

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES - URI CAMPUS DE ERECHIM

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

SIMONE MICHELIN

PRODUÇÃO DE BIODIESEL ENZIMÁTICO LIVRE DE SOLVENTE DO
ÓLEO DO FRUTO DA MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex
Mart) EM SISTEMA DE ULTRASSOM

ERECHIM, RS, BRASIL

FEVEREIRO DE 2013

SIMONE MICHELIN

PRODUÇÃO DE BIODIESEL ENZIMÁTICO LIVRE DE SOLVENTE DO ÓLEO DO
FRUTO DA MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart) EM SISTEMA
DE ULTRASSOM

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.

Orientadores: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira
Prof^a. Dra. Clarissa Dalla Rosa
Prof^a. Dra. Débora de Oliveira

ERECHIM, RS, BRASIL
FEVEREIRO DE 2013

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.

SIMONE MICHELIN

PRODUÇÃO DE BIODIESEL ENZIMÁTICO LIVRE DE SOLVENTE DO
ÓLEO DO FRUTO DA MACAÚBA (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex
Mart) EM SISTEMA DE ULTRASSOM

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:

Prof. José Vladimir de Oliveira, D. Sc.
(Orientador)

Profa. Clarissa Dalla Rosa, D. Sc.
(Orientadora)

Profa. Débora de Oliveira, D. Sc.
(Orientadora)

Profa. Helen Treichel D. Sc.
(UFFS)

Prof. Marcus Vinicius Tres D.Sc.
(URI-Campus de Erechim)

Erechim, 20 de fevereiro de 2013.

***Dedico esta conquista a meus pais,
Edir Luiz e Delci Lurdes, pelo apoio,
amor e confiança que me concederam.***

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amparo e pela força de sempre recomeçar.

A meus pais Edir Luiz e Delci Lurdes por sempre me incentivar a continuar.

As minhas irmãs, Zanete, Ivanete e Rosmari, que sempre procuram me ajudar.

Aos meus sobrinhos, Gabriel, Rafael e Maria Valentina, que permitem momentos maravilhosos de descontração.

Ao meu namorado, Ezequiel Sagiorato, por sua presença, amor, apoio, incentivo e confiança.

Aos meus familiares.

Aos Professores orientadores Clarissa Dalla Rosa, Débora de Oliveira e José Vladimir de Oliveira, pela oportunidade de trabalhar com vocês e de aprender através dos seus grandiosos conhecimentos. Em especial a Professora Clarissa Dalla Rosa pelos conselhos e conversas.

A todas as minhas amigas pelos conselhos, diversões e incentivo.

Ao amigo Lindomar Alberto Lerin e que há muito divide comigo sua imensa amizade e companheirismo.

Aos amigos e colegas Viviane Astolfi e Rubens Artêmio que em diversos momentos dividiram comigo preocupações e alegrias e me auxiliaram, de certa forma, na concretização desta formação.

Às colegas de laboratório Cindy Helena Bustamante Vargas, Claudia Mara Trentin e Mirian Feiten, pelas conversas em buscas de soluções das questões experimentais, pelas longas tardes de estudo, pelos momentos de descontração e também pela grandiosa amizade.

À colega de laboratório Ilizandra Fernandes por sua prontidão em ajudar no andamento das atividades.

Às demais colegas Mariane Lobo Ugalde, Valéria Borszcz e Rubia Mores pela grandiosa amizade e pelas ajudas no decorrer das disciplinas.

Ao colega de trabalho Robson Paulo Scherer pelos momentos de aprendizagem.

Aos demais colegas dos Laboratórios de Termodinâmica, de Biotecnologia vegetal e de alimentos.

Aos Professores Marcus Vinícius Tres, Rogério Cansian e Rogério Dallago que contribuíram com seu conhecimento em diferentes etapas deste trabalho.

Aos professores do Programa Geciane Toniazzo, Helen Treichel, Marco Di Luccio, Elizandra Rigo, Clémerson Alberi Pedroso e Simone Scerezer oportunidade de aprendizagem.

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

Os sistemas de ultrassom, assim como, o uso de lipases comerciais imobilizadas apresentam-se como uma alternativa aos processos de produção de biodiesel convencionais. O principal objetivo deste trabalho foi investigar o potencial de produção de biodiesel enzimático, em sistema livre de solvente e banho de ultrassom, do óleo do fruto de Macaúba, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.). Os experimentos iniciais foram realizados de acordo com condições pré-estabelecidas durante a otimização do processo de produção para o óleo de soja por Popielski (2011). Em seguida realizou-se um planejamento experimental fracionado, de forma a realizar um seleção das seguintes variáveis: temperatura, concentração de enzima, razão molar óleo/etanol e potência do ultrassom. Experimentos externos ao planejamento foram realizados em vista de considerações feitas ao longo do estudo. A caracterização do óleo foi realizada por análise em cromatógrafo gasoso e métodos analíticos de titulação. A quantificação das conversões em ésteres das reações foi realizada por cromatografia gasosa. Os resultados mostraram que o uso da lipase comercial imobilizada Novozym 435 em banho de ultrassom e livre de solvente orgânico apresenta conversões superiores a 70%, sendo esta próxima a convertibilidade máxima neste óleo. Após 8 ciclos subsequentes de uso da lipase, sua atividade relativa manteve-se em torno de 60%. Tendo em vista os resultados promissores obtidos com esse estudo percebe-se a importância da otimização deste processo de produção.

Palavras-chave: ultrassom, biodiesel, lipase, *Acrocomia aculeata*.

ABSTRACT

The ultrasound systems, as well, the use of commercial immobilized lipases are presented as an alternative to conventional processes towards biodiesel production. The main objective of this study was to investigate the potential of enzymatic biodiesel production in solvent-free system under ultrasound irradiation, of the Macaúba oil (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.). Preliminary experiments were conducted following a pre-established condition obtained from the optimization of soybean biodiesel production for Popielski (2011). Then a fractional factorial experimental design was employed to perform a screening of the following variables: temperature, enzyme concentration, molar ratio ethanol and oil-power ultrasound. Other experiments than those of the experimental design were accomplished in attempt to find out the appropriate reactional conditions. Chemical characterization of the oil was performed by gas chromatography analyses and analytical titration methods. Reaction yields in esters were computed taking into account results of gas chromatography analysis. Results showed that the use of immobilized lipase Novozym 435 under ultrasound irradiation in solvent-free system lead to conversions exceeding 70%, which is close to this maximum convertibility of the oil. After 8 consecutive cycles of lipase reuse, its relative activity remained around 60%. Given that macaúba oil is a non-edible oil, promising results were obtained in this study, which in turns make possible to realize the importance of conducting a more detailed investigation considering the technical aspects of the biofuel produced, as well as the optimization of this process.

Key-words: Ultrasound, biodiesel, lipase, *Acrocomia aculeata*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 BIODIESEL	21
3.1.1 Definição	21
3.1.2 Histórico	21
3.1.3 Importância e justificativa	24
3.1.4 Usinas produtoras de biodiesel no Brasil	26
3.1.5 Matéria- prima	27
3.2 QUALIDADE DOS GRÃOS E DO ÓLEO VEGETAL DURANTE O ARMAZENAMENTO	30
3.3 MACAÚBA	31
3.3.1 Características gerais	31
3.4 PRODUÇÃO DE BIODIESEL	41
3.4.1 Aspectos técnicos	41
3.4.2 Processos de produção de biodiesel	41
3.4 LIPASES	50
3.5.1 Lipases imobilizadas	52
3.6 ULTRASSOM	56
3.6.1 Definição	56
3.6.2 Histórico	56
3.6.3 Aparelhos geradores de ondas ultrassônicas	58
3.6.4 Cavitação	58
3.7 PRODUÇÃO DE BIODIESEL ENZIMÁTICO POR TRANSESTERIFICAÇÃO EM SISTEMAS DE ULTRASSOM	63
3.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	64
4. MATERIAL E MÉTODOS	66
4.1 REAGENTES	66
4.2 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	67

4.2.1 Remoção de resíduos do óleo bruto do fruto da macaúba	67
4.3 CARACTERIZAÇÕES DO ÓLEO DO FRUTO DA MACAÚBA	68
4.3.1 Teor de água	68
4.3.2 Quantificação de monoacilgliceróis (Mag), diacilgliceróis (Dag) e triacilgliceróis (Tag)	68
4.3.3 Determinação do índice de acidez	70
4.3.4 Determinação do índice de peróxido	71
4.4 REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DO FRUTO DA MACAÚBA	73
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS	74
4.6 ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE COMERCIAL IMOBILIZADA NOVOZYM 435	76
4.6.1 Avaliação do reuso da lipase comercial imobilizada Novozym 435 ...	79
4.6.2 Influência do ultrassom na atividade de esterificação da lipase Novozym 435	79
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DO FRUTO DA MACAÚBA	80
5.2 TESTES PRELIMINARES	83
5.2.1 Planejamento experimental	84
5.2.2 Efeito da concentração de enzima na cinética de transesterificação	86
5.2.3 Fatores relacionados às baixas conversões em ésteres	88
5.2.4 Influência do uso de peneira molecular na transesterificação enzimática do óleo de fruto de macaúba	91
5.3 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS IDEAIS	93
5.3.1 Determinação da concentração de enzima	94
5.3.2 Estudo da influência do ultrassom	101
5.3.3 Avaliação do reuso da lipase comercial imobilizada Novozym 435	104
5.3.4 Influência do ultrassom na atividade de esterificação da lipase Novozym 435	108
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	112
6.1 CONCLUSÕES	112
6.2 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	113
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
ANEXO A	135

ANEXO B 138

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Localização das usinas de produção de biodiesel autorizadas e em operação e capacidade anual de produção das regiões.	27
Figura 3. 2 - Palmeira <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.....	32
Figura 3.3 - Distribuição espacial da espécie <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart. em 53 municípios do Cerrado, no sentido amplo.	33
Figura 3. 4 - Fruto da <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart.....	34
Figura 3. 5 - Torta da amêndoa (1), Torta da polpa (2) e carvão (3).	35
Figura 3.6 - Colheita pós-maturação (1) e armazenamento do fruto (2).	38
Figura 3.7 - Esquema geral da reação de transesterificação completa de um triglicerídeo em três ésteres alquílicos de ácidos graxos.	42
Figura 3. 8 - Esquema geral das três reações de transesterificação sobre um triglicerídeo.....	44
Figura 3.9 - Dinâmica da cavitação de bolhas.....	59
Figura 3.10 - Erosão cavitacional de sólidos.....	60
Figura 4.1 - Óleo bruto com material sólido (1); filtragem a vácuo (2) e resíduos sólidos removidos do óleo (3).....	67
Figura 4. 2 - Representação esquemática do preparo de amostras para quantificação de Mag, Dag e Tag, conforme Norma Européia 14105.....	69
Figura 4. 3 - Representação esquemática da metodologia IUPAC 2.201 para determinação do índice de acidez de óleos.	70
Figura 4.4 - Representação esquemática da metodologia da AOAC 965.33 para determinação do índice de peróxido de óleos.	72
Figura 4. 5 - Aparato experimental para produção de biodiesel enzimático em ultrassom a partir do óleo do fruto da macaúba.	73
Figura 4. 6 - Representação esquemática das reações de transesterificação e tratamento da amostra até análise por cromatografia gasosa.....	74
Figura 4. 7 - Representação esquemática do preparo de amostras para quantificação de ésteres de acordo com a Norma Européia 14103 adaptada.	75
Figura 4. 8 - Representação esquemática da medida atividade de esterificação enzimática de acordo com metodologia descrita por Oliveira et al. (2006).	77
Figura 5. 1 - Coloração do óleo do fruto da macaúba.....	81

- Figura 5. 2 - Cinética reacional da transesterificação enzimática do óleo do fruto da macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom. Condições: concentração de enzima 27% (m/m), razão molar óleo/etanol 1:3, potência do ultrassom 40% do total da capacidade (132W) e temperatura de 63°C.....84
- Figura 5. 3 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito da concentração de enzima, temperatura, potência e razão molar óleo/etanol na produção de biodiesel enzimático do óleo do fruto da macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.....86
- Figura 5. 4 - Cinética reacional da transesterificação enzimática do óleo do fruto da macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função do tempo e de diferentes concentrações da lipase Novozym 435. Condições: razão molar óleo/etanol 1:3; potência do ultrassom 40% da capacidade máxima (132W) e temperatura de 40°C.87
- Figura 5. 5 - Cinética reacional da transesterificação enzimática do óleo do fruto da macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função do tempo. Condições: concentração da lipase Novozym 435, 20% (m/m); razão molar óleo/etanol 1:9; potência do ultrassom 100% da capacidade máxima (132W) e temperatura de 65°C.88
- Figura 5. 6 - Cinética reacional da conversão em ésteres em função do tempo e da concentração da lipase Novozym 435. Condição: razão molar óleo/etanol 1:9, potência do ultrassom 100%, concentração de peneira molecular 100% (m/m) e temperatura 65 °C.95
- Figura 5.7 - Cinética reacional da conversão em ésteres a partir da transesterificação enzimática de óleo de fruto de macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom. Condições: concentração da lipase Novozym 435 20% (m/m); razão molar óleo/etanol 1:9, potência do ultrassom 100% da capacidade máxima (132W), concentração de peneira molecular 100% (m/m) e temperatura de 65°C.....97
- Figura 5.8 - Influência do ultrassom na produção de biodiesel enzimático do óleo do fruto da macaúba em sistema livre de solvente. Condições: concentração da lipase comercial imobilizada Novozym 435 de 20% (m/m), razão molar óleo/etanol de 1:9 (m/m), concentração de peneira molecular de 100% (m/m), potência do ultrassom 100% da capacidade máxima (132W) e temperatura de 65°C. 102
- Figura 5.9 - Atividade de esterificação da lipase Novozym 435 sobre vibração ultrassônica (a) e sem vibração ultrassônica (b). Condições: concentração da lipase

comercial imobilizada Novozym 435 de 20% (m/m), razão molar óleo/etanol de 1:9 (m/m), peneira molecular 100% (m/m), temperatura de 65°C e tempo reacional de 30 minutos.....	105
Figura 5.10 - Influência do ultrassom sobre a atividade de esterificação da Novozym 435 e sobre a conversão em ésteres de ácidos graxos.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Dados das emissões médias de escapes medidos pela EPA, com biodiesel, nas proporções de 100% e 20% em comparação com o diesel de petróleo	25
Tabela 3.2 - Coeficientes técnicos de aracáceas oleaginosas, matérias-primas potenciais para a produção de biodiesel.	29
Tabela 3.3 - Ácidos graxos constituintes do óleo do fruto da macaúba.	36
Tabela 3.4 - Produtividade agrícola da macaúba.	37
Tabela 5.1 - Características químicas do óleo do fruto da macaúba.	81
Tabela 5.2 - Matriz com valores decodificados e reais dos fatores investigados no planejamento experimental e resposta da interação de variáveis.	85
Tabela 5.3 - Conversão em ésteres do óleo do fruto da macaúba em função do tempo e de diferentes concentrações de peneira molecular, utilizando a lipase comercial imobilizada Novozym 435.	91

1. INTRODUÇÃO

A matriz energética mundial é fortemente inclinada para fontes de carbono, as quais apresentam esgotamento progressivo, como é o caso das reservas mundiais de petróleo, estando no nível mais baixo em 15 anos (IEA, 2010). Essa escassez em combustíveis fósseis pode ser atrelada a dois fatores: longo tempo de formação das jazidas de petróleo e crescimento do consumo (OLIVEIRA e RAMALHO, 2006), principalmente, nos países em desenvolvimento, onde observa-se altas taxas de crescimento populacional, de atividade econômica, de urbanização e de produção industrial (IEA, 2010). Isto gera como agravantes o alto preço dos combustíveis ao consumidor final e o aumento na emissão de poluentes atmosféricos. Assim, a busca por fontes alternativas de energia, que viabilizem o desenvolvimento das sociedades aliado à sustentabilidade das mesmas é imprescindível.

Na busca por um combustível que substitua parcial ou totalmente os combustíveis fósseis, o biodiesel é o mais promissor, pois, suas propriedades são as mais compatíveis com o petrodiesel permitindo a substituição de até 30% do diesel convencional sem a necessidade de alterações nos motores veiculares (HOWELL e JOBE, 2006). Além disso, devido a sua matéria-prima ser originária de fonte renovável, a emissão de gases altamente poluentes é menor. No caso do dióxido de carbono (CO₂), gás ligado ao efeito estufa, a redução na emissão pode ser superior a 70%, uma vez que, há um mecanismo de compensação entre o que é emitido pela queima do combustível e o que é absorvido pelas plantas durante o processo fotossintético (TAN et al. 2010).

O biodiesel foi introduzido na matriz energética brasileira no ano de 2005, através da Lei Federal 11.097, a qual o definiu como um 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.

A matéria-prima para a produção do biodiesel pode ser proveniente de óleos vegetais, de óleos vegetais residuais, de gorduras animais, de ácidos graxos oriundos do refino de óleos vegetais (FOSCHIERA, 2008) e de matérias graxas de alta carga ácida (KNOTHE e GERPEN, 2006). No entanto, os óleos vegetais possuem prioridade, uma vez que, são obtidos da biomassa vegetal, a qual é considerada, atualmente, como a maior e mais sustentável fonte de energia

renovável pronta para uso, sendo composta por cerca de 220 bilhões de toneladas de matéria seca anual (HALL e RAO, 1999). Entre os países com grande potencial para a produção de biodiesel, o Brasil destaca-se entre as economias industrializadas (OLIVEIRA e RAMALHO, 2006), pois possui grandes extensões de terras agricultáveis, permitindo-o incorporar novas áreas à agricultura de energia sem competir com a cadeia de alimentos, tendo também a possibilidade de múltiplos cultivos no ano (FOSCHIERA, 2008).

As culturas de florestas tropicais, geralmente, apresentam rendimentos superiores, em óleo por hectare, aos obtidos por culturas de zonas temperadas (SHAY, 1993). Neste contexto, oleaginosas como a macaúba, o dendê, o coco e o pinhão-manso, constituem fontes promissoras de biodiesel a serem exploradas nas florestas brasileiras (FOSCHIERA, 2008; OLIVEIRA e RAMALHO, 2006). No caso específico da macaúba a produtividade pode chegar a 5.000 kg de óleo/ha, sendo esta, aproximadamente, dez vezes maior que a produção obtida com as culturas da soja e da mamona - 500 a 700 kg de óleo/ha (BHERING, 2009).

As palmeiras de macaúba são adaptadas a condições edafo-climáticas distintas, incluindo biomas diversos, principalmente, cerrado, caatinga e floresta amazônica (BHERING, 2009). O bioma cerrado, no Brasil, representa cerca de 10% das savanas do mundo e devido ao seu clima, requer vegetação perene para manter a estabilidade ambiental do solo, assim sendo, o plantio dessas palmeiras visa além da produção de biodiesel à preservação do solo e também ao desenvolvimento sustentável da região, visto que, as regiões de cerrado são regiões com poucas alternativas tecnológicas e com grande ocorrência de pobreza populacional (LIMA, 2011).

Os óleos vegetais possuem alta viscosidade e, portanto, não podem ser empregados diretamente como combustíveis, uma vez que, não sofrem atomização eficiente. Assim, o uso desses como combustível passa pela necessidade de derivatização, a qual melhora as propriedades do combustível tornando-o apropriado para uso em motores veiculares. Atualmente, as principais metodologias de produção de biodiesel são: misturas binárias com petrodiesel, pirólise, microemulsificação e transesterificação (MA e HANNA, 1999). A transesterificação é o método mais empregado, pois, é o único que forma produtos comumente denominados de biodiesel, isto é, ésteres alquílicos de ácidos graxos (KNOTHE e GERPEN, 2006).

A transesterificação ou alcoólise é uma reação onde os substratos são um álcool de cadeia curta, geralmente, metanol ou etanol e triglicerídeos provenientes do óleo ou da gordura. Os produtos obtidos são alquil ésteres de ácidos graxos, ou seja, o biodiesel e o subproduto é o glicerol, o qual é comercializado em diversos setores industriais. Usualmente, a reação é catalisada com a finalidade de aumentar sua velocidade e rendimento, sendo os catalisadores empregados, álcalis, ácidos ou enzimas, de acordo com as características da matéria-prima (MA e HANNA, 1999). Com relação ao álcool, o etanol apresenta-se como o substrato alcoólico mais adequado para produção de biodiesel no contexto brasileiro, uma vez que, o país possui autossuficiência em sua produção e este é totalmente renovável, sendo usualmente obtido da fermentação da cana de açúcar.

A metodologia comercial de obtenção de biodiesel utiliza frequentemente catalisadores alcalinos para a transesterificação de óleos ou gorduras. Entretanto, esta metodologia requer alto gasto energético, apresenta dificuldade na recuperação do catalisador e do glicerol e alta poluição ambiental devido ao efluente que gera, o qual deve passar por etapas de separação, purificação e tratamento, tornando o processo oneroso e impulsionando a pesquisa na busca de técnicas alternativas (FJERBAEK; CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009).

A tecnologia enzimática é uma das ferramentas mais promissoras para síntese de compostos de alto valor agregado. Dentre as principais enzimas utilizadas em biocatálise destacam-se as lipases, enzimas de atuação predominantemente interfacial, que apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com baixo teor de água. Industrialmente, a maior aplicabilidade das lipases ocorre em reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa classe de enzima incluem fatos relacionados à sua alta estabilidade em solventes orgânicos, além de não requerer a presença de cofatores, possuir larga seletividade pelo substrato e alta enantiosseletividade (CASTRO; MENDES e SANTOS, 2004).

Atualmente, catalisadores enzimáticos imobilizados estão sendo utilizados nos processos de transesterificação, como alternativa aos catalisadores químicos, pois, apesar de possuírem alto custo, apresentam vantagens que podem compensar o seu emprego, como: não há formação de efluentes, permitindo facilidade na separação e na recuperação do produto, possibilidade de reuso do catalisador,

reações com velocidades e taxas de conversões maiores e, portanto, menor gasto energético (FJERBAEK; CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009).

Além do alto custo, outro inconveniente do uso de catalisadores imobilizados é a limitação na transferência de massa, uma vez que, os suportes utilizados para imobilizar as enzimas podem dificultar o acesso dos substratos ao seu sítio catalítico. No entanto, esse inconveniente, geralmente, é minimizado quando se emprega agitação no sistema, uma vez que esta melhora a solubilidade ou até mesmo a emulsificação dos substratos e aumenta a energia cinética das moléculas, o que facilita a colisão das mesmas com orientação apropriada e, portanto, formação de complexos enzima-substrato (FJERBAEK; CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009).

Atualmente, os sistemas de ultrassom surgem como alternativa ao método convencional de agitação nos meios reacionais, apresentando-se como tecnologia ambientalmente correta, devido ao menor gasto energético que empregam no sistema. Essa afirmação é decorrente do princípio de funcionamento do ultrassom, o qual está baseado no fenômeno das cavitações, ou seja, formação de bolhas em um meio líquido com crescimento por penetração de gás dissolvido até um tamanho crítico em que ocorre a implosão das mesmas. A implosão das bolhas de gás tem como consequência o aumento da pressão, da temperatura e da agitação no microambiente do sistema, permitindo que as reações ocorram com menores tempos, menores temperaturas e pressão ambiente (CINTAS e LOUIS-LUCHE, 1999).

A produção de biodiesel com óleos de baixo valor comercial e provenientes de regiões com carências econômicas, juntamente com as características descritas sobre os equipamentos de ultrassom e a possibilidade de reuso de catalisadores enzimáticos imobilizados é que justificam a importância de trabalhos como este que buscam através de uma nova tecnologia aliar desenvolvimento social e tecnológico com sustentabilidade.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar o potencial de produção de biodiesel enzimático, em sistema livre de solvente e banho de ultrassom, do óleo do fruto de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o óleo bruto do fruto de macaúba através da determinação do índice de acidez, do índice de peróxido, do teor de água e da porcentagem de mono-, di- e triacilglicerols (Mag, Dag e Tag, respectivamente) nas amostras;
- Verificar o teor de umidade das amostras por Karl Fischer, a fim de analisá-las por cromatografia gasosa;
- Conhecer o comportamento do sistema proposto a partir de condições otimizadas para a produção de biodiesel do óleo de soja em banho de ultrassom, segundo metodologia de Popiolski (2011) e através de um planejamento de experimentos;
- Determinar as condições ideais para produção de biodiesel enzimático a partir do óleo do fruto da macaúba;
- Avaliar o reuso da lipase comercial imobilizada Novozym 435 no sistema proposto e a influência do ultrassom neste processo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIODIESEL

3.1.1 Definição

Biodiesel é um combustível alternativo aos combustíveis fósseis para utilização em motores de ignição por compressão. Quimicamente o biodiesel é formado por uma mistura de monoalquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, os quais são originados através da esterificação ou transesterificação dos ácidos graxos de triglicerídeos provenientes de um óleo vegetal ou de uma gordura animal (MEHER; SAIGAR e NAIK, 2004).

As estruturas moleculares dos ésteres, que constituem o biodiesel, podem variar tanto no tamanho da cadeia carbônica, quanto na quantidade e posição de insaturações ou até mesmo devido a presença de grupamentos nas cadeias. Dessa forma, a qualidade do biodiesel pode sofrer alterações conforme as estruturas moleculares dos ésteres ou devido a presença de contaminantes oriundos da matéria-prima, do processo de produção ou formados durante a estocagem (LÔBO; FERREIRA e CRUZ, 2009).

3.1.2 Histórico

Historicamente, o biodiesel é utilizado desde 1898, quando Rudolph Diesel, na Exibição Mundial em Paris, demonstrou pela primeira vez seu motor de ignição por compressão, tendo como combustível o óleo de amendoim, o qual seria o biodiesel original. De acordo com Diesel, o uso de óleos vegetais nas colônias tropicais européias tinha como objetivo torná-las autossuficientes em aplicações fundamentais como a geração de energia. Dentre os óleos, comumente citados nesta época como fonte de combustível diesel, destacavam-se os óleos de palma, possivelmente devido ao clima da região favorecer o plantio destas culturas. O uso de óleos vegetais como combustível intensificou-se durante a segunda guerra

mundial, quando estes foram utilizados de forma emergencial, para abastecimento de frotas móveis por diversos países como Argentina, Brasil, China e Índia (KNOTHE, 2006).

No entanto, entre 1930 e 1940 o uso de bicomcombustíveis começa a declinar devido aos baixos preços do barril de petróleo, tornando a produção e comércio de biodiesel economicamente inviável. No final dos anos 70 e início dos anos 80, a OPEP (Organização dos Países Exportadores de Petróleo) reduziu o fornecimento e incrementou os preços do barril de petróleo, demonstrando os primeiros sinais da crise energética do setor de combustíveis fósseis (AMORIN, 2012).

Devido às oscilações no preço dos derivados do petróleo e as perspectivas de escassez destes produtos nos Estados Unidos, durante a segunda guerra mundial, iniciam-se projetos sobre o uso de misturas binárias (bicomcombustíveis) na Universidade Estadual de Ohio, nos Estados Unidos da América, onde investigou-se o uso do óleo do caroço de algodão, do óleo de milho e a mistura destes com o óleo diesel convencional. Em 1998 nos Estados Unidos, torna-se lei o uso de biodiesel, puro ou em misturas com o diesel de petróleo (KNOTHE, 2006).

No Brasil o uso energético de óleos vegetais foi proposto em 1975, originando o Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos (Pró-Óleo). Seu objetivo era gerar excedentes de óleo vegetal que tornassem seus custos de produção competitivos com os do petróleo. Previa-se uma mistura de 30% de óleo vegetal ao óleo diesel, com perspectivas de sua substituição integral em longo prazo. Nesta década, o biodiesel destacou o papel do Brasil como referência mundial no uso de fontes renováveis. Essa posição foi conquistada com o início da utilização do álcool em veículos automotivos, sendo o Proálcool o maior programa de substituição de combustíveis fósseis no mercado automotivo mundial. O Brasil foi pioneiro no desenvolvimento de tecnologias para produção de biodiesel, tendo registrado em 1980 a patente do pesquisador Expedito Parente (MME, 2004).

Entre os anos de 2000 e 2002, devido aos preços mais elevados e maior carga tributária sobre o combustível fóssil, o álcool recuperou atratividade no mercado brasileiro, levando a indústria automotiva a investir em um novo padrão tecnológico, o carro bicomcombustível (álcool/gasolina) também denominado pela expressão norte-americana *flex fuel* (OLIVEIRA e RAMALHO, 2006). No ano de 2004, o Governo Federal lançou o Programa Nacional de Produção e Uso do

Biodiesel, com o objetivo de implementar de forma sustentável sua produção e uso, promovendo a inclusão social, o desenvolvimento regional e contribuindo para a economia e a melhoria das condições do meio ambiente (MATTIUIZI et al. 2012).

Em janeiro de 2005, foi publicada a Lei Federal 11.097, também chamada de Lei do Biodiesel, a qual regulamentou a introdução do biodiesel na Matriz Energética Brasileira (BRASIL, 2005) e estabeleceu percentuais mínimos de mistura do biodiesel ao diesel de petróleo e o monitoramento da inserção do combustível no mercado. De acordo com a referida lei, entre 2005 e 2007, o B2 (2% de adição do biodiesel ao óleo diesel comercializado) seria autorizado, já de 2008 até 2012 seria obrigatório e em 2013, o B5 tornar-se-ia obrigatório. No entanto, a indústria do biodiesel respondeu às perspectivas criadas pela nova demanda do mercado brasileiro e aumentou sua capacidade industrial instalada, assim como, sua produção, incentivando o governo a antecipar a implementação da obrigatoriedade das misturas B3, B4 e B5. Assim, em julho de 2008 entrou em vigor a obrigatoriedade do B3. Após um ano de B3, em julho de 2009, foi antecipada a mistura B4 e em 2010 já entrou em vigor a mistura B5 (FGV PROJETOS e UBRABIO, 2010).

Em função desta crescente demanda entre 2005 e 2011 houve um aumento significativo no volume de biodiesel produzido no país, o qual passou de 736 m³ em 2005 para 2,39 milhões m³ em 2010, tornando o Brasil o segundo maior produtor mundial de biodiesel (PADULA et al. 2012). A Alemanha é o país com liderança mundial em consumo e produção de biodiesel, sendo responsável por 42% da produção mundial (BIODIESEL BR, 2010). Atualmente, o Brasil tem capacidade instalada de produção de biodiesel de, aproximadamente, 5,1 milhões de m³, a qual é muito próxima à demanda projetada para um possível B10 em 2014 (FGV PROJETOS e UBRABIO, 2010).

A criação do Selo de Combustível Social ou Selo Verde, concedido pelo Ministério de Desenvolvimento Agrário, foi mais uma conquista para a consolidação da cadeia produtiva brasileira de biodiesel. Este selo estabelece as condições para os produtores industriais de biodiesel obterem benefícios tributários e financiamentos, sendo que, a matéria-prima deve ser adquirida de agricultores familiares, além de estabelecer contrato com especificação de renda, prazo, garantir assistência e capacitação técnica (MME, 2004).

Atendendo as diretrizes de sustentabilidade ambiental, sociais e econômicas definidas pelo Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, diversos estados brasileiros estão regulamentando leis para incentivar a produção em larga escala deste combustível, tanto em função da demanda crescente por energias renováveis quanto para desfrutarem do poder econômico que as espécies nativas podem trazer as suas comunidades. Foi neste sentido que o governo de Minas Gerais regulamentou a Lei 19.485 em 2011, chamada de Pró-Macaúba, a qual instituiu a política estadual de incentivo ao cultivo, à extração, à comercialização, ao consumo e à transformação da macaúba e das demais palmeiras oleaginosas da região (CARVALHO, 2012).

3.1.3 Importância e justificativa

Ao longo do século 20, os combustíveis derivados de petróleo permaneceram baratos e abundantes. Com a descoberta de novos poços de petróleo em todo o mundo, criou-se a perspectiva de que este combustível seria uma fonte de energia barata, facilmente disponível e suficiente para atender a demanda. A invenção do automóvel ainda neste século aumentou a mobilidade social e a indústria progrediu para atender as necessidades de uma população de crescimento incessante e de transporte movido a diesel. O setor da agricultura também sofreu grandes mudanças nas técnicas de cultivo, plantio, manejo de pesticidas e conservação do solo, tornando a agricultura altamente competitiva e rentável (HOWELL e JOBE, 2006).

Em contrapartida aos crescimentos industrial e populacional e a modernização das sociedades, dois agravantes começaram a surgir sendo estes a poluição do ar, principalmente, nos grandes centros urbanos (MATTIUZI et al. 2012) e a escassez dos combustíveis fósseis, sendo que, de acordo com a Agência de Energia Internacional (IEA) (2010) as reservas mundiais de petróleo encontram-se, atualmente, no nível mais baixo em 15 anos.

No Brasil, entre os anos de 2001 e 2009, a expansão da indústria automobilística, o aumento da renda per capita e os incentivos governamentais acarretaram em aumento de 76,5% da frota veicular total, o que representa um acréscimo de 24 milhões de automóveis nas estradas brasileiras (MATTIUZI et al.

2012). No caso específico do Rio Grande do Sul até setembro de 2012, houve um ingresso de 242,7 mil novos veículos nas estradas, fato este que levou as refinarias a atuarem com 95% da sua capacidade de produção de combustíveis fósseis (MARIANO, 2012).

Atualmente, o biodiesel é considerado o principal combustível alternativo ao de origem fóssil, pois, foi o único que completou os rigorosos testes da Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA) em estudos que examinaram o impacto de centenas de emissões regulamentadas e não regulamentadas, assim como seus potenciais efeitos à saúde, como apresenta a Tabela 3.1 (MATTIUZI et al. 2012).

Tabela 3 .1 - Dados das emissões médias de escapes medidos pela EPA, com biodiesel, nas proporções de 100% e 20% em comparação com o diesel de petróleo.

Emissões regulamentadas	B100	B20
Material particulado	-47%	-12%
Monóxido de carbono	-48%	-12%
Hidrocarbonetos totais não queimados	67%	-20%
Óxidos de Nitrogênio	+10%	-2 a +2%
Emissões não regulamentadas	B100	B20
Sulfatos	-100%	-20%
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	-80%	-13%
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Nitrados (NHPAs)	-90%	-50%
Hidrocarbonetos com potencial de formação de Ozônio	-50%	-10%

Fonte: National Biodiesel Board (2010) apud Mattiuzi et al. (2012).

De acordo com a Tabela 3.1, o uso de biodiesel acarreta em maiores emissões de óxidos de nitrogênio devido às grandes quantidades de oxigênio nas moléculas deste combustível e à melhora nas condições de combustão. No entanto, como possuem baixo conteúdo de enxofre tecnologias de controle de emissão de NO_x podem ser utilizadas. Em um estudo do Departamento de Energia Norte-Americano foi comprovado que a emissão de dióxido de carbono, desde a produção até o consumo, do biodiesel é 78% menor que a do diesel convencional. Isso ocorre porque o CO_2 é absorvido pela biomassa vegetal durante o processo fotossintético (CORONADO et al. 2009; MATTIUZI et al. 2012).

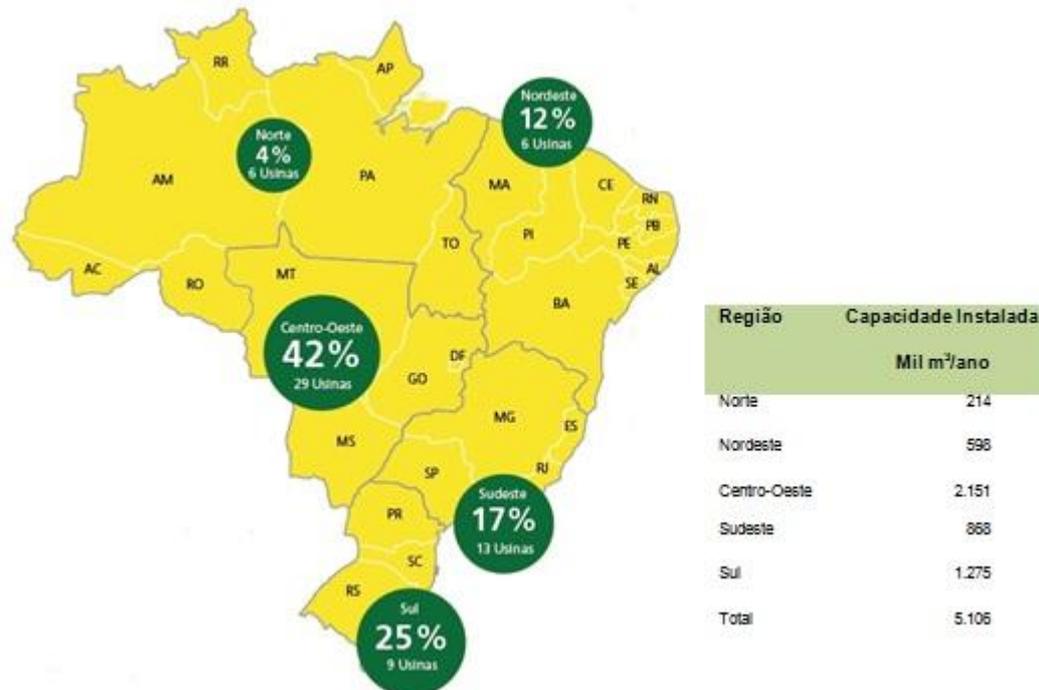
Além da redução na emissão de poluentes a produção e uso do biodiesel traz outras vantagens que justificam sua comercialização, como:

- a mistura do biodiesel ao diesel pode ser usada nos motores já existentes, sem a necessidade de modificações mecânicas para uma proporção de até 30% de biodiesel para 70% de diesel (B30) (HOWELL e JOBE, 2006)
- viabilidade produtiva e econômica, que rompem a hegemonia energética do petróleo, quando o processo tem incentivos governamentais;
- no caso específico do Brasil, em 2008, com o uso do B3, evitou-se a importação de 1,1 bilhão de litros de diesel de petróleo, resultando em uma economia de cerca de R\$ 1,4 bilhão (ROSAS, 2010 apud MATTIUZI et al. 2012);
- benefícios ambientais e sociais, pois, existe uma significativa melhora na qualidade do ar e conseqüentemente, no meio ambiente e na saúde pública. Além disso, a descentralização e o aumento da produção de oleaginosas contribuirão com o desenvolvimento de regiões menos favorecidas e também com a agricultura familiar, gerando emprego e renda para as famílias e possibilitando a comercialização de créditos de carbono (FGV PROJETOS e UBRABIO, 2010).

3.1.4 Usinas produtoras de biodiesel no Brasil

Quanto às usinas produtoras de biodiesel a região centro-oeste é a que possui maior capacidade instalada de produção, 42%; seguida da região sul, 25%; região sudeste, 17%; região nordeste, 12% e região norte 4%, como mostra a Figura 3. 1.

Figura 3.1 - Localização das usinas de produção de biodiesel e capacidade anual de produção das regiões.



Fonte: FGV Projetos e UBRABIO, (2010).

3.1.5 Matéria-prima

O biodiesel pode ser obtido de diversas matérias-primas, incluindo óleos vegetais, gorduras animais, óleos de frituras e matérias graxas de alta carga ácida. Os fatores que determinam quais matérias-primas apresentam maior potencial para serem empregados na produção de biodiesel são basicamente: a geografia, o clima e a economia local (KNOTHE, 2006). No entanto, sabendo que a matéria-prima representa cerca de 70% dos custos totais da produção de biodiesel (BEHZADI e FARID, 2007), geralmente, a fonte mais abundante é a utilizada devido à relação inversa que há entre oferta e custo. Outros fatores como: propriedades do armazenamento, qualidade do combustível a ser gerado e subsídios governamentais é que determinam o potencial de uma determinada matéria-prima ser adotada na produção comercial de biodiesel (FOGLIA e HAAS, 2006).

O óleo vegetal tem sido considerado a matéria-prima mais atrativa devido ao fato de ser uma fonte renovável, trazendo benefícios ambientais e encerrando um potencial de substituição total ou de uma fração dos destilados do petróleo, num

futuro próximo (DEMIRBAS, 2003). No Brasil existem diversas espécies com potencial para serem utilizadas com esta finalidade, tais como: macaúba, dendê, coco, girassol, mamona, soja, amendoim, pinhão-manso, nabo-forrageiro, pequi, buriti, entre outras (FOSCHIERA, 2008; OLIVEIRA e RAMALHO, 2006). No entanto, o óleo de soja representa 78% da matéria-prima de produção de biodiesel no Brasil (FGV PROJETOS e UBRABIO, 2010), sendo responsável por cerca de 81% da produção deste combustível (TEDESCO; ALTHAUS e GIANELLO, 2006). Esta cultura está concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste, as quais, juntas são responsáveis por 88% do biodiesel produzido no país (PADULA et al. 2012).

Embora o Brasil seja o um dos maiores produtores mundiais de soja, novas fontes oleaginosas como, macaúba, mamona, dendê, pinhão manso e girassol precisam ser estudadas para produção de biodiesel devido aos seguintes fatores: estas culturas ao contrário da soja possuem boa aclimatação nas regiões Norte e Nordeste do país (responsáveis por apenas 12% da produção de biodiesel em 2010) e poderão tornar-se aliadas ao desenvolvimento destas regiões, assim como, podem vir a ser uma alternativa de recuperação de biomas como o cerrado (ou savana), o qual ocupa um total 204 milhões de hectares no Brasil, sendo que destes, 90 milhões estão degradados. Além disso, a capacidade produtiva nacional aumenta evitando que a matriz energética fique dependente de uma única fonte de energia renovável, fornecendo maior seguridade quanto à oferta de biodiesel (ROCHA, 2011).

No Brasil e no mundo começam a aparecer iniciativas de produção de biodiesel a partir de diferentes culturas oleaginosas (BASIRON, 2007), sendo que, as arecáceas oleíferas (Dendê, Babaçu, Inajá e Macaúba) existentes no cerrado e na Amazônia constituem, atualmente, cadeias emergentes brasileiras para a produção de biodiesel, pois, apresentam alto conteúdo de óleo nos frutos, como mostra a Tabela 3. 2.

Tabela 3.2 - Coeficientes técnicos de aracáceas oleaginosas, matérias-primas potenciais para a produção de biodiesel.

Atributos das culturas	Dendê	Macaúba	Babaçu	Inajá
Área de ocorrência (10^3 ha)	80	12.000,00	113.000,00	9.000,00
Produtividade média de frutos ($t. ha^{-1}$)	20,00	15,00	2,00	7,40
Conteúdo médio de óleo nos frutos (%)	20	20	4	10
Rendimento médio de óleo ($t. ha^{-1}$)	4,00	3,00	0,08	0,74
Potencial de produção ($10^3 t. ano^{-1}$) de biodiesel, rendimento médio 50%	160,00	18.000,00	680,00	3.330,00
Valor da produção ($R\$*10^6$)	224,00	25.200,00	952,00	4.662,00

Fonte: Lima, 2011.

Dentre as aracáceas citadas na Tabela 3.2 a macaúba destaca-se por apresentar conteúdo médio de óleo nos frutos igual ao dendê (20%) e também por oferecer alto rendimento de óleo nos frutos. Esta aracéca mostra-se resistente à seca, produzindo mais de 10 litros de biodiesel por planta ao ano, o que corresponde nas condições de ocorrência natural de 100 plantas por hectare, a uma produção de 1000 litros por hectare (LIMA, 2011).

O potencial de produção de biodiesel de macaúba foi descoberto ainda na década de 70 em decorrência da crise do petróleo, no entanto, na atualidade um dos principais usos do óleo do fruto e da polpa da macaúba é para a fabricação de sabão de coco (ROCHA, 2011).

Óleos e gorduras são lipídeos de composição triglicéridica predominante, geralmente 95%. A ocorrência de monoglicéridos, diglicéridos e de ácidos graxos livres nos óleos brutos, em geral, é pequena, o que é altamente desejável (REGITANO-D'ARCE, 2006). Os lipídeos de interesse na indústria da olequímica visando a produção de biodiesel são os triglicéridos. Nesta molécula, os grupamentos ésteres são formados entre a carboxila do ácido graxo e a hidroxila do glicerol, sendo este um dos pontos de reatividade na molécula além das duplas ligações das cadeias hidrocarbonadas dos ácidos graxos (REGITANO-D'ARCE, 2006).

3.2. QUALIDADE DOS GRÃOS E DO ÓLEO VEGETAL DURANTE O ARMAZENAMENTO

Durante o armazenamento dos grãos, oscilações no teor de umidade e temperatura podem desencadear reações químicas indesejáveis, como a hidrólise parcial dos triglicerídeos, catalisada por lipases e reações oxidativas de ordem enzimática ou não. Essas reações reduzem a qualidade do óleo a ser extraído, o qual apresentará monoglicerídeos, diglicerídeos e ácidos graxos livres ou oxidados, os chamados peróxidos em quantidades apreciáveis. Além disso, a contaminação do grão por fungos pode levar a inutilização dos subprodutos (ricos em proteínas e carboidratos), originados após a extração do óleo (REGITANO-D'ARCE, 2006).

De acordo com Regitano-D'arce (2006), um dos indicativos de dano a matéria-prima ou armazenamento inadequado, ocorre quando o óleo vegetal apresenta porcentagens baixas de triglicerídeos, pois, óleos de alta qualidade, como o de soja, apresentam entre 95-97% de triglicerídeos no óleo bruto e um mínimo de 99% desta fração lipídica no óleo refinado. Segundo Leung, Wu e Leung (2010), a perda de qualidade do óleo, ou seja, a perda de triglicerídeos, tem como consequência baixas taxas de conversão em biodiesel. Isso ocorre porque os mono e diglicerídeos têm a propriedade de formar misturas devido ao grupamento OH que fica exposto (REGITANO-D'ARCE, 2006).

Entre os fatores que aumentam a suscetibilidade à oxidação dos óleos pode-se citar a composição dos ácidos graxos, sendo que, quanto mais ácido graxo poliinsaturado contém um óleo mais suscetível à oxidação; a presença de oxigênio; temperatura e luz, podem criar condições para a formação de radicais livres. A estabilidade oxidativa dos óleos e gorduras pode ser determinada por diversas técnicas analíticas, sendo usualmente empregadas as seguintes: termogravimetria, índice de acidez, índice de peróxido, espectrofotometria na região ultravioleta, valor de TBA, valor de p-anisidina, valor TOTOX e compostos apolares (REGITANO-D'ARCE, 2006).

3.3 MACAÚBA

3.3.1 Características gerais

- Palmeira

De acordo com Lorenzi et al. (2004), o gênero *Acrocomia*, possui três espécies – *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart., *Acrocomia intumescens* Drude e *Acrocomia totai* Mart. – sendo a espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. a de maior ocorrência no Brasil.

Popularmente, a espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. é conhecida como macaúba, mas conforme a região do Brasil outras denominações populares podem ser encontradas como: macaúva, bocaiúva, macaíba, mucaja, mira, macacaúba, macajuba, macaibeira, mucaia, mucajuba, chiclete baiano, coco-de-espinho, coco-de-catarro e coco-baboso. Outras sinônimas para denominar a espécie também são usadas como: *A. Sclerocarpa* Mart. (LORENZI et al. 2004).

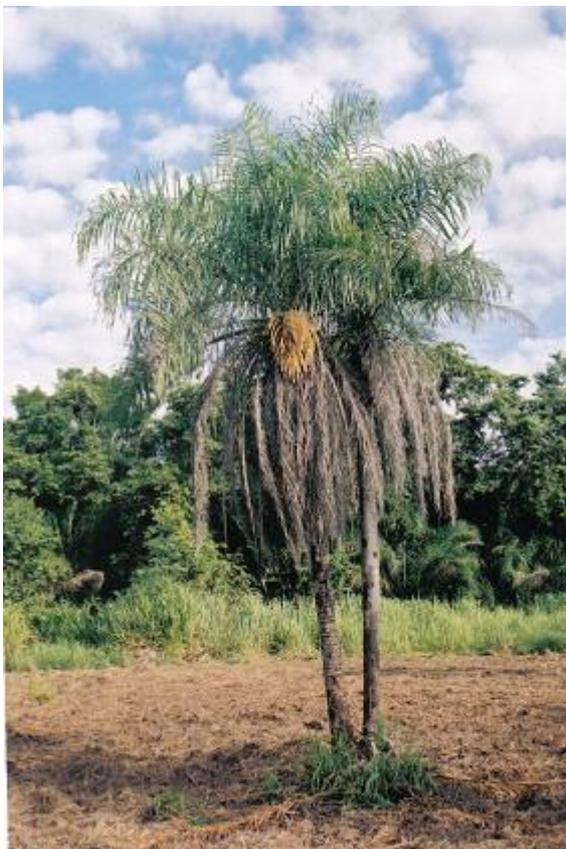
Acrocomia aculeata habita áreas abertas e com alta incidência solar, adapta-se a solos arenosos e com baixo índice hídrico, porém, desenvolve-se melhor em locais onde há solos férteis (GRAY, 2005; MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2005). Em estudo realizado por Da Motta et al. (2002), para relacionar a ocorrência da Macaúba no Estado de Minas Gerais, a atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais, verificou-se que a ocorrência da palmeira acompanha áreas de solos com maior fertilidade, demonstrando que a planta é também indicadora de terrenos férteis.

Esta palmeira apresenta caule cilíndrico com altura entre 10 e 15 metros e diâmetro de 20 a 30 cm, sendo coberto por bases de folhas associadas a espinhos. A espécie *Acrocomia aculeata* apresenta aspecto plumoso na copa devido à ordenação em diferentes planos das folhas pinadas. Suas inflorescências possuem coloração amarela, como mostra a Figura 3.2 (LORENZI et al. 2004).

Estudos recentes do ProPalma indicam que após 3 anos de plantio já ocorre o florescimento das macubeiras (MOTOIKE, 2012). A produtividade da palmeira se estende além dos 50 anos, no entanto, em plantios comerciais o tempo de vida útil das palmeiras é de 20 a 25 anos, pois, após este período a produtividade cai e a

palmeira atinge um tamanho incompatível com a logística da colheita, a qual é realizada manualmente (CASTRO, 2008).

Figura 3. 2 - Palmeira *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.



Fonte: Lorenzi (2006).

- Distribuição geográfica

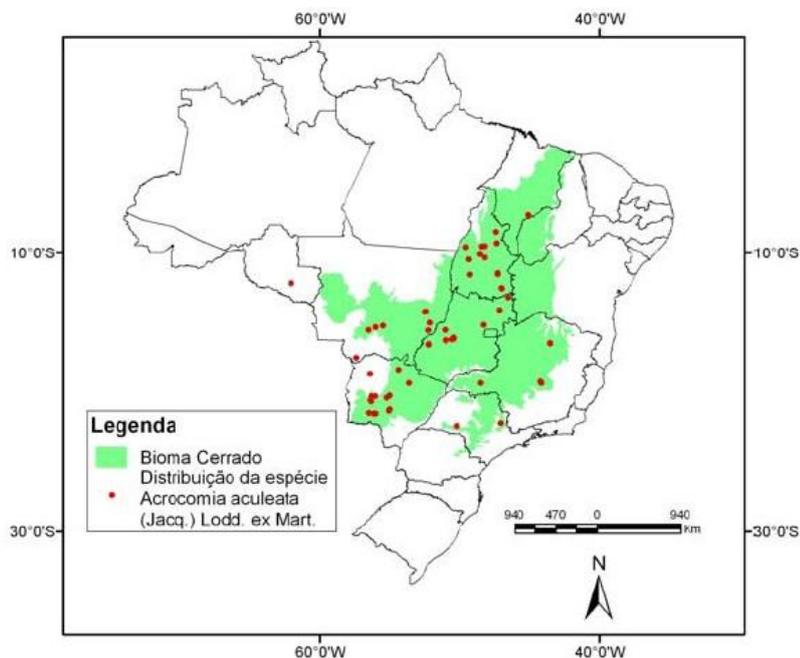
Esta palmeira tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todo o Trópico Americano, do México a Argentina, Bolívia, Paraguai e Antilhas, exceto Equador e Peru. Preferencialmente, em regiões com estação chuvosa bem definida e de baixas altitudes. Sua área de distribuição tem sido fortemente influenciada pelas atividades humanas. Há registros de sua ocorrência nos Andes Colombianos cuja altitude é de 1200 m, na Costa Rica, por exemplo, foi introduzida pelos índios na época pré-colombiana, e no México e na América Central pelos maias (ARBOLES, 2005 apud

LORENZI, 2006; MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2005; HENDERSON; GALEANO e BERNAL, 1995).

No Brasil, a macaúba é considerada a palmeira de maior dispersão, sendo que, seu habitat estende-se da região do Pará até São Paulo, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul, principalmente, em áreas de vegetação aberta, como cerrado, mata semidecídua e florestas conturbadas (LORENZI et al. 2004). Sua maior concentração ocorre nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás (HENDERSON; GALEANO e BERNAL, 1995). No passado, ela ocorria em abundância também em São Paulo, mas as populações naturais foram sistematicamente substituídas pelo cultivo do café (NOVAES, 1952).

No cerrado brasileiro, a espécie *Acrocomia aculeata*, encontra-se distribuída em 53 municípios, como mostra a Figura 3.3.

Figura 3.3 - Distribuição espacial da espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. em 53 municípios do Cerrado, no sentido amplo.



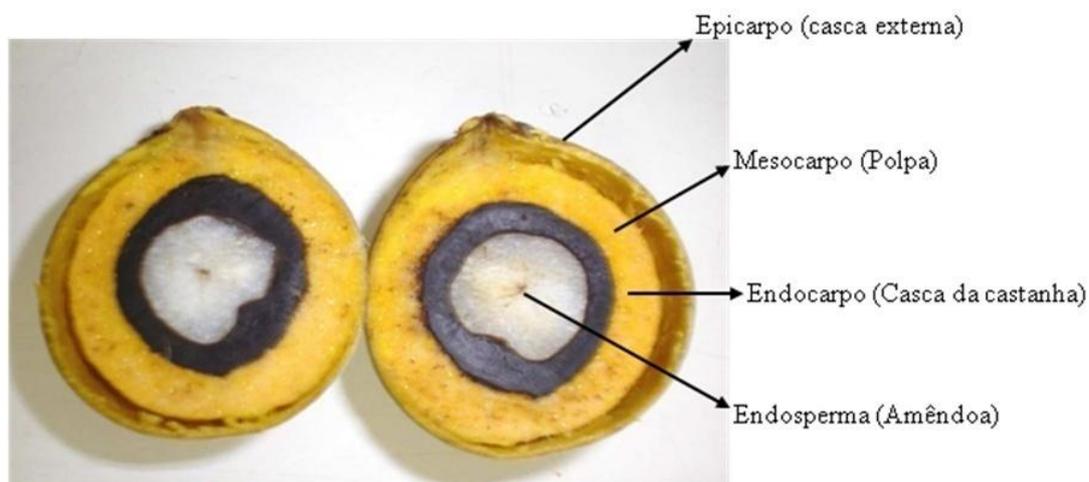
Fonte: Ratter et al. (2003).

- Fruto da macaúba

O fruto da macaúba é esférico ou ligeiramente achatado medindo entre 3,5 a 5,0 cm. A frutificação ocorre durante todo o ano e os frutos amadurecem,

principalmente, entre setembro e janeiro sendo possíveis duas colheitas anuais. Sua disseminação é facilitada pela grande produção e pelo consumo destes por várias espécies de animais (LORENZI et al. 2004; LORENZI, 2006; DA MOTTA et al. 2002). O fruto da macaúba está dividido em 4 partes, como mostra a Figura 3.4.

Figura 3. 4 - Fruto da *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.



Fonte: Castro, 2008.

O mesocarpo ou polpa, constitui cerca de 40% do fruto, possui teor de óleo maior que o da amêndoa, é comestível, fibroso, mucilaginoso e rico em glicerídeos. Do seu beneficiamento extrai-se dois produtos: o óleo da polpa e a torta residual. O óleo da polpa possui alto teor de ácidos graxos saturados, podendo ser utilizado na alimentação humana. Já a torta residual pode ser utilizada para produção de ração animal (BHERING, 2009; CASTRO, 2008). O óleo da polpa é composto por 52,82% de ácido oléico, sendo este o ácido graxo majoritário desta fração de óleo, seguido do ácido palmítico 22,3% (FORTES e BAUGH, 2004; BHERING, 2009), como apresenta a Tabela 3.3. A umidade está desigualmente distribuída no fruto, sendo maior na polpa do que na amêndoa (CASTRO, 2008). Segundo Rocha (2011), a polpa da macaúba, apresenta teor de umidade de 44% (44g/100g de polpa).

A amêndoa ou endosperma produz um óleo que representa em torno de 15% do total de óleo da planta, rico em ácido láurico - 38,89% - e ácido oléico - 22,60% -, como apresenta a Tabela 3.3 (BHERING, 2009; FORTES e BAUGH, 2004). Duarte et al. (2012) e Bhering (2009) também relataram a presença de ácido láurico como

composto majoritário no óleo da amêndoa, representando, respectivamente, 37,9% e 44% dos ácidos graxos.

O alto percentual de ácido láurico nas amêndoas, permite a inclusão da macaúba nas oleaginosas do grupo dos láuricos, valorizados no mercado internacional por sua ampla utilização na indústria de alimentos e cosméticos (CONCEIÇÃO, 2010). Devido a isso, as tortas produzidas a partir do processamento da polpa e da amêndoa são aproveitáveis em rações animais com ótimas características nutricionais e boa aceitação (BHERING, 2009).

Segundo Vieira et al. (2012), as tortas obtidas dos processamentos de grãos oleaginosos são ricos em lignina, celulose e hemicelulose e, portanto, podem vir a ser alternativas de adsorvente de resíduos orgânicos, para a remoção de corantes industriais como os corantes sintéticos azul de metileno e vermelho Congo. Baseado nisso este autor investigou o potencial da torta da macaúba como adsorvente desses corantes a partir de uma solução aquosa e verificou a eficiência do processo, assim como, sua viabilidade econômica.

O epicarpo do fruto possui grande quantidade de ferro, fosfato e cálcio, podendo, portanto, ser utilizado na produção de novos suplementos alimentares, substituindo outros de preços elevados. Já o endocarpo ou casca da castanha, pode ser utilizado para a produção de carvão (CASTRO, 2008). Os subprodutos obtidos com o processamento do fruto da macaúba, podem ser visualizados na Figura 3.5.

Figura 3. 5 - Torta da amêndoa (a), Torta da polpa (b) e carvão (c).



Fonte: Rural sementes, adaptado (2012).

- Ácidos graxos constituintes da amêndoa e da polpa do fruto da macaúba

Fortes e Baugh (2004) determinaram a composição de ácidos graxos presentes no óleo extraído da amêndoa e da polpa do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.), as porcentagens relativas constam na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Ácidos graxos constituintes do óleo do fruto da macaúba.

Ácidos graxos (metil ésteres)	Porcentagem de AG (%)	
	Amêndoa	Polpa
Ácido caprílico	2,10	Traços
Ácido cáprico	3,72	Traços
Ácido láurico	38,89	2,93
Ácido mirístico	11,00	1,88
Ácido palmítico	17,35	22,30
Ácido palmitoléico	-	5,28
Ácido margárico	-	4,34
Ácido esteárico	4,34	5,75
Ácido oléico	22,60	52,82
Ácido linoléico	-	4,69

Fonte: Fortes e Baugh, 2004.

- Potencial de produção em óleo da macaúba

O potencial de produção da macaúba está diretamente associado a densidade de palmeiras por hectare, a quantidade de cachos e ao número de frutos produzidos (Tabela 3.4). De acordo com pesquisa realizada pela CETEC (Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais), a palmeira pode ter 4 a 5 cachos, os quais produzem em média 400 a 500 frutos (RURAL SEMENTES, 2012), o que também é descrito por Rodrigues (2007), sendo a média de produção de 460 frutos por cacho. Quanto à produção de óleo em volume, segundo Da Motta et al. (2002), a macaúba apresenta um potencial de produção de 10 litros por planta. Já para a Embrapa, cada palmeira de macaúba tem potencial de produção de 7,5 litros/óleo por planta (Rural Sementes, 2012).

Tabela 3. 4 - Produtividade agrícola da macaúba.

Palmeiras (hectare)	Rendimento (L/ha)	Referência
100	1000	Da Motta et al. (2002)
200	1500	Embrapa, (Rural Sementes, 2012)
300	3000	Da Motta et al. (2002)
400	3000	Embrapa (Rural Sementes, 2012)
500	3750	Embrapa (Rural Sementes, 2012)
1000	7500	Embrapa (Rural Sementes, 2012)

As divergências apresentadas quanto à capacidade de produção em óleo da palmeira, são decorrentes da quantidade de palmeira por hectare, do número de cachos por palmeira, do número de frutos por cacho e também da época de colheita dos frutos. Estas diferenças mostram a necessidade de estudos genéticos que permitam a produção de palmeiras com um padrão de produção de frutos e, portanto, de óleo.

Duarte et al. (2012), acompanhando o amadurecimento dos frutos da macaúba (polpa + amêndoa) durante os meses de novembro a fevereiro, observou que neste período há um acúmulo de 60% de óleo no fruto, indicando que a colheita antes do amadurecimento ideal, implica em redução do rendimento em óleo. De acordo com os autores, o maior acúmulo de óleo ocorre na polpa, onde o teor deste variou de 15 a 30%, significando um aumento do rendimento de óleo da polpa em relação ao peso do fruto de 8 a 14%. Já a amêndoa não apresentou variação do rendimento de óleo em relação ao peso do fruto, o qual ficou em torno de 1,8% no trimestre. De acordo com dados da CETEC (Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais), o teor de óleo no fruto fresco é de 22,9% enquanto no fruto seco o percentual de óleo chega a 34,3%. Dessa forma, a definição do tempo ideal de colheita é fundamental para que o fruto tenha rendimentos máximos em óleo e que este seja de boa qualidade (RURAL SEMENTES, 2012).

Os dados apresentados por Duarte et al. (2012), possuem grande semelhança aos apresentados por Ahmad (2007), o qual afirma que o rendimento médio de óleo nos frutos de macaúba pode chegar a 20% (18% óleo de polpa e 2% óleo de amêndoa), percentual igual ao dos frutos de dendê, maior produtor de óleo

atualmente. Assim, o óleo extraído da polpa apresenta-se como maior potencial para produção de biodiesel (BHERINGER, 2009; LIMA, 2011).

A macaúba pode vir a atender a busca por novos patamares de rendimento em óleo das espécies vegetais, passando do nível atual de 500 a 700 kg de óleo/ha obtido com as culturas tradicionais, em que se tem domínio tecnológico, como soja e mamona, para aproximadamente 5.000 kg de óleo/ha, proporcionando competitividade crescente ao biodiesel e promovendo a segurança energética nacional (BHERING, 2009). Além disso, a macaúba é adaptada a ambientes mais secos do que o dendê pode suportar, sendo esta característica importante frente a cenários futuros de mudanças climáticas como o aumento da temperatura terrestre e, conseqüentemente, aumento da deficiência hídrica. Dessa forma, a macaúba apresenta-se como uma das matérias-primas brasileiras com alto potencial para a produção de biodiesel (CONCEIÇÃO, 2010).

- Qualidade dos frutos da macaúba durante o armazenamento

Em cooperativas de pequenas comunidades um dos principais usos do óleo do fruto da macaúba, baseia-se ainda somente na produção de sabão e, portanto, as técnicas de colheita e armazenamento não requerem à manutenção e controle de algumas propriedades físico-químicas e microbiológicas dos frutos, como apresenta a Figura 3.6.

Figura 3.6 - Colheita pós-maturação (a) e armazenamento do fruto (b).



Fonte: Rural sementes, adaptado (2012).

No entanto, com a descoberta de que o óleo do fruto da macaúba pode vir a ser uma alternativa viável de produção de biodiesel, novas definições visando a manutenção da qualidade da matéria-prima são necessárias, como: técnicas de colheita e rápido processamento do fruto visando, através de tratamento térmico, inativar lipases, como ocorre atualmente com o coco de dendê; época ideal de colheita; armazenamento adequado dos frutos, com controle de temperatura, controle de insetos e de contaminação por fungos (LIMA, 2011; REGITANO-D'ARCE, 2006).

- Importância da macaúba

Além de sua importância na cadeia de produção de biodiesel, o processamento da macaúba destaca-se por não gerar resíduos que exijam tratamento, pois, seus subprodutos (óleo, torta e carvão) podem ser utilizados pelas indústrias de alimentos e de cosméticos, sendo que, a comercialização destes pode vir a gerar grande renda anual (LIMA, 2011).

A macaúba, atualmente, é considerada como uma das matérias-primas renováveis mais promissoras dentro da cadeia de produção de biodiesel brasileira devido às seguintes peculiaridades:

- frutificação durante todo o ano com amadurecimento dos frutos entre setembro e janeiro (RODRIGUES, 2007);
- adaptação a solos arenosos e com baixo teor de água (RODRIGUES, 2007);
- possibilidade de duas colheitas anuais (RURAL SEMENTES, 2012);
- resistência a secas e a queimadas, devido a presença de espinhos no tronco (LIMA, 2011);
- os frutos podem ser coletados ainda verdes, tendo sua maturação completa fora do pé, como ocorre, atualmente, com a banana, o que pode ser uma das alternativas para estabilizar a acidez do óleo da macaúba (MOTOIKE, 2012);
- redução da erosão do solo (CARVALHO, 2012);
- recuperação de áreas degradadas (CARVALHO, 2012);

- possibilidade de cultivos consorciados e em pequenas áreas, o que permite a participação da agricultura familiar (CARVALHO, 2012);
- demanda de mão de obra ao longo de todo ano, gerando emprego nas comunidades locais (CARVALHO, 2012);
- pode ser introduzida nas áreas de pastagens sem concorrer com as terras destinadas à produção de alimentos (CARVALHO, 2012);
- alto rendimento em óleo, podendo resolver problemas de escassez de combustíveis (LIMA, 2011);
- ganhos ambientais, as plantações de macaúba em consórcio com outras espécies nativas podem auxiliar a manutenção do equilíbrio ecológico de biomas como o cerrado (LIMA, 2011);
- ganhos sociais, com a inserção e a qualificação de agricultores das comunidades locais nas diversas etapas de manejo das areceas, agregando renda as suas famílias (LIMA, 2011);
- ganhos econômicos, com a comercialização dos subprodutos gerados no processamento do fruto da macaúba (LIMA, 2011).

Nas regiões onde a macaúba é nativa ela poderá ser utilizada na recomposição das áreas de reserva legal juntamente com outras espécies alimentícias, principalmente frutíferas tropicais (KAGEYAMA, 2010). Neste tipo de produção consorciada, podem ser produzidos alimentos (feijão, milho) durante a implantação da cultura e após quatro anos, quando as palmeiras atingirem a altura de 7 a 10 metros e estiverem em produção normal de frutos, pode-se plantar capim para criar gado. É um sistema integrado com bom rendimento, pois o gado se alimenta do capim e dos frutos que, eventualmente, caem das árvores e o esterco produzido pelos animais fertiliza as palmeiras (BHERING, 2009). Esse sistema permite, juntamente com a preservação da biodiversidade e dos recursos naturais, a geração de renda para os produtores, o que mostra a possibilidade de desenvolvimento sustentável nestas regiões (KAGEYAMA, 2010).

A produção de biodiesel a partir da macaúba segue as linhas de desenvolvimento tecnológico a médio prazo com a exigência ainda de diversos estudos, principalmente, estudos genéticos, visando a produção de uma variabilidade comercial da palmeira (CONCEIÇÃO, 2010). Além disso, pesquisas

sobre plantio, adubação, espaçamento entre plantas e instalação de usinas de extração próximas ao plantio, são necessárias (BHERING, 2009).

3.4 PRODUÇÃO DE BIODIESEL

3.4.1 Aspectos técnicos

A viscosidade cinemática dos óleos vegetais é cerca de uma ordem de magnitude superior à de combustíveis convencionais derivados do petróleo. Altas viscosidades causam a má atomização do combustível na câmara do motor acarretando sérios problemas operacionais, como a ocorrência de depósitos em suas partes internas. Assim, o uso de óleos vegetais como combustível passa pela necessidade de reduzir sua viscosidade (KNOTHE, 2006).

Atualmente, quatro métodos têm sido investigados para reduzir a alta viscosidade dos óleos vegetais e permitir o seu uso em motores diesel sem acarretar problemas operacionais: uso de misturas binárias com petrodiesel, pirólise, microemulsificação (ou mistura co-solvente) e transesterificação. Dentre todos estes métodos, a transesterificação é comumente empregada (KNOTHE e GERPEN, 2006).

3.4.2 Processos de produção de biodiesel

- Transesterificação

A transesterificação ou alcoólise é o método mais usual de transformação de óleos vegetais ou gorduras animais em biodiesel (DEMIRBAS, 2002). Os óleos vegetais quando modificados em ésteres de ácidos graxos por reações de transesterificação adquirem características físico-químicas muito próximas ao diesel convencional. Entre as alterações que ocorrem no óleo vegetal após a referida reação pode-se citar a redução da viscosidade e da densidade do óleo tornando-o

próprio para uso em motores a diesel, uma vez que, enquadram-se nas especificações técnicas. Há também redução no ponto de fulgor, no ponto de névoa e nos resíduos de carbono, sendo os valores deste último menores que os do diesel de petróleo. A estrutura dos ácidos graxos é mantida, no entanto, o peso molecular dos produtos é menor e o índice de cetano é maior quando comparado ao petrodiesel, o que é altamente desejável, uma vez que, tem-se uma melhora na combustão (MARZULLO, 2007).

Para que a reação de transesterificação ocorra, em taxas aceitáveis, é necessário a presença de dois substratos, sendo um o óleo vegetal ou gordura animal e o outro um álcool, geralmente, metanol ou etanol. Na presença de um catalisador ou, na ausência deste, de condições supercríticas, esta reação gera como produto ésteres (biodiesel) e como subproduto o glicerol (VELJKOVIC´; AVRAMOVIC´; STAMENKOVIC´, 2012).

A reação de transesterificação é reversível e, portanto, um excesso de álcool em relação ao material lipídico é necessário para deslocar o equilíbrio estequiométrico para a formação de ésteres de ácidos graxos (VELJKOVIC´; AVRAMOVIC´; STAMENKOVIC´, 2012). Assim, para a transesterificação completa de 1 mol de triglicerídeo (composto de três ácidos graxos) tem-se a necessidade de 3 mols de álcool, como mostra a Figura 3. 7.

Figura 3.7 - Esquema geral da reação de transesterificação completa de um triglicerídeo em três ésteres alquílicos de ácidos graxos.



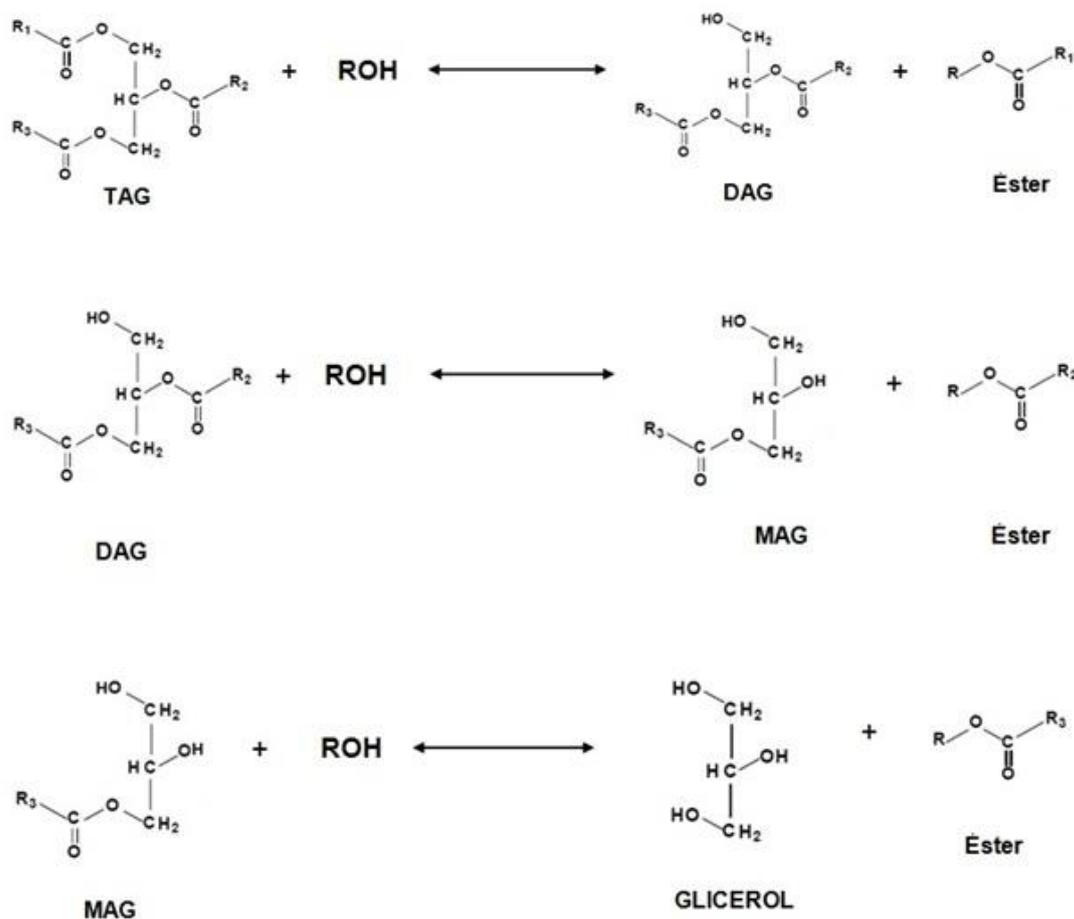
R: geralmente metila (-CH₃) ou etila (-CH₂CH₃)
R₁, R₂, R₃: radicais provenientes dos ácidos graxos que constituíam os triglicerídeos do óleo ou gordura.

Fonte: Rodrigues (2007).

A reação de transesterificação é uma sequência de três reações consecutivas e reversíveis sobre o triacilglicerol, nas quais di- e monoacilgliceróis são formados como intermediários. O primeiro passo é a conversão de um triacilglicérol (Tag) a um diacilglicerol (Dag), seguido pela conversão do diacilglicerol a um monoacilglicerol (Mag) e do monoacilglicerol para glicerol, gerando uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada fase da reação (SRIVASTAVA; PRASAD, 2000), como mostra a Figura 3.8.

A reação de alcoólise catalisada por lipases envolve um mecanismo de dois passos para cada ligação éster da molécula de triglicérido. O primeiro passo é a hidrólise da ligação éster e liberação do radical álcool, seguido por uma esterificação com o segundo substrato. Este tipo de reação, tem o mecanismo já bem definido, demonstrando o comportamento Ping-Pong bi-bi, havendo inibição por excesso de álcool e liberação de um produto entre a adição de dois substratos (BISELLI, KRAGL; WANDREY, 2002; DOSSAT; COMBES; MARTY, 2002; PAIVA; BALCAO; MALCATA, 2000; GOG, et al. 2012).

Figura 3.8 - Esquema geral das três reações de transesterificação sobre um triglicerídeo.



Se a transesterificação não for completa juntamente com o biodiesel haverá uma mistura de álcool, catalisador e tri-, di- e monoglicerídeos, sendo os monoglicerídeos e diglicerídeos considerados impurezas, pois, são responsáveis por elevar o ponto de névoa e de fluidez do biodiesel (MA e HANNA, 1999) interferindo assim na sua qualidade.

- Fatores que afetam a transesterificação

Os fatores que, geralmente, interferem nas reações de transesterificação são: catalisador, razão molar óleo-álcool, matéria-prima e seu grau de refino, temperatura da reação, tempo de reação, presença de umidade e de ácidos graxos livres. Para a

transesterificação proporcionar rendimentos máximos, o conteúdo de ácidos graxos livres do óleo vegetal deve ser inferior a 0,5% e o álcool deve ser livre de umidade, pois, a presença de água no sistema reacional leva a hidrólise dos ácidos graxos ao invés da síntese dos ésteres (GERPEN e KNOTHE, 2006).

- Aplicação de catalisadores na produção de biodiesel

Em geral, existem três tipos de catalisadores utilizados para a produção de biodiesel: básicos, ácidos e enzimas (LEUNG; WU; LEUNG, 2010). A transesterificação por catálise ácida é comumente empregada em matérias-primas com alto índice de acidez, enquanto a transesterificação por catálise básica é empregada em substratos lipídicos de baixa acidez. A transesterificação por catálise enzimática é mais recente, no entanto, vem se destacando como alternativa para produção de biodiesel em função dos benefícios ambientais que gera.

Abaixo uma breve descrição e caracterização sobre o processo de transesterificação realizado a partir dos catalisadores acima mencionados.

- Transesterificação por catálise ácida

Reações de transesterificação catalisadas por ácidos, geralmente ácido sulfúrico, são cerca de 4000 vezes mais lentas do que as reações por catálise alcalina, requerendo, dessa forma, temperaturas elevadas, geralmente, acima de 100°C e mais de 3 horas de reação para obter altos rendimentos em biodiesel (FREEDMAN; PRYDE e MONTS, 1984). Estes catalisadores têm a capacidade de realizar tanto reações de esterificação quanto de transesterificação e não geram sabão como subproduto. Devido às peculiaridades descritas, os catalisadores ácidos, são amplamente empregados em etapas de pré-tratamento de óleos ou gorduras com alto teor de ácidos graxos livres, os quais posteriormente serão transesterificados com catalisadores alcalinos (ZHANG et al. 2003).

- Transesterificação por catálise alcalina

Industrialmente, a transesterificação por catálise alcalina é amplamente empregada, pois, os rendimentos da reação são próximos a 99% com óleos refinados (ANTCZAK et al. 2009) e tem baixo custo porque pode ser realizada com baixas temperaturas e pressão atmosférica (LEUNG; WU e LEUNG, 2010).

Apesar da excelente produtividade global de biodiesel, este tipo de reação é relativamente limitada, pois, apresenta necessidade de purificação e separação em várias etapas do processo de transesterificação. Entre os problemas originados durante a catálise alcalina pode-se citar: dificuldade de recuperação do glicerol; remoção de pigmentos (ANTCZAK et al. 2009); formação de sabão, principalmente, em matérias-primas com alto conteúdo de água e de ácidos graxos livres, exigindo um pré-tratamento da matéria-prima, o qual é comumente realizado com o uso de um catalisador ácido (FJERBAECK; CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009); neutralização do catalisador e desodorização (remoção do odor). A maioria destes tratamentos exige temperaturas elevadas, geralmente, acima de 70°C afim de que os resíduos sejam eliminados e não afetem a qualidade final do biodiesel (ANTCZAK et al. 2009).

Outros inconvenientes da transesterificação alcalina são: necessidade de aplicação de grandes quantidades de álcoois (o excesso molar tem de ser até várias dezenas de vezes maior que a do óleo vegetal) e ter completa remoção da água (ANTCZAK et al. 2009), pois, muitos catalisadores alcalinos são altamente higroscópicos, absorvendo água do ambiente durante o armazenamento, o que pode vir a diminuir o rendimento em ésteres por favorecimento da hidrólise (LEUNG; WU e LEUNG, 2010). A presença da água também reduz a atividade do catalisador, aumenta a viscosidade da reação e provocando a formação de uma emulsão estável, impedindo a separação do glicerol resultante (FREEDMAN; PRYDE e MONTS, 1984). Além disso, a cada tonelada de biodiesel produzido gera-se cerca de 0,2 toneladas de efluentes, tornando necessário o tratamento deste e o reuso da água, o que ocorre com dispendioso consumo energético (SUEHARA et al. 2005).

Nesta perspectiva, catalisadores enzimáticos tornaram-se, recentemente, uma alternativa interessante para a produção de biodiesel em escala industrial, uma vez que, não há formação de sabão e o processo de separação catalisador-

biodiesel-subproduto é relativamente simples (FJERBAECK; CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009), sendo os mesmos, obtidos com maior grau de pureza (NASCIMENTO; NETO e MAZZUCO, 2001).

- Transesterificação por catálise enzimática

Uma das principais funções das enzimas é reduzir a energia de ativação das reações, ou seja, para reagirem, as moléculas precisam colidir com orientação apropriada e esta colisão deve levá-las a adquirir uma quantidade mínima de energia – energia de ativação - que lhes permita atingir um estado reativo, chamado de estado de transição. O processo pelo qual os catalisadores aceleram uma reação química consiste em criar um caminho alternativo para a reação, no qual a energia de ativação requerida é menor. Dessa forma, a principal vantagem no uso de enzimas é o aumento da velocidade das reações, a qual pode ser 10^6 a 10^{12} vezes superior que as reações não catalisadas (TORRES, 2001).

Entre as enzimas empregadas na produção de biodiesel por transesterificação, destacam-se as lipases, pois, apresentam excelente atividade catalítica e estabilidade em meio não aquoso, o que favorece a transesterificação de óleos e gorduras (VILLENEUVE et al. 2000). As reações podem ocorrer sobre diversos materiais lipídicos como: óleos vegetais refinados e brutos, matérias de alta carga ácida, gorduras residuais de fritura, sebo animal, entre outras (ANTCZAK et al. 2009; GERPEN e KNHOTHE, 2006), sendo que as melhores enzimas são capazes de conduzir conversões com rendimentos superiores a 90% (FJERBAECK; CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009).

A transesterificação enzimática para produção de biodiesel pode ser conduzida em sistemas livres de solvente ou na presença de solventes orgânicos. Os solventes orgânicos são utilizados na síntese enzimática de biodiesel com a finalidade de aumentar a taxa de transesterificação através da melhora na solubilidade entre triacilgliceróis (hidrofóbicos) e alcoóis (hidrofílicos). Além disso, os solventes orgânicos podem proteger as enzimas da desnaturação devido aos teores elevados de alcoóis. De acordo com Yu et al. (2010), durante a transesterificação do óleo de soja com metanol, o uso de concentrações crescentes do álcool terc-amílico

como solvente aumentou a solubilidade do metanol na mistura da reação, assim o efeito inibitório do metanol na produção de biodiesel foi eliminado e a lipase Novozym 435 manteve sua atividade catalítica alta, mesmo em concentrações elevadas de álcool. No entanto, devido ao alto risco de inflamabilidade, volatilidade e toxicidade dos solventes orgânicos (ANTCZAK et al. 2009), assim como, a necessidade de recuperação do mesmo no final do processo, a transesterificação enzimática em sistemas livres de solventes tem sido intensivamente investigada (FJERBAECK; CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009).

- Aspectos do substrato alcoólico a serem considerados

Vários alcoóis podem ser utilizados como substrato nos processos de transesterificação enzimática como: metanol, etanol, propanol, isopropanol, 2-propanol, n-butanol, e isobutanol (ANTCZAK et al. 2009). Teoricamente, outro aspecto a ser considerado é o tamanho da cadeia carbônica, pois o aumento desta aumenta também a miscibilidade entre óleos e alcoóis e, portanto, as taxas de reação. No entanto, com o aumento da miscibilidade surge a dificuldade de separação dos ésteres formados (STARAVACHE et al. 2005). Dessa forma, o uso de alcoóis com grandes cadeias carbônicas exigiria etapas de separação que agregariam custos altos ao processo de produção de biodiesel tornando-o economicamente inviável, pois, sabe-se que, atualmente, o principal impasse para a produção deste combustível é o custo.

Nesta perspectiva o metanol e o etanol são usualmente empregados na produção industrial, sendo o metanol amplamente utilizado devido ao seu baixo custo e as suas vantagens físicas e químicas. Ma e Hanna (1999) relataram que o metanol pode reagir com os triglicerídeos rapidamente. No entanto, devido ao seu baixo ponto de ebulição, há risco de explosão associado a vapores de metanol, que são incolores e inodoros, devendo ser assegurada a não exposição a esses produtos químicos durante a produção de biodiesel (LEUNG; WU e LEUNG, 2010). Além dos riscos associados ao uso do metanol, a literatura relata a inibição da lipase Novozym 435 por esse álcool, com perda irreversível de sua atividade catalítica, no entanto, essa inibição pode ser mascarada quando se usam altas concentrações de

enzima, por exemplo, 50% de enzima em relação ao peso do óleo (SHIMADA et al. 1999).

Outro fator importante de ser avaliado na escolha de um álcool é sua origem, pois, um dos principais objetivos da utilização do biodiesel é a redução nas emissões de poluentes, assim como, o uso sustentável dos recursos de tal forma que se possibilite o desenvolvimento sustentável das sociedades. Neste sentido o etanol, produzido no Brasil em larga escala pela fermentação da cana de açúcar, parece ser o substrato alcoólico mais adequado para a produção de biodiesel, pois, o metanol mesmo tendo menor custo é proveniente de fontes fósseis (FJERBAECK; CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009; MEDINA et al. 2009).

- Vantagens e desvantagens

Os processos de transesterificação catalisados por enzimas apresentam como vantagens: a possibilidade de reciclo do catalisador; a baixa produção de efluentes; (FUKUDA; KONDO e NODA, 2001; KAIEDA et al. 1999; KUMARI; SHAH e GUPTA, 2007; MEHER; SAGAR e NAIK, 2006); a possibilidade de esterificar tanto ácidos graxos livres como triglicerídeos em uma única etapa, geração de subprodutos de maior qualidade e em menor quantidade e menor gasto energético (FJERBAECK; CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009).

Entre os principais inconvenientes do uso de catalisadores enzimáticos estão: o custo para uso industrial, nos EUA o custo do catalisador enzimático é de US\$ 1,000/Kg, enquanto o custo do hidróxido de sódio é de US\$ 0,62/Kg (HAAS et al. 2006) e a perda da atividade enzimática dentro de, aproximadamente, 100 dias de operação (ZHANG et al. 2003; FUKUDA; KONDO e NODA, 2001; JAEGER e EGGERT, 2002; MA e HANNA, 1999; MEHER; SAGAR e NAIK, 2006; SHIMADA et al. 1999).

Neste contexto, um dos métodos adotados como forma de diminuir os custos da produção de biodiesel enzimático tem sido a imobilização de enzimas, método este que tem a propriedade de aumentar o tempo de vida da proteína, devido à redução dos danos físicos e químicos a sua estrutura, mantendo assim sua

conformação ótima e atividade catalítica, fato este que possibilita o reciclo da mesma (LEUNG; WU e LEUNG, 2010).

3.5 LIPASES

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) e catalisam tanto reações de hidrólise quanto de síntese de éster, sendo os acilgliceróis seu substrato natural (JAEGER e REETZ, 1998). As lipases são obtidas de plantas, animais e micro-organismos. No entanto, a maioria das preparações comerciais de lipases são de origem microbiana devido a maior termoestabilidade (ANTCZAK et al. 2009), à possibilidade de manipulação genética e ao rápido crescimento dos micro-organismos em meios de cultivo de baixos custos. Além disso, a importância das enzimas microbianas tem sido cada vez maior, dado que não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento como ocorre com enzimas de origem vegetal e animal (HASAN; SHAN e HAMEED, 2006).

Uma grande quantidade de lipases obtidas de fungos filamentosos já foi estudada tanto do ponto de vista bioquímico quanto genético, sendo os melhores micro-organismos produtores os do gênero *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor* (FEVRIER et al. 2001; KIRAM e DIVAKAR, 2001). Grande número de lipases são também produzidas por leveduras, sendo as mais importantes as do gênero *Candida*, bastante utilizadas em processos biotecnológicos (SÁNCHEZ et al. 2000; CARDENAS et al. 2001).

Lipases não requerem cofatores e são regioespecíficas. Apresentam peso molecular entre 20-75 KDa com cerca de 300 resíduos de aminoácidos (CASTRO; MENDES e SANTOS, 2004). Em solução, algumas lipases podem formar agregados, os quais chegam a apresentar peso molecular entre 20.000 e 60.000 dáltons. A atividade ótima, da maioria das lipases, ocorre em temperaturas na faixa de 30 a 40°C. Quanto ao pH, as lipases são ativas em uma ampla faixa, apresentando alta atividade na faixa de pH entre 5 e 9, com um ótimo, frequentemente, situado entre 6 e 8 (MACRAE e HAMMOND, 1985).

As lipases possuem uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos Serina-Histamina-Asparagina ou Serina-Histamina-Glutamina, a qual constitui o sítio ativo da enzima. Quando a enzima está inativa este sítio encontra-se recoberto por uma estrutura polipeptídica de formato helicoidal, a qual atua como uma tampa ou lid, tornando o local inacessível aos solventes e substratos, assim, não há atividade proteolítica da tríade catalítica (YAHIA; ANDERSON e MOO-YOUNG, 1998). A ativação da enzima, então, requer a abertura do lid e consequente exposição da tríade catalítica, o que ocorre quando um substrato liga-se a superfície enzimática, ou seja, na parte externa do lid. A abertura desta estrutura expõe o sítio ativo com uma larga superfície hidrofóbica e confere as lipases afinidade por qualquer substrato hidrofóbico, o que resultará na catálise enzimática (VOLPATO, 2009).

A face interna do lid, ou seja, aquela voltada para o sítio ativo da lipase possui cadeias laterais hidrofóbicas, enquanto sua face externa tem cadeias laterais hidrofílicas (YAHIA; ANDERSON e MOO-YOUNG, 1998). Essa conformação estrutural das lipases confere a elas a capacidade única de agir na interface óleo/água. Assim, a abertura do lid é dependente de uma área interfacial mínima disponível (VILLENEUVE et al. 2000), pois, as lipases não apresentam atividade enquanto seus substratos estão presentes na solução em estado monomérico. Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa o seu limite de solubilidade, ocorre um rápido aumento na atividade da lipase. A razão pela qual uma lipase não hidroliza substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima (a concentração miscelar crítica, CMC), é chamada de “ativação interfacial” (COSTA e AMORIN, 1999).

Dessa forma, o fenômeno da ativação interfacial é frequentemente associado à reorientação da estrutura α -helicoidal que forma o lid. Estudos preliminares de raios-X em lipases de *Candida antarctica* revelaram a existência de um lid muito semelhante a tríade catalítica Serina-Histamina-Asparagina (YAHIA; ANDERSON e MOO-YOUNG, 1998).

Em reações de transesterificação catalisadas por lipases os rendimentos das reações também são dependentes do tamanho da área interfacial, a qual pode ser aumentada com a adição de pequenas alíquotas de água no meio reacional. No entanto, as lipases são hidrolases e em solução aquosa podem favorecer reações de hidrólise quando há um excesso de água no sistema (GOG et al. 2012) ou, com

baixo conteúdo de água, podem favorecer reações de esterificação e de transesterificação (KLIBANOV, 1997). Além disso, o excesso de água pode tornar a enzima mais flexível, causando alterações na sua estrutura conformacional e, conseqüentemente, na sua capacidade catalítica (GOG et al. 2012).

O conteúdo de água ideal do meio reacional deve ser avaliado para cada lipase e em cada processo, uma vez que, estudos como os de Shah e Gupta (2007) revelaram que a adição de 5% de água no processo faz com que o rendimento em ésteres passe de 70% para 98%. Já segundo Yu et al. (2010), a lipase comercial Novozym 435 apresenta atividade catalítica máxima com baixa disponibilidade de água, sendo o conteúdo de água ideal de 0,5%, quando utilizada em reações de transesterificação do óleo de soja com álcool terc-amílico, metanol, ultrassom + vibração de 50 rpm, temperatura de 40°C e tempo de 120 minutos.

3.5.1 Lipases imobilizadas

Enzimas imobilizadas são enzimas quimicamente confinadas ou localizadas em uma região determinada de um espaço com retenção da sua atividade catalítica (JEGANNATHAN et al. 2008). A principal vantagem no uso de enzimas imobilizadas está no fato de que elas podem ser recuperadas por filtragem simples e reutilizadas em processos subsequentes (NIELSEN; BRASK e FJERBAEK, 2008). Além disso, apresentam maior estabilidade térmica, possibilitando o aumento das taxas de reação, as quais, geralmente, aumentam com o aumento da temperatura (FJERBAECK; CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009). Existem vários métodos para a imobilização de lipases, entre eles pode-se citar: adsorção, ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento e cross-linking (TAN et al. 2010).

Lipases de diversas fontes têm sido imobilizadas com vistas na produção de biodiesel, como: *Candida antartica*, *Candida* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, Porcine pancreatic, *Rhizomucor miehei* e *Chromobacterium viscosum* (DU et al. 2004; SHIMADA et al. 1999; WANG et al. 2007; WATANABE et al. 2000; LU et al. 2007; 2008, 2009; NIE et al. 2006; TAN et al. 2006; ISO et al. 2001; SALIS et al. 2005 e 2008; SOUMANOU e BORNSCHEUER, 2003; SHAH e

GUPTA, 2007; SHAH, SHARMA e GUPTA, 2004; SHIEH; LIAO e LEE, 2003; YESILOGLU, 2004).

A lipase de *Candida antarctica*, conhecida comercialmente como Novozym 435, e a de *Candida sp* são mais frequentemente imobilizadas para aplicações industriais. A lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435) é imobilizada em resina acrílica macroporosa e possibilita rendimentos superiores a 90%, já a lipase de *Candida sp.* é imobilizada em membrana têxtil, podendo catalisar reações com rendimentos superiores a 87% (TAN et al. 2010). Estudos mostram que os óleos vegetais têm sido eficazmente modificados por lipases imobilizadas. Com lipases de origem de *Candida sp.* e *Pseudomonas cepacia*, por exemplo, a produção de ésteres metílicos do óleo de soja foi de 98,8% e de 56%, respectivamente (YANG et al. 2006; NOUREDDINI; GAO e PHILKANA, 2005).

Ao mesmo tempo que a imobilização de enzimas melhora a estabilidade e permite fácil recuperação do catalisador no sistema, problemas associados ao transporte de massa surgem, como: dificuldade de formar complexos enzima-triglicerídeos devido as moléculas destes serem grandes e os poros do suporte enzimático apresentarem pequeno diâmetro; possibilidade de acúmulo de reagentes, como o óleo, na superfície do catalisador imobilizado, formando uma espécie de filme sobre o catalisador e dificultando o acesso ao sítio ativo da proteína. Este filme também pode ocorrer pelo acúmulo de glicerol. No entanto, essas limitações, geralmente, são bem atenuadas com o emprego da agitação no meio reacional (FJERBAECK, CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009).

Neste contexto, métodos alternativos, tais como o ultrassom, irradiação de micro-ondas, cavitação hidrodinâmica e adição de co-solventes têm sido utilizados como forma de eliminar ou minimizar a limitação de transferência de massa nos sistemas e, portanto, melhorar os rendimentos durante o processo de produção de biodiesel (VELJKOVIC´, AVRAMOVIC´ e STAMENKOVIC´, 2012).

- Lipase imobilizada de *Candida antarctica* – Novozym 435

A lipase de *Candida antarctica* é extracelular e conhecida como uma das enzimas mais versáteis utilizadas em processos biocatalíticos. A forma comercial da

enzima imobilizada é chamada de Novozym® 435. Esta enzima favorece numerosas reações sintéticas, devido à sua alta atividade, estabilidade e capacidade de reciclagem (ZHAO e SONG, 2010), atuando, não especificamente, nas 3 posições do triglicerídeo.

A Novozym 435 é produzida através da adsorção física de CALB livre em grânulos de poliacrilato, os quais, consistem em ligações cruzadas entre o metacrilato de metila e o divinilbenzeno. As enzimas imobilizadas têm formato esférico, com tamanho médio de 0,315 - 1,0 mm, densidade de 0,65-0,8 g/cm³, alta área superficial, aproximadamente, 130m²/g e elevada estabilidade térmica, tolerando temperaturas entre - 20 a 100°C (ZHAO e SONG, 2010).

Shimada et al. (1999), durante screening de lipases para produção de ésteres metílicos observou que dentre as lipases imobilizadas de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM60), *Candida antarctica* (Novozym 435), *Rhizopus delemar*, *Fusarium heterosporum* e *Aspergillus niger* somente a Novozym 435 e a Lipozyme IM60, apresentam conversões em ésteres após 4 reações subsequentes, no entanto, as conversões mantidas pela Novozym 435 (33,1%) são 13,7% superiores as observadas com o reuso da Lipozyme IM60 (19,4%).

- Uso de peneira molecular em sistemas reacionais catalisados por lipases

Peneiras moleculares são materiais com estruturas cristalinas de tamanho de poro bem definido e de ordem de grandeza molecular. São um dos tipos de adsorventes industriais que têm a capacidade de fazer adsorção. Adsorção é o termo usado para descrever o fenômeno espontâneo no qual moléculas de um fluido gasoso ou líquido agrupam-se espontaneamente sobre a superfície de um sólido. A adsorção é, portanto, um dos fenômenos de transferência de massa que explora a habilidade de certos sólidos em concentrar na sua superfície determinadas substâncias presentes na fase fluida, sendo geralmente usados na remoção de compostos orgânicos, presentes em muitos efluentes industriais, na desumidificação de gases, na recuperação de vapores de solventes dispendiosos, na remoção da umidade da gasolina e no tratamento de efluentes com metais pesados (NÓBREGA, 2001).

Atualmente, o uso de peneiras moleculares tem sido relatado em diversas pesquisas visando à manutenção de um teor de água ótimo no meio reacional, pois, segundo Aquino (2010), em reações catalisadas por enzima o excesso de água forma uma camada sobre o biocatalisador e impede o acesso de substratos lipofílicos aos sítios catalíticos da enzima. Nestes sistemas a peneira molecular atua como adsorvente, onde a água percola por seus poros e fica retida internamente, o que é extremamente importante em algumas reações, permitindo maiores rendimentos do produto desejado.

Neste contexto, Du, Wang e Liu (2007), observaram altas taxas de conversão em ésteres do óleo de soja após a remoção do excesso de água do meio reacional, através do uso de peneira molecular. Chamouveau et al. (2001), também verificaram que a esterificação da frutose com ácido palmítico catalisada pela lipase imobilizada de *Candida antarctica* é fortemente afetada pela atividade de água inicial e que o uso de peneira molecular no meio reacional aumentou o desempenho da reação.

- Fatores que influenciam a atividade das lipases

Os parâmetros ótimos para a utilização de uma lipase específica dependem da origem, bem como da formulação da lipase, ou seja, se ela é imobilizada ou livre, pois, estudos mostram que a produção de ésteres etílicos, por transesterificação do óleo de *Jatropha*, por exemplo, ocorre em 8 h quando se utiliza a lipase imobilizada de *Pseudomonas cepacia*, já com metanol e lipase de *Pseudomonas cepacia* livre a transesterificação ocorre em 90 horas. Outros fatores interferem na atividade destas enzimas, como: temperatura e tempo da reação, óleo utilizado, concentração miscelar disponível, conteúdo de água, álcool e razões molares dos substratos (FJERBAECK; CHRISTENSEN e NORDDAHL, 2009).

A transesterificação de óleos exige um excesso de álcool, o qual, dependendo da razão molar deve ser adicionado progressivamente ao sistema, pois, esta estratégia pode evitar a inativação da lipase (CHEN; YING e LI, 2006; LU et al. 2007; SOUMANOU e BONSCHEUER, 2003). A inativação da enzima pode ocorrer se a monocamada de água do sítio ativo for removida pelos grupamentos hidrofílicos da molécula de álcool. Outra estratégia adotada por muitos pesquisadores é o uso de

solventes orgânicos (ROYON et al. 2007; ISO et al. 2001) mas, devido aos aspectos já descritos este método torna-se menos competitivo em escala industrial.

3.6 ULTRASSOM

3.6.1 Definição

Ultrassom é um som com uma frequência maior da que o ouvido humano consegue responder. De acordo com a frequência do som emitido, o equipamento é classificado como ultrassom de alta frequência (2-10 MHz) ou de baixa frequência (20-100 MHz). Atualmente, o ultrassom de baixa frequência é amplamente usado em diversas áreas da química devido aos efeitos positivos sobre reações químicas, os quais são desencadeados por um fenômeno chamado de cavitação (VELJKOVIC´, AVRAMOVIC´ e STAMENKOVI´C, 2012).

3.6.2 Histórico

A descoberta do ultrassom ocorreu em 1880 enquanto Curie estudava o efeito piezoelétrico. Em 1984 Thornycroft e Barnaby, descobriram o fenômeno de cavitação enquanto observavam que durante a propulsão de mísseis, lançados por um destróier, uma fonte de vibração era gerada causando implosão de bolhas na água. A cavitação, então, foi definida como a formação e a implosão de bolhas em um meio líquido, sendo que, a propagação das ondas ultrassônicas ocorre somente em meios com propriedades elásticas, como a água (MARTINES, DAVOLOS e JAFELICCI, 2000).

O uso comercial das ondas na frequência de ultrassom ocorreu somente em 1912, quando Langevin desenvolveu o SONAR, um aparelho capaz de medir a profundidade do mar. Em 1927, os efeitos destas ondas foram observados em sistemas químicos e biológicos e em 1950 os primeiros aparelhos geradores de ultrassom foram comercializados (MARTINES, DAVOLOS e JAFELICCI, 2000).

A descoberta do fenômeno da cavitação gerado pelo ultrassom levou ao crescente interesse por este sistema e novas possibilidades de uso foram descritas como o efeito terapêutico e de diagnóstico, sendo seu uso generalizado na medicina. Atualmente, desenvolvimentos no campo da síntese química incluindo a ciência dos materiais, de aerogéis, de alimentos entre outras áreas relatam o uso de pesquisas assistidas por ultrassom (MASON, 2007).

Os primeiros estudos sobre a influência das ondas ultrassônicas na química, foram realizados através de diversas reações em meios aquosos, como: reações de hidrólise, reações de hidratação, de oxidação, de polimerização e despolimerização, rearranjo, reduções, entre outras. Na década de 70 o ultrassom ganhou mais destaque devido aos efeitos positivos em sistemas homogêneos não aquosos e então a influência desta nova tecnologia passou a ser pesquisada também em sistemas heterogêneos. Nestes sistemas o principal efeito observado do ultrassom foi a formação de rápidas emulsões entre óleo-água (BARBOSA e SERRA, 1992).

Desde as primeiras descobertas de aplicação do ultrassom, foi clara a ocorrência de reações de síntese em tempos menores e de forma mais “limpa”, ou seja, ambientalmente correta. Dessa forma, esta nova tecnologia foi bem aceita devido a sua ligação aos conceitos emergentes, chamados de “química verde” e “engenharia verde”. A química verde se refere ao design de produtos e processos químicos que reduzem ou eliminam a utilização e geração de substâncias perigosas e procuram reduzir e prevenir a poluição na fonte (CINTAS e LOUIS-LUCHE, 1999), assim como, reduzir o gasto energético durante o processo de produção (MASON, 2007). Já a engenharia verde, se refere à comercialização e utilização de processos que são viáveis, econômicos, reduzem a poluição na fonte e minimizam o risco para a saúde humana e para o ambiente (CINTAS e LOUIS-LUCHE, 1999).

A sonoquímica é uma das tecnologias que pode ser uma aliada da ciência verde, ou seja, do desenvolvimento tecnológico sustentável, pois, envolve o uso de produtos químicos e solventes menos perigosos; o desenvolvimento de condições de reação que aumentam a seletividade para o produto; a minimização do consumo de energia e o uso de matérias-primas alternativas ou renováveis (MASON, 2007).

O uso do ultrassom também é relatado em estudos de química ambiental para a extração de materiais vegetais, para o controle da emissão final de efluentes, para

a descontaminação da atmosfera e do solo e para a remoção da contaminação biológica e química da água (MASON, 2007).

3.6.3 Aparelhos geradores de ondas ultrassônicas

Atualmente, há dois tipos de aparelhos geradores de ondas ultrassônicas, o banho, normalmente utilizado para limpeza de material e a sonda, normalmente utilizada em laboratório de microbiologia para rompimento de células vivas. Nestes dois sistemas, a fonte de energia ultrassônica é uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas. Este sistema constitui o transdutor piezoelétrico. O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas, as chapas metálicas amplificam estes sinais e o transdutor transmite os impulsos ultrassônicos ao meio reacional (BARBOSA e SERRA, 1992).

No banho, o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultrassônica é transmitida através de um líquido, normalmente água. Neste caso, há muita dispersão de energia, e conseqüentemente, menor influência no sistema reacional. Na sonda, o transdutor é acoplado na extremidade do equipamento e entra em contato direto com o sistema reacional, por isso geralmente é mais eficiente (BARBOSA e SERRA, 1992).

3.6.4 Cavitação

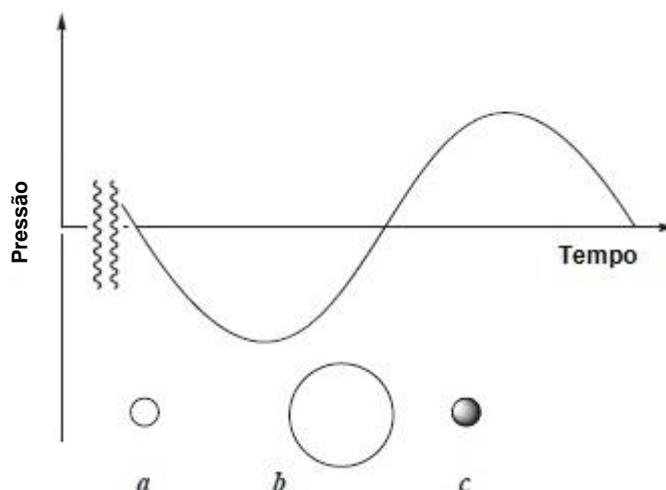
O processo de cavitação gerado pelo ultrassom é um fenômeno físico (MARTINES, DAVOLOS e JAFELICCI, 2000) e envolve três etapas: formação (a), crescimento (b) e implosão de bolhas (c) (BARBOSA e SERRA, 1992), conforme é apresentado na Figura 3.9.

O fenômeno de cavitação inicia-se quando o ultrassom gera ondas ultrassônicas no meio reacional, sendo estas as responsáveis pela vibração das moléculas (MARTINES, DAVOLOS e JAFELICCI, 2000). A propagação das ondas no meio origina dois tipos de bolhas: as bolhas de cavitação estáveis que oscilam

no meio e possuem tempo de vida de alguns ciclos e as bolhas de cavitação transitórias. As bolhas de cavitação transitórias originam-se do crescimento, até um tamanho crítico, das bolhas de cavitação estáveis devido à penetração de gás dissolvido. Estas bolhas têm tempo de vida mais curto, de poucos ciclos e a sua implosão é responsável pelo fenômeno da cavitação (BARBOSA e SERRA, 1992).

O meio reacional irradiado com ondas ultrassônicas apresenta variação na pressão do sistema devido à ocorrência de ciclos alternados de compressão e expansão das bolhas de cavitação (a etapa de compressão é chamada de pressão positiva e a de expansão, de pressão negativa, a qual resulta em "vácuo"). Quando a pressão diminui de forma suficiente a causar o rompimento das forças que mantêm a coesão molecular (ligações de Van Der Waals) ocorre a implosão de bolhas no centro de um líquido (c), o que caracteriza a cavitação, como mostra a Figura 3.9 (CINTAS e LOUIS-LUCHE, 1999). A implosão das bolhas de cavitação transitórias – cavitação - produz forte aquecimento local, aumento da pressão e aumento na transferência de massa no sistema (VELJKOVIC´, AVRAMOVIC´ e STAMENKOVIC´, 2012). As altas temperaturas e pressão do interior da bolha são as responsáveis pela formação de radicais livres (BARBOSA e SERRA, 1992).

Figura 3.9 - Dinâmica da cavitação de bolhas.



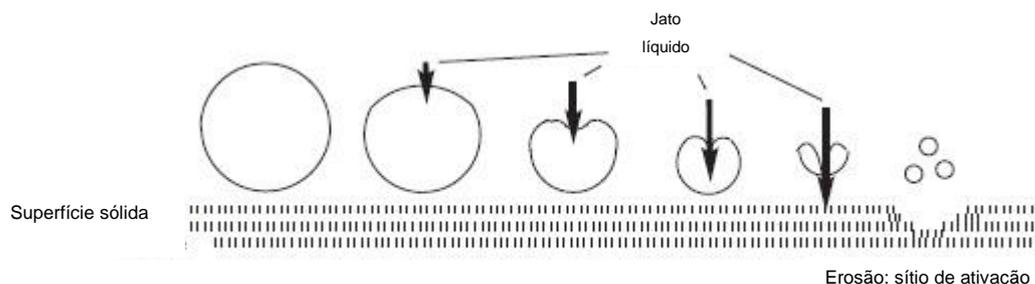
Fonte: Cintas e Louis-Luche, 1999.

O crescimento e o colapso de microbolhas cheias de gás é acompanhado da emissão de flashes de luz, fenômeno este chamado de sonoluminescência, o qual ocorre em meios aquosos e não aquosos e constitui um dos ambientes para determinar quais são as condições físicas reais no interior da bolha (CINTAS e LOUIS-LUCHE, 1999). Neste processo, dois elementos são importantes: a presença de gás dissolvido para encher as bolhas e a presença de partículas em suspensão, as quais diminuem a força de coesão molecular (BARBOSA e SERRA, 1992).

Em meio homogêneo há duas regiões de reatividade sonoquímica, sendo que, uma corresponde à fase gasosa dentro da bolha e a outra é uma fina camada em volta da bolha gasosa. A zona gasosa foi denominada de “hot spot”, sendo este o ponto onde se inicia a destruição da bolha, dessa forma, a implosão da bolha depende da volatilidade do solvente (BARBOSA e SERRA, 1992), pois, as moléculas voláteis penetram na bolha, causando subsequente colapso e formação de radicais (CINTAS e LOUIS-LUCHE, 1999). Nos sistemas heterogêneos, na interface sólido-líquido a destruição das bolhas ocorre de forma não simétrica, dando origem a um jato de líquido dirigido para a superfície sólida, o qual pode causar erosão localizada, como mostra a Figura 3.10. Além disso, microfluxos de líquidos são formados devido a absorção de grande quantidade de energia vibracional dentro do pequeno volume, com pouco ou nenhum aquecimento associado, favorecendo o transporte de massa entre a fase líquida e a sólida e acelerando a velocidade da reação (BARBOSA e SERRA, 1992).

De acordo com Cintas e Louis-Luche (1999) os principais fatores que afetam a cavitação são a natureza dos solventes, a viscosidade, a tensão de superfície e sua capacidade de gerar radicais.

Figura 3.10 - Erosão cavitacional de sólidos.



Fonte: Cintas e Louis-Luche, 1999.

- Efeitos positivos do processo cavitacional
 - **Agitação eficiente e miscibilidade entre reagentes de polaridades diferentes:** quando as bolhas formadas pela cavitação rebentam perto do limite de fase de dois líquidos imiscíveis, a onda de choque resultante fornece eficiente agitação, o que leva a mistura das camadas (YACHMENEV, BLANCHARD e LAMBERT, 2004). Este evento é o responsável pela formação de emulsões entre dois reagentes imiscíveis, aumentando a área interfacial da reação e, portanto, a velocidade da mesma. Estas emulsões têm normalmente gotas de menor tamanho e são mais estáveis do que as obtidas utilizando técnicas convencionais, o que é muito vantajoso para reações em sistemas líquido-líquido (VELJKOVIC', AVRAMOVIĆ' e STAMENKOVIC', 2012).
 - **Formação de espécies reativas:** o colapso cavitacional, produz, localmente, condições extremas induzindo a formação de espécies químicas que não são facilmente atingidas em condições convencionais, o que fornece uma reatividade particular ao meio (CINTAS e LOUIS-LUCHE, 1999). Como consequência, o fenômeno de cavitação pode aumentar as taxas de reação em reações heterogêneas (YACHMENEV, BLANCHARD e LAMBERT, 2004; LI et al. 2005), assim como, os rendimentos e a via das reações, iniciando-a em sistemas químicos, biológicos e eletroquímicos. Já em sínteses orgânicas, o uso do ultrassom permite reduzir o número de etapas de síntese, assim como o tempo e a temperatura da reação (VELJKOVIC', AVRAMOVIĆ' e STAMENKOVIC', 2012). No caso da água as espécies reativas formadas são $H\bullet$ e $OH\bullet$ (CINTAS e LOUIS-LUCHE, 1999).
 - **Energia:** alguns pesquisadores relataram que a cavitação ultrassônica fornece não apenas a energia mecânica para a mistura, mas também a energia de ativação necessária para iniciar a reação de transesterificação (VELJKOVIC', AVRAMOVIĆ' e STAMENKOVIC', 2012), fato este, provavelmente, associado a vibração das moléculas.

- **Potencial catalítico:** em reações enzimáticas o ultrassom pode melhorar a atividade catalítica de enzimas, como a Novozym 435, no entanto, há necessidade de controlar o teor de água presente no meio reacional, pois, a presença de muitas moléculas de água leva a remoção da monocamada de água do sítio ativo das enzimas, a qual é essencial para a manutenção da conformação ótima destas (VELJKOVIC´, AVRAMOVIC´ e STAMENKOVIC´, 2012). Este fato não é desejável, uma vez que, uma das premissas relacionadas ao uso de novas tecnologias para catálise enzimática é a manutenção da sua atividade de tal forma que seu reuso seja possível.

Segundo Barbosa e Serra (1992), a utilização do ultrassom em reações químicas apresenta ainda diversas vantagens como: redução do tempo de reação, redução da quantidade de reagentes, aumento do rendimento e da seletividade dos produtos e favorecimento de reações que normalmente não ocorrem em condições normais. Em processos biotecnológicos o efeito físico do ultrassom consiste, principalmente, na alteração da temperatura e da pressão do microambiente. A ocorrência associada destes fatores torna o ultrassom um método alternativo e eficiente na catálise enzimática, pois, pode vir a reduzir as limitações de transferência de massa entre substrato e enzima imobilizada, aumentar a miscibilidade entre compostos de características químicas distintas e diminuir a energia de ativação destes processos. Devido a isso, o ultrassom, frequentemente, age como “catalisador”, permitindo que as reações ocorram com velocidades e taxas de conversões maiores (BABICZ, 2009).

- Inconvenientes do processo cavitacional
 - Distribuição desigual da energia cinética (CINTAS e LOUIS-LUCHE, 1999);
 - Produção de ondas de choque suscetíveis de provocar defeitos e deformações na superfície sólida (BARBOSA e SERRA, 1992), assim como, a desnaturação de enzimas;

- A camada de água que envolve o sítio ativo das enzimas pode ser removida pela vibração ultrassônica (MARTINES, DAVOLOS e JAFELICCI, 2000) associada à alta energia cinética, podendo causar danos a estrutura terciária e quaternária da enzima.

3.7 PRODUÇÃO DE BODIESEL ENZIMÁTICO POR TRANSESTERIFICAÇÃO EM SISTEMAS DE ULTRASSOM

A síntese de biodiesel nestes sistemas ocorre, principalmente, por reações de transesterificação sendo os óleos vegetais, as principais matérias-primas empregadas, no entanto, há dados na literatura de transesterificação de gorduras animais (TEIXEIRA et al. 2009) e de óleos residuais nestes sistemas (VELJKOVIC´, AVRAMOVIC´ e STAMENKOVIC´, 2012).

O uso ultrassom na produção de biodiesel já é relatado tanto para uso com catalisadores químicos quanto enzimáticos (YU et al. 2010), sendo o ultrassom de baixa frequência o mais empregado para sua síntese (VELJKOVIC´, AVRAMOVIC´ e STAMENKOVIC´, 2012). Até o momento, pouca pesquisa tem sido feita sobre a aplicação de irradiação ultrassom na produção de biodiesel catalisada por lipases (YU et al. 2010), sendo a preparação comercial da lipase de *Candida antarctica*, Novozym 435, a mais estudada (VELJKOVIC´, AVRAMOVIC´ e STAMENKOVIC´, 2012). A literatura apresenta efeitos significativos destes sistemas na atividade desta lipase e também nas reações de transesterificação enzimática (YU et al. 2010).

De acordo com Veljkovic´, Avramovic´ e Stamenkovic´, (2012) a produção de biodiesel em sistemas de ultrassom, geralmente, permite rendimentos mais elevados e em tempos de reação mais curtos, independentemente do tipo de catalisador e da matéria-prima quando comparado aos sistemas com agitação mecânica e irradiação de micro-ondas. No entanto, a maior diferença está no tempo de formação do produto e não na conversão final.

3.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Atualmente, a cultura da soja representa cerca de 90% da produção de óleos vegetais no Brasil, sendo sua cadeia produtiva bem consolidada no setor alimentício. No entanto, em vista da grande biodiversidade das florestas nacionais, oleaginosas alternativas começam a ser investigadas como matérias-primas para produção de biodiesel de forma a garantir a segurança energética nacional, uma vez que, a produção de energia a partir de diferentes fontes impede que a ocorrência de intempéries venha a acometer toda a cadeia produtiva. Neste cenário, as palmeiras ganham grande destaque devido ao alto rendimento em óleo que apresentam, sendo que, no caso da macaúba este pode chegar a ser 10 vezes superior ao da soja.

Um dos maiores problemas associados ao uso de óleos de palmeiras para produção de biodiesel é a alta acidez, no entanto, essa pode ser controlada com rápido processamento dos frutos após a colheita ou com a colheita dos frutos ainda verdes e posterior amadurecimento. O uso de matérias-primas de baixo valor agregado para produção de biodiesel pode vir a ser uma das alternativas para viabilizar economicamente a oferta deste combustível, considerado, atualmente, a única alternativa energética para abastecimento de frotas veiculares com propriedades semelhantes as do diesel e ainda com menor impacto ambiental devido as emissões de poluentes atmosféricos serem demasiadamente menores.

Estudos sobre a produção de biodiesel a partir do óleo do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.) são recentes, sendo que em todos os trabalhos a alta acidez deste é relatada (RODRIGUES, 2007; FARIA, 2010; GONZALEZ, 2011). Recentemente, resultados satisfatórios foram obtidos empregando catalisadores químicos (ácidos ou álcalis) e também com emprego de catalisadores enzimáticos imobilizados, no entanto, em tempos reacionais longos, sobre altas temperaturas e com necessidade de pré-tratamento do óleo.

O estudo desenvolvido com este trabalho é pioneiro dentre aqueles desenvolvidos pelo grupo, mostrando-se também inovador no setor, pois, busca aliar alto rendimento, baixo custo e sustentabilidade ambiental. Desta forma, a produção de biodiesel a partir de matérias-primas abundantes e através de tecnologias ambientalmente corretas poderá trazer novas perspectivas quanto aos processos de produção de biodiesel, tornando possível o desenvolvimento de uma nova e mais

econômica tecnologia de produção. Esta afirmação está baseada no fato de que equipamentos de ultrassom reduzem o tempo reacional das reações, e proporcionam altos rendimentos às mesmas, auxiliados por catalisadores enzimáticos que podem ser reaproveitados em diversos ciclos de produção. Em vista do exposto e da fundamentação teórica apresentada na revisão bibliográfica é que se justifica este trabalho.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Este estudo foi realizado com dois lotes do óleo do fruto da macaúba, os quais foram denominados como Lote A e Lote B. Estes lotes foram caracterizados quimicamente, sendo os resultados apresentados posteriormente. O Lote A foi utilizado nos testes preliminares para a produção de ésteres etílicos. Após estabelecidas as condições ideais de produção de biodiesel, todos os experimentos foram realizados com o Lote B.

Os substratos utilizados para as reações de transesterificação foram o óleo bruto do fruto de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart) obtido da unidade de beneficiamento de coco de macaúba (Associação Comunitária dos Pequenos Produtores Rurais de Riacho D'Antas e Adjacências – COOPER RIACHÃO – Montes Claros-MG) e álcool etílico (Merck, 99,9 %). O catalisador utilizado para as reações foi a lipase comercial imobilizada Novozym 435, adquirida junto a Novozymes Brasil/ Araucária-PR.

Para determinação dos índices de acidez e índice de peróxido do óleo bruto do fruto da macaúba os reagentes empregados foram: fenoltaleína 0,5% (P. A. Nuclear), hidróxido de potássio (P. A. Vetec), éter etílico (99,5% Vetec), etanol (95% Fmaia), ácido acético (99,7% P. A. Fmaia), clorofórmio (99,8% P. A. Vetec), iodeto de potássio (P. A. Nuclear), tiosulfato de sódio (pentahidratado) (P.A. Vetec), amido solúvel (P. A. Synth), dicromato de potássio (99% Nuclear) e ácido clorídrico (P. A. Vetec).

Além dos substratos já citados, nas reações de transesterificação empregou-se peneira molecular 4Å (Sigma Aldrich), como agente dessecante. Após as reações o meio foi lavado com n-hexano (99% Vetec), por meio de filtragem simples em papel filtro.

A quantificação dos ésteres formados durante a reação de transesterificação foi realizada usando padrões comerciais dos ésteres majoritários do biodiesel tradicional derivado do óleo de soja, como o padrão interno heptadecanoato de

metila (99% Sigma-Aldrich). A diluição das amostras foi feita com o solvente n-heptano (99% Vetec) de acordo com a Norma Européia 14103 adaptada.

No procedimento para a determinação da atividade de esterificação da lipase Novozym 435 utilizou-se os seguintes reagentes: acetona P. A. (99,5% Vetec), álcool etílico (99% Merck), NaOH (P. A. Nuclear), ácido láurico (98% Vetec) e álcool n-propílico normal (99,5% Nuclear).

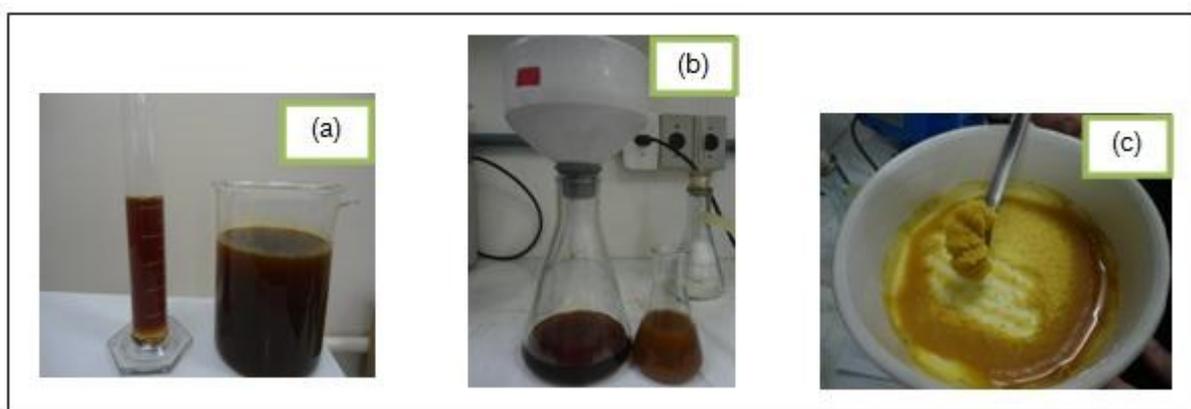
4.2 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

O óleo dos frutos da Macaúba, *Acrocomia aculeata*, foi adquirido da Unidade de Beneficiamento do Coco de Macaúba – UBCM, de Montes Claros/MG. É importante frisar que o óleo utilizado neste estudo é uma mistura, com proporção desconhecida, do óleo da polpa e do óleo da amêndoa da macaúba, sendo, portanto, denominado de óleo do fruto da macaúba.

4.2.1 Remoção de resíduos do óleo bruto do fruto da macaúba

O óleo do fruto da macaúba adquirido apresentava grande quantidade de sujidades, tornando necessária filtragem a vácuo para remoção destas, como apresenta a Figura 4.1.

Figura 4.1 - Óleo bruto com material sólido (a); filtragem a vácuo (b) e resíduos sólidos removidos do óleo (c).



A remoção dos resíduos sólidos do óleo do fruto da macaúba acarretou uma perda em torno de 60% em volume de óleo.

4.3 CARACTERIZAÇÕES DO ÓLEO DO FRUTO DA MACAÚBA

4.3.1 Teor de água

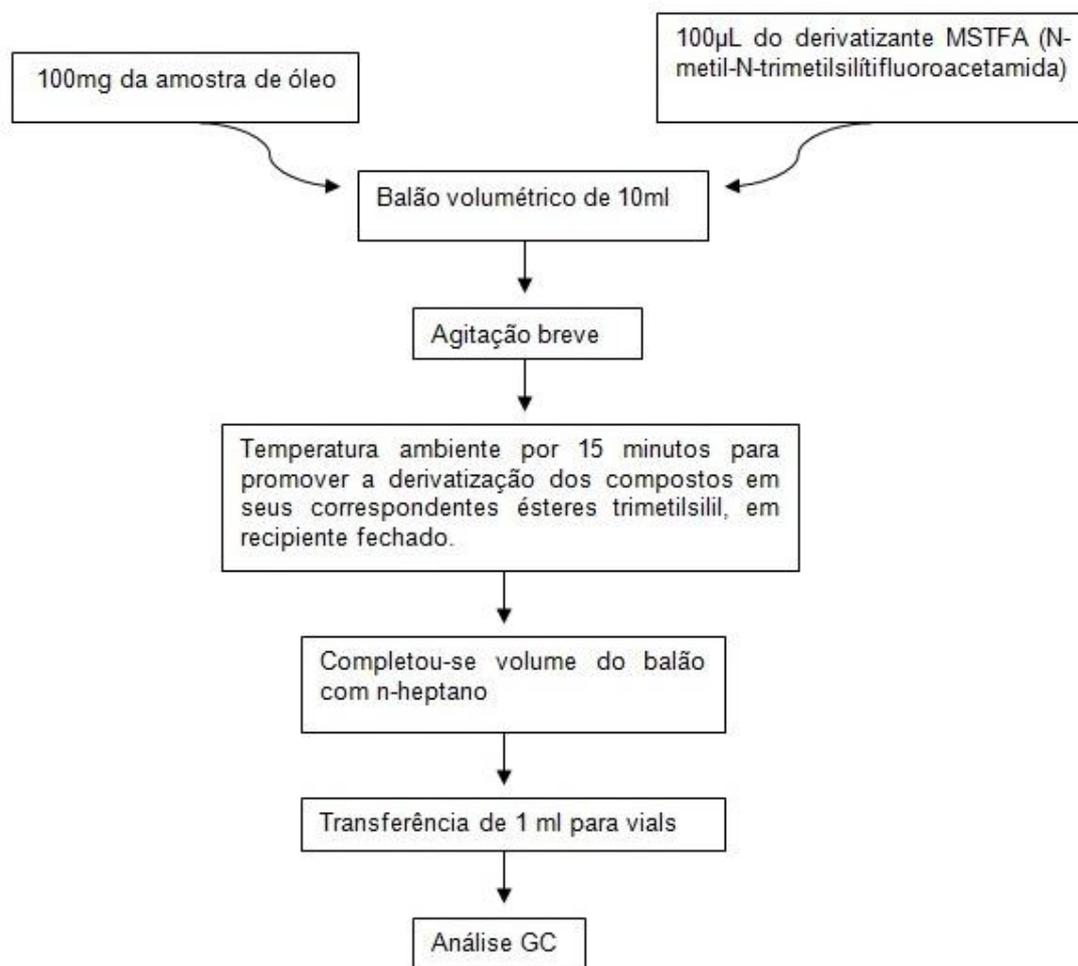
Para determinar o teor de água nas amostras de óleo, utilizou-se a metodologia da AOAC Official Method 984.20, sendo os aparatos e reagentes para titulação de Karl Fischer e o equipamento Mettler Todelo DL 50 Graphix.

4.3.2 Quantificação de monoacilgliceróis (Mag), diacilgliceróis (Dag) e triacilgliceróis (Tag)

Para a quantificação do teor de Mag, Dag e Tag do óleo bruto do fruto da macaúba, empregou-se técnica de cromatografia gasosa utilizando as condições cromatográficas descritas pela Norma Européia 14105 do Comitê Europeu para Padronizações.

De acordo com esta norma, a preparação das amostras segue o esquema apresentado na Figura 4.2.

Figura 4.2 - Representação esquemática do preparo de amostras para quantificação de Mag, Dag e Tag, conforme Norma Européia 14105.



A análise das amostras foi realizada em cromatógrafo gasoso (modelo Shimadzu – 2010), com injetor automático, on-column e detector de ionização de chama. Utilizou-se a coluna capilar DB-5 de 30m x 0,25mm x 0,1µm.

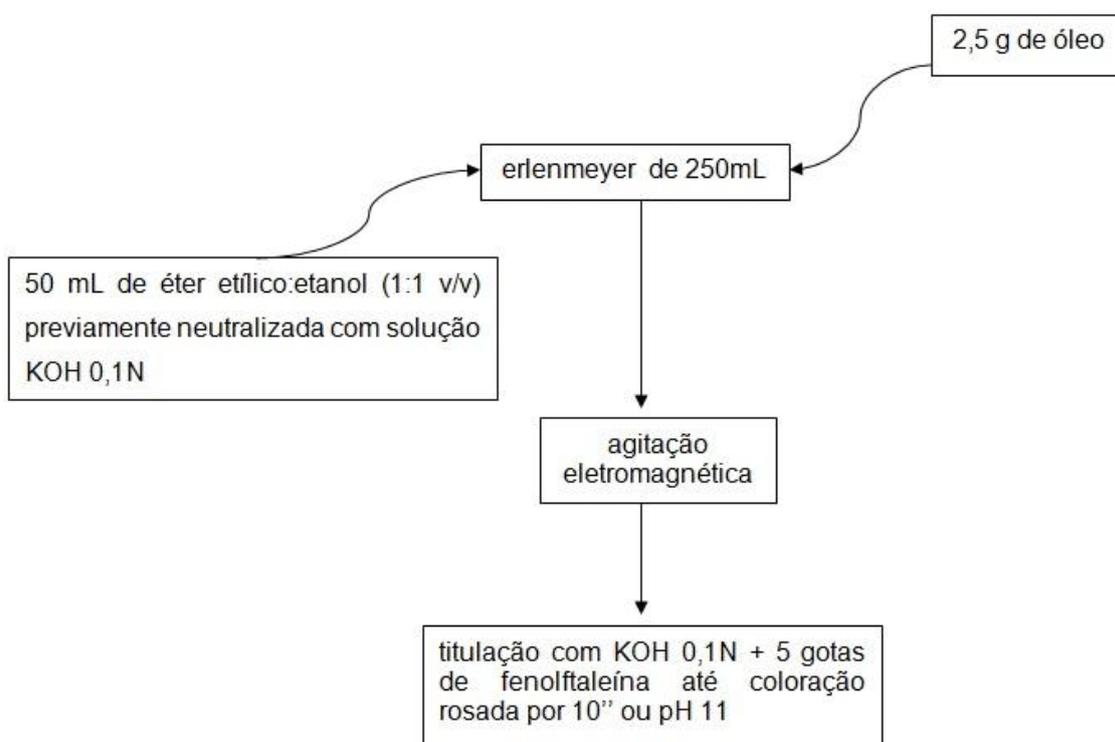
A quantificação, de mono, di e triglicerídeos, estabelecida pela norma anteriormente referida prevê que as frações de Mag possuem tempo de retenção entre 14 e 18 minutos, já Dag possui tempo de retenção entre 24 e 27 minutos e Tag apresenta tempo de retenção entre 28 e 32 minutos. A partir disto, foi determinada a área de cada uma destas frações de lipídeos no óleo e, então, juntamente com as equações de reta geradas pelas curvas de calibração foi determinada a concentração destes na amostra, e logo após a porcentagem correspondente. As curvas de calibração, assim como, as equações de reta por ela geradas e as equações de teor de cada uma das frações são apresentadas no Anexo A.

4.3.3 Determinação do índice de acidez

O índice de acidez do óleo bruto do fruto de macaúba foi determinado de acordo com a metodologia descrita pela IUPAC 2.201 (2012). De acordo com esta metodologia, a acidez de um óleo é a medida da extensão da hidrólise, a qual libera ácidos graxos dos triglicerídeos. O índice de acidez ou valor de acidez é o número de mg de KOH necessário para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em 1g de amostra. A acidez também pode ser expressa como porcentagem, sendo que, nesse caso pode ser relatada com referência ao peso molecular do ácido láurico, ácido palmítico ou ácido oléico.

O procedimento para determinar o índice de acidez do óleo bruto foi realizado de acordo com o esquema apresentado na Figura 4.3.

Figura 4.3 - Representação esquemática da metodologia IUPAC 2.201 (2012) para determinação do índice de acidez de óleos.



A metodologia da IUPAC 2.201 estabelece que quando não se conhece o valor aproximado da acidez de uma amostra, inicie-se considerando um valor ácido entre 4 a 15, assim, a massa de amostra pesada deve ser de $2,5 \text{ g} \pm 0,01\text{g}$.

Após a titulação, o valor ácido ou índice de acidez do óleo do fruto da macaúba foi determinado a partir da Equação 4.1

$$I.A. = \frac{M * N * G}{m} \quad (4.1)$$

Onde:

M = peso molecular do KOH;

N = normalidade da solução de KOH;

G = volume gasto de KOH em mL;

m = massa da amostra em gramas.

A porcentagem de ácidos graxos livres na amostra foi expressa em ácido oléico e determinada de acordo com a Equação 4.2.

$$A\% = \frac{N * G * M}{10 * m} \quad (4.2)$$

Onde:

N = normalidade real da solução de KOH;

G = volume gasto de KOH em mL;

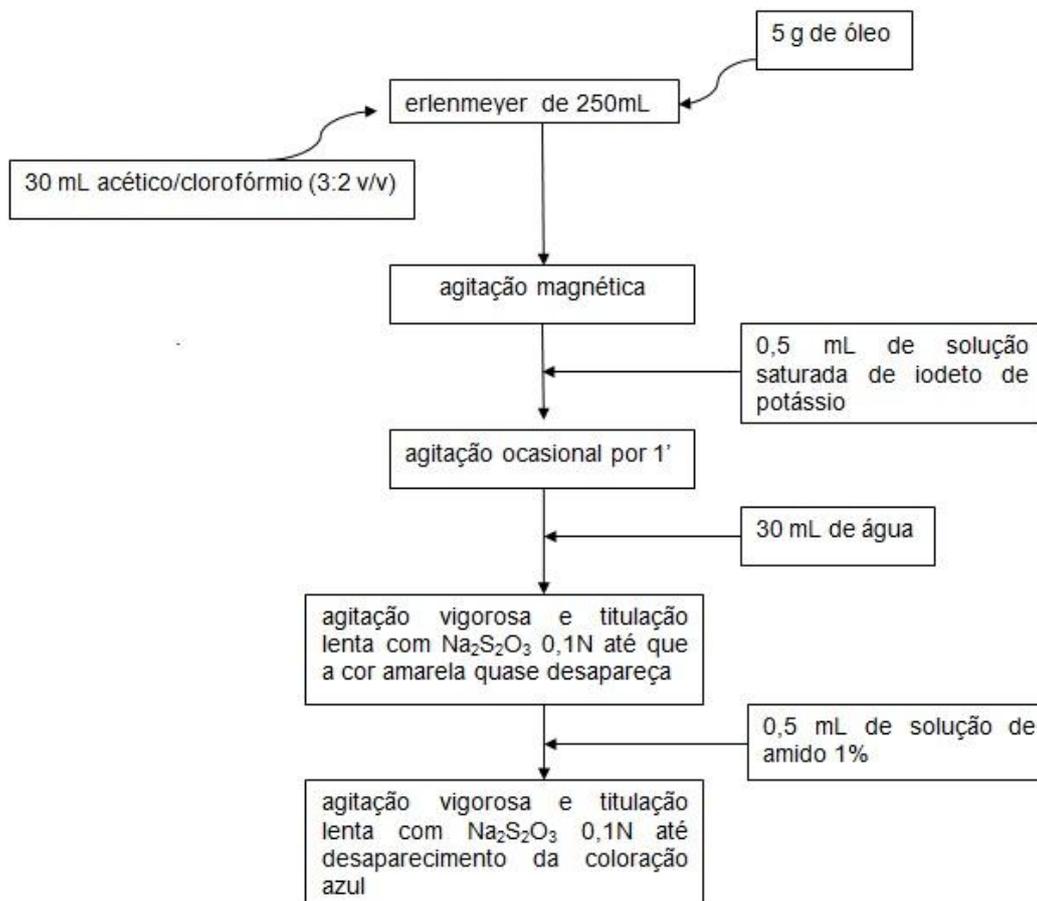
M = peso molecular do ácido oléico;

m = massa da amostra em gramas.

4.3.4 Determinação do índice de peróxido

A determinação do índice de peróxido do óleo bruto do fruto de macaúba foi realizada a partir da metodologia descrita pela AOAC 965.33 (1995), conforme representado no esquema da Figura 4.4.

Figura 4.4 - Representação esquemática da metodologia da AOAC 965.33 (1995) para determinação do índice de peróxido de óleos.



O preparo da solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 N, assim como, sua padronização foram realizadas de acordo com a metodologia AOAC 942.27.

Após a titulação da amostra realizou-se uma determinação do branco, ou seja, titulação sem amostra de óleo. O volume gasto nessa titulação foi subtraído do volume gasto na titulação da amostra. O índice de peróxido, então, foi determinado de acordo com a Equação 4.3.

$$I.P. \left(\text{miliequivalente} \frac{\text{peróxido}}{\text{kg}} \text{ amostra} \right) = S * N * \frac{1000}{g} \text{ amostra} \quad (4.3)$$

Onde:

S = ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (com branco corrigido);

N = normalidade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;
g amostra = massa de amostra em gramas.

4.4 REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DO FRUTO DA MACAÚBA

As reações de transesterificação foram realizadas em banho de ultrassom (marca: UNIQUE Ultrasonic Cleaner; modelo: USC-1800A; frequência de 40KHz e potência de 132W), conforme apresentado na Figura 4.5.

Figura 4.5 - Aparato experimental para produção de biodiesel enzimático em ultrassom a partir do óleo do fruto da macaúba.



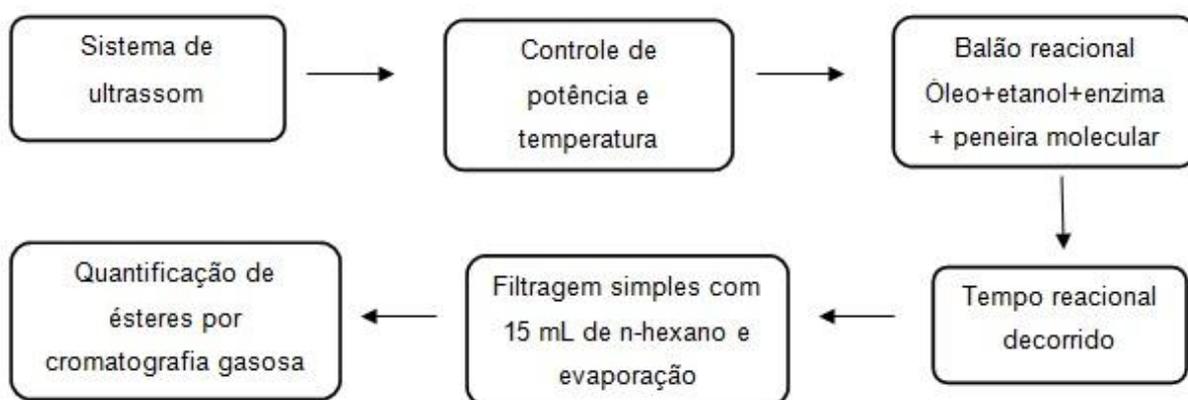
Nestas reações empregou-se como substrato alcoólico o etanol e como substrato lipídico o óleo do fruto da macaúba, sendo a lipase comercial imobilizada Novozym 435, utilizada como catalisador do processo. Devido ao pequeno volume de reação, para cada tempo reacional analisado, foi realizada uma reação, utilizando balão volumétrico de 50 ml.

Devido ao fato de que a produção de biodiesel do óleo do fruto da macaúba em sistema de ultrassom apresenta-se como uma nova e promissora tecnologia, não

se tem conhecimento do comportamento do óleo no sistema proposto. Em vista disso, as condições iniciais para produção de biodiesel neste trabalho foram as otimizadas por Popielski (2011) para a transesterificação enzimática do óleo de soja em sistema de ultrassom e livre de solvente. Estas condições são as seguintes: concentração de enzima 27%, razão molar óleo/etanol 1:3, potência do ultrassom 40% do total da capacidade máxima (132W) e temperatura de 63°C.

Após os testes preliminares, os ensaios foram conduzidos com base em um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , o qual visou o “screening” das seguintes variáveis: temperatura, razão molar óleo-etanol, concentração de enzima e potência do ultrassom nos níveis -1, 0 e 1, como apresenta a Tabela 5.2. Devido a considerações pertinentes feitas no decorrer deste trabalho, algumas reações foram realizadas com o uso de peneira molecular de 4Å de maneira a remover a água do sistema reacional. As reações de transesterificação ocorreram de acordo com a Figura 4.6.

Figura 4.6 - Representação esquemática das reações de transesterificação e tratamento da amostra até análise por cromatografia gasosa.

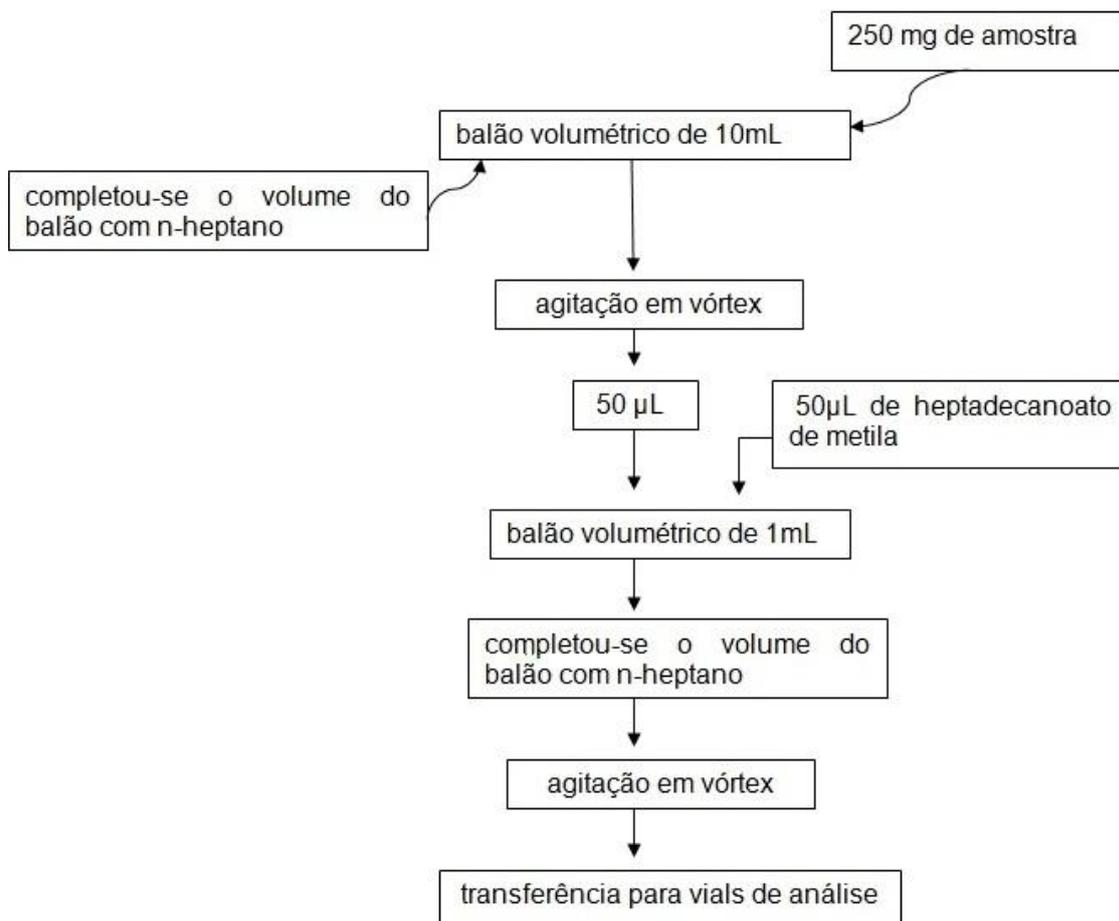


4.5 QUANTIFICAÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS

Após as reações de transesterificação, a quantificação das conversões em ésteres dos ácidos graxos do óleo do fruto da macaúba foi realizada de acordo com a Norma Europeia 14103 adaptada. O uso da norma adaptada foi adotado, uma vez que, se reduz consideravelmente o volume de solvente utilizado no preparo das

amostras. Dessa forma, as amostras foram preparadas conforme esquema apresentado na Figura 4.7.

Figura 4.7 - Representação esquemática do preparo de amostras para quantificação de ésteres de acordo com a Norma Européia 14103 adaptada.



Esta metodologia estabelece tempo de análise de 25 minutos, em cromatógrafo gasoso acoplado com detector de ionização em chama e coluna capilar RTx-Wax (30m – 0,25 mm – 0,25 µm), sendo a temperatura do detector e do injetor de 250°C. A rampa de aquecimento da coluna foi a seguinte: 120°C por 1 minuto, após, aquecimento de 15°C por minuto até atingir 180°C, permanecendo nesta por 2 minutos. Após, houve aquecimento de 5°C por minuto até atingir 250°C, na qual permaneceu por 2 minutos. A amostra foi injetada no modo split numa razão de 1:20, sendo o volume injetado de 1 µL. A quantificação dos ésteres foi realizada

entre os picos dos ésteres C₁₄ e C₂₄, pois, este é o intervalo onde encontram-se os componentes majoritários do biodiesel. O heptadecanoato de metila (C_{17:0}) foi utilizado como padrão interno, o qual possui tempo de retenção de aproximadamente 7,5 minutos.

As conversões em ésteres, expressas em porcentagem (m/m), foram determinadas de acordo com a Equação 4.4, a qual também é adaptada da referida norma:

$$C = \left(\frac{\sum A - API}{API} * \frac{CPI \left(\frac{mg}{L} \right)}{C_{amostra} * 0,91} \right) * 100 \quad (4.4)$$

Onde:

C= conversão em ésteres em porcentagem;

∑A = somatório das áreas dos componentes majoritários do biodiesel e do padrão interno obtida da integração dos picos de ésteres C₁₄ ao C₂₄;

API = área do padrão interno (C_{17:0} – heptadecanoato de metila);

CPI= concentração em mg/L do padrão interno na amostra injetada (aproximadamente 250 mg/L);

Camostra = concentração de amostra injetada (aproximadamente 1000 mg/L);

0,91= fator de correção considerando a produção de glicerol no sistema, ou seja, a conversão de 100% em ésteres é referente a 91%.

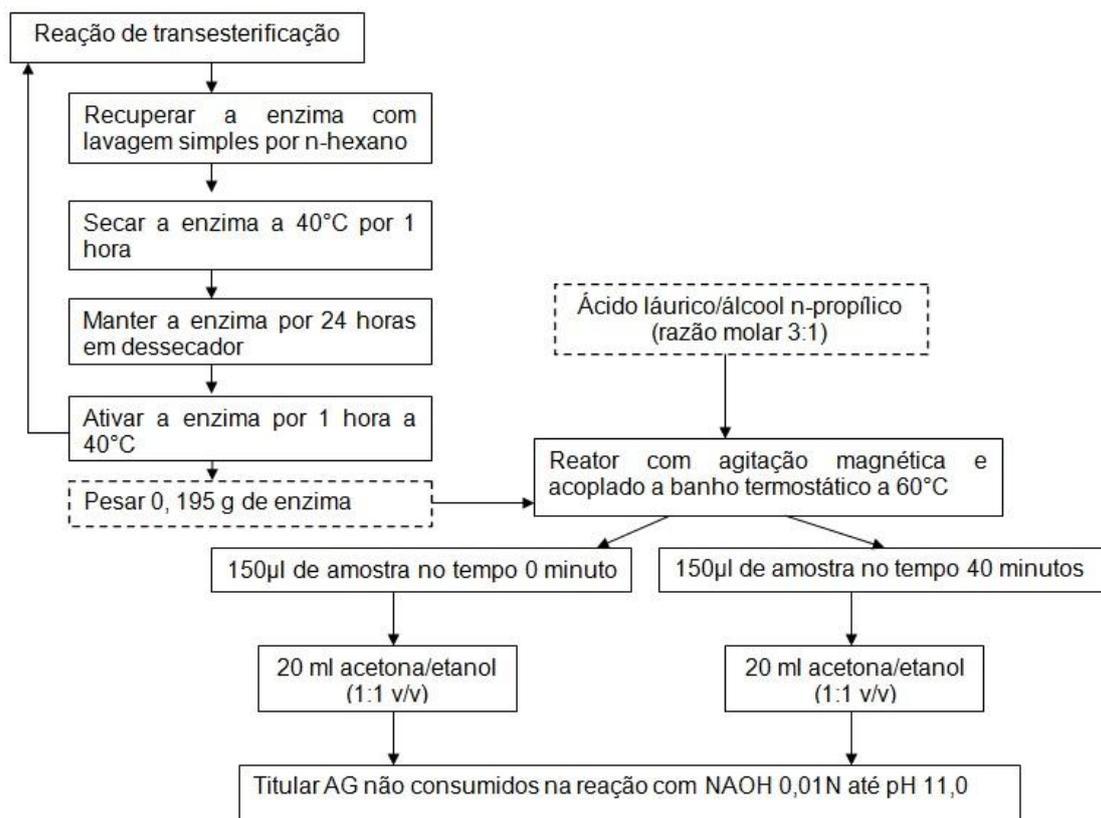
De acordo com a Norma Européia 14103 a expressão dos resultados deve ser de até uma casa decimal.

4.6 ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE COMERCIAL IMOBILIZADA NOVOZYM 435

A atividade de esterificação da enzima foi acompanhada com a finalidade de avaliar o reuso desta. A determinação da atividade de esterificação da lipase foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de transesterificação entre o ácido láurico e o álcool n-propílico, catalisada com 5% (m/m) de Novozym 435,

conforme metodologia descrita por Oliveira et al. (2006). De acordo com esta técnica a atividade de esterificação de uma enzima imobilizada deve ser determinada conforme o esquema apresentado na Figura 4.8.

Figura 4.8 - Representação esquemática da medida atividade de esterificação enzimática de acordo com metodologia descrita por Oliveira et al. (2006).



A massa de enzima que restou após cada medida de atividade de esterificação (para a qual retirou-se 5% (m/m) de enzima ou 0,195g) foi reutilizada em outro ciclo, como mostra a Figura 4.8. Dessa forma, a massa de enzima utilizada diminuía a cada reuso, no entanto, não se fez a correção em massa dos outros reagentes, uma vez que, foi observada incrustação de óleo no suporte enzimático o que não permitiu definir com precisão a massa de enzima restante.

Nos tempos reacionais de 0 e 40 minutos, foram retiradas duas alíquotas de amostras, assim, a atividade de esterificação da Novozym 435 foi determinada em duplicata. A solução de acetona/etanol foi utilizada para interromper a reação de transesterificação.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para consumir 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições experimentais descritas, sendo esta determinada através da Equação 4.5.

$$A \left(\frac{\text{U}}{\text{g}} \right) = \frac{(V_a - V_b) * N * 10^3}{t * m_a} \quad (4.5)$$

Onde:

N = normalidade real da solução de NaOH;

V_a = volume de NaOH em mL gasto na titulação da amostra retirada do reator no tempo 0 (zero);

V_b = volume de NaOH em mL gasto na titulação da amostra retirada do reator após decorridos 40 minutos de reação;

m_a = massa de enzima utilizada na reação em g;

t = tempo da reação em minutos;

1U = 1 μmol de ácido/minuto.

A atividade de esterificação da lipase foi representada como atividade relativa, por meio da Equação 4.6.

$$\text{A.R. \%} = \frac{A_f}{A_{f_0}} \quad (4.6)$$

Onde:

A.R. = atividade relativa da enzima expressa em porcentagem;

A_f = atividade final da enzima expressa em U/g;

A_{f_0} = atividade inicial da enzima expressa em U/g.

4.6.1 Avaliação do reuso da lipase comercial imobilizada Novozym 435

A realização deste estudo ocorreu somente após estabelecidas as condições ideais de produção de biodiesel do óleo do fruto da macaúba. Um aumento de escala do volume da reação em 10 vezes foi necessário para que todas as determinações de atividade de esterificação fossem realizadas com a mesma amostra de enzima. Então, nessa etapa, com razão molar óleo/etanol 1:9 tem-se 10g de óleo para 4,8g de etanol. Devido a isso, os experimentos foram realizados em balões de fundo redondo de 250 mL.

Etapas posteriores a reação e a recuperação da enzima seguiram conforme representação da Figura 4.8. No entanto, neste estudo o volume de n-hexano necessário para filtração foi de aproximadamente 30 mL. Peneiras com diâmetro de de 42 e 16 mesh foram utilizadas para separar a peneira molecular da enzima. Nesse caso, quando a enzima era levada para estufa a 40°C durante 1 hora, mantinha-se a mistura enzima-peneira molecular por aproximadamente 10 minutos, após, a peneira molecular era removida e a enzima recuperada voltava para estufa até completar 1 hora de secagem.

Este procedimento de secagem é adotado, uma vez que a lipase em estudo apresenta alta atividade catalítica em ambientes com baixo teor de água. O estudo de reuso da enzima foi acompanhado durante 8 ciclos sucessivos.

4.6.2 Influência do ultrassom na atividade de esterificação da lipase Novozym 435

Para avaliar a influência do ultrassom na atividade de esterificação da lipase Novozym 435 fez-se o mesmo procedimento descrito nos itens 4.6 e 4.6.1, no entanto, sem uso de potência ultrassônica. Posteriormente, os dados obtidos nos dois sistemas (com e sem potência ultrassônica) foram correlacionados, permitindo, dessa forma, avaliar a influência do ultrassom no processo de produção de biodiesel do óleo do fruto da macaúba.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DO FRUTO DA MACAÚBA

De forma geral, os índices de acidez e de peróxido, assim como as quantificações, por cromatografia gasosa, de Mag, Dag e Tag, têm a finalidade de verificar a qualidade de óleos e gorduras, sendo esta proporcional ao percentual de triglicerídeos. Segundo Regitano-D'arce (2006), óleos brutos de alta qualidade, como o da soja, apresentam entre 95 e 97% de triglicerídeos. Dessa forma, valores altos de índice de acidez e de índice de peróxido, implicam baixas porcentagens de triglicerídeos e, portanto, baixa qualidade da matéria-prima.

A coloração do óleo da macaúba pode ser um indicativo de sua qualidade. Rodrigues (2007), correlacionando colorações de amostras do óleo de macaúba extraídas do mesocarpo e do epicarpo do fruto com aspectos qualitativos, observou que amostras de óleos mais claras (verdes e amarelas) possuem valores de acidez entre 5-17 mgKOH/g_{óleo}. Já as amostras do mesocarpo obtidas em colorações tendendo do amarelo ao marrom, apresentam valores de acidez superiores, entre 10-90 mgKOH/g_{óleo}.

A relação coloração/índice de acidez descrita por Rodrigues (2007) também foi observada neste estudo. Os dois lotes do óleo bruto do fruto da macaúba apresentaram coloração de aspecto marrom (Figura 5.1) e alto índice de acidez, como mostra a Tabela 5.1.

Figura 5. 1 - Coloração do óleo do fruto da macaúba.**Tabela 5.1** - Características químicas do óleo do fruto da macaúba.

Características químicas	Valores	
	Lote A	Lote B
Teor de água (%)	0,64	0,61
Índice de acidez (mgKOH/ g _{óleo})	88,88	75,10* ±0,54
Índice de peróxido (meq/ Kg _{óleo})	19,41	16,42**±0,84
Mag (%)	30,7	24,2
Dag (%)	21,6	6,7
Tag (%)	8,3	13,3

* O índice de acidez deste lote foi acompanhado durante 9 semanas em amostras armazenadas em temperatura ambiente, sendo o valor apresentado a média obtida durante estas determinações (erro padrão). **O índice de peróxido deste lote foi acompanhado durante 4 semanas, sendo o valor apresentado a média obtida durante estas determinações (erro padrão).

Os valores de índice de acidez encontrados neste estudo estão de acordo com Rodrigues (2007) e Gonzalez (2011), os quais verificaram índices de acidez de 10-90 mgKOH/g_{óleo} e 79,24 mgKOH/g_{óleo} para o óleo do mesocarpo e para o óleo do fruto da macaúba, respectivamente.

Os valores de acidez apresentados são considerados altos, uma vez que, o limite máximo para óleos e gorduras refinados é de 0,6 mgKOH/g_{óleo} e de 10,0 mgKOH/g_{óleo} para óleos de palma virgem (ANVISA, 2005). De acordo com Faria (2010), o índice de acidez do óleo da amêndoa do fruto da macaúba é menor (12,9 mgKOH/g_{óleo}), fato este que pode estar associado à localização desta no fruto, a qual é protegida pelo endocarpo, sendo este envolvido ainda pelo mesocarpo e epicarpo.

De acordo com Rodrigues (2007), os rendimentos em ésteres decrescem com o aumento deste índice, pois, ao investigar a etanolise com KOH de amostras de óleo da amêndoa da macaúba, com valores de acidez entre 3,33 e 22,62 mgKOH/g_{óleo}, verificou rendimentos de 82,4% e 39,9%, respectivamente.

Com relação ao índice de peróxido, segundo Mehlenbacher (1961), esta técnica analítica determina o grau de oxidação de óleos e gorduras. No início dos processos de rancificação há formação de peróxidos orgânicos, os quais degradam os triglicerídeos levando à formação de produtos como ácidos graxos, aldeídos, monoglicerídeos e diglicerídeos, os quais são indesejáveis, pois diminuem o rendimento em ésteres (RODRIGUES, 2007).

O índice de peróxido dos lotes de óleo utilizados neste trabalho foi de 19,41 meq/Kg_{óleo} e 16,42 meq/Kg_{óleo}, como apresenta a Tabela 5.1. Rodrigues (2007) observou valores de índice de peróxido muito semelhantes aos descritos neste trabalho, entre 16-18 meq/Kg_{óleo}, em amostras de óleos do mesocarpo do fruto da macaúba. Faria (2010) determinou o índice de peróxido do óleo da amêndoa do fruto da macaúba, sendo este de 3,94 meq/Kg_{óleo}. Segundo a Anvisa (2005), para óleos com qualidade de refino é estabelecido valores máximos de 10 meq/Kg_{óleo}.

A determinação dos lipídeos simples Mag, Dag e Tag, assim como o teor de água presente nas amostras de óleo, confirmam os indicativos de deterioração apresentados pelos índices de acidez e de peróxido, o que permite caracterizar o óleo do fruto da macaúba utilizado neste estudo como um óleo de baixa qualidade.

De acordo Regitano-D'arce (2006), esse tipo de deterioração é característico de grãos de oleaginosas quando seu teor de água é mais alto que a umidade recomendada e também quando o período de armazenamento é muito longo, pois a presença de água, enzimas lipolíticas e altas temperaturas resultam na hidrólise de triglicerídeos devido ao processo de ativação das lipases naturais dos frutos e, portanto, início da hidrólise dos ácidos graxos dos triglicerídeos, causando, conseqüentemente, um aumento do teor de mono e diacilgliceróis e, portanto, de ácidos graxos livres ou oxidados, os chamados peróxidos em quantidades apreciáveis.

De acordo com Lam, Lee e Mohamed (2010), a catálise ácida e a catálise enzimática são as melhores opções para a produção de biodiesel a partir de óleos com alto conteúdo de ácidos graxos livres. No entanto, devido às peculiaridades

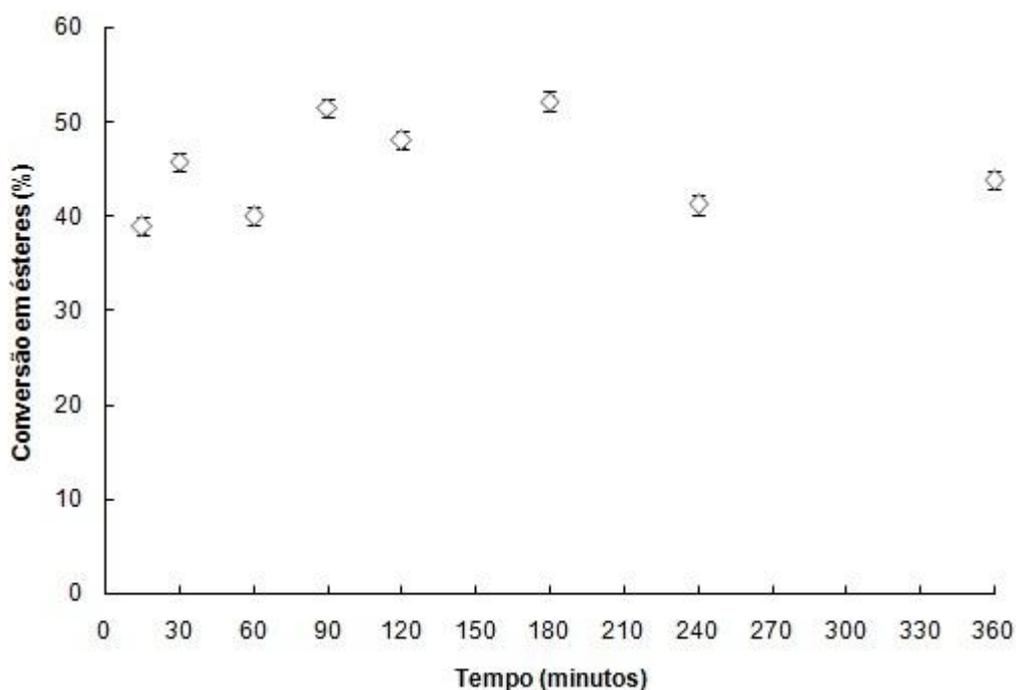
destes sistemas descritas anteriormente, o uso de catálise enzimática foi adotado neste trabalho.

5.2 ENSAIOS PRELIMINARES

Estudos iniciais visando ter um conhecimento prévio do comportamento do sistema proposto foram realizados, com o lote de óleo "A", o qual apresentou um índice de acidez de 88,88 mgKOH/g_{óleo} e índice de peróxido de 19,41 meq/Kg_{óleo}.

As condições destes experimentos foram baseadas no trabalho de Popiolski (2011), a qual obteve 78% de conversão em ésteres etílicos, sendo a condição ótima para a produção de biodiesel a partir do óleo de soja em sistema livre de solvente e banho de ultrassom, utilizando a lipase Novozym 435, a seguinte: temperatura 63 °C, concentração de enzima 27% (m/m), potência do ultrassom 40% do total da capacidade (132 W) e razão molar óleo/etanol 1:3. Os tempos da cinética reacional foram de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240 e 360 minutos, sendo os experimentos realizados em duplicata. As conversões em ésteres etílicos obtidos nesta cinética são apresentadas na Figura 5.2.

Figura 5. 2 - Cinética reacional da transesterificação enzimática do óleo do fruto da macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom. Condições: concentração de enzima 27% (m/m), razão molar óleo/etanol 1:3, potência do ultrassom 40% do total da capacidade (132W) e temperatura de 63°C.



De acordo com a Figura observa-se que a conversão máxima em ésteres foi de 66,3%, no tempo de 300 minutos.

5.2.1 Planejamento experimental

Realizou-se um planejamento experimental 2^{4-1} , com triplicata do ponto central, de modo a realizar um "screening" das variáveis importantes no processo. As seguintes variáveis foram investigadas: temperatura, razão molar óleo/etanol, concentração de enzima e potência do ultrassom, a resposta é apresentada na Tabela 5.1 como porcentagem de conversão em ésteres etílicos do óleo do fruto da macaúba. Neste planejamento fixou-se o tempo em 90 minutos, com base nos resultados obtidos nos ensaios preliminares.

Tabela 5.2 - Matriz com valores decodificados e reais dos fatores investigados no planejamento experimental e resposta da interação de variáveis.

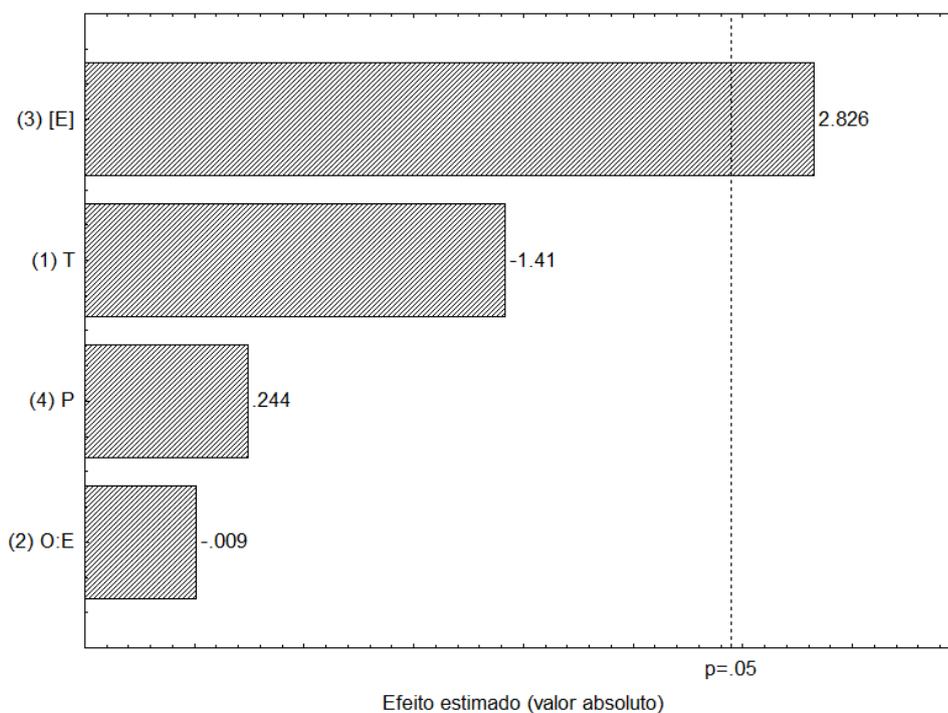
Ensaio	T	O:E	[E]	P	Conversão em ésteres
1	(-1) 40	(-1) 1:3	(-1) 5	(-1) 40	38,6
2	(1) 70	(-1) 1:3	(-1) 5	(1) 100	38,5
3	(-1) 40	(1) 1:10	(-1) 5	(1) 100	42,0
4	(1) 70	(1) 1:10	(-1) 5	(-1) 40	35,6
5	(-1) 40	(-1) 1:3	(1) 20	(1) 100	47,1
6	(1) 70	(-1) 1:3	(1) 20	(-1) 40	45,0
7	(-1) 40	(1) 1:10	(1) 20	(-1) 40	48,7
8	(1) 70	(1) 1:10	(1) 20	(1) 100	42,8
9	(0) 55	(0) 1:6,5	(0)12,5	(0) 70	46,8
10	(0) 55	(0) 1:6,5	(0)12,5	(0) 70	47,4
11	(0) 55	(0) 1:6,5	(0)12,5	(0) 70	48,8

T=Temperatura (°C); O:E=razão molar óleo/etanol (m/m); [E]=concentração de enzima (%); P=potência do ultrassom (%).

Conforme apresenta a Tabela 5.2, as respostas obtidas foram insatisfatórias, sendo menores do que 50% e, portanto, menores em relação aos experimentos iniciais, o que é justificável, teoricamente, devido à menor concentração de enzima utilizada. Dentre as quatro variáveis analisadas, somente a concentração de enzima foi significativa neste processo, com 95% de confiança, como apresenta a Figura 5.3.

Batistella et al. (2012), investigando o efeito destas variáveis e da concentração de água na produção de biodiesel por transesterificação do óleo de soja com solvente orgânico em sistema de ultrassom e utilizando a lipase Novozym 435 também observou o efeito positivo significativo da concentração desta enzima.

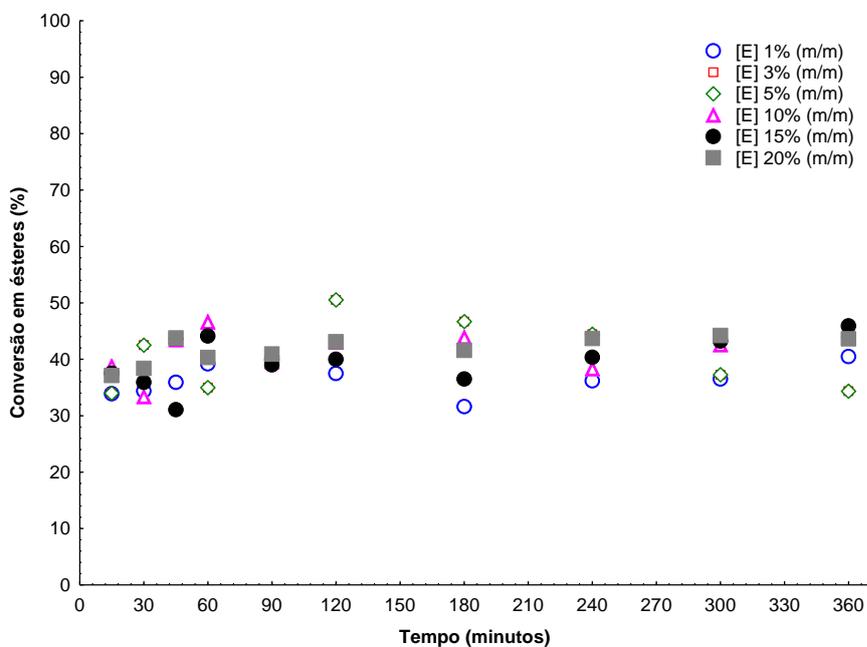
Figura 5.3 - Diagrama de Pareto mostrando o efeito da concentração de enzima, temperatura, potência e razão molar óleo/etanol na produção de biodiesel enzimático do óleo do fruto da macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.



5.2.2 Efeito da concentração de enzima na cinética de transesterificação

Tendo em vista que somente a concentração de enzima apresentou-se significativa no processo, realizou-se nova cinética reacional, variando a concentração de enzima em 1, 3, 5, 10, 15 e 20% (m/m), mantendo as outras variáveis nas condições estabelecidas pelo nível -1 do planejamento experimental (40°C, razão molar óleo/etanol 1:3 e 40% da potência do ultrassom). As respostas obtidas nessas condições são apresentadas na Figura 5.4.

Figura 5.4 - Cinética reacional da transesterificação enzimática do óleo do fruto da macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função do tempo e de diferentes concentrações da lipase Novozym 435. Condições: razão molar óleo/etanol 1:3; potência do ultrassom 40% da capacidade máxima (132W) e temperatura de 40°C.

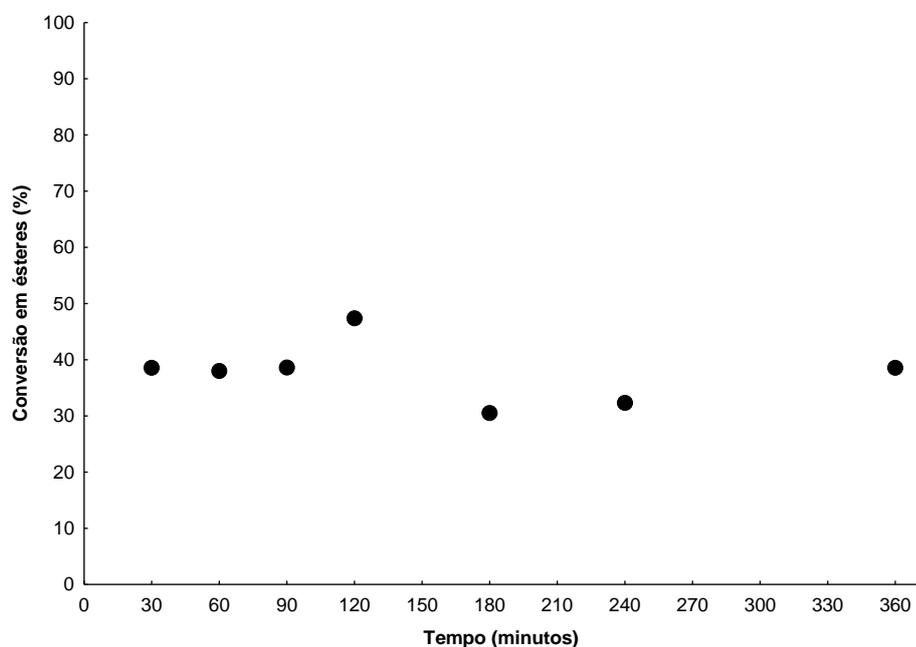


Como pode ser visualizado na Figura 5.4, o perfil de conversão em ésteres foi muito semelhante ao obtido no planejamento inicial onde o efeito de todas as variáveis foi investigada. Também observou-se que não há diferenças importantes, em termos de conversão, quando se altera a concentração de enzima, isso, provavelmente está ligado ao uso do planejamento fracionário. Nestes planejamentos é importante considerar a existência de liases, as quais podem estar mascarando o efeito de algumas variáveis importantes no processo de produção por excluïrem alguns ensaios do planejamento, como o que consideraria os seguintes níveis (1), (-1), (1) e (1) para os respectivos fatores, potência ultrassônica, temperatura do banho, razão molar óleo/etanol e concentração de enzima.

A conversão em ésteres de 66,3% obtida na cinética reacional apresentada na Figura 5.2, sugere que a convertibilidade do óleo do fruto da macaúba, mesmo com alta acidez, é superior a 50%. Dessa forma novas investigações foram feitas com a finalidade de reproduzir e melhorar os resultados iniciais, como um experimento aleatório ao planejamento, sendo definidas as seguintes condições

para este: concentração de enzima 20% (m/m), razão molar óleo/etanol 1:9, potência do ultrassom 100% da capacidade máxima (132 W) e temperatura de 65 °C. Os tempos desta cinética reacional foram: 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 360 minutos. Entretanto, como pode ser visualizado na Figura 5.5, as conversões mantiveram-se inferiores a 50%.

Figura 5.5 - Cinética reacional da transesterificação enzimática do óleo do fruto da macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função do tempo. Condições: concentração da lipase Novozym 435, 20% (m/m); razão molar óleo/etanol 1:9; potência do ultrassom 100% da capacidade máxima (132W) e temperatura de 65°C.



5.2.3 Fatores relacionados às baixas conversões em ésteres

A produção de biodiesel enzimático a partir do óleo do fruto da macaúba em sistema de ultrassom e livre de solvente apresenta-se como uma nova e promissora tecnologia e como tal, torna necessária a especulação para o conhecimento de questões básicas que podem atuar de forma expressiva sobre o sistema. Com base nisso, considerou-se que as baixas conversões observadas possam estar associadas a três fatores:

i. perda de triglicerídeos, tendo como consequência baixas taxas de conversão em biodiesel (LEUNG, WU e LEUNG, 2010). Isso ocorre porque monoglicerídeos e diglicerídeos têm a propriedade de formar misturas devido ao grupamento OH que fica exposto (REGITANO-D'ARCE, 2006). Grupos hidroxilas expostos favorecem a ligação dos substratos alcoólicos e, portanto, diminuem a concentração destes no meio reacional. Isto tem como consequência baixa produção de ésteres, pois, com poucas moléculas alcoólicas disponíveis, há uma queda nas reações de produção de biodiesel (ésteres) a partir dos ácidos graxos;

ii. óleos vegetais com alta acidez e alta umidade apresentam a tendência de favorecer reações de esterificação (quando em contato com álcool), a qual é indesejável (JEGANNATHAN et al. 2008), uma vez que, gera como subprodutos glicerol e água. A água formada, provavelmente, levará à hidrólise de mais ácidos graxos e, conseqüentemente, a menores conversões, assim como, dificultará a separação do glicerol;

iii. alta razão molar óleo/etanol (1:9) e o alto teor de água (0,64%) nas amostras, associadas aos efeitos gerados pelo ultrassom deve ser considerada. Os sistemas de ultrassom possuem a propriedade de gerar a agitação do meio através da formação de cavitações em um líquido (MARTINES, DAVOLOS e JAFELICCI, 2000). A implosão de bolhas durante o processo cavitacional resulta no aumento de choque entre moléculas e, portanto, em agitação eficiente do sistema, além de favorecer a emulsão entre líquidos hidrofílicos e hidrofóbicos. Como consequência, as reações ocorrem com velocidades e taxas de conversão maiores (YACHMENEV et al. 2004). No entanto, quando há um excesso de líquido, a energia cinética no meio reacional pode aumentar demasiadamente causando efeitos indesejáveis como a desnaturação ou baixa atividade de enzimas, devido a danos ao suporte enzimático ou remoção da monocamada de água ligada à enzima, sendo estes fatores determinantes para a expressão de suas propriedades (atividade, estabilidade e especificidade). Assim, pequenas variações no conteúdo de água podem provocar grandes modificações na atividade enzimática.

Outros trabalhos condizem com esta situação, por exemplo, Shimada et al. (1999), ao investigarem a metanólise de óleos vegetais em sistema contínuo observaram que a lipase imobilizada de *Candida antarctica* (Novozym 435), quando submetida a ambientes com alto teor de água favorece a hidrólise dos ácidos graxos dos triacilgliceróis, o que acarreta diminuição nas conversões em ésteres.

Batistella et al. (2012), investigando a produção de biodiesel do óleo de soja por transesterificação catalisada pela lipase Novozym 435 em solvente orgânico e banho de ultrassom, demonstraram que o baixo teor de água nestes sistemas é imprescindível para que obtenham-se valores satisfatórios de conversão, pois, o autor observou conversões em ésteres de 66,9% sem adição de água no sistema, no entanto, quando a água foi adicionada na concentração de 10% (m/m) as conversões em ésteres foram de apenas 20,4%.

Trentin et al. (2012), investigando o efeito da concentração da enzima imobilizada Novozym 435 na produção de biodiesel de óleo de soja, em sistema livre de solvente em banho de ultrassom, observaram que dentre as variáveis analisadas a água apresenta um efeito significativo negativo sobre este processo. A mesma observação foi feita por Faccio (2004), ao estudar a alcoólise do óleo de mamona e do óleo de soja em solvente orgânico, tendo como catalisador a lipase Novozym 435, mostrando que o excesso de água pode deslocar o equilíbrio da reação (no sentido da hidrólise), corroborando que a enzima necessita de apenas uma monocamada de água para manter sua capacidade catalítica.

Devido ao exposto, o possível excesso de água do meio reacional (0,64%) foi removido com o uso de peneiras moleculares. Outras duas questões envolveram a remoção da água do sistema: (1) a análise quantitativa da conversão em ésteres é feita por cromatografia gasosa, a qual tem como princípio a rápida volatilização dos compostos a serem analisados. Como a água não volatiliza rapidamente, sua presença pode causar graves problemas ao equipamento e (2) a água não agrega valor econômico ao processo de produção de biodiesel e torna difícil a separação do glicerol, portanto, deve ser removida de forma a atender as especificações técnicas e as propriedades necessárias para a combustão completa do biodiesel em motores por compressão.

5.2.4 Influência do uso de peneira molecular na transesterificação enzimática do óleo de fruto de macaúba

Peneiras moleculares de 4 Å foram utilizadas nas reações com a finalidade de remover a água em excesso do sistema e permitir maiores conversões dos ácidos graxos em ésteres. As proporções utilizadas de peneira molecular foram: 0, 10, 20, 50 e 100% (m/m), conforme mostra a Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Conversão em ésteres do óleo do fruto da macaúba em função do tempo e de diferentes concentrações de peneira molecular, utilizando a lipase comercial imobilizada Novozym 435.

Tempo (minutos)	Concentração de peneira molecular (m/m)				
	0%	10%	20%	50%	100%
	Conversão em ésteres (%)				
30	38,5	39,3	62,8	49,4	46,2
60	38,0	40,3	40,4	53,4	44,1
120	47,3	39,1	46,4	47,9	60,2
180	30,5	40,6	47,4	53,9	51,2
240	32,3	43,9	42,4	49,4	47,7

De acordo com a Tabela, os resultados apresentam-se mais expressivos a partir do uso de 20% de peneira molecular, onde são observadas diferenças de até 24% sobre a conversão em ésteres. No tempo de 30 minutos com 0 e 20% de peneira molecular de 4 Å, as conversões em ésteres foram de 38,5% e 62,8%, respectivamente. Já no tempo de 120 minutos, com 0 e 100% de peneira molecular, obteve-se conversões em ésteres de 47,3 e 60,2%, respectivamente. Estas conversões mostraram-se muito próximas às obtidas nos estudos iniciais (66,3%), conforme mostra a Figura 5.2 e evidenciaram a importância da remoção do excesso de água do meio reacional para uma maior produção de biodiesel a partir da oleaginosa em estudo.

O teor de umidade após decorrido o tempo reacional de 120 minutos e com 100% de peneira molecular foi de 0,36%, indicando que houve remoção de 56,25% do teor de água do meio, em comparação com o teor de água inicial (0,64%). Segundo estudo realizado por Yu et al. (2010), teores de umidade de 0,5% são ideais para que a lipase imobilizada Novozym 435 apresente atividade catalítica

ótima. A concentração ótima de água no meio reacional minimiza a formação de produtos de hidrólise indesejáveis e mantém a enzima com alta capacidade catalítica (MALCATA et al. 1990). Já o excesso de água forma uma camada sobre o biocatalisador e impede o acesso de substratos lipofílicos aos sítios catalíticos, além de causar danos à estrutura conformacional protéica, devido à remoção da monocamada de água do sítio ativo, podendo inativá-la (AQUINO, 2010).

Neste contexto, Lee et al. (2008), investigando a estabilidade da lipase imobilizada Novozym 435 em esterificação direta da glicose com ácido laúrico em reator com irradiação ultrassônica, verificaram que o uso de peneira molecular de 4 Å na concentração de 15% aumentou em 4,7 vezes a atividade da enzima em um meio supersaturado. Chamouleau et al. (2001), investigando a esterificação da frutose com ácido palmítico catalisado pela lipase imobilizada de *Candida antarctica*, também verificaram que o uso de peneira molecular de 4 Å no meio reacional aumentou o desempenho da reação e que a atividade de água inicial afeta intensamente a reação. Tuzuki et al. (1999), observaram que a água contida na mistura reacional afetava a conversão da glicose na reação de síntese de palmitato de glicose catalisada por uma lipase modificada, uma vez que a conversão da glicose foi maior que 90% na presença da peneira molecular, enquanto que na ausência deste agente dessecante a conversão foi inferior a 20%.

Aquino (2010), investigando a esterificação da sacarose com ácido acrílico para produção de acrilato de sacarose, tendo como catalisador a lipase imobilizada Novozym 435, temperatura de 65 °C e razão molar sacarose/ácido acrílico 1:6 obteve conversões diretamente proporcionais ao acréscimo de peneira molecular (20, 40, 60, 70 e 76%; com 0, 100, 200, 300 e 400g/L de peneira molecular, respectivamente). Esta observação também foi feita por Ayres (2010) durante a esterificação do ácido acrílico com frutose utilizando a lipase imobilizada Novozym 435 e peneira molecular de 3 Å. As conversões de frutose após 24 h de reação foram 24, 65, 79, 86, 84 e 85% com 0, 1, 2, 3, 4 e 5 g de peneira molecular, respectivamente.

Yu et al. (2010), investigando a transesterificação do óleo de soja em ultrassom com potência de 50% + 50 rpm de agitação e temperatura de 40 °C, observaram que a adição de metanol até razão molar óleo/álcool 1:6 aumenta a atividade enzimática gradualmente. No entanto, a partir deste ponto, a adição de maiores alíquotas de álcool leva ao decréscimo da atividade enzimática. Segundo os

autores, este fato pode estar associado ao aumento do processo cavitacional, pois, quando maiores volumes de álcool são adicionados ao sistema reacional há também um maior número de moléculas no sistema, as quais aumentarão a energia cinética no sistema e, conseqüentemente, a formação dos produtos. No entanto, isto é verdadeiro até certo ponto, pois quando se verifica um decréscimo da atividade enzimática tem-se um indicativo de que a energia cinética do meio está excessivamente alta, sendo a alta razão de substrato uma das variáveis responsável por este evento.

Badday et al. (2013), também observaram que um aumento na razão molar, através da adição de maiores quantidades de metanol, melhorou o rendimento de reações assistidas com ultrassom. Os autores atribuíram este evento ao aumento de bolhas de cavitação, quando a razão do substrato alcoólico foi elevada, o que favoreceu a formação de uma emulsão e, conseqüentemente, de uma concentração miscelar crítica adequada entre os substratos (metanol/óleo) permitindo a abertura da “tampa” (*lid*) da enzima e conseqüente exposição da sua tríade de aminoácidos e de sua atividade catalítica ótima (VILLENEUVE et al. 2000).

A análise dos dados obtidos neste trabalho em paralelo aos dados da literatura sugere que o uso de peneira molecular possibilitou a ocorrência de reações de transesterificação sobre o óleo do fruto da macaúba, assim como, a manutenção de um nível de energia adequado ao meio, permitindo que conversões consideravelmente superiores fossem obtidas, conforme exposto no item 5.2.3, na descrição dos fatores ii e iii, relacionados às sugestões para as baixas conversões em ésteres.

5. 3 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS IDEAIS

Com base nos resultados apresentados anteriormente, definiu-se algumas condições para produção de ésteres etílicos, por transesterificação enzimática do óleo do fruto da macaúba, como:

- razão molar óleo/etanol 1:9,
- potência do ultrassom 100% da capacidade máxima (132 W),
- temperatura de 65 °C,
- concentração de peneira molecular 100% (m/m).

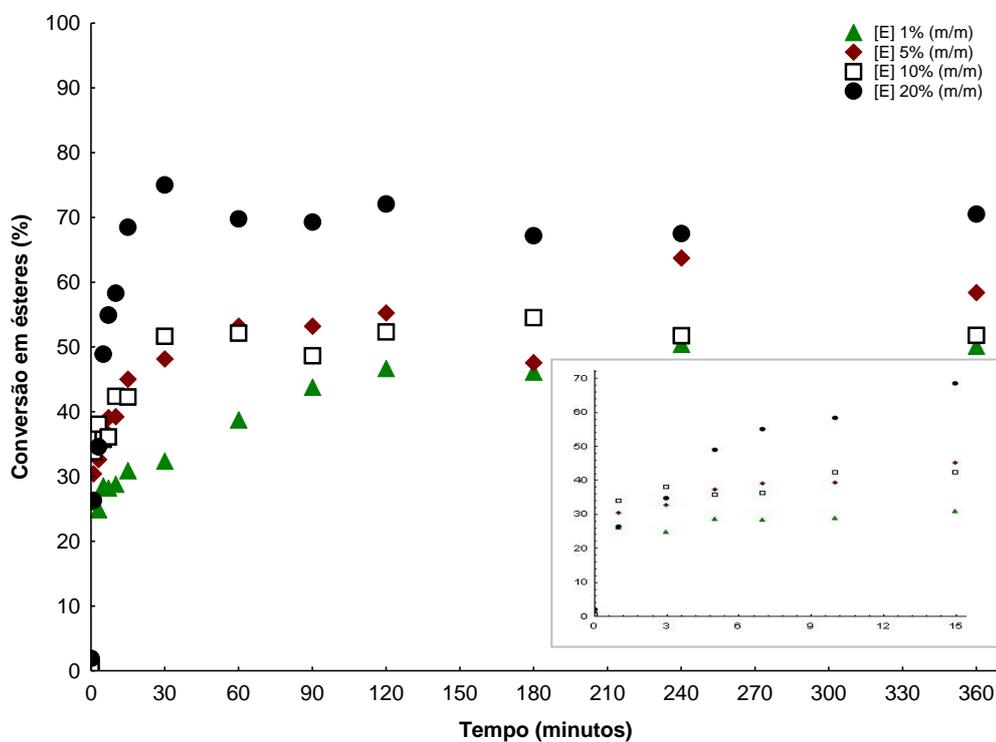
Tendo em vista que a concentração de enzima foi a única variável significativa no processo, sua concentração não foi fixada, assim como, o tempo reacional. Dessa forma, a cinética reacional ocorreu com concentração de enzima de 1, 5, 10 e 20% (m/m) e tempos de 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 360 minutos. Após estas definições, todos os experimentos foram realizados com o lote de óleo "B", o qual apresentou menor deterioração de acordo com as análises realizadas (índice de acidez de 75,10 mgKOH/g_{óleo}, índice de peróxido de 16,42 meq/Kg_{óleo} e percentual de Tag de 13,3%).

O uso de peneira molecular na concentração de 100% foi adotado uma vez que não se conhece a real capacidade adsorptiva deste agente dessecante aliado ao fato de que as quantificações em ésteres são realizadas em cromatografia gasosa, a qual exige que a mínima quantidade possível de água esteja presente para garantir a manutenção do equipamento e a qualidade das análises.

5.3.1 Determinação da concentração de enzima

Neste trabalho, a concentração enzimática para produção de biodiesel a partir do lote "B" do óleo do fruto da macaúba em sistema ultrassônico, foi avaliada nas concentrações de 1, 5, 10 e 20% (m/m), como mostra a Figura 5.6. No detalhe da Figura 5.6 as conversões de 0 a 15 minutos podem ser melhor visualizadas.

Figura 5.6 - Cinética reacional da conversão em ésteres em função do tempo e da concentração da lipase Novozym 435. Condição: razão molar óleo/etanol 1:9, potência do ultrassom 100%, concentração de peneira molecular 100% (m/m) e temperatura 65 °C.



A partir da Figura 5.6 pode-se observar que as conversões em ésteres em todos os tempos, utilizando 1, 5 e 10% de enzima ficam próximas a 50%, com exceção do tempo de 240 minutos e 5% de enzima, onde observou-se conversões em ésteres de 63,8%.

As conversões em ésteres obtidas com concentração enzimática de 20% (m/m) foram consideravelmente superiores, sendo que a partir de 15 minutos já foram observadas conversões de 68,5% e em 30 minutos as conversões são superiores a 70,0%, como mostra a Figura 5.6.

Segundo Stamenkovic´; Velickovic´ e Veljkovic´ (2011), a etanolise de óleos vegetais catalisada por enzimas, geralmente ocorre com quantidades de lipase que variam de 5 a 30%. Trentin et al. (2012), relatam que as maiores conversões em ésteres etílicos do óleo de soja (85,7%), utilizando banho de ultrassom, ocorrem quando a concentração da lipase Novozym 435 é de 27% em relação a massa molar.

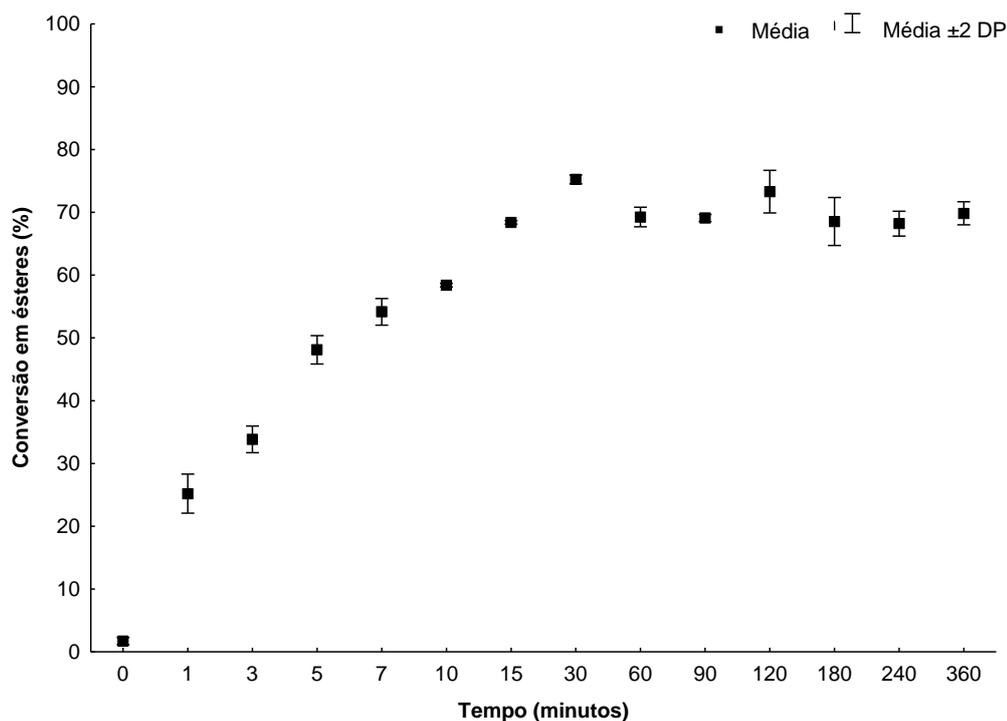
Oliveira et al. (2005), ao realizarem ensaios de produção de ésteres etílicos a partir do óleo de mamona e de soja com as enzimas comerciais Lipozyme IM e

Novozym 435 em solvente orgânico, observaram que a concentração de enzima é um dos parâmetros que afeta de forma positiva o processo de conversão. Para uma maior concentração de enzima, tem-se uma maior disponibilidade de centros ativos, incrementando as taxas de reação e diminuindo, conseqüentemente, o tempo de reação.

A visualização da cinética reacional apresentada pela Figura 5.6 permitiu a definição do tempo reacional em 30 minutos, assim como da concentração da lipase Novozym 435 em 20% (m/m). Estas condições mostraram-se ideais para a produção de biodiesel do óleo do fruto da macaúba em ultrassom, onde conversões de 75,2% foram obtidas, como pode ser visualizado na Figura 5.7, onde a cinética foi realizada em duplicata.

Em um processo de produção é extremamente importante que conversões máximas sejam obtidas em tempos reacionais curtos, como ocorreu neste estudo (75,2% em ésteres em 30 minutos), pois, isso implica em menor gasto energético e, portanto, em maior viabilidade econômica. Badday et al. (2013), durante a otimização do processo de produção de biodiesel a partir de óleo de pinhão-manso utilizando catalisador ácido e assistido por energia ultrassônica, observaram que o aumento da amplitude do ultrassom leva a um ligeiro aumento do rendimento nos tempos iniciais.

Figura 5.7- Cinética reacional da conversão em ésteres a partir da transesterificação enzimática de óleo de fruto de macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom. Condições: concentração da lipase Novozym 435 20% (m/m); razão molar óleo/etanol 1:9, potência do ultrassom 100% da capacidade máxima (132W), concentração de peneira molecular 100% (m/m) e temperatura de 65°C.



A partir da Figura 5.7 observa-se um aumento constante da conversão em ésteres no decorrer do tempo reacional de 0 a 30 minutos, sugerindo, de acordo com o Modelo de Michaelis-Menten, uma reação de ordem 1. Logo após, há uma pequena queda na conversão em ésteres em função do tempo o que pode estar atrelado à complexação da maioria das moléculas de enzima com seus substratos, sendo a reação neste intervalo considerada de ordem 0.

A conversão máxima em éster obtida neste trabalho (75,2%) é muito próxima ao rendimento em ésteres descrito por Freitas et al. (2012), de 70,1% enquanto investigavam a etanolise enzimática do óleo da macaúba assistida por irradiação micro-ondas e agitação magnética, utilizando como biocatalisador a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂PVA na concentração de 20% (m/m), razão molar óleo/etanol 1:7, temperatura de 50°C e tempo reacional de 12 horas. Outra semelhança deste trabalho com o de Freitas et al. (2012), é a razão molar

óleo/etanol descrita como a ideal (1:7 para Freitas et al. 2012 e 1:9 neste trabalho), indicando que, provavelmente, o excesso de álcool tido com estas razões molares é a relação estequiométrica mais próxima ao ótimo para transesterificar grande parte das moléculas de ácidos graxos do óleo do fruto da macaúba e também para diminuir a viscosidade do óleo, visto que a redução da viscosidade está diretamente relacionada com maiores conversões (MOREIRA et al. 2007). Segundo Freitas et al. (2012), na razão molar óleo/etanol 1:7, menores valores de viscosidade (8,9 cSt) foram verificadas.

Nogueira et al. (2010), investigando o efeito da irradiação de micro-ondas na transesterificação do óleo da macaúba, utilizando a lipase imobilizada Novozym 435 como catalisador e etanol como substrato alcoólico, observaram conversões máximas em ésteres etílicos de 45% quando utilizaram concentração de enzima de 2,5%, razão molar óleo/etanol 1:9, temperatura de 30 °C e tempo reacional de 15 minutos. Segundo os autores, este sistema apresentou problemas quanto à agitação e não permitiu uma eficiente transferência de massa entre os reagentes, por isso, os melhores resultados foram obtidos com baixas concentrações de enzima.

Rodrigues (2007), investigando a transesterificação do óleo do mesocarpo da macaúba em sistemas homogêneos, com índice de acidez de 30 mgKOH/g_{óleo}, utilizando como catalisadores o ácido clorídrico e o ácido sulfúrico e tempo reacional de 6 a 10 horas, obteve conversões em ésteres etílicos de 94 e 98%, respectivamente. Em meios heterogêneos, uma amostra de óleo do mesocarpo com índice de acidez de 85,5 mgKOH/g_{óleo}, transesterificada com o catalisador pentóxido de vanádio, apresentou conversões de 99,2%, após 20 horas. Neste mesmo meio, os catalisadores cloreto de cobre e pentóxido de vanádio, foram utilizados para transesterificar uma amostra de óleo da amêndoa da macaúba, com índice de acidez de 5,5 mgKOH/g_{óleo}, sendo relatadas conversões de 99,4% em 4 horas e 99,5% em 25 horas, respectivamente. As altas conversões obtidas por este autor podem ser decorrentes da maior qualidade do óleo da macaúba, pois, conforme relata o autor, todo o processo desde a colheita dos frutos e extração do óleo foi realizada pela própria equipe, o que permite maior controle de qualidade química e microbiológica da matéria-prima.

Rezende (2009) investigou a transesterificação por catálise básica, empregando hidróxido de potássio, para produção de ésteres metílicos a partir de três amostras de óleo da macaúba: óleo bruto, óleo desacidificado e óleo submetido

a refino. Os rendimentos em ésteres metílicos foram 84,1, 96,1 e 94,3%, respectivamente, com concentração do catalisador de 1% em relação à massa do óleo, razão molar óleo/metanol 1:6, tempo reacional de 45 minutos e temperatura ambiente. Tendo em vista que o óleo bruto da macaúba apresenta alta acidez, provavelmente, neste trabalho foi realizado um pré-tratamento deste com emprego de catalisador ácido e posterior transesterificação por catálise alcalina, o que justifica os altos rendimentos em ésteres.

Díaz (2012) determinou a convertibilidade máxima em ésteres de duas amostras do óleo do fruto da macaúba com índices de acidez de 89,15 e 90,08 mgKOH/g_{óleo}. Os valores encontrados para convertibilidade foram, respectivamente, de 89,2 e de 90,0%. O autor definiu convertibilidade como o conteúdo de ésteres obtidos por método de conversão completa dos ácidos graxos da amostra em ésteres metílicos correspondentes, independente da sua forma no óleo. Com base no estudo de Díaz (2012), pode-se dizer que os resultados obtidos neste estudo são extremamente promissores¹, demonstrando que a conversão obtida (75,2% em 30 minutos) é, provavelmente, muito próxima a conversão máxima em biodiesel que o óleo do fruto da macaúba, com índice de acidez de 75,1 mgKOH/g_{óleo} (37,74%) pode fornecer (informação verbal¹). No entanto, é necessário determinar essa relação índice de acidez/convertibilidade máxima em outras amostras de óleo de tal forma que essa observação possa ser apresentada como uma peculiaridade ou não do óleo do fruto da macaúba.

Este trabalho também permite frisar a eficiência do processo de transesterificação enzimática sobre óleos com alto índice de acidez. Observação esta também verificada por Souza et al. (2009), ao obter conversões em ésteres de 83,5% enquanto estudava a esterificação do óleo de soja desodorizado e destilado (subproduto do refino do óleo de soja), com índice de acidez de 144,4 mg KOH/g_{óleo}, em reator descontínuo e sob agitação mecânica, com temperatura de 50°C, concentração da lipase Novozym 435 de 3% e razão molar óleo/etanol de 1:2. Outro apontamento importante a ser feito com este trabalho é a possível viabilidade na produção de biodiesel a partir deste tipo de matéria-prima, pois, como se apresentam deterioradas tem menor valor de compra no mercado e, portanto, podem vir a ser uma alternativa viável para diminuir o custo final do biodiesel, o qual,

¹ Informação verbal obtida de Díaz em Florianópolis, em 2012.

segundo Padula et al. (2012), chega a ser 20% maior do que o do combustível de origem fóssil. No entanto, devido às especificações técnicas regulamentadas para o biodiesel, são necessárias outras determinações para que tal hipótese seja confirmada.

Alguns trabalhos sobre produção de biodiesel enzimático em sistema de ultrassom são relatados para o óleo de soja. Michelin et al. (2012), investigando a transesterificação enzimática do óleo de soja em sistema livre de solvente e banho de ultrassom, observaram conversões de 61,9%, nas seguintes condições: concentração da lipase imobilizada Novozym 435 de 20% (m/m), razão molar óleo/etanol de 1:9, temperatura de 65 °C, potência do ultrassom de 100% da capacidade máxima (132 W) e tempo reacional de 4 horas. Trentin et al. (2012), obtiveram rendimentos em ésteres de 85% ao transesterificar o óleo de soja em sistema de ultrassom e livre de solvente, nas seguintes condições otimizadas: temperatura de 70 °C, razão molar óleo/etanol 1:3, concentração da lipase imobilizada Novozym 435 de 20% (m/m), potência ultrassônica de 40% da capacidade máxima (132 W) e tempo reacional de 1 hora.

Batistella et al. (2012), relatou a conversão em ésteres de 57,5%, enquanto investigavam a transesterificação do óleo de soja no mesmo sistema descrito acima, mas com uso de solvente orgânico, concentração da lipase imobilizada Novozym 435 de 27% (m/m), razão molar óleo/etanol de 1:3, potência ultrassônica de 40% da capacidade máxima (132 W), temperatura de 43 °C e tempo reacional de 4 horas. Já com a enzima Lipozyme RM IM, as conversões em ésteres foram de 86,5%, utilizando concentração enzimática de 12,9%, temperatura de 77°C e demais condições iguais as descritas anteriormente.

Rodrigues et al. (2009), investigando a transesterificação etanólica do óleo de soja (Índice de acidez 0,2 mgKOH/g_{óleo}) em sistema de ultrassom, utilizando como catalisador hidróxido de sódio, obtiveram rendimentos de 91,8% em ésteres no tempo de 30 minutos, temperatura de 29 °C, razão molar óleo/etanol 1:10,2 e concentração do catalisador de 0,35%.

Levando em consideração que o óleo de soja refinado apresenta cerca de 98% de triglicerídeos e índice de acidez de 0,6 mgKOH/g_{óleo}, teoricamente as conversões em ésteres em condições otimizadas são próximas a 100%. Dessa forma, quando comparamos as conversões e/ou rendimentos em ésteres obtidos nos trabalhos descritos com as obtidas neste trabalho, observa-se que o sistema

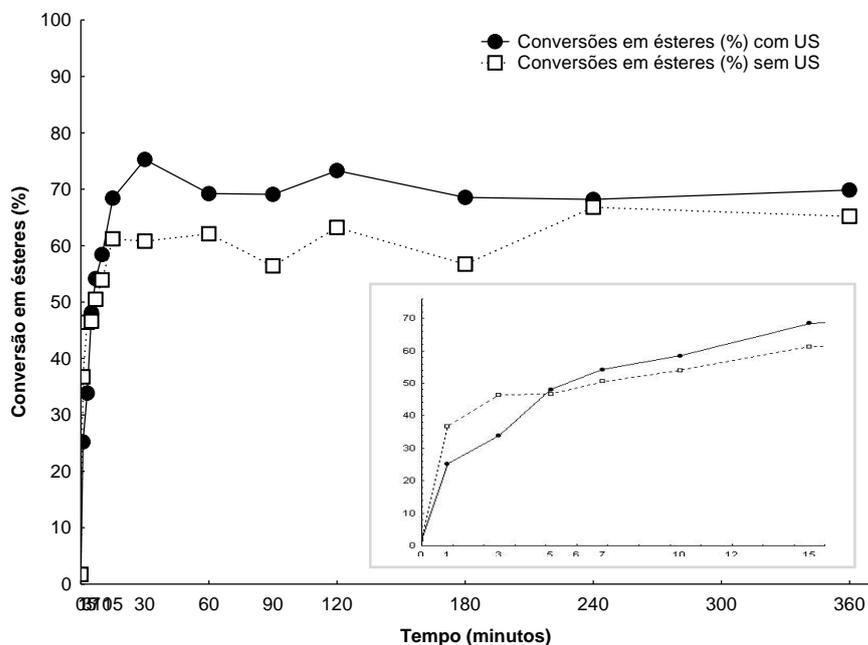
proposto apresentou eficiência na conversão de ácidos graxos em monoalquil ésteres de ácidos graxos. Além disso, mostra que a aplicação do óleo do fruto da macaúba pode ir muito além do usual (matéria-prima para produção de sabão), podendo trazer benefícios sociais e econômicos às comunidades onde o plantio desta palmeira já está bem estabelecido.

Com a otimização deste processo de produção poder-se-á atingir a conversão máxima em ésteres para este óleo com condições menores de temperatura e peneira molecular, o que aumentaria a viabilidade deste sistema se a alta conversão em ésteres, observada neste trabalho, for mantida em tempos curtos. Pois, sabe-se que o aumento da temperatura eleva a velocidade da reação por aumentar a energia livre no sistema e portanto, facilitar a complexação entre catalisador e substratos, dessa forma, com menores temperaturas, possivelmente, a reação terá uma duração maior e novos estudos sobre efeitos do ultrassom na atividade de esterificação da lipase deveriam ser conduzidos.

5.3.2 Estudo da influência do ultrassom

A Figura 5.8 apresenta a influência do ultrassom na produção de biodiesel enzimático do óleo do fruto da macaúba. Conversões em ésteres nos tempos de 0 a 15 minutos podem ser adequadamente visualizadas no detalhe da Figura 5.8.

Figura 5.8- Influência do ultrassom na produção de biodiesel enzimático do óleo do fruto da macaúba em sistema livre de solvente. Condições: concentração da lipase comercial imobilizada Novozym 435 de 20% (m/m), razão molar óleo/etanol de 1:9 (m/m), concentração de peneira molecular de 100% (m/m), potência do ultrassom 100% da capacidade máxima (132W) e temperatura de 65°C.



Conforme demonstrado na Figura 5.8, em tempos menores (0 a 15 minutos), o uso do ultrassom não gerou diferenças importantes, em termos de conversão. A partir de 30 minutos, quase todos os pontos com 100% de potência do ultrassom apresentam diferenças percentuais, de conversão em ésteres, acima de 10% quando comparados aos pontos do branco – sem uso da potência do ultrassom – sugerindo, dessa forma, que houve grande vantagem com o uso desse sistema no processo reacional.

Segundo Stavarache; Vinatoru e Maeda (2006), os ésteres de ácidos graxos formados sob irradiação ultrassônica são idênticos aos formados em processos convencionais, no entanto, o tempo reacional é significativamente menor, pois, uma das principais funções do sistema ultrassônico é acelerar o processo de transesterificação em até 60 vezes, quando comparado ao processo tradicional (BIOSONIC, 2012). Na Figura 5.8, esta peculiaridade do ultrassom, em permitir que altas conversões sejam obtidas em tempos curtos, pode ser observada quando comparamos a conversão máxima obtida com ultrassom de 75,2% em 30 minutos, com a conversão máxima obtida sem ultrassom de 66,8% no tempo 240 minutos.

Esta observação também pode ser bem correlacionada quando se compara as conversões em ésteres máximas obtidas neste trabalho, 75,2% em 30 minutos, com o trabalho de Freitas et al. (2012), onde a transesterificação enzimática do óleo de macaúba assistida por irradiação de micro-ondas permitiu rendimentos em ésteres de 70,1% em 12 horas. Outro exemplo decorrente dessa observação é a produção de ésteres metílicos por transesterificação do óleo de soja tendo como catalisador hidróxido de potássio 1%, razão molar óleo/álcool 1:6 e potência do ultrassom de 20 KHz (150 W) apresentando rendimento em ésteres de 99% em 10 minutos enquanto que com agitação mecânica a conversão em ésteres foi de 97% em 60 minutos (Jl et al. 2006).

Tendo em vista que o óleo bruto do fruto da macaúba, em estudo, apresentava grande quantidade de material proveniente de outras partes do fruto, como apresentado na Figura 4.1, a agitação fornecida pelas ondas ultrassônicas pode ter auxiliado no aumento das conversões em ésteres. Segundo Veljkovic´; Avramovic´ e Stamenkovic´ (2012), na presença de catalisador sólido, o ultrassom pode aumentar a área de superfície da reação, a intensidade da mistura e o transporte de massa, pois, pode desalojar os materiais que ocupam a superfície do catalisador, permitindo maior acesso ao sítio catalítico da enzima.

Lee et al. (2008), investigando a capacidade da irradiação de ultrassom em aumentar a dissolução da glicose em duas soluções (uma solução saturada e uma supersaturada) e a atividade da lipase imobilizada Novozym 435, observaram que a velocidade de dissolução inicial da glicose sob agitação magnética + irradiação de ultrassom foi cerca de duas vezes maior do que somente com agitação magnética. Em reações de transesterificação de glicose com laurato de vinila, as conversões foram superiores, em torno de 10%, nas reações conduzidas com uso de agitação magnética + irradiação de ultrassom. Estes dados, segundo os autores, sugerem que o ultrassom pode aumentar a atividade enzimática, assim como, a taxa de transferência do substrato para a enzima e a taxa de liberação do produto.

Michelin et al. (2012), investigando a influência do ultrassom na síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos por transesterificação enzimática do óleo de soja em sistema livre de solvente e banho de ultrassom não observou diferenças de conversão entre os dois sistemas, sendo as conversões máximas ligeiramente superiores a 60%, com condições de operação iguais as descritas como ideais neste trabalho.

Feiten et al. (2012), investigando a hidrólise enzimática de óleo de soja empregando as lipases comerciais de pâncreas suíno e Lipozyme TL IM em sistema de ultrassom, observaram que, aparentemente, o emprego do ultrassom não tem efeito significativo na lise de ácidos graxos dos triglicerídeos.

A influência dos sistemas de ultrassom deve ser estudada individualmente em cada processo de produção e sobre diferentes matérias-primas, pois, a aplicabilidade do ultrassom mostrou-se importante em diversos estudos. De acordo com, Veljkovic´; Avramovic´ e Stamenkovic´ (2012), em alguns casos, a produção de biodiesel em banhos de ultrassom permite rendimentos mais elevados e em tempos de reação mais curtos, independentemente do tipo de catalisador e da matéria-prima. Neste contexto, pode-se citar as seguintes pesquisas:

- a produção de ésteres metílicos por transesterificação do óleo de soja tendo como catalisador hidróxido de sódio 1%, razão molar óleo/álcool 1:6, temperatura de 30°C e potência do ultrassom de 20 KHz (600 W) apresentou rendimento em ésteres de 90,2% em 10 minutos enquanto com irradiação de micro-ondas a conversão em ésteres foi de 21% em 10 minutos (HSIAO et al. 2010).
- a produção de ésteres metílicos de um óleo de palma, utilizando como catalisador monóxido de cálcio 3%, razão molar óleo/álcool 1:12, temperatura de 65°C e potência do ultrassom de 20 KHz, apresentou um rendimento de 77,3% em 60 minutos enquanto que com o uso de agitação mecânica o rendimento foi de apenas 5,5% em 60 minutos (MOOTABADI et al. 2010).
- em hidrólise de ésteres, o ultrassom aumentou o rendimento e a velocidade das reações, sendo que, foram observados rendimentos de 94% no tempo de 60 minutos sob condição de ultrassom e de apenas 15% no tempo de 90 minutos sob condição de refluxo. Segundo o autor, altos rendimentos foram possíveis porque o ultrassom favoreceu a formação de emulsão entre pequenas partículas imiscíveis (DAVIDSON, 1990).

5.3.3 Avaliação do reuso da lipase comercial imobilizada Novozym 435

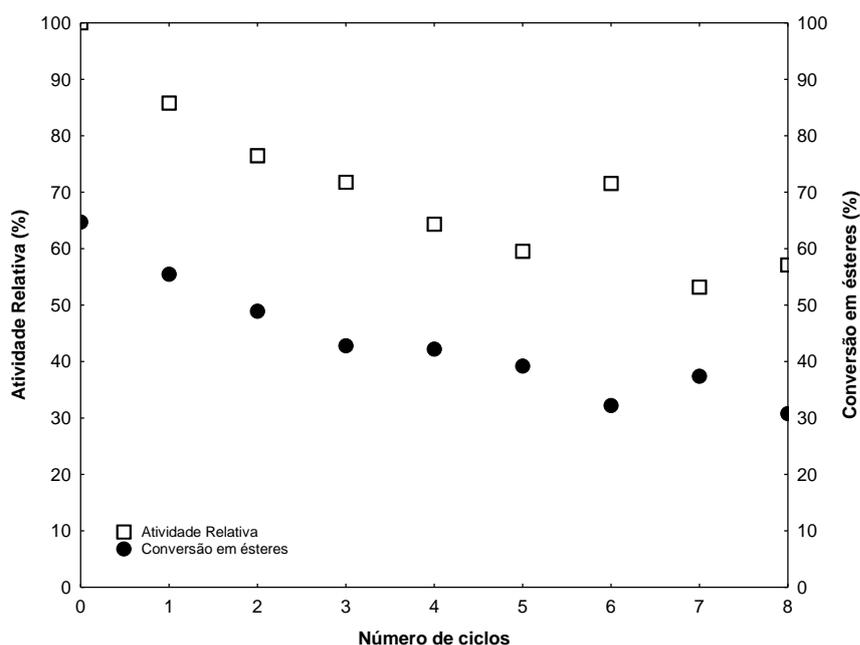
O uso de lipases (EC 3.1.1.3) na síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos tem sido muito investigado durante a última década devido às vantagens deste

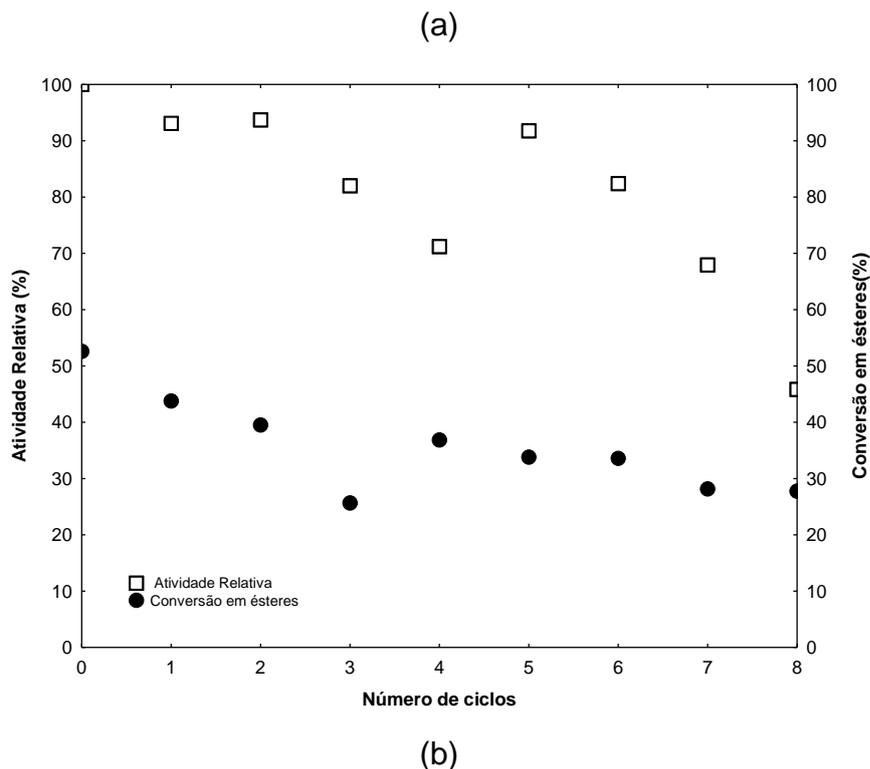
processo, as quais incluem a simples separação e purificação dos produtos da reação e produção de uma quantidade mínima de efluentes (JEGANNATHAN et al. 2008). Além disso, esta classe de lipases catalisa simultaneamente a alcoólise de triglicerídeos e a esterificação de ácidos graxos livres (FUKUDA; KONDO e NODA, 2001; WU et al. 1999). No entanto, desvantagens como o preço elevado da enzima, restringem o seu uso em aplicações industriais, dessa forma, o estudo de enzimas imobilizadas é crescente, uma vez que, estas podem ser reutilizadas em sucessivos ciclos de reação e, portanto, compensar o alto valor de compra.

Foi neste contexto que após definidas as condições ideais de produção de biodiesel enzimático do óleo do fruto da macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom, realizou-se o estudo de reuso da lipase Novozym 435. Para este estudo, o volume da reação foi aumentado em 10 vezes, assim, todas as determinações foram realizadas sobre a mesma amostra de enzima.

A Figura 5.9 apresenta a atividade de esterificação da enzima imobilizada Novozym 435 e a conversão em ésteres no sistema durante o estudo de reuso com vibração ultrassônica e sem vibração ultrassônica. A atividade de esterificação da enzima foi acompanhada por 8 ciclos, sendo representada, como atividade relativa.

Figura 5.9- Atividade de esterificação da lipase Novozym 435 sobre vibração ultrassônica (a) e sem vibração ultrassônica (b). Condições: concentração da lipase comercial imobilizada Novozym 435 de 20% (m/m), razão molar óleo/etanol de 1:9 (m/m), peneira molecular 100% (m/m), temperatura de 65°C e tempo reacional de 30 minutos.





A partir da análise da Figura 5.10 (a), observa-se que a atividade relativa da lipase imobilizada Novozym 435 é decrescente ao longo de 8 ciclos: 100; 85,8; 76,5; 71,7, 64,3; 59,5; 71,5; 53,2 e 57,1%. A queda na atividade de esterificação da enzima foi acompanhada pela queda nas conversões em ésteres: 64,7; 55,5; 48,9; 42,8; 42,2; 39,2; 32,2; 37,4 e 30,8%, do ciclo 0 ao 8, respectivamente.

Também observa-se claramente que a vibração gerada pelo banho de ultrassom não teve grande influência sobre a atividade de esterificação da lipase, principalmente até o 4º ciclo onde esta manteve atividade relativa próxima a 70%. A partir deste ciclo a perda de atividade de esterificação foi mais intensa, sendo que, ao final do ciclo 8 a atividade relativa foi inferior a 60%. Diversos trabalhos de reuso da lipase imobilizada Novozym 435 relatam queda na atividade de esterificação a partir do 4º ciclo (LEE et al. 2008; DALLA ROSA, 2009 e LERIN et al. 2011).

Trentin et al. (2012), ao estudarem a estabilidade da lipase imobilizada Novozym 435 submetida ao tratamento em banho de ultrassom com 100% da capacidade máxima (132W) e armazenada em geladeira, observou a manutenção da atividade enzimática inicial durante 300 dias, o que sugere que esta enzima possui alta estabilidade quando submetida a tal sistema.

Lee et al. (2008), investigando a estabilidade da lipase imobilizada Novozym 435 em líquidos iônicos observaram que a atividade residual sob irradiação de ultrassom, mantém-se muito semelhante após 4 reusos quando comparada a atividade sem o uso de ultrassom, isso mostra que a estabilidade da Novozym 435 não é severamente influenciada pela irradiação com ultrassom.

Dalla Rosa (2009), investigando o reuso da lipase imobilizada Novozym 435, em reações de produção de biodiesel utilizando propano pressurizado como solvente, em modo batelada, sendo a reação conduzida na condição de pressão de 50 bar, temperatura de 65°C, concentração de enzima de 20% (m/m), razão molar óleo:etanol de 1:6 e razão mássica solvente:substrato 2:1, também observou um declínio mais acentuado das conversões em ésteres e da atividade enzimática a partir da quarta etapa.

Lerin et al. (2011), investigando o reuso da lipase imobilizada Novozym 435 na reação de síntese de ascorbil palmitato em terc-butanol, com razão molar de ácido ascórbico e ácido palmítico de 1:9, 10 mL de solvente terc-butanol, 5% de enzima (m/m), 150 rpm por 17 horas cada ciclo e temperatura de 70°C observou que a lipase Novozym 435 apresentou atividade residual estável (aproximadamente 100%) nos 4 primeiros ciclos de utilização. A partir do 5º ciclo, a enzima apresentou redução de cerca de 60 a 70% de atividade.

Yu et al. (2010), investigando reações de transesterificação do óleo de soja utilizando como substrato alcoólico metanol, razão molar óleo:álcool 1:6, 6% da lipase comercial imobilizada Novozym 435, temperatura de 40°C, razão molar de álcool terc-amílico/óleo 1:1 (v/v), frequência e potência do ultrassom de 40 kHz/500 W e agitação de 50 rpm, observaram rendimento em biodiesel de 96% em 240 minutos sendo a perda da atividade enzimática, em torno de 4% somente após 5 ciclos sucessivos.

Yadav e Lathi (2004), investigando a síntese de laurato de citronelol em meio orgânico catalisado por lipases imobilizadas, observaram um decréscimo entre 62 e 55% na atividade da Novozym SP 435 após 3 ciclos de reuso, sendo que, no tempo reacional de 30 minutos deste ciclo as conversões foram inferiores a 20%.

Popiolski (2011), investigando a atividade de esterificação da lipase imobilizada Novozym 435 após sucessivos ciclos de uso para a produção de ésteres etílicos por transesterificação do óleo de soja em sistema de ultrassom, relatou perda da atividade enzimática próxima a 50%, logo após dois ciclos de reuso, sendo

que, no terceiro e quarto ciclos a perda de atividade foi completa. As condições de operação deste sistema eram: concentração da lipase comercial Novozym 435 de 27%, razão molar óleo/álcool de 1:3, potência do ultrassom de 40% da capacidade máxima (132W), temperatura de 63°C e tempo de 60 minutos.

Como mostra a Figura 5.9 (a), as conversões máximas em ésteres obtidas durante o reuso com uso de ultrassom foram de 64,7%, ou seja, não reproduziram as conversões obtidas na condições ideais (75,2%), isso pode ser decorrente do aumento de escala das reações, no qual utilizou-se um volume de reação 10 vezes maior. De acordo com Staravache et al. (2007), o rendimento em ésteres depende do tamanho do reator e do tempo de residência, sendo que rendimentos superiores a 95% são obtidos com reatores menores e com tempo de residência entre 10 e 30 minutos.

Na Figura 5.9 (b) percebe-se maior estabilidade da atividade de esterificação da enzima sem emprego do ultrassom, onde a atividade enzimática relativa é, respectivamente, de 100; 93; 93,7; 82,2; 71,2; 91,8; 82,4; 67,9 e 45,8% do ciclo 0 ao 8. No entanto, baixas conversões em ésteres foram observadas: 52,6; 43,8; 39,5; 25,7; 36,8; 33,8; 33,6; 28,2 e 27,8% do ciclo 0 ao 8, respectivamente.

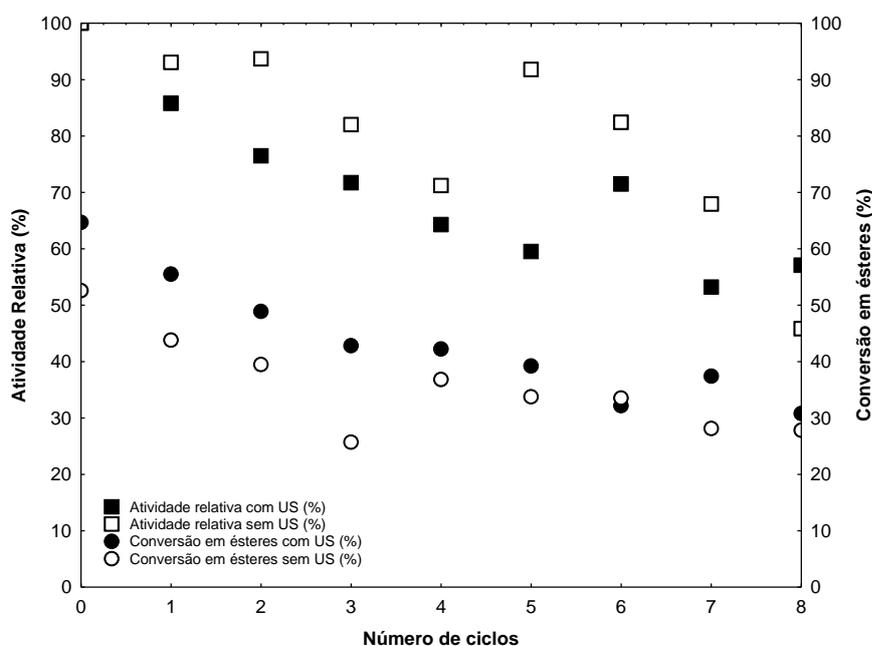
Com base nos dados apresentados pode-se afirmar que o reuso da lipase imobilizada Novozym 435 no sistema proposto por este trabalho é viável entre 3 e 4 ciclos com uso de ultrassom.

5.3.4 Influência do ultrassom na atividade de esterificação da lipase Novozym 435

A Figura 5.10 apresenta a influência do ultrassom sobre a atividade de esterificação da Novozym 435 e sobre a conversão em ésteres de ácidos graxos. Como mostra a Figura 5.10, a correlação de dados obtidos nos dois sistemas demonstra que a atividade relativa da lipase mantém-se maior onde a potência ultrassônica não é aplicada. No entanto, as conversões em ésteres neste sistema são evidentemente menores. Esta observação é bastante evidenciada no 3º ciclo da Figura 5.10, onde a atividade relativa da enzima sem uso de ultrassom é de 82,2%, no entanto, as conversões em ésteres são de apenas 25,7%. Já no sistema onde o

ultrassom é aplicado a atividade relativa da enzima é de 71,7%, sendo as conversões em ésteres de 42,8 %.

Figura 5.10- Influência do ultrassom sobre a atividade de esterificação da Novozym 435 e sobre a conversão em ésteres de ácidos graxos.



No sistema sem ultrassom, como não há agitação do meio reacional, pode estar ocorrendo a incrustação de biodiesel, óleo e glicerol no suporte enzimático, o que dificulta o acesso dos substratos ao sítio catalítico das enzimas. No entanto, a expressão de maior atividade enzimática neste sistema se deve ao fato de que a determinação da atividade de esterificação é realizada com agitação, assim, o óleo que estava incrustado no suporte durante a reação de transesterificação é removido durante esta medida e acaba revelando uma alta atividade de esterificação da lipase, a qual não é condiz com a catálise que ela realiza no meio reacional.

Alguns estudos corroboram os resultados obtidos neste trabalho e fornecem argumentos sobre o melhor desempenho da lipase imobilizada Novozym 435 quando utilizada em banho de ultrassom. Segundo Wang et al. (2007), as ondas ultrassônicas tendem a reduzir a adsorção de biodiesel e de glicerol na superfície da lipase Novozym 435. Isto permite que os substratos tenham maior acesso ao sítio catalítico da enzima, então, mesmo com menor atividade de esterificação conseguem catalisar um maior número de reações e aumentar a produção.

Veljkovic´, Avramovic´ e Stamenkovic´ (2012) relataram que o ultrassom pode melhorar a atividade catalítica da lipase comercial imobilizada Novozym 435, no entanto, há necessidade de controlar o teor de água presente no meio reacional, pois, a presença de muitas moléculas de água leva remoção da monocamada de água do sítio ativo, essencial para a manutenção da estrutura terciária da enzima.

Batistella (2011), investigando a atividade de esterificação da lipase imobilizada Novozym 435, após tratamento em ultrassom e com os solventes orgânicos terc-butanol e hexano, identificou um rápido aumento da atividade enzimática, a qual atribuiu a prováveis mudanças estruturais da proteína, uma vez que, a análise por microscopia eletrônica de varredura mostra algumas ranhuras no suporte, no entanto, sem alteração no formato esferoidal da enzima.

Wang et al. (2007), investigando a transesterificação de óleos com alto índice de acidez, tendo como catalisador a lipase comercial imobilizada Novozym 435 em banho de ultrassom, verificaram que a atividade enzimática aumenta com uso de equipamentos de baixas frequências. Com 8% da lipase Novozym 435, razão molar óleo/etanol de 1:3, potência do ultrassom de 100 W, temperatura entre 40 a 45°C e tempo reacional de 50 minutos obtiveram conversões de 94,8% em propil oleato. Utilizando somente agitação mecânica a conversão máxima obtida foi de 84,4%.

Lee et al. (2008), também observaram aumento da atividade enzimática da lipase Novozym 435 enquanto estudavam a transesterificação de laurato de vinila com glicose em solução supersaturada sob agitação magnética + irradiação de ultrassom. De acordo com os autores, a atividade enzimática foi 2,6 vezes superior em comparação com o método convencional, o qual usa somente agitação magnética.

Outra ressalva plausível com o estudo de reuso da lipase Novozym 435 e da influência do ultrassom na atividade de esterificação desta lipase é de que as conversões em ésteres nos dois sistemas, onde a atividade de esterificação foi testada, apresentam o mesmo perfil observado no estudo da influência do ultrassom (item 5.3.2), onde diferenças em torno de 10% de conversão foram obtidas. Este estudo sugere que o uso de ultrassom incrementa as conversões em ésteres na faixa de 10% não causando perdas consideráveis na atividade de esterificação da enzima em estudo.

Sendo assim, o ultrassom pode ser um aliado na produção de biodiesel enzimático do óleo do fruto da macaúba, pois, além das vantagens já citadas, de acordo com Thanh et al. (2010), o ultrassom diminui de forma considerável o consumo de energia elétrica durante o processo de transesterificação de óleos residuais de cozinha quando comparado aos processos convencionais, onde somente agitação mecânica é empregada. Assim, se a produção final de biodiesel for realmente significativa o emprego desta tecnologia poderá trazer viabilidade ao processo, justificando o seu uso, assim como, o uso de lipases imobilizadas em tal processo.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 CONCLUSÕES

Este trabalho buscou investigar o potencial de produção de biodiesel enzimático em sistema livre de solvente e banho de ultrassom. Dessa forma, fez-se uma caracterização inicial do óleo, a qual indicou a partir do índice de acidez, índice de peróxido e percentual de triglicerídeo, que este óleo apresenta alta deterioração.

Em testes preliminares com amostras de óleo do fruto da macaúba com índice de acidez de 88,88 mgKOH/g_{óleo}, observou-se que a concentração de enzima é a única variável significativa no processo e que a água proveniente do óleo degradado foi responsável por baixas conversões em ésteres, pois, quando peneira molecular foi adicionada ao meio as conversões em ésteres apresentaram um aumento de até 24% quando comparadas ao sistema onde não utilizou-se peneira molecular.

As condições ideais para produção de biodiesel enzimático do óleo do fruto da macaúba em sistema de ultrassom foram: concentração de enzima de 20% (m/m); razão molar óleo/álcool 1:9; concentração de peneira molecular de 100% (m/m), potência do ultrassom de 100%, tempo de 30 minutos e temperatura de 65°C. Nestas condições as conversões em ésteres foram de 75,2%, o que é altamente promissor, uma vez que, é recente o conhecimento de que esta conversão é muito próxima a máxima possível para o óleo do fruto da macaúba. O ultrassom apresentou influência considerável neste processo, gerando um aumento nas conversões em ésteres de 10%. Também observou-se que o ultrassom reduz o tempo das reações e aumenta a transferência de massa no sistema.

O ultrassom não apresenta grande influência sobre a atividade catalítica da enzima, no entanto, impede incrustações ao suporte enzimático permitindo maiores conversões após sucessivos ciclos de uso. A lipase comercial e imobilizada Novozym 435 submetida ao ultrassom apresenta boa estabilidade até o 4º ciclo de reuso onde mantém atividade relativa próxima a 70%, indicando assim, o número de reciclos possíveis neste sistema.

Dessa forma, a proposta de produção de biodiesel a partir da lipase comercial e imobilizada Novozym 435, em sistema livre de solvente e banho de ultrassom, tendo como substrato lipídico o óleo bruto do fruto da macaúba apresentou

resultados importantes e promissores, demonstrando o potencial que o óleo de macaúba, mesmo com alto índice de acidez e, portanto, com baixo valor industrial pode vir a ter dentro da cadeia de produção de biodiesel brasileira.

Outra consideração importante deve ser detalhada. Tendo em vista que este trabalho caracteriza-se como um trabalho pioneiro dentro do sistema proposto muitas considerações a respeito do funcionamento adequado do sistema foram realizadas, sendo uma das principais a necessidade de padronizar um único equipamento de ultrassom para o desenvolvimento do projeto, pois, pequenas oscilações na amplitude das ondas geradas, influenciadas pela oscilação na entrada de energia elétrica podem comprometer a produção e impedir a reprodutibilidade dos experimentos. Além disso, os resultados obtidos são promissores e constituem uma base de referência para pesquisas posteriores que visem à otimização, assim como, o *scale up* deste processo de produção.

6.2 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos com este trabalho podem ser feitas algumas considerações com a finalidade de motivar futuros estudos, como:

- Caracterização e produção a partir de diferentes lotes de óleo de forma a ter uma padronização da produção;
- Otimização do processo de produção com novos planejamentos experimentais incluindo como variável do processo a peneira molecular, pois, isto pode permitir que menores concentrações desta venham a ser utilizadas;
 - *Scale up* do processo de produção;
 - Produção de biodiesel do óleo do fruto da macaúba a partir de outras lipases imobilizadas comerciais e não comerciais;
- Produção de biodiesel do óleo do fruto da macaúba a partir de outros sistemas, como o contínuo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, D. S. **Biofuels: The Malasia story**. New straits times. Kuala Lumper, p. 48-49, 2007.

AMORIN, P. Q. R. **Biodiesel no Semi-Árido: Histórico**. (2012). Disponível em: <www.biodieselbr.com/estudos/biodiesel/mamona-semi-arido_06.htm?start=3>. Acesso em: 13 ag. 2012.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – key factors affecting efficiency of processes. **Renewable energy**, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

ANVISA. **Resolução nº. 270, de 22 de setembro de 2005**. (2005) Disponível em:< www.portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 12 nov. 2012

AQUINO, D. S. **Esterificação enzimática para síntese de acrilato de sacarose**. 2010. 128 f. Tese (Doutorado apresentado à Faculdade de Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. SÃO PAULO. 2010.

AYRES, B. M. T. **Obtenção de acrilatos de frutose por biocatálise**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química da Unicamp. Campinas, 2010.

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

BADDAY, A. S.; ABDULLAH, A.Z.; LEE, K. T. Optimization of biodiesel production process from Jatropha oil using supported heteropolyacid catalyst and assisted by ultrasonic energy. **Renewable Energy**, v 50, p. 427-432, 2013.

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

BASIRON, Y. Palm oil production through sustainable plantations. **European Journal of Lipid science and Technology**, v. 109, p. 289-295, 2007.

BATISTELLA, L. **Produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em banho de ultrassom**. 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação *Strictu-Sensu* em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim. Erechim. 2011.

BATISTELLA, L.; LERIN, L. A.; BRUGNEROTTO, P.; DANIELLI, A. J.; TRENTIN, C. M.; POPIOLSKI, A.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Ultrassond-assisted lipase transesterification of soybean oil in organic solvent system. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 19, p. 452-458, 2012.

BEHZADI, S.; FARID M. M. Review: examining the use of different feedstock for the production of biodiesel. **Chemical Engineering Journal**, v. 2, p.480–486, 2007.

BHERING, L. **MACAÚBA: matéria-prima nativa com potencial para a produção de biodiesel**. Embrapa Agroenergia. (2009). Disponível em:<www.embrapa.br>. Acesso em: 17 set. 2012.

BIODIESEL BR. **Biodiesel no mundo**. (2010). Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/mundo/biodiesel-no-mundo.htm>>. Acesso em 14/01/2013.

BIOSONIC. **Transesterificação ultrassônica**: ultrasonicação. Disponível em: <www.unique.ind.br/biosonic.html>. Acesso em : 16 nov. 2012.

BISELLI, M.; KRAGL, U.; WANDREY, C. Reaction engineering for enzyme catalyzed biotransformation. In: Drauz K, Waldmann H, (ed. (s)). **Enzyme catalysis in organic synthesis**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2002. p 185–257.

BRASIL. **Lei n. 11.097, de 13 de janeiro de 2005.** (2005). Disponível em: <www.planalto.gov.br/>. Acesso em: 17 set. 2012.

CARDENAS, F.; DE CASTRO, M. S.; SANCHEZ- MONTERO, J.M; SINISTERRA, J. V.; VALMESEDA, M.; ELSON, S. W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: Catalytic activity in reaction in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 145-154, 2001.

CARVALHO, G. **MACAÚBA.** (2012). Disponível em: < www.biodieselbr.com/ >. Acesso em: 22 jun. 2012.

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

CASTRO, M. **Óleo da palmeira nativa de Minas, ganha status de produto de qualidade para vários setores.** Caderno Agropecuário. Jaboticatubas/MG: Portal Estado de Minas, 2008.

CHAMOULEAU, F.; COULON, D.; GIRARDIN, M.; GHOUL, M., Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalized synthesis in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 949-954, 2001.

CHEN, G.; YING, M.; LI, W. Enzymatic conversion of waste-cooking oils into alternative fuel biodiesel. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.132, p. 911-921, 2006.

CINTAS, P.; LOUIS-LUCHE, J. The sonochemical approach. **Green chemistry**, p. 115-125, 1999.

CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. **Macaúba é potencial fonte para a produção de biodiesel.** (2010). Disponível em: <www.agrolink.com.br/> Acesso em: 24 set. 2012.

CORONADO, C. R.; CARVALHO JR., J. A.; SILVEIRA, J. L. Biodiesel CO₂ emissions: A comparison with the main fuels in the Brazilian market. **Fuel processing Technology**, v. 90, p.204-211, 2009.

COSTA, V. E. U; AMORIM, H. L. N. O emprego de lípases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, p. 863 - 873, 1999.

DALLA ROSA, C. **Produção enzimática de biodiesel em modo contínuo em meio pressurizado**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

DA MOTTA, P. E. F.; CURI, N.; DE OLIVEIRA-FILHO, A. T.; GOMES, J. B. V. Ocorrência de Macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 37, p. 1023-1031, 2002.

DAVIDSON, R. S. In: Sonochemistry: the uses of ultrasound in chemistry; MASON, T. S. (Ed.). **The Royal Society of Chemistry**; Cambridge, p. 69, 1990.

DEMIRBAS, A. Diesel fuel from vegetable oil via transesterification and soap pyrolysis. **Energy Sources**, v. 24, p. 835-841, 2002.

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

DÍAZ, H. J. N. Informação verbal em conversa informal. Florianópolis, Junho, 2012.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 30, n.1, p.90-94, 2002.

DUARTE, D. I. ; ROGERIO, J. C.; LICURGO, F M. S.; BACK, G. R.; SANTOS, M. C. S.; ANTONIASSI, R., FARIA-MACHADO, A. F.; BIZZO, H. R.; JUNQUEIRA, N. T. V. Efeito da maturação de frutos de macaúba no rendimento de óleo e na composição de ácidos graxos. In: **5° Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. 8° Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel**. 2012. Salvador: Bahia. p. 253-254.

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

DU, W.; WANG, L.; LIU, D. Improved methanol tolerance during Novozym 435-mediated methanolysis of SODD for biodiesel production. **Green Chemistry**, v.9, p. 173–176, 2007.

FACCIO, C. **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais**. 2004. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim. 2004.

FARIA, L. A. **Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* produzida por fermentação em substrato líquido**. 2010. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2010.

FEITEN, M. C.; MONTEMEZZO, M. M.; ZANATTA, J. S.; LEVANDOSKI, K. L . D.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. Hidrólise enzimática de óleo de soja empregando lipases comerciais em sistema de ultrassom. In: **XVII Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos e XIII Encontro de Iniciação científica**. 2012. Erechim: Rio Grande do Sul.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298-1302, 2009.

FOGLIA, T. A.; HAAS M.J. Matérias-primas alternativas e tecnologias para a produção de biodiesel. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; (Ed.s) RAMOS, L.P (trad.). **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. p. 46-59.

FORTES, I. C. P.; BAUGH, P. J. Pyrolysis-GC/MS studies of vegetable oils from Macauba fruit. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v. 72, p. 103-111, 2004.

FOSCHIERA, I. P. **O programa nacional de produção e uso de biodiesel: impactos e perspectivas**. 2008. 73 f. Monografia (Graduação em Ciências Sociais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2008.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E.H.; MOUNTS, T.L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, p. 1638-1643, 1984.

FREITAS, L.; GARVES, L. F.; ANDRADE, G.S.S.; OLIVEIRA, P.C.; DE CASTRO, H.F. Etanolise do óleo de macaúba por catálise enzimática assistida por irradiação de microondas. In: **12º Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. 2012. Búzios: Rio de Janeiro.

FEVRIER, P.; GUÉGAR, P.; YVERGNAUX, F.; CALLEGARI, J.P.; DUFOSSÉ, L.; BISSET, A. Evaluation of regioselectivity of lipase based on synthesis reaction conducted with propyl alcohol, isopropyl alcohol and propylene glycol, **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, v. 11, p. 445-453, 2001.

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. KNOTHE, G. Produção de Biodiesel: princípios da reação de transesterificação. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; (Ed.s) RAMOS, L.P (trad.). **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. p. 31-35.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOS, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F.D. Biodiesel production using enzymatic transesterification e Current state and Perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, p.10-16, 2012.

GONZALEZ, S. L. **Produção contínua de biodiesel por transesterificação de óleo do fruto de macaúba (*Acrocomia aculeata*) e óleo de fritura em metanol e em etanol supercrítico**. 2011. 68 f. Qualificação (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2011.

GRAY, M. **Palm and Cycad Societies of Australia**. (2005). Disponível em: <<http://www.pacsoa.org.au/palms/Acrocomia/aculeata.html>> Acesso em: 09 nov. 2012.

HAAS, M. J.; MCALOON, A.J.; YEE, W.C.; FOGLIA, T. A. A process model to estimate biodiesel production costs. **Bioresource Technology**, v. 97, p.671–678, 2006.

HALL. D. O.; RAO, K. K. **Photosynthesis**. 6. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 214 p., 1999. Disponível em: <<http://books.google.com.br>>. Acesso em: 26/11/2012.

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

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field Guide to the Palms of the Americas New Jersey**. Princeton University, 1995. p.166-167.

HOWELL, S. JOBE, J. O estado da arte da indústria do biodiesel. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; (Ed.s) RAMOS, L.P (trad.). **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. p. 8 - 9.

HSIAO, M-C.; LIN, C-C.; CHANG, Y-H.; CHEN, L-C. Ultrasonic mixing and closed microwave irradiation-assisted transesterification of soybean oil. **Fuel**, v.89, p. 3618–3622, 2010.

IEA. INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. (2010). **World Energy Outlook 2010**. Disponível em: < <http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2010/weo2010.pdf> >. Acesso em 19 abr. 2012

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

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **IUPAC 2.201**: Índice de acidez, 2012.

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

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

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E.S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase — a critical review. **Critical Review in Biotechnology**, v.28, p. 253–264. 2008.

JI, J.; WANG, J.; LI, Y.; YU, Y.; XU, Z. Preparation of biodiesel with the help of ultrasonic and hydrodynamic cavitation. **Ultrasonics**, v. 44, p. 411–414, 2006.

KAGEYAMA, P. **Macaúba: mudança no modelo de produção pode tornar reserva legal rentável**. (2010). Disponível em: < <http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/280610.htm> >. Acesso em: 22 jun. 2012.

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 water-

containing system without an organic solvent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p.627- 631, 1999.

KIRAN, K.R.; DIVAKAR, S. Lipase catalyzed synthesis of organic acid esters of lactic acid in non-aqueous media, **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 109-121, 2001.

KLIBANOV, A. M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water ?. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 97–101, 1997.

KNOTHE, G. A história dos combustíveis derivados de óleos vegetais. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; (Ed.s) RAMOS, L.P (trad.). **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. p.8-9.

KNOTHE, K. ; GERPEN, J. V. Produção de biodiesel: princípios da reação de transesterificação. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; (Eds.) RAMOS, L.P. (trad.). **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. p. 29.

KUMARI, V.; SHAH, S.; GUPTA, M.N. Preparation of biodiesel by lipase catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*. **Energy Fuels**, v. 21, p. 368–372, 2007.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fat acid oil (waste cook oil) to biodiesel: A review. **Biotechnology advances**, v. 28, p. 500-518. 2010.

LEE, S.H.; NGUYEN, H.M.; KOO, Y.M.; HA, S.H. Ultrasound-enhanced lipase activity in the synthesis of sugar ester using ionic liquids. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1009–1012, 2008.

LERIN, L. A.; CENI, G.; RICETT, A.; KUBIAK, G; OLIVEIRA, J. V.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OESTREICHER, E. G.; OLIVEIRA, D. Successive cycles of utilization of novozym 435 in three different reaction systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 181-188, 2011.

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

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.

LIMA, M. M. **Análise transdisciplinar, evolutiva e sustentável de uma filière de biocombustível: A Macaúba em Montes Claros/MG**. 2011. 316 f. Tese (Doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Agronegócios) - Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2011.

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

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; CERQUEIRA, L.S.C.; COSTAS, J. T. M.; FERREIRA, E. **Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2004. p. 34.

LORENZI, G.M.A.C. **Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. - arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. 2006. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, 2006.

LU, J.; CHEN, Y.; WANG, F.; TAN, T. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 in organic solvent system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 122–125, 2009.

LU, J.; NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99–125. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1367–1370, 2007.

LU, J.; NIE, K.; WANG, F.; TAN, T. Immobilized lipase *Candida* sp. 99–125 catalyzed methanolysis of glycerol trioleate: Solvent effect. **Bioresource Technology**, v.99, p. 6070–6074, 2008.

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

MACRAE, A. R. Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 80, n.2, p. 291-294, 1983.

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

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

MARIANO, N. Risco na energia. **Jornal Zero Hora**, Porto Alegre, p.5, 27 out. 2012.

MARTINES, M.A.U.; DAVOLOS, M.R.; JAFELICCI, M. JR. O efeito do ultra-som em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251-256, 2000.

MARZULLO, R. C. M. **Análise de eficiência de óleos vegetais oriundos da soja e palma, visando a produção de biodiesel**. 2007. 279 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2007.

MASON, T. J. Sonochemistry and the environment – Providing a “green” link between chemistry, physics and engineering. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, p. 476–483, 2007.

MATTIUZI, C.D.P.; PALAGI, A. C.; TEIXEIRA, E. C.; WIEGAND, F. Poluição atmosférica do biodiesel: estado da arte. In: TEIXEIRA, E. C. (Coord.). **Biodiesel: impacto ambiental, agrônômico e atmosférico**. Porto Alegre: FEPAM, 2012. p 43-67.

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. 20, p. 1–21, 2004.

MEHER, L. C.; SAGAR, D.V.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review. **Renew Sustain Energy**, v. 10, p. 248 – 268, 2006.

MEHLENBACHER, V.C. The analysis of fats and oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 63, p. 195-196, 1961.

MICHELIN, S.; SCHERER, R. P.; DANIELLI, A. J.; ZANATTA, J. S.; LEVANDOSKI, K. L. D.; MONTEMEZZO, M. M.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. Estudo da influência do ultrassom na síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos por transesterificação enzimática do óleo de soja em banho de ultrassom. In: **XVII Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos e XIII Encontro de Iniciação científica**. 2012. Erechim: Rio Grande do Sul.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Acrocomia aculeata**. (2005). Disponível em: <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>> Acesso em: 26 jun. 2012.

MME. Cartilha sobre biodiesel. **Biodiesel: o novo combustível do Brasil**. (2004). Disponível em: < <http://www.mme.gov.br/>>. Acesso em 21 set. 2012.

MOOTABADI, H.; SALAMATINIA, B.; BHATIA, S. ABDULLAH, A. Z. Ultrasonic-assisted biodiesel production process from palm oil using alkaline earth metal oxides as the heterogeneous catalysts. **Fuel**, v. 89, p. 1818-1825, 2010.

MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V.H.; ZANIN, G.M.; CASTRO, H.F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy Fuel**, v.21, p.3689-3694, 2007.

MOTOIKE, S. **Pesquisas com macaúba avançam**. (2012). Disponível em: < <http://www.biodieselbr.com/noticias/materia-prima/macauaba/pesquisas-macauaba-avancam-270312.htm> >. Acesso em 22 jun. 2012.

NASCIMENTO, M.G.; NETO, P.R.C.; MAZZUCO, L.M. Biotransformação de óleos e gorduras: utilização de lipases para obtenção de biocombustíveis. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Ano 3, n. 19, p. 28-31, 2001.

NIE, K.; XIE, F.; WANG, F.; TAN, T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p.142–147, 2006.

NIELSEN, M. P.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p.692-700, 2008.

NÓBREGA, G. A. S. **Determinação do teor de umidade do gás natural usando um dispositivo com adsorção**. 2001. 85 f. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2001.

NOGUEIRA, B. M.; CARRETONI, C.; CRUZ, R.; FREITAS, S.; MELO JR., P.A.; COSTA-FÉLIX, R.; 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.

NORMA EUROPÉIA. **Norma Européia 14103**: Teor de ésteres: Comitê Europeu para Padronizações.

NORMA EUROPÉIA. **Norma Européia 14105**: Comitê Europeu para Padronizações.

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

NOVAES, R. F. **Contribuição para o estudo do coco macaúba**. 1952. 85 f. Tese (Doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias) - Escola Superior de Agricultura Eça de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba. 1952.

OFFICIAL METHODS. AOAC 984.20. **Moisture in Oils and Fats Karl Fischer Method**, 1984-1985.

OFFICIAL METHODS. AOAC 965.33. **Peroxide Value of oils and fats** ,1995.

OFFICIAL METHODS. AOAC 942.27. **Standart solution of sodium thiosulfate**,1995.

OLIVEIRA, A. J. ; RAMALHO, J. (Coord. (s)). **Plano nacional de agroenergia 2006-2011**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria da Produção e Agroenergia, 2 ed. rev. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/arqAGROENERGIA.pdf>. Acesso em: 25/04/2012

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 Biotechnololy**, v.121, p.231-41, 2005.

PADULA, A. D.; SANTOS, A. S.; FERREIRA, L.; BORENSTEIN, D. The emergence of the biodiesel industry in Brazil: Current figures and future prospects. **Energy Policy**, v. 44, p. 395–405, 2012.

PAIVA, A. L.; BALCAO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme microbiology technology**, v. 27, p. 187–204, 2000.

POPIOLSKI, S.A. **Otimização do processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom**. 2011. 124f. Dissertação (Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Strictu-Sensu* em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim. 2011.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. *Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation iii: comparison of the woody vegetation of 376 areas*. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 1, p. 57-109, 2003.

REGITANO D'ARCE. Química Básica dos Lipídeos. In: OETTERER, M.; REGITANO D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M.H.F (Org.). **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2006. p. 196-242.

REGITANO D'ARCE. Deterioração de Lipídeos – Ranço. In: OETTERER, M.; REGITANO D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M.H.F (Org.). **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2006. p. 243-299.

REZENDE, J.R. **Desacidificação de óleo de macaúba por extração líquidolíquido, para produção de biodiesel**. 2009. 47 f. Dissertação (Mestrado apresentado a Programa de Pós-Graduação *Strictu-sensu* em Engenharia de Alimentos, Area de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga. 2009.

ROCHA, M. S. **Compostos bioativos e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição) - Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2011.

RODRIGUES, H. S. “**Obtenção de ésteres etílicos e metílicos, por reações de transesterificação, a partir do óleo da palmeira Latino Americana macaúba- *Acrocomia aculeata***”. 2007. 236 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química) – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2007.

RODRIGUES, S.; MAZZONE, L. C. A.; SANTOS, F. F. A.; CRUZ, M. G. A.; FERNANDES, F. A. N. Optimization of the production of ethyl esters by ultrasound assisted reaction of soybean oil and Ethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 361-366, 2009.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 648 – 653, 2007.

RURAL SEMENTES. **Macaúba alternativa econômica para produção de óleos e tortas**. (2012). Disponível em:< <http://www.ruralsementes.com.br/>>. Acesso em: 23 jun. 2012.

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

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.54, p. 19–26, 2008.

SÁNCHEZ, A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÁ, C. Highly enantioselective esterification of racemic ibuprofen in a packed bed reactor using immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 157-166, 2000.

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

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of jatropha oil. **Energy Fuel**, v.18, p.154–159, 2004.

SHAY, E.G. Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities. **Biomass and bioenergy**, v. 4, n. 4, p. 227-242, 1993.

SHIEH, C. J.; LIAO, H. F.; LEE, C. C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 88:103–106, 2003.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 7, p. 789–793, 1999.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U.T. Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p.656-660, 2003.

SOUZA, M. S.; SOUZA, ERIKA, C. G.; AGUIEIRAS, M. A. P.; SILVA, M. A. P. DA.; LANGONE, M. A. P. Biodiesel Synthesis via Esterification of Feedstock with High Content of Free Fatty Acids. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 154, p.253–267, 2009.

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

STAMENKOVIC', O. S.; VELICKOVIC', A. V.; VELJKOVIC', V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, p. 3141- 3155, 2011.

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

STAVARACHE, C.; VINATORU, M.; MAEDA, Y. ; BANDOW, H. Ultrasonically driven continuous process for vegetable oil transesterification. **Ultrason Sonochemistry**, v.14, p. 413–417, 2007.

STAVARACHE, C.; VINATORU, M.; MAEDA, Y. Ultrasonic versus silent methylation of vegetable oils. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 401, 2006.

SUEHARA, K.; KAWAMOTO, Y.; FUJII, E.; KOHDA, J.; NAKANO, Y.; YANO, T. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p.437- 442, 2005.

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

TAN, T.; NIE, K.; WANG, F. Production of biodiesel by immobilized *Candida* sp. lipase at high water content. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 128, p. 109–116, 2006.

TEDESCO, M.J.; ALTHAUS, D.; GIANELLO, C. Utilização de resíduos do processamento de óleo combustível (biodiesel) no solo. In: KNOTHE et al. (Ed.). **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. p. 21.

TEIXEIRA, L. S. G.; ASSIS, J. C. R.; MENDONÇA, D. R.; SANTOS, I. T. V.; GUIMARÃES, P. R. B.; PONTES, L. A. M.; TEIXEIRA, J. S. R. Comparison between conventional and ultrasonic preparation of beef tallow biodiesel. **Fuel Processing Technology Journal**, v. 90, p. 1164–1166, 2009.

THANH, L. T.; OKITSU, K.; YASUHIRO, S.; TAKENAKA, N.; MAEDA, Y.; 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.

TORRES, B. B. **Biotecnologia industrial**: elementos da enzimologia. V1. São Paulo: Edgard Bülcher, 2001. p 151-155.

TRENTIN, C. M.; LEVANDOSKI, K. L. D.; ZANATTA, J. S.; MONTEMEZZO, M. M.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. Efeito da concentração de enzima na produção de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom. In: **XVII Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos e XIII Encontro de Iniciação científica**. 2012. Erechim: Rio Grande do Sul.

TRENTIN, C. M.; SOARES, M. B. A.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Alcoólise enzimática da produção de biodiesel em meio livre de solvente orgânico em modo batelada utilizando banho de ultrassom. In: **10º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**. 2012. Blumenau: Santa Catarina. N° 245.

TUZUKI, W.; KITAMURA, Y.; SUZUKI, T.; KOBAYASHI, S. Synthesis of sugar fatty acid esters by modified lipase. **Biotechnology Bioengineering**, v. 64, p. 267-271, 1999.

UBRABIO. **O biodiesel e sua contribuição ao desenvolvimento brasileiro**. (2010). Disponível em: <http://www.ubrablo.com.br/sites/1700/1729/00000201.pdf>
Acesso em 24/11/2012.

VELJKOVIĆ, V. B.; AVRAMOVIĆ, J.M.; STAMENKOVI, O.S. Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: State of the art and the perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 16, p. 1193– 1209, 2012.

VIEIRA, S.S.; MAGRIOTIS, Z. M.; SANTOS, N. A.V.; CARDOSO, M.G.; SACZK, A. A. Macauba palm (*Acrocomia aculeata*) cake from biodiesel processing: An efficient and low cost substrate for the adsorption of dyes. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p.152– 161, 2012.

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

VOLPATO, G. **Produção, purificação e imobilização de lipases de *Staphylococcus warneri* EX 17 produzidas em glicerol.** Tese (Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Strictu-Sensu* em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: 2009.

WANG, J. X.; HUANG, Q. D.; HUANG, F. H.; WANG, J. W.; HUANG, Q. J. Lipase-catalyzed production of biodiesel from high acid value waste oil using ultrasonic assistant. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 1121–1128, 2007.

WANG, J.X.; HUANG, Q. D.; HUANG, F.H.; WANG, J.W.; HUANG, Q. J. Lipase-catalyzed production of biodiesel from high acid value waste oil using ultrasonic assistant. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, p.121–128, 2007.

WANG, L.; DU, W.; LIU, D.H.; LI, L. L.; DAI, N. M. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.43, p. 29-32, 2006.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 77, p.355–360, 2000.

WU, W. H.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W. N.; PHILLIPS, J. G. Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, p. 517–521, 1999.

YACHMENEV, V.G.; BLANCHARD, E.J.; LAMBERT, A.H. Use of ultrasonic energy for intensification of the bio-preparation of greig cotton. **Ultrasonics**, v.42, p. 87–91, 2004.

YADAV, G. D.; LATHI, P.S. Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: Kinetic studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 113-119, 2004.

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

YANG, G.; TIAN-WEI, T.; KAI-LI, N.; FANG, W. Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media. **Chinese Journal Biotechnology**, v. 22, p. 114-118, 2006.

YESILOGLU, Y. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.81, p.157–160, 2004.

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, Y.; DUBE, M.A.; MCLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil. 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 1–16, 2003.

ZHAO, H.; SONG, Z. Migration of reactive trace compounds from Novozym® 435 into organic solvents and ionic liquids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 113–118, 2010.

ANEXO A

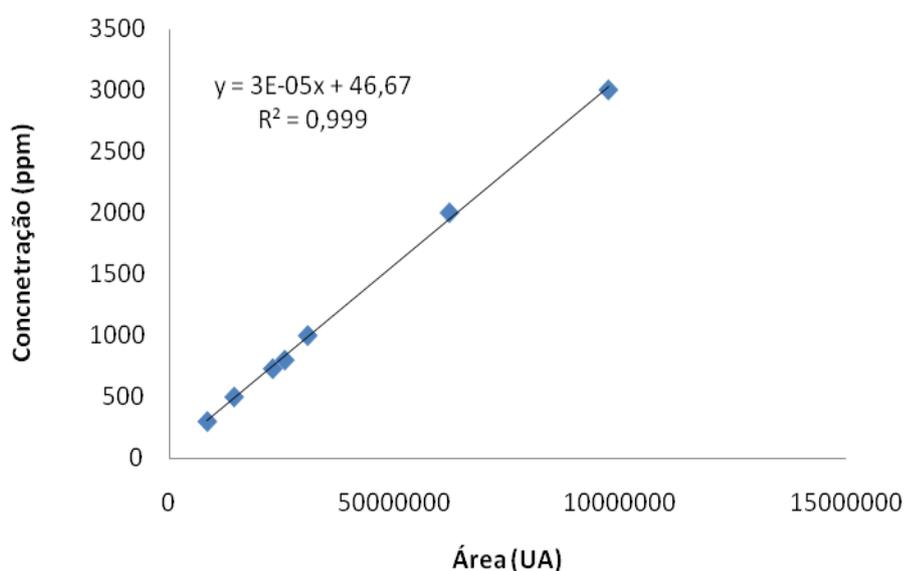
A concentração de óleo na amostra foi determinada através da seguinte Equação:

$$C_2 = \frac{\text{massa (mg)}}{\text{volume (L)}}$$

A concentração de Mag, Dag e Tag no óleo foi determinado de acordo com as curvas de calibração e áreas totais obtidas com análise em cromatografia gasosa, conforme descrito abaixo:

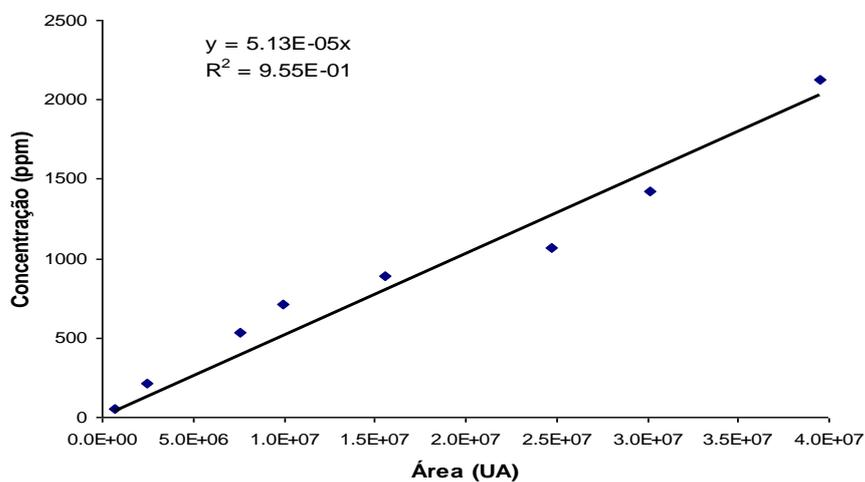
Curva de calibração para monooleína

- $C_1 \text{ (mg/L)} = 3 \text{ E } 10^{-5} * \Sigma \text{ Área MAGs}$



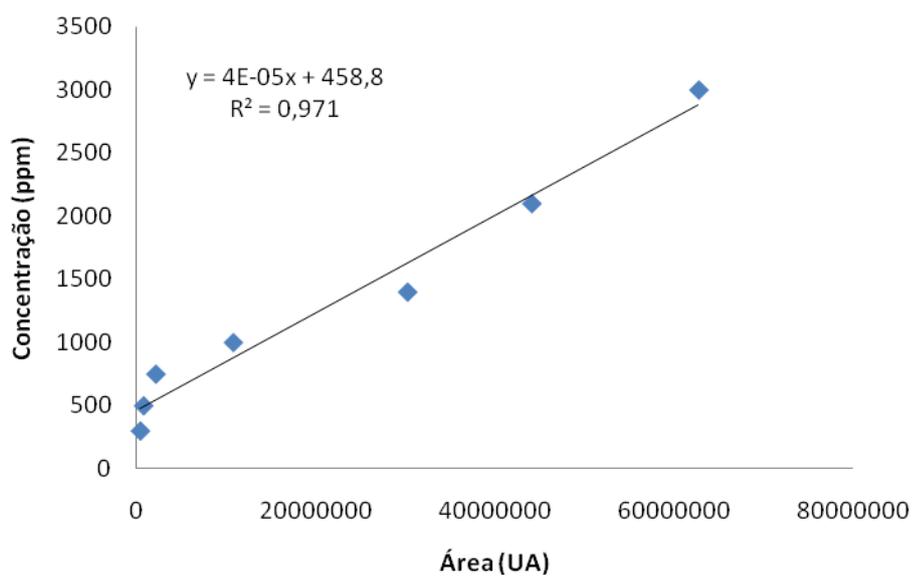
Curva de calibração para dioleína

- $C_1 \text{ (mg/L)} = 5,13 E 10^{-5} * \Sigma \text{ Área DAGs}$



Curva de calibração para trioleína

- $C_1 \text{ (mg/L)} = 4 E 10^{-5} * \Sigma \text{ Área TAGs}$



- Teor de Mag, Dag e Tag

C_2 (mg/L) —————→ 100%

C_1 (mg/L) —————→ x % de Mag, Dag ou Tag na amostra

ANEXO B**Artigo submetido para publicação**

Periódico: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*

Título: Kinetics of ultrasound-assisted enzymatic biodiesel production from Macauba coconut oil.

Autores: Simone Michelin; Melania M. Sychoski; Robison P. Scherer; Clarissa D. Rosa; Helen Treichel; Debora Oliveira; J. Vladimir Oliveira, D.Sc.

Abstract: This work reports the production of fatty acid ethyl esters (FAEE) by means of Macauba (*Acrocomia aculeata*) coconut oil (MCO) solvent-free enzymatic transesterification reactions using a commercial immobilized lipase (Novozym 435) under the influence of ultrasound irradiation. The experiments were performed in an ultrasonic water bath, following an experimental design to evaluate the effects of temperature (40 – 70 °C), enzyme (5 to 20 wt%) concentration, oil to ethanol molar ratio (1:3 - 1:10) and output irradiation power (40 to 70 % of the maximum supply value) on the reaction yield. Besides, a kinetic study varying the enzyme concentration was also carried out. Results show that ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of MCO with ethanol in solvent-free system might be a potential alternative route to conventional alkali-catalyzed and /or traditional enzymatic methods, as reaction yields around 70 wt% were obtained at mild irradiation power supply (~ 132 W), and temperature (65 °C) in a short reaction time, 30 min. The extent of the reaction was explored using a novel parameter, convertibility, which corresponds to the maximum ester content attainable from the feedstock (80.1 %).