios, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acila produzindo 1,3-diglicerídios, ou 1- ou 3- monoglicerídios. 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 *et al.*, 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). Como exemplo clássico pode-se citar a lipase produzida por *Candida rugosa*.

### 2.2.3 Características cinéticas e físico-químicas das lipases

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), apresentando temperatura ótima para atividade máxima 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).

As lipases geralmente são glicoproteínas ácidas (Hiol *et al.*, 1999) de massa molecular geralmente variando entre 20 e 60kDa (Carvalho *et al.*, 2003). Seu ponto isoelétrico varia em uma faixa de 3,6 a 7,6, sendo majoritariamente ácidas, com pI entre 4 e 5 (Ferrer *et al.*, 2000).

#### **2.2.4 Estrutura tridimensional e mecanismo catalítico das lipases**

Nos últimos anos, a elucidação da relação estrutura-função de lipases, bem como de seu mecanismo catalítico, na presença ou não de interfaces orgânico-aquosas, tem sido muito estudada. A ativação de lipases ocorre na interface água-lipídio, um fenômeno que pode ser relacionado às características estruturais únicas dessa classe de enzimas. Como as lipases e os lipídios interagem na interface, este mecanismo ainda não está totalmente claro e tem sido matéria de investigação intensa (Bon *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2001).

As estruturas tridimensionais da lipase fúngica de *Rhizomucor michei* e da lipase pancreática humana foram determinadas em 1990. Desde então, diversas outras estruturas lipásicas foram determinadas. Essas enzimas exibem um padrão de formação característico: um dobramento básico de  $\alpha$ - $\beta$ -hidrolases. O centro ativo é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina, o que também é encontrado em serina proteases (Jaeger e Reetz, 1998; Kademi *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2008; Bon *et al.*, 2008).

A resolução da estrutura tridimensional de uma lipase por difração de raios-X revelou a presença de uma estrutura  $\alpha$ -helicoidal oligopeptídica na superfície da proteína que protege o centro ativo, denominada “tampa”. O lado hidrofóbico da hélice é virado para dentro do sítio ativo, que fica então inacessível às moléculas do substrato. Contudo, quando uma lipase se liga em uma interface lipídica, um rearranjo conformacional ocorre, causando o deslocamento da “tampa”, enquanto o sítio ativo da lipase fica totalmente acessível para o substrato. Como um resultado, o lado hidrofóbico da tampa fica exposto à fase lipídica, aumentando as interações hidrofóbicas entre a enzima e a superfície lipídica. A mecânica de abertura da tampa pode variar entre enzimas, mas em todos os casos conduz à criação de um sítio ativo aberto, acessível e hidrofóbico para a ligação lipídica. Outras estruturas

tridimensionais foram descritas e a presença da tampa corroborada, mas o número e a posição das  $\alpha$ -hélices envolvidas na composição da tampa difere entre as lipases. Estudos de cristalografia mostraram, também, que a maior parte das lipases apresenta o sítio recoberto, sugerindo que o estado inativo provavelmente prevalece em solução (Joseph *et al.*, 2008; Jaeger e Reetz, 1998; Kademi *et al.*, 2004; Lotti e Alberghina, 2007; Bon *et al.*, 2008).

De maneira geral, quando a enzima é cristalizada na presença de inibidores ou co-fatores, a estrutura obtida encontra-se sempre na conformação aberta. No caso de lipases não complexadas, o estado conformacional da estrutura cristalina depende da composição e das propriedades microscópicas da solução. Assim, as estruturas de lipases até hoje determinadas são geralmente divididas em duas categorias: as que têm o sítio ativo acessível ao solvente (estrutura aberta) e as que têm o sítio ativo inacessível ao solvente (estrutura fechada). Estes estados são importantes para a função destas enzimas. Na ausência de interfaces, é observada uma baixa atividade lipolítica, sugerindo que as estruturas fechadas predominam em meios aquosos (Lotti e Alberghina, 2007).

As estruturas tridimensionais das lipases conhecidas até hoje mostram que o grau de mobilidade da “tampa” varia fortemente, encontrando-se desde casos em que parece haver dois estados extremos – aberto e fechado – com níveis de energia significativamente inferiores aos dos estados de transição, até casos com tampas muito móveis, com vários estados intermediários de energia comparáveis (Bon *et al.*, 2008).

O mecanismo de reação para lipases é comum a todos os membros da família serina hidrolases, sendo os complexos acila-enzima os intermediários cruciais em todas as reações catalisadas por lipases (Reis *et al.*, 2008; Reetz, 2002). As lipases são carboxilesterases que atuam em acilglicerídios de cadeia longa e são classificadas como serina hidrolases devido à inibição por fosfato de dietil p-nitrofenol (Kademi *et al.*, 2004).

O fenômeno denominado “ativação interfacial” foi empregado, por muito tempo, para distinguir lipases de esterases (enzimas ativas em ligações éster de moléculas solúveis que seguem a cinética clássica de Michaelis-Menten). Esse comportamento encontrou uma explicação estrutural alguns anos depois

quando as primeiras estruturas tridimensionais das lipases foram elucidadas (Bon *et al.*, 2008; Lotti e Alberghina, 2007).

Contudo, a classificação de uma enzima lipolítica como uma verdadeira lipase (EC 3.1.1.3) com base em sua ativação na interface na presença de uma estrutura tipo tampa não se aplica em vários casos. Lipases sem uma tampa ou com uma tampa mas nenhuma ativação interfacial já foram descritas (Lotti e Alberghina, 2007; Bon *et al.*, 2008). Algumas lipases não mostram ativação na presença de substratos emulsificados; ao contrário, sua atividade aumenta continuamente, indicando que essas enzimas são capazes de degradar substratos monoméricos e emulsionados, enquanto esterases verdadeiras degradam somente substratos monoméricos. Até a data, a definição mais ampla de uma lipase como uma carboxilesterase que catalisa a hidrólise e a síntese de acilgliceróis de cadeia longa é geralmente aceita e parece ser adequada para descrever todas as lipases conhecidas (Lotti e Alberghina, 2007; Kademi *et al.*, 2004; Jaeger e Reetz, 1998).

### **2.2.5 Aplicações industriais das lipases**

Enzimas lipolíticas constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas. A produção de lipases microbianas requer um entendimento detalhado do mecanismo molecular que governa a sua secreção e formação. A otimização de propriedades das lipases industrialmente relevantes tem sido estabelecida com sucesso utilizando lipases para a síntese de biopolímeros e biodiesel, a produção de farmacêuticos enantiopuros, agroquímicos e compostos aromáticos (Hasan, 2006).

Alguns dos produtos industrialmente importantes fabricados a partir de óleos e gorduras por processos químicos podem ser produzidos por lipases com maior rapidez e melhor especificidade em condições brandas (Vulfson *et al.*, 1994). O comportamento quimio-, regio- e enantiospecífico destas enzimas tem despertado grande interesse entre cientistas e industriais (Saxena *et al.*, 2003; Hasan, 2006).

A utilização de enzimas lipolíticas pelas indústrias apresenta vantagens como: estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, facilidade de separação dos produtos e, quando imobilizadas, podem ser submetidas às

condições industriais típicas, com reatores a temperaturas superiores a 70°C por longos períodos de tempo (Hasan *et al.*, 2006).

Com o aumento da conscientização ambiental e questões de custo, a biotecnologia está ganhando espaço rapidamente, devido às diversas vantagens que ela oferece em relação às tecnologias convencionais. O campo de enzimas industriais está vivenciando maiores iniciativas em pesquisa e desenvolvimento, resultando no desenvolvimento de uma série de novos produtos e em melhorias no processo e desempenho da vários produtos existentes.

### 2.3 Biodiesel

O biodiesel é um combustível composto de mono-álquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (com ou sem duplas ligações), obtido a partir de matérias primas vegetais ou animais (Hu *et al.*, 2004; Thanh *et al.*, 2010). As matérias-primas vegetais são derivadas de óleos vegetais tais como soja, mamona, colza (canola), palma, girassol e amendoim, entre outros, e as de origem animal são obtidas do sebo bovino, suíno e de aves, podendo-se também incluir o uso de alternativas de matérias-primas como os óleos utilizados em fritura (cocção).

Esse combustível é utilizado para substituição do óleo diesel, em percentuais adicionados no óleo diesel ou integral, nos motores à combustão dos transportes rodoviários e aquaviários e nos motores utilizados para a geração de energia elétrica.

O biodiesel compõe, junto com o etanol, importante oferta para o segmento de combustíveis. Ambos são denominados de biocombustíveis por serem derivados de biomassa (matéria orgânica de origem vegetal ou animal que pode ser utilizada para a produção de energia), menos poluentes e renováveis (SEBRAE, 2007).

A definição para biodiesel adotada na Lei nº 11.097, de 13 de setembro de 2005, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira é:

*“Biodiesel: biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.” (NR)*

O Programa Nacional de Biodiesel (Lei nº 11.097) prevê a adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado, em qualquer parte do território nacional. Em sua primeira etapa, o programa prevê a mistura de biodiesel na proporção de até 2% (B2) ao diesel de petróleo e de 5% (B5) oito anos após a publicação da referida lei ([www.biodiesel.gov.br](http://www.biodiesel.gov.br)).

### **2.3.1 Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel**

O Brasil, por ser detentor de uma grande extensão territorial, apresenta uma ampla diversidade de matérias-primas para a produção de biodiesel. Destacam-se, dentre as principais, as oleaginosas, como o algodão, amendoim, dendê, girassol, mamona, pinhão manso e soja. São também consideradas matérias-primas para biocombustíveis os óleos de descarte, gorduras animais e óleos já utilizados em frituras de alimentos. No entanto, é importante ressaltar que as propriedades químicas e físicas da matéria-prima estão diretamente associadas à tecnologia e ao rendimento do processo de conversão e, por conseguinte, à qualidade do produto final para fins combustíveis.

Cada oleaginosa, dependendo da região na qual é cultivada e segundo as condições de clima e de solo, apresenta características específicas na produtividade por hectare e na percentagem de óleo obtida da amêndoa ou grão. A produtividade obtida também está diretamente associada às condições de clima e do sol, às tecnologias de cultivo, à qualidade de semente e às tecnologias de processamento praticadas. A Tabela 2.1 ilustra a relação das espécies, produtividade e rendimento de acordo com as regiões produtoras.

A importância da seleção da matéria-prima pode ser inicialmente avaliada pelo seu impacto sobre o custo da produção industrial de biodiesel, por exemplo, via transesterificação (ou alcoólise) em meio alcalino. De acordo com avaliações do National Biodiesel Board ([www.biodiesel.org](http://www.biodiesel.org)), baseadas na produção norte-americana de ésteres metílicos de óleos ou gorduras, a matéria-prima corresponde a 69,9% do custo de produção, cabendo 8,8% à administração e vendas (incluindo marketing), 6,3% ao custo de capital, 5,1% ao álcool para transesterificação, 3,4% ao custo de pessoal, 1,6% ao catalisador alcalino, 4,0% à manutenção, seguro e despesas incidentais e 1,0%

ao capital de giro. Isto significa que a escolha da matéria-prima não pode ser vinculada a uma decisão meramente política.

**Tabela 2. 1:** Características de culturas oleaginosas no Brasil com potencial de uso energético.

Espécie	Produtividade (toneladas/há)	Porcentagem de óleo	Ciclo de vida	Regiões produtoras	Tipo de cultura	Rendimento (tonelada óleo/há)
Algodão		15	Anual	MT, GO, MS, BA e MA	Mecanizada	0,1 a 0,2
Amendoim	1,5 a 2	40 a 43	Anual	SP	Mecanizada	0,6 a 0,8
Dendê	15 a 25	20	Perene	BA e PA	Intensiva MO	3 a 6
Girassol	1,5 a 2	28 a 48	Anual	GO, MS, SP, RS e PR	Mecanizada	0,5 a 0,9
Mamona	0,5 a 1,5	43 a 45	Anual	Nordeste	Intensiva MO	0,5 a 0,9
Pinhão manso	2 a 12	50 a 52	Perene	Nordeste e MG	Intensiva MO	1 a 6
Soja	2 a 3	17	Anual	MT, PR, RS, GO, MS, MG e SP	Mecanizada	0,2 a 0,4

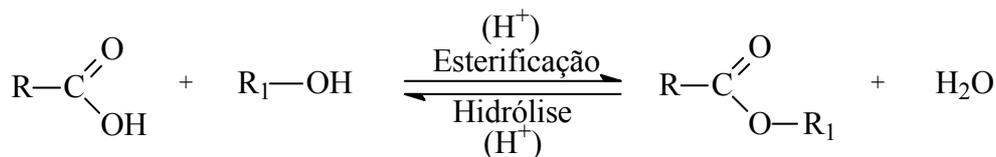
Fonte: SEBRAE, 2007.

Segundo dados da Abiove (Associação Brasileira de Óleos vegetais), a tendência do Brasil é adotar a soja como matéria-prima para produção de biodiesel, visto que a produção desta oleaginosa representa 95% da produção nacional de grãos e 90% da produção de óleos vegetais, apresentando o maior potencial para servir de modelo para o desenvolvimento de um programa nacional de biodiesel. Em termos mundiais, o Brasil se encontra como o segundo maior produtor desta oleaginosa. A safra de 2009/2010 atingiu a produção recorde de 67 milhões de toneladas. Atualmente, a soja é a principal cultura agrícola do Brasil, em volume e geração de renda, representa 11% das exportações totais, conta com 250 mil produtores rurais em 17 estados e gera 1,5 milhões de empregos diretos e indiretos ([www.conab.com.br](http://www.conab.com.br); [www.abiove.com.br](http://www.abiove.com.br)).

### **2.3.2 Técnicas para produção de biodiesel**

Os dois processos mais utilizados na produção de biodiesel são a transesterificação e a esterificação, embora existam outros processos que também possam ser utilizados, como por microemulsões e por pirólise. O objetivo desses processos é diminuir a viscosidade do óleo vegetal assim como melhorar o desempenho do mesmo em motores movidos a diesel (Camargos, 2005). Ênfase especial será dada, neste capítulo, à produção de biodiesel via reação de transesterificação, escopo do presente trabalho. Detalhes acerca dos outros métodos para produção de biodiesel podem ser encontrados nos trabalhos de Fukuda *et al.*, 2001; Ma e Hanna, 1999; Knothe *et al.*, 2002).

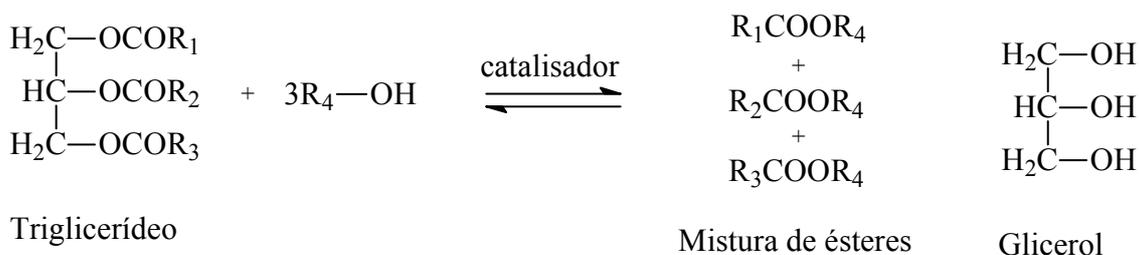
A esterificação é o processo de obtenção de ésteres formados a partir da substituição de uma hidroxila (-OH) de um ácido por um radical alcoxila (-OR), ou seja, é uma reação de condensação de um ácido carboxílico com um álcool produzindo éster e água catalisada por ácidos (Solomons e Fryhle, 2002). Reações de esterificação são exemplos de reações reversíveis, sendo a reação inversa conhecida como hidrólise (Figura 2.1).



**Figura 2. 1:** Esquema geral para a reação de esterificação.

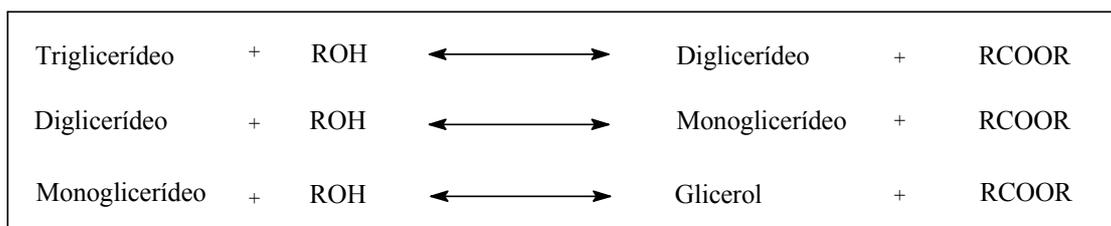
O surgimento da transesterificação pode ser datado de 1846, quando Rochieder descreveu a produção de glicerol pela etanolise de óleo de mamona. Desde aquele momento, o processo de alcoólise tem sido largamente estudado (Demirbas, 2003).

Transesterificação é um termo geral usado para descrever uma importante classe de reações orgânicas onde um éster é transformado em outro através da troca do resíduo alcoxila (Ma e Hanna, 1999). Quando o éster original reage com um álcool, o processo de transesterificação é denominado alcoólise (Figura 2.2). Esta reação é reversível e prossegue essencialmente misturando os reagentes. Contudo, a presença de um catalisador (ácido ou base) acelera consideravelmente esta conversão, como também contribui para aumentar o rendimento da mesma (Ma e Hanna, 1999; Schuchardt *et al.*, 1999).



**Figura 2.2:** Esquema geral da reação de transesterificação de um triglicerídeo.

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 do monoglicerídeo para glicerol, gerando uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada fase da reação (Srivastava e Prasad, 2000), conforme representado na Figura 2.3.



**Figura 2.3:** Representação das etapas da reação de transesterificação de óleos vegetais.

Com relação ao agente transesterificante, o processo reacional ocorre preferencialmente com álcoois de baixa massa molecular, como por exemplo, metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico (Ferrari *et al.*, 2005), mas metanol e etanol são os mais freqüentemente empregados. Metanol é o mais utilizado devido ao seu baixo custo na maioria dos países e às suas vantagens físicas e químicas (polaridade, álcool de cadeia mais curta, reage rapidamente com o triacilglicerídeo e dissolve facilmente o catalisador básico). Além disso, permite a separação simultânea do glicerol (Ma e Hanna, 1999). No entanto, é um produto tóxico. A mesma reação usando etanol é mais complicada, pois requer um álcool anidro, bem como um óleo com baixo teor de água para levar à separação do glicerol (Ma e Hanna, 1999). A vantagem de se usar o etanol obtido da cana-de-açúcar, que é 100% renovável e garante maior segurança na manipulação devido a sua menor toxicidade, é totalmente biodegradável, tanto que é usado na área de alimentos. O metanol também é conhecido por causar inativação mais do que o etanol. Portanto, o etanol é geralmente preferido para realização de transesterificação catalisada por lipase para a preparação de biodiesel (Naranjo *et al.*, 2010). Além disso, no Brasil existe uma maior disponibilidade do álcool de cana (maior produtor mundial de etanol), enquanto parte (50% aproximadamente) do metanol consumido no país para outras finalidades é importado.

Este procedimento pode ser realizado tanto em meio ácido como em meio básico ou utilizando enzimas. Entre os catalisadores básicos estão os hidróxidos de metais alcalinos, carbonatos e alcóxidos de metais alcalinos (metóxido de sódio, etóxido de sódio, propóxido de sódio e butóxido de sódio). A maior parte dos trabalhos descritos na literatura emprega catalisadores

básicos, tais como KOH e NaOH, onde foram observados maiores rendimento e seletividade (Freedman *et al.*, 1986).

No entanto, outros catalisadores básicos não iônicos podem ser usados na transesterificação dos triacilgliceróis, evitando a formação de subprodutos indesejáveis como os sabões, entre eles trietilamina, piperidina, guanidinas (Ma e Hanna, 1999). Ácido sulfúrico, ácidos sulfônicos e ácido clorídrico são geralmente empregados como catalisadores ácidos.

A conversão enzimática de óleos vegetais em biodiesel oferece uma opção ambientalmente mais atrativa que os processos convencionais (Prasad *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2006). Enzimas hidrolíticas como as lipases são usadas como biocatalisadores, embora o processo enzimático não tenha sido desenvolvido comercialmente (Ma e Hanna, 1999).

### **2.3.3 Transesterificação catalisada por enzimas**

Embora a transesterificação química usando um processo de catálise alcalina proporcione níveis elevados de conversão dos triglicerídios aos seus correspondentes alquil ésteres de ácidos graxos, este processo encerra uma série de desvantagens, como: grande gasto de energia, a recuperação do glicerol é difícil, o catalisador ácido ou alcalino tem que ser retirado do produto, o efluente alcalino requer tratamento. Os catalisadores enzimáticos como lipases, em contrapartida, são capazes de catalisar a transesterificação de triglicerídios em sistemas aquosos ou não aquosos (Meher *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2001; Helwani *et al.*, 2009).

A Tabela 2.2 apresenta uma comparação entre os métodos da catálise básica e enzimática, especificamente para a produção de biodiesel. Deve-se salientar que no processo enzimático o subproduto, a glicerina, pode ser facilmente recuperado com simples processos de separação. No entanto, os catalisadores enzimáticos são frequentemente mais caros do que catalisadores químicos, de modo que a sua reciclagem e reutilização é muitas vezes indispensável para a viabilidade comercial.

Embora, no momento, o alto custo de produção da enzima é o maior obstáculo à comercialização de processos catalisados pelas mesmas, os recentes avanços na tecnologia de enzimas, tais como o uso de lipases

tolerantes a solventes e lipases imobilizadas que podem tornar sua reutilização possível, estão sendo testadas para desenvolver sistemas de baixo custo (Oliveira *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Rosa *et al.*, 2008).

Embora a transesterificação catalisada por enzimas ainda não seja aplicada comercialmente, alguns resultados foram relatados na literatura. Esses estudos consistem principalmente na otimização das condições de reação (temperatura, solvente, pH, razão molar álcool/óleo, o tipo de micro-organismo que gera a enzima, etc) a fim de estabelecer as características adequadas para uma indústria. Síntese de biodiesel utilizando enzimas, tais como *Candida antarctica* (Reyes *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2007), *Candida rugosa* (Linko *et al.*, 1998; Shao *et al.*, 2008), *Candida sp.* (Lv *et al.*, 2008), *Pseudomonas cepacia* (Shah *et al.*, 2007), *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) (Bernardes *et al.*, 2007), *Pseudomonas fluorescens* (Luo *et al.*, 2006), *Pseudomonas sp.* (Lutz *et al.*, 2006) e *Thermomyces lanuginosus* (Dizge *et al.*, 2007) são relatadas na literatura.

**Tabela 2. 2:** Comparação entre os métodos de catálise alcalina e catálise enzimática na produção de biodiesel (Fuduka *et al.*, 2001).

	Processo de catálise alcalina	Processo de catálise enzimática
Temperatura de reação (K)	333 – 338	303 – 313
Ácidos graxos livres nas matérias-primas	Produtos saponificados	Metil ésteres
Água nas matérias primas	Interferência com a reação	Não influencia
Rendimento de metil ésteres	Normal	Maior
Recuperação de glicerol	Difícil	Fácil
Purificação de metil ésteres	Lavagem repetida	Nada
Produção por catálise	Barato	Relativamente caro

### 2.3.4 Produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico

A síntese enzimática de biodiesel pode ser realizada utilizando solventes orgânicos ou sistema livre de solventes (somente a mistura de substratos). Normalmente, em sistemas orgânicos de solventes, as lipases podem catalisar conversão de óleos (por exemplo, óleo de colza, óleo de soja) para ésteres alquila de ácidos graxos quando a alíquota de álcool é adicionada no início do processo (Szczesna *et al.*, 2009).

Os solventes orgânicos são utilizados na síntese enzimática de biodiesel a fim de aumentar a taxa de transesterificação através da solubilidade mútua dos TAGs hidrofóbicos e álcoois hidrofílicos. Observa-se que a solubilidade de propanol e butanol em óleos é muito superior ao do metanol e etanol e, portanto, estes dois álcoois primários não precisa de solvente orgânico adicional (Soumanou *et al.*, 2003).

Entre os solventes orgânicos utilizados para a síntese enzimática de biodiesel os mais adequados são os hidrofóbicos, tais como isooctano (log P = 4,7), n-heptano (log P = 4,0), éter de petróleo 60-120 (log P = 3,5-4,3), éter de petróleo 40-60 (log P = 3,2), n-hexane (Log P = 3,5) e cicloexano (log P = 3,1), bem como terc-butanol com log P = 0,83 (Su *et al.*, 2008; Royon *et al.*, 2008). Solventes orgânicos hidrofílicos interajam fortemente com as moléculas de água da camada de revestimento da enzimas e, portanto, eles são muito menos úteis na catálise enzimática (Royon *et al.*, 2007).

Solventes mais sofisticados e caros são os líquidos iônicos (pares de íons, que são líquidos à temperatura ambiente), que podem ser usados na síntese de biodiesel (Zhang *et al.*, 2011). Os líquidos iônicos são não-voláteis, não-tóxicos e termicamente estáveis, além disso, a sua hidrofobicidade/hidrofílicidade pode ser ajustado de acordo com a natureza do cátion e do ânion constituintes. Além disso, eles dissolvem muitas moléculas polares e não polares que participam do processo de transesterificação e pode estabilizar algumas enzimas (Zhang *et al.*, 2011).

Os custos da produção de biodiesel na indústria química são menores do que os dos processos enzimáticos, no entanto, se a poluição ambiental for levada em consideração, esses custos são comparáveis (Canakci *et al.*, 2003). A fim de diminuir os custos de produção, vem sendo utilizadas lipase resistentes e desenvolvidos de sistemas que fornecem a longo prazo, uso

repetitivo destes biocatalisadores, os quais podem dar origem à substituição de processos químicos por enzimas (Szczena *et al.*, 2009; Gerpen, 2005; Meher *et al.*, 2006; Srivathsan *et al.*, 2008).

Resumindo, a principal razão da adição de solventes orgânicos para misturas de álcool/óleo consiste em melhorar a solubilidade mútua dos destes substratos e aumentando a estabilidade operacional da lipase. Solventes orgânicos eliminam a necessidade de adicionar álcoois em porções. Desde inflamabilidade, volatilidade e toxicidade dos solventes orgânicos podem prejudicar scale-up de produção de biodiesel, a transesterificação enzimática em sistemas de solventes tem sido intensamente investigados (Szczena *et al.*, 2009).

### **2.3.5. Escolha de solventes para reação enzimática**

A seleção do solvente orgânico é um fator crucial na catálise enzimática em meio não aquoso, devido à interferência direta desta na estabilidade, atividade e especificidade da enzima. Embora reações catalisadas por lipases na presença de solventes orgânicos apresentam muitas vantagens (Ji *et al.*, 2010), a maioria das enzimas, incluindo as lipases, não é estável em solventes orgânicos, especialmente os solventes hidrofílicos.

Em geral, solventes hidrofóbicos são menos prejudiciais para as enzimas de forma significativa com a água necessária para manter a estrutura da enzima. Solventes hidrofílicos tendem a retirar a água essencial da estrutura protéica, conduzindo à perda de atividade enzimática (De Paula *et al.*, 2005). Além disso, um solvente orgânico ideal pode dissolver consideravelmente o substrato, favorecendo o progresso da reação, sem afetar a atividade enzimática (Tsukamoto, 2006).

De uma maneira geral para a otimização dos sistemas biocatalíticos em solventes orgânicos, o log P é considerado um bom método quantitativo, uma vez que representa a polaridade do solvente. A seguinte classificação é recomendada para a escolha da maioria dos solventes orgânicos adequados para a catálise enzimática: (i) os solventes com  $\log P < 2$ , devido à sua alta polaridade pode causar a desnaturação do catalisador, (ii) os solventes com  $2 < \log P < 4$  são considerados moderado e (iii) os solventes com  $\log P > 4$  pode

ser considerado o mais adequado, pois eles são não-polares (Tsukamoto, 2006).

Para superar essa limitação do uso de solventes, várias estratégias, tais como a modificação química, imobilização, e proteína de engenharia, têm sido empregadas para a estabilização de enzimas para uso em solventes orgânicos. Alternativamente, tem sido proposto que em vez de modificar as enzimas para aumentar a sua estabilidade perante os solventes, é mais conveniente realizar uma triagem das enzimas naturalmente evoluídas que sejam tolerantes a solventes, para aplicação em não-aquosos síntese enzimática (Ji *et al.*, 2010).

#### 2.4. Ultrassom

O ultrassom é uma onda mecânica que está no intervalo de frequência de 20 kHz a um limite superior que não é precisamente definido, mas geralmente definido para os gases em 5 MHz e de 500 MHz para líquidos e sólidos (Mason, 2002).

Estas ondas são 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).

O ultrassom foi descoberto em 1880 por Curie enquanto este 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).

As ondas ultrassônicas são geradas por transdutores ultrassônicos. Esses transdutores são feitos de materiais piezoelétricos que apresentam um fenômeno chamado efeito piezoelétrico. Piezoelectricidade é a propriedade que certos materiais apresentam quando a aplicação de uma voltagem nos

eletrodos de sua superfície causa uma deformação mecânica numa certa direção. Esse é o chamado “efeito piezoelétrico direto”. Similarmente, existe o “efeito piezoelétrico inverso” quando a aplicação de uma força mecânica na superfície do material resulta no aparecimento de uma voltagem nos eletrodos.

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

- Alta frequência (2-10 MHz) e baixa potência ( $<1 \text{ W/cm}^2$ ), utilizado em diagnóstico de imagem e análises químicas;
- Baixa frequência (20-100 KHz) e alta potência ( $10-1000 \text{ W/cm}^2$ ), utilizado para a sonoquímica.

O ultrassom é um fenômeno físico que influencia no processo de criar, aumentar e rebentar cavidades de vapor e gases, denominado cavitação, em um líquido promovendo efeitos de ativação em reações químicas.

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).

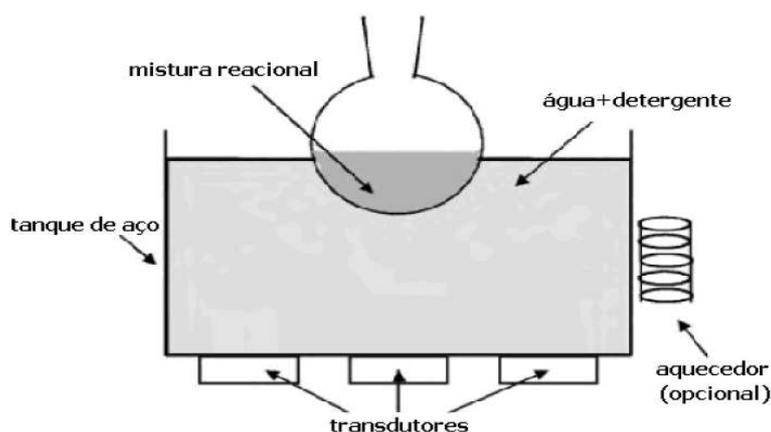
Em sistemas heterogêneos, a destruição da bolha ocorre assimetricamente originando um jato de líquido em direção à superfície sólida, podendo causar erosão localizada. Mas existem também microfluxos de líquidos que acabam por favorecer o transporte de massa entre a fase líquida e a superfície sólida, acelerando algumas reações químicas (Liu *et al.*, 2008).

### 2.4.1 Equipamentos ultrassônicos

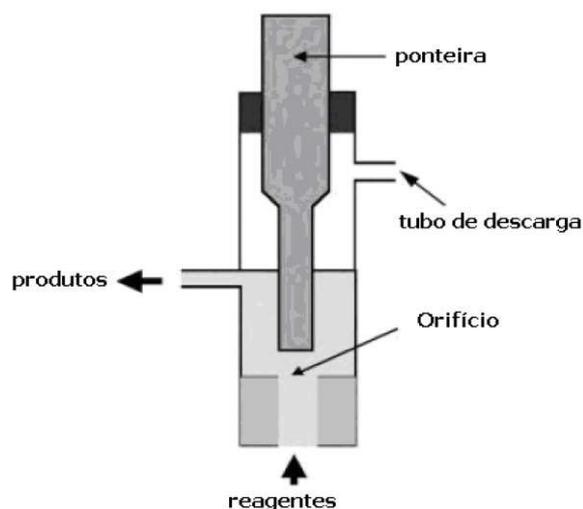
Dois equipamentos de ultrassom são mais utilizados para realização em reações químicas: o banho de ultrassom e a ponteira ultrassônica. A fonte de energia ultra-sonora é uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas, este sistema constitui o transdutor piezoelétrico. O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas; as chapas metálicas amplificam estes sinais; o transdutor transmite os impulsos ultra-sonoros ao meio reacional (Barbosa e Serra, 1992).

No banho, o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultra-sonora é transmitida através de um líquido, normalmente água (Figura 2.4). Neste caso, há muita dispersão de energia ultra-sonora, 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 (Figura 2.5) (Barbosa e Serra, 1992).

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



**Figura 2. 4:** Ilustração esquemática do banho de ultrassom.



**Figura 2. 5:** Ilustração esquemática da ponteira ultrassônica.

#### 2.4.2 Produção de biodiesel em sistema de ultrassom

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.

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 (50% da energia ultrassônica, 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 ciclos.

Kuma *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.

## 2.5 Considerações finais

A literatura aponta que o Brasil possui tradição no cultivo da soja, além de capacidade de esmagamento e cadeia produtiva bem estabelecida. 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 em 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 3 – Material e Métodos

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Enzimas

Foram utilizadas duas lipases comerciais de origem microbiana:

- Novozym 435 - Produzida a partir de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/ Araucária-PR. A enzima atua randomicamente nas 3 posições do triglicerídio. O produto é constituído por partículas de formato esferoidal, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, e densidade de aproximadamente 430 kg/m<sup>3</sup>. Este produto é fornecido com quantidade de água entre 1-2%. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40-70°C (NOVO NORDISK, 1992);

- Lipozyme RM IM - Produzida por fermentação submersa de *Rhizomucor miehei* e imobilizada em resina de troca iônica. Apresenta especificidades nas posições 1,3 do triglicerídio. Possui tamanho de partícula entre 0,2-0,6 mm, densidade entre 350-450 Kg/m<sup>3</sup> e conteúdo de água entre 2-3%. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 30-70°C (NOVO NORDISK, 1992).

#### 3.1.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes/solventes:

- Terc-butanol (99,5%), etanol (99%), iso-octano (99%), n-hexano (99%), etanol (99%), álcool iso-propílico (99,5%), acetona e metanol grau HPLC (UV/HPLC – grau espectroscópico), todos adquiridos da Vetec SA e utilizados sem nenhum tratamento prévio;
- Para as análises cromatográficas foram utilizados padrões do metil éster do ácido nervônico (C24:1) e o metil éster do ácido mirístico (C14) e como padrão interno foi adotado o heptadecanoato de metila (C17:0), todos de procedência Sigma-Aldrich. Para o preparo das soluções foi utilizado como solvente n-heptano marca Merck, de pureza 99,9%, cuja pureza segue a Norma Européia EN14103.

### 3.1.3 Substratos para a reação de transesterificação

Como substratos foram usados:

- Ácido láurico (Vetec) e álcool n-propílico (Vetec) para dosagem da atividade de esterificação das lipases;
- Óleo de soja (BUNGE), sem nenhum tratamento prévio;
- Álcool etílico (Nuclear) 99,5%;
- Hexano (F.Maia) 98,5%.

### 3.1.4 Equipamentos

Dentre os equipamentos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, pode-se citar:

- Agitador magnético marca Fisatom, modelo 550;
- Balança Analítica marca Bel Engineering;
- Estufa modelo JP 101, marca J. Prolab;
- pHmetro digital PG 2000, marca Gehaka;
- Dessecador;
- Rotavapor marca Fisatom, modelo 550;
- Freezer modelo Frost Free 270, marca Brastemp;
- CG/FID Shimadzu modelo 2010, equipado com uma coluna capilar apolar modelo RT-WAX;
- Banho de ultrassom com frequência de 37 kHz e potência de 132 W (USC 1800A, UNIQUE).

## 3.2 Metodologia

### 3.2.1 Estudo da influência dos solventes orgânicos sobre a atividade enzimática em banho de ultrassom

A avaliação do comportamento da atividade enzimática na presença dos diferentes solventes, etanol (log P 0,24), terc-butanol (log de P 0,80), hexano (log P 3,50), iso-octano (log P 4,50) e álcool iso-propílico (log P 0,28) foi realizada em um banho de ultrassom nas temperaturas de 50°C para a enzima Lipozyme RM IM e 70°C para a enzima Novozym 435, sem agitação mecânica. Foram utilizados 0,5 g de enzima e 8,3 mL de solvente. Antes do início da reação ativou-se a enzima em estufa a 40°C durante 60 minutos. Os

experimentos foram conduzidos nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 horas. Posteriormente, as enzimas foram secas em estufa a 40°C durante alguns minutos. Em seguida, as mesmas foram mantidas em dessecador por no mínimo 18 horas. Com as enzimas secas mediu-se a atividade enzimática de esterificação, seguindo metodologia descrita posteriormente.

### ***Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)***

A fim de verificar possíveis alterações nas propriedades morfológicas das enzimas após tratamento em sistema de ultrassom, as mesmas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (modelo XL-30 ESEM, Phillips). As amostras das enzimas foram dispostas em placa metálica e as mesmas sofreram um tratamento prévio de atomização com ouro para tornar-se condutora e para melhorar a definição da imagem.

### ***Estabilidade das lipases tratadas em ultrassom em baixas temperaturas***

Após o tratamento em ultrassom com os diferentes solventes orgânicos etanol, hexano e terc-butanol, devido ao etanol ter apresentado um comportamento bastante diferente aos demais solventes, e a escolha do n-hexano e terc-butanol devido a estes serem os solventes mais utilizados na indústria de biodiesel, e a não escolha do iso-octano e álcool iso-propílico, devido a eles apresentarem influência na atividade enzimática parecidas com o n-hexano e terc-butanol, e por não serem muito utilizados para produção de biodiesel. As enzimas tratadas e uma amostra da enzima sem sofrer tratamento foram armazenadas em geladeira (4°C) e então realizada a medida de atividade de esterificação, durante um período de 100 dias para monitoramento da atividade enzimática.

## **3.2.2 Produção de biodiesel em sistema de ultrassom utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM**

### **3.2.2.1 Determinação do tempo reacional**

Os ensaios cinéticos preliminares foram realizados em batelada (modo destrutivo), sendo a temperatura mantida constante no banho de ultrassom. O recipiente de reação (balão de fundo redondo de 250 mL) foi acoplado a um condensador de refluxo total ligado a um banho termostático na temperatura de

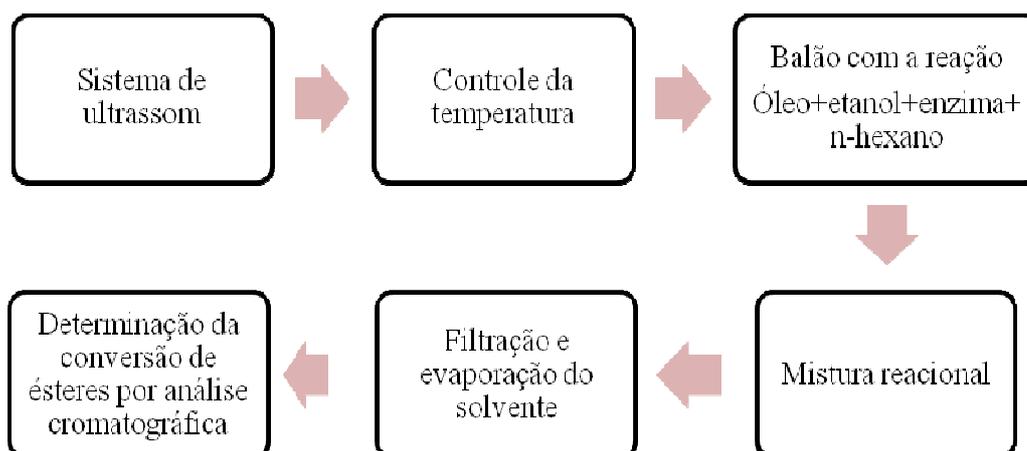
15°C para evitar a evaporação da meio reacional, formado pelos substratos (óleo e álcool), solvente e enzima (Figura 3.1).



**Figura 3. 1:** Vista geral do aparato experimental utilizado para produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em sistema de ultrassom.

Os tempos reacionais foram testados utilizando as duas lipases comerciais, Lipozyme RM IM e Novozym 435. Amostras foram retiradas em intervalos de 1 hora, totalizando 8 horas, visando à obtenção da curva cinética da reação. A condição experimental testada foi: razão molar 1:3 (1g de óleo e 0,165 g de 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. Todas as reações (0,05 g), foram realizadas utilizando n-hexano (40 mL) como solvente.

Decorrido o tempo de reação, a amostra foi filtrada para retenção da enzima para posterior recuperação e medida da atividade residual. A amostra sem enzima foi levada a rotaevaporador para evaporação do solvente a 60°C. A Figura 3.2 representa o fluxograma geral do procedimento experimental adotado nesta etapa do trabalho.



**Figura 3. 2:** Fluxograma do procedimento experimental para a reação de transesterificação enzimática em solvente orgânico em sistema de ultrassom.

### 3.2.2.2 Otimização da conversão na reação de produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em sistema de ultrassom

Na determinação das condições experimentais para maximização da produção enzimática de biodiesel em sistema de ultrassom com as enzimas comerciais imobilizadas Novozym 435 e Lipozyme RM IM, foi utilizada uma estratégia seqüencial de planejamentos fatoriais.

Inicialmente optou-se por um delineamento de Plackett & Burman de doze (12) ensaios (PB-12), com o ponto central em triplicata, onde foi avaliada a influência de cinco variáveis (temperatura, razão molar óleo/etanol, concentração de enzima, concentração de água e potência do ultrassom) e foram mantidos fixos o tempo de contato (4 horas) e o volume de solvente (40 mL de n-hexano).

Posteriormente, foi realizado um DCCR 2<sup>2</sup> com dois pontos axiais para cada variável e triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos para cada enzima. Nesta etapa, foram avaliados os efeitos da concentração de enzima e da temperatura, mantendo-se fixos, além do tempo de reação e do volume de solvente, a razão molar óleo/etanol (1:3), a concentração de água adicionada (0%) e a potência do ultrassom, para a Lipozyme RM IM (100%) e a Novozym 435 (40%).

A Tabela 3.1 apresenta as variáveis e a faixa de estudo para os delineamentos experimentais realizados. A resposta avaliada em todos os

experimentos foi a conversão em ésteres (%), seguindo metodologia a ser descrita posteriormente.

**Tabela 3. 1:** Níveis dos fatores investigados nos planejamentos experimentais sequenciais.

Variáveis/Níveis	Planejamento PB-12				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura (°C)	-	40	55	70	-
Razão Molar*	-	1: 3	1:6,5	1:10	-
Concentração de Enzima (% m/m)	-	5	12,5	20	-
Água (%m/m)	-	0	5	10	-
Potência (%)	-	40	70	100	-
DCCR 2 <sup>2</sup> Novozym 435					
Concentração de Enzima (% m/m)	10	12,9	20	27,1	30
Temperatura (°C)	60	63	70	77	80
DCCR 2 <sup>2</sup> Lipozyme RM IM					
Concentração de Enzima (% m/m)	10	12,9	20	27,1	30
Temperatura (°C)	40	43	50	57	60

\*(razão molar óleo/etanol)

Os dados experimentais obtidos em cada planejamento experimental foram tratados estatisticamente. A análise estatística relacionada com os efeitos estimados de cada variável e maximização dos processos foi realizada através do erro padrão relativo entre os dados experimentais e os preditos. A formulação dos modelos híbridos foi verificada por meio do coeficiente de correlação (R). Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica versão 6.0 (Statsoft Inc, USA).

### 3.2.3 Estudo de sucessivos ciclos de uso das enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM na produção de biodiesel em sistema de ultrassom

Os ensaios de reuso das enzimas foram realizados nas condições experimentais onde se obteve os melhores resultados de conversão em biodiesel nos planejamentos experimentais completos (DCCR 2<sup>2</sup>), referentes às seguintes condições: para a Lipozyme RM IM, 12,9% de enzima, 57°C de temperatura, 100% de potência de ultrassom, razão molar óleo:etanol 1:3. Para a Novozym 435, 27,1% de enzima, 63°C de temperatura, 40% de potência de ultrassom, razão molar óleo:etanol 1:3 óleo etanol. Foram avaliadas oito bateladas consecutivas, com tempo de reação de 4 horas/batelada.

Devido ao equipamento de ultrassom ser de pequeno porte, não foi possível fazer uma reação aumentando a escala dos substratos. Para tanto, os reusos foram feitos de duas maneiras:

1<sup>a</sup>: utilizando sempre um lote não utilizado de enzima, aumentando 4 horas cada reação, partindo-se de 4 horas até 32 horas, totalizando 8 ciclos. Após cada batelada, foram determinados o teor de ésteres etílicos e a atividade enzimática.

2<sup>a</sup>: utilizando a mesma enzima para todos os ciclos, ou seja, a enzima foi recuperada ao final de cada reação, onde o biocatalisador imobilizado foi separado do meio reacional por filtração com papel de filtro. Em seguida, realizou-se duas lavagens com 10 mL 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. Posteriormente secou-se a enzima em estufa a 40°C durante uma 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 uma hora (OLIVEIRA *et al.*, 2006a), para perda de umidade livre.

### 3.2.3 Metodologia analítica

#### 3.2.3.1 Determinação da atividade de esterificação das lipases

A determinação da atividade de esterificação das lipases foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação entre o ácido láurico e álcool propílico com razão molar ácido-álcool de 3:1 à temperatura de 60°C, com a enzima a 5% (m/m) mantida sob agitação por 40 minutos.

A reação iniciou-se pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator de vidro fechado, de 20 mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático. Foram retiradas alíquotas (triplicata) de 150 µL, e a reação foi interrompida pela adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol 1:1 (v/v). Os ácidos graxos não consumidos na reação foram titulados até pH 11,0 com uma solução de NaOH 0,01N. Os brancos reacionais foram preparados retirando-se alíquotas (triplicata) de 150 µL previamente à incubação no reator e interrompendo-se a reação com 20 mL de acetona/etanol 1:1 (v/v). Os brancos também foram titulados até pH 11,0 com solução de NaOH 0,01 N. (Oliveira *et al.*, 2006).

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária pra consumir 1 µmol de ácido graxo por minuto nas condições experimentais descritas, determinada por meio da Equação 3.1.

$$Atividade (U/g) = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 10^3}{t \times ma} \quad \text{Equação (3.1)}$$

onde:

N: normalidade da solução de NaOH (mol.L-1);

V<sub>a</sub>: volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada do reator no tempo zero (mL);

V<sub>b</sub>: volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos de reação (mL);

ma: massa de preparação enzimática utilizada na reação (g);

t: tempo de reação (minutos);

1U = 1µmol de ácido/min.

Para o cálculo da atividade de esterificação relativa foi utilizada a Equação 3.2:

$$\text{Atividade Relativa (\%)} = \frac{A_f}{A_o} \times 100 \quad \text{Equação (3.2)}$$

onde:

$A_f$ : atividade enzimática final (U/g);

$A_o$ : atividade enzimática inicial (U/g).

### 3.2.3.2 Metodologia analítica para determinação da conversão em ésteres

#### *Preparação das amostras para análise*

As amostras obtidas foram preparadas seguindo três etapas:

1ª Etapa - Preparo de padrão: 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.

2ª Etapa: Uma alíquota de 0,250 g da amostra foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e posteriormente aferido o volume do mesmo com heptano.

3ª Etapa: Foi transferido para um balão volumétrico de 1 mL uma alíquota de 50  $\mu$ L da amostra preparada na 2ª etapa e mais 50  $\mu$ L do padrão, preparado na 1ª etapa, após foi completado o volume do balão com heptano. A amostra foi agitada e transferida para os vials, dando sequência à análise cromatográfica.

#### *Análise*

A solução foi então injetada em triplicata em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG/FID Shimadzu modelo 2010) equipado com uma coluna capilar apolar modelo RT-WAX (contendo polietileno glicol na fase estacionária), de 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,32 mm, nas seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial da coluna de 150°C, permanecendo por 1 minuto nesta condição, taxa de aquecimento de

10°C/min até atingir a temperatura final da coluna de 250°C, permanecendo por 1 minuto nesta condição. A temperatura do injetor e do detector foi estabelecida em 250°C. A quantidade da solução de amostra injetada foi de 1 µL.

As informações aqui reportadas sobre os preparos de soluções, bem como as condições cromatográficas, tipo de coluna e demais detalhes do procedimento para determinação da conversão em ésteres, seguem as especificações da Norma Europeia EN14103, segundo documento oficial publicado em 01/06/01 com número de projeto: 1999/00751. A Equação 3.3 a seguir expressa em porcentagem a conversão em ésteres:

$$C = \frac{(\sum A) - A_{ei}}{A_{ei}} \times \frac{C_{ei} \times V_{ei}}{W} \times 100 \quad \text{Equação (3.3)}$$

onde:

$\sum A$  = área total de picos entre os padrões C14 e C24:1;

$A_{ei}$  = é a área correspondente ao pico do padrão interno, C17:0;

$C_{ei}$  = é a concentração, em mg/mL, da solução de padrão interno, C17:0;

$V_{ei}$  = é o volume da solução de padrão interno adicionado à amostra;

$W$  = é a massa, em mg, da amostra de biodiesel.

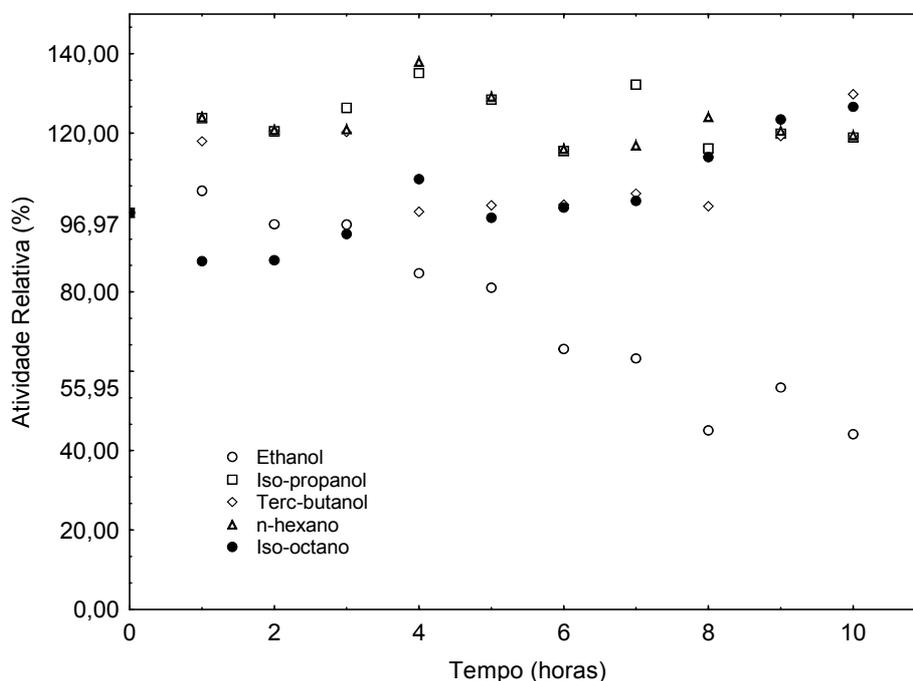
A conversão do triglicerídeo em ésteres (rendimento em ésteres) foi calculada conforme exposto por Silva *et al.* (2009), que considera a estequiometria da reação, mais precisamente a relação entre a concentração de ésteres obtida via análise cromatográfica com o teor de glicerol para 100% de conversão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

## Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Como existem poucos trabalhos na literatura enfocando a influência do ultrassom na atividade e estabilidade das enzimas, foi realizado, primeiramente, um estudo visando verificar a influência de alguns tipos de solventes e da energia ultrassônica sobre a atividade de esterificação das lipases, para posterior aplicação na produção de biodiesel enzimático.

### 4.1 Influência do solvente e da energia ultrassônica sobre a atividade de esterificação das lipases imobilizadas

A Figura 4.1 apresenta a atividade relativa da Novozym 435 em diferentes solventes orgânicos após tratamento em sistema de ultrassom durante 10 horas de tempo de contato.

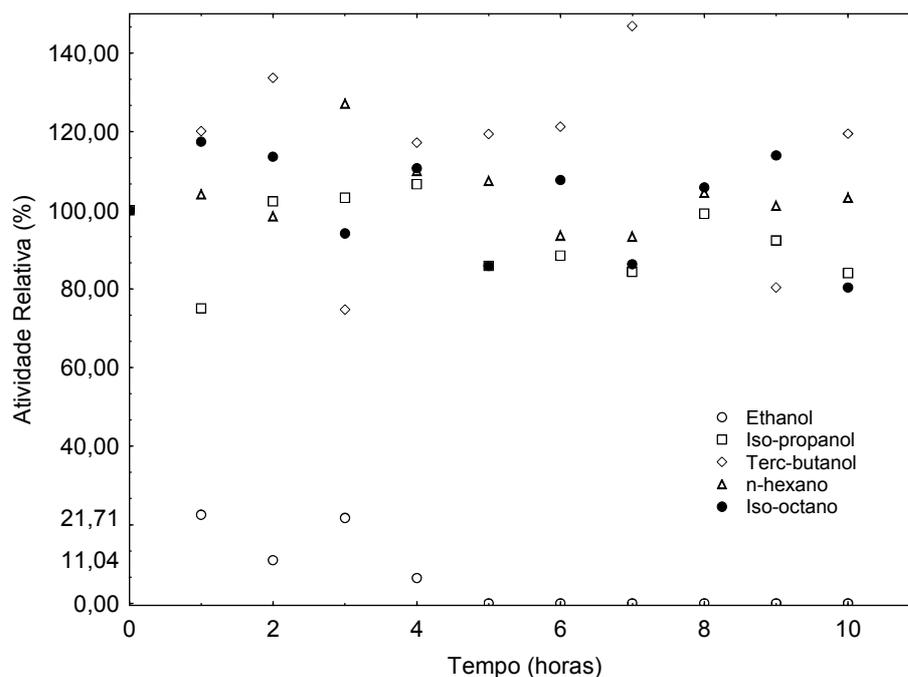


**Figura 4. 1:** Atividade relativa da Novozym 435 em diferentes solventes orgânicos tratados em sistema de ultrassom (atividade da enzima não tratada de U/g foi de 36,79, equivalente a 100%).

A partir desta figura pode-se observar que, de uma maneira geral, 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%.

A Figura 4.2 apresenta a atividade relativa da Lipozyme RM IM em diferentes solventes orgânicos tratados em sistema de ultrassom. Para o etanol pode ser observado que, após cinco horas de contato, a enzima perdeu completamente sua atividade. A atividade relativa utilizando álcool iso-propílico como solvente manteve-se estável até 4 horas de tratamento, apresentando um aumento de até 6% durante esse tempo, após diminuiu cerca de 15% em relação à atividade inicial. Os solventes terc-butanol e iso-octano conduziram a um incremento de aproximadamente 50 e 17% da atividade da enzima em seis horas de exposição, respectivamente. A atividade final utilizando hexano como solvente manteve-se muito próxima da atividade inicial, tendo um salto em três horas de 27%. Em suma, a atividade de esterificação da Lipozyme RM IM manteve seu valor inicial após o processo.

Com base nos resultados apresentados anteriormente, pode-se dizer que o solvente exerce influência direta sobre a atividade, estabilidade e especificidade da enzima (De Paula *et al.*, 2005). Doukyu e Ogino apontaram que várias enzimas lipolíticas apresentadas na literatura são tolerantes a solventes orgânicos. Além disso, a literatura tem apontado que de todos os parâmetros que podem afetar a atividade enzimática, tais como a constante dielétrica, momento dipolar, ligação de hidrogênio, a polaridade e o logaritmo do coeficiente de partição ( $\log P$ ), o  $\log P$  fornece a melhor correlação com a atividade da enzima (Doukyu e Ogino, 2010; Laane *et al.*, 1987).



**Figura 4. 2:** A atividade relativa do Lipozyme RM IM em diferentes solventes orgânicos tratados em sistema de ultrassom. (atividade da enzima não tratada de U/g foi de 29,42 equivalente a 100%).

Levando em conta os resultados obtidos para Lipozyme RM IM e Novozym 435, os solventes que apresentaram aumento na atividade da lipase foram terc-butanol ( $\log P = 0,8$ ) e n-hexano ( $\log P = 3,50$ ). 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 (Toma *et al.*, 2011). Outros parâmetros importantes podem ser os grupos funcionais dos solventes. Segundo Liu *et al.* (2010), 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.

O trabalho de Secundo e Carrea (2010) 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.

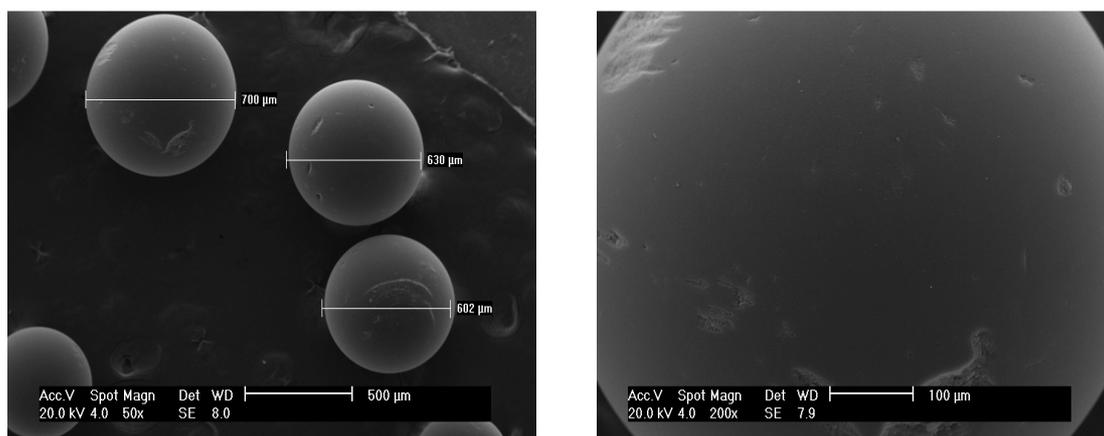
Os efeitos das condições de operação do ultrassom sobre a estabilidade de algumas preparações comerciais de enzimas purificadas foram investigados por Ozbek e Ülgen (2000). Soluções tampão de seis enzimas álcool desidrogenase (ADH), malato desidrogenase (MDH), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), L-lactic desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina (AP) e beta-galactosidase (bG) foram sonicadas em uma faixa até 40 W. As enzimas apresentaram estabilidades variadas com completa estabilidade para AP, e acima de 70% de inativação para G6PDH. Alguns modelos de inativação foram testados para a compreensão da relação entre a intensidade de sonicação e a estabilidade da enzima. O tempo de processamento no ultrassom também afetou a taxa de inativação da ADH e MDH. A estabilidade da ADH sonicada diminuiu com o tempo quando comparada com o controle (sem efeito do ultrassom). O aumento da viscosidade do fluido no processo com glicerol resultou em 39% de inativação com ADH, enquanto o controle mostrou 15% de inativação para as mesmas condições operacionais.

### Análises das lipases tratadas em solventes orgânicos em banho de ultrassom por Microscopia Eletrônica de Varredura

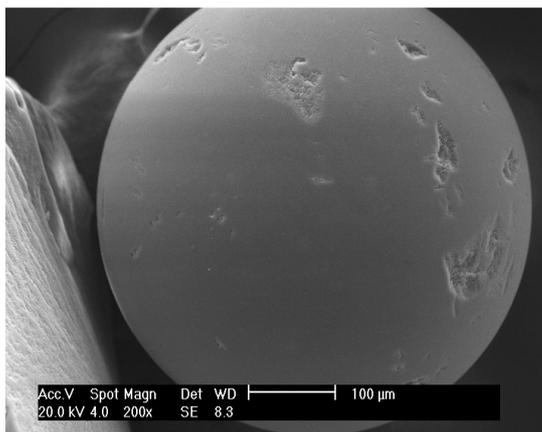
As Figuras 4.3 e 4.4 apresentam as micrografias obtidas por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) da Novozym 435 não tratada e tratada em sistema de ultrassom e Lipozyme RM IM não tratada e tratada em sistema de ultrassom, respectivamente, utilizando diferentes solventes e tempos de contato.

Na Figura 4.3 pode-se verificar que o solvente e o ultrassom parecem atacar o suporte utilizado para imobilização da lipase, não afetando a atividade enzimática, como apresentado na Tabela 4.1. Com relação à Lipozyme RM IM (Figura 4.4) nenhuma mudança foi observada na superfície da enzima e as atividades enzimáticas aumentaram seus valores após o tratamento em terc-butanol e n-hexano. Após esta avaliação, pode-se dizer que algumas modificações a nível estrutural podem ter ocorrido, já que quase nenhuma alteração pôde ser observada após as análises de MEV.

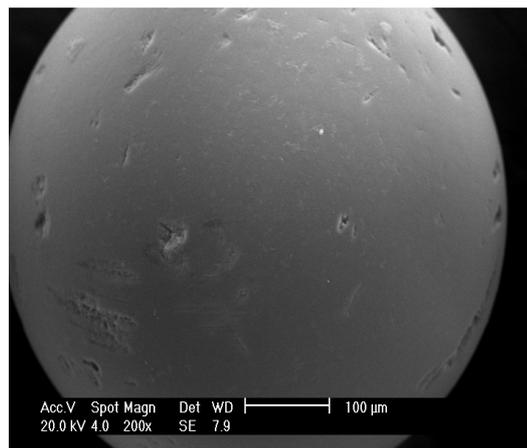
A Tabela 4.1 apresenta uma compilação dos resultados obtidos nesta etapa do trabalho, na forma de atividades de esterificação da Novozym 435 e Lipozyme RM IM em diferentes solventes e tempos de contato após o tratamento em sistema de ultrassom.



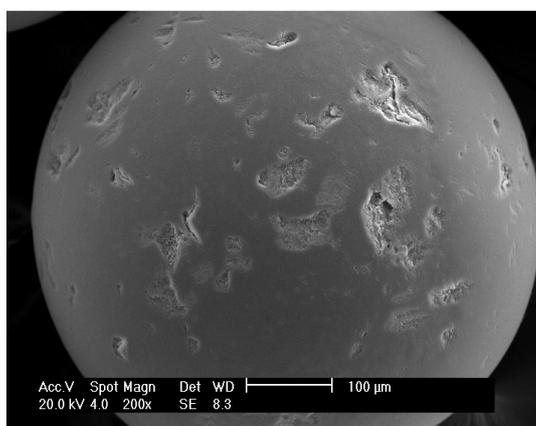
(a)



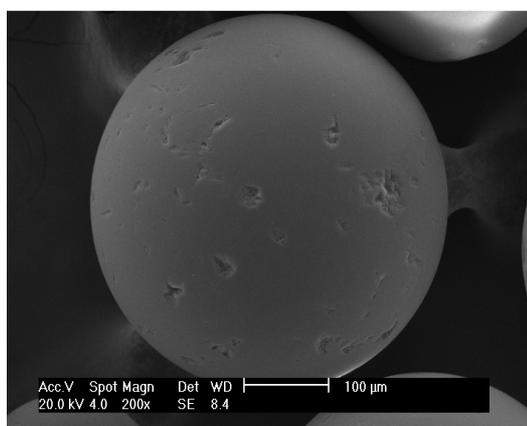
Etanol 1 hora (200X)



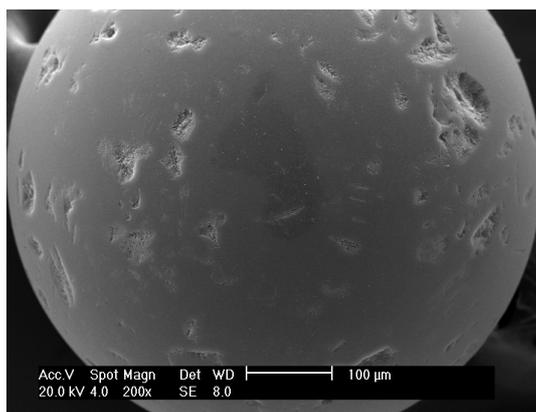
Etanol 10 horas (200X)



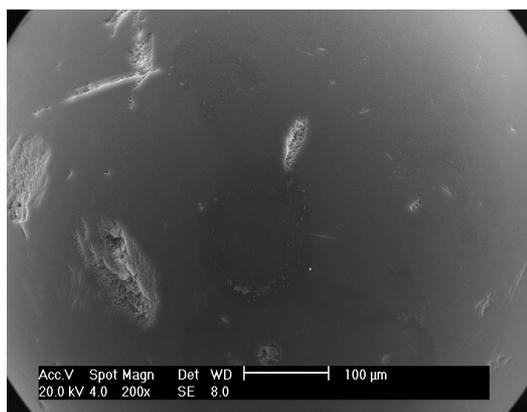
Butanol 1 horas (200X)



Butanol 10 horas (200X)

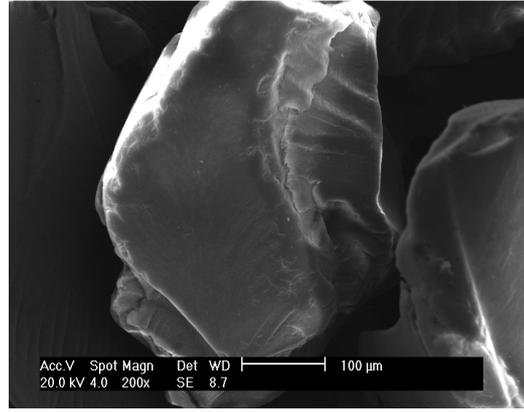
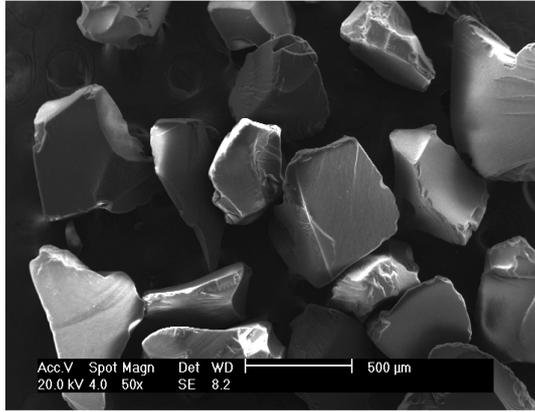


Hexano 1 hora (200X)

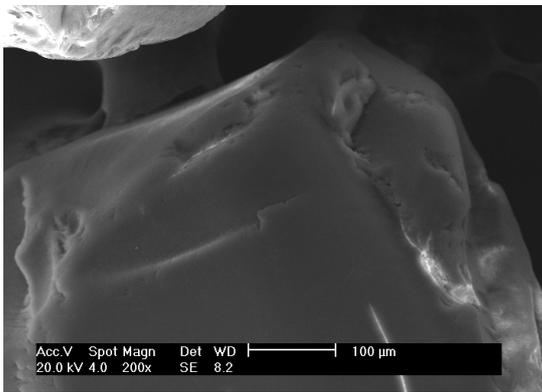


Hexano 10 horas (200X)

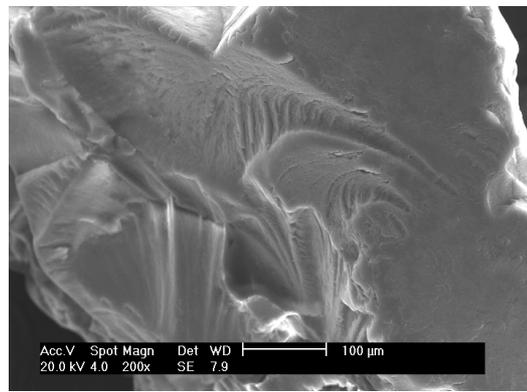
(b)  
**Figura 4. 3:** MEV da Novozym 435 não-tratada (a) e tratada em sistema de ultrassom usando diferentes solventes orgânicos e tempos de contato (b).



(a)



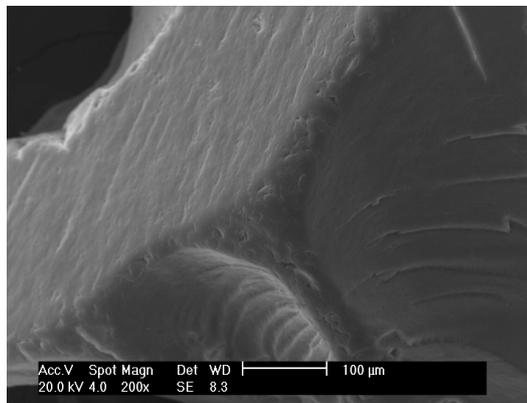
Etanol 1 hora (200X)



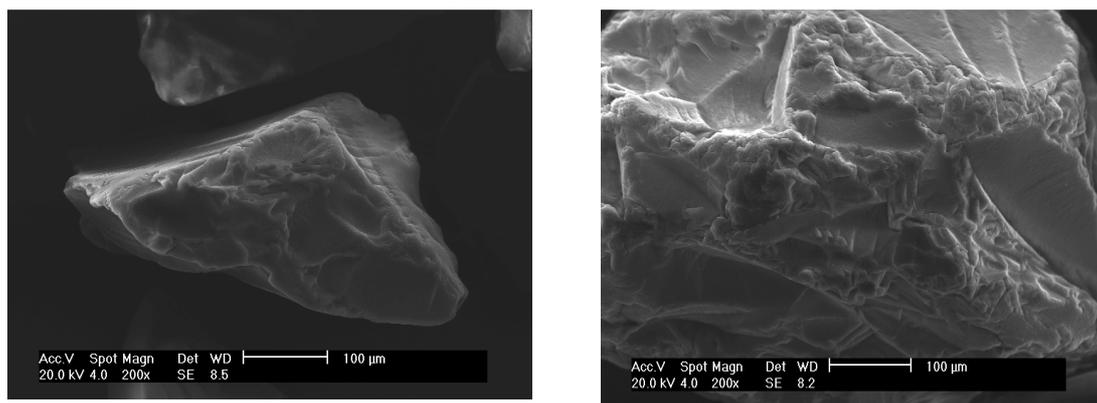
Etanol 10 horas (200X)



Butanol 1 hora (200X)



Butanol 10 horas (200X)



Hexano 1 hora (50X)

Hexano 1 horas (50X)

(b)

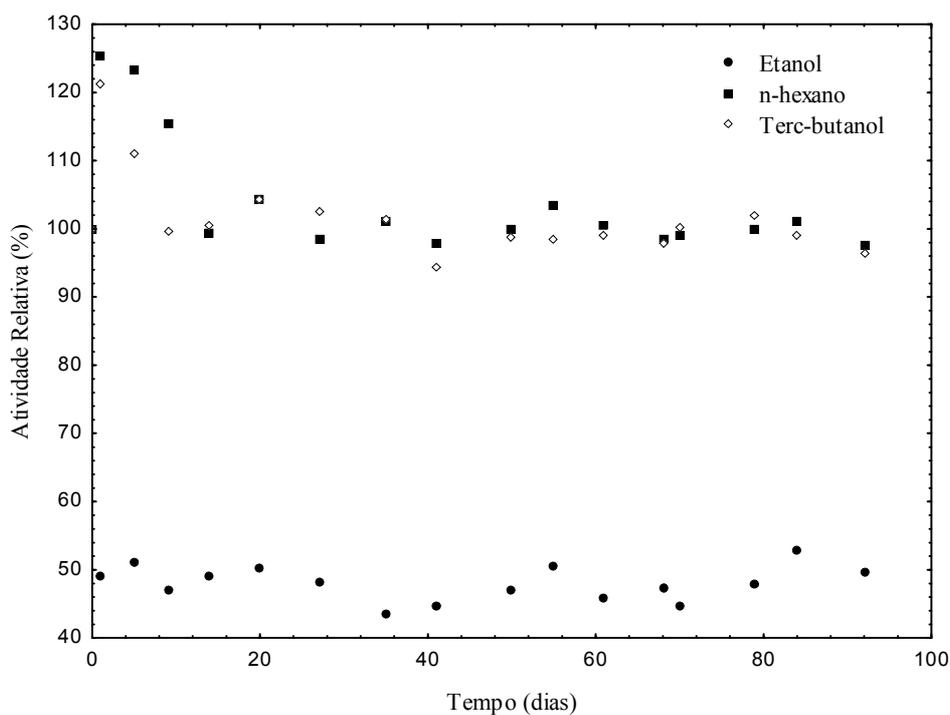
**Figura 4.4:** MEV da Lipozyme RM IM não tratada (a) e tratada em sistema de ultrassom usando diferentes solventes orgânicos e tempos de contato (b).

**Tabela 4.1:** Resumo das atividades de esterificação da Novozym 435 e Lipozyme RM IM em diferentes solventes e tempos de contato após o tratamento em sistema de ultrassom.

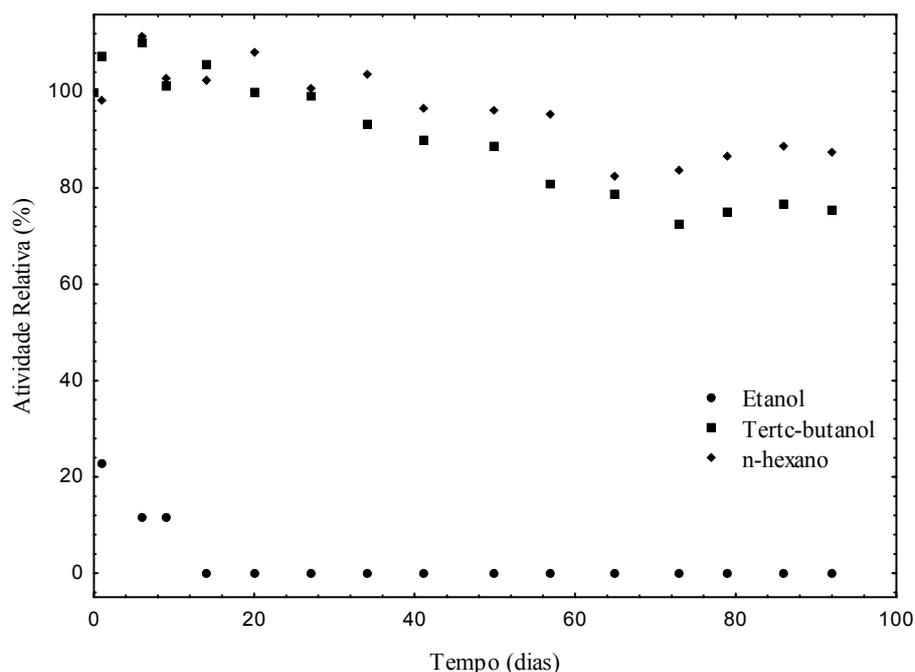
Enzima	Solvente	Tempo de contato (horas)	Atividade de esterificação (U/g)
Novozym 435	Etanol	1	36,84
		10	27,12
	Terc-butanol	1	41,45
		10	40,93
	n-hexano	1	42,46
		10	41,93
	Não-tratada	-	36,79
Lipozyme RM IM	Etanol	1	1,287
		10	0,00
	Terc-butanol	1	28,00
		10	32,56
	n-hexano	1	28,39
		10	35,93
	Não-tratada	-	29,42

### Estabilidade de lipases imobilizadas para o armazenamento a baixas temperaturas

A Figura 4.5 apresenta a estabilidade a baixas temperaturas da Novozym 435 (a) e Lipozyme RM IM (b) tratadas durante 10 horas de contato com diferentes solventes orgânicos em sistema de ultrassom durante o armazenamento a 4°C. As atividades foram acompanhadas periodicamente até 100 dias. Novozym 435 e Lipozyme RM IM apresentaram alta estabilidade ao armazenamento após o tratamento com sistema de ultrassom com os solventes n-hexano e terc-butanol. O tratamento de ambas as lipases comerciais imobilizadas tratadas com etanol causou perda completa da atividade após 10 dias de armazenamento.



(a)



(b)

**Figura 4.5:** Estabilidade em baixas temperaturas da Novozym 435 (a) e Lipozyme IM (b) usando diferentes solventes orgânicos, sob o sistema de ultrassom.

Encerrando esta primeira etapa do trabalho pode-se concluir que os solventes n-hexano e terc-butanol são mais eficazes, pois conseguiram manter a atividade das enzimas durante o tratamento com ultrassom.

Deste modo, para a segunda etapa deste trabalho, que é a produção de biodiesel enzimático em sistema de ultrassom, optou-se por utilizar solvente na reação, pois em misturas de óleo-álcool os solventes orgânicos melhoram a solubilidade dos substratos e aumentam a estabilidade operacional das lipases, como pode ser visto na primeira etapa deste estudo. Além de os solventes eliminarem a necessidade de adicionar álcoois em grandes proporções, os quais podem vir a causar inativação das enzimas (Antczak *et al.*, 2009).

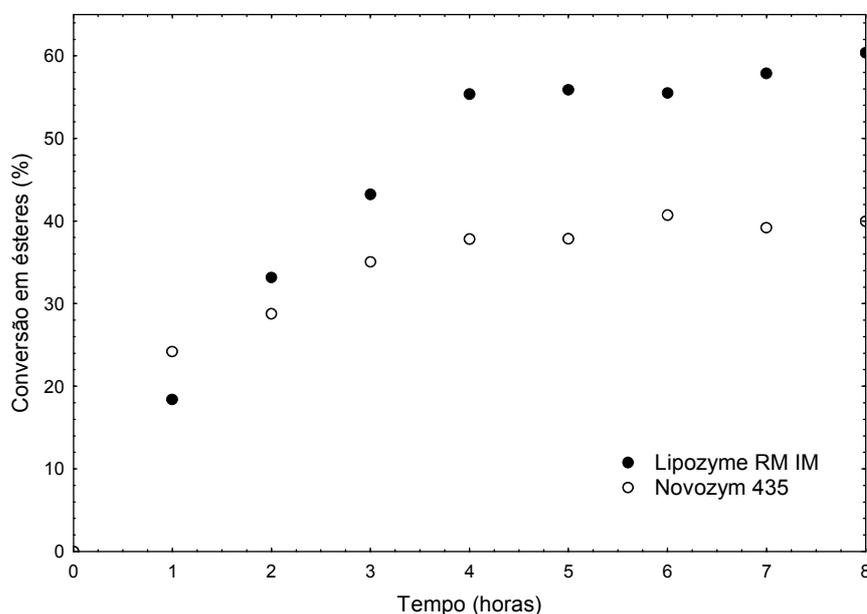
Neste sentido, foi escolhido o solvente n-hexano para o desenvolvimento da segunda etapa, devido ao mais baixo custo deste produto e ser o mais amplamente utilizado na extração de óleos vegetais. Na literatura existem muitas pesquisas onde é utilizado n-hexano durante a produção de biodiesel, entre eles pode-se destacar os trabalhos realizados por Li *et al.*, (2010); Chang *et al.* (2005); Salamatina *et al.* (2010); Koh *et al.* (2011); Lam *et al.* (2010).

## 4.2 Produção de biodiesel em sistema de ultrassom utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM

Neste item serão apresentados os resultados obtidos na produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em sistema de ultrassom.

### 4.2.1 Determinação do tempo reacional

Neste trabalho, o tempo de reação foi avaliado dentro de um intervalo de 1 a 8 horas. Como observado na Figura 4.6, na transesterificação de óleo de soja, por meio de sistema ultrassônico, houve uma tendência ascendente para os catalisadores (enzimas Lipozyme RM IM e Novozym 435). Nas duas figuras 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%, após verifica-se comportamento assintótico do rendimento de reação. Com base neste experimento prévio, o tempo reacional foi fixado para os demais ensaios em 4 horas.



**Figura 4.6:** Cinética reacional da produção de biodiesel utilizando as enzimas (●) Lipozyme RM IM e (○) Novozym 435. Na seguinte condição: RM óleo/etanol 1:3, 65°C de temperatura, 5% de enzima, 40 mL de n-hexano e 100% de potência.

#### 4.2.2 Avaliação das variáveis de processo para produção de biodiesel

A Tabela 4.2 apresenta a matriz do delineamento PB-12, com os valores codificados das variáveis independentes (temperatura, enzima, água, razão molar óleo/etanol, potência) e a resposta em termos de conversão em ésteres (%) em 4 horas de reação. Nesta tabela é possível observar que a maior conversão em ésteres utilizando a enzima Novozym 435 (66,9%) foi obtida no ensaio de maior temperatura e concentração de enzima e nas menores concentrações de água, razão molar (óleo/etanol) e potência (ensaio 1).

Utilizando a enzima Lipozyme RM IM, a maior conversão em ésteres (64,7%) foi obtida utilizando as menores temperatura e razão molar e maiores concentração de enzima, água e potência do ultrassom (ensaio 8).

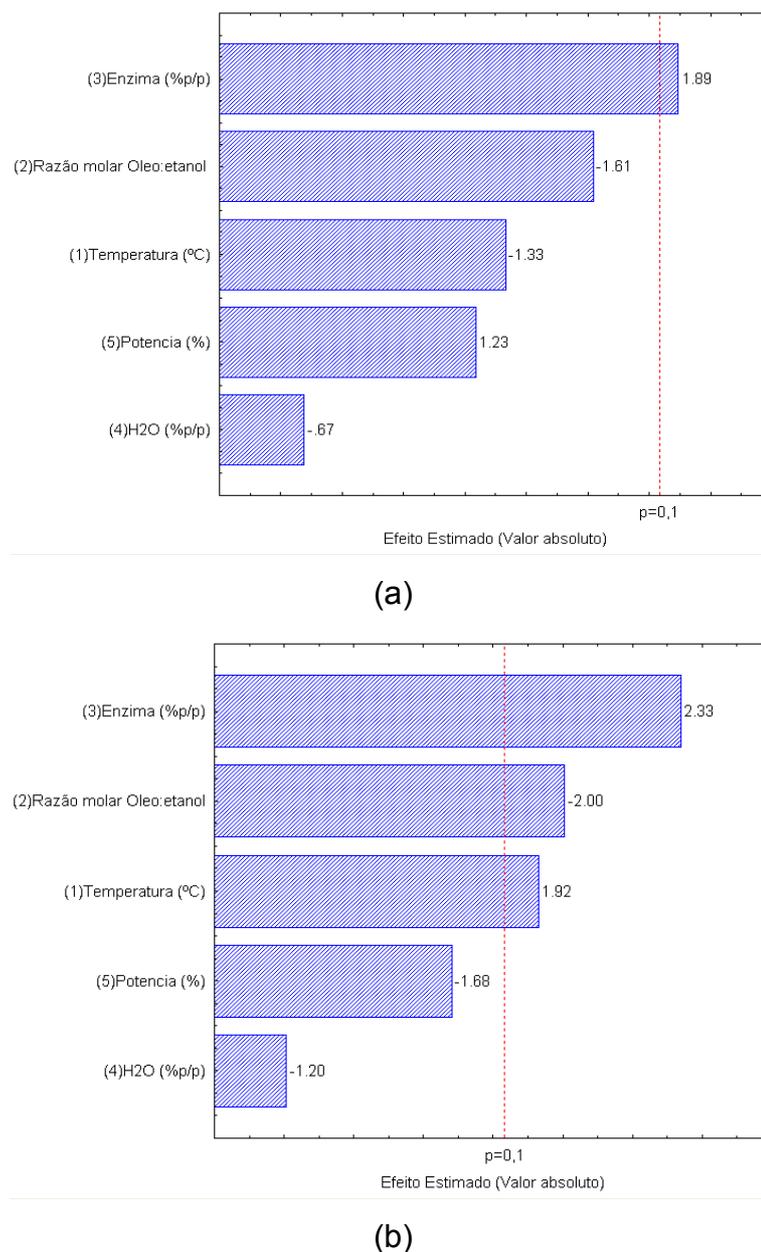
Para uma análise mais consistente desses resultados, os dados obtidos foram tabulados e analisados utilizando o software Statistica<sup>®</sup>, no módulo de Planejamento de Experimentos. A Figura 4.7 (a e b) apresenta o Diagrama de Pareto, construído com o objetivo de verificar o efeito de cada variável independente estudada na resposta (Conversão em Ésteres (%)). É possível observar nos dois diagramas (a e b) que, em um nível de confiança de 90%, a concentração de enzima apresentou efeito positivo significativo na conversão em ésteres etílicos. Na Figura 4.7 b, pode-se verificar que a razão molar óleo/etanol apresentou efeito negativo significativo e a temperatura exerceu um efeito positivo significativo; as demais variáveis, potência e concentração de água não foram significativas, considerando 90% de confiança.

Oliveira *et al.* (2004, 2005), ao realizar testes na produção de ésteres etílicos a partir de óleo de mamona e de soja com duas enzimas comerciais, Lipozyme IM e Novozym 435 em solvente orgânico (n-hexano), observaram que um dos parâmetros que afetam de forma positiva o processo de conversão é a concentração de enzima. Para uma maior concentração de enzima, tem-se uma maior disponibilidade dos centros ativos das enzimas, incrementando as taxas de reação e diminuindo, conseqüentemente, o tempo de reação.

**Tabela 4.2:** Matriz do primeiro planejamento experimental (valores codificados e reais) com as respostas em termos de conversão em ésteres em 4 horas de reação.

Ensaio	T	R	E	H	P	Conversão em ésteres (m/m%)	
						Novozym 435	Lipozyme RM IM
1	1 (70)	-1 (1:3)	1 (20)	-1(0)	-1 (40)	66,90	37,96
2	1 (70)	1 (1:10)	-1 (5)	1 (10)	-1 (40)	3,04	1,39
3	-1 (40)	1 (1:10)	1 (20)	-1 (0)	1 (100)	5,09	33,86
4	1 (70)	-1 (1:3)	1 (20)	1 (10)	-1 (40)	20,38	6,56
5	1 (70)	1 (1:10)	-1 (5)	1 (10)	1 (100)	1,04	1,29
6	1 (70)	1 (1:10)	1 (20)	-1 (0)	1 (100)	7,12	15,65
7	-1 (40)	1 (1:10)	1 (20)	1 (10)	-1 (40)	4,76	1,52
8	-1 (40)	-1 (1:3)	1 (20)	1 (10)	1 (100)	8,84	64,66
9	-1 (40)	-1 (1:3)	-1 (5)	1 (10)	1 (100)	0,42	16,05
10	1 (70)	-1 (1:3)	-1 (5)	-1 (0)	1 (100)	6,01	11,04
11	-1 (40)	1 (1:10)	-1 (5)	-1 (0)	-1 (40)	0,62	12,61
12	-1 (40)	-1 (1:3)	-1 (5)	-1 (0)	-1 (40)	3,56	16,51
13	0 (55)	0 (1:6,5)	0 (12,5)	0 (5)	0 (70)	2,06	2,82
14	0 (55)	0 (1:6,5)	0 (12,5)	0 (5)	0 (70)	1,96	1,80
15	0 (55)	0 (1:6,5)	0 (12,5)	0 (5)	0 (70)	2,17	1,01

T=temperatura; R=razão molar óleo:etanol; E=concentração de enzima; H=concentração de água adicionada; P=potência de ultrassom.



**Figura 4. 7:** Diagrama de Pareto para o Delineamento Plackett & Burman (PB-12). Diagrama (a) enzima Lipozyme RM IM e (b) enzima Novozym 435.

O ultrassom afeta a reatividade do catalisador pelo aumento de transferência de massa e entrada de energia. A cavitação ultrassônica é uma forma única de colocar energia em reações químicas. Uma combinação de alta velocidade de jatos líquidos, alta pressão e temperaturas elevadas, enormes taxas de aquecimento de resfriamento ( $>10^9 \text{Ks}^{-1}$ ) ocorrem localmente, durante a compressão e implosão das bolhas de cavitação (Kumar *et al.*, 2010; [http://www.hielscher.com/ultrasonics/sonochem\\_01.htm](http://www.hielscher.com/ultrasonics/sonochem_01.htm)).

Na catálise enzimática, onde o catalisador está em uma fase diferente dos demais reagentes, a dispersão ultrassônica aumenta a área disponível para os reagentes. De forma geral, a cavitação aumenta a eficiência do catalisador e o ótimo pode ser alcançado mesmo com menor quantidade de catalisador (Yu *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011).

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).

Martín *et al.* (2008) verificaram que a alcoólise dos óleos vegetais foi mais rápida com a Lipozyme TL IM do que com a Novozym 435, utilizando um sistema de agitação com temperatura controlada. Utilização de uma alta concentração de Novozym 435 (50% m/m) e um grande excesso molar de etanol são necessários para obter uma conversão de 100% em ésteres enquanto que para a Lipozyme TL IM a conversão não foi maior de 84% em um menor quantidade de enzima (10% m/m) e razão molar de etanol.

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). Os melhores resultados neste trabalho foram obtidos na relação 1:3, onde a quantidade de etanol adicionada foi consumida totalmente pela reação e por esta razão, no instante de 4 horas, não haveria redução da conversão.

Teoricamente, alta temperatura pode aumentar a chances de colisão das moléculas do substrato e as enzimas, formando complexo enzima-substrato, levando a um aumento da atividade da enzima. No entanto, as enzimas dependem da temperatura, pois são facilmente desativadas em alta temperatura. O aumento da temperatura de reação também diminui a viscosidade do óleo de soja, aumentando os eventos de cavitação e da taxa de

formação da emulsão, assim, conseqüentemente, a uma maior conversão em biodiesel (Antczak *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010).

Martín *et al.* (2008) realizaram síntese de biodiesel utilizando as enzimas Novozym 435 e Lipozyme TL IM, onde foi estudado o efeito da temperatura de 25-60°C onde foi observado para as enzimas Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM que as conversões diminuíram com o aumento da temperatura, obtendo desta forma 25°C de temperatura ótima para ambas as enzimas. Em contrapartida a enzima Novozym 435 apresentou conversões mais elevadas com o aumento da temperatura.

Conteúdo de água na reação é um fator determinante no rendimento da síntese enzimática de biodiesel (Antczak *et al.*, 2009). 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 (Kaieda *et al.*, 1999). As lipase 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 (Teixeira *et al.*, 2010).

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.

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%.

De acordo com os resultados apresentados nos diagramas de Pareto foi realizado um DCCR 2<sup>2</sup>, onde foi fixada a potência do ultrassom, concentração de água e razão molar óleo/etanol. Variou-se a temperatura e concentração de enzima, sendo a matriz dos planejamentos bem como os resultados obtidos em termos de conversão em ésteres etílicos (%), apresentados na Tabela 4.3 (enzima Lipozyme RM IM) e Tabela 4.4 (enzima Novozym 435).

Nos DDCR 2<sup>2</sup>, as concentrações de enzima e temperatura que maximizaram a produção de biodiesel (ésteres etílicos) foram obtidas no experimento 3 para a Lipozyme RM IM e no experimento 2 para a Novozym 435, nas seguintes condições: 12,9% (p/p) de enzima e 57°C para a Lipozyme RM IM e para a Novozym 435 27,1% (p/p) de enzima e 63°C, atingindo conversões de 86 e 57% de produto, respectivamente.

Os resultados apresentados nos delineamentos completos 2<sup>2</sup> referente à conversão em ésteres foram tratados estatisticamente para a avaliação dos efeitos de cada variável independente sobre a resposta. A Tabela 4.5 apresenta a análise dos coeficientes de regressão dos fatores para a resposta referente à enzima Lipozyme RM IM e a Tabela 4.6 apresenta a análise dos coeficientes de regressão dos fatores para a resposta referente à enzima Novozym 435.

Deste modo, a Equação 4.1 (Lipozyme RM IM) e 4.2 (Novozym 435) apresentam os modelos empíricos de segunda ordem propostos a partir do delineamento completo 2<sup>2</sup> para a conversão em ésteres etílicos, como uma função das temperaturas e concentrações de enzima na reação

**Tabela 4.3:** Matriz do segundo planejamento experimental realizado para produção de biodiesel utilizando a enzima Lipozyme RM IM, com a resposta em conversão em ésteres em 4 horas de reação.

Ensaio	Enzima	Temperatura	Conversão em ésteres (%)
1	-1 (12,9)	-1 (63)	39,52
2	1 (27,1)	-1 (63)	79,43
3	-1 (12,9)	1 (77)	86,45
4	1 (27,1)	1 (77)	26,81
5	-1,41 (10)	0 (70)	45,82
6	1,41 (30)	0 (70)	46,39
7	0 (20)	-1,41 (60)	47,92
8	0 (20)	1,41 (80)	34,54
9	0 (20)	0 (70)	44,29
10	0 (20)	0 (70)	44,27
11	0 (20)	0 (70)	44,68

**Tabela 4.4:** Matriz do segundo planejamento experimental realizado para produção de biodiesel utilizando a enzima Novozym 435 com a resposta em conversão em ésteres em 4 horas de reação.

Ensaio	Enzima	Temperatura	Conversão em ésteres (%)
1	-1 (12,9)	-1 (43)	33,47
2	1 (27,1)	-1 (43)	57,47
3	-1 (12,9)	1 (57)	30,83
4	1 (27,1)	1 (57)	44,93
5	-1,41 (10)	0 (50)	20,04
6	1,41 (30)	0 (50)	42,13
7	0 (20)	-1,41 (40)	53,25
8	0 (20)	1,41 (60)	33,20
9	0 (20)	0 (50)	54,31
10	0 (20)	0 (50)	53,55
11	0 (20)	0 (50)	55,85

$$\text{Conversão de ésteres (\%)} = 44,36 - 2,37.\text{enzima(L)} + 4,49.\text{enzima (Q)} - 3,07.\text{temperatura (L)} + 2,04.\text{temperatura(Q)} - ,88.\text{enzima(L)temperatura(L)}$$

*Equação (4.1)*

$$\text{Conversão de ésteres(\%)} = 4,55 + 8,68.\text{enzima(L)} - 10,64.\text{enzima(Q)} - 5,44.\text{temperatura(L)} - 4,53.\text{temperatura(Q)} - ,47.\text{enzima(L)temperatura(L)}$$

*Equação (4.2)*

**Tabela 4.5:** Coeficientes de regressão para a resposta conversão em ésteres etílicos (%) utilizando Lipozyme RM IM.

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	P
Média	44,36	5,69	7,791	0,0005*
Enzima Linear (E)	-2,37	3,49	-0,679	0,5271
Enzima Quadrática (E <sup>2</sup> )	4,49	4,16	1,079	0,3297
Temperatura Linear (T)	-3,07	3,49	-0,881	0,4184
Temperatura Quadrática (T <sup>2</sup> )	2,04	4,16	0,490	0,6442
Enzima x Temperatura (ExT)	-24,88	4,93	-5,046	0,0039*

\*termos estatisticamente significativos a 95% de confiança.

**Tabela 4.6:** Coeficientes de regressão para a resposta conversão em ésteres etílicos (%) utilizando Novozym 435.

	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t(5)	P
Média	54,55	2,20	24,74	0,0000*
Enzima Linear (E)	8,68	1,35	6,42	0,0013*
Enzima Quadrática (E <sup>2</sup> )	-10,64	1,61	-6,59	0,0012*
Temperatura Linear (T)	-5,44	1,35	-4,02	0,0100*
Temperatura Quadrática (T <sup>2</sup> )	-4,53	1,61	-2,81	0,0375*
Enzima x Temperatura (ExT)	-2,47	1,90	-1,29	0,2512

\*termos estatisticamente significativos a 95% de confiança.

Para verificação da validade do modelo foi realizada a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 4.7. Verifica-se que os coeficientes de correlação obtidos (0,95 para Novozym 435) e (0,84 para Lipozyme RM IM) e o teste F (F calculado maior que o F tabelado) validaram estatisticamente os modelos ( $p < 0,05$ ).

O modelo permitiu a construção da superfície de resposta e curva de contorno apresentadas na Figura 4.8 (a e b), onde se pode observar para a Lipozyme RM IM (Figura 4.8 a) que a conversão em ésteres etílicos em função da concentração de enzima e da temperatura apresenta dois pontos de ótimo, um aumentando a temperatura e diminuindo a concentração de enzima e o outro diminuindo a temperatura e aumentando a concentração de enzima. O que pode ser considerado uma boa opção para a indústria, com economia em enzima ou temperatura. Para a Novozym 435 (Figura 4.8 b) foi possível observar que a maior conversão ocorreu em uma faixa de 20 a 27,1% de concentração de enzima e 63 a 70°C de temperatura.

**Tabela 4.7:** Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo para conversão em ésteres etílicos utilizando a Novozym 435 e Lipozyme RM IM.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados		Graus de Liberdade		Média Quadrática		F calculado	
	Lipo	Novo	Lipo	Novo	Lipo	Novo	Lipo	Novo
Regressão	2714,26	1509,33	5	5	542,85	301,867	5,581	20,70
Residual	486,321	72,882	5	5	97,26	14,576		
Total	3200,581	1582,22	10	10				

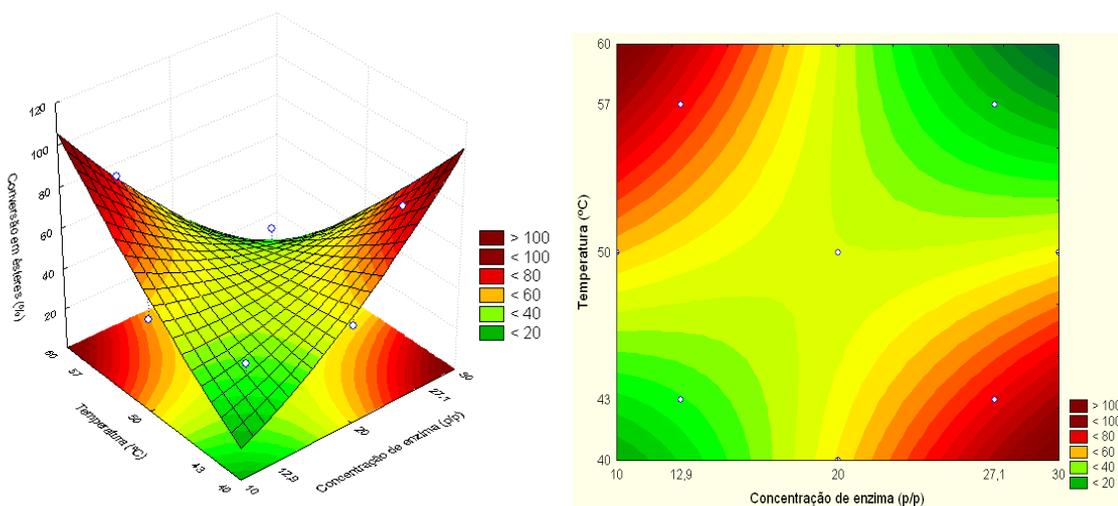
$R=0,84$ ,  $F_{5;5; 0,84} = 5,05$  ( Lipozyme RM IM)  $R=0,95$   $F_{5;5; 0,95} = 5,05$  (Novozym 435 )

No trabalho de Yu *et al.* (2010), a atividade da Novozym 435 na produção de biodiesel sob ação do ultrassom foi avaliada pela variação da potência do ultrassom (40-100%), teor de água (0-4%), solventes, relação óleo/solvente, relação metanol/óleo (1:1-6:1), dosagem de enzimas (0-10%) e temperatura da reação (30-70°C). As condições ótimas obtidas foram de 50% de potência, 0,5% de água, 1:1 de álcool terc-amílico/óleo, 6:1 de metanol/óleo, 6% de

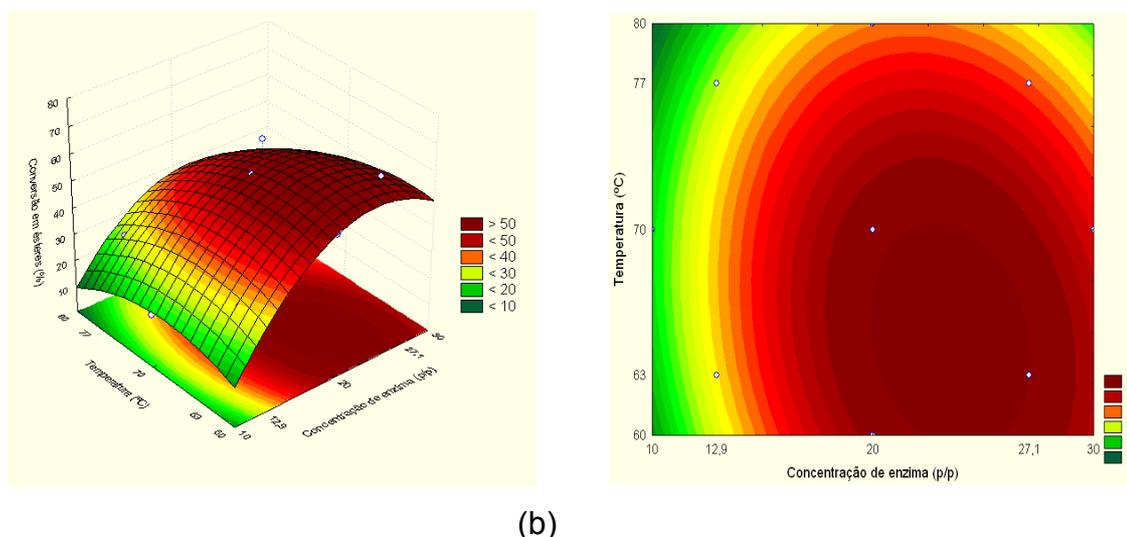
enzima e 40°C, nestas condições foram obtidos 96% de conversão em etil ésteres após 4 horas de reação.

Kumar . (2011) utilizaram uma lipase de *A. aerogenes*, para produção de biodiesel em sistema de ultrassom, onde foram investigados os efeitos concentração do catalisador (3 a 6%) e razão molar óleo/metanol (1:3, 1:4, 1:5). As condições otimizadas (5% de catalisador, razão molar de 1:4, 50% de potência e 30 minutos de reação) conduziram a conversões de 85%.

A Tabela 4.8 apresenta os desvios relativos entre as conversões de biodiesel observadas no delineamento completo 2<sup>2</sup> e as previstas por meio do modelo proposto (Equações 4.1 e 4.2). É possível observar que os desvios relativos versam entre 0,15 e 27% (Lipozyme RM IM) e 0,07 e 14% (Novozym 435) aproximadamente, o que é aceitável em se tratando de um processo biotecnológico. Ainda, os menores desvios relativos foram observados para os ensaios 2,3, 6 e 7 para a Lipozyme RM IM e para os ensaios 2 e 9,10 e 11 (ponto central) utilizando a Novozm 435, que apresentam as maiores respostas em termos de conversão em ésteres (%), e também para as repetições do ponto central.



(a)



**Figura 4. 8:** Superfícies de resposta e curvas de contorno para conversão em ésteres (%). (a) utilizando Lipozyme RM IM e (b) utilizando Novozym 435.

**Tabela 4.8:** Conversão em ésteres etílicos utilizando a enzima Novozym 435 e Lipozyme RM IM: valores experimentais, preditos pelo modelo e desvios relativos.

Ensaio	Conversão (%)		Conversão (%)		Desvio relativo (%)	
	Experimental		Predita			
	Lipo	Novo	Lipo	Novo	Lipo	Novo
1	39,52	33,47	31,45	33,67	20,43	-0,59
2	79,43	57,47	76,47	55,97	3,72	2,63
3	86,45	30,83	75,07	27,73	13,16	10,07
4	26,81	44,93	20,57	40,15	23,28	10,65
5	45,82	20,04	56,62	21,16	-23,58	-5,57
6	46,39	42,13	49,94	45,64	-7,64	-8,30
7	47,92	53,25	52,74	53,21	-10,06	0,07
8	34,54	33,20	44,08	37,87	-27,61	-14,05
9	44,29	54,31	44,36	54,55	-0,15	-0,43
10	44,27	53,55	44,36	54,55	-0,18	-1,86
11	44,68	55,85	44,36	54,55	0,72	2,33

### 4.2.3 Estudo do reuso das lipases Novozym 435 e Lipozyme RM IM para produção de biodiesel em sistema de ultrassom

O uso de enzimas como catalisadores tem como vantagens o fato de as enzimas serem biodegradáveis, permitirem recuperação do glicerol sem tratamento complexo e exigirem menor gasto energético, pois a temperatura de reação é mais baixa. Além disso, as enzimas podem ser recuperadas e reutilizadas. Apesar das vantagens, o uso de enzimas imobilizadas como catalisadores – responsáveis por acelerar a reação entre o óleo vegetal e o álcool na produção de biodiesel – é ainda relativamente oneroso, devido a seu alto custo. Para tanto vem sendo realizados estudos de reuso das enzimas, visando à diminuição dos custos e viabilização econômica do processo.

Para tal, as reações foram realizadas de duas maneiras, onde foram utilizadas as seguintes condições; para a Lipozyme RM IM, 12,9% de enzima, 57°C de temperatura, 100% de potência de ultrassom, razão molar óleo:etanol 1:3. Para a Novozym 435, 27,1% de enzima, 63°C de temperatura, 40% de potência de ultrassom, razão molar óleo:etanol 1:3 óleo etanol. Foram avaliadas oito bateladas consecutivas, com tempo de reação de 4 horas/batelada.

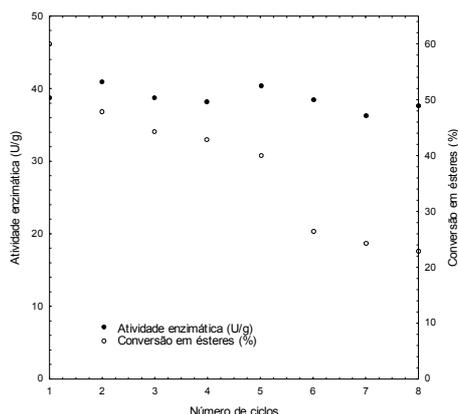
A Figura 4.9 (a-b-c-d) apresenta o estudo de reuso realizado para as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM, onde as figuras (a-c) foram obtidas através da 1ª metodologia descrita para o reuso dos catalisadores (utilização de enzima nova e condicionada durante várias bateladas) e as figuras (b-d) foram obtidas através da 2ª metodologia (onde foi utilizada a mesma enzima para todos os ciclos). As figuras a e b correspondem à Novozym 435 e as figuras c e d, correspondem à Lipozyme RM IM.

A análise destas figuras permite verificar que na metodologia onde foi utilizada uma nova amostra de enzima a cada batelada, a atividade enzimática se manteve estável durante os oito ciclos estudados. Para a Novozym 435 a conversão em ésteres caiu de 60% para até 20% ao longo dos ciclos (Figura 4.9 a); para a enzima Lipozyme RM IM a conversão em ésteres se manteve em torno de 80% (Figura 4.9 c).

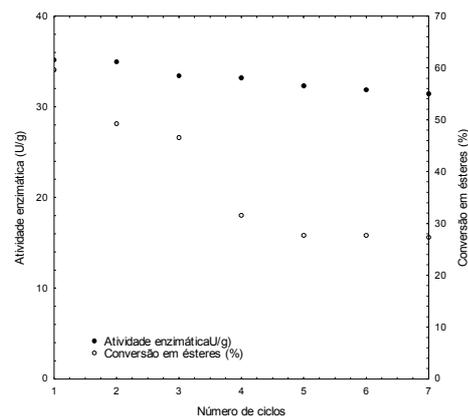
Quando realizado o reuso com a mesma enzima para todos os ciclos (Figura 4.9 b-d), a atividade enzimática para a Novozym 435 se manteve estável, já para a Lipozyme RM IM a atividade caiu significativamente; quanto à

conversão em ésteres o uso das duas enzimas conduziu a significativas quedas na conversão após cada sucessivo ciclo.

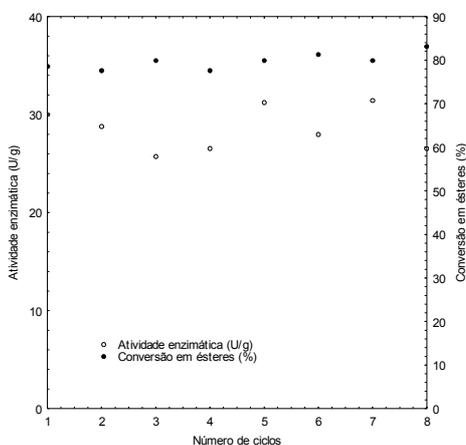
O diferente comportamento observado para as duas metodologias requer um estudo aprofundado visando obter informações/explicações mais precisas para tal.



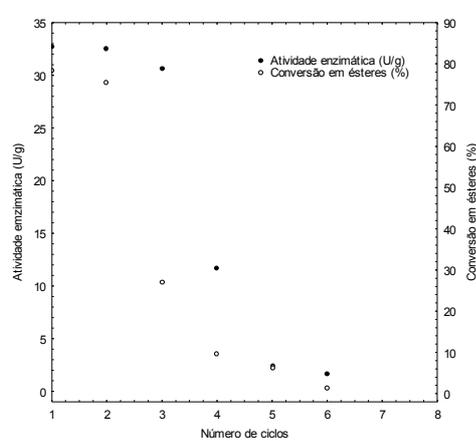
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 4.9:** (a) enzima Novozym 435 reuso das enzimas com enzima nova a cada batelada, (b) enzima Novozym 435 reuso com a mesma enzima, (c) enzima Lipozyme RM IM, reuso das enzimas com enzima nova a cada batelada e (d) enzima Lipozyme RM IM reuso com a mesma enzima. Condição:

Para a Novozym 435, 27,1% de enzima, 63°C de temperatura, 40% de potência, R.M.óleo/etanol 1:3. Para Lipozyme RM IM, 12,9% de enzima, 57°C de temperatura, 100% potência, R.M.óleo/etanol 1:3, para as duas enzimas foi utilizado 40 mL de n-hexano durante 4 horas de reação.

Yu *et al.* (2010) realizaram um estudo de reuso da enzima Novozym 435 para produção de biodiesel em sistema de ultrassom. As condições utilizadas foram, álcool terc-amílico (4 mL), óleo de soja (4 mmol), 50% de potência do ultrassom, Novozym 435 (6% baseado no peso do óleo), 0,5% de água, 40°C de temperatura e 50 rpm durante 2 horas. Os autores concluíram que a enzima não foi desativada ou desnaturada quando submetida à potência ultrassônica, perdendo um pouco de atividade (cerca de 4%) após cinco ciclos de uso.

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 etanolise. 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%.

## **Capítulo 5 – Conclusões e Sugestões**

### **5.1 Conclusões**

Neste trabalho propôs-se a avaliação exploratória da produção enzimática de biodiesel a partir da utilização de óleo de soja e etanol como substratos, n-hexano como solvente e duas lipases imobilizadas comerciais (Novozym 435 e Lipozyme RM IM) em sistema de ultrassom. Assim, foram realizados estudos preliminares para a avaliação do comportamento da atividade das lipases comerciais em solvente orgânico em banho de ultrassom, afim de determinar o solvente mais adequado para posterior utilização na produção de biodiesel. Neste contexto as conclusões obtidas foram as que seguem.

Na primeira etapa do trabalho pode-se concluir que os solventes n-hexano e terc-butanol se mostraram os mais adequados, pois conseguiram manter a atividade das enzimas durante o tratamento com ultrassom. As imagens de MEV demonstraram que o solvente pode vir a atacar o suporte da enzima, não danificando, no entanto, sua estrutura. E quando as enzimas foram armazenadas em baixa temperatura os solventes n-hexano e terc-butanol apresentaram alta estabilidade durante 100 dias de avaliação.

Desta forma, foi fixado o solvente n-hexano para realização da segunda etapa do trabalho. Devido ao seu menor custo comparado ao terc-butanol e por ser o solvente mais utilizado pelas indústrias de óleo.

A produção de biodiesel em sistema de ultrassom com solvente n-hexano e as enzimas Novozym 435 e Lipozyme RM IM como biocatalisadores, apresentaram rendimentos de aproximadamente 60 e 80%, respectivamente, na condição otimizada.

O estudo de reuso de ambas enzimas mostrou-se promissor quanto ao rendimento da reação, revelando-se, no entanto, em contexto complexo à luz do comportamento da atividade enzimática, ensejando, desta forma, a realização de investigação verticalizada no assunto.

## 5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, algumas sugestões para trabalhos futuros podem ser apontadas em função da forma de condução do processo:

- Avaliação do tipo e da quantidade de solvente orgânico adicionado ao meio reacional na conversão em ésteres;
- Análises de MEV das enzimas, na presença de solvente sem ultrassom e somente com ultrassom, e também após produção de biodiesel em ultrassom;
- Avaliação aprofundada do estudo de reuso dos catalisadores;
- Avaliação cinética dos sistemas reacionais: Dados experimentais e modelagem;
- Estudo da conversão em ésteres em sistema de ultrassom com as lipases comerciais utilizadas neste trabalho, em meio livre de solvente;
- Avaliar a produção de biodiesel em ultrassom com enzimas não comerciais.

## Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais, 2010.  
www.abiove.com.br

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.

ATADASHI, I.M.; AROUA, M.K.; AZIZ, A.A., High quality biodiesel and its diesel engine application: A review *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.14, p.1999–2008, 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, 1815-1835, 2010.

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

BERNARDES, O.L.; BEVILAQUA, J.V.; LEAL, M.C.M.R.; FREIRE, D.M.G.; LANGONE, M.A.P., Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v.137, p.105-114, 2007.

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

BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L., *Enzimas em biotecnologia*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

CAMARGOS, R. R. S., *Avaliação da viabilidade de se produzir biodiesel através da transesterificação de óleo de grãos de café defeituosos*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Minas Gerais - MG. 2005.

CANAKCI, M.; GERPEN, V. J., A pilot plant to produce biodiesel from high free fatty acid feedstocks. *Transactions of the ASAE*, v.46, p.945-954, 2003.

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 biotransformations using lipases. *Química Nova*. v.6, p.6-15, 1995.

CENI, G.C.; SILVA, P.C.; LERIN, L.; OLIVEIRA, J.V.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E.G.; OLIVEIRA, D., Ultrasound-assisted enzymatic transesterification of methyl benzoate and glycerol to 1-glyceryl benzoate in organic solvent. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 48, p. 169-174, 2011.

CHANG, H.M.; LIAO, H. F.; LEE, C. C.; SHIEH, C.J., Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. *J Chem Technol Biotechnol* v.80, p.307-312, 2005.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento (2010) [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)

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

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.

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.

DESHMANE, V.G.; GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B., Ultrasound-assisted synthesis of biodiesel from palm fatty acid distillate. *Ind Eng Chem Res* v.48, p.7923-7927, 2009.

DIZGE, N.; KOSEOGLU, D.Y.; KESKINLER. B., Biodiesel Production by *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* immobilised in hydrophilic polyurethane foam. European congress of chemical engineering (ECCE-6), Copenhagen, (Denmark), September p.16-20, 2007.

DOUKYU, N.; OGINO H., Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, v.48, p.270-282, 2010.

ELIE, A. G.; CHOIA, S.H.; GECKELER, K. E., Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v.58 p.118-123, 2009.

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

FACCIO, C., Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais. Dissertação de mestrado. URI-Campus de Erechim, 2004.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A., Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, v. 28, p.19-23, 2005.

FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A., Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.75, p.569-576, 2000.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H., Transesterification kinetics of soybean oil, *Journal of the American Oil. Chemical Society*, v. 63, p. 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, p. 405-416, 2001.

GERPEN J. V., Biodiesel processing and production, *Fuel Processing Technology* v.86, p.1097-1107, 2005.

GHANEM, A., ABOUL-ENEIN, H.Y. Application of lipase in kinetic resolution of racemates. *Chirality*, v.17, p.1-15, 2005.

HARDING, K.G.; DENNIS, J.S.; BLOTTNITZ, V.H.; HARRISON, S.T.L., A life-cycle comparison between inorganic and biological catalysis for the production of biodiesel. *Journal of Cleaner Production* v.16, p.1368-1378, 2007.

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

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A., Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* v.27 p. 782-798, 2009.

HELWANI, Z.; OTHMAN, M.R.; AZIZ, N.; KIM, J.; FERNANDO, W.J.N., Solid heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides with methanol: a review. *Applied Catalysis A: General*, v.363, p.1-10, 2009.

HIOL, A.; JONZO, M.D.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L.C., Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enzyme Microbiol. Technology*, v. 25, p. 80-87, 1999.

[http://www.hielscher.com/ultrasonics/sonochem\\_01.htm](http://www.hielscher.com/ultrasonics/sonochem_01.htm). Acessado em 16/05/2011.

HU, J.; DU, Z.; TANG, Z.; MIN, E., Study on the solvent power of new green solvent: biodiesel. *Ind. Eng. Chem. Res.* v.43, p.7928-7931, 2004.

HAAS, M.J.; PIAZZA, G.J.; FOGLIA, T.A., Enzymatic approaches to the production of biodiesel fuels. In: Kuo TM, Gardner HW, editors. *Lipid biotechnology*. New York: Marcel Dekker Inc; p.587-598, 2002.

ISSARIYAKUL, T.; KULKARNI, M.G.; MEHER, L.C.; DALAI, A.K.; BAKHSHI, N.N., Biodiesel production from mixtures of canola oil and used cooking oil. *Chem Eng J*, v.140, p.77-85, 2008.

JAEGER, K.E.; REETZ, M., Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Tibtech*, v.16, p.396-403, 1998.

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

JI, Q.; XIAO, S.; HE, B.; LIU, X., Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.66, p.264-269, 2010.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P.W.; THOMAS, G., Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances* v.26, p.457-470, 2008.

KADEMI, A.; LEBLANE, D.; HOUDE, A., Lipases. In: Pandey A. Concise Encyclopedia of Bioresource Technology. New York: The Haworth Press Inc., p.552-561, 2004.

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., Surfactant-Coated Lipase Suitable for the Enzymatic Resolution of Menthol as a Biocatalist in Organic Media. Biotechnology Processes. v.11, p.270-275, 1995.

Kirki, O; Borchert, T.V.; Fuglsang, C.C., Industrial Enzymes applications. Current Op. Biotechnol, v. 13, p.345-351, 2002.

KNOTHE, G.; DUNN, R.O.; BAGBY, M.O., Biodiesel: the use of vegetable oils and their derivatives as alternative diesel fuels. Oil Chemical Research, National Center for Agricultural Utilization Research, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, IL61604 , 2002.

KOH, M. Y.; GHAZI, T.I.M., A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. Renewable and Sustainable Energy Reviews v.15, p.2240-2251, 2011.

KUMAR, D.; KUMAR, G.; POONAM; SINGH, C.P., Fast, easy ethanolysis of coconut oil for biodiesel production assisted by ultrasonication. Ultrasonics Sonochemistry, v.17, p.555-559, 2010.

KUMAR, D.; KUMAR, G.; POONAM, C.P., Singh, Ultrasonic-assisted transesterification of *Jatropha curcus* oil using solid catalyst, Na/SiO<sub>2</sub>. *Ultrasonics Sonochemistry* v.17, p. 839-844, 2010.

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

LAM, M.K.; LEE, K.T.; Mohamed, A.R., Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnology Advances*, v.28, p.500-518, 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.

LI, C.; YOSHIMOTO, M.; OGATA, H.; TSUKUDA, N.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K., Effects of ultrasonic intensity and reactor scale on kinetics of enzymatic saccharification of various waste papers in continuously irradiated stirred tanks. *Ultrasonic Sonochemistry*. v.12, p.373-384, 2005.

LI, Q.; ZHENG, J.; YAN, Y., Biodiesel preparation catalyzed by compound-lipase in co-solvent. *Fuel Processing Technology* v.91, p.1229-1234, 2010.

LIN, G.; LIU, H., Ultrasound promoted lipase catalyzed reactions. *Tetrahedron Letters*, v.36, p.6067-6068, 1995.

LINKO, Y.Y.; LAMSA, M.; WU, X.; UOSUKAINEN, W.; SAPPALA, J.; LINKO, P., Biodegradable products by lipase biocatalysis. *Journal Biotechnology* 1998;66:41–50.

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

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. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.73, p.349-355, 2006.

LUTZ, G.; CHAVARRÍA, M.; ARIAS, M.L.; MATA-SEGREDA, J.F., Microbial degradation of palm (*Elaeis guineensis*) biodiesel. *Rev Biol Trop* v.54, p.59-63, 2006.

LV, P.; WANG, X.; YUAN, Z.; TAN, T., Conversion of soybean oil to biodiesel fuel with immobilized candida lipase on textile cloth. *Energy Source Part A*, v.30, p.872-9, 2008.

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

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

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

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*, v.23, p.2757-2766, 2009.

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.

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

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

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

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

MASON, T.J.; LORIMER, J.P., *Applied sonochemistry: The uses of power ultrasound in chemistry and processing*. Ed. Wiley-VCH, 2002.

MEDINA, A.R.; MORENO, P.A.G.; CERDÁN, L.E.; GRIMA, E.M., Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production *Biotechnology Advances* v.27, p.398-408, 2009.

MEHER, L.C.; SAGAR, D.V.; NAIK, S.N., Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* v.10, p.248-268, 2006.

NARANJO, J.C.; CÓRDOBA, A.; GIRALDO, L.; GARCÍA, V.S.; PIRAJÁN, J.C.M., Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v.66, p.166-171, 2010.

NOGUEIRA, B. M.; CARRETONIA, C.; CRUZ, R.; FREITAS, S.; MELO, P. A.; FÉLIX, R. C.; Pinto, J. C.; Nele, M.; Microwave activation of enzymatic catalysts for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v.67, p.117-121, 2010.

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., Do Nascimento, I.; Di Luccio, M.; Faccio, C.; Rosa, D.C., Bender, J.P.; Lipke, N.; Amroginski, C.; Dariva, C.; Oliveira, J.V., Kinetics of enzyme-catalyzed alcoholysis of soybean oil in n-hexane. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.121, p.231-41, 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. *Journal Supercrit Fluids*, v.38, p.373-382, 2006a.

OLIVEIRA, A.C. FEIHRMANN, C. DARIVA, A.G. CUNHA, J.V. BEVILAQUA, J. DESTAIN, J.V. OLIVEIRA, D.M.G. Freire, Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase, *Journal Mol. Cat. B:: Enzymatic*. v.39, p.117-123, 2006b.

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

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A., Plant lipases from latex: properties and industrial applications. *Química Nova*, v.29, p. 93-99, 2006.

PRASAD, B.B.N.; MODI, M.K.; REDDY, J.R.C., RAO, B.V.S.K.; Lipase-mediated transformation of vegetable oils into biodiesel using propan-2-ol as acyl acceptor, *Biotechnology Letters*, v.28, p. 637-642, 2006.

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.

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.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R., Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. V.147, p.237-250, 2009.

REYES-DUARTE, D.; LOPEZ-CORTES, N.; FERRER, M.; PLOU, J.F.; Ballesteros, A., Parameters affecting productivity in the lipase-catalysed synthesis of sucrose palmitate. *Biocatal Biotransfor*, v.23, p.19-27, 2005.

ROKHINA, E.V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J., Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in Biotechnology* v..27, p.298-306, 2007.

ROSA, C.D.; MORANDIM, M.B.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V., Lipase catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane. *Journal Supercrit Fluids*, v.47, p.49-53, 2008.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S., Enzymatic of biodiesel from cottonseed using t-butanol as a solvent. *Bioresour Technololy*, v.98, p.648-53, 2007.

SALAMATINIA, B.; MOOTABADI, H.; BHATIA, S.; ABDULLAH, A.Z., Optimization of ultrasonic-assisted heterogeneous biodiesel production from palm oil: A response surface methodology approach. *Fuel Processing Technology*, v.91, p.441-448, 2010.

SANTOS, S.C.; 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.

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

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

SEBRAE. Biodiesel, [www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha\\_Sebrae.pdf](http://www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha_Sebrae.pdf), acessado em: dezembro de 2010. <http://www.biodieselbr.com/colunistas/ramos/qualidade-materia-prima-producao-biodiesel-1.htm>

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

SHAH S, SHWETA S, GUPTA MN. Biodiesel preparation by lipase-catalysed transesterification of jatropha oil. *Energy and Fuels*, v.18, p.154-159, 2004.

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

SHAO, P.; MENG, X.; HE, J.; SUN, P., Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soap stock. *Food and Bioproducts Processing*, v.86, p.283-289, 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.; HINGU; PARAG, R.; GOGATE; VIRENDRA, K.; RATHOD., Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using sonochemical reactors, *Ultrasonics Sonochemistry*, v.17 p.827-832, 2010.

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

SILVA, C. produção contínua de biodiesel por transesterificação não catalítica de óleo de soja, Tese de Doutorado, Programa de Engenharia Química, UEM, Maringá - PR, - Brasil, junho de 2009.

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

SOUMANOU, M.M.; BORNSCHEUER, U.T., Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enz Microb Technol*, v.33, p.97-103, 2003.

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

SRIVATHSAN V.R.; SRINIVASAN L.N.; KARUPPAN, M., An overview of enzymatic production of biodiesel *Bioresource Technology*, v.99, p.3975-398, 2008.

STAVARACHE, C.; VINATORU, M.; MAEDA, Y., Ultrasonic versus silent methylation of vegetable oils. *Ultrason Sonochem* v.13, p.401-407, 2006.

STAVARACHE, C.; VINATORU, M.; NISHIMURA, R.; MAEDA, Y., Fatty acids methyl esters from vegetable oil by means of ultrasonic energy. *Ultrason Sonochem* v.12, p.367-372, 2005.

SU, E.; WEI, D., Improvement in lipase-catalyzed methanolysis of triacylglycerols for biodiesel production using a solvent engineering method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v.55, p.118-125, 2008.

TAN, T. W.; NIE, K. L.; WANG, F., Production of biodiesel by immobilized *Candida* sp. Lipase at high water content. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v.128, 109-114, 2006.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; Wang, F., Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, v.28, p.628-634, 2010.

THANH, L.T.; OKITSU, K.; SADANAGA, Y.; TAKENAKA, N.; MAEDA, Y. E BANDOW, H., A two-step continuous ultrasound assisted production of biodiesel fuel from waste cooking oils: A practical and economical approach to produce high quality biodiesel fuel. *Bioresource Technology*, v.101, p.5394-5401, 2010.

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

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

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

VULFSON EN. Industrial applications of lipases. In: Wooley P, Petersen SB, editors. Lipases. Cambridge, Great Britain: Cambridge University Press; p. 271, 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 p.519-525, 2010.

ZHANG, K.P.; LAI, J.Q.; HUANG, Z. L.; YANG, Z., *Penicillium expansum* lipase-catalyzed production of biodiesel in ionic liquids *Bioresource Technology*, v.102, p.2767-2772, 2011.