

URI - CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CLAUDIA MARA TRENTIN SANTIN

**SÍNTESE DE BIODIESEL PELA TRANSESTERIFICAÇÃO E
ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE
SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Engenharia de Alimentos, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimento, área de concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI - Campus de Erechim.

Orientadores: José Vladimir de Oliveira
Débora de Oliveira
Clarissa Dalla Rosa

ERECHIM, RS
Setembro de 2013

SÍNTESE DE BIODIESEL PELA TRANSESTERIFICAÇÃO E ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM

Claudia Mara Trentin Santin

Tese de Doutorado submetido ao corpo docente da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim, Programa de Doutorado em Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

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

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

Clarissa Dalla Rosa, D.Sc.
(URI - Erechim) (Orientadora)

Helen Treichel, D.Sc.
(UFFS)

Ignacio Vietez, D.Sc.
(UDELAR)

Marcelo Mignoni, D.Sc.
(URI)

Rogério Dallago, D.Sc.
(URI – Erechim)

Erechim, setembro 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.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, e em especial ao meu esposo Marcos André Santin que me apoiou em todos os momentos, pelas angústias e preocupações que passaram por minha causa, pelo amor, carinho e estímulo, dedico-lhes esta conquista com gratidão.

AGRADECIMENTOS

Esta tese é resultado de muita dedicação e esforço, e não poderia deixar de registrar aqui minha sincera gratidão a todos que contribuíram para sua conclusão.

A Deus, pois muitas vezes o caminho foi pedregoso, e eu aprendi a desviar as pedras, arrancar os espinhos e superar as barreiras, muitas vezes o caminho foi escuro, e eu, aprendi andar na escuridão, pois levava a certeza de que alguém já o construiu e por ele andou até o fim, a certeza de que não estava só pois Deus me guiava.

Ao meu esposo Marcos André Santin, pelo grande apoio incondicional, pelas noites sem dormir passadas juntos no laboratório coletando amostras. Obrigada por me acolher e saber dizer as palavras certas nos momentos mais confusos e difíceis para mim, obrigada por ser esta pessoa maravilhosa pela qual tenho uma grande admiração, por estar sempre ao meu lado, por secar minhas lágrimas nos momentos difíceis e me apontar novos caminhos.

Aos meus pais Egidio e Lurdete, por simplesmente tudo, por sempre acreditarem na minha capacidade e me apoiarem incondicionalmente.

Ao meu irmão Carlos Diogo, pelos risos, pelos consolos, por fazer valer a pena cada momento.

Aos meus orientadores, Débora de Oliveira, José Vladimir de Oliveira e Clarissa Dalla Rosa, pela paciência, compreensão, dedicação, amizade e generosidade em compartilhar seus conhecimentos, obrigada acima de tudo por serem pessoas tão maravilhosas e fazerem parte de minha vida, obrigada por ouvirem meus desabafos.

Aos demais professores sem citar nomes, por todo o tempo e ensino que a mim dedicaram, pela orientação constante, pela amizade, por repartirem experiências de vida e me auxiliarem a trilhar este caminho.

Às bolsistas de Iniciação Científica Michele, Juliana, e Katarine, pelo empenho na realização dos experimentos.

Aos colegas do doutorado e mestrado, em especial às minhas amigas Stephani, Simone, Viviane, Syndi, Gracieli, Marcelli, Ilizandra, Juliana Soares,

Juliana Silva, Miriam, Iloir, Ariana, Gustavo, pelas longas conversas, pela amizade sincera, companheirismo, pelas longas noites no laboratório, por tudo.

Aos demais amigos inesquecíveis que estão distantes, mas sempre de braços abertos para ajudar, Alessandra Smaniotto, Mara, Daniela Remonato, Luciane Batistella, Lindomar, Daiane, Patrícia, Claiton, enfim a todos, pelos risos, pelo incentivo quando tudo parecia estar errado, pela amizade.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

À URI – Campus de Erechim e a CAPES, pelo suporte e apoio financeiro.

Enfim a todos os amigos que fiz durante esta caminhada e que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

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

SÍNTESE DE BIODIESEL PELA TRANSESTERIFICAÇÃO E ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM

Claudia Mara Trentin Santin

Orientadores: José Vladimir de Oliveira

Débora de Oliveira

Clarissa Dalla Rosa

O objetivo do presente trabalho consistiu na produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em modo batelada e contínuo. Para o modo batelada foi realizado um estudo cinético nos intervalos de tempo de 15 minutos a 8 horas para determinar o melhor tempo. Após realizou-se um delineamento de Plackett & Burman com 12 ensaios, apresentando ponto central em triplicata, onde foi avaliada a influência de cinco variáveis (temperatura 40 a 80 °C; razão molar (óleo/etanol) 1:3, 1:6,5 e 1:10; concentração da enzima *Novozym 435* de 5 a 40% (m/m em relação aos substratos); potência 52,80; 92,40 e 132 Watts e concentração de água de 5% a 10% (m/m em relação aos substratos), mantendo-se fixo o tempo de contato em 1 hora de reação. Após observadas as variáveis significativas e não significativas realizou-se um delineamento composto central rotacional 2² (DCCR), totalizando 11 experimentos. O tempo total de reação foi de 1 hora e temperaturas de 60, 63, 70, 77 e 80 °C. A condição otimizada correspondeu ao tempo de 1 hora de reação, razão molar 1:3, 63 °C, 52,80 Watts e 27% (m/m em relação aos substratos) de concentração de enzima, atingindo conversões de aproximadamente 85,70% em biodiesel. Após, realizou-se um estudo

cinético para confirmar qual a melhor concentração de enzima a ser utilizada. Foi variado o tempo em 15 e 30 minutos e em 1 a 6 horas e a concentração da enzima em 10%, 20%, 25%, 30% e 40% (m/m), para analisar em qual concentração de enzima a produção de ésteres etílicos apresentaria melhores conversões. E por fim, o estudo de reuso da enzima *Novozym 435* permitiu verificar que a mesma manteve sua atividade durante dois ciclos, perdendo sua atividade a partir do terceiro ciclo. Para o modo contínuo de produção de biodiesel através de reação de transesterificação verificou-se que a melhor condição corresponde a razão molar (óleo/etanol) 1:3, 61,60 W, com 98,62% de conversão em 54 minutos porém ocorre a formação e acúmulo de glicerol, e este acaba por inibir o catalisador, a passagem de solvente orgânico para possível remoção do mesmo não foi eficiente. Verificou-se que o óleo de macaúba apresenta um bom potencial para o processo contínuo visto que, foi possível obter conversões de 63,75% em 27 minutos sendo que a convertibilidade máxima do óleo era de 75,04%. Já para a reação de esterificação verificou-se que o ultrassom não exerce influência, o processo é relativamente estável sendo que em 48 h de reação a conversão se manteve constante em aproximadamente 90% para razão molar 1:3 (carga ácida/etanol) e 0 W de potência, aumentando a razão molar para 1:6 e trabalhando com 61,60 W de potência foi possível em apenas 6 minutos de reação uma conversão de 97,86%.

Summary of Thesis presented to the Graduate Program in Food Engineering as part of the requirements for obtaining the degree of Doctor of Food Engineering.

SYNTHESIS OF BIODIESEL BY TRANSESTERIFICATION AND ENZYMATIC ESTERIFICATION SYSTEM IN SOLVENT FREE ULTRASOUND IN BATH

Claudia Mara Trentin Santin

Advisors: José Vladimir de Oliveira

Débora de Oliveira

Clarissa Dalla Rosa

The aim of this work was the enzymatic production of biodiesel in solvent-free system using an ultrasound bath operated in continuous mode. For batch mode a kinetic study was carried out in intervals of 15 minutes to 8 hours in order to determine the best reaction time. Afterwards, a Plackett & Burman with 12 trials, with triplicate at central point, was conceived towards evaluating the influence of five variables (temperature 40-80 °C, molar ratio (oil / ethanol) 1:3, 1:6, 5 and 1:10, *Novozym 435* enzyme concentration from 5 to 40% (by weight of substrate), irradiation power of 52.80, 92.40 and 132 Watts and water concentration of 5% to 10% (wt% with respect to the substrates), keeping constant the contact time at 1 hour reaction. After observing the significant variables a central composite rotational design 2^2 (DCCR), totaling 11 experiments, was executed. The total reaction time was 1 hour and at 60, 63, 70, 77 and 80 °C. The optimal condition corresponding to 1 hour reaction, molar ratio 1:3, 63 °C, 52.80 Watts and 27 wt% of enzyme, allowed reaching conversions of approximately 85.70% in biodiesel. Afterwards, a kinetic study was carried out to confirm the best enzyme concentration to be used. In this case, reaction time varied from 15, 30 min, 1 to 6 hours and the enzyme concentration at 10, 20, 25, 30 and 40 wt% to find out the enzyme concentration to give the highest ethyl esters yield. Finally, a study concerning the enzyme

reuse (*Novozym 435*) showed that it maintained its activity for two rounds, with enzyme activity losses after the third cycle. Continuous mode operation for biodiesel production via transesterification reaction was found that the best condition corresponds to the molar ratio (oil: ethanol) 1:3, 61.60 W, 98.62% conversion in 54 minutes but formation and accumulation of glycerol occurs, that can inhibit the catalyst while solvent passing to the packed-bed reactor was not efficient. It was found that the macauba oil has a good potential for the continuous process since it was possible to obtain conversions of 63.75% in 27 minutes and the maximum convertibility of the oil was 75.04%. For the esterification reaction it was found that ultrasound did not influence the process. Furthermore it was verified that the reaction system relatively stable up to 48 h, with reaction conversion nearly constant at approximately 90% molar ratio of 1:3 (acid load / ethanol) and 0 W of power, increasing the molar ratio to 1:6 and working with 0 W and 61.60 W of power it was possible to reach in only 6 minutes a conversion as high as 97.86%.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
SUMÁRIO	xi
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE SIGLAS	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1 OBJETIVO GERAL	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1 OS BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL.....	8
3.2 BIODIESEL	12
3.2.1 Aspectos Ambientais.....	18
3.2.2 Aspectos Econômicos	20
3.2.3 Aspectos Sociais.....	20
3.3 PROCESSO DE OBTENÇÃO DO BIODIESEL.....	22
3.3.1 Transesterificação	22
3.3.2 Esterificação.....	32
3.4 ENZIMAS	34
3.4.1 Imobilização de Enzimas.....	37
3.4.2 Lipases	39
3.4.3 Lipases como Catalisadores	41
3.5 CATÁLISE ENZIMÁTICA EM ULTRASSOM.....	44
3.5.1 Produção enzimática de biodiesel em banho de ultrassom.....	49

3.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	52
4. MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS	54
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	55
4.2.1 Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	55
4.2.2 Produção de biodiesel enzimático em sistema de ultrassom livre de solvente orgânico em modo batelada.....	56
4.2.2.1 Estudo cinético prévio	56
4.2.2.2 Planejamento Plackett & Burman	57
4.2.2.3 Delineamento Composto Central Rotacional 2²	58
4.2.2.4 Estudo Cinético: Efeito da Concentração de Enzima	58
4.2.2.5 Estudo Cinético: Efeito da Razão Molar entre os Substratos	59
4.2.2.6 Avaliação de Sucessivos Ciclos de Reuso do Biocatalisador <i>Novozym 435</i>	59
4.2.3 Produção de biodiesel enzimático em sistema de ultrassom livre de solvente orgânico em modo contínuo	60
4.2.3.1 Descrição do aparato experimental	60
4.2.3.2 Produção de biodiesel enzimático utilizando o processo de transesterificação	62
4.2.3.3 Produção de biodiesel enzimático utilizando o processo de esterificação	63
4.2.4 Determinação da Atividade Enzimática.....	64
4.2.5 Quantificação do Glicerol	66
4.2.6 Quantificação de Ésteres Etílicos e Metílicos de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa	67
4.2.7 Conversão dos ácidos graxos vegetais em ésteres obtidos por meio de reação de esterificação	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1 ANÁLISES DA LIPASE NÃO TRATADA E TRATADA EM BANHO DE ULTRASSOM POR MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA.....	70

5.2 ESTABILIDADE DA ENZIMA NOVOZYM 435	73
5.3 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM ULTRASSOM EM MODO BATELADA.....	74
5.3.1 Estudo cinético prévio para determinação do tempo reacional.....	74
5.3.2 Planejamento Packett & Burman.....	84
5.3.3 Delineamento Composto Central Rotacional 2 ²	88
5.3.4 Estudo Cinético: Efeito da Concentração da Enzima	94
5.3.5 Efeito da Razão Molar entre os Substratos	96
5.3.6 Reutilização da Enzima <i>Novozym 435</i> na Produção Enzimática de Biodiesel em Sistema Livre de Solvente em Banho de Ultrassom	98
5.4 PRODUÇÃO DE BIODIESEL EM MODO CONTÍNUO	104
5.4.1 Planejamento 2 ³ - Efeito das variáveis do processo na conversão em biodiesel enzimático de soja em modo contínuo em banho de ultrassom.....	104
5.4.2 Aprimoramento da conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos	109
5.4.3 Efeito da potência ultrassônica e da razão molar óleo/etanol na conversão em biodiesel obtido a partir da transesterificação enzimática de óleo de soja em modo contínuo e em banho de ultrassom	114
5.4.4 Efeito do tipo de álcool	117
5.4.5 Produção de biodiesel em modo contínuo e banho de ultrassom utilizando as enzimas <i>Lipozyme RM IM</i> e <i>Lipozyme TL IM</i>	120
5.4.6 Comparação entre o óleo de soja e o óleo de macaúba na produção de biodiesel	122
5.5 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM MODO CONTÍNUO E ULTRASSOM ATRAVÉS DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS.....	127
5.5.1 Efeito da razão molar e do álcool na esterificação enzimática de ácido graxo vegetal em modo contínuo em banho de ultrassom	128
5.5.2 Efeito da potência ultrassônica.....	132
5.5.3 Estabilidade da produção de biodiesel enzimático em modo contínuo através de reação de esterificação.....	134

5.5.4 Produção de biodiesel por esterificação de ácido graxo vegetal em modo contínuo em banho de ultrassom utilizando como catalizador a lipase <i>Lipozyme RM IM</i>	138
5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	140
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	142
6.1 CONCLUSÕES.....	142
6.2 SUGESTÕES.....	144
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146
APÊNDICE A – ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	184
APÊNDICE B – TRABALHOS PUBLICADOS	188

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução energética dos biocombustíveis no Brasil.....	11
Figura 2: Potencialidades brasileiras para produção e consumo de combustíveis vegetais.	16
Figura 3: Representação da reação de metanólise de triacilgliceróis.	23
Figura 4: Reações intermediárias da reação de alcoólise de triacilgliceróis. ..	24
Figura 5: Representação da reação de esterificação.....	33
Figura 6: Efeito de métodos diferentes em rendimentos de metil éster de ácidos graxos.	50
Figura 7: Aparato experimental utilizado para a produção de biodiesel enzimático em modo batelada e banho de ultrassom..	56
Figura 8: Aparato experimental utilizado para a produção de biodiesel enzimático em modo contínuo e banho de ultrassom..	60
Figura 9: Equipamento utilizado para determinação de atividade enzimática..	65
Figura 10: MEV da <i>Novozym 435</i> não-tratada (a) e tratada em sistema de ultrassom usando diferentes tempos de contato (b).....	70
Figura 11: Atividade enzimática de esterificação da <i>Novozym 435</i> após cada tempo de reação para condição experimental: 70 °C e 52,8 W de potência....	72
Figura 12: Estabilidade da enzima <i>Novozym 435</i> , submetida ao ultrassom a 132 W de potência e armazenada em geladeira à 4 °C.....	73
Figura 13: Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos obtidos na transesterificação enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.....	74
Figura 14: Atividade de esterificação da <i>Novozym 435</i> após cada ponto cinético, apresentado na Figura 13..	79
Figura 15: Efeito que a frequência do ultrassom exerce sobre a conversão de ésteres metílicos (razão molar (óleo: metanol) 1:6, 1% KOH e 100% de potência ultrassônica)..	83

Figura 16: Gráfico de Pareto para a produção enzimática de biodiesel utilizando a lipase <i>Novozym 435</i> em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função das variáveis independentes.....	86
Figura 17: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função da temperatura e da concentração de enzima..	92
Figura 18: Avaliação da cinética da reação em função da concentração de enzima em termos de conversão de triglicerídeos em biodiesel, na condição experimental otimizada no planejamento de experimentos.....	95
Figura 19: Cinética da transesterificação do óleo de soja com etanol e com <i>Novozym 435</i> em diferentes concentrações de enzima (1%, 3%, 5% e 10%, m/m) e razão molar de substrato (1:3, 1:6 e 1:9). Temperatura de 70 °C e potência ultrassônica de 52,80 W.	97
Figura 20: Atividade de esterificação da <i>Novozym 435</i> após cada ciclo de uso para produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.....	99
Figura 21: Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos. Temperatura de 65 °C e vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 0,5 mL/min.....	105
Figura 22: Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos. Temperatura de 65 °C e vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 5 mL/min.	106
Figura 23: Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos. Temperatura de 65 °C e vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 2,75 mL/min.....	106
Figura 24: Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos - efeito do isopropanol.....	110
Figura 25: Conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos – efeito da passagem de hexano e etanol e da potência ultrassônica.....	111
Figura 26: Efeito da potência do ultrassom e da razão molar sobre a conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos em modo contínuo.....	114
Figura 27: Efeito do metanol sobre a conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos. Razão molar (óleo/metanol) 1:3 e 1:6, 65 °C, potência ultrassônica 61,60 W e vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min.	118

- Figura 28:** Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos em modo contínuo em banho de ultrassom utilizando as enzimas *Lipozyme TL IM* e *RM IM*. Temperatura de 57 °C, razão molar (óleo/etanol) 1:3, potência ultrassônica de 154 W e vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 0,5 mL/min. 121
- Figura 29:** Identificação das classes lipídicas do óleo de macaúba por cromatografia de camada delgada: (a) padrão e (b) óleo de macaúba..... 124
- Figura 30:** Conversão de triglicerídeos do óleo de macaúba e do óleo de soja em ésteres etílicos pela transesterificação catalisada por *Novozym 435* em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (óleo/etanol) 1:6, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 0 e 154W..... 125
- Figura 31:** Efeito da razão molar e do álcool sobre a conversão em ésteres utilizando um ácido graxo vegetal como substrato em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/etanol) e (carga ácida/metanol) 1:3 e 1:1, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 61,60 W..... 129
- Figura 32:** Conversão de éster etílicos, para razão molar (etanol / ácido oléico) 3:1, 5% m/m de concentração de H₂SO₄, 20 °C, 10 h, sob a irradiação contínua de ultrassom..... 130
- Figura 33:** Comparação entre da técnica de titulação e a EN 14103. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 61,60 W..... 131
- Figura 34:** Efeito da potência ultrassônica sobre a produção de biodiesel por meio da reação de esterificação enzimática em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 0 e 154 W. 132
- Figura 35:** Estabilidade da produção de biodiesel via esterificação enzimática em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 0 W..... 134
- Figura 36:** Produção de biodiesel via reação de esterificação enzimática em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:6,

vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 65 °C, sem potência ultrassônica e com potência ultrassônica de 61,6 W..... 135

Figura 37: Conversão de ésteres etílicos com uso da enzima *Lipozyme RM IM* como catalisador através da esterificação em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:6, vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 61,60 W. 139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de ácidos graxos em óleos vegetais e gorduras.	15
Tabela 2: Especificações de alguns óleos vegetais <i>in natura</i> e do óleo diesel.17	
Tabela 3: Redução das emissões em relação ao diesel.....	19
Tabela 4: Comparação da produção de biodiesel utilizando o método de ultrassom.....	48
Tabela 5: Variáveis e níveis estudados no planejamento Plackett & Burman para produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente orgânico e em banho de ultrassom.....	57
Tabela 6: Variáveis e níveis estudados no planejamento no planejamento fatorial completo 2^2 , para otimização da produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente e em banho de ultrassom.....	58
Tabela 7: Variáveis e níveis estudados no planejamento 2^3 , para a produção de biodiesel enzimático por meio de reação de transesterificação em banho de ultrassom e sistema livre se solvente orgânico em modo contínuo.....	63
Tabela 8: Especificações do ácido graxo vegetal de soja.	63
Tabela 9: Composição dos ácidos graxos do óleo de soja.....	64
Tabela 10: Matriz do planejamento fatorial do tipo Plackett & Burman com 12 ensaios (PB-12) com a resposta em termos de conversão em ésteres etílicos (% , m/m) a partir da alcoólise enzimática do óleo de soja em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.....	85
Tabela 11: Matriz do delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR) para otimização da produção enzimática de biodiesel em ultrassom em sistema livre de solvente.	89
Tabela 12: Análise dos efeitos das variáveis sobre a conversão em biodiesel, referente aos resultados apresentados na Tabela 11.	92
Tabela 13: Análise de Variância (ANOVA) das variáveis sobre a conversão em biodiesel, referente aos resultados apresentados na Tabela 12.	94
Tabela 14: Atividade de esterificação da enzima Nozoyrn 435 após reação de transesterificação do óleo de soja em modo contínuo	108

Tabela 15: Atividade de esterificação enzimática após realização de passagem de solvente orgânico na reação de transesterificação enzimática de óleo de soja em modo contínuo em banho de ultrassom.....	113
Tabela 16: % de glicerol, após passagem de solvente orgânico	113
Tabela 17: Comparação da sistese de transesterificação de ésteres etílicos em ultrassom.....	116
Tabela 18: Características físico-químicas do óleo de macaúba.....	123
Tabela 19: Atividade de esterificação enzimática ao final da reação de transesterificação dos óleos de soja e macaúba em modo contínuo em banho de ultrassom.....	126
Tabela 20: Atividade enzimática ao final da reação de esterificação de ácido graxo vegetal em modo contínuo em banho de ultrassom	132
Tabela A.1: Testes da metodologia de análise, referentes às amostras de biodiesel etílico de soja	185
Tabela A.2: Composição química em ácidos graxos do óleo de soja (Marca Soya) utilizado como substrato	186

LISTA DE SIGLAS

ANP	Agencia Nacional de Petróleo
ANOVA	Análise de variância
BNDS	Banco Nacional do Desenvolvimento
CAL B	Lipase de <i>Candida antarctica</i> tipo B
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
DAG	Diacylgliceróis
DCCR	Deliamento Composto Central Rotacional
F	Quociente entre os quadrados médios dos tratamentos e dos resíduos
GL	Graus de liberdade
MAG	Monoacylgliceróis
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MDA	Ministério de desenvolvimento Agrário
MME	Ministério das Minas e Eneias
PB12	Plackett & Burman com 12 ensaios
PROÁLCOOL	Programa Nacional do Álcool
Pronaf	Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar
QM	Quadrados médios
SQ	Soma dos quadrados
TAG	Triacylgliceróis
UFCE	Universidade Federal do Ceará
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
URI	Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
W	Watts

1. INTRODUÇÃO

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

As pesquisas têm sido voltadas para utilização das lipases na transesterificação de moléculas de ácidos graxos de elevada massa molecular. A lipase catalisa a reação do álcool com óleos vegetais e gordura animal (LEE et al., 2002). Os catalisadores enzimáticos como as lipases, podem catalisar eficazmente o processo de transesterificação dos triglicerídeos nos sistemas aquosos ou não aquosos, superando os problemas relacionados ao conteúdo de água presente. Em particular, o subproduto glicerol, pode facilmente ser removido sem nenhum processo complexo, e também os ácidos graxos livres contidos nos óleos e nas gorduras podem completamente ser convertidos a ésteres (MEHER et al., 2006).

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

A transesterificação, também conhecida como alcoólise, acarreta na diminuição da viscosidade do óleo vegetal e, assim, melhora o desempenho do mesmo em motores movidos a diesel. Atualmente, o biodiesel é obtido através

de reações de transesterificação, onde um triacilglicerol reage com um álcool de cadeia curta na presença de um catalisador (enzimático, ácido forte ou base), produzindo uma mistura de ésteres e glicerol. Com relação aos catalisadores, a transesterificação pode ser realizada tanto em meio ácido quanto em meio básico, porém, ela ocorre de maneira mais rápida na presença de um catalisador alcalino do que na presença da mesma quantidade de catalisador ácido, observando-se maior rendimento e seletividade. Também pode ser realizada em meio enzimático, e sem a presença de catalisadores, em reações a altas pressões e temperaturas (SCHUCHARDTA et al., 1998).

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

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

O processo de produção de biodiesel utilizando ultrassom apresenta-se como alternativa ao processo convencional de produção, uma vez que as cavitações (formação, aumento e implosão de bolhas no meio reacional)

geradas pelo ultrassom aumentam a miscibilidade entre os reagentes, fornecem energia necessária para a reação, reduzem o tempo de reação e a quantidade de reagentes, e aumentam o rendimento e a seletividade da reação (YU et al., 2010).

Portanto, com o auxílio do ultrassom as reações tornam-se mais rápidas, com maiores taxas de conversão, dispensando assim maiores quantidades de catalisador, o que por sua vez implica na minimização da formação de sabão. Menores quantidades de sabão no processo implicam em menores gastos na purificação do biodiesel. No caso da esterificação, usar menores quantidades de catalisador constitui facilidades na neutralização, uma vez que há pouco catalisador a ser neutralizado.

A principal razão para as baixas taxas nas reações de transesterificação são as limitações na transferência de massa uma vez que o ácido graxo é imiscível ao álcool e forma duas fases no sistema. O aumento da taxa da reação química é resultado de cavitação nas condições de intensa turbulência e correntes de circulação de líquidos (KELKAR et al., 2008).

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

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

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

A literatura relata diversos trabalhos sobre a produção de biodiesel em ultrassom (LIU et al., 2008; BABICZ et al., 2010; THANH et al., 2010; KUMAR et al., 2011; KUMAR et al., 2010; HINGU et al., 2010; ZHANG et al., 2009; MOOTABADI et al., 2010; STAVARACHE et al., 2005; STAVARACHE et al., 2006; MAHAMUNI; ADEWUYI 2009; STAVARACHE et al., 2007a; STAVARACHE et al., 2007b; CINTAS et al., 2010; WU et al., 2007; SANTOS et al., 2010) demonstrando que o sistema reacional tem grande influência na síntese enzimática.

Reações catalisadas por enzimas em sistema livre de solvente orgânico e sob a ação do ultrassom, apesar de sua relevância científica e industrial, ainda são consideradas uma tecnologia nova, uma vez que poucos estudos sobre esse assunto são encontrados na literatura. O único trabalho encontrado até o momento versando sobre a produção de biodiesel enzimática em sistema livre de solvente em ultrassom é de autoria de Kumar et al., (2011). Os autores relatam a transesterificação enzimática de óleo de pinhão manso usando a lipase de *Enterobacter aerogenes*. Os autores obtiveram para a condição otimizada de produção de biodiesel, razão molar de 1:4 de óleo para metanol, concentração de enzima de 5%, tempo de reação de 30 min, e potência de ultrassom de 100 W/m^3 , conversões de $84,5 \pm 0,5\%$. Os autores utilizaram metanol como substrato. Nenhum trabalho foi encontrado neste assunto usando etanol como substrato em sistema livre de solvente. Batistella et al., (2012) relataram a transesterificação de óleo de soja com etanol utilizando duas lipases comerciais imobilizadas sob a influência da irradiação ultrassônica e solvente orgânico. Os resultados mostraram que rendimentos elevados ($\sim 90\%$, m/m) foram obtidos com potência branda de irradiação de ($\sim 100 \text{ W}$) e temperatura ($60 \text{ }^\circ\text{C}$), em um tempo de reação relativamente curto, 4 h, utilizando *Lipozyme IM RM* como catalisador e 40 mL de n-hexano como solvente.

Com base nos aspectos expostos anteriormente, este trabalho visa explorar o potencial da técnica de ultrassom para a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente orgânico, por meio da reação de transesterificação do óleo de soja e etanol, utilizando como catalisador a lipase comercial imobilizada *Novozym 435*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho consiste na produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em modo batelada e contínuo.

2.2 OBEJTIVOS ESPECÍFICOS

Com base no objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

Produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em modo batelada:

- ✓ Estudo da influência do ultrassom na enzima *Novozym 435*;
- ✓ Estudo da influência do ultrassom sobre o óleo de soja;
- ✓ Estudo cinético prévio para definição do tempo de reação a ser utilizado nas etapas posteriores;
- ✓ Determinação da influência das variáveis do processo (temperatura, concentração de enzima e de água, razão molar óleo/etanol, potência de irradiação) na produção de ésteres etílicos;
- ✓ Otimização do processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom;
- ✓ Estudo cinético para avaliação do efeito das variáveis relevantes (significativas) no rendimento do processo utilizando a condição experimental otimizada na etapa anterior;
- ✓ Estudo da reutilização da lipase imobilizada comercial *Novozym 435* em sucessivos ciclos na condição experimental otimizada anteriormente, correspondente ao maior rendimento em biodiesel.

Produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em modo contínuo:

- ✓ Estudo da produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente orgânico em modo contínuo em banho de ultrassom;
- ✓ Avaliação da influência das variáveis de processo (razão molar óleo/etanol, temperatura e tempo de reação) no rendimento da reação;
- ✓ Estudo da produção de biodiesel enzimático em diferentes configurações de reator;
- ✓ Avaliação da passagem de solvente orgânico para limpeza do reator e verificar a produção de glicerol;
- ✓ Estudo da produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em modo contínuo e banho de ultrassom utilizando um ácido graxo através de reação de esterificação;
- ✓ Estudo da estabilidade do processo de produção de biodiesel por esterificação;
- ✓ Investigação exploratória da eficiência do processo com o uso de uma enzima de menor custo, com vistas à viabilidade econômica do processo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte no que concerne à produção enzimática de biodiesel, iniciando-se pelo histórico da inserção dos biocombustíveis no mundo, principalmente à produção de biodiesel, analisando seus aspectos econômicos, ambientais, sociais e tecnológicos. Na sequência, apresentam-se as principais rotas de obtenção de biodiesel. Com base no exposto anteriormente, levando em consideração os objetivos delineados para este trabalho, ênfase especial será dada ao sistema de produção enzimática de biodiesel em sistema de ultrassom. Resultados da literatura concernentes à etapa já realizada desta pesquisa apresentam especial destaque.

3.1. OS BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL

A ideia de aproveitar os óleos vegetais como matéria-prima para combustíveis não é nova, sendo que as primeiras experiências com motores de combustão por compressão foram conduzidas com óleo de amendoim. A utilização de óleos vegetais como combustível está relacionada com a invenção do motor a diesel, pelo engenheiro francês de origem alemã Rudolph Christian Carl Diesel (1858-1913), no final do século XIX. Suas primeiras experiências foram realizadas com óleo de amendoim (cultura difundida nas colônias francesas na África), onde foi apresentado pelo próprio Rudolph Diesel na Exposição Universal de Paris um protótipo de motor por compressão. No entanto, a abundância da oferta de petróleo e o seu preço acessível, determinaram que, nos anos seguintes, os derivados do petróleo fossem os combustíveis preferidos, reservando os óleos vegetais para outros usos.

Em 1937, o cientista belga G. Chavenne descobriu e patenteou o processo de transesterificação, o qual diminuía a viscosidade do óleo vegetal e melhorava seu processo de combustão no interior do motor (KNOTHE, 2001). Assim, o nome “biodiesel” foi dado ao óleo vegetal transesterificado para

descrever seu uso como combustível em motores do ciclo diesel (CERBIO, 2006).

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

A crise do petróleo iniciada no final de 1973 afetou todos os países importadores de petróleo, principalmente aqueles em desenvolvimento, como o Brasil. Essa crise causou uma necessidade em se obter fontes alternativas de energia. Uma das alternativas colocadas em questão foi à utilização de óleo vegetal ao invés de óleo diesel. Várias universidades brasileiras se dedicaram a estudar a produção de combustíveis substitutivos do diesel, que aproveitassem diversas matérias-primas de origem vegetal. No Brasil, a transesterificação foi estudada pela primeira vez na Universidade Federal do Ceará (UFCE), em 1979, que pesquisou um novo processo com base na biomassa para encontrar fontes alternativas de energia. As experiências acabaram revelando um novo combustível originário de óleos vegetais e com propriedades semelhantes às do óleo diesel fóssil, o biodiesel (PARENTE, 2003).

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

meio-ambiente reavivaram essa discussão em todo o mundo (OSAKI; BATALHA, 2008).

A influência da instabilidade do preço do petróleo é altamente perceptível na política de biocombustíveis no Brasil. Em 1975, sob efeito do primeiro choque mundial de petróleo, o Governo Brasileiro criou o Programa PROÁLCOOL. O interesse nacional pelo uso de biodiesel como um combustível alternativo também foi despertado, inicialmente por conta de um choque no preço do petróleo, no caso o segundo, que aconteceu no início da década de 80.

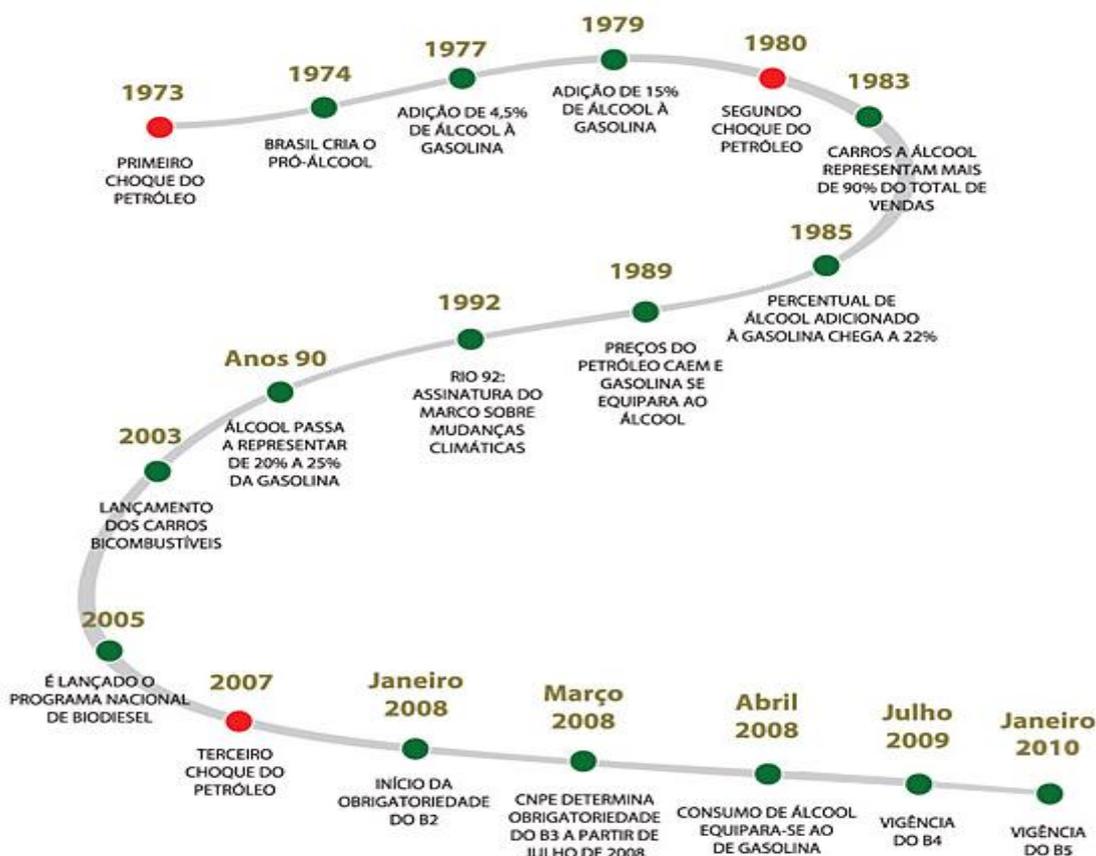
A rápida subida dos preços do petróleo e as crescentes preocupações ambientais no tocante às emissões de gases de efeito estufa levaram ao surgimento do biodiesel como uma alternativa ao óleo diesel (SHARMA et al., 2008).

Na segunda metade da década de 80, o preço começou a cair, dificultando a sustentabilidade do PROÁLCOOL e desestimulando o desenvolvimento de uma política nacional de biodiesel. No entanto, apesar das variações do preço do petróleo, no dia 6 de dezembro de 2004, o Governo Federal inseriu o biodiesel na matriz energética brasileira a partir da criação de seu marco regulatório, por meio da Medida Provisória 214, convertida na Lei 11.097/2005, publicada no Diário Oficial da União em 13/01/2005. Conforme definido nesse marco, autorizou-se a mistura de 2% em volume de biodiesel ao diesel (B2), desde janeiro de 2005, tornando-a obrigatória em 2008, quando foi autorizado o uso de 5% (B5) (Ministério das Minas e Energia, MME, 2004). O marco regulatório é constituído por atos legais, em que se definem os percentuais de mistura do biodiesel ao diesel, a forma de utilização do combustível e o regime tributário.

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

O biodiesel é um combustível produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais que deve atender à especificação estabelecida pela Resolução ANP nº 07/2008. Desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética, publicada no Diário Oficial da União em 26 de outubro de 2009, que aumentou de 4 para 5% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel. A contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis (ANP, 2010). A Figura 1 mostra a evolução energética dos biocombustíveis no Brasil.

Figura 1: Evolução energética dos biocombustíveis no Brasil.



Fonte: ANP, 2010.

A venda de diesel B5 – nome da mistura de óleo diesel derivado do petróleo e um percentual (5% v/v, atualmente) de biodiesel – é obrigatória em todos os postos que revendem óleo diesel, sujeitos à fiscalização pela ANP. A adição de até 5% de biodiesel ao diesel de petróleo foi amplamente testada, dentro do Programa de Testes coordenado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia, que contou com a participação da Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. Os resultados demonstraram, até o momento, não haver a necessidade de qualquer ajuste ou alteração nos motores e veículos que utilizem essa mistura (ANP, 2010).

A experiência de utilização do biodiesel no mercado de combustíveis tem se dado em quatro níveis de concentração:

- Puro (B100);
- Misturas (B20 – B30);
- Aditivo (B5);
- Aditivo de lubricidade (B2).

Atualmente, o Brasil é o país com o maior potencial para produção de biodiesel, pois possui abundância em terras cultiváveis e etanol. Os brasileiros passaram a dar mais valor aos indícios ambientais e passaram a se conscientizar em relação ao aquecimento global, que está fazendo com que o tema biocombustível seja pauta novamente e foco de novos olhares curiosos e empreendedores (ANP, 2010).

3.2. BIODIESEL

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

Biodiesel (do grego, bio significa vida, e diesel de Rudolf Diesel) se refere a um diesel equivalente, combustível transformado derivado de fontes biológicas. Quimicamente, o biodiesel é definido como mono-alquil-éster de ácidos graxos de cadeia longa derivada biolípídios renováveis (DEMIRBAS,

2008b). Biodiesel é tipicamente produzido através da reação de um óleo vegetal ou gordura animal com metanol ou etanol, na presença ou ausência de um catalisador, para produção de ésteres metílicos ou etílicos (biodiesel) e glicerina (DEMIRBAS, 2002).

O óleo vegetal sempre foi considerado como uma opção para a substituição do óleo diesel, já que seu poder calorífico é similar. Porém, os óleos vegetais *in natura*, não modificados, quando utilizados em motores de compressão interna causam problemas sérios. A alta viscosidade, os ácidos graxos livres presentes nos óleos vegetais, bem como a formação de goma devido à oxidação e polimerização durante armazenamento e combustão, depósitos de carbono no motor e nos injetores e problemas com lubrificante são exemplos de algumas das dificuldades mais comuns. As altas massas moleculares e viscosidade, 10 vezes superior à viscosidade do diesel, causam uma pobre atomização do combustível o que leva à combustão incompleta, baixa volatilidade e aumento da penetração do *spray* de combustível. Esse aumento da penetração do *spray* é considerado parcialmente responsável pelas dificuldades encontradas com os depósitos de carbono e o espessamento do óleo lubrificante. O uso prolongado resulta em eventual falha no motor. Em função destes problemas, surgiu então a necessidade de se modificar os óleos vegetais com o objetivo de reduzir sua viscosidade e sua tendência à polimerização. Diversos processos foram sugeridos e o biodiesel foi então produzido a partir de diferentes óleos vegetais e animais (KARAOSMANOGLU et al., 1996; MUNIYAPPA et al., 1996; ENCINAR et al., 1999; MA e HANNA, 1999; RANESES et al., 1999; ALCANTARA et al., 2000; FUKUDA et al., 2001; MONYEM e VAN GERPEN, 2001; ENCINAR et al., 2002; ZHANG et al., 2003; DORADO et al., 2004; KNOTHE, 2005; CAMARGOS da SILVA, 2005).

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

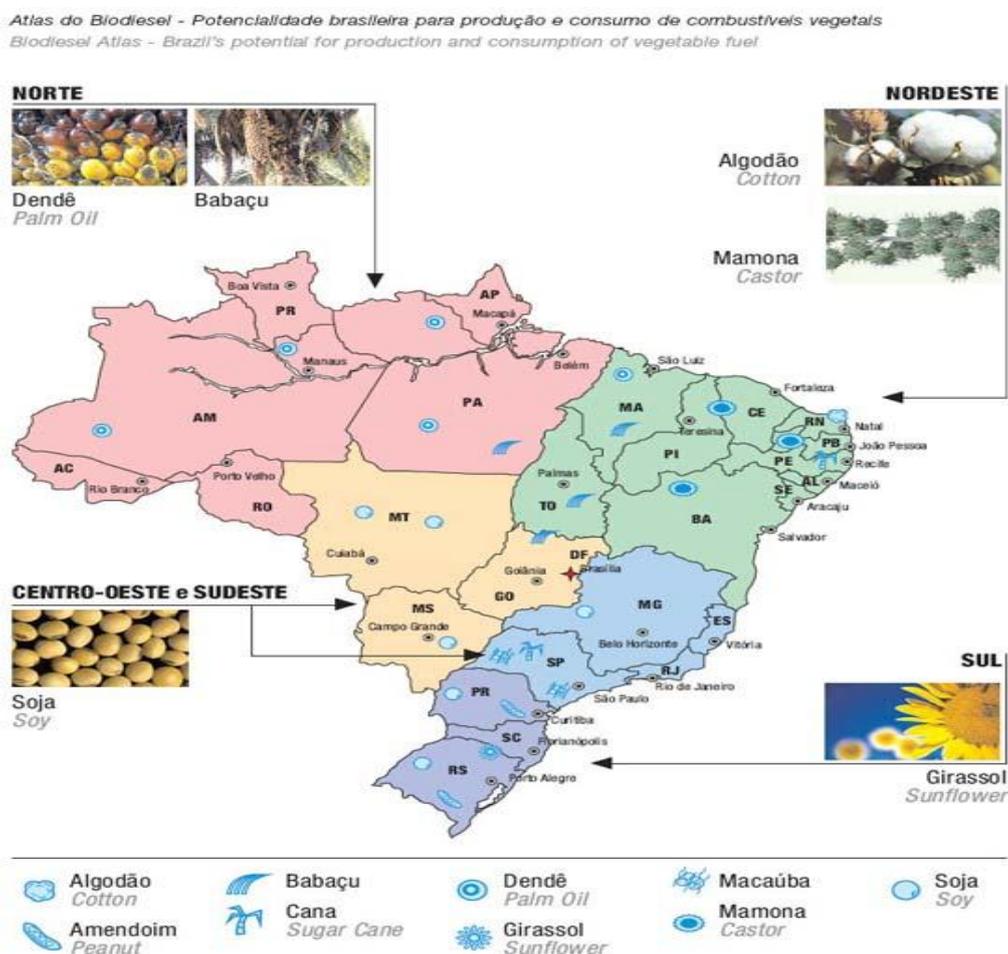
Dentre as oleaginosas já investigadas para a produção de biodiesel destacam-se a soja, o girassol, a mamona, o milho, a canola, o babaçu, o buriti, o dendê, o amendoim, entre outras (MA e HANNA, 1999) e estudos recentes destacam a utilização de pinhão manso (ACHTEN et al., 2008; BERCHMANS e HIRATA, 2008). No entanto, a escolha da oleaginosa a ser utilizada deve considerar o teor em óleo vegetal, produtividade e adaptação territorial (RAMOS et al., 2003). Observando-se os aspectos tecnológicos e econômicos, no âmbito nacional cada região apresenta potencialidade para diferentes tipos de oleaginosas. Por exemplo, no Estado do Rio Grande do Sul as oleaginosas potenciais são a mamona, colza/canola, girassol, soja, milho, nabo forrageiro, entre outras, a palma e o babaçu no norte, a soja, o girassol e o amendoim nas regiões sudeste e centro-oeste, e a mamona, que além de ser a melhor opção do semiárido nordestino, apresenta-se também como alternativa às demais regiões do país, conforme apresentado na Figura 2.

Tabela 1: Composição de ácidos graxos em óleos vegetais e gorduras.

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

Fonte: Demirbas (2008b).

Figura 2: Potencialidades brasileiras para produção e consumo de combustíveis vegetais.



Fonte: BIODIESELBR, 2012.

Conforme foi demonstrado na Tabela 1, os óleos consistem de uma mistura de ácidos graxos, os quais lhe conferem propriedades físico-químicas peculiares. A Tabela 2 apresenta as propriedades de interesse para a área de biocombustíveis para alguns óleos vegetais potenciais para serem empregados na síntese de biodiesel. A partir desta tabela fica evidente a elevada viscosidade dos óleos vegetais quando comparados ao diesel, principalmente a do óleo de mamona (ROSSI et al., 2000; LOTERO et al., 2005).

Um fato a ser considerado para baixar custos de fabricação e tornar o biodiesel competitivo, é a utilização de óleos degomados que apresentam menor custo que óleos refinados, além da possibilidade da reciclagem de óleos

de fritura na produção deste biocombustível (AKGUN e IYSCAN, 2007; SILVA, 2009), no entanto, mudanças no procedimento de reação são frequentemente necessárias devido à presença de água e de ácidos graxos livres.

A utilização de biodiesel como combustível vem apresentando um potencial promissor no mundo, devido principalmente à redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental. No entanto, a produção de biodiesel requer apoio governamental no sentido de regulamentar e incentivar seu crescimento industrial. Na Europa a produção de biodiesel já atinge cerca de 20 a 25 milhões de galões/ano, podendo atingir de 500 milhões até 1 bilhão de galões/ano, sendo atualmente a Alemanha o maior produtor e consumidor europeu (GERPEN, 2005).

Tabela 2: Especificações de alguns óleos vegetais *in natura* e do óleo diesel – adaptado de ROSSI et al. (2000).

Características	Tipos de óleos					
	Mamona	Babaçu	Dendê	Soja	Pequi	Óleo diesel
Poder calorífico (kcal/kg)	8913	9049	8946	9421	9330	10950
Ponto de névoa (°C)	10	26	31	13	26	0
Índice de cetano	Nd	38	38 – 40	36 – 39	38	40
Densidade a 25 °C (g/cm ³)	0,9578	0,9153	0,9118	Nd	0,9102	0,8497
Viscosidade a 37,8 °C (cSt)	285	30,3	36,8	36,8	47,0	2,0 - 4,3
Destilação a 90% (°C)	Nd	349	359	370	Nd	338
Teor de cinzas (%)	Nd	0,03	0,01	Nd	0,01	0,014
Cor (ASTM)	1,0	0,5	1,0	Nd	2,0	2,0
Resíduo de carbono sobre 10% do resíduo seco (%)	Nd	0,28	0,54	0,54	Nd	0,35

3.2.1 Aspectos Ambientais

Uma das grandes vantagens do biodiesel é sua adaptabilidade aos motores do ciclo diesel, diferindo, assim, de outros combustíveis limpos como o gás natural ou biogás, que requerem adaptação dos motores. Sua viabilidade, do ponto de vista econômico, está relacionada à substituição das importações e às vantagens ambientais inerentes tais como a redução de emissão de materiais particulados, de dióxido de carbono (CO₂), e de dióxido de enxofre (SO₂), os quais são gases responsáveis pelo efeito estufa e chuva ácida. O biodiesel é um combustível que além de não conter enxofre, reduz significativamente as emissões de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH's) e de aldeídos, cujas emissões são compensadas pelo aumento da emissão de acroleína, evitando custos com saúde pública, e podendo gerar recursos internacionais no mercado de carbono (DERMIRBAS, 2003; HOLANDA, 2004; VICENTE et al., 2004).

Em escala global, as mudanças climáticas causadas por emissões de dióxido de carbono através da combustão de carvão e de petróleo são a principal força para incentivar a produção de biocombustíveis. O biodiesel tem uma viscosidade de 10 a 17% maior do que o óleo diesel (DEMIRBAS, 2007), e teores bem menores de enxofre, de monóxido de carbono (CO) e de aromáticos do que o óleo diesel (SUBRAMANIAN et al. 2005). A mistura de biodiesel com diesel confere a este combustível propriedades lubrificantes, permitindo a completa dessulfurização do diesel mineral no processo de refino (VIANNA, 2006). Segundo este autor, uma mistura de biodiesel com diesel pode diminuir emissões de vários outros poluentes, além do enxofre (Tabela 3).

Tabela 3: Redução das emissões em relação ao diesel.

Tipo de Emissão	B100%	B20%
Monóxido de Carbono	0	0
Hidrocarbonetos	56,3	11,0
Particulados	55,4	18,0
Óxidos de Nitrogênio	+5,8	+1,2
Ar Tóxico	60	90

Nota: B100 se refere a 100% biodiesel e B20 se refere a uma mistura de 20% de biodiesel com óleo diesel.

Fonte: VIANNA, 2006.

O biodiesel oferece diversas vantagens ambientais e de segurança quando comparado com o diesel. Apresenta um ponto de fulgor muito mais alto, o que diminui a possibilidade de produzir vapores de ar/combustível, possui melhor qualidade de ignição, pois apresenta elevado teor de cetanos, que é um indicador importante na qualidade do combustível para motores de compressão interna (KNOTHE, 2005; ZAPPI et al., 2003). Seu armazenamento e manipulação são, portanto, mais seguros que o do diesel. O biodiesel também é superior ao diesel no que diz respeito à sua natureza não tóxica e ao fato de ser biodegradável. O biodiesel é degradado aproximadamente em 95% num período de 30 dias, causando poucos problemas em caso de derramamento acidental e para a saúde do trabalhador. Por produzir menor quantidade de gases do efeito estufa por unidade de energia utilizável e, pela emissão de CO₂ ser inferior ao limite fixado pelas plantas que originaram o combustível, pode contribuir significativamente para a redução do efeito estufa. O biodiesel apresenta também conteúdo praticamente nulo de enxofre (FUKUDA et al., 2001; BONDIOLI, 2004).

3.2.2 Aspectos Econômicos

O uso do biodiesel resulta em benefícios econômicos significativos para os setores rural e urbano, bem como para a balança comercial do país (KNOTHE, 2006).

Os países produtores serão beneficiados com a redução da dependência de importações de combustíveis fósseis, especialmente para o setor de transportes. Incentivos em impostos são compensados por um retorno de 60 a 70% através de redução na importação e do surgimento de novos impostos devido a novas atividades industriais. Atividades industriais essas que também serão responsáveis pela oferta de novas vagas de emprego (ENCINAR et al., 1999; LEUNG, 2010; ANTOLIN et al., 2002; VICENTE et al., 2004).

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

3.2.3. Aspectos Sociais

Nas Regiões Norte e Nordeste o vetor mais importante do Programa é o componente social, pois, diferentemente do PROÁLCOOL, a logística e formatação do Programa de Biodiesel, em todos os seus aspectos, está sendo feita com base no parâmetro social.

É necessário testar, demonstrar e fomentar os sistemas de produção agrícola com base em assentamentos familiares, pois é a partir desta estratégia produtiva que deverá alicerçar-se o programa. Um exemplo de sistema produtivo com base no social foi proposto no Senado Federal, fundamentado no agronegócio da mamona, alternativa que associa a geração

de renda ao uso de terras de baixo valor aquisitivo, bem como a utilização de uma cultura xerófila apropriada para o semi-árido nordestino (OLIVEIRA, 2001).

O biodiesel pode substituir total ou parcialmente o óleo diesel de petróleo em motores ciclo diesel automotivos como, por exemplo, caminhões, tratores, camionetas, automóveis, ou estacionários como geradores de eletricidade e calor (BIODIESEL, 2011). Experiências diversas, muitas delas realizadas na década de 80 do século passado, mostram que não são necessárias mudanças nos motores, mesmo com a utilização de biodiesel puro (B100) e muito menos como aditivo, através da mistura em até 5% (B5).

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

Para estimular ainda mais esse processo, o Governo Federal lançou o Selo Combustível Social, um conjunto de medidas específicas visando estimular a inclusão social da agricultura, nessa importante cadeia produtiva, conforme Instrução Normativa nº 01, de 05 de julho de 2005. Em 30 de setembro de 2005, o MDA publicou a Instrução Normativa nº 02 para projetos de biodiesel com perspectivas de consolidarem-se como empreendimentos aptos ao selo combustível social. O enquadramento social de projetos ou empresas produtoras de biodiesel permite acesso a melhores condições de financiamento junto ao BNDES e outras instituições financeiras. As indústrias produtoras também terão direito a desoneração de alguns tributos, mas deverão garantir a compra da matéria-prima, preços pré-estabelecidos, oferecendo segurança aos agricultores familiares. Os agricultores familiares também terão acesso a linhas de crédito do Pronaf, por meio dos bancos que operam com esse Programa, assim como acesso à assistência técnica, fornecido pelas próprias empresas detentoras do Selo Combustível Social (BIODIESEL, 2011).

3.3. PROCESSOS DE OBTENÇÃO DO BIODIESEL

A aplicação direta dos óleos vegetais nos motores é limitada por algumas propriedades físicas dos mesmos, principalmente sua alta viscosidade, sua baixa volatilidade e seu caráter poliinsaturado, que implicam em alguns problemas nos motores, bem como em uma combustão incompleta (ENCINAR, 1999). Visando reduzir a viscosidade dos óleos vegetais, melhorar a qualidade de ignição e ajustar a densidade específica, diferentes alternativas têm sido consideradas, tais como diluição, micro-emulsão com metanol ou etanol, craqueamento catalítico e reação de transesterificação com etanol ou metanol (MA e HANNA, 1999). Porém, os três processos mais investigados a fim de sobrepor os problemas encontrados na substituição do diesel por óleos vegetais são a pirólise, a micro-emulsificação e a transesterificação.

3.3.1 Transesterificação

A transesterificação, também conhecida como alcoólise, conduz à diminuição da viscosidade do óleo vegetal assim como melhora o desempenho do mesmo em motores movidos a diesel. Atualmente, o biodiesel é obtido através de reações de transesterificação entre um óleo vegetal e um álcool de cadeia curta na presença de catalisador. Alcoóis de cadeia curta, como o metanol e etanol, também têm sido utilizados na tentativa de se excluir os catalisadores da reação (MA e HANNA, 1999).

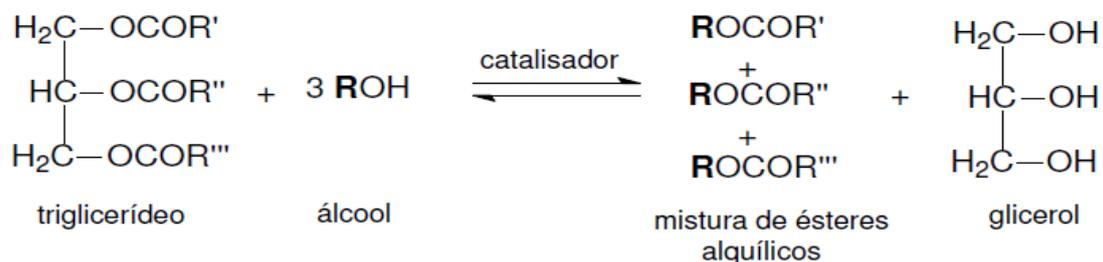
O Brasil apresenta uma vantagem em relação aos países europeus que utilizam metanol na produção do biodiesel, pois utiliza etanol que, além de apresentar menor toxidez, é proveniente de fontes renováveis, e é produzido em larga escala no país por tecnologia altamente competitiva (MA e HANNA, 1999; FUKUDA et al., 2001; ZHANG et al., 2003; COSTA, 2004).

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

seletividade. Também pode ser realizada em meio enzimático e sem a presença de catalisadores, em reações a altas pressões e temperaturas.

Na reação de transesterificação dos óleos vegetais, um triacilglicerol reage com um álcool na presença de um catalisador (enzimático, ácido forte ou base), produzindo uma mistura de ésteres e glicerol. A reação estequiométrica exige 1 mol de um triacilglicerol e 3 moles do álcool, resultando na produção de 3 moles de ésteres e 1 mol de glicerol, conforme representação na Figura 3. Entretanto, um excesso do álcool é usado para aumentar os rendimentos dos ésteres. Diversos aspectos, incluindo o tipo de catalisador (enzimático, alcalino ou ácido), razão molar entre álcool/óleo vegetal, temperatura, pureza dos reagentes (principalmente índice de água) e de ácidos graxos livres afetam a taxa de reação (SCHUCHARDTA et al., 1998).

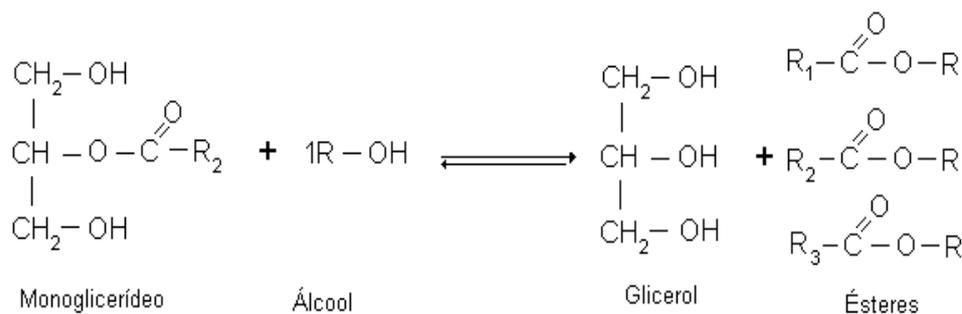
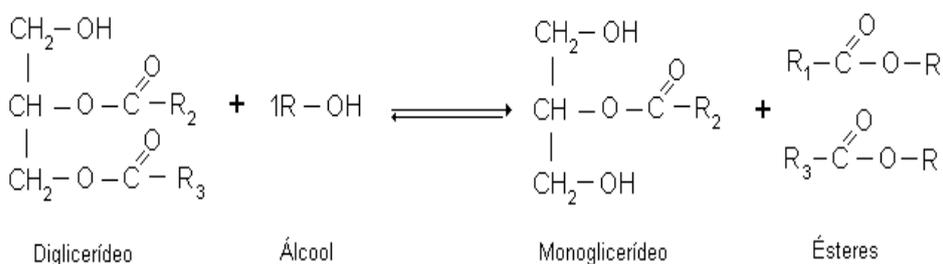
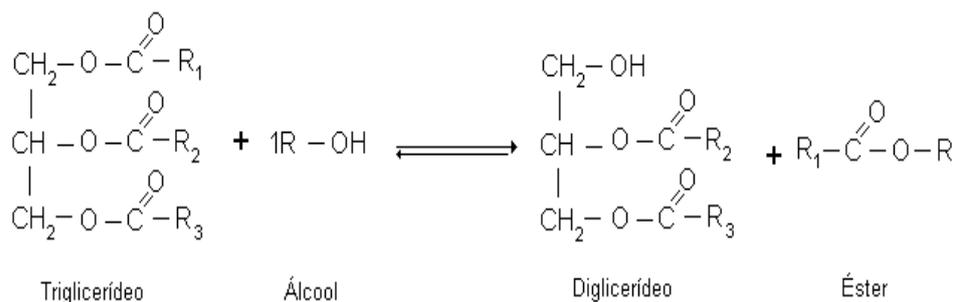
Figura 3: Representação da reação de metanólise de triacilgliceróis.



Fonte: TALEBIAN-KIAKALAIEH et al., 2013.

A transesterificação é uma reação reversível que ocorre em três etapas reacionais com formação de produtos intermediários: diacilgliceróis (DAG) e monoacilgliceróis (MAG), representadas pela Figura 4.

Figura 4: Reações intermediárias da reação de alcoólise de triacilgliceróis.



Fonte: TRENTIN, 2010.

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

Com relação ao álcool a ser utilizado como agente de transesterificação, pode ser utilizado metanol, etanol, propanol ou butanol;

sendo o metanol e o etanol os mais empregados (MACEDO e MACEDO, 2004).

O biodiesel utilizado em vários países da Europa e nos Estados Unidos é uma mistura de ésteres produzidos pela rota metílica. O metanol geralmente é obtido de fontes fósseis não renováveis, mas também pode ser obtido por destilação seca da madeira; esta rota, no entanto, produz quantidades menores. A tecnologia de produção de biodiesel pela rota metílica é totalmente dominada, porém, esta rota apresenta a desvantagem de que o metanol é extremamente tóxico, podendo causar cegueira e morte (LIMA, 2004).

A transesterificação utilizando o etanol é mais trabalhosa, pois o uso do deste álcool, ainda que anidro, implica em problemas na separação da glicerina do meio reacional. Entretanto, o uso de etanol é vantajoso, pois o Brasil, ainda, é o maior produtor mundial de etanol sintetizado a partir de cana-de-açúcar (LIMA, 2004). Além de ser proveniente de fonte renovável, a utilização do etanol resultará em maiores ganhos no mercado de carbono. Quanto às dificuldades na separação das fases em reações que empregam etanol na síntese do biodiesel, as mesmas podem ser contornadas por ajustes nas condições reacionais.

De acordo com Akgun e lyscan (2007), dentre os fatores que interferem no rendimento da reação de transesterificação, pode-se citar o tipo e quantidade de catalisador, tempo e temperatura de reação, razão molar de óleo:álcool, teor de ácidos graxos livres e água nos substratos, intensidade de agitação, solubilidade entre as fases e natureza do álcool. No entanto, estas variáveis vão depender necessariamente da metodologia empregada.

Nas reações de transesterificação alguns parâmetros precisam ser considerados, como:

- A quantidade de ácidos graxos livres nos óleos é um fator importante na reação quando catalisada por NaOH, pois será maior o rendimento para a neutralização. O conteúdo de água dos reagentes deve ser muito baixo, pois pode alterar a rota da reação (hidrólise), o que aumentaria a viscosidade final do produto, dificultando o processo de separação.

- O efeito da razão molar entre os reagentes. Altas razões molares resultam em elevadas conversões em ésteres em curtos tempos de reação (MA e HANNA, 1999).
- Os tipos de catalisadores possíveis são os ácidos (H_2SO_4 , HCl e derivados H_2PO_4), básicos (KOH e NaOH) ou enzimáticos (lipases). Segundo Leung et al., (2010) a concentração de catalisador pode afetar o rendimento do produto em biodiesel. O catalisador mais comumente utilizado para a reação é o hidróxido de sódio.
- O efeito do tempo de reação. Para sistemas utilizando catalisadores químicos, a completa conversão do sistema é geralmente atingida em torno de 20 minutos de reação. No método enzimático com solventes orgânicos, a reação atinge conversão máxima em 5 horas de reação (FACCIO, 2004). Dalla Rosa et al., (2008) obteve conversão completa em 2 horas de reação, utilizando enzimas em fluidos pressurizados.
- O efeito da temperatura é variável em função dos tipos de óleos e do catalisador. Segundo Darnoko e Cheryan (2000) e Leung et al. (2010), a temperatura ótima para a reação utilizando catalisadores químicos situa-se próxima a temperatura normal de ebulição do álcool a ser utilizado na reação, e ela influencia claramente na reação de produção de biodiesel. Temperaturas mais elevadas podem diminuir a viscosidade do óleo e resultar em um aumento da taxa de reação e um tempo de reação mais curto. Em relação a sistemas enzimáticos, a temperatura ótima de operação é função da enzima a ser utilizada como catalisador da reação (NASCIMENTO et al., 2004).

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

A catálise química homogênea (ácida ou básica) é a técnica mais utilizada na reação de transesterificação, pois permite, no caso da catálise alcalina, a obtenção de altas conversões em baixos tempos de reação, como relatam estudos na literatura (FREEDMAN et al., 1986; DARNOKO e CHERYAN, 2000; FACCIO, 2004; FERRARI et al., 2005; MARTINEZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005; MARTINEZ et al., 2006; LIMA et al., 2007).

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

Um grande número de catalisadores heterogêneos tem sido relatado na literatura para promover a reação de transesterificação, tal como Kawashima et al., (2008), que utilizaram óxidos para promover a reação de produção de biodiesel do óleo de colza; suas atividades catalíticas foram testadas a 60 °C, com uma relação molar metanol:óleo de 6:1 e um tempo de reação de 10 horas. Nestas condições, os catalisadores CaTiO_3 , CaMnO_3 , $\text{Ca}_2\text{Fe}_2\text{O}_5$, CaZrO_3 e CaO-CeO_2 mostraram rendimentos de aproximadamente 90% de ésteres metílicos.

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

Yang e Xie (2007) utilizaram metal alcalino terroso dopado em óxido de zinco como catalisador heterogêneo para a transesterificação do óleo de soja,

sendo que a maior atividade catalítica foi obtida com ZnO impregnado com 2,5 mmol de $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2/\text{g}$, seguido de calcinação a 600 °C por 5 horas. A reação de transesterificação foi realizada em refluxo de metanol a 55 °C, razão molar óleo:metanol de 1:12, utilizando 5% de catalisador, obtendo uma conversão de 94,7% em biodiesel. Além disso, quando usado tetrahidrofurano como co-solvente a conversão alcançou 96,8%.

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

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

de água deve ser inferior a 0,06% (m/m) e de ácidos graxos livres menor que 0,5% (m/m) (MA e HANNA, 1999; ZHANG et al., 2003).

A transesterificação alcalina ocorre aproximadamente 4000 vezes mais rápida do que a ácida e é a mais empregada comercialmente, pois permite a obtenção de altas conversões em baixos tempos de reação, como relatam estudos na literatura (FREEDMAN et al., 1986; NOUREDDINI; ZHU, 1997; DARNOKO; CHERYAN, 2000; FACCIO, 2004; MARTINEZ, 2005; OLIVEIRA et al., 2005).

Embora a transesterificação química, empregando catálise alcalina, resulte em altas taxas de conversão de triglicerídeos em seus respectivos ésteres, quando se trata de custos, tempos de reação, existem alguns inconvenientes ou desvantagens (MADRAS et al., 2004):

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

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

Catalisadores enzimáticos tornaram-se recentemente mais atraente, uma vez que pode evitar formação de sabão e o processo de purificação é simples de realizar. No entanto, eles são frequentemente menos utilizados comercialmente devido ao maior tempo de reação e maior custo (LEUNG et al., 2010).

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

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

Misturas dos óleos de colza foram tratados com preparações de várias lipases imobilizadas na presença de metanol. A lipase de *C. antarctica* foi a mais efetiva em promover a formação de ésteres metílicos. Para atingir altos níveis de conversão, foi necessária a adição de três equivalentes de metanol. Porém, esta quantidade de metanol foi incorporada em três adições consecutivas, porque altos níveis de metanol resultam na desativação das enzimas. Sob estas condições, foram obtidas conversões acima de 97% de óleo a ésteres metílicos e por simples decantação houve a separação entre as fases de ésteres metílicos e de glicerol (SHIMADA et al., 1999; WU et al., 1999).

Lai et al., (2005) estudaram a produção de ésteres metílicos do óleo de farelo de arroz utilizando duas lipases comerciais imobilizadas, a *Novozym 435* e MI 60. A enzima *Novozym 435* mostrou-se mais eficaz, obtendo conversão superior a 98% em 6 horas de reação, utilizando 5% (m/m) da enzima.

Segundo Balat e Balat (2010), a alcoólise de triglicerídeos com uma lipase é considerada uma das reações mais eficazes para a produção de biodiesel. Embora processos de transesterificação catalisados por enzimas ainda não são comercialmente desenvolvidos, novos estudos foram relatados

na literatura. Esses estudos consistem principalmente na otimização das condições de reação (temperatura, solvente, pH, razão molar álcool/óleo, o tipo de micro-organismo que produz a enzima, etc) a fim de estabelecer as características adequadas para um processo de produção industrial. A síntese de biodiesel utilizando enzimas, tais como de *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida sp.*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor miehei* (*Lipozyme RMIM*), *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas lanuginosus* e *Thermomyces* é bem relatado na literatura (JEONG e PARCK, 2007; SHAO et al., 2008; SHAH e GUPTA, 2007; LUO et al., 2006).

Em relação à produção de biodiesel em sistemas enzimáticos utilizando solventes pressurizados, menores quantidades de solvente são utilizadas no processo, além da simples separação dos mesmos do meio reacional (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2000 e 2001; DALLA ROSA et al., 2008 e 2009). Altas conversões em ésteres são relatadas para ambos os sistemas, no entanto, requer a utilização de altos percentuais de enzima no meio de reação em relação à massa dos substratos. Dalla Rosa et al., (2008) apresenta a obtenção de biodiesel de soja em propano com a enzima comercial *Novozym 435*. Conversões completas da reação são relatadas em tempo de reação de 6 horas, utilizando 3% e 5% (m/m) de enzima, porém quando visto pelo aspecto de um menor tempo de reação, a concentração de 20% de catalisador torna-se apreciável. No emprego de propano pressurizado, a razão solvente:substrato necessária para que boas conversões de ésteres sejam atingidas é de 2:1 conduzindo à conversões de até 82% em ésteres.

A transesterificação enzimática propicia temperaturas amenas de operação, facilidade de separação do glicerol gerado como subproduto e a purificação dos ésteres produzidos é facilmente realizada (FUKUDA et al., 2001). Porém, a produção de biodiesel utilizando enzimas ocorre em velocidade consideravelmente menor que a catálise química via rota alcalina. Isso leva a necessidade do uso de grandes quantidades de catalisadores, o que aumenta os custos de produção (MOREAU, 2008).

Atualmente, vários processos são empregados para transesterificação de óleos embora subsistam ineficiências consideráveis nos métodos existentes

que incluem a redução da seletividade da reação, longo tempo de separação entre os produtos. O aquecimento convencional dos reagentes no caso da transesterificação requer maior energia, mais tempo de pré-aquecimento e de reação para produzir conversões superiores a 95% (KANITKAR et al., 2011). Microondas podem interagir diretamente com uma matriz de amostra por dois mecanismos: a rotação dipolar e condução iônica. Quando exposta a frequências de microondas, dipolos na amostra alinham-se na direção de aplicação de campo elétrico. Como o campo elétrico oscila rapidamente, o dipolo tenta realinhar o campo elétrico através de rotação. O calor é gerado pelas forças de atrito entre as moléculas polares e aleatoriamente rotativa. Na condução iônica, as partículas carregadas dissolvidas oscilam para frente e para trás sob a influência do campo aplicado de microondas. Quando ocorrem mudanças de direção de campo elétrico, os íons maiores dissipam sua energia cinética na forma de calor. Ambos os mecanismos contribuem sobre para o aquecimento localizado (KAPPE et al., 2009). Assim, a maior vantagem da síntese de microondas assistida é que as reações podem ser realizadas rapidamente, com eficiência e segurança (KANITKAR et al., 2011).

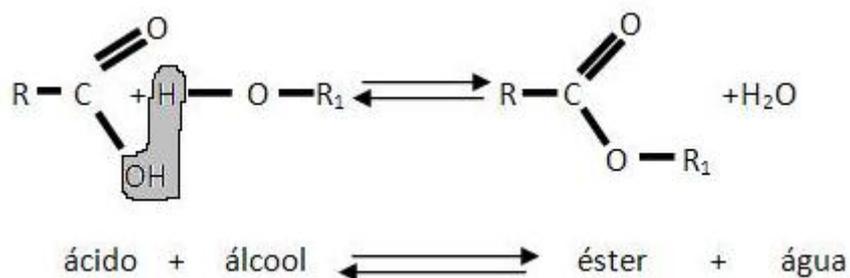
A transesterificação enzimática de óleos vegetais pode ser realizada de forma substancialmente mais rápida e mais economicamente, em reatores contínuo do que em reatores batelada (KOMERS et al., 2010; LEE et al., 2010; DALLA ROSA et al., 2009). Operação em batelada é considerada lenta e trabalhosa, em comparação com um processo contínuo, que tem vantagens evidentes: nos custos de produção e no tempo que podem ser ajustado de acordo com o nível de trabalho, e o projeto do equipamento é flexível em termos de otimização de qualidade do biodiesel (HALIM et al., 2009).

3.3.2 Esterificação

A esterificação é o processo de obtenção de um éster a partir da reação de um ácido orgânico ou inorgânico com um álcool, pela substituição de uma hidroxila (-OH) de um ácido por um radical alcoxila (-OR) do álcool, havendo eliminação de água.

A esterificação pode ser precedida da hidrólise de uma molécula de triglicerídeo, produzindo-se uma mistura de ácidos graxos, que são então esterificados. Pode-se observar que, enquanto na transesterificação utilizam-se três moléculas de álcool para cada molécula de triglicerídeo, a esterificação obedece a uma estequiometria de um mol de álcool para cada mol de ácido graxo, conforme Figura 5. Outro aspecto a ser notado é que o subproduto da reação de esterificação é a água, o que representa uma vantagem ambiental quando comparado com a reação de transesterificação, que gera glicerol.

Figura 5: Representação da reação de esterificação.



Fonte: CONSTANTINO et al., 2004.

De uma forma geral, a reatividade dos álcoois varia segundo o tipo de álcool em função do processo de desidratação, sendo maior nos álcoois primários, seguido dos secundários e depois pelos terciários. Álcoois terciários, por exemplo, tem reatividade muito pequena dada à fácil desidratação. Outros problemas encontrados com álcoois estão relacionados com o impedimento estérico e a proximidade das hidroxilas. Quanto mais ramificada é a cadeia carbônica e mais perto estiverem às hidroxilas no álcool, o processo será mais lento e com menor limite de esterificação (LIMA, 2008).

Conforme Patel et al., (2013), a reação de esterificação é uma reação de equilíbrio limitado. Visando transpor a limitação de equilíbrio, a esterificação de ácidos graxos livres geralmente é realizada utilizando o álcool em excesso, a fim de favorecer a reação. Os autores ainda estudaram a produção de biodiesel por esterificação de ácidos graxos livres sobre zircônia sulfatada, e avaliaram o efeito de vários parâmetros da reação tais como: concentração de

catalisador, razão molar de álcool, tempo de reação e temperatura sobre o desempenho catalítico, para otimizar a condições máxima de produção de ésteres metílicos, e verificaram que o catalisador é estável até 600 °C e que o $\text{CSO}_4^{2-}/\text{ZrO}_2$ exibe uma atividade significativa para a produção de biodiesel por esterificação de ácido oléico sob condições amenas, com um rendimento de 90%. Seus estudos também revelaram que o catalisador pode ser utilizado para a produção de biodiesel a partir de óleo de cozinha já utilizado e de óleo de *Jatropha* sem qualquer pré-tratamento. Por isso, o catalisador estudado pode se utilizado para matérias-primas que são ricas em ácidos graxos livres.

A reação de esterificação com catálise ácida representa uma forma eficiente de conversão de ácidos carboxílicos livres em seus ésteres correspondentes (Biodiesel) quando o resíduo contém grande concentração de ácidos graxos livres. Neste caso, ocorre a reação de substituição nucleofílica bimolecular, sem formação de carbocátions e a reação ocorre em um único estágio e o hidrogênio presente na molécula do ácido carboxílico é substituído pelo grupo CH_3CH_2^- proveniente do álcool (BARROS et al., 2008).

A viabilidade econômica para a produção de biodiesel pode ser acentuada quando realizada via esterificação de diferentes ácidos graxos livres presentes nas borras ácidas oriundas do processo de refino de óleo vegetais (GHANDI et al., 1995) e em resíduos graxos de outros processos (XEU et al., 2006).

3.4. ENZIMAS

As enzimas são importantes componentes do metabolismo de todos os seres vivos, elas têm a capacidade de promover e acelerar reações químicas. Micro-organismos ou substâncias com essa propriedade já eram usados por populações humanas muito antigas para modificar alimentos – fermentar uvas e fabricar o vinho, ou alterar o leite e produzir queijo, por exemplo. Depois que pesquisadores desvendaram a atuação das enzimas, estas passaram a ser cada vez mais empregadas, com variadas finalidades, tanto na área de alimentos, quanto em muitos outros setores.

Estes biocatalisadores ou catalisadores biológicos são proteínas cuja principal função, portanto, é catalisar reações nos organismos. Os biocatalisadores são utilizados em química orgânica como uma alternativa aos processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens. Dentre estas se destacam: utilização de condições brandas, compatibilidade com substratos sintéticos, em alguns casos podem catalisar as reações nos dois sentidos e podem, ainda, apresentar seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam (PAQUES; MACEDO, 2006).

Muito da história da bioquímica refere-se à pesquisa em enzimas. Em 1926, James Sumner's isolou e cristalizou a primeira enzima, a urease, que catalisa a hidrólise da uréia em NH_3 e CO_2 . Com exceção de um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA, todas as enzimas são proteínas (GALVÃO, 2004). Pode-se definir a grande maioria das enzimas como sendo proteínas globulares formadas por resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. São catalisadores biológicos que diminuem a energia de ativação, acelerando termodinamicamente uma reação possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação (ERGINER et al., 2000; GÜRSEL et al., 2003; ISIK et al., 2003).

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (DALLA-VECHIA et al., 2004).

Enzimas são catalisadores de reações químicas em sistemas biológicos, envolvendo reações com substratos. São geralmente de natureza protéica, altamente específicas e apresentam grande poder catalítico. A aplicação tecnológica de enzimas é bastante vantajosa quando comparada aos processos químicos por não necessitar de condições de temperatura e pressão drásticas. Uma das vantagens da produção microbiana de enzimas é que se pode utilizar substratos de baixo custo e as mesmas exigirem um tempo relativamente curto de produção (MEDEIROS et al., 1999).

As lipases são originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência (SAXENA et al., 2003).

Atualmente, aproximadamente 4000 enzimas são conhecidas, e destas cerca de 200 são usadas comercialmente, sendo que a maioria das enzimas é de origem microbiana (SHARMA et al., 2001).

As enzimas como proteínas biologicamente ativas são responsáveis pela catálise de diversas reações. Em uma proteína enzimática, existe certo domínio chamado de “sítio ativo” que se liga ao substrato – a molécula reagente – e diminui a energia do estado de transição que leva ao produto desejado. A ligação entre o sítio ativo e o substrato é extremamente específica: a molécula precisa ter certas características eletrônicas e espaciais que permitam o seu “encaixe” com a proteína, esta relação tem sido chamada de “chave-fechadura”. Como catalisadores biológicos, as enzimas estão sujeitas às mesmas leis termodinâmicas e cinéticas dos catalisadores químicos, isto é, alteram a velocidade da reação, porém não a reação final de equilíbrio entre o substrato e o produto (PRIMO et al., 2007).

A conformação e a estabilidade da estrutura molecular das enzimas é assegurada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de Van der Waals. A atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade da enzima dependem da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, temperatura e força iônica do meio, entre outros, afetam a estrutura da enzima e, em decorrência, suas propriedades (LIMA et al., 2001).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, os quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação de enzimas como catalisadores em processos industriais (CASTRO et al., 2004).

Da maioria das enzimas aplicadas industrialmente, aproximadamente 75% são hidrolases, utilizadas na despolimerização de substâncias naturais. Entre as enzimas classificadas como hidrolases, as proteases dominam o

mercado enzimático, representando cerca de 40% de todas as enzimas comercializadas. As proteases são empregadas em vários setores como a indústria de alimentos, detergentes, couro e farmacêutica. O segundo grande grupo de hidrolases com aplicação industrial é composto pelas carbohidrases, utilizadas em cervejarias, panificação, na indústria do amido, têxtil e de papel. Além destes setores, estas enzimas têm sido utilizadas na fabricação de ração animal, em biotransformação de produtos químicos, em análises diagnósticas e no tratamento de resíduos. Outras classes de enzimas encontram aplicação industrial pontual, como a glicose isomerase, as oxidases, glicose oxidase, colesterol oxidase e algumas enzimas usadas em técnicas de biologia molecular (SAID; PIETRO, 2004).

3.4.1 Imobilização de enzimas

Em 1916, ocorreu a primeira utilização de enzima imobilizada (*invertase* em carvão vegetal) por Nelson e Griffin. Em 1960 Katchalski introduziu os primeiros suportes úteis. Em 1978, os processos com enzimas imobilizadas também têm utilização industrial em larga escala - *aminoacilase* imobilizada em DEAE–Sephadex para produção L-aminoácidos.

O maior uso de enzimas imobilizadas é na produção de xaropes de frutose através da *glicose-isomerase* imobilizada é realizada em grande escala nos Estados Unidos.

A imobilização pode ser definida como um movimento não independente das células ou enzimas na parte aquosa do sistema, por serem alojadas dentro ou na superfície do agente imobilizador. A imobilização também é definida como a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente (CANTARELLI, 1989).

Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da

imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (VILLENEUVE et al., 2000).

Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas em um espaço, separadas por barreiras que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio da reação, mas que as tornam pouco solúveis em qualquer meio (GIRELLI; MATTEI, 2005; PAIVA et al., 2000). As pesquisas sobre esse assunto intensificaram-se a partir dos anos 60, no sentido de estabelecer métodos eficientes de imobilização, quer por meios físicos ou químicos (VITOLLO, 2001).

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

Embora as enzimas apresentem muitas vantagens em relação aos catalisadores inorgânicos, como alta especificidade, condições amenas de reação, baixo consumo de energia, e maior atividade catalítica, sua utilização em processos industriais têm sido limitada. Isto se deve, principalmente, à baixa estabilidade operacional, ao elevado custo de obtenção e à dificuldade de separação do produto final, impedindo seu uso em processos contínuos. Com a finalidade de aproveitar as vantagens da catálise enzimática e superar as deficiências deste processo, têm-se estudado métodos para tornar enzimas insolúveis ao meio de reação, resultando nas técnicas de imobilização enzimática (ZANIN; MORAES, 2004; LADERO et al., 2002).

Como as enzimas não são consumidas na reação, sua ação catalítica é semelhante aos catalisadores inorgânicos. Porém, é diferente dos catalisadores sintéticos comuns pela forma amena que realiza a catálise, geralmente em soluções aquosas neutras, temperatura e pressão ambiente e, principalmente, com elevado grau de especificidade em relação ao substrato. O

processo de imobilização tem sido bastante estudado para viabilizar o uso de enzimas industrialmente, permitindo a recuperação e o reaproveitamento da mesma, pois o uso da enzima livre é, em várias situações, inviável economicamente (RIBEIRO, 1989; COUTINHO FILHO, 1996; VICENTE, 2000).

Apesar do grande número de trabalhos publicados no campo da imobilização enzimática, poucos processos são aplicados em escala industrial. Tal fato deve-se ao elevado custo dos suportes e reagentes utilizados no processo de imobilização, baixa eficiência de retenção catalítica da maioria dos processos, baixa estabilidade operacional de muitas enzimas imobilizadas e pouca versatilidade em equipamentos de operação contínua. Além disso, a pequena demanda do produto normalmente não incentiva a produção em larga escala (ZANIN; MORAES, 2004).

3.4.2 Lipases

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

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

As lipases têm sido definidas, nos trabalhos mais recentes, como carboxilesterases, que hidrolisam acilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono, enquanto que as enzimas que hidrolisam acilgliceróis compostos de ácidos graxos de cadeia curta (menos de dez átomos de carbono) são reconhecidas

como as esterases-carboxil éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3 (CASTRO-OCHOA et al., 2005; BORNSCHEUER, 2002; NINI et al., 2001; SHARMA et al., 2001; JAEGER et al., 1999).

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

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

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

As lipases pertencem a um grupo especial de esterases, são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando di- ou monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Atuam sobre substratos pouco solúveis em água, em interfaces de lipídeo/água, hidrolisando, por exemplo, acilgliceróis de cadeia longa (acima de 8 átomos de carbono) (ERICSSON et al., 2008; CÔTÉ; SHARECK, 2008).

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

3.4.3 Lipases como catalisadores

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

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

A vantagem da reação catalítica enzimática em comparação com o método convencional é que a reação pode ser realizada sob condição de reação brandas. Portanto, é mais vantajoso para a produção de produtos de alto valor agregado, como para produção de éster, na indústria farmacêutica e de óleos químicos (RAHMAN, et al. 2012).

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

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

As desidrogenases são enzimas nicotinâmicas, isto é, dependem da presença do cofator, e atuam em reações de oxiredução envolvendo grupos CH-OH, C=O e CHO. Algumas desidrogenases NAD ou NADP dependentes têm um elevado potencial de aplicação em síntese orgânica devido ao seu amplo espectro de ação (GONÇALVES et al., 2000; GONÇALVES et al., 2003).

Em alguns casos, micro-organismos íntegros podem ser usados (RIBEIRO et al., 2003).

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

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

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

As lipases são enzimas que são primeiramente responsáveis pela hidrólise de acilglicerídeos. Contudo, um número de diferentes ésteres de altas e baixas massas molares, tiol ésteres, amidas, etc., são utilizados como substratos por este único grupo de enzimas. O extenso campo para emprego, em uma variedade de reações, dotado de ampla especificidade do substrato, é também aumentado pelo fato destas lipases serem capazes de catalisar a reação reversa de síntese, de forma adequada e eficientemente. De fato, algumas lipases são mais desejáveis para aplicações de síntese do que hidrólise (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998; GANDHI, 1997; YAHYA et al., 1998).

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

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

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

Em função dessas características, as lipases são de importância particular em biotecnologia com diversas aplicações em indústrias de alimentos, têxtil, detergentes biológicos, aplicações médicas, farmacêuticas,

agroquímica, oleoquímica e na produção enzimática de substâncias químicas lipofílicas. Lipases termoestáveis apresentam um importante papel em processos industriais cujas temperaturas empregadas excedam 50°C (SINCHAIKUL et al., 2001; SHARMA et al., 2002; DE PAULA et al., 2005; HASAN et al., 2006).

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

Recentemente, o interesse em pesquisas com lipases, principalmente de origem microbiana, tem crescido devido ao seu grande potencial biotecnológico. Como biocatalisadores, as lipases apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos industriais. Efetivamente, suas características de especificidade, regioseletividade e enantiosseletividade, permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos requerem procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizam temperatura e pressão ambientes, condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente (CASTRO-OCHOA et al., 2005; SILVA et al., 2005; VILLENEUVE et al., 2000). Consequentemente, uma considerável atenção vem sendo dada ao uso das lipases em aplicações industriais.

3.5. CATÁLISE ENZIMÁTICA EM ULTRASSOM

O ultrassom foi descoberto em 1880 por Curie enquanto estudava o efeito piezoelétrico e 14 anos depois Thornycroft e Barnaby observaram que, na propulsão de mísseis, uma fonte de vibração era gerada causando implosão de bolhas e cavidades na água, fenômeno que ficou conhecido como cavitação. Entretanto, somente em 1912, quando Langevin desenvolveu o

SONAR (Sound Navigation And Ranging), um aparelho capaz de medir a profundidade do mar, que as ondas na frequência de ultrassom foram aplicadas comercialmente. Em 1927, os efeitos destas ondas foram observados em sistemas químicos e biológicos e em 1950 os primeiros aparelhos geradores de ultrassom foram comercializados (MARTINEZ et al., 2000).

A fonte de energia ultrassônica é uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas, sistema este que 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; SERRA, 1992).

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

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

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

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

Nos últimos anos têm sido relatados estudos com a utilização de ultrassom em reações químicas, bem como em outras áreas da ciência.

Ultrassom é considerado uma tecnologia "verde" devido à sua alta eficiência, baixos requisitos instrumentais, redução significativa do tempo de processamento em comparação com outras técnicas convencionais e por, geralmente, demonstrar um desempenho economicamente viável (MASON, 2007).

A aplicação das ondas sonoras de alta potência se dá nas áreas da biologia (homogeneização, rompimento de células), engenharia (limpeza de metal, soldagem, refinamento de metal, perfuração), industrial (filtração, degaseificação, cristalização, dispersão de sólidos, emulsificação, etc), física (cavitação, fenômeno de ondas acústicas, velocidade do som), polímeros (polimerização, despolimerização, degradação da massa molecular), entre outros (MARTINEZ et al., 2000).

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

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

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

Existem muitos fatores que afetam a cavitação: presença de gás dissolvido, frequência de irradiação, temperatura, viscosidade, tensão

superficial, pressão externa e presença de partículas em solução (RASO et al., 1999).

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

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

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

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

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

Há muitos relatos na literatura relacionada à intensificação da síntese de biodiesel com diferentes tipos de matérias-primas, alguns exemplos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Comparação da produção de biodiesel utilizando o método de ultrassom.

Óleo	Catalisador	Álcool	Concentração de Catalisador	Razão molar	Temperatura de reação (°C)	Tempo de reação (min)	Conversão	Reator ultrassom	Referências
Sebo bovino	KOH	Metanol	0,5	1:6	60	1,7	92	400W	Kumar et al., 2010
Jatropha	Na/SiO ₂	Metanol	3	1:9	-	15	98	200W	Deshmane et al., 2010
Ácido graxo destilado de palma	H ₂ SO ₄	Metanol	2	1:3	90	720	98	240W	Mootabadi et al., 2010
Palma	BaO	Etanol	2,5	1:9	65	60	95	200W	Zhang et al., 2009
Trioleína	KOH	Metanol	1	1:6	25	15	95	Batelada, 1200W	Yu et al., 2010
Soja	Novozym 435	Metanol	6	1:6	40	720	96	Batelada	Babicz et al., 2010
Canola	KOH	Metanol	0,7	1:5	-	50	99	1KW	Thank et al., 2010
Óleo de cozinha utilizado	KOH	Metanol	0,7	1:5	25	0,93	99	2KW	Hingu et al., 2010
Óleo de cozinha utilizado	KOH	Metanol	1	1:6	45	40	89	250W	Chand et al., 2010
Óleo de cozinha utilizado	KOH	Metanol	0,75	1:5	30	30	98	400W	Santos et al., 2009
Óleo vegetal	NaOH	Metanol	0,5	1:6	-	20	98	Batelada, 1200W	Stavarache et al., 2005
Palma	Bao, Sro	Metanol	2,8	1:9	65	50	95	200W	Kelkar et al., 2008
Ácido graxo	H ₂ SO ₄	Metanol	2	1:10	28	90	95	Batelada, 200W	Huang et al., 2010
Sacarose	K ₂ CO ₃	Metanol	13	1:2	70	2	95	Batelada	Hanh et al., 2009

Fonte: GOLE; GOGATE, 2012.

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

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

3.5.1 Produção enzimática de biodiesel em banho de ultrassom

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

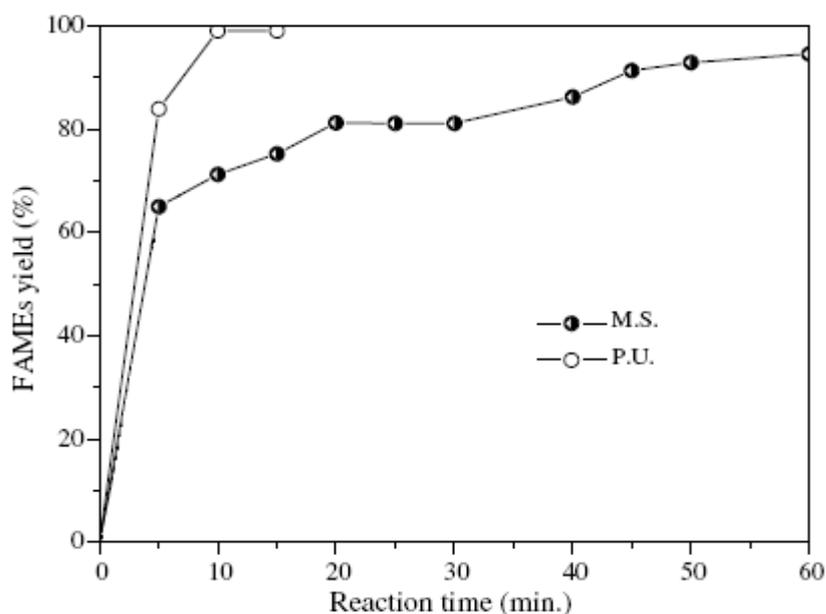
O processo de produção de biodiesel utilizando ultrassom vem como alternativa ao processo convencional de produção, uma vez que as cavitações (formação, aumento e implosão de bolhas no meio reacional) geradas pelo ultrassom aumentam a miscibilidade entre os reagentes, fornecem energia necessária para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

Tem sido relatado que o ultrassom exerce um efeito significativo sobre a transesterificação enzimática. A irradiação de ultrassom vem sendo estudada

para produção de biodiesel utilizando enzimas, como a *Novozym 435* (YU et al., 2010), bem como o uso de catalisadores ácidos ou básicos (DESHMANE et al., 2009; MAHAMUNI et al., 2009). No entanto, pouca investigação tem sido apresentada até a presente data sobre as aplicações da irradiação de ultrassom na produção de biodiesel catalisada por lipases.

Ji et al., (2006) estudaram o método de produção de biodiesel com energia ultrassônica (19,7 kHz) em transesterificação utilizando óleo de soja, metanol e hidróxido de sódio como catalisador. Para as condições experimentais estudadas, os melhores resultados foram obtidos mediante razão molar álcool/óleo de 6:1, frequência de pulso igual a 1 (ultrassom contínuo) e temperatura de 45 °C. Na Figura 6 o rendimento de ésteres é obtido mais rapidamente para a reação assistida por ultrassom, se comparado ao processo reacional sob agitação mecânica. Esse fato é explicado pelo aumento do contato entre as fases álcool/óleo, reduzindo assim a barreira inicial da reação devido à imiscibilidade dos reagentes (JI et al., 2006).

Figura 6: Efeito de métodos diferentes em rendimentos de metil éster de ácidos graxos. - ● - reação assistida por ultrassom (P.U); - ○ - reação sob agitação mecânica (M.S).



Fonte: Ji et al., (2006).

Yu et al., (2010) estudaram a produção de biodiesel com óleo de soja e metanol em sistema de ultrassom utilizando como catalisador a enzima *Novozym 435*. Nas condições ótimas de 50% da energia ultrassônica (500 W e frequência de irradiação de 40 kHz), 50% de vibração, teor de água de 0,5%, razão molar de 1:1 álcool terc-amil/volume de óleo, razão molar 6:1 metanol/óleo, 6% de *Novozym 435* e 40 °C, rendimentos de 96% em ésteres metílicos de ácidos graxos foram obtidos. Nestas condições, a enzima não apresentou perdas de atividade durante os ciclos.

Kumar et al., (2011) avaliaram a produção de ésteres metílicos através da metanólise do óleo de pinhão manso onde foi utilizada uma lipase imobilizada obtida a partir *Anterobacter aerogenes* como catalisador e um sistema de ultrassom. Foi avaliado o efeito do tempo (20-35 min), da razão molar óleo/metanol (1:3 – 1:5), da concentração do catalisador (3 – 6%, com base na massa de óleo) e da amplitude e ciclo do ultrassom (30 – 60% para amplitude e 0,3 – 0,9 s para o ciclo). A condição ótima obtida foi em 30 min de reação, razão molar óleo/metanol de 1:4, concentração do catalisador de 5%, ultrassom com amplitude de 50% e ciclos de 0,7 s (cada segundo). Nestas condições otimizadas obteve-se o rendimento máximo de 84,5% de biodiesel.

Para as reações sob irradiação ultrassônica, à energia ultrassônica consiste em um fator relevante. Ondas ultrassônicas de baixa intensidade têm um efeito pequeno sobre a transferência de massa da solução, em comparação com alta intensidade, o que aumenta a transferência de massa. Por outro lado, as ondas de alta intensidade ultrassônica podem levar a mudanças na conformação da enzima (BEZBRADICA et al., 2006).

A aplicação do ultrassom contribuirá para uma mistura de reação mais homogênea e facilitará a dispersão da lipase através do substrato, reduzindo a aglomeração de modo que a taxa de reação não diminui com o aumento da concentração de lipase (LIU et al., 2008).

No caso da catálise enzimática, embora as taxas de conversão de triglicerídeos em ésteres sejam mais lentas em comparação com a catálise alcalina, a catalise enzimática tem atraído muita atenção, pois é um processo de produção mais limpo e tem potencial para implementação industrial devido à

simplicidade do processo e o uso de menor temperatura de reação. De fato, como mencionado por Nielsen et al., (2008), a principal vantagem de um processo de produção de biodiesel enzimático é que os triglicerídeos, bem como ácidos graxos livres podem ser eficientemente transformados em biodiesel, e o glicerol como co-produto pode ser facilmente recuperado, com alta qualidade sem qualquer processo complexo (NIELSEN et al., 2008). Embora o alto custo de produção de enzimas continua a ser o grande obstáculo para a comercialização do processo de catálise enzimática, tem se realizado estudos com o uso de solventes tolerantes, enzimas comerciais e não comerciais, novas tecnologias para a imobilização de lipases, para tornar o catalisador reutilizável para produção de biodiesel (NIELSEN et al., 2008).

Batistella et al., (2012) relata a transesterificação do óleo de soja com etanol utilizando duas lipases comerciais imobilizadas (*Lipozyme* RM IM e *Novozym* 435) sob a influência da irradiação ultrassom, avaliou os efeitos da temperatura, da concentração de enzima e de água, razão molar óleo/ etanol e a potência da irradiação sobre a conversão da reação. Os resultados obtidos pelos autores mostram que a transesterificação enzimática assistida por ultrassom pode ser uma alternativa para o método alcalino convencional, alcançando conversões de 86,5 % para irradiação ultrassônica de 100 Watts, razão molar (óleo/etanol) 1:3 temperatura de 57 °C em um tempo de reação relativamente curto, de 4 h, usando 12,3% (p/p) de concentração da enzima *Lipozyme* IM RM como catalisador.

3.6. CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Na revisão bibliográfica apresentada neste capítulo, procurou-se relatar o estado da arte a respeito da produção de biodiesel por transesterificação enzimática. As matérias-primas mais utilizadas na produção de biodiesel no Brasil são o óleo de soja e o metanol, dado a tradição no cultivo da soja, além de capacidade de esmagamento e cadeia produtiva bem estabelecida, uma vez que o óleo de soja representa cerca de 90% da produção brasileira de óleos vegetais.

O emprego de enzimas como catalisadores nas reações de produção de biodiesel apresenta muitas vantagens em relação aos catalisadores químicos homogêneos. Vários pesquisadores relatam o uso de enzimas aplicadas às reações de transesterificação em solventes orgânicos. No entanto, poucos trabalhos têm sido apresentados na literatura no que se refere à produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente orgânico, com auxílio de ultrassom, como tentativa de reduzir a resistência à transferência de massa neste sistema reacional. Este fato, aliado à fundamentação teórica apresentada neste capítulo, permite justificar plenamente a realização deste trabalho, cujo maior objetivo reside no estudo da produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente orgânico em banho de ultrassom, contemplando a otimização das condições operacionais do processo, o estudo da cinética de reação e a avaliação do reuso do catalisador na condição otimizada do processo de produção em modo batelada e contínuo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental deste trabalho, relacionado à produção de biodiesel enzimático em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.

4.1 ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS

Para a realização deste trabalho, nas reações de transesterificação e esterificação em modo batelada e em modo contínuo foram utilizadas três lipases comerciais de origem microbiana:

- *Novozym 435* - Produzida a partir de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/Araucária-PR. A enzima atua randomicamente nas 3 posições do triglicerídeo. O produto é constituído por partículas de formato esferoidal, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, e densidade de aproximadamente 430 kg/m³. Este produto é fornecido com quantidade de água entre 1-2%. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40-70 °C (NOVO NORDISK, 1992);
- *Lipozyme RM IM* - Produzida por fermentação submersa de *Rhizomucor miehei* e imobilizada em resina de troca iônica. Apresenta especificidades nas posições 1,3 do triglicerídeo. Possui tamanho de partícula entre 0,2-0,6 mm, densidade entre 350-450 Kg/m³ e conteúdo de água entre 2-3%. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 30-70 °C (NOVO NORDISK, 1992).
- *Lipozyme TL IM* – Produzida por fermentação submersa fermentação a partir de *Thermomyces lanuginosus*. É imobilizada em resina fenólica e adequada para aplicação em reatores de leito fixo, pelo fato de ser granulada. É recomendável o uso em solventes orgânicos, uma vez que em meio aquoso, o suporte pode sofrer solvatação. As principais características técnicas dessa enzima são as seguintes: atividade

catalítica: $75 \text{ IUN.g}^{-1} \text{ b}$; densidade do meio: $0,54 \text{ g.mL}^{-1}$; diâmetro de partícula: $0,3 - 1,0 \text{ mm}$; conteúdo de água: $5\% \text{ (m/m)}$ (SKORONSKI, 2006).

Como substratos foram utilizados:

- Óleo de soja comercial (Marca Soya) sem nenhum tratamento prévio;
- Óleo de macaúba, obtido da Cooper Riacham, Montes Claros - MG;
- Ácido graxo vegetal (lote: PA 1060.525 A12) produzido por SGS Agricultura e Indústria Ltda, em Ponta Grossa – PR.
- Álcool etílico e álcool metílico (Merck, 99,9 % de pureza);

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

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

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Inicialmente, a fim de verificar possíveis alterações nas propriedades morfológicas das enzimas após tratamento em sistema de ultrassom, as mesmas foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (modelo XL-30 ESEM, Phillips), realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. As amostras das enzimas foram dispostas em placa

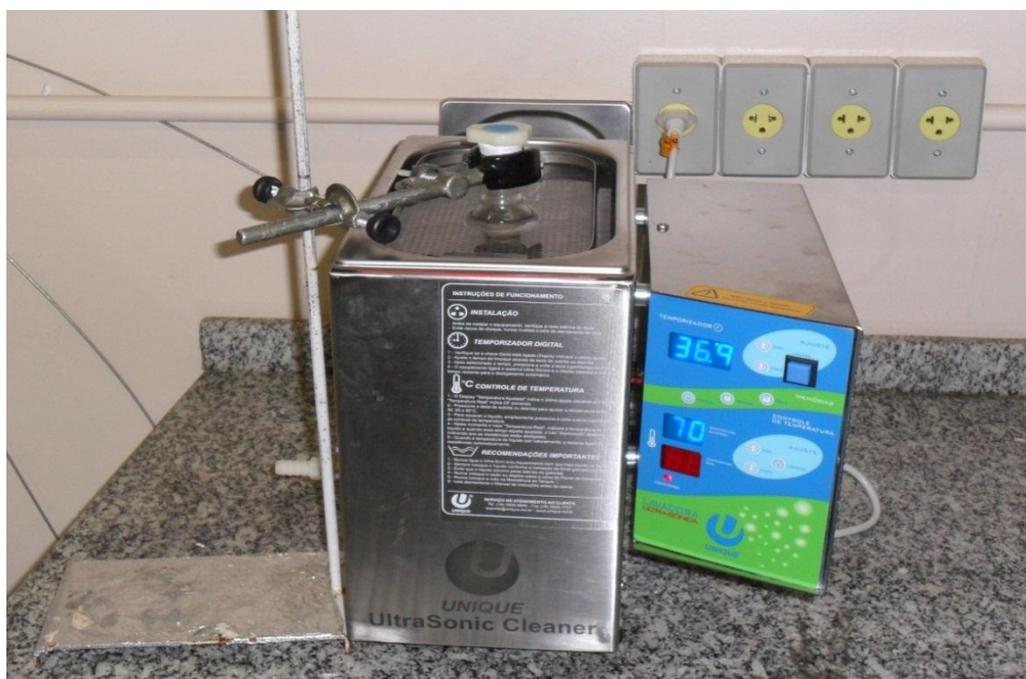
metálica e submetidas a um tratamento prévio de atomização com ouro para tornar-se condutora e para melhorar a definição da imagem.

4.2.2 Produção de biodiesel enzimático em sistema de ultrassom livre de solvente orgânico em modo batelada

4.2.2.1 Estudo Cinético Prévio

Os experimentos para produção enzimática de biodiesel foram realizados em um banho de ultrassom (Unique ultraSonic Cleaner, modelo: USC-1800A, frequência US 40 KHz, potência de até US 132 W), conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7: Aparato experimental utilizado para a produção de biodiesel enzimático em modo batelada e banho de ultrassom.



Inicialmente, realizou-se um estudo cinético prévio (destrutivo), para determinar o melhor tempo de reação, onde os experimentos foram realizados em um balão de 50 mL, onde foi colocado 20% (m/m) da enzima *Novozym 435*

(em relação à massa de substratos, óleo + etanol) na razão molar óleo/etanol de 1:3, temperatura de 70 °C e potência de ultrassom correspondente à 52,80 W. Esta condição foi avaliada tendo em vista resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa, relativos às conversões satisfatórias em biodiesel, a partir de óleo de soja e etanol, em sistema orgânico (n-hexano), sem ultrassom.

Experimentos destrutivos foram realizados, sendo as reações conduzidas nos tempos de 15 e 30 minutos e 1, 2, 4, 6 e 8 horas de reação, em meio livre de solvente orgânico.

4.2.2.2 Planejamento Plackett & Burman

Após determinar o tempo a ser fixado nesta etapa do trabalho, realizou-se um delineamento de Plackett & Burman (PB-12) com 12 ensaios, apresentando ponto central em triplicata, onde foi avaliada a influência de cinco variáveis: temperatura 40, 55 e 70 °C; razão molar (óleo/etanol) 1:3, 1:6,5 e 1:10; concentração da enzima *Novozym 435* de 5 a 20% (m/m em relação aos substratos); potência 52,80 W, 92,40 W e 132 W e concentração de água de 0% a 10% (m/m em relação aos substratos), mantendo-se fixo o tempo de reação em 1 hora. As variáveis estudadas e os respectivos níveis são apresentados na Tabela 5.

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

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
Temperatura (°C)	40	55	70
Razão molar óleo/etanol	1:3	1:6,5	1:10
[E] (% m/m, em relação à massa de substratos)	5	12,5	20
[H ₂ O] (% m/m, em relação à massa de substratos)	0	5	10
Potência (Watts)	52,80	92,40	132

Os resultados foram analisados usando o software Statistica® 7.0 Statsoft Inc. e, através do gráfico de Pareto, determinaram-se as variáveis significativas e não significativas.

4.2.2.3 Delineamento composto central rotacional 2²

Após análise estatística do planejamento experimental apresentado anteriormente, realizou-se um delineamento composto central rotacional 2² (DCCR), totalizando 11 experimentos, visando otimizar a conversão em biodiesel no sistema reacional estudado. O tempo total de reação foi fixado em 1 hora e as faixas de temperatura e concentração de enzima estudadas nesta etapa são apresentadas na Tabela 6. Os resultados foram analisados usando o software Statistica® 7.0 Statsoft Inc. e, através da análise de superfície de resposta, determinaram-se os valores ótimos destas variáveis para máxima produção de biodiesel.

Tabela 6: Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2², para otimização da produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente e em banho de ultrassom.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura (°C)	60	63	70	77	80
[E] (% m/m)	10	13	20	27	30

4.2.2.4 Estudo cinético: Efeito da concentração de enzima

Em seguida, realizou-se um estudo cinético para verificar a concentração de enzima que conduziria à maior conversão em biodiesel. Com a condição já otimizada através do delineamento composto central rotacional 2² (DCCR), em 70 °C, 52,80 W de potência e razão molar (óleo/etanol) 1:3, foi variado o tempo em 15 e 30 minutos e em 1 a 6 horas e a quantidade da enzima em 10%, 20%, 25%, 30% e 40% (m/m).

4.2.2.5 Estudo cinético: Efeito da razão molar entre os substratos

Para verificar o efeito que a razão molar exerce sobre a conversão em ésteres realizou-se um estudo cinético utilizando razões molares de (óleo/etanol) de 1:3, 1:6 e 1:9, 70 °C e 52,80 W de potência ultrassônica, uma concentração de enzima de 1, 3, 5 e 10% m/m, com bases na massa do substrato, e variou-se o tempo de reação em 15 e 30 minutos e em 1 a 7 horas.

4.2.2.6 Avaliação de sucessivos ciclos de reuso do biocatalisador *Novozym 435*

Para realização do estudo de reuso da enzima *Novozym 435*, foi utilizada a condição experimental de 1 hora de reação, 70 °C, 52,80 W, razão molar (óleo/etanol) 1:3 e concentração de enzima de 20% (m/m da enzima *Novozym 435*, em relação à massa de substratos).

Para recuperar a enzima ao final de cada reação, o biocatalisador imobilizado foi separado do meio reacional por filtração utilizando papel filtro. Em seguida, realizou-se duas lavagens com 10 mL de hexano e filtrou-se a vácuo a suspensão obtida. Este procedimento é uma variação do método desenvolvido por Castro e Anderson (1995), que utiliza n-heptano. Após este procedimento, a amostra foi submetida à rotavapor (marca Fisatom, modelo 550). Posteriormente secou-se a enzima em estufa (modelo JP 101, marca J. Prolab) a 40 °C durante 1 hora. A enzima recuperada foi mantida em dessecador por 24 horas. Após este período, a atividade da mesma foi determinada para verificar possíveis perdas durante a reação e torná-la apta para a reutilização.

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

4.2.3 Produção de biodiesel enzimático em sistema de ultrassom livre de solvente orgânico em modo contínuo

4.2.3.1 Descrição do aparato experimental

O sistema experimental utilizado neste trabalho consiste num reator de polietileno de alta densidade (PA 12) com 1/16 in de diâmetro externo, espessura de 1,1 mm, diâmetro interno de 4,15 mm, comprimento de 2 metros e volume de 27,05 mL (Figura 7) com alimentação da mistura reacional de óleo de soja/ carga ácida e álcool etílico/álcool metílico (substrato), com uso de aproximadamente 11 g de catalisador, sendo este as enzimas *Novozym 435* e *Lipozyme RM IM*, um banho de ultrassom (Unique ultraSonic cleaner, modelo: USC-180A, frequência US: 40KHz, potência de até US: 154W). A Figura 8 abaixo apresenta o aparato experimental utilizado neste trabalho.

Figura 8: Aparato experimental utilizado para a produção de biodiesel enzimático em modo contínuo e banho de ultrassom, utilizando o método de transesterificação e esterificação.



O procedimento experimental consistiu no empacotamento do reator com a enzima, sob a ação de um agitador magnético, a fim de realizar um empacotamento mais eficiente, conforme Dalla Rosa (2009).

Após acoplou-se o reator ao sistema reacional e imergiu-o no banho de ultrassom já acondicionado na temperatura e potência a ser utilizada no experimento, iniciou-se o bombeamento contínuo dos substratos óleo de soja/carga ácida e álcool etílico/álcool metílico, previamente homogeneizados sob a mesma agitação, durante a reação, por um agitador mecânico (Marca Fisatom, Modelo 712) inserido no frasco contendo a mistura reacional, a uma dada razão molar (óleo:álcool) e vazão volumétrica de alimentação do substrato, até o completo preenchimento do sistema reacional, usando uma bomba de alta pressão para líquidos (HPLC) Digital Série III (Marca Acuflo). Este tipo de bomba opera com vazão constante (0,1 a 10 mL/min) e pressão de trabalho de 0 a 414 bar. A bomba é utilizada para deslocar a mistura reacional para a zona de reação e manter a pressão do sistema.

O cálculo do volume do reator foi realizado através de seu diâmetro interno e comprimento utilizado. A porosidade do leito foi determinada de acordo com Dalla Rosa (2009) adicionando o cômputo da porosidade interna da enzima. Neste caso, a porosidade do leito deve considerar o volume do soluto (enzimas) que ocupa o leito do reator e o volume de poros da enzima, como mostra a seguinte equação:

$$\varepsilon_L = 1 - \left(\frac{V_S - V_P}{V_R} \right) \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

V_S = volume ocupado pelas enzimas no leito do reator;

V_R = volume do leito do reator;

V_P = volume de poros das enzimas que ocupam o leito do reator.

Conforme Dalla Rosa (2009) para o cálculo do volume de soluto (V_S) obteve-se as seguintes informações: número de unidades de enzima em determinada massa (realizado manualmente) e diâmetro médio das partículas

da enzima (calculado pela média da observação do resultado de análise de MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura).

O volume de poros (V_P) foi então multiplicado pela massa da amostra de enzima empacotada no leito do reator. Neste caso, foi adotado como valor de volume de poros: V_{P1} = dado pela ficha técnica do fabricante da enzima (0,5 mL/g).

O tempo de residência é dado pela porosidade do leito multiplicado pelo seu volume e dividido pela vazão de alimentação de substratos a serem utilizados no processo (DALLA ROSA, 2009).

$$\tau = \frac{\varepsilon_L \times V_R}{q} \quad (\text{Equação 2})$$

Após a mistura reacional percorrer toda a extensão do reator, a coleta das amostras foi realizada em frascos de amostragem (previamente pesados) após decorrido um tempo de residência da mistura na zona reacional. Em seguida, procedia-se a evaporação do álcool não reagido das amostras em estufa a vácuo (Marca Quimis, Modelo Q819V2) na temperatura de 65 °C e 0,05 MPa de vácuo, para posterior análise de ésteres etílicos.

4.2.3.2 Produção de biodiesel enzimático utilizando o processo de transesterificação

Com base nos resultados obtidos para a produção de biodiesel enzimático em modo batelada iniciou-se o estudo para o modo contínuo de produção de biodiesel. Realizou-se um planejamento 2^3 para verificar a influência da razão molar (óleo/álcool), potência do ultrassom e a vazão de alimentação, mantendo-se fixa a temperatura em 65 °C. As variáveis estudadas e os respectivos níveis são apresentados na Tabela 7, que segue abaixo.

Tabela 7: Variáveis e níveis estudados no planejamento 2^3 , para a produção de biodiesel enzimático por meio de reação de transesterificação em banho de ultrassom e sistema livre de solvente orgânico em modo contínuo.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
Razão molar óleo/etanol	1:3	1:8	1:13
Vazão de alimentação (mL/min)	0,5	2,75	5,0
Potência (Watts)	61,60	107,80	154

4.2.3.3 Produção de biodiesel enzimático utilizando o processo de esterificação

Para as reações de esterificação utilizou-se um ácido graxo vegetal e realizou-se o procedimento descrito acima.

A Tabela 8 mostra as especificações do ácido graxo utilizado nas reações de esterificação para produção de biodiesel.

Tabela 8: Especificações do ácido graxo vegetal de soja.

Análises	Especificações
Índice de Acidez (mgKOH/g)	195,0 – 205,00
Índice de Iodo (cgI ₂ /g)	125,0 – 135,00
Det. Umidade (%)	Máximo 0,5
Det. Cor Gardner	Máximo 2,5
Índice de Peróxido (meq O ₂ /Kg)	Máximo 3,0
Índice de Saponificação (MG KOH/g)	197,0 – 207,00

Fonte: SGS Agricultura e Indústria Ltda, Lote: PA 1060 525 A12.

Como o ácido graxo é um hidrolisado do óleo de soja deve apresentar os mesmos constituintes do referido óleo. Vieitez et al., (2012) realizaram análises do óleo de soja e descreveram a composição em ácidos graxos conforme a Tabela 9.

Tabela 9: Composição dos ácidos graxos do óleo de soja.

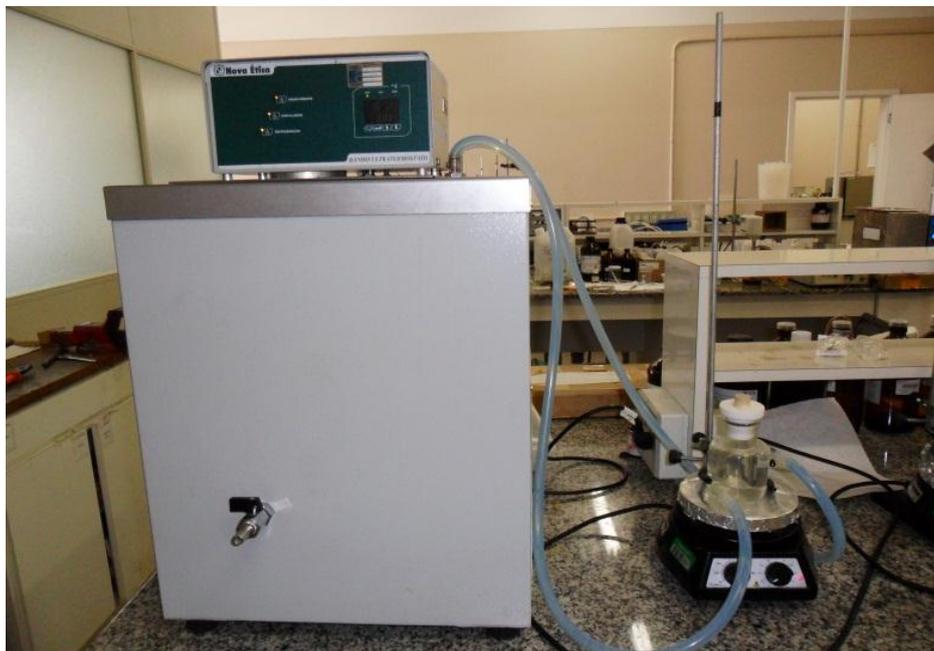
Ácido Graxo	(%)
Palmítico (C16:0)	10,9
Esteárico (C18:0)	3,5
Oléico (C18:1)	26,0
Linoléico (C18:2)	52,7
Linolênico (C18:3)	5,0

Fonte: VIEITEZ et al., 2012.

Com base nesses dados, o hidrolisado do óleo de soja deve apresentar composição semelhante à obtida pelos autores. A determinação do teor de acidez foi realizada através da técnica de titulação por KOH, em comparação aos dados fornecidos pela empresa. Na análise realizada obteve-se uma acidez de 195,73 mgKOH/g, concordando com a acidez indicada.

4.2.4 Determinação da atividade enzimática

O procedimento adotado para a determinação da atividade da enzima *Novozym 435* e *Lipozyme RM IM*, foi descrito por Oliveira et al. (2006). Sucintamente, a atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação entre o ácido láurico e álcool n-propílico, à temperatura de 60 °C, com a enzima (0,195 g) mantida sob agitação por 40 minutos. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator de vidro aberto de 20 mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático, conforme Figura 9. Alíquotas de 150 µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e foram diluídas em 20 mL de acetona-etanol (1:1) com a finalidade de cessar a reação e a extração dos ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,01 N. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 mmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas.

Figura 9: Equipamento utilizado para determinação de atividade enzimática.

A Equação 3 foi empregada para o cálculo da atividade da lipase:

$$\text{Atividade (U/g)} = \frac{[(V^0 \text{ NaOH}) - (V^{40} \text{ NaOH})]}{t.ma} \cdot N \cdot 10^3 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio;

V^0 = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL);

V^{40} = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra após 40 minutos de reação (mL);

ma = massa de enzima utilizada na reação (g);

t = tempo de reação (min).

A atividade da enzima foi determinada no início e ao final das reações em todos os experimentos realizados, objetivando o acompanhamento da alteração da atividade da *Novozym 435* quando do seu emprego na reação de transesterificação e de esterificação.

4.2.5 Quantificação do glicerol

O método de periodato para determinação da concentração de glicerol foi descrito por Cocks e Van Rede (1966), o qual consiste na reação do glicerol presente na amostra com periodato de sódio (NaIO_4) em solução aquosa ácida para produzir formaldeído e ácido fórmico, este último utilizado como medida do glicerol.

O procedimento consiste na diluição da amostra previamente pesada em 50 mL de água bidestilada. De 5 a 7 gotas de azul de bromotimol são adicionadas a amostra e a mesma é acidificada com ácido sulfúrico 0,2 N até pH 4. A solução é então neutralizada com NaOH 0,05 N até coloração azul.

Paralelamente, uma solução em branco deve ser preparada contendo 50 mL de água bidestilada, sem a presença de glicerol e o mesmo procedimento adotado para a amostra a ser analisada deve ser aplicado ao branco. Em seguida, 100 mL de solução de periodato de sódio (60 g/L) são adicionados à amostra e ao branco e mantidas ao abrigo da luz por 30 min. Após este período, 10 mL de solução de etileno glicol (1:1) são adicionadas à mistura que é deixada ao abrigo da luz por mais 20 min. As amostras são, então, diluídas até completar o volume de 300 mL com água bidestilada e tituladas com solução de NaOH 0,125 N usando pH-metro para determinar pH 6,5 para o branco e pH 8,1 para a amostra. O teor de glicerol contido na amostra é determinado através da seguinte equação:

$$\text{Glicerol}(\%m/m) = \frac{[9,209N(V_1 - V_2)]}{m_A} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

N = normalidade da solução de NaOH;

v_1 = volume da solução de NaOH gasto na amostra (mL);

v_2 = volume da solução de NaOH gasto no branco (mL);

m_A = massa de amostra utilizada (g).

4.2.6 Quantificação dos ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos por cromatografia gasosa

Após a coleta das amostras no modo batelada de produção, procedia-se a evaporação do álcool etílico não reagido e do hexano utilizado para lavar a enzima em rotavapor (Marca Fisatom, modelo 550) na temperatura de 60 °C. Para o modo contínuo, após a coleta procedia-se a evaporação do álcool não reagido das amostras em estufa a vácuo (Marca Quimis, Modelo Q819V2), na temperatura de 65 °C e 0,05 MPa de vácuo até obtenção de peso constante.

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

A solução foi então injetada (1 µL) em um cromatógrafo gasoso (GC) (Shimadzu 2010), com injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar Rtx-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) nas condições cromatográficas descritas pela norma EN 14103 (2003), do Comitê Europeu para Padronizações. A temperatura inicial da coluna foi 120 °C permanecendo por 1 minuto, seguido pelo aquecimento de 15 °C/min até 180 °C permanecendo por 2 minutos, e novamente aquecendo 5 °C/min até 250 °C permanecendo assim por mais 2 minutos. Ar sintético e nitrogênio eram utilizados como gás de arraste e a temperatura do injetor e detector eram 250 °C e a taxa de split de 1:50. Possibilitando a determinação da conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos e metílicos da reação, cujos cálculos estão descritos no Apêndice A.

4.2.7 Conversão dos ácidos graxos vegetais em ésteres obtidos por meio de reação de esterificação

Como a reação de esterificação produz além dos ésteres também água, as amostras coletadas foram analisadas através do método da titulação. Este é um método eficiente que substitui, neste caso, a utilização da cromatografia gasosa na quantificação dos ácidos graxos, sem necessidade de secagem para completa remoção da água da amostra e não necessitando de evaporação do excesso de álcool, como podem ser observados os resultados comparando o método cromatográfico e o de titulação são apresentados na Tabela 11 descrita no Apêndice A para comprovação da efetividade da técnica, com base na comparação realizada entre os dois métodos e a literatura reportada pelos seguintes autores (CHEN et al., 2012, ZHANG et al., 2012; RATTANAPHRA et al., 2012; LEMAIRE et al., 2011; SATYARTHI et al., 2010; MARCHETTI e ERRAZU, 2010, MARCHETTI et al., 2007) a conversão dos ácidos graxos foi determinada por titulação.

A técnica da titulação foi realizada de acordo com a IUPAC 2.201 o AOCS Cd 3d - 63 e consiste na determinação da acidez do meio, devido a presença dos ácidos graxos livres. Estes ácidos são capazes de reagir com a solução de hidróxido de potássio e o resultado obtido é expresso em mg KOH por (g) de amostra e normalmente a acidez titulável corresponde ao dobro do percentual do ácido correspondente da amostra. Este procedimento é realizado com a pesagem de uma alíquota de $\pm 1,5$ g de amostra em um erlenmeyer de 300 mL. Em seguida, adiciona-se 50 mL de uma solução etanol anidro:éter etílico (v/v), homogeneizado e à esta, adiciona-se 5 gotas de indicador fenolftaleína 1% para indicar o ponto de viragem (mudança de cor) na titulação com solução de KOH 0,1 N. Como já mencionado, a amostra não necessita de tratamento prévio por esta técnica, sendo esta, diretamente coletada do reator para ser analisada, sem necessidade de secagem para evaporação da água ou do excesso de solvente.

O índice de acidez é determinado pela Equação 5.

$$A = \frac{56,1 * V_{KOH} * N_{KOH}}{M_{amostra}} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

- A = Índice de acidez (mg KOH/g);
- 56,1 = Equivalente grama do KOH;
- V_{KOH} = Volume de KOH gasto na titulação (mL);
- N_{KOH} = Normalidade do KOH usado na titulação;
- $M_{amostra}$ = Massa de amostra utilizada para titular.

Para determinar a o percentual de conversão do ácido graxo vegetal é necessário determinar a acidez da solução alimentada no reator. Determinando-se a acidez inicial e final (após a reação) é possível determinar a conversão de ácidos graxos, que está diretamente relacionada com o teor em ésteres da mistura. O cálculo para conversão dos ácidos graxos é apresentado na Equação 6.

$$x_{AGL} (\%) = \left(\frac{A_i - A_t}{A_i} \right) * 100 \quad (\text{Equação 6})$$

x_{AGL} = Conversão de ácido graxo livre;

A_i = Índice de acidez inicial;

A_t = Índice de acidez final.

A acidez no tempo t é calculada pontualmente, de acordo com a cinética realizada, ou seja, assim que a amostra é coletada já é devidamente pesada e titulada evitando a evaporação dos componentes.

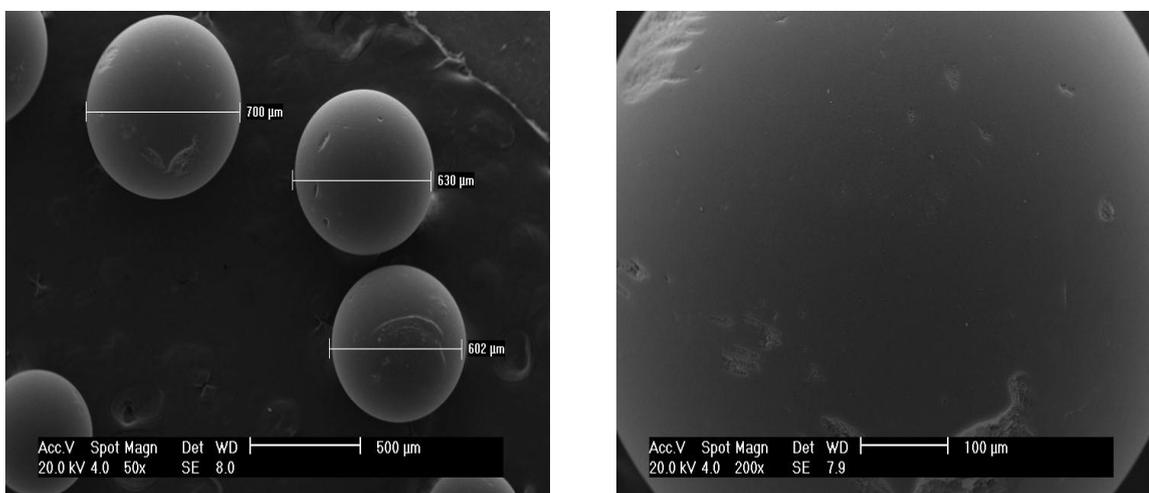
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo do processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente orgânico em banho de ultrassom, conforme já descrito no capítulo anterior.

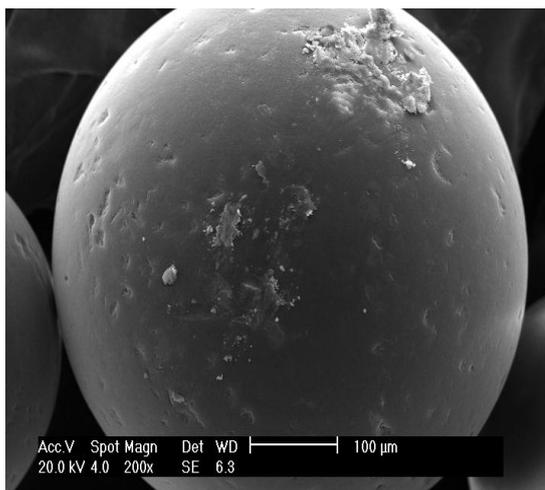
5.1. ANÁLISES DA LIPASE NÃO TRATADA E TRATADA EM BANHO DE ULTRASSOM POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A Figura 10 apresenta as micrografias obtidas por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) da *Novozym 435* não tratada e tratada em sistema de ultrassom, respectivamente, utilizando diferentes tempos de contato.

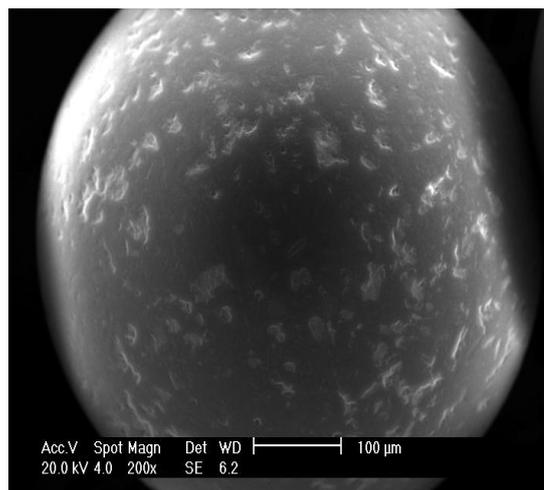
Figura 10: MEV da *Novozym 435* não-tratada (a) e tratada em sistema de ultrassom a 52,8 W, 70 °C, usando diferentes tempos de contato (b).



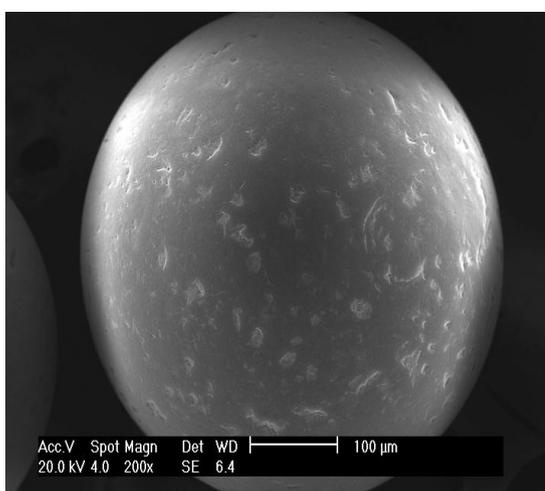
(a)



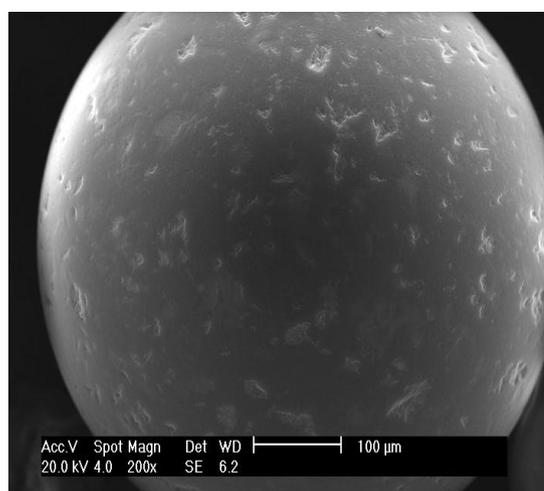
1 hora (200X)



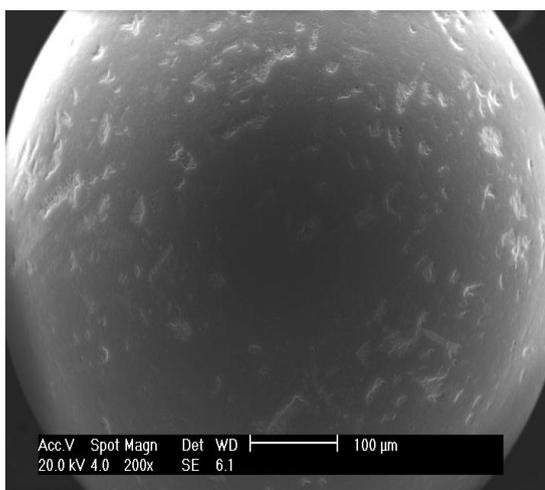
2 horas (200X)



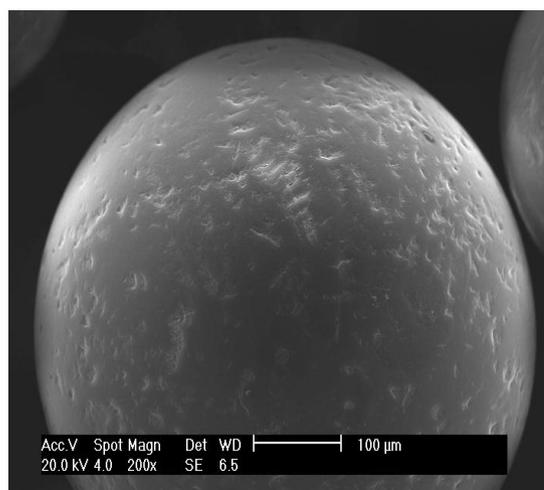
3 horas (200X)



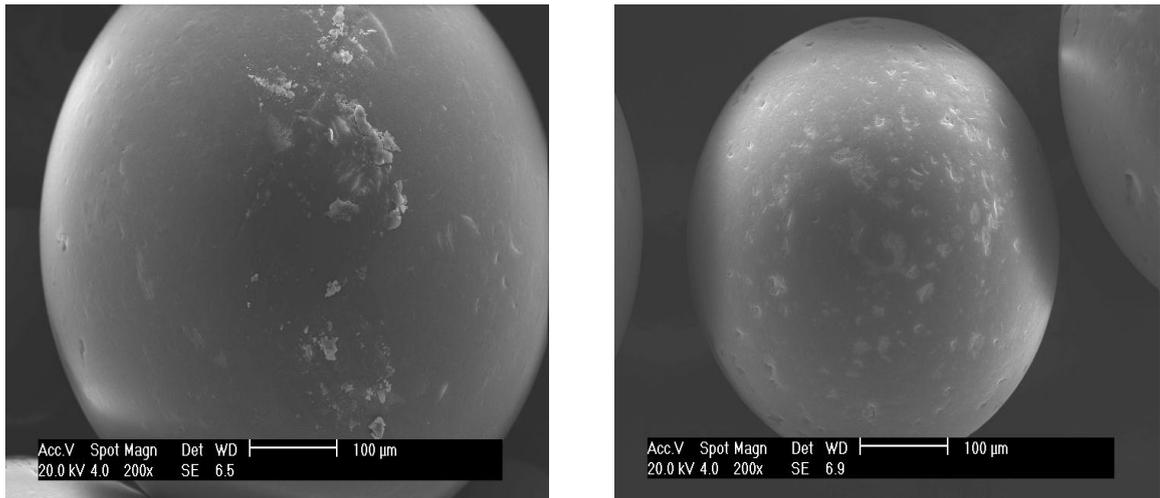
4 horas (200X)



5 horas (200X)



6 horas (200X)



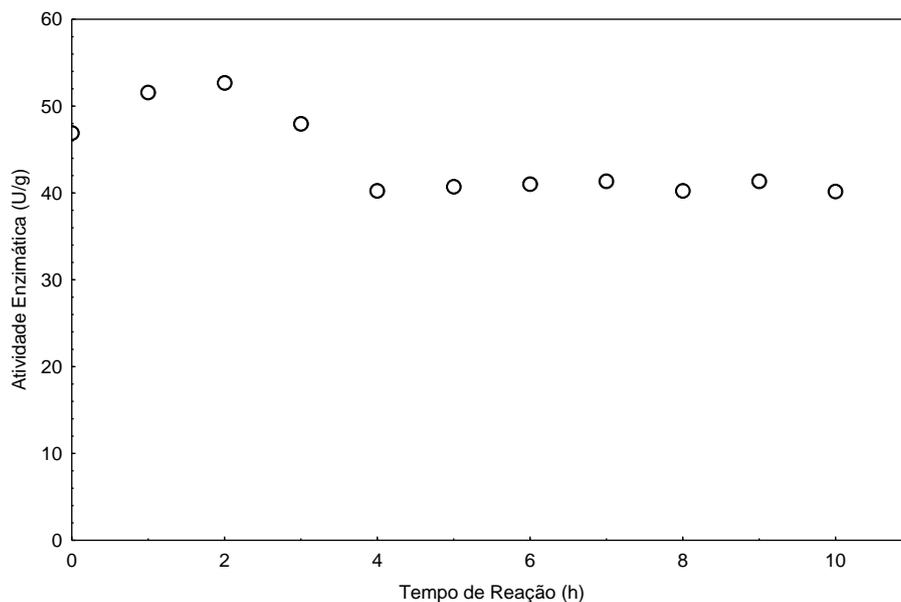
9 horas (200X)

10 horas (200X)

(b)

Na Figura 10 pode-se verificar que o ultrassom parece atacar o suporte utilizado para imobilização da lipase, não afetando a atividade enzimática, como apresentado na Figura 11. Após esta avaliação, pode-se dizer que algumas modificações a nível estrutural podem ter ocorrido. Batistella (2011) também verificou que o solvente e o ultrassom parecem atacar o suporte utilizado para imobilização da lipase, não afetando a atividade enzimática.

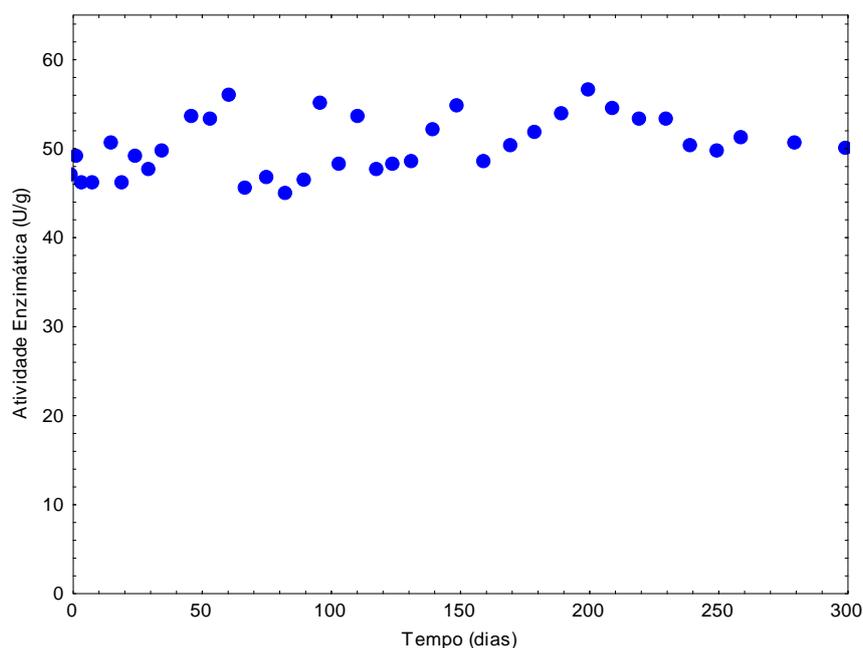
Figura 11: Atividade enzimática de esterificação da *Novozym 435* após cada tempo de reação para condição experimental: 70 °C e 52,8 W de potência.



5.2 ESTABILIDADE DA ENZIMA NOVOZYM 435

A Figura 12 relata a estabilidade da enzima *Novozym 435*, quando esta foi submetida ao ultrassom a 132 Watts de potência e após armazenada em geladeira à 4 °C.

Figura 12: Estabilidade da enzima *Novozym 435*, submetida ao ultrassom a 132 W de potência e armazenada em geladeira à 4 °C.



Conforme resultados apresentados na Figura 12 pode-se verificar que o ultrassom não influencia no comportamento da enzima, visto que a mesma possui atividade enzimática inicial de 46,9 U/g e após o tratamento no ultrassom ela aumentou esta atividade e mantendo a mesma em torno de 50 U/g durante os 300 dias de monitoramento, comprovando assim a potencialidade de sua aplicação na síntese de biodiesel em banho de ultrassom.

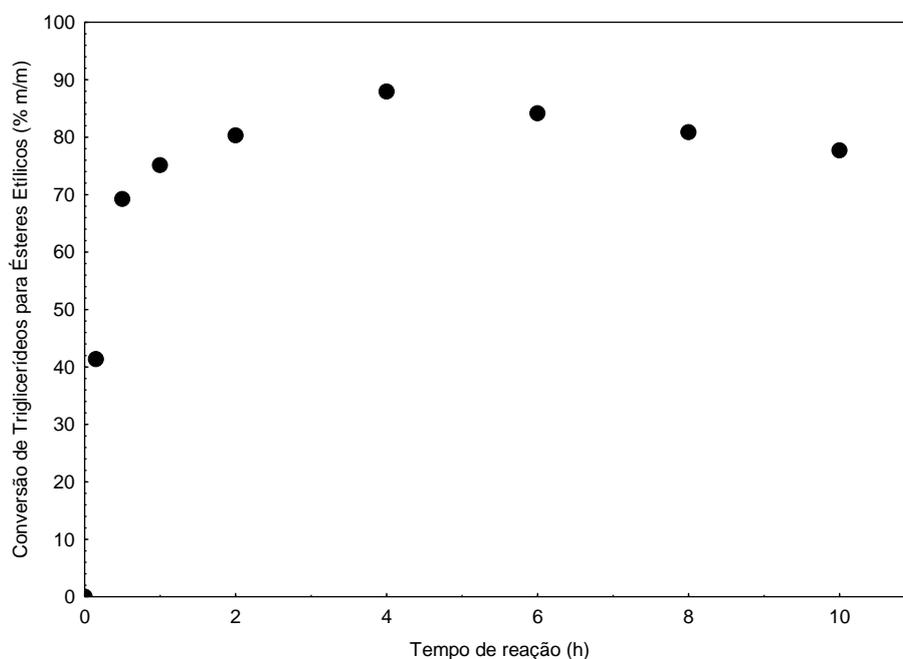
5.3 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM ULTRASSOM EM MODO BATELADA

5.3.1 Estudo cinético prévio para determinação do tempo reacional

Nas reações de transesterificação enzimática em ultrassom foi avaliado o rendimento em ésteres etílicos produzidos durante a avaliação cinética do processo de produção de biodiesel em sistema livre de solvente. Este estudo teve como objetivo determinar o tempo para consecução dos experimentos visando a otimização da conversão do processo. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 13.

Os experimentos foram realizados em um balão de 50 mL, onde foi colocado 20% (m/m) da enzima *Novozym 435*, na razão molar óleo/etanol de 1:3, temperatura de 70 °C e potência de ultrassom, correspondente à 52,8 W.

Figura 13: Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos obtidos na transesterificação enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.



De acordo com a Figura 13 pode-se observar que o rendimento em ésteres etílicos foi de cerca de, 41,33% em 15 minutos, 69,22% em 30 minutos, 71,50% em 1 hora, 80,32% em 2 horas, 87,96% em 4 horas, 84,14% em 6 horas e 80,86% em 8 horas e 78,70% em 10 horas de reação. O tempo de 4 horas de reação conduziu ao maior teor de ésteres etílicos. Nos intervalos de tempos de 6 e 8 horas observa-se uma pequena queda em relação ao teor de ésteres. Analisando os resultados obtidos, percebe-se que não há uma diferença considerável na conversão em ésteres etílicos obtidos a partir de 30 minutos de reação, permitindo concluir que não existe a necessidade, neste momento, de se realizar os experimentos em um tempo superior a 4 horas de reação. Desta forma, as etapas posteriores deste trabalho, relacionadas à otimização da produção de biodiesel em modo batelada, foram conduzidas em tempo fixo de 1 hora de reação. Conversão satisfatória, em torno de 71,5%, foi obtida neste teste prévio, demonstrando o potencial de aplicação do ultrassom para este sistema, mesmo sendo ele um sistema livre de solvente.

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

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

No trabalho realizado por Oliveira, et al., (2005(b)) foi estudada a produção de biodiesel etílico de soja com duas lipases (*Novozym 435* e *Lipozyme IM*) onde os ensaios foram realizados em Erlenmeyers e incubados em agitador rotativo (shaker) à 200 rpm por 8 horas e em todos os

experimentos foi utilizado 40 mL de solvente n-hexano para 1 g de amostra de óleo. Foi observado para o sistema contendo óleo de soja-*Lipozyme IM* que a condição otimizada foi 35 °C, 20% (m/m) de enzima, razão molar óleo-etanol de 1:3 e 10% (m/m) de água adicionada. A maior conversão observada experimentalmente foi de 95,6%. Utilizando o mesmo procedimento, a condição otimizada para o sistema óleo de soja-*Novozym 435*, foi: temperatura de 65 °C, concentração de enzima 5% (m/m), 0% (m/m) de água adicionada e razão molar óleo-etanol de 1:3. A maior conversão observada experimentalmente foi de 11,8%.

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

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

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

Shishir et al., (2010) compararam a conversão de metil ésteres utilizando a ponteira ultrassônica e o método de agitação convencional. Para tanto foi utilizado como catalisador hidróxido de potássio 1%, razão molar metanol/óleo 6:1, potência do ultrassom de 200 W, agitação de 1000 rpm e 40 minutos de reação, onde foi obtido com o sistema de ultrassom 89,5% de conversão e com o método convencional 57,5%.

Comparando este trabalho com os resultados do teste cinético realizado, onde utilizou-se razão molar etanol/óleo 3:1, temperatura de 70 °C, potência do ultrassom de 52,8 W e 20% de enzima (m/m em relação à massa de substratos) em 30 minutos e 1 hora de reação, obteve-se um teor de ésteres etílicos de 69,22% e 75,15%, respectivamente, demonstrando desta maneira que em menores níveis de razão molar e potência de ultrassom, resultados promissores também foram obtidos.

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

Xiao et al., (2005) investigaram a transesterificação enzimática de glicose e divinilbutanodioato utilizando as enzimas protease alcalina de *Bacillus subtilis*, *Novozym 435*, *Lipozyme (Mucor miehei)*, lipase AY30, lipase de

pâncreas de porco e protease de *Aspergillus oryzae* em banho de ultrassom. A protease alcalina conduziu à conversões de 78% e a *Novozym 435* 8,5% depois de 2 horas nas mesmas condições reacionais (100 W e 20 Hz). As demais enzimas não apresentaram formação do produto após 8 horas de reação.

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

Ribeiro et al., (2001) avaliaram a resolução enzimática em ultrassom de etil 3-hidroxi-3-fenilpropanoato utilizando esterase de fígado de porco, lipase de *Pseudomonas cepacia* e lipase de *Candida rugosa*. Os autores compararam a conversão do produto em ultrassom e agitação magnética, observando que em todos os experimentos ocorreu uma redução no tempo de reação da hidrólise enzimática quando utilizado o ultrassom, mas sem mudanças significativas nos rendimentos ou no excesso enantiomérico do produto.

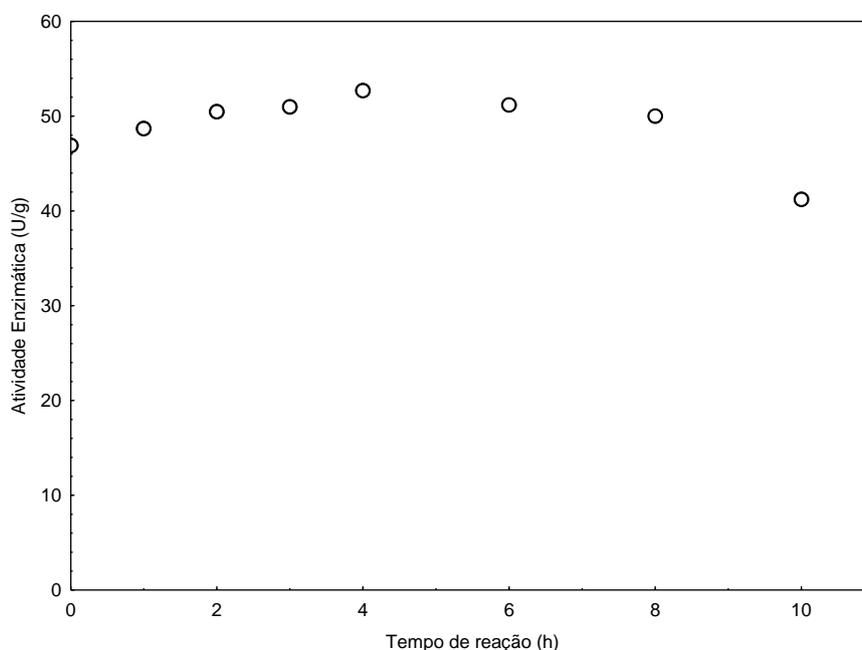
Zhu et al., (2010), estudando a produção de ésteres de frutose utilizando a lipase *Novozym 435* em ultrassom, observaram a intensidade do som de 10 kHz, 0,16 W.m⁻² e 40 kHz, 1 W.m⁻² como sendo as melhores condições para a produção de ésteres de frutose, havendo um aumento exponencial da conversão até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

Santos et al., (2010) avaliaram a produção de éster metílico a partir de óleo de *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) e metanol, utilizando ultrassom. Os autores relataram 98% de conversão após 90 minutos com frequência de 40 kHz e temperatura de 30 °C. Hanh et al., (2009) estudaram a produção de

ésteres etílicos de ácidos graxos. A condição ótima do processo de esterificação foi com razão molar de álcool e ácido oléico de 3:1, 5% de ácido sulfúrico a 60 °C de temperatura por 2 horas de reação. Foram obtidas conversões de cerca de 80% utilizando n-propanol, cerca de 70% utilizando n-butanol e cerca de 60% utilizando 2-propanol como solvente.

A Figura 14 apresenta os resultados da atividade enzimática obtidos durante a avaliação cinética preliminar do processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.

Figura 14: Atividade de esterificação da *Novozym 435* após cada ponto cinético, apresentado na Figura 13.



Conforme a Figura 14 pode-se verificar que a enzima não apresentou perdas de atividade no final de cada reação, onde obteve-se aproximadamente 52,7 U/g em 4 horas, 51,2 U/g em 6 horas e 50 U/g em 8 horas de reação, demonstrando potencial para ser utilizada em sucessivos ciclos de uso. Após 8 horas sob efeito da irradiação pode-se observar uma pequena perda na atividade enzimática devido ao provável colapso cavitacional.

A atividade inicial da *Novozym 435* foi de aproximadamente 46,9 U/g. Conforme relatam Zhu et al., (2010) e Chisti (2003), a aplicação de ultrassom

para a síntese enzimática catalisada em uma fase não aquosa pode aumentar a atividade da enzima e também pode melhorar a transferência entre o substrato e o sítio ativo da enzima. Tendo em vista estes aspectos, a tecnologia ultrassônica tem começado a ser explorada mais largamente no campo da biotecnologia, através da combinação da tecnologia ultrassônica e biotecnologia, usando a energia física do ultrassom sobre as células para criar mudanças conformacionais na estrutura das enzimas, alterando assim a atividade da enzima.

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

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

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

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

Em outro sistema de reação constituído por glicerol e ácido ascórbico, Lerin et al., (2012) obtiveram valores mais expressivos de atividade residual para *Novozym 435* e *Lipozyme RM IM* quando foi utilizado como solvente o terc-butanol ($\log P = 0,80$).

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

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

As ondas de ultrassom podem interferir nas características da enzima, alterando sua estrutura em resposta à perturbação dinâmica provocada pelo ultrassom (HOSHINO et al., 2006). Existem poucos estudos relacionando o efeito do ultrassom com a atividade das enzimas e têm sido relatados resultados contraditórios de inativação e ativação da enzima após serem submetidas ao ultrassom. Diferente da tradicional inativação das enzimas em

temperaturas elevadas, o processo de sonicação não destrói o sítio ativo das enzimas. Esta constatação tem sido claramente demonstrada com α -amilase, peroxidase de raiz forte, lacase e fosfatase alcalina (OZBEK; ULGEN, 2000; REHOREK et al., 2004; BASTO et al., 2007; TAUBER et al., 2008).

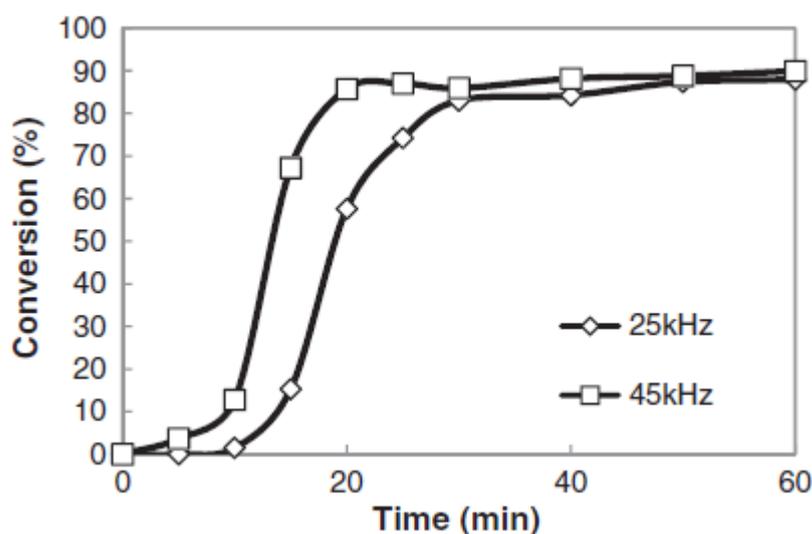
Estudos mostram que o ultrassom provocou a inativação de algumas enzimas, incluindo fosfatase alcalina, glicose-6-fosfato desidrogenase e tripsina. A inativação foi observada quando utilizada potência de ultrassom de 500 W, mas, de modo geral, utiliza-se potência de 25 a 150 W para reações enzimáticas. A inativação provavelmente ocorreu devido à reação de radicais hidroxila ou de hidrogênio formadas com a estrutura da proteína (BASTO et al., 2007). Este fato pode levar à obstrução dos sítios ativos, e ao mesmo tempo, diminuir a estabilidade da proteína (TIAN et al., 2004). Além disso, forças de cisalhamento que ocorrem no fluido durante a irradiação do ultrassom também podem ter um papel significativo na inativação da enzima (OZBEK; ULGEN, 2000).

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

Encinar et al., (2012) realizaram experimentos em modo batelada, utilizando banho de ultrassom em uma potência constante de 100%, para a razão molar 1:6 (óleo: metanol) e 1% de KOH, e verificaram que a 45 kHz, o período de indução é menor e a reação termina mais rapidamente do que a 25 kHz de acordo com a Figura 15. No entanto, o rendimento final é semelhante para as duas frequências. Os autores concluíram que, conseqüentemente, a frequência do ultrassom afeta o processo de um ponto de vista cinético, de modo que a reação realizada com maior frequência o estado de equilíbrio é

atingido mais rápido, embora o rendimento seja semelhante em ambas às reações. A frequência das ondas de ultrassom afeta a dimensão crítica da bolha. Um aumento na frequência leva a uma diminuição do volume e tempo de implosão da bolha. As frequências mais altas produzem bolhas menores com maior proporção área de superfície/volume, levando a um aumento da atividade de transporte em toda a interface de bolha. O efeito líquido consiste em produzir um maior aumento de emulsificação e taxa de reação.

Figura 15: Efeito que a frequência do ultrassom exerce sobre a conversão de ésteres metílicos (razão molar (óleo: metanol) 1:6, 1% KOH e 100% de potência ultrassônica).



Fonte: ENCIANAR et al., (2012).

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

sugere que cadeias mais curtas facilitam o acesso ao sítio ativo da enzima (*Novozym 435*).

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

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

5.3.2. Planejamento Plackett & Burman

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

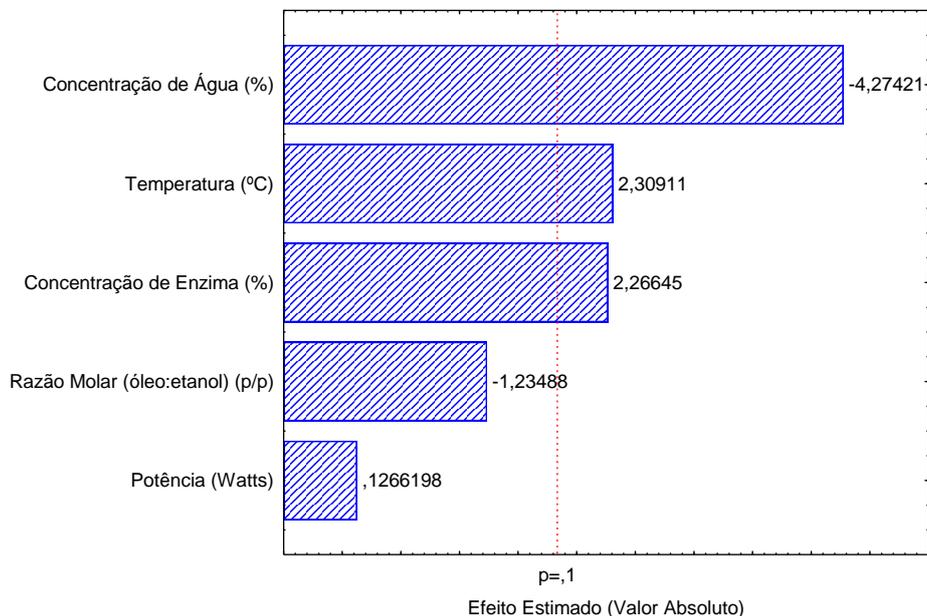
A Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento de experimentos e as respostas em termos de conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos. A partir desta tabela pode-se verificar que o rendimento mais elevado foi obtido no experimento 1 (75,15%), correspondendo à temperatura mais elevada (70 °C), razão molar entre os substratos de 1:3, 20% (m/m) de enzima e 52,80 W de potência de ultrassom.

Tabela 10: Matriz do planejamento fatorial do tipo Plackett & Burman com 12 ensaios (PB-12) com a resposta em termos de conversão em ésteres etílicos (% m/m) a partir da alcoólise enzimática do óleo de soja em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão molar	[E]	[H ₂ O]	Potência (Watts)	Conversão de triglicerídeos (% m/m)
1	1 (70)	-1 (1:3)	1 (20)	-1(0)	-1(52,80)	75,15
2	1 (70)	1 (1:10)	-1(5)	1(10)	-1(52,80)	0,42
3	-1 (40)	1(1:10)	1(20)	-1(0)	1(132)	32,32
4	1 (70)	-1(1:3)	1(20)	1(10)	-1(52,80)	7,25
5	1 (70)	1(1:10)	-1(5)	1(10)	1(132)	0,55
6	1 (70)	1(1:10)	1(20)	-1(0)	1(132)	38,02
7	-1(40)	1(1:10)	1(20)	1(10)	-1(52,80)	0,33
8	-1 (40)	-1(1:3)	1(20)	1(10)	1(132)	2,01
9	-1 (40)	-1(1:3)	-1(5)	1(10)	1(132)	0,40
10	1 (70)	-1(1:3)	-1(5)	-1(0)	1(132)	34,63
11	-1 (40)	1(1:10)	-1(5)	-1(0)	-1(52,80)	6,29
12	-1 (40)	-1(1:3)	-1(5)	-1(0)	-1(52,80)	12,91
13	0 (55)	0(1:6,5)	0(12,5)	0(5)	0(92,40)	5,79
14	0 (55)	0(1:6,5)	0(12,5)	0(5)	0(92,40)	3,02
15	0(55)	0(1:6,5)	0(12,5)	0(5)	0(92,40)	3,30

Os dados obtidos na Tabela 10 foram tratados estatisticamente e o efeito das variáveis sobre o rendimento em ésteres pôde ser determinado. Os resultados são apresentados na forma de Gráfico de Pareto (Figura 16).

Figura 16: Gráfico de Pareto para a produção enzimática de biodiesel utilizando a lipase *Novozym 435* em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função das variáveis independentes.



Conforme a Figura 16 pode-se observar que a variável concentração de água apresentou efeito significativo negativo, e as variáveis temperatura e concentração de enzima apresentaram efeito significativo positivo, considerando 90% de confiança. Por outro lado, a variável potência ultrassônica não apresentou influência significativa na conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos.

O teor de água na reação pode ser um fator determinante no rendimento da síntese enzimática de biodiesel (ANTCZAK et al., 2009). É consenso que um pouco de água é necessário para manter a enzima ativa em solventes orgânicos. Por outro lado, a água pode tomar parte na transesterificação, influenciando assim o equilíbrio (KAIEDA et al., 1999). As lipases possuem a característica única de atuar na interface entre uma solução aquosa e uma fase orgânica, por isso a atividade da lipase geralmente depende da área interfacial. A água facilita o aumento da área interfacial disponível, assim ajuda a manter a atividade da lipase. No entanto, o excesso de água pode tornar a lipase mais flexível e levar a algumas reações colaterais

indesejadas, como a hidrólise, especialmente no processo de transesterificação (TEIXEIRA et al., 2010).

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

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

De acordo com Hsieh et al., (2006) a razão molar dos substratos normalmente é um dos parâmetros mais importantes nas reações de esterificação enzimática. Desde que a reação é reversível, um aumento na concentração de um substrato pode deslocar o equilíbrio químico, resultando em maiores conversões. Por outro lado, altas concentrações podem reduzir a taxa de reação devido ao efeito de inibição. A razão molar óleo/etanol é uma das variáveis mais importantes que afeta o rendimento da reação. A relação estequiométrica de transesterificação requer três moles de álcool e um mol de triglicerídeos para produzir os três moles de ésteres etílicos e um mol de glicerol. No entanto, a transesterificação é uma reação de equilíbrio em que uma alta proporção molar é usada para deslocar a reação para a direita, no sentido de obtenção dos produtos. Ao usar o sistema de ultrassom, a quantidade de álcool requerida pode ser reduzida (YU et al., 2010).

Segundo o trabalho de Batistella et al., (2012), realizado em ultrassom, a maior conversão em ésteres etílicos utilizando a enzima *Novozym 435* (66,9%) foi obtida no ensaio de maior temperatura (70 °C) e concentração de enzima (20%) e nas menores concentrações de água (5%), razão molar (óleo/etanol) (1:3) e potência 40% de 132 W.

Conforme o trabalho de Ceni et al., (2010), a melhor conversão (29%) para a produção enzimática de gliceril benzoato foi alcançada com 50 °C, razão molar entre os substratos de 1:1, concentração enzimática de 10% em peso da *Novozym 435*, adição de 5 mL de 2-propanol, taxa de agitação de 150 rpm em 36 horas de reação.

5.3.3 Delineamento Composto Central Rotacional 2²

Após a determinação das variáveis significativas realizou-se um delineamento composto central rotacional 2², totalizando 11 experimentos, para verificar a influência das variáveis temperatura e concentração de enzima. Como no planejamento PB-12 a concentração de água apresentou efeito significativo negativo, esta variável foi mantida constante em seu nível inferior (0%) neste segundo planejamento. A razão molar óleo/etanol foi mantida fixa em 1:3 e a potência de ultrassom em 52,8 Watts. Foram investigadas nesta etapa a concentração de enzima e a temperatura, tendo em vista o fato de saber-se que a temperatura pode afetar diretamente a atividade enzimática.

A Tabela 11 apresenta a matriz do planejamento de experimentos 2² para a produção enzimática de ésteres etílicos em ultrassom em sistema livre de solvente.

De acordo com a Tabela 11, pode-se observar que as conversões mais elevadas foram obtidas nos experimentos 3 (85,7%); 4 (84,6%) e 8 (84,6%), nas temperaturas de 63; 77 e 70 °C, nas concentrações de enzima de 27 e 30% (m/m), respectivamente. Ao compararmos os resultados aqui obtidos com os resultados do estudo cinético prévio e do planejamento Plackett & Burman, onde foi encontrado um rendimento de 75% em ésteres etílicos utilizando 20% (m/m) de enzima e 70 °C percebe-se uma pequena diferença entre as conversões obtidas. Levando em consideração o alto custo da enzima, onde, 1 Kg da mesma custa aproximadamente dois mil reais, optou-se por trabalhar com a concentração de 20% (m/m em relação à massa de substratos) de enzima.

Tabela 11: Matriz do delineamento composto central rotacional 2^2 (DCCR) para otimização da produção enzimática de biodiesel em ultrassom em sistema livre de solvente.

Ensaio	Temperatura (°C)	[E]	Conversão de triglicerídeos em ésteres (%; m/m)
1	-1 (63)	-1 (13)	54,13
2	1 (77)	-1 (13)	57,13
3	-1 (63)	1 (27)	85,70
4	1 (77)	1 (27)	84,59
5	-1,41 (60)	0 (20)	76,56
6	1,41 (80)	0 (20)	73,38
7	0 (70)	-1,41 (10)	49,90
8	0 (70)	1,41 (30)	84,57
9	0 (70)	0 (20)	68,22
10	0 (70)	0 (20)	71,67
11	0 (70)	0 (20)	68,03

Batistella (2011) obteve em seu trabalho um rendimento de 57% em ésteres etílicos utilizando a enzima *Novozym 435* em sistema com solvente orgânico (n-hexano), utilizando ultrassom, nas seguintes condições: 27,1% (m/m) de enzima, 4 horas de reação e temperatura de 63 °C.

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

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

viscosidade do óleo, aumentando os eventos de cavitação e da taxa de formação da emulsão, levando assim, conseqüentemente, a um maior rendimento em biodiesel (ANTCZAK et al., 2009; YU et al., 2010).

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

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

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

Yu et al., (2010) variaram a concentração de enzima (*Novozym 435*) para a produção de biodiesel em sistema de ultrassom, de 0 a 10% com base na massa do óleo, e verificaram que aumentando a concentração de enzima também houve um aumento na conversão em biodiesel (96% metil ésteres de ácidos graxos).

De acordo com Karra-Châabouni et al., (2006), as moléculas da enzima na superfície externa das partículas são expostas a altas concentrações de substrato, mas o transporte de massa poderia limitar drasticamente a concentração de substrato no interior das partículas. Baixas atividades do

biocatalisador reduzem a eficiência da enzima, não aumentando a conversão da reação.

Babicz et al., (2010) avaliaram o efeito da concentração de enzima (1 e 2%, m/m) na hidrólise de óleo de soja em ultrassom (frequência de 47 kHz e potência de 125 W) e observaram que quando utilizado 1% (m/m) de *Lipozyme TL IM* em 1,5 horas, o rendimento foi de 40%, no entanto quando utilizado 2% (m/m) da mesma enzima, o rendimento foi de 32%, em 3 horas. Os autores avaliaram o efeito da concentração de enzima utilizando as enzimas *Lipozyme RM IM* e *Novozym 435*. Com a *Lipozyme RM IM* a concentração de 1% (m/m) apresentou um rendimento de 41% enquanto 2% (m/m) de enzima 34%. A *Novozym 435* apresentou rendimento de 32% quando utilizado 1% (m/m) de enzima e 30% com 2% (m/m) de enzima, mostrando que com menores concentrações de enzima melhores rendimentos com as duas enzimas testadas foram obtidos.

Os resultados apresentados (Tabela 11) referentes à conversão de triglicerídeos em ésteres foram tratados estatisticamente para a avaliação dos efeitos de cada variável independente sobre a resposta. A Tabela 12 apresenta os coeficientes de regressão e os respectivos erros obtidos para o modelo matemático.

Tabela 12: Análise dos efeitos das variáveis sobre a conversão em biodiesel, referente aos resultados apresentados na Tabela 11.

	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	69,30	1,33	52,00	0,00
Temperatura (L)	-0,32	0,82	-0,39	0,70
Temperatura (Q)	2,66	0,97	2,73	0,04
[E] (L)	13,53	0,81	16,55	0,00
[E] (Q)	-1,23	0,97	-1,25	0,26
Temperatura L x [E] L	-1,03	1,15	-0,89	0,41

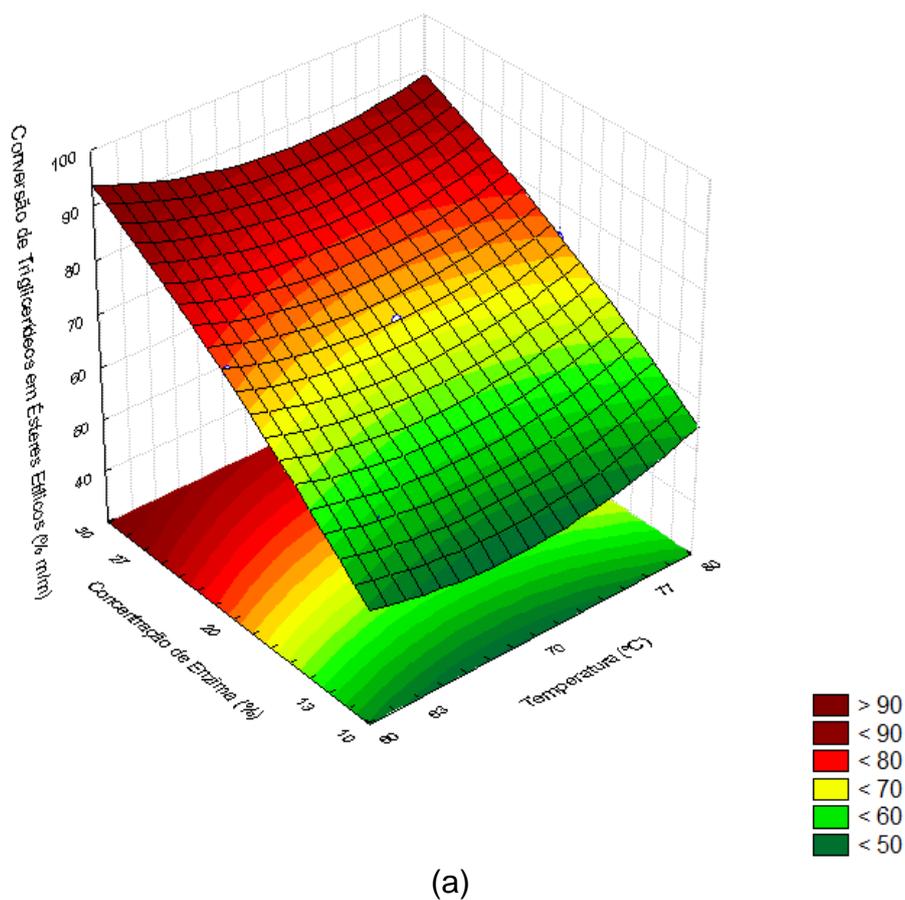
A Equação 7 apresenta o modelo codificado gerado pela análise de regressão:

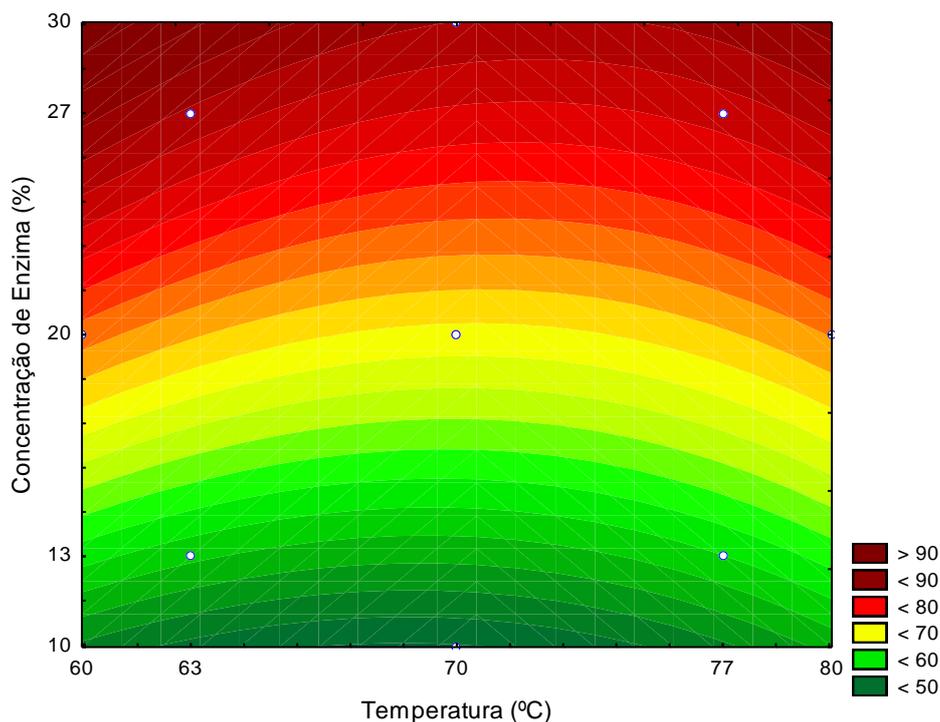
$$Y = 69,30 - 0,32.T + 2,66.T^2 + 13,52 [E] - 1,22 [E]^2 - 1,02 T.[E] \quad (\text{Equação 7})$$

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

O modelo codificado de 2ª ordem representado pela Equação 7, validado pela análise de variância, foi usado para gerar as superfícies de resposta e curva de contorno para a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função da temperatura e da concentração de enzima, as quais estão apresentadas na Figura 17 (a e b).

Figura 17: Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em função da temperatura e da concentração de enzima.





(b)

Através da Figura 17 (a e b) pode-se observar que a temperatura e a concentração de enzima apresentam efeito positivo na conversão em ésteres etílicos, conforme explicação já apresentada anteriormente.

Foi realizada a Análise de variância (ANOVA) para verificar a validade do modelo matemático a 95% de confiança, apresentada na Tabela 13, que mostra a soma dos quadrados (SQ), os graus de liberdade (GL) e os quadrados médios (QM) do tratamento (termos do modelo), dos resíduos (diferença entre experimentos e termos do modelo) e do total (experimentos) e o F calculado (quociente entre os quadrados médios dos tratamentos e dos resíduos).

Tabela 13: Análise de Variância (ANOVA) das variáveis sobre a conversão em biodiesel, referente aos resultados apresentados na Tabela 12.

	SQ	GL	QM	F calc
Regressão	1529,427	5	305,8855	57,3955
Resíduo	26,647	5	5,329432	
Total	1556,074	10		

$$R^2=0,98; F_{\text{tab}}=5.32$$

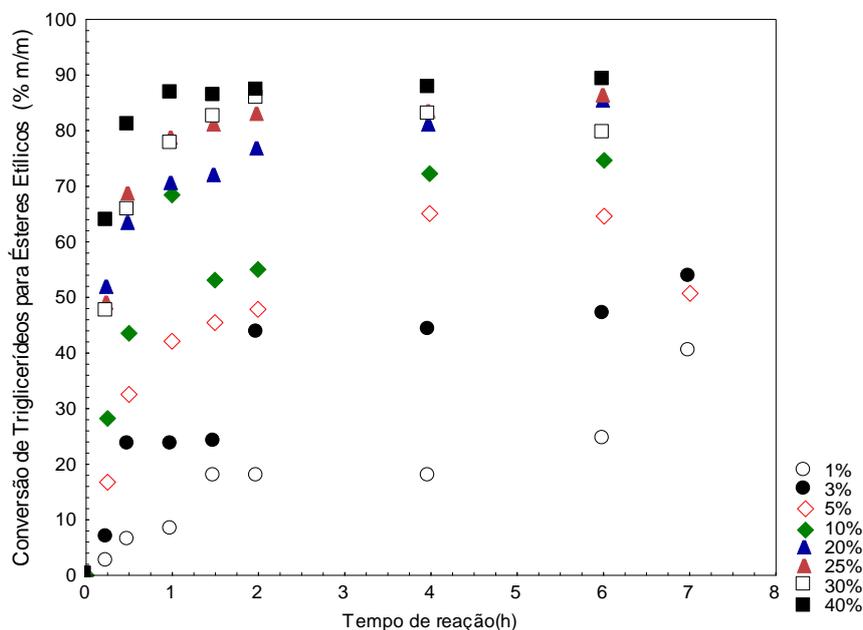
O valor de F reflete a razão da soma quadrática média devido à regressão pela soma quadrática média devido ao erro e indica a significância de cada fator do modelo. Na Tabela 13 o valor calculado de F foi 57,39, o qual é aproximadamente 11 vezes maior que o valor tabelado, mostrando que o modelo é estatisticamente significativo. O coeficiente de determinação (R^2) de 0,98 sugere que o modelo gerado a partir dos dados da Tabela 12 pode explicar 95% da variação total dos resultados.

De acordo com os resultados obtidos neste planejamento e o discutido anteriormente, pode-se considerar como condição ótima de trabalho a temperatura de 70 °C, razão molar 1:3 (óleo/etanol), potência de 52,80 W e 20% de enzima (m/m em relação à massa de substratos).

5.3.4. Efeito da concentração da enzima

Após a consecução do Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 , realizou-se um estudo cinético para verificar a melhor concentração de enzima a ser utilizada. Com a condição já otimizada em 70 °C, 52,80 W e razão molar (óleo/etanol) 1:3, variou-se o tempo em 15 e 30 minutos, 1 a 7 horas, a concentração da enzima em 1, 3, 5, 10, 20, 25, 30 e 40% (m/m). Os resultados obtidos em termos de rendimento em biodiesel são apresentados na Figura 18.

Figura 18: Avaliação da cinética da reação em função da concentração de enzima em termos de conversão de triglicerídeos em biodiesel, na condição experimental otimizada no planejamento de experimentos.



De acordo com a Figura 18 observa-se que após 1 hora de reação, nas concentrações de enzima de 10, 20, 25, 30 e 40% obteve-se uma conversões de triglicerídeos para ésteres etílicos de 68,6; 70,4; 78,4; 77,7 e 86,4%.

Ainda de acordo com a Figura 18, nota-se uma pequena diferença no rendimento em ésteres etílicos nas condições testadas, o que nos permite determinar a concentração de enzima em 20% (m/m) num tempo de 1 hora, admitindo que não há necessidade de usar uma concentração maior de enzima, nem um tempo maior de reação, já que a variável tempo e as concentrações testadas apresentam um resultado semelhante, considerando também o alto custo da enzima.

Um excesso de enzima no meio reacional poderia contribuir para uma diminuição da conversão da reação, uma vez que elevadas concentrações de enzima podem propiciar a formação de aglomerados, tornando o sítio ativo da enzima indisponível para os substratos (KARRA-CHÂABOUNI et al., 2006).

Liu et al., (2008) avaliaram o efeito da concentração de enzima na hidrólise de óleo de soja, estudaram os intervalos de 0,1; 0,55; 1; 2 e 3% de

lipase de *C. lipolytica* em sistema livre de solvente utilizando ultrassom. A taxa de reação mostrou um aumento em função da concentração de 0,1% para 0,55% e de 0,55% para 3%, respectivamente. Não foi observada diminuição da taxa de reação com o aumento da concentração da enzima. Com base nestes resultados, os autores acreditam que haja uma concentração de enzima crítica (0,55%, neste caso), acima do qual a interface de reação está saturada.

A reação convencional de esterificação/transesterificação para a produção de biodiesel tende a ser lenta e a separação de fases de glicerina é demorada. A produção de biodiesel em ultrassom reduz o tempo de processamento e tempo de separação de fase. O ultrassom também ajuda a diminuir a quantidade de catalisador necessários em até 50%, bem como a quantidade de metanol em excesso, devido ao aumento da atividade química na presença de cavitações (KUMAR et al., 2011).

5.3.5. Efeito da razão molar entre os substratos

A Figura 19 apresenta a cinética de transesterificação do óleo de soja com etanol e com a *Novozym 435* em diferentes concentrações de enzima (1, 3, 5 e 10%, m/m, com base na massa de substratos) e razão molar (1:3, 1:6 e 1:9), temperatura fixa de 70 °C e irradiação ultrassônica de 52,80 W.

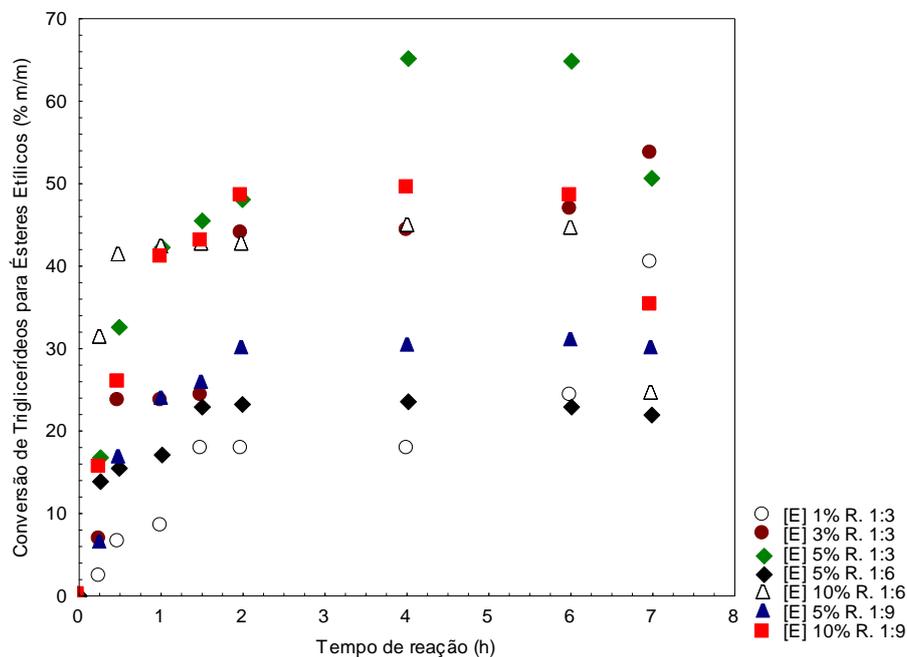
Não há dados na literatura sobre o efeito da razão molar substrato sobre a transesterificação enzimática para a produção de ésteres etílicos sob um sistema de ultrassom. A razão molar de metanol ao óleo também é fator importante que afeta a produção de ésteres de ácidos graxos. Embora a razão molar de metanol ao óleo necessário para completar a transesterificação é de 3:1, uma quantidade excessiva de metanol é útil para deslocar a reação para a formação ésteres de ácidos graxos (THANH et al., 2010).

A taxa de uma reação catalítica da enzima depende da concentração de enzima e substrato. A variação da proporção de substrato pode ter efeito significativo sobre a taxa da reação.

No trabalho de Yu et al., (2010), a atividade da *Novozym 435* na produção de biodiesel sob ação do ultrassom foi avaliada pela variação da

potência do ultrassom (40-100%), teor de água (0-4%), solventes, relação óleo/solvente, relação metanol/óleo (1:1-6:1), dosagem de enzimas (0-10%) e temperatura da reação (30-70 °C). As condições ótimas obtidas foram de 50% de potência, 0,5% de água, 1:1 de álcool terc-amílico/óleo, 6:1 de metanol/óleo, 6% de enzima e 40 °C, nestas condições foram obtidos 96% de conversão em etil ésteres após 4 horas de reação. Como o aumento da quantidade de metanol, mais bolhas podem ser geradas por causa das eventuais cavitações, melhorando assim a reação. Com o aumento da razão molar de substrato, a atividade enzimática diminuiu gradualmente, provavelmente devido ao efeito inibitório de metanol na enzima. Então, a razão molar de 6:1 foi considerada como a razão molar de substrato ideal.

Figura 19: Cinética da transesterificação do óleo de soja com etanol e com *Novozym 435* em diferentes concentrações de enzima (1%, 3%, 5% e 10%, m/m) e razão molar de substrato (1:3, 1:6 e 1:9). Temperatura de 70 °C e potência ultrassônica de 52,80 W.



A relação molar substrato geralmente é um dos parâmetros mais importantes em reações de esterificação enzimática. Uma vez que a reação é reversível, um aumento na concentração de um substrato pode deslocar o

equilíbrio químico para a formação de produtos, resultando em conversões mais elevadas (CHANG et al., 2009; BURHAM et al., 2009).

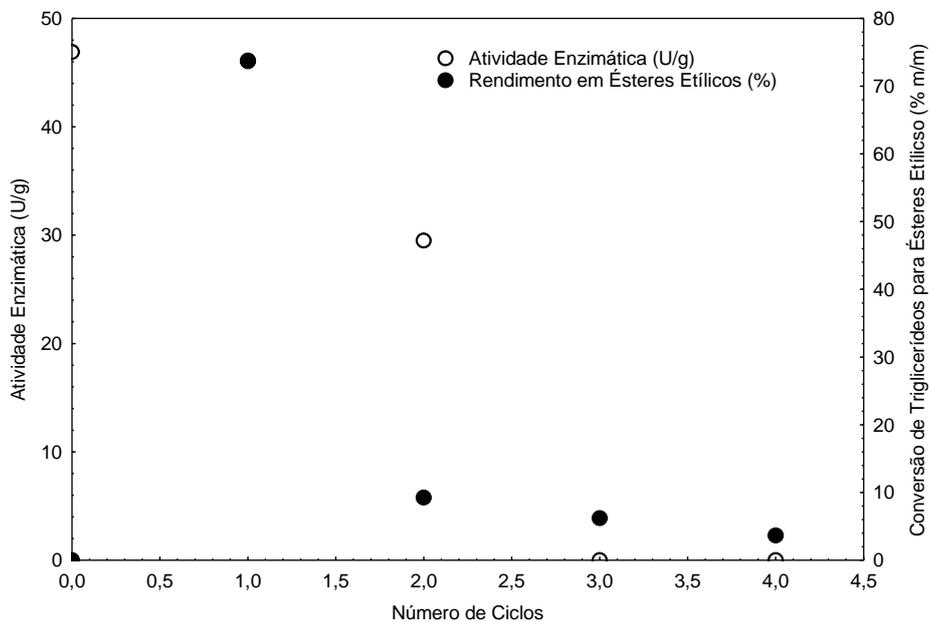
Normalmente, em sistemas orgânicos de solventes, um ligeiro excesso de álcool (mais que o álcool necessário para a estequiométrica, razão molar de 4-5:1) é necessário para alcançar um rendimento satisfatório no processo de transesterificação. Em sistemas livres de solvente, deve-se utilizar pequenas proporções de álcool (ANTCZAK et al., 2009).

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

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

Devido ao custo elevado da enzima, a reutilização da mesma é um fator essencial para a produção de biodiesel em nível industrial. Os estudos de reutilização do catalisador foram realizados para investigar a estabilidade da enzima sob a radiação ultrassônica após sucessivos ciclos de uso. A Figura 20 apresenta os resultados experimentais de conversão de ésteres etílicos e a respectiva atividade enzimática residual após cada ciclo. Como apresentado na Figura 20, a enzima *Novozym 435* manteve atividade durante 2 ciclos, perdendo a sua atividade a partir do terceiro ciclo.

Figura 20: Atividade de esterificação da *Novozym 435* após cada ciclo de uso para produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.



Analisando os resultados obtidos pode-se afirmar, através da Figura 20, que a atividade enzimática diminuiu consideravelmente conforme cada etapa de reuso da enzima. A atividade inicial foi de 46,9 U/g, no primeiro ciclo a atividade se manteve em 46,1 U/g, no segundo ciclo ficou em torno de 29,5 U/g e no terceiro e quarto ciclos a enzima não apresentou atividade.

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

O reuso do biocatalisador enzimático foi realizado para a condição otimizada, isto é, sem adição de água, e de acordo com Rahman et al., (2012), a lipase em meio não aquoso muitas vezes sofre redução de atividade, seletividade e de estabilidade.

De acordo com a Figura 20 pode-se verificar que conforme a atividade de esterificação diminui, também observa-se uma queda na conversão em ésteres etílicos. Por exemplo, no primeiro reuso obteve-se 46,10 U/g de atividade e 73,68% de ésteres etílicos. Já no segundo reuso obteve-se uma atividade de 29,5 U/g e 9,27% em ésteres etílicos. No terceiro e quarto ciclos obteve-se conversões em ésteres etílicos de 6,22% e 3,65%, respectivamente.

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

Ceni et al., (2011) investigou a atividade de esterificação residual e o produto de conversão após 10 sucessivos ciclos de utilização da lipase comercial *Novozym 435* em três sistemas diferentes: esterificação do 2-etil-hexanol e ácido palmítico em sistema livre de solvente; esterificação de ácido ascórbico e ácido palmítico em terc-butanol, e a transesterificação de glicerol e benzoato de metila em 2-propanol. Ceni et al., (2011) avaliou os vários ciclos de utilização do biocatalisador. A esterificação de 2-etil hexanol mostrou que, após 10 ciclos, a enzima manteve 90% da sua atividade. O sistema que consiste em ácido ascórbico, ácido palmítico, *Novozym 435* e terc-butanol, mostrou uma redução da atividade da enzima acompanhada de uma redução na conversão da reação, o mesmo não foi observado para o terceiro sistema.

Nos experimentos realizados por Ceni (2010) pode ser observado que a lipase *Nozozym 435* apresentou atividade residual estável nos 5 primeiros ciclos de utilização. A partir do 6º ciclo, a enzima apresentou redução de cerca de 30 a 40% de atividade, e mesmo após 240 horas de reação a redução da

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

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

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

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

A utilização de solventes orgânicos em síntese enzimática possibilita a fácil recuperação do produto e em muitos casos ainda pode ser observado um

aumento da atividade catalítica da enzima, uma vez que o solvente pode torná-las mais ativas (GOTOR-FÉRNANDEZ et al., 2006).

Batistella et al., (2012) verificaram que, para a produção enzimática de ésteres etílicos de ácidos graxos usando óleo de soja e etanol como substratos sob sistema de ultrassom em solvente orgânico, após 8 ciclos sucessivos de uso, a atividade *Novozym 435* permanece quase constante, apontando a estabilidade da enzima, mas o rendimento de ésteres da reação inevitavelmente foi reduzido conforme o número de ciclos foi aumentando.

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

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

No trabalho realizado por Raita et al., (2010), foi desenvolvido um biocatalisador heterogêneo (PCMCs – proteína revestida de microcristais) que foi preparada através de uma enzima comercial de *Aspergillus* recombinante e uma lipase de *Thermomyces lanuginosus*, para síntese de biodiesel a partir de óleo de palma por etanolise. As reações continham 500 mg de óleo de palma e razão molar óleo:álcool de 1:4, com 20% (p/p baseado em TAG) de lipase-

PCMC, razão molar 1:1 de óleo:solvente. As reações foram mantidas a 45 °C por 24 h. Foi aumentada a estabilidade do catalisador através da lavagem do mesmo com terc-butanol (resultados não obtidos sem a lavagem ou utilizando acetona). Isso permitiu a reutilização do biocatalisador por 8 ciclos consecutivos com 77,5 – 84,8% de rendimento em produto. Os mesmos autores utilizaram a *Novozym 435* nas mesmas condições e obtiveram rendimentos de 79,5 - 86,2%.

Uma possível explicação para a perda de atividade enzimática observada no estudo da reutilização em sistema livre de solvente pode estar relacionado com o efeito estabilizador do solvente orgânico, como ele pode ajudar a manter a estrutura terciária da enzima. A adição de um solvente para o meio de reação sob o sistema de ultrassom também pode influenciar a transferência de massa. Baixas intensidades de ondas ultrassônicas favorecem o fluxo de reagentes ao sítio ativo da enzima, favorecendo a reação. No entanto, a intensidade ou o tempo de irradiação pode levar à inativação da enzima pelo colapso cavitacional (ZHU et al., 2010).

Percebe-se que as ondas de ultrassom podem interferir nas características da enzima, modificando a sua estrutura como uma resposta à perturbação causada pela dinâmica ultrassom (HOSHINO et al., 2006). Poucos estudos sobre o efeito do ultrassom no âmbito da atividade da enzima são apresentados na literatura, mostrando resultados contraditórios de ativação ou desativação. Diferente da tradicional inativação pelas altas temperaturas, o processo de sonicação não afeta os sítios ativos da enzima. Esta observação já foi demonstrada para α -amilase, lacase, peroxidase e fosfatase alcalina (BASTO et al., 2007; TAUBER et al., 2008).

O uso de enzimas livres resulta em dificuldades técnicas, sendo praticamente impossível a recuperação e reuso das mesmas, o que incrementa os custos econômicos do processo, além de promover a contaminação do produto com atividade enzimática residual. Essas dificuldades podem ser superadas pelo uso de enzimas na sua forma imobilizada, permitindo o reuso desse biocatalisador várias vezes, reduzindo custos e ainda melhorando a qualidade do produto obtido (DABDOUB et al., 2009).

Como base nos resultados obtidos para a produção de biodiesel enzimático em sistema de ultrassom, livre de solvente orgânico e em modo batelada apresentados até o momento, realizou-se um estudo comparativo com o modo contínuo de produção apresentado a seguir.

5.4 PRODUÇÃO DE BIODIESEL EM MODO CONTÍNUO

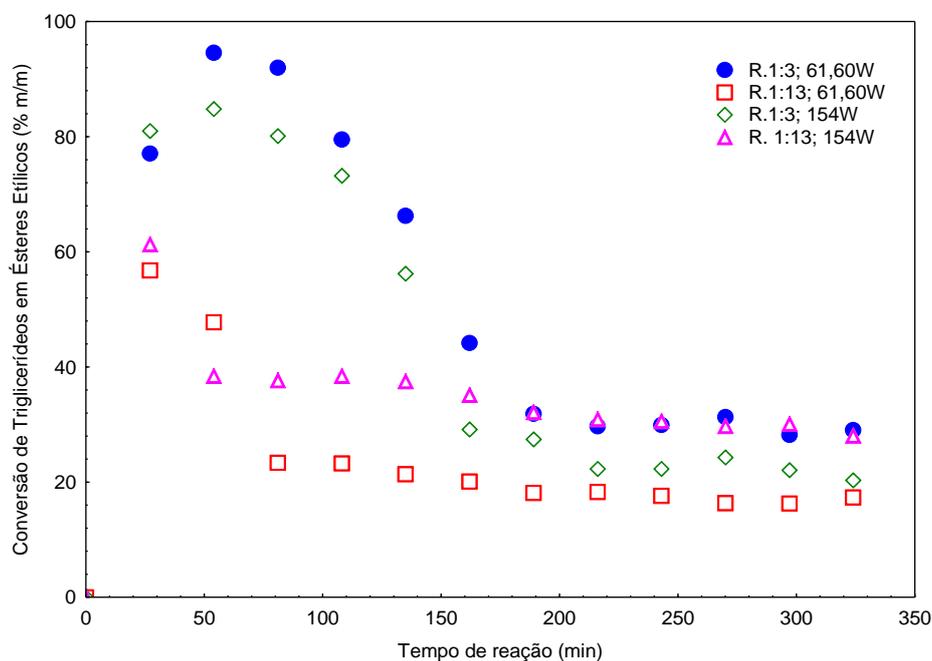
Existem dois procedimentos básicos para a síntese de biodiesel, batelada e contínuo, que pode ser realizado a temperatura ambiente ou mais elevadas, à pressão atmosférica ou elevada, na presença ou ausência de catalisadores adequados. No método batelada, as fases de reação e da separação são geralmente efetuadas no mesmo tanque, de modo que requer um maior volume do reator e tempos de reação e separação mais longos e os tempos de separação (THANH et al., 2010). O processo contínuo proporciona um menor custo de produção, a qualidade do produto é uniforme, facilita o controle do processo e diminuindo o volume do reator, reduz-se o tempo de retenção necessário para atingir conversões desejadas (VELJKOVIĆ et al., 2012). Diante deste fato, a seguir é apresentado o estudo realizado sobre a produção de biodiesel em banho de ultrassom e modo contínuo de produção.

5.4.1. Planejamento 2³ - Efeito das variáveis do processo na conversão em biodiesel enzimático de soja em modo contínuo em banho de ultrassom

A fim de avaliar o influência das variáveis razão molar (1:3, 1:8 e 1:13), potência ultrassônica (61,60; 107,80 e 154 W) e a vazão de alimentação de substrato (0,5; 2,75 e 5mL/min) no modo contínuo de produção de biodiesel por meio de reação de transesterificação, manteve-se fixa a temperatura em 65 °C e realizou-se um planejamento 2³.

As Figuras 21, 22 e 23 apresentam a influência da razão molar, da potência ultrassônica e da vazão de alimentação de substrato na conversão em biodiesel.

Figura 21: Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos. Temperatura de 65 °C e vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 0,5 mL/min.



Verifica-se, através da Figura 21, que após o segundo tempo de reação, a conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos diminuiu, de aproximadamente 97% em 54 minutos para 92% em 81 minutos e 80% em 108 minutos; provavelmente em função da formação e acúmulo de glicerol na superfície do catalisador, com isso o sítio ativo da enzima acaba ficando indisponível para o substrato.

De acordo com as Figuras 21, 22 e 23, os melhores resultados em termos de conversão em ésteres etílicos foram obtidos para a vazão de alimentação de 0,5mL/min pois ocorre um maior tempo de contato entre o substrato e a enzima, e para a razão molar óleo/etanol de 1:3.

Figura 22: Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos. Temperatura de 65 °C e vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 5 mL/min.

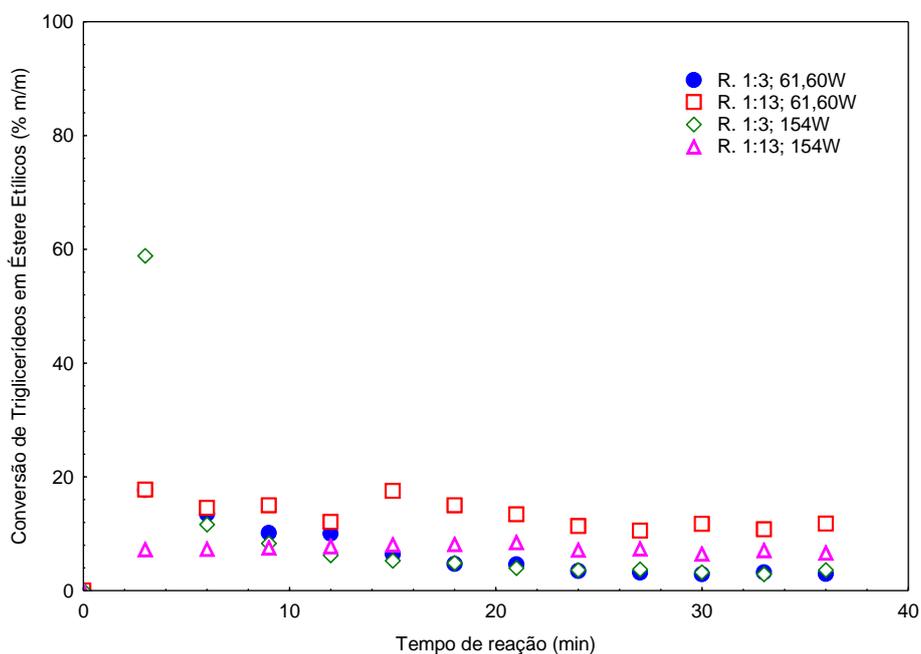
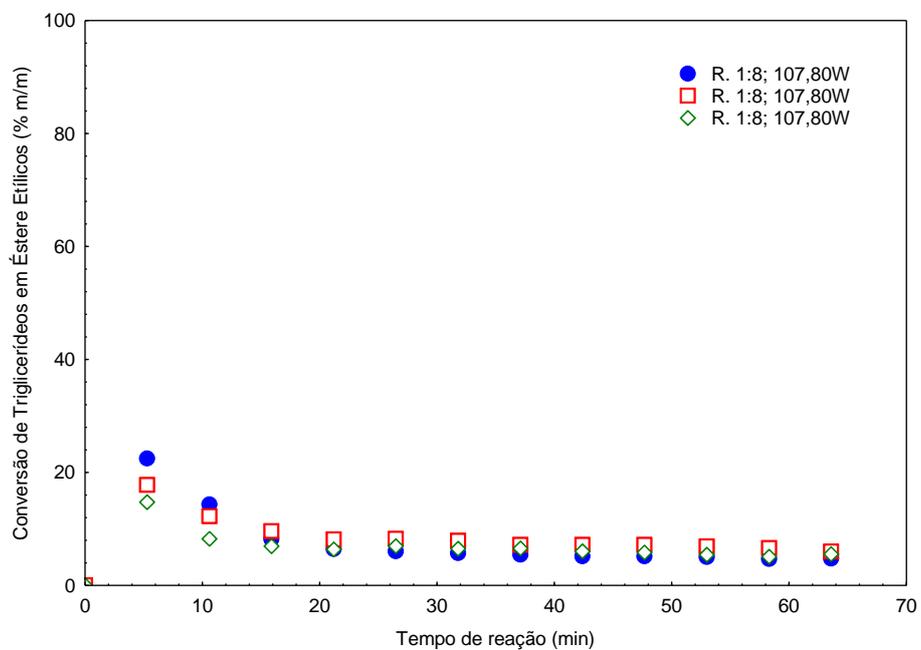


Figura 23: Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos. Temperatura de 65 °C e vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 2,75 mL/min.



Conforme Trentin (2010), ao aumentar o fluxo volumétrico de alimentação dos reagentes, a conversão pode ser reduzida, fato atribuído ao menor tempo de residência.

Séverac et al., (2011) estudou a produção de ésteres em modo contínuo utilizando óleo de girassol em um reator tipo leito fixo que consistia de uma coluna (10 mm de diâmetro e comprimento de 11 cm), mantida a 60 °C e que continha 10 g de *Novozym 435*. Séverac et al., (2011) também estudaram a produção de biodiesel em modo batelada. Para o modo batelada, as reações foram realizadas em tubos de vidro, com o óleo bruto e refinado e butanol, a mistura foi incubada a 40 °C com a *Lipozyme RM IM*, *Lipozyme TL IM* e lipase *PS Amano IM* e a 60 °C com *Novozym 435*. As reações foram mantidas sob agitação magnética (250 rpm). Com este trabalho Séverac et al., (2011) concluíram que o uso de *Novozym 435* na presença de terc-butanol, oferece uma série de vantagens para a transesterificação como: (i) elevado nível de atividade e altos rendimentos de conversão são obtidos, (ii) o sistema pode ser realizado num processo contínuo, sem inibição ou instabilidade devido à presença de fosfolípidos no óleo bruto ou devido à produção de glicerol, (iii) o catalisador faz não requerem a regeneração e a longo prazo a catálise é possível. Finalmente, a utilização do óleo bruto contendo antioxidante natural vai reduzir o preço de produção.

Silva et al., (2011) estudaram a produção de biodiesel a partir de óleo de soja e bioetanol por múltiplos estágios em reator Ultra-Shear (USR). As experiências foram realizadas nas seguintes condições: tempo de reação de 6 a 12 min, concentração de catalisador de 0,5% a 1,5% em peso de óleo de soja; razão molar de etanol: óleo de 6:1 e 10:1. Para investigar a influência das variáveis do processo na conversão em biodiesel utilizou o delineamento experimental e a melhor conversão em éster etílico foi 99,26% em peso, para razão molar etanol: óleo de soja de 6:1, concentração de catalisador de 1,35% e com tempo de reação de 12 minutos.

Batistella et al., (2012) relataram a transesterificação do óleo de soja com etanol utilizando duas lipases comerciais imobilizada, sob a influência de irradiação de ultrassom em modo batelada. Após avaliação dos efeitos da

concentração de enzima, temperatura, concentrações de água, razão molar óleo/etanol, irradiação ultrassônica sobre o rendimento da reação, os resultados mostram que a transesterificação assistida por ultrassom, catalisada por lipase pode ser uma via potencial alternativa para o método alcalino catalisado convencional, dado aos altos rendimentos da reação 90% foram obtidos a sob irradiação ultrassônica de 100 W, e temperatura de 60 °C em um tempo de reação relativamente curto 4 h, usando como catalisador a enzima *Lipozyme IM RM*, a utilização repetida do catalisador sob a condição experimental ótima resultou num declínio tanto da atividade da enzima como da conversão em ésteres após dois ciclos. O uso de enzima *Novozym 435* conduziu a conversões mais baixas cerca de 57%, mas a atividade enzimática manteve-se estável após oito ciclos de utilização, mostrando, contudo, uma redução na conversão do produto após o quarto ciclo.

Em relação à atividade enzimática da enzima *Novozym 435* pode-se observar, de acordo com a Tabela 14, que a mesma mantém sua atividade em todas as condições estudadas (atividade inicial de 48,6 U/g).

Tabela 14: Atividade de esterificação da enzima *Novozym 435* após reação de transesterificação do óleo de soja em modo contínuo.

Ensaio	Razão molar	Potência (Watts)	Vazão de alimentação (mL/min)	Atividade Enzimática (U/g)
1	-1 (1:3)	-1(61,60)	-1(0,5)	48,01
2	1 (1:13)	-1(61,60)	-1(0,5)	42,20
3	-1(1:3)	1(154)	-1(0,5)	47,25
4	1(1:13)	1(154)	-1(0,5)	50,80
5	-1(1:3)	-1(61,60)	1(5)	51,35
6	1(1:13)	-1(61,60)	1(5)	45,01
7	-1(1:3)	1(154)	1(5)	43,16
8	1(1:13)	1(154)	1(5)	50,07
9	0(1:8)	0(107,80)	0(2,75)	42,44
10	0(1:8)	0(107,80)	0(2,75)	46,41
11	0(1:8)	0(107,80)	0(2,75)	48,10

A atividade da enzima da *Novozym 435* em reações de transesterificação é aumentada pela irradiação ultrassônica (FAN et al., 2010; WANG et al., 2007; VELJKOVIĆ et al., 2012).

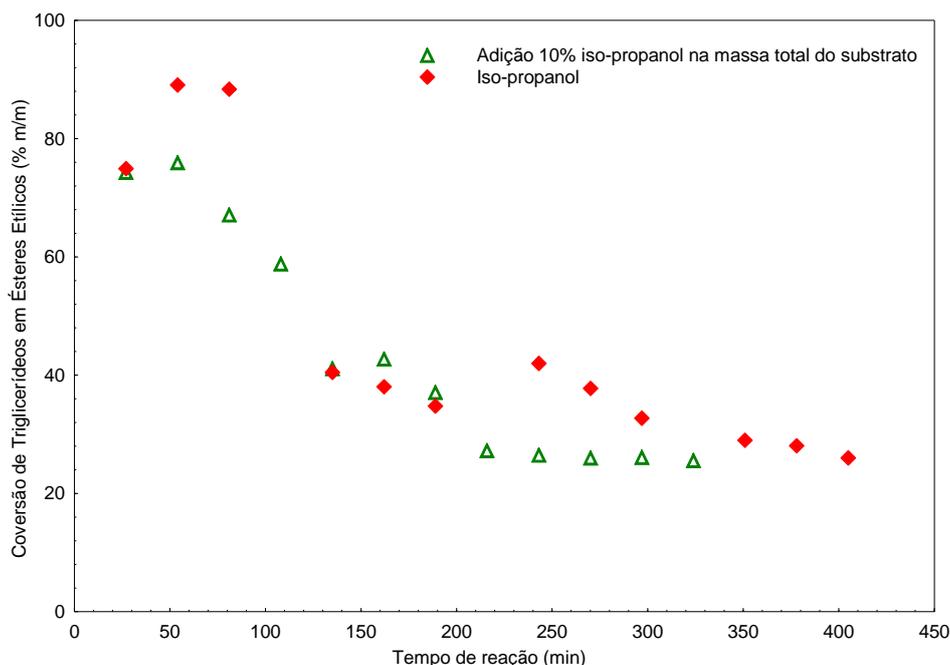
De acordo com Gole e Gogate (2012), a seleção da razão molar ótima é um parâmetro crucial para a síntese de biodiesel. Maior proporção molar (excesso de álcool) é geralmente necessária a fim de manter o equilíbrio da reação. O coeficiente de transferência de massa é aumentado devido a formações e colapso de bolhas perto da fase cavitacional entre as fases de óleo e de metanol. Operar com menor quantidade de metanol também pode ajudar na redução dos custos global de processamento.

5.4.2 Aprimoramento da conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos

Para recuperar a conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos realizou-se a passagem de solventes orgânicos a cada três tempos de reação. Avaliou-se o uso dos solventes orgânicos iso-propanol, hexano e etanol, com o intuito de remover o glicerol acumulado na superfície do suporte da enzima.

A Figura 24 compara a reação para remoção do glicerol utilizando adição de 10% de iso-propanol em relação à massa total do óleo de soja e etanol utilizadas na reação com razão molar de 1:3, com a reação utilizando a passagem do solvente orgânico iso-propanol para a lavagem, no reator, a cada três tempos de reação. Esta “lavagem” foi realizada em uma vazão de alimentação de 5 mL/min, maior que a utilizada na reação, com o intuito de uma remoção mais eficaz.

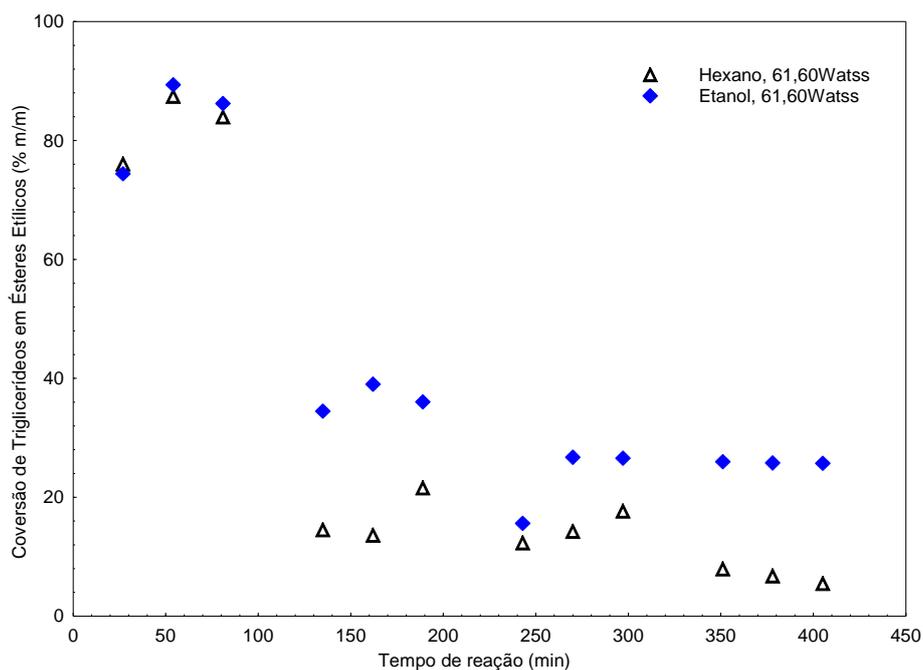
Figura 24: Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos – efeito do iso-propanol. Temperatura de 65 °C, vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 0,5 mL/min, potência ultrassônica de 61,60 W, razão molar (óleo se soja:etanol) 1:3 para reação com passagem de iso-propanol e reação com adição de 10% de iso-propanol em relação a massa total de substrato.



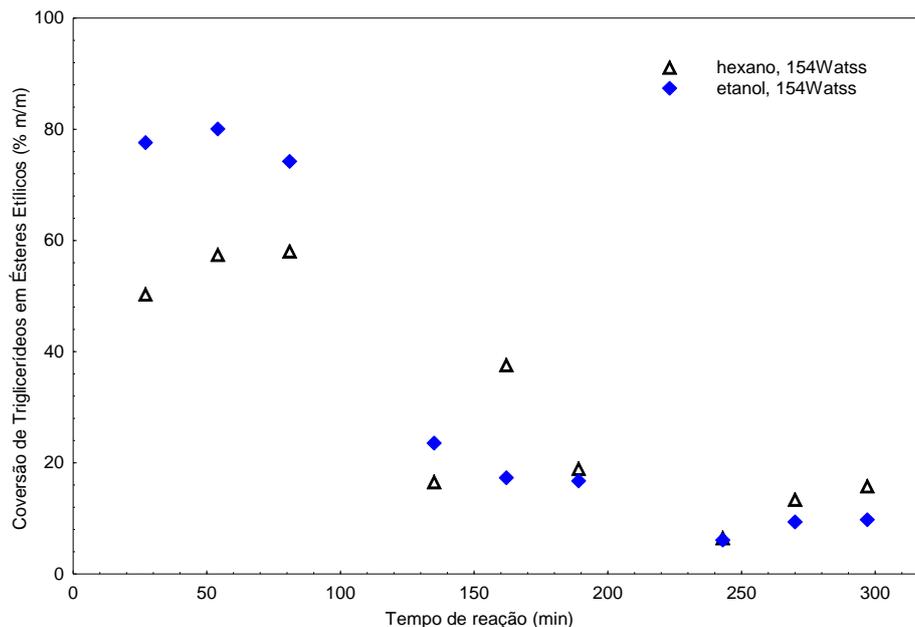
Conforme dados expostos na Figura 24 verifica-se que a adição de 10% do álcool iso-propanol na mistura reacional não contribuiu para a reação de transesterificação, e a conversão de triglicerídeos em ésteres diminuiu, pois em 54 minutos de reação, observa-se uma conversão de aproximadamente 89,07% em ésteres etílicos e com a adição dos 10% de iso-propanol na mistura reacional observa-se para o mesmo tempo de reação 75% em ésteres, além de que esta reação apresentou o mesmo comportamento da reação cinética sem utilização de solvente orgânico, isto é, nos primeiros tempos de reação ocorre uma maior conversão e após uma queda da mesma. Por meio da Figura 24 é possível verificar também que quando realizou-se a passagem do solvente orgânico iso-propanol, a cada três tempos de reação, não foi possível aumentar a conversão em ésteres.

Com base nestes resultados testou-se a passagem de outros solventes orgânicos como o hexano e o etanol e variou-se a potência ultrassônica de 61,60 para 154 W. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Figura 25 (a e b).

Figura 25: Conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos – efeito da passagem de hexano e etanol e da potência ultrassônica. (a) Temperatura de 65 °C, vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 0,5 mL/min, potência ultrassônica de 61,60 W, razão molar (óleo se soja:etanol) 1:3 e realização de passagem de solvente orgânico hexano e etanol. (b) Temperatura de 65 °C, vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 0,5 mL/min, potência ultrassônica de 154 W, razão molar (óleo se soja:etanol) 1:3 e realização de passagem de solvente orgânico hexano e etanol.



(a)



(b)

De acordo com a Figura 25 pode-se concluir que a tentativa de remoção do glicerol da superfície do catalisador enzimático não surtiu efeito com nenhum dos solventes testados, e comparando o uso do etanol e hexano pode-se observar que o etanol apresentou melhor desempenho que o hexano. Em relação à potência do equipamento, verifica-se que ao trabalhar com uma potência intermediária de 61,60 W obtém-se melhores conversões.

Em relação à atividade da enzima ao final dos experimentos (Tabela 15), para a reação de transesterificação com razão molar 1:3 (óleo/etanol), vazão de alimentação de 0,5 mL/min, 61,60 e 154 W de potência observou-se que a enzima não apresentou perda significativa da atividade.

Tabela 15: Atividade de esterificação enzimática após realização de passagem de solvente orgânico na reação de transesterificação enzimática de óleo de soja em modo contínuo em banho de ultrassom.

Potência (Watts)	Solvente Orgânico	Atividade Enzimática (U/g)
61,60	Hexano	47,27
61,60	Etanol	42,04
154,00	Hexano	48,83
154,00	Etanol	38,49

Após realização de passagem de solvente orgânico, iso-propanol, etanol e hexano, realizou-se análise de glicerol da amostra coletada através do método de periodato de sódio descrito por Cocks e Nan Rede (1966).

Tabela 16: % de glicerol, após passagem de solvente orgânico.

Potência (Watts)	Solvente Orgânico	Glicerol (%)
61,60	Hexano	5,57
61,60	Etanol	27,52
61,60	Iso-propanol	12,18
154	Hexano	2,7
154	Etanol	5,5

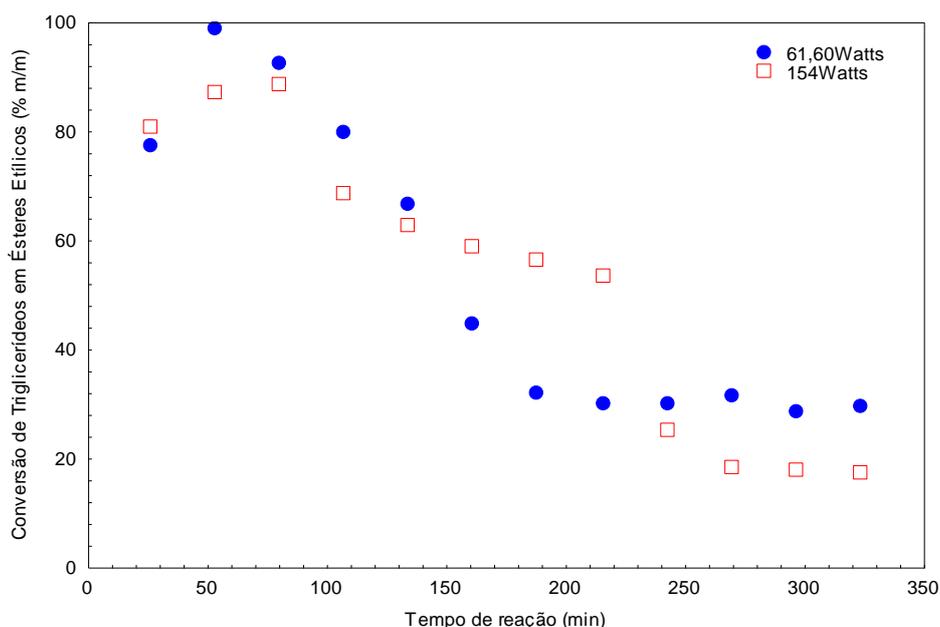
A Tabela 16 comprova a formação e acúmulo do glicerol no interior do reator e na enzima utilizada como catalisador. Por meio destes resultados pode-se comprovar também que a passagem de solvente orgânico não se mostrou eficaz para a remoção do glicerol.

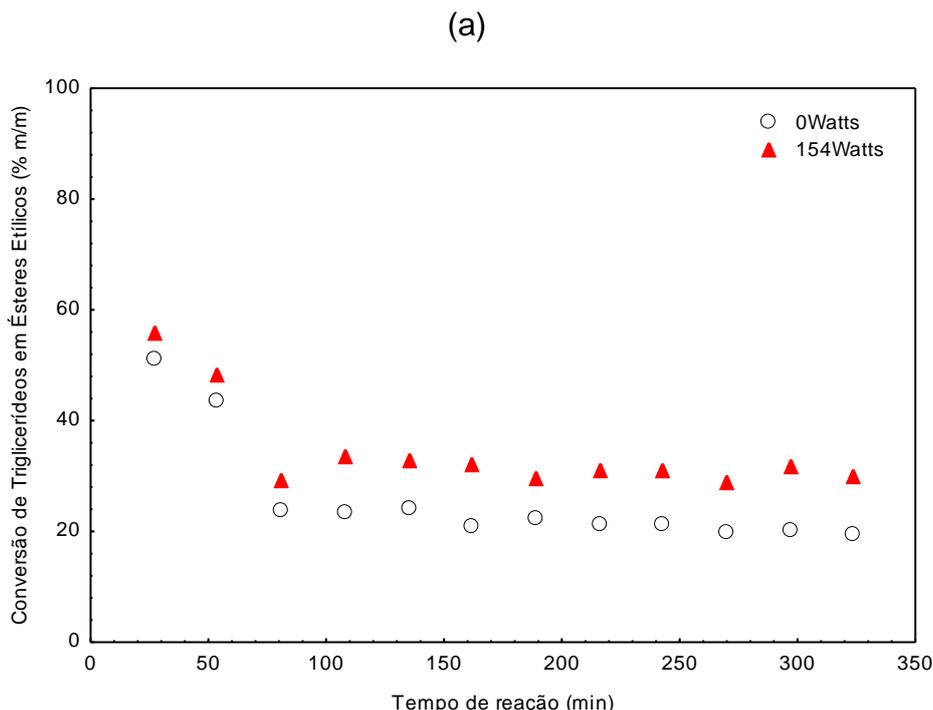
5.4.3 Efeito da potência ultrassônica e da razão molar óleo/etanol na conversão em biodiesel obtido a partir da transesterificação enzimática de óleo de soja em modo contínuo e em banho de ultrassom

A razão molar óleo/álcool é uma importante variável que influencia na conversão em ésteres de ácidos graxos. A estequiometria da reação requer uma razão óleo:álcool de 1:3 para a produção de 3 moles de ésteres de ácidos graxos e 1 mol de glicerol. No entanto, a reação de transesterificação pode ser favorecida pelo deslocamento de seu equilíbrio em direção à formação dos ésteres através do aumento da razão molar de álcool para óleo (LEUNG et al. 2010).

A fim de verificar a influência que a potência do ultrassom exerce sobre a reação de transesterificação avaliou-se as potências de 61,60 e 154 W para a razão molar (óleo/etanol) 1:3 e as potências de 0 e 154 W para a razão molar (óleo/etanol) 1:6 para temperatura de 65 °C, conforme Figura 26 (a e b).

Figura 26: Efeito da potência do ultrassom e da razão molar sobre a conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos em modo contínuo. (a) Razão molar (óleo/etanol) 1:3, 65 °C, potência ultrassônica 61,60 e 154 W. (b) Razão molar (óleo/etanol) 1:6, 65 °C, potência ultrassônica de 0 e 154 W.





(b)

Por meio da Figura 26 pode-se verificar que tanto o excesso de álcool, quanto a potência ultrassônica, não contribui para a reação de conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos, visto que para a potência de 154 W obteve-se 55,60, 48,39 e 29,18% em ésteres para os tempos de reação de 27, 54 e 81 minutos e razão molar (óleo/etanol) 1:6. Para a razão molar (óleo/etanol) 1:3, obteve-se 80,55, 86,83 e 88,12% em ésteres etílicos para a mesma potência ultrassônica e tempos de reação.

Stavarache et al., (2007b), utilizando ultrassom para o processo contínuo de transesterificação do óleo de palma, relataram conversão de 90%, um tempo de residência de 20 min com proporção molar de 1:6 de óleo para metanol.

Brito et al., (2012) investigaram o efeito da concentração de catalisador, o tempo de reação e a razão molar de etanol para óleo na produção de biodiesel assistida por ultrassom, utilizando catálise homogênea para a etanolise do óleo de soja em modo batelada. O estudo mostrou que a irradiação por ultrassom pode melhorar o processo de transesterificação de ésteres etílicos, e todas as variáveis estudadas apresentaram efeito

significativo positivo sobre o rendimento. A eficiência do processo de ultrassom demonstrou rendimentos superiores a 95% (rendimentos de 97 e 93% foram obtidos para maiores razão molar (óleo/etanol) 1:24, tempo de reação de 360 s e 120 s e maior quantidade de catalisador 1,5%. Menores rendimentos, 40 e 50% foram obtidos para os tempos de reação mais curtos de 120 s, menor quantidade de catalisador 0,5% e razão molar de 1:24 e 1:6), porém estudos adicionais são necessários para avaliar a viabilidade industrial do processo.

A Tabela 17 faz um comparativo entre o processo de transesterificação para a produção de ésteres etílicos através da irradiação ultrassônica em modo batelada. De acordo com a mesma verifica-se que a sonda ultrassônica apresenta um melhor desempenho sobre o processo de transesterificação, e ao comparamos os resultados expressos na Tabela 17, com os obtidos nesse trabalho (Figura 26), verifica-se que para o modo contínuo de produção de biodiesel a irradiação ultrassônica não apresenta efeito e que os melhores resultados são obtidos para a razão molar (óleo/etanol) 1:3 sendo que em 27 minutos obtem-se 77,1% em 61,60 Watts e 80,5% em 154 Watts de potência.

Tabela 17: Comparação da síntese de transesterificação de ésteres etílicos em ultrassom.

Óleo	Dispositivo ultrassom	Razão molar (óleo/etanol)	Concentração de catalisador	Tempo de reação (min)	Rendimento (%)	Referências
Peixe	Banho	1:6	C ₂ H ₅ ONa,	90	98,1	Armenta et al. 2007
	Sonda		0,8%	60	98,2	
Semente de algodão	Sonda	1:7	NaOH, 2%	60	90	Georgogianni et al. 2008
Coco	Sonda	1:6	KOH, 0,75%	7	98,2	Kumar et al, 2010
Soja	Banho	1:10,2	KOH, 0,35%	30	91,9	Rodrigues et al. 2009
Soja	Sonda	1:24	KOH, 1,5%	6	97	Brito et al. 2012

Fonte: BRITO et al., 2012.

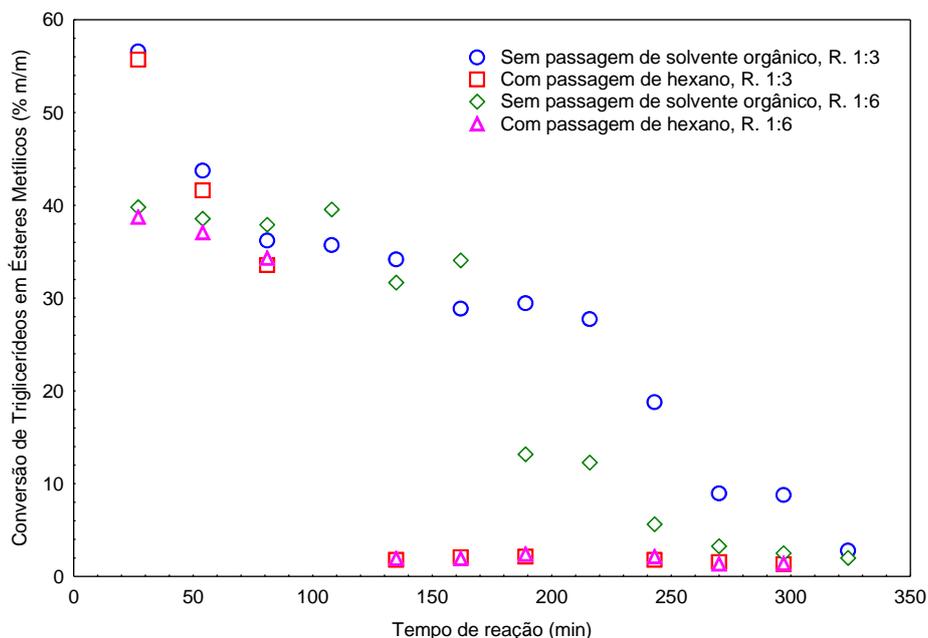
5.4.4 Efeito do tipo de álcool

O metanol e o etanol são os álcoois primários mais produzidos em escala industrial e seus usos nas reações de transesterificação têm sido frequentes (GERPEN et al., 2004). Entre todos os álcoois utilizados para a transesterificação, o metanol é o mais comumente utilizado, devido ao seu baixo preço e vantagens químicas e físicas (ZHANG et al., 2003). A solubilidade do catalisador em metanol é mais rápida em comparação com outros álcoois e pode facilmente reagir com triglicerídeos levando as taxas de reação mais rápidas (KANITKAR et al., 2011). Por comparação, a formação de ésteres etílicos é mais difícil que a de ésteres metílicos, devido às diferentes reatividades dos álcoois com o catalisador (MEHER et al., 2006).

Os principais fatores que afetam o rendimento de biodiesel é a quantidade de álcool, o tempo de reação, a temperatura de reação e a concentração do catalisador.

A fim de avaliar o efeito do álcool sobre as reações de transesterificação enzimática do óleo de soja em modo contínuo em banho de ultrassom para a produção de biodiesel, comparou-se a utilização do etanol e do metanol como substratos para o processo, de acordo com as Figuras 26 (a, b) e 27.

Figura 27: Efeito do metanol sobre a conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos. Razão molar (óleo/metanol) 1:3 e 1:6, 65 °C, potência ultrassônica 61,60 W e vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min.



De acordo com a Figura 27 verifica-se que a razão molar (óleo/metanol) 1:3 apresenta uma melhor conversão em ésteres metílicos sendo que em 27 minutos de reação obtem-se 56,58% para razão molar 1:3 e 39,78% para razão molar 1:6. Para ambas as razões molares observa-se o mesmo comportamento de queda da produção de biodiesel. A passagem do solvente orgânico hexano na tentativa da remoção do glicerol acumulado não apresentou efeito positivo.

Ao compararmos a Figura 27 com a Figura 26, percebe-se claramente a diferença em relação à utilização do etanol, visto que para a reação com etanol, para os tempos de reação de 27, 54, 81 e 108 minutos, obteve-se 77,11; 98,62; 92,01 e 79,54% em ésteres etílicos para razão molar (óleo/etanol) 1:3, vazão de alimentação 0,5 mL/min, 61,60 W de potência ultrassônica e vazão de alimentação de substrato de 0,5 mL/min, já para as mesmas condições porém utilizando metanol ao invés de etanol, obteve-se, 56,58; 43,73; 36,19 e 35,71% em ésteres metílicos, ficando claro que a utilização do

etanol apresenta vantagens em relação ao metanol, devido ao fato de ocorrer inibição parcial nas reações ao utilizar etanol como substrato, e inibição total ao realizar as reações com metanol.

A eficiência de produção do biodiesel depende do álcool utilizado na reação. Durante a transesterificação sob as mesmas condições de reação, o etanol, devido à sua cadeia de carbono ser mais longa, exibe uma baixa reatividade em comparação com o metanol (CERNOCH et al., 2010). O tempo necessário para a reação de etanólise é mais longo do que aquele para a metanólise. Maior energia, em geral, também é requerida na etanólise. Além disso, são necessárias maiores proporções molares de álcool/óleo para aumentar a conversão de éster em tempos de reação mais curtos (MARJANOVIC et al., 2010).

Um método para diminuir o tempo de reação de transesterificação quando se utiliza o etanol como substrato, poderia ser através da utilização de irradiação ultrassônica. A transesterificação através da catálise básica convencional é caracterizada por taxas de reação lentas em ambas as fases de reação, inicial e final, e é limitada pela transferência de massa entre a fase polar de álcool/glicerol e a fase apolar de óleo (BRITO et al., 2012). A utilização de ultrassom pode aumentar a interação entre as fases através do colapso de bolhas de cavitação que perturba o limite das fases e causa a emulsificação (TEIXEIRA et al., 2009). Este processo aumenta a transferência de massa e permite tempos de reação mais curtos, o emprego de reagentes mais baratos e menores condições físicas de operação.

Kanitkar et al., (2011) investigaram a transesterificação de óleos vegetais (soja e farelo de arroz) em ésteres metílicos e etílicos, utilizando um sistema batelada e microondas. Os autores realizaram uma comparação entre os dois álcoois em termos de rendimento, qualidade e cinéticas de reação. Os parâmetros temperatura (60, 70 e 80 °C) e tempo (5, 10, 15 e 20 min) foram avaliados e verificou-se que, em todas as condições testadas, mais de 96% de conversão foram obtidos tanto para o etanol como para o metanol. O uso de tecnologia de microondas para auxílio do processo de transesterificação

resultou em tempos de reação mais rápidos e a exigência de catalisador foi reduzido.

Metanol exige razões molares inferior de óleo/álcool em relação ao etanol que requer proporções molares mais elevadas. Metanol apresenta um desempenho melhor em termos de custos, enquanto que o etanol pode ter alguns benefícios ambientais e de segurança (KANITKAR et al., 2011).

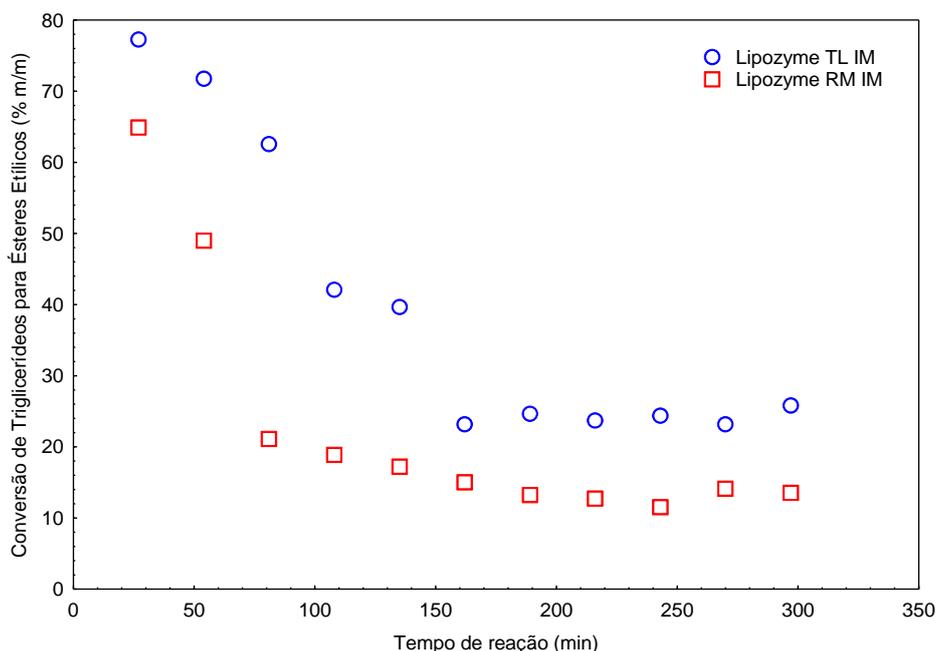
5.4.5 Produção de biodiesel em modo contínuo e banho de ultrassom utilizando as enzimas *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme TL IM*

Nos últimos anos, a pesquisa de vias alternativas para a clássica síntese alcalina ou ácida de ésteres alquílicos demonstrou a capacidade das lipases para catalisar a transesterificação de triacilgliceróis (TAN et al., 2010). A eficiência operacional e alta estabilidade de lipases na transesterificação tem sido amplamente relatado (DALLA ROSA et al., 2009; SU et al., 2009; LIAW; LIU, 2010), o que demonstra a possibilidade de reciclar o enzima com a utilização de um solvente orgânico (DU et al., 2007; TALUKDER et al., 2009; BATISTELLA et al., 2012; YU et al., 2010) ou em sistemas sem solventes (OGNJANOVIC et al., 2009). A principal desvantagem dos processos catalisados por enzimas é o elevado custo das lipases.

Batistella (2011) estudou sobre produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico (n-hexano) em banho de ultrassom e modo batelada, e verificou que para a *Lipozyme RM IM* e para a *Novozym 435*, as melhores condições foram as seguintes: 12,9% (m/m) de enzima, 100% de potência dos 132 W, razão molar (óleo/etanol) 1:3 e 57 °C para a *Lipozyme RM IM* e para a *Novozym 435* 27,1% (p/p) de enzima e 63 °C, atingindo conversões de 86 e 57% de produto, respectivamente. Com base neste trabalho, testou-se as enzimas *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme TL IM* no modo contínuo em reator com leito empacotado na condição ótima de Batistella (2011), com o intuito da possível utilização de um catalisador biológico com menor custo.

A Figura 28 demonstra o comportamento em termos de conversão de triglicerídeos em ésteres etílicos para as enzimas *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme TL IM*.

Figura 28: Conversão de triglicerídeos para ésteres etílicos em modo contínuo em banho de ultrassom utilizando as enzimas *Lipozyme TL IM* e *RM IM*. Temperatura de 57 °C, razão molar (óleo/etanol) 1:3, potência ultrassônica de 154 W e vazão de alimentação de substrato (óleo/etanol) de 0,5 mL/min.



Conforme a Figura 28 verifica-se que a enzima *Lipozyme TL IM* apresentou um maior potencial para a transesterificação do óleo de soja que a *Lipozyme RM IM*, apresentando conversões de 77,30; 71,75 e 62,57% em ésteres etílicos. A *Lipozyme RM IM* apresentou conversões de 64,92; 48,97 e 21,70% em ésteres etílicos para os tempos de reação de 27, 54 e 81 minutos. Sua atividade enzimática inicial foi de 11,52 U/g e 43,84 U/g e sua atividade ao final da reação foi de 5,57 U/g e 2 U/g, para as enzimas *Lipozyme TL IM* e *RM IM*. Porém, a enzima *Novozym 435* ainda apresenta melhores resultados em termos de conversão em ésteres etílicos.

O método para a síntese enzimática de biodiesel devido ao elevado custo do catalisador e da taxa de reação ser muito lenta não têm sido capaz de

encontrar aplicação comercial. Tem sido relatado que o uso de ultrassom de baixa frequência pode ser eficaz para as operações biológicas, tais como ruptura das células microbianas, desinfecção microbiana e biológica de águas residuais (GOLE; GOGATE, 2012). Na verdade, há poucos relatos indicando a aplicação de ultrassom para a intensificação da síntese de biodiesel com base na via enzimática. O estudo comparativo de Yu et al. (2010), com a lipase (*Novozym 435*) mostra a produção de biodiesel utilizando a abordagem convencional e na presença de irradiação ultrassônica (banho de potência nominal de 400 W, 40 kHz), indicou que o rendimento máximo obtido utilizando a abordagem convencional (vibrador a 200 rpm) foi de 62%, enquanto que o rendimento obtido por ultrassom aumentou para 93% sobre os tempos de reação semelhantes (12 h de operação), ele também observou que a taxa de reação é reforçada quando uma combinação de vibrações de baixa velocidade (50 rpm) e baixa frequência ultrasonica (20 kHz), utilizado o tempo de reação de apenas 4 h o rendimento é melhorado para 96%, a intensificação tem sido atribuída aos efeitos físicos do ultrassom, tais como aumento da turbulência, área interfacial resulta na eliminação da barreira de transferência de massa no meio reacional.

5.4.6 Comparação entre o óleo de soja e o óleo de macaúba na produção de biodiesel

Após a utilização do óleo de soja refinado como substrato, um óleo que apresenta baixíssima acidez, optou-se em fazer um comparativo com um óleo com uma acidez mais elevada, o óleo de macaúba.

De acordo com Gonzalez (2012), o óleo de macaúba apresenta as seguintes características físico-químicas, detalhadas na Tabela 18.

Tabela 18: Características físico-químicas do óleo de macaúba.

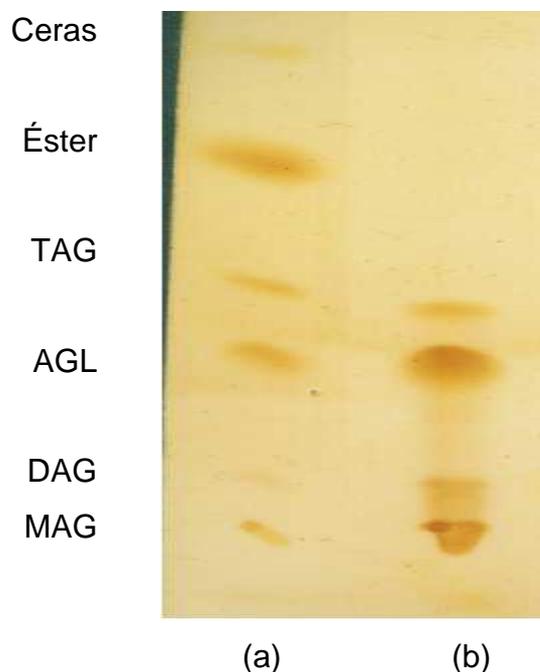
Características físico-químicas	Valores ± desvio
Teor de água (%)	0,94 ± 0,16
Índice de acidez (mg KOH.g-1)	114,42 ± 0,4
Índice de peróxido (meq de peróxido kg-1)	4,4 ± 4.10-2
Densidade (g.cm ⁻³ à 25 °C)	0,9273 ± 6,84.10-4
Índice de saponificação (*)	204,20 ± 2,9

* mg KOH requerido para saponificar 1 g de óleo

Fonte: GONZALEZ, 2012.

Gonzalez (2012) realizou a determinação qualitativa das classes lipídicas por cromatografia de camada delgada do óleo de macaúba, conforme Figura 29, e observou que na primeira coluna (Figura 29), apresentam-se os padrões para monoglicerídeo (MAG), diglicerídeo (DAG), triglicerídeo (TAG), ácidos graxos livres (AGL), ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e ceras. Na segunda coluna, apresentam-se os resultados da presença ou ausência dessas classes lipídicas no óleo de macaúba. Em conformidade com Gonzalez, 2012 para esse óleo verifica-se a presença de monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeo e ácidos graxos livres e a ausência de éster de ácidos graxos e ceras. Para o óleo de macaúba observa-se uma maior intensidade na mancha de ácidos graxos livres, o que sugere uma maior quantidade desses compostos, coerente com o valor elevado de acidez encontrado no óleo.

Figura 29: Identificação das classes lipídicas do óleo de macaúba por cromatografia de camada delgada: (a) padrão e (b) óleo de macaúba.



Fonte: GONZALEZ, 2012.

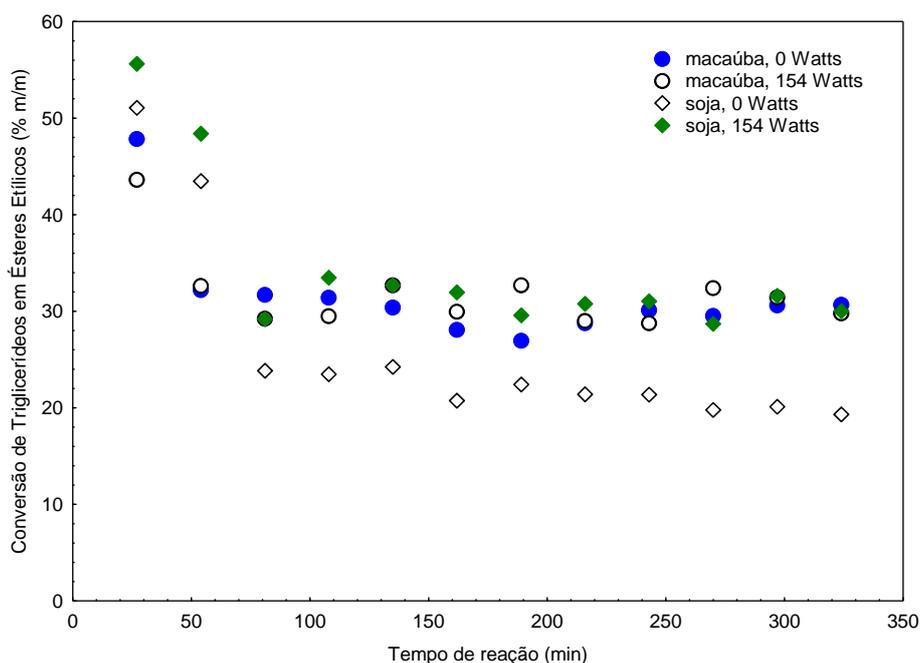
Fortes e Baugh (2004) determinaram a composição de ácidos graxos presentes no óleo da polpa de macaúba e verificaram que o ácido oléico (18:1) está presente em maior concentração – 52,82 %, seguido do ácido palmítico (16:0) com 22,3 %, esteárico (18:0) com 5,75 %, palmitoléico (16:1) com 5,28 % e linoléico (18:2) com 4,69 %, os outros ácidos graxos determinados pelos autores possuíam concentrações menores que 3%.

O óleo pode sofrer várias alterações onde ocorre a formação de polímeros, dímeros, triglicerídeos oxidados, etc. (RUIZ-MÉNDEZ et al., 2008). Conforme Gonzalez (2012), esses compostos formados não podem ser convertidos em ésteres, implicando em um decréscimo real do rendimento da reação. A partir do método de conversão quantitativa com BF_3 , Gonzalez (2012) verificou o valor máximo de conteúdo de ésteres no óleo, ou seja, o valor de convertibilidade máxima para o óleo que, no caso do óleo de macaúba, foi de 80,1 %. Em estudos recentes realizados por Navarro-Díaz

(2013), verificou-se que a convertibilidade máxima de triglicerídeos em ésteres do óleo de macaúba é de 75,04% e o índice de acidez é de 75,0 mg KOH/g.

Na transesterificação do óleo de macaúba em etanol avaliou-se o efeito da potência do ultrassom, e comparou-se com a transesterificação do óleo de soja e etanol. Para a potência, a faixa de estudo foi de 0 e 100 W, 65 °C, razão molar (óleo/etanol) 1:6 e vazão de alimentação de substrato de 0,5mL/min, conforme Figura 30.

Figura 30: Conversão de triglicerídeos do óleo de macaúba e do óleo de soja em ésteres etílicos pela transesterificação catalisada por *Novozym 435* em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (óleo/etanol) 1:6, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 0 e 154 W.



Conforme dados apresentados na Figura 30, verifica-se que a potência ultrassônica não exerceu influência sobre conversão em ésteres etílicos quando utilizou-se o óleo de macaúba, pois levando em consideração a convertibilidade máxima do óleo de macaúba utilizado de 75,04%, verifica-se para os tempos de reação de 27, 54, 81 e 108 minutos, potência de 0 Watts,

para o óleo de macaúba conversões de 63,73; 42,87; 42,24 e 41,85% em ésteres etílicos. Esta conversão se mantém em torno de 40% até o final da reação; estes resultados representam uma conversão de cerca de 90% em 27 minutos. Para 154 W de potência, verifica-se conversões na ordem de 58,11; 43,46; 39; 39,3%. Já para o óleo de soja pode-se observar claramente que a potência ultrassônica exerce influência na conversão, visto que para 0 W obtém-se uma conversão de 51,06; 43,46 e 23,84% em ésteres para os tempos de reação de 27, 54 e 81 minutos, sendo que a conversão se mantém até o final da reação na ordem de conversão de 20% em ésteres. Para 154 W de potência ultrassônica obtém-se 55,60; 48,39 e 29,18% em ésteres e a conversão também se mantém ao longo da reação em torno de 30% de conversão de triglicerídeos em ésteres. Desta forma, ao realizar uma comparação entre os dois óleos (soja e macaúba), constata-se que o óleo de macaúba apresenta um melhor desempenho, apesar de seu alto teor de acidez.

A Tabela 19 apresenta os valores da atividade enzimática obtida ao final de cada reação de transesterificação do óleo de soja e macaúba, para a razão molar (óleo/etanol) 1:6 e 65 °C.

Tabela 19: Atividade de esterificação enzimática ao final da reação de transesterificação dos óleos de soja e macaúba em modo contínuo em banho de ultrassom.

Potência (W)	Razão molar (1:6)	Atividade Enzimática (U/g)
0	Óleo de soja/ etanol	53,65
154	Óleo de soja/ etanol	44,33
0	Óleo de macaúba/ etanol	46,31
154	Óleo de macaúba/ etanol	41,17

Nogueira et al., (2010) investigaram o efeito da irradiação por microondas na taxa de transesterificação do óleo de macaúba com etanol em modo batelada catalisada pelas enzimas *Novozym 435* (*Candida antarctica*) e *Lipozyme IM* (*Mucor miehei*). As variáveis estudadas foram temperatura (30 a

40 °C), tempo de reação (5 a 15 min) e concentração de enzima (2,5 a 7,5% m/m). Para isso misturou de 10 g de óleo de macaúba com 5 g de etanol (1:9 razão molar) numa placa de agitação durante 10 min. Os reagentes misturados com o catalisador foram então transferidos para vasos de reator de microondas (Synthos-Anton Paar) para iniciar a reação, esta foi realizada nas condições com a máxima velocidade de agitação disponível no reator. No final da reação, a mistura foi filtrada para remoção do catalisador. Os autores observaram conversões de 45,2% para a enzima *Novozym 435*, para as condições de 30 °C, 2,5% m/m concentração de enzima e 15 min de reação e de 35,8% para a *Lipozyme IM* a 40 °C, 7,5% m/m de enzima e 5 minutos de reação. O tempo de reação apresentou um efeito significativo na redução da atividade catalítica da enzima, que foi interpretada em termos de desativação da enzima devido a exposição ao microondas. A comparação dos resultados entre a atividade do biocatalisador na ausência e na presença de microondas mostrou que a atividade é aumentada em cerca uma ordem de grandeza devido à ação do microondas.

5.5 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM MODO CONTÍNUO E ULTRASSOM ATRAVÉS DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

O biodiesel produzido a partir de fontes alimentares possui limitações em relação a questões de segurança e, portanto, não é considerado como uma abordagem sustentável. Caminhos com base em fontes vegetais não comestíveis e resíduos têm sido desenvolvidos, mas a grande quantidade de ácido graxo livre e de umidade requer um processamento adicional, que requer tempo e consome muita energia. Há um amplo espaço disponível para o uso de processos e técnicas com o objetivo de fazer a síntese economicamente viável e uma das abordagens baseia-se na utilização de reatores sonoquímicos com técnicas de intensificação, como o uso de microondas e cavitação hidrodinâmica. A utilização de reatores sonoquímicos pode intensificar

consideravelmente o processo de síntese do biodiesel, com redução no tempo de processamento e de exigência de matérias-primas (GOLE; GOGATE, 2011).

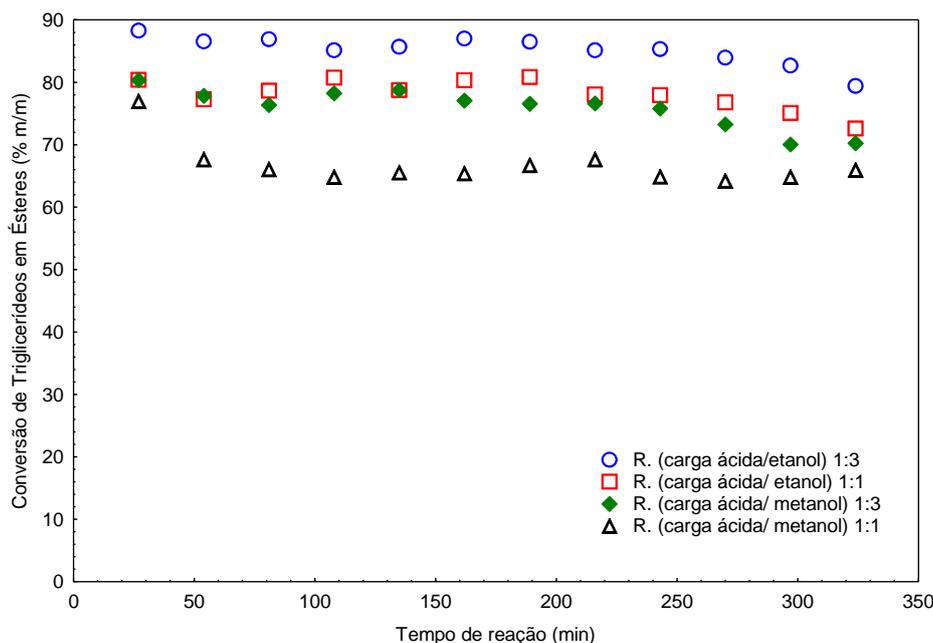
Os ácidos graxos são constituintes dos óleos e gorduras na forma de mono, di e triglicerídios, uma grande quantidade de ácidos graxos livres indica que o produto está em acelerado grau de deterioração. A principal consequência disso é que o produto torna-se mais ácido. Um elevado índice de acidez indica, portanto, que o óleo ou gordura está sofrendo quebras em sua cadeia, liberando seus constituintes principais, os ácidos graxos (ALVES et al., 2009).

Com base nos resultados promissores obtidos através da transesterificação do óleo de macaúba, óleo este com um índice de acidez de 75,0 mg KOH/g, acidez elevada comparada ao óleo de soja (0,086 mg KOH/g) (GARCIA, 2006), investigou-se o efeito da razão molar, do álcool e da potência ultrassônica na estabilidade do processo de produção de biodiesel por meio da reação de esterificação com um ácido graxo vegetal com índice de acidez mais elevado (195,73 mg KOH/g).

5.5.1 Efeito da razão molar e do álcool na esterificação enzimática de ácido graxo vegetal em modo contínuo em banho de ultrassom

O efeito da razão molar e do álcool foi avaliado para as seguintes variáveis, razão molar (carga ácida/etanol) e (carga ácida/metanol) 1:3 e 1:1, temperatura 65 °C, potência ultrassônica de 61,60 W e vazão de alimentação de substrato de 0,5mL/min para o biocatalisador *Novozym 435*. A Figura 31 apresenta os resultados obtidos nesta etapa.

Figura 31: Efeito da razão molar e do álcool sobre a conversão em ésteres utilizando um ácido graxo vegetal como substrato em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/etanol) e (carga ácida/metanol) 1:3 e 1:1, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 61,60 W.



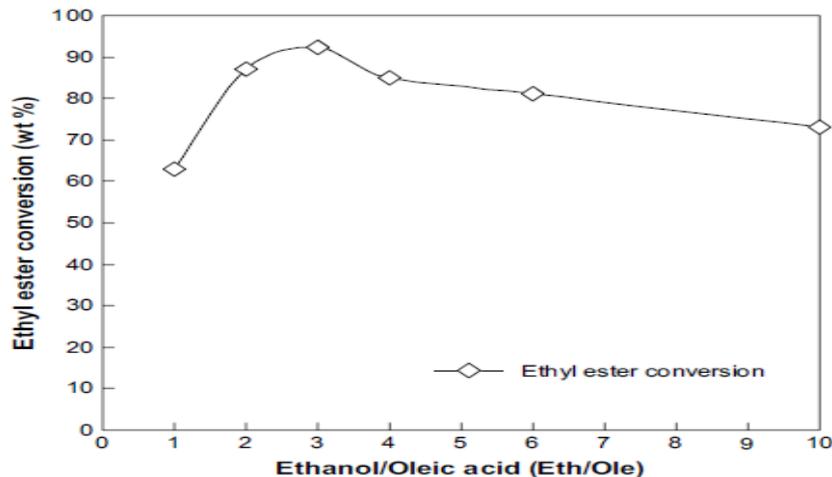
Com base na Figura 31 verifica-se que também para a reação de esterificação o etanol apresenta vantagens sobre o metanol, proporcionando melhores conversões em ésteres, e em relação à razão molar pode-se visualizar claramente que a reação realizada com a razão molar (carga ácida/etanol) 1:3 apresentou os melhores resultados visto que para os tempos de reação de 27 a 81 minutos obteve-se 88,26, 86,56 e 86,88% em ésteres. Para a razão molar 1:1, obteve-se 80,39, 77,25 e 78,62% em ésteres etílicos. Para todos os experimentos realizados as conversões se mantiveram constantes ao longo dos 324 minutos de reação estudados.

Hanh et al., (2009) estudaram a produção de éster etílico de ácido graxo a partir de ácido oleico com álcoois de cadeia curta (etanol, propanol e butanol) sob irradiação ultrassônica e verificaram que a condição ideal para o processo de esterificação foi para a razão molar de álcool para ácido oleico de

3:1 com 5% em peso do catalisador H_2SO_4 a 60 °C com um tempo de irradiação de 2 h. A partir desses resultados obtidos em seu estudo, concluíram que para a esterificação de ácido oleico, o tempo para alcançar a máxima conversão de éster etílico é muito maior do que a transesterificação da trioleína, e a conversão do éster etílico máximo é menor em comparação com aqueles para a transesterificação de trioleína sob irradiação ultrassônica.

De acordo com Hanh et al., (2009), Figura 32, verifica-se que após 3 horas de reação começa a ocorrer um decréscimo na conversão de ésteres com o uso de catalisador ácido na reação de esterificação. Comparando estes resultados com os obtidos no presente estudo verifica-se que o uso da catálise enzimática na reação de esterificação é capaz de proporcionar conversões estáveis na ordem de 90%, Figura 31, por um período muito maior.

Figura 32: Conversão de éster etílicos, para razão molar (etanol/ácido oléico) 3:1, 5% m/m de concentração de H_2SO_4 , 20 °C, 10 h, sob a irradiação contínua de ultrassom.



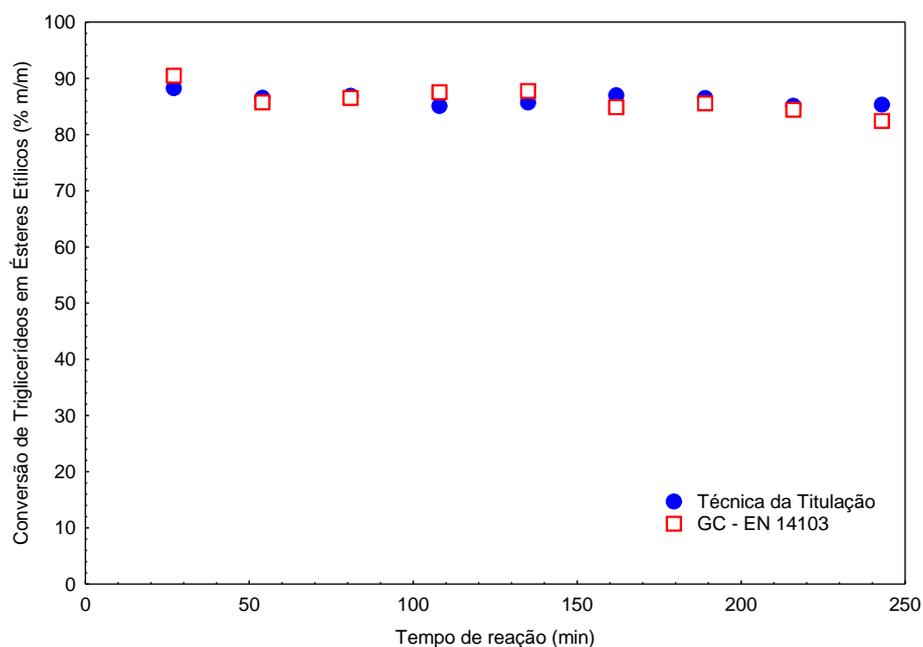
Fonte: HANH et al., 2009.

Marciniuk et al., (2007) simularam a reação de esterificação do ácido oléico com metanol e etanol. Os autores observaram que a reação com etanol é endotérmica e, desta forma, a conversão de equilíbrio aumenta com o aumento de temperatura. Já a reação com metanol é exotérmica, apresentando

comportamento oposto. Os autores concluem que na faixa de temperatura investigada, 25 a 60 °C, razões molares de 2:1 até 10:1 apresentam conversões de equilíbrio próximas de 1, isto é, o excesso de álcool não provocaria um aumento significativo da conversão.

Como a reação de esterificação produz água, as análises de conversão foram realizadas através do método de titulação, mas para comprovar a eficiência do método adotado realizou-se a análise comparativa em cromatógrafo gasoso (GC) (Shimadzu 2010), conforme Figura 33.

Figura 33: Comparação entre da técnica de titulação e a EN 14103. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 61,60 W.



Ao final de cada reação de esterificação, realizou-se a medida de atividade da enzima *Novozym 435*, conforme apresentado na Tabela 20. A análise desta tabela permite verificar que a enzima não perdeu sua atividade de esterificação (atividade inicial de 47,80 U/g).

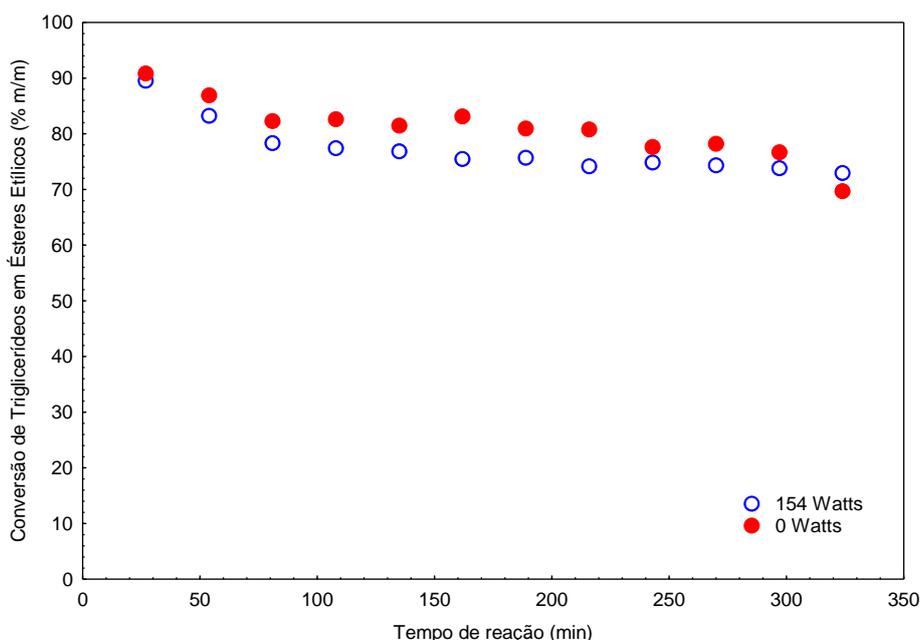
Tabela 20: Atividade enzimática ao final da reação de esterificação de ácido graxo vegetal em modo contínuo em banho de ultrassom.

Razão molar	Atividade Enzimática (U/g)
Carga ácida/ etanol (1:3)	44,93
Carga ácida/ etanol (1:1)	54,15
Carga ácida/ metanol (1:3)	47,02
Carga ácida/ metanol (1:1)	53,53

5.5.2 Efeito da potência ultrassônica

O efeito da potência ultrassônica foi avaliado para as potências de 0 e 154 W, 65 °C, vazão de alimentação de substrato de 0,5mL/min e razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, de acordo com a Figura 34.

Figura 34: Efeito da potência ultrassônica sobre a produção de biodiesel por meio da reação de esterificação enzimática em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 0 e 154 W.



A potência ultrassônica não exerceu nenhuma influência sobre a reação de esterificação, conforme pode ser observado na Figura 34.

A atividade enzimática ao final da reação para a reação realizada a 154 W foi de 45,85 U/g e para a reação realizada a 0 W foi de 45,80 U/g, comprovando também que a utilização do ultrassom não interfere na atividade enzimática.

Lee et al., (2011) estudaram o efeito da irradiação ultrassônica sobre o processo de produção de biodiesel a partir de óleo vegetal e verificaram que o ultrassom apresentou efeitos sobre o aquecimento e mistura dos reagentes. A irradiação ultrassônica reduziu o tempo de reação e as propriedades do biodiesel sem qualquer passo adicional de mistura no processo de esterificação de óleos vegetais. Os resultados obtidos por Lee et al., (2011) podem ser resumidos como:

1. O rendimento de biodiesel aumentou com o aumento da energia ultrassônica de 150-450 W, mas o conteúdo de ésteres metílicos diminuiu a potências ultrassônicas. Isto aconteceu provavelmente devido à diminuição do tempo real de irradiação causada pelo aumento do intervalo de pulso necessário para ajustar a temperatura, devido à extensão da potência de irradiação.

2. O rendimento de biodiesel e conteúdo de ésteres metílicos, ambos 95%, no tempo de reação de 30 min para todos os três óleos vegetais (soja, canola e óleo de milho). O óleo de canola exibiu melhores propriedades de biodiesel em relação aos outros dois óleos.

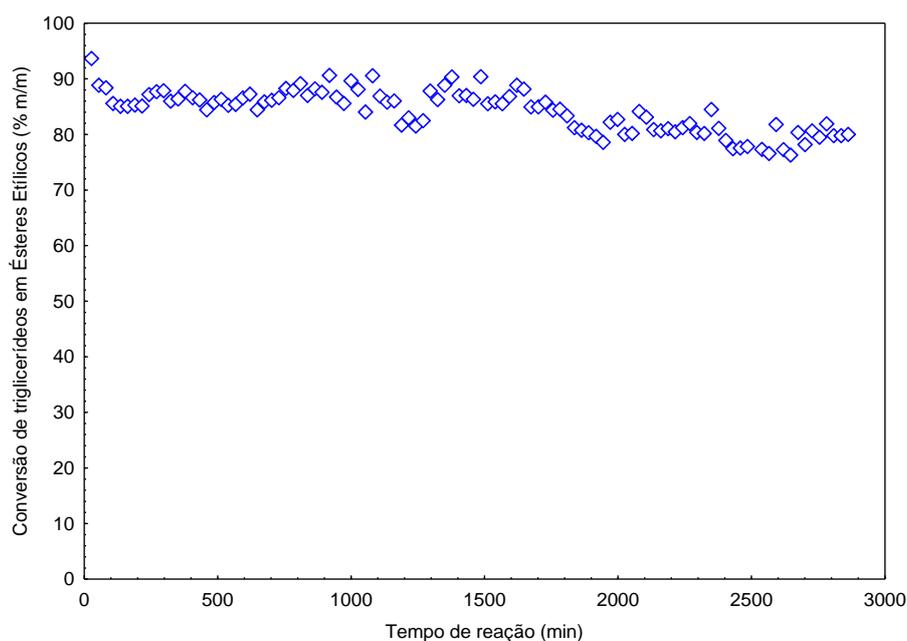
Aranda et al., (2008) estudaram a esterificação de resíduos ácidos oriundos do processamento de óleo de palma de forma não catalítica e utilizando catalisadores homogêneos (ácido metanosulfônico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico e ácido tri-cloroacético), com concentração variando de 0,01 a 0,1% m/m, na presença de metanol ou etanol, na razão molar de 3:1 (álcool:ácidos graxo de óleo de palma) a uma temperatura de 130 °C. As maiores conversões foram obtidas para os ácidos sulfúrico e metanosulfônico, tanto para a reação com etanol quanto com metanol. Segundo os autores, o

maior rendimento observado para estes dois catalisadores pode ser explicado por sua maior força ácida, quando comparados com os demais.

5.5.3 Estabilidade da produção de biodiesel enzimático em modo contínuo através de reação de esterificação

Com base nos resultados expressos pelas Figuras 31 e 34 verifica-se que a produção de biodiesel através da reação de esterificação é praticamente constante durante a cinética realizada de 324 minutos. Desta forma, com o intuito de comprovar esta estabilidade, realizou um estudo com a melhor condição, sendo esta, 65 °C, vazão de alimentação de substrato de 0,5 mL/min, razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3 e 0 W de potência, conforme Figura 35.

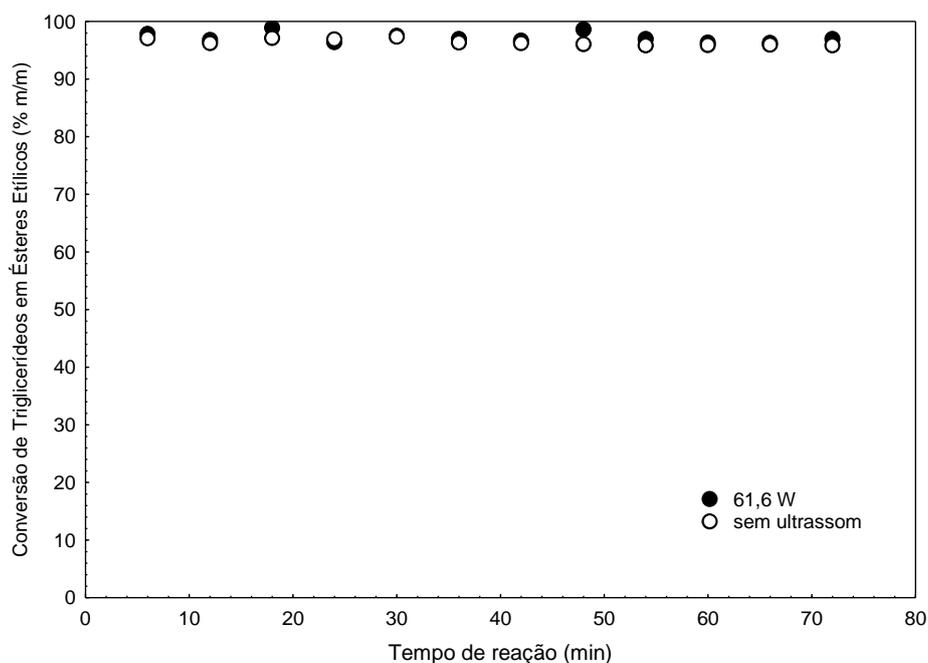
Figura 35: Estabilidade da produção de biodiesel via esterificação enzimática em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, vazão de alimentação de substrato 0,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 0 W.



Ao final da reação, a enzima apresentou atividade de 32,40 U/g e o estudo realizado comprovou a eficácia do processo sendo que a produção de biodiesel permaneceu contínua e estável durante as 48 horas estudadas.

Tendo em vista esta estabilidade do processo procurou-se avaliar a conversão em ésteres com uma vazão de alimentação de 2,5 mL/min e uma razão molar (carga ácida/ etanol) de 1:6, conforme apresentado na Figura 36.

Figura 36: Produção de biodiesel via reação de esterificação enzimática em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:6, vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 65 °C, sem potência ultrassônica e com potência ultrassônica de 61,6 W.



De acordo com a Figura 36, é possível constatar que a potência ultrassônica não exerce nenhuma influência em relação a conversão de ésteres, e com o aumento da razão molar e da vazão de alimentação observa-se uma melhor conversão em ésteres etílicos, sendo esta de 97,86% em 6 minutos de reação e de 96,97% em 72 minutos. Já a atividade enzimática ao final da reação foi de 47,25 U/g, não ocorrendo alteração na mesma, para ambas as potências. Verifica-se também que os dados da Figura 36

apresentam o mesmo comportamento dos dados da Figura 35, sendo que possivelmente se a reação tivesse percorrido um tempo igual ou superior às 48 horas a conversão em ésteres também seria estável. Ao compararmos estes valores com os apresentados na Figura 34, comprova-se que não é necessário tempos de reação longos para obter bons resultados, sendo que em 27 minutos para a razão molar 1:3 e vazão de alimentação de 0,5 mL/min obteve-se 93,71% e em 48 horas 80,07% em ésteres etílicos.

A fim de verificar o efeito do catalisador realizou-se uma reação sem a presença do mesmo, com razão molar (carga ácida/ etanol) 1:3, vazão de alimentação de substrato de 0,5 mL/min, 65 °C e 0 W de potência, e constatou-se que a reação de esterificação é auto-catalítica, isto é, mesmo sem a utilização do catalisador conversões na ordem de 25,26% foram obtidas.

Do ponto de vista termodinâmico, o excesso de reagente tenderia a deslocar o equilíbrio da reação para os produtos, isto é, esperar-se-ia um aumento na conversão com o aumento do excesso de álcool (SRIVASTAVA et al., 2003).

Kelkar et al., (2008) realizaram reação de esterificação com um catalisador ácido de (C₈-C₁₀), com metanol em condições de reação ótimas, e reportaram níveis de conversão de 98% em 75 min. Com o acréscimo da proporção molar (álcool/óleo) de 5/1 a 10/1, o rendimento foi aumentado de cerca de 91% em 3 horas para cerca de 98% em 2 h.

Com o aumento da temperatura de 10-60 °C no caso de esterificação do ácido oleico catalisada sob irradiação ultrassônica, a conversão de ésteres etílicos aumenta e o tempo para obter o máximo de conversão é reduzido. Deshmane et al., (2009) observaram que a taxa de reação bem como o equilíbrio e a conversão aumenta rapidamente com o aumento da temperatura.

Park et al., (2010), para maximizar a produção de biodiesel a partir de borra de soja, investigaram os efeitos da água sobre a reação de esterificação de ácidos graxos. Os óleos investigados foram o ácido oléico e um óleo de elevada acidez. Estes foram esterificados por reação com metanol na presença de Amberlyst-15, como um catalisador heterogêneo e ácido sulfúrico como catalisador homogêneo. O rendimento em éster de ácido graxo foi estudado

para as razões molares (óleo/metanol) 1:3 e 1:6 e temperaturas de reação de 60 e 80 °C. A taxa de esterificação do ácido oléico diminuiu significativamente como o conteúdo inicial de água aumentou para 20% em relação ao óleo. A atividade de Amberlyst-15 diminuiu mais rapidamente do que a do ácido sulfúrico, devido ao afeto direto dos sítios ácidos pela água. Park et al., (2010) verificaram que a água resultante da esterificação do ácido oléico inibe a reação de esterificação, a inibição pelo efeito da água foi mais dominante sob Amberlyst-15 do que sob o ácido sulfúrico, devido ao ataque dos sítios ácidos da Amberlyst-15 por água. A esterificação do ácido oléico em duas fases, que inclui a substituição do metanol e do catalisador após 30 min, o tempo de reação é reduzido e a conversão de ésteres é de 90%. A esterificação em duas fases do ácido graxo com ácido sulfúrico como catalisador também reduziu o tempo de reação necessário de 6 horas para 1,8 horas e atingiu mais de 85% de ésteres.

O desenvolvimento de reatores adequados é crucial para a produção de biodiesel. Wang et al., (2011) estudaram um reator utilizando lipase- Fe_3O_4 catalisador biocompósito desenvolvido para produção de biodiesel com base em óleo de soja, metanólise. A emulsificação antes da metanólise melhorou a velocidade da reação. A lipase e nanopartículas do biocompósito mostraram alta atividade e estabilidade no leito do reator a uma taxa de fluxo ótima (0,25 mL/min). A taxa de conversão e estabilidade obtida utilizando o reator com quatro colunas empacotadas foram mais elevadas do que os obtidos utilizando um único reator de leito empacotado. A conversão de biodiesel foi mantida a uma taxa elevada de mais de 88% por 192 h, e foi apenas ligeiramente diminuída para aproximadamente 75% depois de 240 horas de reação. O sistema de reator de leito, portanto, tem um grande potencial para realização do projeto e operação da produção de biodiesel enzimática em escala industrial.

Conforme Wang et al., (2011), é importante notar que, do ponto de vista econômico, o custo envolvido na imobilização da lipase também resultaria em um aumento global no custo de fabricação do biodiesel. Em seu estudo a lipase-biocompósito nanopartículas foi preparado usando um método simples e

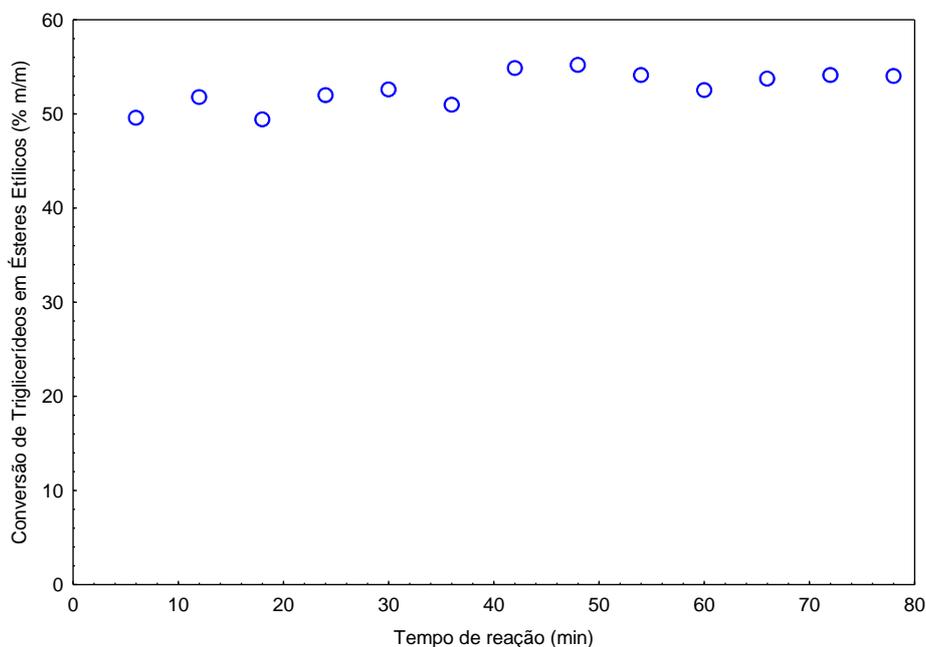
eficaz de imobilização em que Fe_3O_4 serviu de suporte, de acordo com trabalho anterior (WANG et al., 2009). Assim, a vantagem da utilização de uma enzima imobilizada poderia superar o aumento do custo de imobilização. Em escala laboratorial, estes resultados têm grande potencial para melhorar a concepção e operação de grandes sistemas enzimáticos.

Avellaneda e Salvadó (2011) compararam a transesterificação convencional com a transesterificação em reator tubular contínuo. Neste reator os reagentes (metanol, óleo e hidróxido de potássio) escoavam através de um tubo helicoidal submerso em um banho de aquecimento a 60 °C. O reator possuía cinco tomadas de amostras distribuídas sem uniformidade para permitir a retirada de alíquotas em tempos diferentes de reação com o intuito de encontrar o melhor/menor tempo de reação, evitando assim a necessidade de agitação mecânica do sistema. Os autores estudaram uma maneira de melhorar a qualidade do biodiesel obtido e variaram o sistema helicoidal incorporando um micromix estático, fornecendo a energia sob a forma do ultrassom no banho de aquecimento. O reator produziu biodiesel e glicerina em composições aproximadamente iguais aqueles obtidos no processo em batelada (índice de ácidos graxos 89% no tempo de 75 minutos), mas no processo contínuo (2,5 mL/min) foi observado o mesmo rendimento para um tempo de 13 minutos, aproximadamente 6 vezes mais rápido.

5.5.4 Produção de biodiesel por esterificação de ácido graxo vegetal em modo contínuo em banho de ultrassom utilizando como catalizador a lipase *Lipozyme RM IM*

Ao comprovar a eficácia do processo de produção de biodiesel por meio de reação de esterificação em modo contínuo utilizando reator com leito empacotado e banho de ultrassom, testou-se a enzima comercial *Lipozyme RM IM* na tentativa de reduzir o custo da produção de biodiesel. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 37.

Figura 37: Conversão de ésteres etílicos com uso da enzima *Lipozyme RM IM* como catalisador através da esterificação em modo contínuo em banho de ultrassom. Razão molar (carga ácida/ etanol) 1:6, vazão de alimentação de substrato 2,5 mL/min, 65 °C, potência ultrassônica de 61,60 W.



Apesar da estabilidade da reação, demonstrada na Figura 35, a diferença na conversão em ésteres é muito grande como pode ser observado fazendo um comparativo entre as Figuras 36 e 37. Para a enzima *Novozym 435*, (Figura 36), obteve-se 97,86, 97,53 e 96,31% em ésteres para 6, 30 e 60 minutos, já para as mesmas condições e a enzima *Lipozyme RM IM*, (Figura 37), obteve-se 49,57, 52,60 e 52,53% de conversão em ésteres etílicos para os mesmos tempos de reação.

A produção de biodiesel é amplamente realizada através da reação de transesterificação, catalisada por catalisadores homogêneos ou catalisadores heterogêneos. O catalisador mais notável usado na produção de biodiesel são os catalisadores homogêneos alcalino tal como NaOH, KOH, e CH_3OK CH_3ONa . A escolha destes catalisadores é devido a suas taxas de reação cinéticas maiores. Porém com o custo por causa de matérias-primas refinadas e dificuldades associadas ao uso de catalisadores homogêneos alcalinos para transesterificação de matérias-primas de baixa qualidade para a produção de

biodiesel, o desenvolvimento de vários catalisadores heterogêneos estão aumentando. O desenvolvimento de catalisadores heterogêneos tal como catalisadores sólidos e enzimas poderia superar a maior parte dos problemas associados com catalisadores homogêneos (ATADASHI et al., 2013).

Em comparação com os métodos de síntese química, a produção de biodiesel catalisada por enzimas (lipases) oferece muitas vantagens, tais como uma elevada seletividade, menor consumo de energia, menos produtos secundários e resíduos, evitando formação de sabão e fácil recuperação de glicerol e de catalisadores. No entanto, o custo da lipase é o maior obstáculo para a utilização de lipases em produção de biodiesel industrial (VELJKOVIĆ et al., 2012).

Vários métodos diferentes de desenvolvimento de biodiesel, reduzindo os custos de produção de biodiesel estão sendo atualmente investigados, tal como a otimização dos fatores de processo, utilizando métodos estatísticos, o desenvolvimento de modelos de processos cinéticos, o ultrassom aplicado à reação de transesterificação, a utilização do processo contínuo e a concepção de novos tipos de reatores ultrassônicos. Uma atenção especial deve ser dada para a utilização de novos tipos de reatores ultrassônicos com um melhor desempenho do que os atualmente utilizados. Uma combinação entre o ultrassom e reatores de fluxo contínuo é um caminho promissor. Espera-se que o futuro dos reatores ultrassônicos encontre-se no desenho de reatores com múltiplas frequências e transdutores baseados em funcionamento de forma contínua. Por certo, mais estudos sobre a ligação do reator com as características dinâmica de bolhas, a cavitação, a reologia da mistura de reação em diferentes aplicações de escala são necessários (VELJKOVIĆ et al., 2012).

5.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste capítulo visaram avaliar a influência das variáveis no processo e otimizar a produção enzimática de ésteres etílicos em sistema livre de solvente orgânico em banho de ultrassom em modo

batelada e contínuo. De forma geral, após a consecução desta etapa do trabalho, pôde-se verificar que as estratégias utilizadas visando à produção enzimática de ésteres etílicos apresentaram potencialidade para serem aplicadas em diferentes sistemas reacionais. Tratando-se de um sistema novo sob investigação, o estudo realizado utilizando a metodologia do planejamento experimental mostrou relevância na avaliação do efeito das variáveis significativas do processo. O estudo cinético foi de fundamental importância para o melhor entendimento do processo.

O processo contínuo de produção de biodiesel demonstrou um comportamento instigador especialmente para a reação de transesterificação e apontou uma alternativa muito promissora para a reação de esterificação.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1 CONCLUSÕES

Produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em modo batelada:

- Na primeira etapa do trabalho pode-se concluir que as imagens de MEV demonstraram que o ultrassom pode vir a atacar o suporte da enzima, não danificando, no entanto, sua estrutura, refletida na medida da atividade enzimática.
- No estudo cinético prévio (destrutivo), a conversão de ésteres etílicos foi de 75,15% em 1 hora, e 87,96% em 4 horas. Analisando os resultados obtidos, conclui-se que não é viável realizar os experimentos em um tempo maior (4 horas) de reação, já que em 1 hora o resultado não é muito diferente do que em 4 horas, então, torna-se viável trabalhar com um tempo menor (1 hora).
- No planejamento proposto por Plackett & Burman a conversão máxima (75,15% de ésteres etílicos) foi encontrada na condição de 70 °C, razão molar 1:3 (óleo/etanol), potência 52,80 W e 20% de enzima (p/p em relação à massa de substratos), e com um tempo de 1 hora de reação, apenas as variáveis temperatura e concentração de enzima apresentaram efeito significativo positivo.
- Os resultados da produção de biodiesel em sistema de ultrassom livre de solvente orgânico com enzima *Novozym 435* como biocatalisador, foi otimizado e mostraram uma perspectiva promissora para o uso da técnica, atingindo rendimentos de 85,70% em ésteres obtidos em condições brandas de operação, irradiação de energia (~ 132 W), 27% de concentração de enzima (em relação a massa de substrato), temperatura (63 °C), em um tempo de reação relativamente curto (1 h).
- A reutilização da enzima mostrou-se interessante para o campo da catálise enzimática, evidenciando o comportamento complexo das

lipases. A enzima *Novozym 435* manteve atividade durante 2 ciclos, perdendo a sua atividade a partir do terceiro ciclo.

Produção de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em modo contínuo:

Reação de transesterificação

- A melhor condição foi obtida para a razão molar (óleo: etanol) 1:3, 61,60 W, vazão de alimentação de 0,5 mL/min, com uma conversão máxima de 98,62% em 54 minutos, porém ocorre formação e acúmulo de glicerol, fazendo com que ocorra inibição do catalisador.
- A passagem de solvente orgânico para remoção do glicerol formado não foi eficiente ao processo.
- O estudo realizado com o óleo de macaúba apresentou conversões satisfatórias levando em consideração que a convertibilidade máxima do óleo utilizado era de 75,04%.
- A potência do ultrassom não exerceu influência sobre a conversão em ésteres e, em relação ao álcool utilizado, o etanol apresentou melhor desempenho.

Reação de esterificação

- A potência do ultrassom não exerce influência sobre a conversão em ésteres.
- A reação é altamente estável sendo que foi possível manter a produção por 48 horas com uma conversão de aproximadamente 90% em ésteres etílicos para a razão molar (carga ácida:etanol) 1:3, 0 W de potência, vazão de 0,5 mL/min e 65 °C de temperatura.
- Com o aumento da razão molar, tabalhando com 1:6 (carga ácida:etanol), vazão de 2,5 mL/min, 0 W e 61,60 W obteve-se uma conversão de 97,86% em ésteres etílicos em um tempo de apenas 6 minutos, esta conversão foi mantida durante o estudo realizado de 1 hora, como a estabilidade da reação já foi provada com 48 horas de

reação, acredita-se que é possível também manter esta conversão por um período maior do que o estudado.

Comparando a produção de biodiesel em batelada e em reator contínuo, pode-se concluir que o método contínuo é efetivamente melhor do que o modo em batelada e em relação à reação de transesterificação e esterificação empregadas no processo comprovou-se, com este estudo, que a reação de esterificação apresentou vantagens sobre a reação de transesterificação, sendo que com um ácido graxo vegetal (chamado neste trabalho de carga ácida) foi possível obter e manter conversões satisfatórias por um período de 48 horas, ao aumentarmos a razão molar (carga ácida:etanol) utilizada no processo para 1:6 as conversões foram de 97,86% em um tempo reacional extremamente pequeno com emprego de 61,60 W e sem utilização de potência ultrassônica superando assim todos os demais resultados obtidos neste trabalho, diante deste fato comprovou-se a viabilidade do processo para emprego industrial.

6.2 SUGESTÕES

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

- Avaliação de outras lipases para a síntese de ésteres etílicos, incluindo enzimas não comerciais.
- Estudar a produção de ésteres etílicos a partir de outros óleos vegetais.
- Realizar uma investigação mais aprofundada sobre a produção de biodiesel em modo contínuo utilizando o óleo de macaúba, variar a razão molar e o álcool.
- Propor metodologia para viabilizar o reuso da enzima por vários ciclos.
- Modelagem cinética dos dados experimentais obtidos.
- Construção de um reator contínuo, mas em série, para tentar remover o glicerol formado e acumulado durante o processo.
- Estudo da reação de esterificação da carga ácida com outros álcoois e variando a razão molar.

- Associar a produção de biodiesel em banho de ultrassom com condições supercríticas de pressão, e uso de co-solventes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AKGUN, N.; IYSCAN E. **Effects of process variables for biodiesel production by transesterification**. European Journal of Lipid Science and Technology, v. 109, p. 486- 492, 2007.

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

ALVES, R.F.; GUIMARÃES, S.M.; ABREU T. C.; SILVA, R. D. Índices de Acidez Livre e de Peróxido. **Relatório para a Disciplina de Bioquímica**, Curso Técnico de Química Industrial, Centro de Educação Profissional Hélio Augusto de Sousa, São José dos Campos, SP, 2009.

ANP: **Agência Nacional de Petróleo**. www.anp.gov.br. Acessado em janeiro de 2011.

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

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

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

ARANDA, D. A. G.; SANTOS, R. T. P.; TAPAÑES, N. C. O.; RAMOS, A. L. D.; ANTUNES, O. A. C. **Acid-Catalyzed Homogeneous Esterification Reaction for Biodiesel Production from Palm Fatty Acids**, Catalysis Letters, v. 122, p. 20-25, 2008.

ARMENTA, R.E.; VINATORU, M.; BURJA, A. M.; KRALOVEC, J. A.; BARROW, C. J. **Transesterification of Fish Oil to Produce Fatty Acid Ethyl Esters Using Ultrasonic Energy.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 84, p. 1045–1052, 2007.

ATADASHI, I.M; AROUA, M.K.; ABDUL AZIZ, A. R.; SULAIMAN, N. M. N. **The effects of catalysts in biodiesel production: A review.** Journal of Industrial and Engineering Chemistry, v. 19, p. 14-26, 2013.

AVELLANEDA, F.; SALVADÓ, J. **Continuos transesterification of biodiesel in a helicoidal reactor using recycled oil.** Fuel Processing Technology, v. 92, p. 83-91, 2011.

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

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

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

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

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

BARROS, A. A.C.; WUST, E.; MEIER, H. F. **Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos**. Engenharia Sanitária e Ambiental, v.13, p. 255-262, 2008.

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

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

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

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

BEZBRADICA, D.; MIJIN, D.; SILER-MARINKOVIC, S.; KNEZEVIC, Z. **The *Candida rugosa* lipase catalyzed synthesis of amyl isobutyrate in organic solvent and solvent-free system: a kinetic study**, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 38, p. 11–16, 2006.

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

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

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

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

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

BRITO, J. Q. A.; SILVA, C. S.; ALMEIDA, J. S.; KORN, M. J. A.; KORN, M.; TEIXEIRA, L. S. G. **Ultrasound-assisted synthesis of ethyl esters from soybean oil via homogeneous catalysis**. Fuel Processing Technology, v. 95, p. 33–36, 2012.

BURHAM, H., RASHEED, R.A.G.A., NOOR, N.M., BADRUDDIN, S., SIDEK, H. **Enzymatic synthesis of palm-based ascorbyl esters**, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 58, p. 153-157, 2009.

BRITO, J. Q. A.; SILVA, C. S.; ALMEIDA, J. S.; KORN, M. G. A.; KORN, M.; TEIXEIRA, L. S. G. **Ultrasound-assisted synthesis of ethyl esters from soybean oil via homogeneous catalysis.** Fuel Processing Technology, v. 95, p. 33–36, 2012.

CAMARGOS DA SILVA, R. R. **Avaliação da viabilidade de se produzir biodiesel através da transesterificação de óleo de grãos de café defeituosos.** Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Escola de engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

CANTARELLI, C. **The use of immobilized yeasts in wine fermentation.** Journal of Food Science. Nº 3, p. 3-20, 1989.

CAO, W.; HAN, H.; ZHANG, J. **Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and CO₂ as co-solvent.** Process Biochemistry, v. 40, p. 3148-3156, 2005.

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

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

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

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

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

CENI, G.; LERIN, L.A.; FACCIN DE CONTO, J.; BRANCHER, C.V.; SILVA, P.C.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; OESTREICHER, E.G.; ANTUNES, O.A.C. **Optimization of 1-glycerol benzoate production by enzymatic transesterification in organic solvents**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46 p. 107–112, 2010.

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

CERNOCH, M.; HÁJEK, M.; SKOPAL, F. **Study of effects of some reaction conditions on ethanolysis of rapeseed oil with dispergation**. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 1213–1219, 2010.

CHAND, P.; CHINTAREDDY, V.R.; VERKADE, J.G.; GREWELL, D. **Enhancing biodiesel production from soybean oil using ultrasonics**. *Energy Fuels*, v. 24, p. 2010–2015, 2010.

CHANG, S.W., YANG, C.J., CHEN, F.Y., AKOH, C.C., SHIEH, C.J. **Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-ascorbyl laurate by Novozym® 435**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 56, p. 7-12, 2009.

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

CHEN, W.; YIN, Y.; CHEN, H.; WANG, Z. **Production of biodiesel by esterification of stearic acid over aminophosphonic acid resin D418.** Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 51, p. 5402-5407, 2012.

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

CINTAS, P.; MANTEGNA, S.; GAUDINO, E.C.; CRAVOTTO, G. **A new pilot flow reactor for high-intensity ultrasound irradiation, Application to the synthesis of biodiesel.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 17, p. 985-989, 2010.

CONSTANTINO, M.G.; SILVA, G.V.J.; DONATE, P.M. **Fundamentos de Química Experimental.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, Acadêmica:53, IV série, p. 270, 2004.

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

CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Cloning, **Purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2).** Enzyme and Microbial Technology, v.42, p. 381 – 388, 2008.

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

COUTINHO FILHO, U. **Contribuição ao Estudo de Hidrólise de Sacarose por Invertase Livre.** Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal de Uberlândia (UFU), 1996.

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

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

DALLA ROSSA, C. **Produção enzimática de biodiesel em modo contínuo em meio pressurizado**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC, 2009.

DALLA ROSA, C.D., MORANDIM, M.B., NINOW, J.L., OLIVEIRA, D., TREICHEL, H., OLIVEIRA, J.V. **Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids**. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5818–5826, 2009.

DALLA ROSA, C.; MORANDIM, M.B.; NINOW, J.L.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V. **Lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed propane**. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 47, p. 64–69, 2008.

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

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

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

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

DEMIRBAS, A. **Importance of biodiesel as transportation fuel.** Energy Policy, v. 35, p. 4661-4670, 2007.

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

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

DESHMANE, V. G.; GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. **Ultrasound-assisted synthesis of biodiesel from palm fatty acid distillate.** Industrial Engineering Chemistry Research, v. 48(17), p.7923–7, 2009.

DESHMANE, V.G.; GOGATE, P.R.; PANDIT, A.B. **Process intensification of synthesis process for medium chain glycerides using cavitation.** Chemical Engineering Journal, v. 145, p. 351–354, 2008.

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

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

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

ENCINAR, J. M.; GONZALEZ, J. F.; SABIO, E.; RAMIRO, M. J. **Preparation and Properties of Biodiesel from *Cynara cardunculus* L. Oil.** Industrial Engineering Chemistry Research, v. 38, p. 2927-2931, 1999.

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

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; PARDAL, A. **Transesterification of castor oil under ultrasonic irradiation conditions. Preliminary results.** Fuel Processing Technology, v. 103, p. 9–15, 2012.

ERGINER, R.; TOPPARE, L.; ALKAN, S.; BAKIR, U. **Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices.** Reactive & Funcional Polymers, v. 45, p. 227-233, 2000.

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

FAN X.; CHEN F.; WANG X. **Ultrasound-assisted synthesis of biodiesel from crude cottonseed oil using response surface methodology.** Journal of Oleo Science, v. 59, p. 235–241, 2010.

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

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

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

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.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. **Transesterification kinetics of soybean oil**. JAmOCS, v. 63, p. 1375-1380, 1986.

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

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

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

GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, SP: [s.n], 2006.

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

GERPEN, V.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. **Biodiesel Production Technology**, publicação do National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, 2004.

GEORGOGIANNI, K. G.; KONTOMINAS, M. G.; POMONIS, P. J.; AVLONITIS, D.; GERGIS, V. **Alkaline Conventional and in Situ Transesterification of cottonseed oil for the production of biodiesel**. *Energy & Fuels*, v. 22, p. 2110–2115, 2008.

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

GHANDI, N. N.; SAVANT, S. B.; JOSHI, J. B.; **Specificity of a lipase in ester synthesis: Effect of alcohol**. *Biotechnology Progress*, v. 11, p. 282 – 287, 1995.

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

GIRELLI, A.M.; MATTEI, E. **Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review**. *Journal of Chromatography B*, p. 3-16, 2005.

GOLE, V. L.; GOGATE, P. R. **A review on intensification of synthesis of biodiesel from sustainable feed stock using sonochemical reactors**. *Chemical Engineering and Processing*, v. 53, p. 1-9, 2012.

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

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

GONZALES, L. S. **Produção contínua de biodiesel por transesterificação de óleo do fruto de macaúba (*acrocomia aculeata*) e óleo de fritura em metanol e em etanol supercrítico.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC, 2012.

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

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

GÜRSEL, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; YAGGCL, Y. **Immunization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers.** Reactive & Funcional Polymers, v. 57, p. 57-65, 2003.

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

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. **Immobilization of β -galactosidase by bioaffinity adsorption on concanavalin A layered calcium alginate-starch hybrid beads for the hydrolysis of lactose from whey/milk.** International Dairy Journal, v. 19, p. 172-177, 2009.

HAJAR, M.; SHOKROLLAHZADEH, S.; VAHABZADEH, F.; MONAZZAMI, A. **Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use**

of **Novozym 435 plus loofa**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 188-194, 2009.

HALIM, S.F.A., KAMARUDDIN, A.H., FERNANDO, W.J.N. **Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies**. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 710–716, 2009.

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

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

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

HINGU, S.M.; GOGATE, P.R.; RATHOD, V.K. **Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using sonochemical reactors**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 17, p. 827–832, 2010.

HINGU, S.M., GOGATE, P.R., RATHOD, V.K. **Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using sonochemical reactors**, *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 17, p. 827 – 832, 2010.

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

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

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

HUANG, D.; JIANG, X.; ZHU, H.; FU, X.; ZHONG, K.; GAO, W. **Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters under ultrasonic irradiation.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 17, p. 352–355, 2010.

ISIK, S.; ALKAN, S. TOPPARE, L. CIANGA, I.; YAGGCL, Y. **Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2—(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices.** *European Polymer Journal*, v. 39, p. 2375-2381, 2003.

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

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

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

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

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

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.

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

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

KANITKAR, A.; BALASUBRAMANIAN, S.; LIMA, M.; BOLDOR, D. **A critical comparison of methyl and ethyl esters production from soybean and rice bran oil in the presence of microwaves.** Bioresource Technology, v. 102, p. 7896–7902, 2011.

KAPPE, O.; DALLINGER, D.; MURPHREE, S.S. **Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists.** Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, 2009.

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

KARRA-CHÂABOUNI, M.; GHAMGHI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI, Y. **Production of flavour esters by immobilized**

Sthaphylococcus simulans lipase in a solvent-free system. Process Biochemistry, v. 41, p. 1692-1698, 2006.

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

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

KELKAR, M. A.; GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B., **Intensification of esterification of acids for synthesis of biodiesel using acoustic and hydrodynamic cavitation.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 15, p. 188-194, 2008.

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

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

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

KNOTHE, G.; VON GERPEN, J.; KRAHH, J.; RAMOS, L. P. Ramos (Eds.) **Manual de Biodiesel.** São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2006.

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

KOMERS, K., SKOPAL, F., ČEĀAN, A. **Continuous biodiesel production in a cascade of flow ideally stirred reactors**. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 3772–3775, 2010.

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

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

KUMAR, G., KUMAR, D., POONAM, R., SINGH, C.P. **Ultrasonic-assisted transesterification of *Jatropha curcas* oil using solid catalyst, Na/SiO₂**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.17, p. 839-844, 2010.

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

KUMAR, G.; KUMAR, D.; POONAM; JOHARI, R.; SINGH, C. P., **Enzymatic transesterification of *Jatropha curcas* oil assisted by ultrasonication**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, p. 923-927, 2011.

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

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

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

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA, L.J.; CARRASCOSA, V.A. PESSELA, C.C.B.; GARCIA-OCHOA. **Studies on the activity and the atability of β -Galactosidases from *Thermus* sp. Strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 392-405, 2002.

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

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

LEE, J.H., KIM, S.B., PARK, C., TAE, B., HAN, S.O., KIM, S.W. **Development of batch and continuous processes on biodiesel production in a packed-bed reactor by a mixture of immobilized *Candida rugosa* and *Rhizopus oryzae* lipases.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 365–371, 2010.

LEE, S. B.; LEE, J. D.; HONG, I. K. **Ultrasonic energy effect on vegetable oil based biodiesel synthetic process.** *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 17, p. 138–143, 2011.

LERIN L. A.; RICHETTI A.; DALLAGO R.; TREICHEL H.; MAZUTTI M. A.; OLIVEIRA J.V.; ANTUNES O. A. C.; OESTREICHER E. G.; OLIVEIRA D., **Enzymatic Synthesis of Ascorbyl Palmitate in Organic Solvents: Process Optimization and Kinetic Evaluation.** *Food Bioprocess Technology*, v. 5, p. 1068-1076, 2012.

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.

LIAW, E.T.; LIU, K.J. **Synthesis of terpinyl acetate by lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide.** Bioresource Technology, v. 101 (10), p. 3320–3324, 2010.

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

LIMA, P.C.R. **O biodiesel e a inclusão social,** Consultoria legislativa – Câmara dos Deputados, Brasília, 2004.

LIMA, L.L. **Produção de biodiesel a partir da hidroesterificação dos óleos de mamona e soja.** Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2008.

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

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

LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D.E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D.A.; GOODWIN JR., J.G. **Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis.** Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 44, p. 5353-5363, 2005.

LUO, Y.; ZHENG, Y.; JIANG, Z.; MA, Y.; WEI, D. **A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution**

and biodiesel production via transesterification. Applied Microbiol Biotechnol, v. 73, p. 349-55, 2006.

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

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

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

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

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

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

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.

MAHAMUNI, N. N.; ADEWUYI, Y. G. **Optimization of the synthesis of biodiesel via ultrasound-enhanced base-catalyzed transesterification of**

soybean oil using a multifrequency ultrasonic reactor. Energy Fuels, v. 23, p. 2757 – 66, 2009.

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

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

MARCINIUK, L. L.; GARCIA, C. M.; MUTERLE, R. B.; SCHUCHARDT, U. **Produção de ésteres metílicos e etílicos de óleo de soja via catálise com fosfatos ácidos de metais trivalentes.** In: Anais do 14º Congresso Brasileiro de Catálise, Porto de Galinhas-PE, Set. 2007.

MARJANOVIC, A.V.; STAMENKOVIC, O.S.; TODOROVIC, Z.B.; LAZIC, L.M.; VELJKOVIC, V.B. **Kinetics of the base-catalyzed sunflower oil ethanolysis.** Fuel, v. 89, p. 665–671, 2010.

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

MARTINEZ, M.; VICENTE, G.; ARACIL, J.; ESTEBAN, A. **Kinetics of Sunflower oil methanolysis.** Industrial Engineering Chemistry Research, v. 44, p. 5447-5454, 2005.

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

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

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

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

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 Processing Technology, v.89 p. 1818-1825, 2010.

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

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

MUNIYAPPA, P. R.; BRAMMER, S. C.; NOUREDDINI, H. **Improved Conversion of Plant Oils and Animal Fats into Biodiesel e Co-product.** Bioresource Technology, v. 56, p. 19 -24, 1996.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. M. **Biotransformação de óleos e gorduras: Utilização de lípases para obtenção de biocombústíveis.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 33, p. 27-38, 2004.

NAVARRO-DÍAZ, H.J.; GONZALEZ, S. L.; IRIGARAY, B.; VIEITEZ, I.; JACHMANIÁN, I.; CARCIOFI, B. A. M.; OLIVEIRA, J. V. **Macauba oil as an alternative feedstock for biodiesel: characterization and conversion to biodiesel by the supercritical method.** III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids Cartagena de Indias (Colombia), 2013.

NELSON, L. A.; FOGLIA, A.; MARMER, W. N. **Lipase-catalyzed production of biodiesel.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 73, pp. 1191-1195, 1996.

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

NINI, L.; SARDA, L.; LOUIS-CLAUDE, C.; BOITARD, E.; JEAN-PAUL, D.; CHAHINIAN, H. **Lipase catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1534, p. 34-44, 2001.

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

NOUREDDINI, H.; ZHU, D. **Kinetics of transesterification of Soybean Oil.** JAOCS, v. 74, p. 1457-1461, 1997.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JUGOVIC, Z. K., **Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability.** Bioresource Technology. v.100, p. 5146-5154, 2009.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Kinetics of the enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO₂**. Industrial Engineering Chemistry Research, v. 39, p. 4450, 2000.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V., **Enzymatic Alcoholysis of Palm Kernel Oil in n-hexane and in SCCO₂**. The Journal of Supercritical Fluids, v. 19, n. 2, p. 141 - 148, 2001.

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

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

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

OLIVEIRA, D.; NASCIMENTO FILHO, L.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C. D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; AMROGINSKI, C.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. **Kinetics of Enzyme-catalyzed alcoholysis of soybean oil in n-hexane**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121-124, p. 231-241, 2005 (b).

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

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

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

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

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

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

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

PARK, J.Y.; WANG, Z.M.; KIM, D. K.; LEE, J. S. **Effects of water on the esterification of free fatty acids by acid catalysts.** Renewable Energy, v. 35, p. 614–618, 2010.

PATEL, A.; BRAHMKHATRI, V.; SINGH, N. **Biodiesel production by esterification of free fatty acid over sulfated zirconia.** Renewable Energy, v. 51, p. 227-233, 2013.

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

PINNARAT, T.; SAVAGE, P. **Assessment of non-catalytic biodiesel synthesis using supercritical reaction conditions**. *Industrial Engineering Chemistry Research*, v. 47, p. 6801- 6808, 2008.

PINTO, A. C.; GUARIEIROA, L. L. N.; REZENDEA, M. J. C.; RIBEIROA, N. M.; TORRES, E. A.; LOPESC, W. A.; PEREIRAC, P. A. P.; ANDRADE, J. B. **Biodiesel: An Overview**. *Journal of Braziliam Chemical Society*, v. 16, p. 1313-1330, 2005.

PRIMO M. S.; CENI G. C.; MARCON N. S.; ANTUNES O. A. C.; OLIVEIRA D.; OLIVEIRA J. V. *et al.* **Effects of compressed carbon dioxide treatment on the specificity of oxidase enzymatic complexes from mate tea leaves**. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 43, p. 283–290, 2007.

RAHMAN, M. B. A.; JUMBRI, K.; HANAFIAH, N. A. M. A.; ABDULMALEK. E.; TEJO, B. A.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. **Enzymatic esterification of fatty acid esters by tetraethylammonium amino acid ionic liquids-coated *Candida rugosa* lipase**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 79, p. 61– 65, 2012.

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

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

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

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

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

RIBEIRO, E. J. **Estudo Cinético da hidrólise de sacarose por invertase livre e imobilizada**. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Univerdade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), 1989.

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

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

RODRIGUES, S.; MAZZONE, L.C.A.; SANTOS, F.F.P.; 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.

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

ROSSI, L. F. S.; COSTA NETO, P. R.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. **Produção de Biocombustível Alternativo ao Óleo Diesel Através da Transesterificação de Óleo de Soja Usado em Frituras**. Química Nova, v. 23(4), p. 531-537, 2000.

RUIZ-MÉNDEZ, M. V.; MARMESAT, S.; LIOTTA, A.; DOBARGANES, M. C. **Analysis of used frying fats for the production of biodiesel**. Grasas y aceites. v. 59. n.1, p. 45-50, 2008.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 1-9, 2004.

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

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

SANTOS, F.F.P.; RODRIGUES, S.; FERNANDES, F.A.N. **Optimization of the production of biodiesel from soybean oil by ultrasound assisted methanolysis**. Fuel Processing Technology, v. 90, p. 312–316, 2009.

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

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

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

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

SÉVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; MONSAN, P.; MARTY, A. **Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil.** Bioresource Technology, v. 102, p. 4954–4961, 2011.

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

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

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

SHARMA, Y.C., SINGH, B., **Development of biodiesel from karanja, a tree ound in rural India.** Fuel Processing Technology, v. 87 n° 8 e 9, p. 1740–1742, 2008.

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

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, p. 789-793, 1999.

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

SILVA, N. L.; GARNICA, J. A. G.; BATILTELLA, C. B.; MACIEL, M. R. W.; MACIEL FILHO, R. **Use of experimental design to investigate biodiesel production by multiple-stage Ultra-Shear reactor**. Bioresource Technology, v. 102, p. 2672–2677, 2011.

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

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

SRIVASTAVA, S.; MADRAS, G.; MODAK, J. **Esterification of myristic acid in supercritical carbon dioxide**. Journal of Supercritical Fluids, 27, p. 55-64, 2003.

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

SOLOMONS, T.W.G. & FRYHLE, C. **Química Orgânica**, 7^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

SU, E.; YOU, P.; WEI, D. **In situ lipase-catalyzed reactive extraction of oilseeds with short-chained dialkyl carbonates for biodiesel production.** *Bioresource Technology*, 100 (23), p. 5813–5817, 2009.

SUBRAMANIAN, K.A.; SINGAL, S.K.; SAXENA, Mukesh; SINGHAL, Sudhir. **Utilization of liquid biofuels in automotive diesel engines: An Indian perspective.** *Biomass and Bioenergy*, v. 29, p. 65-72, 2005.

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

STANDARD UNE-EN 14103. **Fat and oil oil derivatives: Fatty Acid Methyl esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents.** Asociación Española de Normalización y Certificación, Madrid, 2003.

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

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

STAVARACHE, C.; VINATORU, M.; MAEDA, Y. **Aspects of ultrasonically assisted transesterification of various vegetable oils with methanol.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 14, p. 380-386, 2007a.

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

SKORONSKI, E. **Estudo Cinético da Síntese do Octanoato de n-Pentila Catalisada pela Enzima Lipozyme TL IM**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

TALEBIAN-KIAKALAIEH, A.; AMIN, N.A.S.; MAZAHERI, H. **A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil**. Applied Energy, v. 104, p. 683–710, 2013.

TALUKDER, M.; WU, J.; VAN NGUYEN, T.; FEN, N.; MELISSA, Y. **Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: comparison of methanolysis methods**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 60 (3–4), p.106–112, 2009.

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

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, v. 90, p. 1164–1166, 2009.

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

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

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

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

TRENTIN, C. M. **Estudo da cinética de transesterificação não-catalítica de óleo de soja com co-solvente em reator micro tubo.** Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2010.

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

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

VIANNA, F.C. – **Análise de ecoeficiência: avaliação do desempenho econômicoambiental do biodiesel e petrodiesel** - Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2006.

VICENTE, A.A. **Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica.** 2000. 224 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

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

VIEITEZ, I; IRIGARAY, B.; CASULLO, P.; PARDO, M. J.; GROMPONE, M. A.; JACHMANIAN, I. **Effect of free fatty acids on the efficiency of the supercritical ethanolysis of vegetable oils from diferente origins.** Fuel, v. 26, p. 1946-1951, 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 of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 9, p. 113-148, 2000.

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

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

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

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

VITOLLO, M.; Imobilização de Enzimas. IN: Lima, U.A.; Aquarone, E.; Brozani, W.; Schimidell, W.; **Biotechnologia Industrial, Processos Fermentativos e Enzimáticos.** São Paulo, SP: Edgard Blücher Ltda, v.3, p. 391-403, 2001.

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

XUE, F.; ZHANG, X.; LUO, H. TAN, T. **A new method for preparing raw material for biodiesel production**. Process Biochemistry, v. 41, p. 1644 – 1702, 2006.

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

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

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***. Processes Biochemistry, v. 45, p. 519–525, 2010.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; **Enzimas imobilizadas in: Enzimas como agentes biotecnológicos**. Said, S. & Pietro, R. C. L. R., Ed. Legis Summa. 2004.

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

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

ZHANG, Y., STANCIULESCU, M., IKURA, M. **Rapid transesterification of soybean oil with phase transfer catalysts**. Applied Catalysis A: General, v.366, p. 176-183, 2009.

ZHANG, H.; DING, J.; QIU, Y.; ZHAO, Z. **Kinetics of esterification of oil with different alcohols by a cation ion-exchange resin/polyethersulfone hybrid catalytic membrane**. Bioresource Technology, v. 112, p. 28-33, 2012.

ZHU, K.; LIU, H.; HAN, P.; WEI, P. **Study of ultrasound-promoted, lipase-catalyzed synthesis of fructose ester**. Frontiers of Chemical Engineering in China, v. 4, p. 367-371, 2010.

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, X., DOU, P., ZHAO, P., ZHAO, C., DING, Y., XU, P. **Immobilization of lipases onto magnetic Fe₃O₄ nanoparticles for application in biodiesel production**. Chem. Sus. Chem. v. 2, p. 947–950, 2009.

WANG, X.; LIU, X.; ZHAO, C.; DING, Y.; XU, P. **Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase–nanoparticle biocomposite**. Bioresource Technology, v. 102, p. 6353 – 6355, 2011.

WU, W. H., FOGLIA, T. A., MARMER, W. M., PHILLIPS, J. G. **Otimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology**. Ibid., v. 76, p. 517-521, 1999.

WU, P.; YANG, Y.; COLUCCI, J.A.; GRULKE, E.A. **Effect of ultrasonication on droplet size in biodiesel mixtures**. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 84, p. 877-884, 2007.

(<http://www.petrobras.com.br>)

(www.biodiesel.gov.br)

(<http://www.biodieselbr.com>)

APÊNDICE A – ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Neste apêndice é apresentada a metodologia de cálculo adotada para determinação do teor em termos de ésteres de ácidos graxos.

Ésteres de Ácidos Graxos

Em relação ao método cromatográfico utilizado para quantificação dos ésteres de ácidos graxos utilizou-se o método conforme a norma EN 14 103 (2003). Sendo que o mesmo consiste na injeção de amostras em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG/FID Shimadzu modelo GC 2010) equipado com injetor automático AOC-20i e uma coluna capilar RTX - Wax (30m x 0,25 mm x 0,25 mm), com as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial da coluna de 120 °C, permanecendo por 1 minuto nesta condição, aumentando-se a temperatura a uma taxa de 15 °C/minuto até 180 °C, permanecendo assim por 2 minutos, e aumentando novamente a uma taxa de 5 °C/min até 250 °C permanecendo 2 minuto nesta condição. Ar sintético e nitrogênio era utilizados como gás de arraste e a temperatura do injetor e detector eram 250 °C e a taxa de split de 1:50.

As amostras referentes a cada experimento foram preparadas em triplicata conforme descrito no capítulo de materiais e métodos. Utilizou-se a mesma metodologia de preparo das amostras para análise descritas por Sliva (2009), realizou adaptação da EN 14 103 (2003), devido ao alto consumo de padrão interno indicado pela normativa. As adaptações em relação ao método oficial foram testadas com base a amostra de biodiesel etílico de soja obtido pelo método de catálise alcalina utilizando hidróxido de sódio como catalisador, em condições de reação otimizadas por Faccio (2004), conforme é apresentado na Tabela A.1.

Tabela A.1: Testes da metodologia de análise, referentes às amostras de biodiesel etílico de soja.

Amostra	Concentração em Ésteres (%) EN 14103	Concentração em Ésteres (%) EN 14103 adaptada	Desvio Padrão
1.1	97,6	97,3	0,21
1.2	97,5	96,8	0,49
2.1	98,2	97,54	0,46
2.2	97,8	98,2	0,28

Os resultados apresentados na Tabela A.1, confirmam a representatibilidade da metodologia utilizada no preparo das amostras para quantificação de ésteres de ácidos graxos, uma vez que os desvios padrões obtido em relação às diferentes metodologias foram baixos (SILVA, 2009).

Cálculos do teor de ésteres etílicos

As amostras foram preparadas após evaporação do etanol conforme apresentado no Capítulo 3. A solução preparada era então injetada em cromatógrafo gasoso em duplicata e o cálculo do teor de ésteres etílicos da amostra era obtido através da equação abaixo, com base na EN 14103 (2003):

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

onde:

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

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

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

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

De acordo com Silva (2009) a Tabela A.2 relata a composição química obtida pela derivatização do óleo de soja com BF_3/MetOH conforme AOCS (1990), o peso molecular médio do óleo de soja é de 871,91 g/gmol e 306,9 g/gmol para seus ésteres etílicos.

Tabela A.2. Composição química em ácidos graxos do óleo de soja (Marca Soya) utilizado como substrato.

Componente	Percentual médio (%)
C16:0 (ácido palmítico)	10,08±0,08
C18:0 (ácido esteárico)	3,80±0,01
C18:1 (ácido oléico)	27,70±0,02
C18:2 (ácido linoléico)	52,70±0,13
C18:3 (ácido linolénico)	5,00±0,03

Fonte: SILVA, 2009.

Desta forma, com a conversão completa da reação, para cada mol de triglicerídeo reagido, serão produzidos: 1010,9 g de produtos, dos quais 918,9g são ésteres e 92g é glicerol. Considerando a estequiometria de uma reação com 100% de conversão, cerca de 91% dos produtos correspondem à mistura de ésteres (Silva, 2009).

$$\begin{array}{l}
 1010,9 \text{ g produtos} \text{ -----} > 100\% \\
 918,9 \text{ g ésteres} \text{ -----} > X \\
 X = 91\%
 \end{array}$$

Considerando 91% da massa de amostra coletada, obtém-se a massa referente ao teor de ésteres teórico que deveriam estar presentes na amostra se a conversão da reação atingisse 100%.

$$\begin{array}{l}
 \text{massa coletada (g)} \text{ -----} > 100\% \\
 \text{massa teórica (g)} \text{ -----} > 91\% \text{ são ésteres}
 \end{array}$$

Logo, à conversão em ésteres da reação é obtida substituindo a C_{amostra} na equação pela $C_{\text{teórica}}$, deste modo:

$$\text{Conversão em Esteres}(\%) = \left(\frac{\sum A - API}{API} \frac{CPI}{C_{\text{teórica}}} \right) * 100$$

APÊNDICE B – TRABALHOS PUBLICADOS

Resumos e trabalhos completos em anais de eventos:

2011

- **Produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.** 6º Congresso Internacional de BioEnergia, Curitiba - PR.
- **Otimização do processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.** VI Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada, Salvador – BA.
- **Biodiesel enzimático em sistema livre de solvente e banho de ultrassom.** III Semana de Ciências Agrárias, XII Semana Acadêmica do Curso de Engenharia Agrícola. IV Semana Acadêmica do Curso de Agromonia e XVI Semana Acadêmica do Curso de Engenharia de Alimentos, Erechim – RS.
- **Avaliação da produção de biodiesel supercrítico em reator tubular a partir de óleo de soja e etanol.** III Semana de Ciências Agrárias, XII Semana Acadêmica do Curso de Engenharia Agrícola, IV Semana Acadêmica do Curso de Agromonia e XVI Semana Acadêmica do Curso de Engenharia de Alimentos, Erechim – RS.

2011 Trabalho destaque:

2º lugar na área de Engenharia de Alimentos - VII Simpósio de Alimentos para a região Sul.

- **Avaliação preliminar da produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em ultrassom.** VII Simpósio de Alimentos para a Região Sul, Passo Fundo – RS.

2012

- **Solvent-free enzymatic production of biodiesel in batch and continuous modes under ultrasound-assisted system.** IUFoST / World Congress of Food Science and Technology, Foz do Iguaçu – PR.
- **Produção de carotenoides em batelada alimentada por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator.** 4º Simpósio de Segurança Alimentar, Gramado – RS.
- **Produção de biodiesel enzimático livre de solvente orgânico em modo contínuo e batelada utilizando ultrassom.** XXIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas – SP.
- **Produção de biodiesel enzimático em modo contínuo utilizando banho de ultrassom.** X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC, Blumenau – SC.
- **Produção de biodiesel enzimático a partir da transesterificação do óleo de soja e esterificação da ácido graxo vegetal em modo contínuo utilizando banho de ultrassom.** 7º Congresso internacional de BIOEnergia, São Paulo – SP.
- **Immobilization of comercial porcine pancrea lipase in inorganic supports-activated alumina and mcm-22 zeolite.** IUFoST / World Congress of Food Science and Technology, Foz do Iguaçu – PR.
- **Estudo do efeito ultrassônico sobre a produção de biodiesel enzimático em modo batelada.** SBQ – Sul, Tubarão – SC.
- **Estudo comparativo entre o modo batelada e contínuo de produção de biodiesel enzimático livre de solvente em sistema de ultrassom.** 1º Congreso Iberoamericano de Ingenieros Alimentarios (CIIAL), Montevideu, Uruguai.
- **Efeito da concentração de enzima na produção de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.** XVII Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos e XIII Encontro de Iniciação Científica, Erechim – RS.

- **Avaliação do efeito do ultrassom sobre a enzima *Novozym 435* e produção de biodiesel enzimático em banho de ultrassom e sistema livre de solvente orgânico.** 4º Simpósio de Segurança Alimentar, Gramado – RS.
- **Avaliação da produção enzimática de biodiesel a partir de óleo de pinhão manso em sistema livre de solvente em ultrassom.** X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC, Blumenau – SC.
- **Alcoólise enzimática da produção de biodiesel em meio livre de solvente orgânico em modo batelada utilizando banho de ultrassom.** X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC, Blumenau – SC.

2013

- **Estudo da produção enzimática de biodiesel em banho de ultrassom utilizando diferentes óleos vegetais.** 6º Simpósio Nacional de Biocombustíveis, Canoas - RS.
- **Produção de biodiesel enzimático do óleo do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata*) em processo modo contínuo empregando sistema de ultrassom livre de solvente.** 6º Simpósio Nacional de Biocombustíveis, Canoas - RS.
- **Produção enzimática de ésteres etílicos em processo contínuo livre de solvente empregando óleo do fruto de macaúba em sistema de banho de ultrassom.** XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM. X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa – SHEB, Foz do Iguaçu – PR.

2013 Trabalho destaque:

Menção honrosa XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos – X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas.

- **Efeito da potência do ultrassom e da razão molar óleo/etanol sobre a produção de biodiesel enzimático em modo contínuo.** XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM. X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa – SHEB, Foz do Iguaçu – PR.

Artigos submetidos e aceitos para publicação:

Enzyme-catalyzed production of biodiesel by ultrasound-assisted ethanolysis of soybean oil in solvent-free system.

Claudia M. Trentin¹, Ariana S. Popiolki¹, Luciane Batistella¹, Clarissa Dalla Rosa¹, Helen Treichel², J. Vladimir Oliveira³, Débora de Oliveira³

^aDepartment of Food Engineering, URI - Campus de Erechim, Erechim, 99700-000, RS, Brazil

^bDepartment of Chemical and Food Engineering, UFSC, Florianópolis, 88040-900, SC, Brazil

^cFederal University of Fronteira Sul - Campus de Erechim, Erechim, 99700-000, RS, Brazil

Submetido à revista: Ultrasonics Sonochemistry

Continuous lipase-catalyzed esterification of soybean fatty acids under ultrasound irradiation

Claudia M. Trentin^a, C. Dalla Rosa^a, D. Oliveira^b, H. Treichel^c, J. Vladimir Oliveira^b

^aDepartment of Food Engineering, URI - Campus de Erechim, Erechim, 99700-000, RS, Brazil

^bDepartment of Chemical and Food Engineering, UFSC, Florianópolis, 88040-900, SC, Brazil

°Federal University of Fronteira Sul - Campus de Erechim, Erechim, 99700-000, RS, Brazil

Aceito à revista: Bioprocess Biosystems Engineering

**Produção enzimática de biodiesel em banho de ultrassom
utilizando diferentes óleos vegetais como substratos**

Claudia Mara Trentin Santin; Simone Michelin; Robison Paulo Scherer; Clarissa Dalla Rosa

Departamento de Engenharia de Alimentos, URI – Campus de Erechim, 99700-000, Erechim - RS, Brasil

Débora de Oliveira; José Vladimir de Oliveira

Departamento de Engenharia de Alimentos, UFSC, 88040-900, Florianópolis - SC, Brasil

Submetido à revista: Química Nova (QN).

Patente de invenção submetida ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI:

“Sistema e processo para hidroesterificação enzimática de óleos vegetais e gordura animal utilizando ultrassom”

Autores/inventores:

José Vladimir de Oliveira, Débora de Oliveira, Mirian Cristina Feiten, Claudia Mara Trentin Santin, Clarissa Dalla Rosa.