

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

ROBISON PAULO SCHERER

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS EM
SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE
ULTRASSOM EMPREGANDO ÓLEO DO FRUTO DE
MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*) E ÓLEO DE FRITURA
COMO SUBSTRATOS**

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

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

ERECHIM, RS
Junho de 2015

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS EM SISTEMA
LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM
EMPREGANDO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA
(*Acrocomia aculeata*) E ÓLEO DE FRITURA
COMO SUBSTRATOS**

Robison Paulo Scherer

Tese de Doutorado submetida 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:

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

Marceli Fernandes Silva, D.Sc.
(UFFS)

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

Katia Bernardo Gusmão, D.Sc.
(UFRGS)

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

Clarice Steffens, D.Sc.
(URI - Erechim)

Natália Paroul, D. Sc.
(URI - Erechim)

Erechim, Junho de 2015.

Aos meus pais Theobaldo e Gilce Scherer, minha irmã Katlin e minha namorada Eliza Freitas que sempre estiveram junto de mim, me apoiando em todos os sentidos nas horas que precisei, dando-me sempre atenção, carinho e incentivo para realização deste trabalho.

A vocês a minha gratidão por tudo.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades que me concedeu, por chegar até aqui para conclusão de mais esta etapa, apesar de todas as adversidades, pelas pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho, por estar sempre comigo e me dar forças necessárias nos momentos difíceis para continuar seguindo.

A minha família, especialmente aos meus pais, que estiveram sempre me apoiando em todos os momentos, não medindo esforços sempre que necessário para me dar uma palavra de incentivo.

A minha namorada, o meu amor que mesmo distante fisicamente esteve ao meu lado, incondicionalmente, em todos os momentos, me incentivando, me apoiando, me confortando com seu amor e seu carinho.

A minha irmã Katlin, pelos risos, pelas conversas, pelos consolos, por fazer valer a pena cada momento no decorrer desta minha caminhada.

Aos meus orientadores, Débora de Oliveira, José Vladimir de Oliveira e Clarissa Dalla Rosa, pela disponibilidade, atenção, paciência, compreensão, dedicação, generosidade em compartilhar comigo seus vastos conhecimentos, e principalmente pela amizade construída durante todos estes anos. Tive muita sorte em conhecê-los e ter suas orientações.

Aos professores dos Cursos de Engenharia de Alimentos e Química, por toda disponibilidade de tempo e ensinamentos, pelas amizades conquistadas e por repartirem comigo suas experiências de vida.

Aos amigos e colegas de mestrado e doutorado dos laboratórios de Biotecnologia e Termodinâmica pelos risos, ajudas e ideias, pelo incentivo quando tudo parecia dar errado e principalmente pela amizade.

A URI Campus de Erechim por disponibilizar suas instalações para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, 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 Doutor em Engenharia de Alimentos.

PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM EMPREGANDO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA (*Acrocomia aculeata*) E ÓLEO DE FRITURA COMO SUBSTRATOS

Robison Paulo Scherer

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

O objetivo do presente trabalho consistiu na produção enzimática de ésteres etílicos em sistema livre de solvente em banho de ultrassom em modos batelada e contínuo empregando dois lotes de óleo do fruto de macaúba e óleo de fritura derivado de soja como substratos. Realizou-se a caracterização de ambos os óleos em termos de índice de acidez e índice de peróxidos bem como a determinação de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis (MAG, DAG e TAG) a fim de determinar suas características físico-químicas. Os óleos apresentaram elevado grau de acidez e oxidação com índices de acidez de 89 e 73 mg KOH/g (Lotes 1 e 2 óleo de macaúba) e 5,37 mg KOH/g (óleo de fritura derivado de soja) e índices de peróxido de 19,78 e 14,22 meq peróxido/kg (Lotes 1 e 2 óleo de macaúba) e 0,79 meq peróxido/kg (óleo de fritura derivado de soja).

Para o óleo de macaúba em modo batelada foram realizados estudos preliminares empregando diferentes concentrações de enzima e peneira molecular, variando a razão molar óleo/etanol, a potência ultrassônica e a

temperatura, a fim de determinar as melhores condições experimentais para obtenção de ésteres etílicos. As melhores condições experimentais em modo batelada foram definidas como: razão molar óleo/etanol 1:9, temperatura 65 °C, 100% de peneira molecular (m/m), 20% da lipase Novozym 435 e potência do ultrassom (132 W). Os experimentos foram conduzidos em tempos reacionais de 0 a 360 minutos atingindo rendimento em ésteres etílicos de aproximadamente 79% em 30 minutos com o uso do banho de ultrassom. Em estudo comparativo nas mesmas condições experimentais sem o uso de potência ultrassônica rendimentos em ésteres de 60% foram obtidos, demonstrando a eficiência do emprego do ultrassom no processo.

A partir dos melhores resultados obtidos no estudo em batelada com óleo de macaúba foram selecionados os tempos de 30 e 120 minutos para avaliação dos ciclos de reutilização da enzima Novozym 435 a fim de investigar a estabilidade da lipase imobilizada sob as condições da radiação ultrassônica. Os resultados mostram que a enzima Novozym 435 manteve boa atividade durante 8 ciclos no tempo de 30 minutos de exposição perdendo gradativamente a sua atividade até atingir uma perda de 49% no oitavo ciclo. Em 120 minutos de exposição o ultrassom afetou de forma drástica a atividade da enzima com perda de aproximadamente 76% já no segundo ciclo de reuso.

Para o modo contínuo utilizando óleo de macaúba empregou-se as seguintes condições experimentais: potência ultrassônica de 154 W, vazão de alimentação do substrato óleo/etanol de 2,0 mL/min e tempo reacional variando até 78 minutos. Rendimentos de 90% em ésteres etílicos com o uso do banho de ultrassom foram obtidos em tempo reacional de 6,5 minutos. Sem o uso do ultrassom os rendimentos foram inferiores durante todo o período estudado. Ao final das reações a atividade enzimática foi determinada e os resultados comprovaram que o uso do ultrassom não interferiu na atividade da enzima, com atividade enzimática de 45,11 U/g com o uso do ultrassom (154 W) e 46,87 U/g na reação realizada apenas com agitação mecânica e temperatura.

Na sequência do estudo realizaram-se reações de transesterificação enzimática com auxílio de banho de ultrassom empregando óleo residual de fritura derivado de soja em modos batelada e contínuo. Os experimentos desta

etapa seguiram as mesmas condições experimentais empregadas anteriormente nas reações com óleo de macaúba.

No modo batelada o ultrassom conduziu a bons rendimentos em ésteres etílicos (88,5%), em um curto espaço de tempo reacional (90 minutos) quando comparado às reações apenas com o uso da temperatura e agitação mecânica. Neste mesmo período reacional a conversão em ésteres etílicos sem o uso de potência ultrassônica atingiu rendimentos de 77%.

Para o modo contínuo observou-se o mesmo comportamento dos estudos anteriores, com o uso do ultrassom conduzindo aos melhores rendimentos em ésteres etílicos durante todo o período reacional estudado quando comparado às reações realizadas sem a sua utilização (apenas com aquecimento e agitação mecânica). As maiores conversões (80 e 80,38%) foram obtidas nos primeiros tempos reacionais (13 e 19 minutos) quando empregada a tecnologia ultrassônica.

A partir destes resultados constata-se que o uso de energia ultrassônica para produção de ésteres etílicos, a partir de fontes alternativas como o óleo de macaúba e óleo residual de fritura derivado de soja, demonstra ser um processo eficiente, viável e relativamente simples, gerando economia de tempo, reagentes e energia reacional quando comparado à metodologia convencional, além de apresentar-se como um processo ambientalmente limpo ocasionando a redução de poluentes contaminantes de águas e solos.

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.

ENZYMATIC CATALYZED PRODUCTION OF ETHYL ESTERS IN SOLVENT FREE SYSTEM ASSISTED BY ULTRASOUND USING MACAUBA COCONUT OIL (*Acrocomia aculeata*) AND WASTE COOKING OIL AS SUBSTRATES

Robison Paulo Scherer

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

The objective of this work was the enzymatic production of ethyl esters in solvent-free system using ultrasound bath operated in batch and continuous modes, using Macauba coconut oil (two samples) and waste cooking oil as substrates.

The characterization of both oils in terms of acid and peroxide levels and the determination of monoacylglycerols, diacylglycerols, and triacylglycerols (MAG, DAG, and TAG) were carried out in order to determine their physicochemical characteristics. Both oils presented high acidity and peroxide levels with acidity degree of 89 and 73 mg KOH/g (samples 1 and 2 of Macauba coconut oil, respectively) and 5.37 mg KOH/g (waste cooking oil), and peroxide degree of 19.78 and 14.22 meq peroxide/kg oil (samples 1 and 2 of Macauba coconut oil, respectively) and 0.79 meq peroxide/kg oil (waste cooking oil).

For the Macauba coconut oil, preliminary studies were carried out employing different concentrations of enzyme and molecular sieve varying the

molar ratio oil/ethanol, ultrasonic power and temperature, in order to determine the best experimental conditions to obtaining ethyl esters.

The best experimental conditions were defined as: molar ratio oil/ethanol 1:9, temperature 65 °C, 100% of molecular sieve (w/w), 20% of Novozym 435 lipase and maximum ultrasound power (132 W). The experiments were carried out in reaction times from 0 up to 360 minutes, achieving yields of 79% of ethyl esters in 30 minutes using an ultrasound bath. In a comparative study, using similar experimental conditions but without ultrasound bath, 60% of yield was obtained, demonstrating the efficiency of the ultrasound in the process.

From the best obtained results in batch using the Macauba coconut oil, the times of 30 and 120 minutes were selected to evaluate the reuse of the Novozym 435 in order to explore the stability of the immobilized enzyme under ultrasonic conditions. The results showed that Novozym 435 kept the activity during 8 cycles of 30 minutes of reaction, losing gradually its activity until 49% in the eighth cycle. In 120 minutes of reaction, the ultrasound affects drastically the activity, with activity loss of 76% in the second cycle.

For continuous mode using Macauba coconut oil, the following conditions were employed: ultrasound power of 154 W, substrate flow oil/ethanol of 2 mL/min and reaction time varying up to 78 minutes. Yield of 90% in ethyl esters were obtained using ultrasound bath in 6.5 minutes of reaction. Without the ultrasound bath the yields were lower during all the studied period. At the end of the reaction the enzymatic activity was determined and the results demonstrated that the use of ultrasound do not interfered in the reaction activity, with enzymatic activity of 45.11 U/g employing the ultrasound and 46.87 U/g using only temperature and stirring.

In the sequence, enzymatic transesterification reactions were carried out with ultrasound bath using the waste cooking oil in both batch and continuous modes. The experiments of this step followed the same experimental conditions used in the reactions employing Macauba coconut oil.

In batch mode the ultrasound led to good yield in ethyl esters (88.5%) in short reaction time (90 minutes) when compared with reactions employing only

temperature and mechanical stirring. In the same reaction period, the conversion of ethyl esters without ultrasound irradiation was 77%.

For the continuous mode, the same behavior of previous studies was observed, where the ultrasound led to the best yield in ethyl esters during all reaction period studied when compared to the reactions without its utilization (only temperature and mechanical stirring). The highest yields (80 and 80.38%) were obtained in the early reaction times (13 and 19 minutes) when ultrasound irradiation was employed.

From these results, the use of ultrasound irradiation to ethyl esters production, using Macauba coconut oil and waste cooking oil as alternative substrate sources proved to be an efficient process, viable and relatively simple, saving time, reactants and reaction energy when compared to conventional methodology, besides being an environmental clean process to reduction of pollutants from water and soil.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	ix
SUMÁRIO	xii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1. OS BIOCOMBUSTÍVEIS E SUA IMPORTÂNCIA	12
3.2. BIODIESEL	15
3.3. REGULAMENTAÇÃO DO BIODIESEL.....	22
3.4. PROCESSOS DE OBTENÇÃO DO BIODIESEL	25
3.4.1. <i>Transesterificação</i>	28
3.4.2. <i>Catálise enzimática e Imobilização</i>	32
3.5. EMPREGO DO ULTRASSOM EM REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO	45
3.5.1. <i>Produção enzimática de biodiesel em ultrassom</i>	55
3.6. ÓLEO DE FRITURA COMO FONTE ALTERNATIVA PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	61
3.7. MACAÚBA [ACROCOMIA ACULEATA (JACQ.) LODD. EX MART]	69
3.8. CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	78
4. MATERIAIS E MÉTODOS	81
4.1. MATERIAIS.....	81
4.1.1. <i>Reagentes</i>	81
4.1.2. <i>Enzima</i>	82
4.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	83
4.2.1. <i>Pré-tratamento do óleo bruto do fruto de macaúba</i>	83
4.3. CARACTERIZAÇÕES DOS ÓLEOS DO FRUTO DE MACAÚBA E ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.	84
4.3.1 <i>Cromatografia gasosa (Determinação de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG))</i>	84
4.3.2 <i>Determinação do índice de acidez (IUPAC 2.201)</i>	85
4.3.3 <i>Determinação do índice de peróxido (AOAC 965.33)</i>	86
4.4. REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM MODO BATELADA	87
4.4.1 <i>Planejamento de experimentos</i>	89

4.4.2 Determinação da melhor condição experimental para o primeiro lote de óleo do fruto de macaúba.....	90
4.4.3 Quantificação do teor de água do óleo do fruto de macaúba.....	91
4.4.4 Estudo de transesterificação na melhor condição experimental para o segundo lote de óleo do fruto de macaúba e óleo residual de fritura.....	91
4.5. ESTUDO DE REUSO DO BIOCATALISADOR NOVOZYM 435.....	92
4.6. REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM MODO CONTÍNUO.....	93
4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	96
4.8. QUANTIFICAÇÃO DOS ÉSTERES ETÍLICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	97
4.9. CONVERSÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS VEGETAIS EM ÉSTERES ETÍLICOS POR TITULAÇÃO DE ÍNDICE DE ACIDEZ.....	98
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA E ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA	100
5.1.1. Determinação de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG).....	100
5.1.2. Determinação do índice de acidez, peróxido e quantificação do teor de água do óleo do fruto de macaúba e óleo residual de fritura.....	102
5.2. TESTE PRELIMINAR PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA.....	105
5.3. ESTUDO DE VARIÁVEIS DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES A PARTIR DA ETANÓLISE DE ÓLEO DE MACAÚBA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE	108
5.4. ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA NA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DO ÓLEO DE MACAÚBA.....	111
5.5. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO USO DE PENEIRA MOLECULAR NA TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA.	113
5.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE APÓS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE MACAÚBA EM ULTRASSOM.	116
5.7. DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO EXPERIMENTAL PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÓLEO DE MACAÚBA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM ULTRASSOM	117
5.7.1. ESTUDO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÓLEO DE MACAÚBA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM ULTRASSOM EM PROCESSO CONTÍNUO	120
5.8. ESTUDOS DE REUSO E ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA NOVOZYM 435	123
5.9. ESTUDOS DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM ULTRASSOM EM PROCESSOS MODO BATELADA E CONTÍNUO.....	127

5.9.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	133
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	135
6.1. CONCLUSÕES.....	135
6.2. SUGESTÕES.....	137
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
APÊNDICE A – ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	187
ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS	187
CÁLCULOS DO TEOR DE ÉSTERES ETÍLICOS	188
QUANTIFICAÇÃO DE MONO- (MAG), DI- (DAG) E TRIGLICERÍDEOS (TAG).....	189
CÁLCULOS PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MONO-, DI- E TRIGLICERÍDEOS	189
CURVAS DE CALIBRAÇÃO MONO-, DI-, E TRIGLICERÍDEOS	189

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE ALCOÓLISE DE TRIGLICERÍDEOS.	16
FIGURA 2. REAÇÕES INTERMEDIÁRIAS DA REAÇÃO DE ALCOÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS.	30
FIGURA 3. FORMAÇÃO, CRESCIMENTO E COLAPSO DA BOLHA POR CAVITAÇÃO EM ULTRASSOM.	46
FIGURA 4. EFEITO DA CONVERSÃO DE ÉSTERES METÍLICOS COM E SEM A PRESENÇA DE IRRADIAÇÃO ULTRASSÔNICA (45 °C, 7 G CATALISADOR NaOH/LITRO DE ÓLEO).....	52
FIGURA 5. EFEITO ENTRE O USO DO ULTRASSOM E PROCESSO REACIONAL COM AGITAÇÃO MECÂNICA SOBRE OS RENDIMENTOS DE METIL ÉSTER DE ÁCIDOS GRAXOS.....	54
FIGURA 6. MAPA DE REGIÕES QUE POSSUEM MAIOR OCORRÊNCIA DE PLANTAÇÕES DE MACAÚBA NO BRASIL.	70
FIGURA 7. <i>ACROCOMIA ACULEATA</i> (JACQ.) LODD. EX MART. (MACAÚBA).	72
FIGURA 8. FRUTOS DA <i>ACROCOMIA ACULEATA</i> (JACQ.) LODD. EX MART.	74
FIGURA 9. APARATO EXPERIMENTAL DE FILTRAGEM A VÁCUO DO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA.	83
FIGURA 10. FILTRAGEM DO ÓLEO DE MACAÚBA: RESÍDUO SÓLIDO DE FIBRAS PRESENTE NO ÓLEO (À ESQUERDA); ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA OBTIDO APÓS FILTRAGEM (À DIREITA).....	84
FIGURA 11. APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS EM MODO BATELADA EM BANHO DE ULTRASSOM.....	88
FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO E TRATAMENTO DA AMOSTRA ATÉ ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA.	91
FIGURA 13. APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS EM MODO CONTÍNUO E BANHO DE ULTRASSOM.....	94
FIGURA 14. RENDIMENTO EM ÉSTERES ETÍLICOS OBTIDOS NA TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE MACAÚBA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA 27% (M/M), RAZÃO MOLAR ÓLEO/ETANOL 1:3, POTÊNCIA DO ULTRASSOM 40% DO TOTAL DA CAPACIDADE DO EQUIPAMENTO (132 W) E TEMPERATURA DE 63 °C.	106
FIGURA 15. GRÁFICO DE PARETO PARA A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL UTILIZANDO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA E A LIPASE NOVOZYM 435 EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES.	110
FIGURA 16. RENDIMENTO EM ÉSTERES ETÍLICOS OBTIDOS NA TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE MACAÚBA EM BANHO DE ULTRASSOM COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LÍPASE NOVOZYM 435.....	111
FIGURA 17. CINÉTICA ENZIMÁTICA DE CONVERSÃO DE ÉSTERES DO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PENEIRA MOLECULAR EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM.....	114
FIGURA 18. CINÉTICA DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA (LOTE 2) COM E SEM O USO DE BANHO DE ULTRASSOM.	118

FIGURA 19. TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA (LOTE 2) COM E SEM O USO DE BANHO DE ULTRASSOM EM MODO CONTÍNUO.	121
FIGURA 20. ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA NOVOZYM 435 E RENDIMENTO EM ÉSTERES APÓS CADA CICLO DE 30 MINUTOS DE USO PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM NAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: 65 °C, RAZÃO MOLAR ÓLEO ETANOL 1:9, 100% DE PENEIRA MOLECULAR (M/M), 20% (M/M) NOVOZYM 435 E 100% DE POTÊNCIA MÁXIMA DO ULTRASSOM (132 W).	124
FIGURA 21. ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA NOVOZYM 435 E RENDIMENTO EM ÉSTERES APÓS CADA CICLO DE 120 MINUTOS DE USO PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE BIODIESEL EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM NAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: 65 °C, RAZÃO MOLAR ÓLEO ETANOL 1:9, 100% DE PENEIRA MOLECULAR (M/M), 20% (M/M) NOVOZYM 435 E 100% DE POTÊNCIA MÁXIMA DO ULTRASSOM (132 W).	125
FIGURA 22. PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DERIVADOS DE ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA COM E SEM O USO DE BANHO DE ULTRASSOM EM MODO BATELADA.	128
FIGURA 23. PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DERIVADOS DE ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA COM E SEM O USO DE BANHO DE ULTRASSOM EM MODO CONTÍNUO.	130
FIGURA A1. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA MONOLEÍNA... ..	191
FIGURA A2. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DIOLÉINA... ..	191
FIGURA A3. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA TRIOLEÍNA... ..	192

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM ÓLEOS VEGETAIS E GORDURAS.	19
TABELA 2. DIFERENTES MÉTODOS PARA PRODUÇÃO DE BODIESEL.....	27
TABELA 3. VANTAGENS E DESVANTAGENS DE CATALISADORES USADOS NA PRODUÇÃO DE BODIESEL.....	31
TABELA 4. COMPARATIVO DA TECNOLOGIA ENZIMÁTICA VERSUS TECNOLOGIA QUÍMICA (ALCALINA E ÁCIDA) PARA PRODUÇÃO DE BODIESEL. FONTE: (GOG ET AL., 2012).....	37
TABELA 5. PRODUÇÃO DE BODIESEL COM VÁRIAS LIPASES IMOBILIZADAS.	38
TABELA 6. COMPARAÇÃO DE MATÉRIAS PRIMAS PARA TRANSESTERIFICAÇÃO: ÓLEO DE FRITURA X ÓLEO VIRGEM E USO DE AQUECIMENTO NÃO CONVENCIONAL (ULTRASSOM) X AQUECIMENTO CONVENCIONAL (AGITAÇÃO CONVENCIONAL).	65
TABELA 7. PRODUÇÃO DE BODIESEL Á PARTIR DE ÓLEOS RESIDUAIS EMPREGANDO TECNOLOGIA DE ULTRASSOM.....	67
TABELA 8. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA POLPA E AMÊNDOA <i>IN NATURA</i> DA MACAÚBA <i>ACROCOMIA ACULEATA</i> (JACQ.) LODD. EX MART.....	75
TABELA 9. COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO ÓLEO DA POLPA E AMÊNDOA <i>IN NATURA</i> DA MACAÚBA <i>ACROCOMIA ACULEATA</i> (JACQ.) LODD. EX MART.....	76
TABELA 10. VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO 2^{4-1} PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE E EM BANHO DE ULTRASSOM.	90
TABELA 11. PORCENTAGEM DE MONOACILGLICERÓIS (MAG), DIACILGLICERÓIS (DAG) E TRIACILGLICERÓIS (TAG) NOS LOTES 1 E 2 DO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA E ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.	101
TABELA 12. RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS NO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA E ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA.	102
TABELA 13. MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^{4-1} COM 11 ENSAIOS APRESENTANDO A RESPOSTA EM TERMOS DE RENDIMENTO EM ÉSTERES ETÍLICOS (% M/M), EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM, UTILIZANDO ÓLEO DE MACAÚBA E ETANOL COMO SUBSTRATOS E NOVOZYM 435 COMO CATALISADOR.....	109
TABELA 14. PORCENTAGEM DE ÁGUA PRESENTE NO ÓLEO DE MACAÚBA APÓS REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO E RENDIMENTO EM ÉSTERES.....	116
TABELA A1. TESTES DA METODOLOGIA DE ANÁLISE, REFERENTES ÀS AMOSTRAS DE BODIESEL ETÍLICO DE SOJA..	188
TABELA A2. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE CALIBRAÇÃO DOS GLICERÍDEOS.	190

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos Graxos Livres
ANP	Agencia Nacional de Petróleo
B100	Biodisel puro
CAL B	Lipase de Candida antarctica B
CO	Monóxido de Carbono
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAG	Diacilgliceróis
GC-FID	Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama
HC	Hidrocarbonetos totais
HPAs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HPLC	Bomba de Alta Pressão para Líquidos
KOH	Hidróxido de Potássio
MAG	Monoacilgliceróis
MME	Ministério de Minas e Energia
MP	Material Particulado
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilitrifluoroacetamida
NaOH	Hidróxido de Sódio
TAG	Triacilgliceróis
URI	Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
W	Watts

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes alternativas de energias renováveis devido à possibilidade de escassez da oferta de combustíveis fósseis e a crescente preocupação com os impactos ambientais decorrente da emissão de materiais poluentes que provêm da exaustão dos combustíveis derivados do petróleo, têm levado a pesquisas sobre diferentes fontes de combustíveis alternativos. Dentre esses combustíveis, o biodiesel se destaca em virtude do seu elevado potencial como substituto dos combustíveis fósseis, uma vez que pode ser usado puro ou na forma de misturas com óleo diesel. Além disso, o biodiesel possui características semelhantes ao diesel convencional apresentando até melhores propriedades em virtude de ser um combustível renovável, biodegradável, atóxico, livre de enxofre e compostos aromáticos (Demirbas, 2002; 2003; 2007; 2008b; Gerpen, 2005; Agarwal, 2007; Jegannathan *et al.*, 2008, Bajaj *et al.*, 2010, Hingu *et al.*, 2010, Gog *et al.*, 2012, Pal e Kachhwaha, 2013, Gharat e Rathod, 2013, Gude e Grant, 2013, Araújo *et al.*, 2013, Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2013, Özener *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2014, Aarthy *et al.*, 2014, Hindryawati e Maniam, 2015, Pukale *et al.*, 2015).

O uso de energias limpas e renováveis, mais do que uma necessidade, é uma obrigação diante do quadro alarmante apresentado pela Organização das Nações Unidas (ONU) sobre o futuro no Planeta. Além disso, os combustíveis derivados de petróleo são atualmente uma fonte global dominante das emissões de CO₂ e sua combustão apresenta-se como uma forte ameaça de impacto ambiental. Isso tem estimulado o grande interesse em possíveis substitutos para os combustíveis à base de petróleo (Pal e Kachhwaha, 2013, Özener *et al.*, 2014).

O biodiesel representa uma alternativa essencial para atender à crescente demanda energética da sociedade moderna de forma sustentável, visando também minimizar os impactos ambientais causados pela emissão de gases poluentes (Ramos *et al.*, 2011). O biodiesel é chamado assim porque é derivado a partir de fontes biológicas e corresponde ao desempenho de

combustão semelhante e até superior ao diesel derivado de petróleo (Pal e Kachhwaha, 2013).

Definido como uma mistura de monoalquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa o biodiesel é derivado de fontes renováveis lipídicas, tais como óleo vegetal ou gordura animal que podem ser utilizados nos motores de ignição por compressão, com poucas ou nenhuma modificação. O método mais usual para transformar o óleo em biodiesel é o processo de transesterificação, que pode ser realizado na presença de um álcool (metanol ou etanol) usando diferentes sistemas catalíticos, tais como: alcalino, ácido e enzimático (Demirbas, 2002; Leung *et al.*; 2010; Lam *et al.*; 2010).

A reação de transesterificação é um processo reversível e o excesso de álcool desloca o equilíbrio no sentido dos produtos. Existem basicamente dois métodos de transesterificação, que são com catalisador e sem uso de catalisador, sendo que a utilização de diferentes tipos de catalisadores podem melhorar a conversão e o rendimento de biodiesel (Tabelian-Kiakalaieh *et al.*, 2013).

É conhecido que os óleos vegetais são candidatos como combustíveis alternativos para os motores a diesel, por apresentarem um elevado poder calorífico. Entretanto, o uso direto destes óleos vegetais nos motores conduz a vários problemas devido a sua elevada viscosidade. O processo de transesterificação torna o óleo resultante (biodiesel) menos viscoso que o óleo cru. Essa diminuição da viscosidade evita a ocorrência de problemas operacionais nos motores diesel, como, principalmente, o acúmulo de material em partes do motor (Pereira, 2009).

A transesterificação é uma reação reversível que ocorre em três etapas reacionais com formação de produtos intermediários. O primeiro passo é a conversão de um triglicerídeo a um diglicerídeo, seguido pela conversão de um diglicerídeo a monoglicerídeo e de monoglicerídeo para glicerol, gerando uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada fase da reação (Rodrigues, 2009).

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).

Em relação ao sistema catalítico empregando enzimas, mais especificamente as lipases, uma atenção maior vem sendo dada a estes biocatalisadores. 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 *et al.*, 2004). Estas são geralmente consideradas biocatalisadores eficazes devido à elevada atividade específica pelo substrato, pelo baixo impacto ao ambiente, afinidade ao grupo funcional e estereoseletividade. Além do que, sabe-se que as reações químicas podem ser conduzidas diretamente usando lipases em meio orgânico (Oliveira *et al.*, 2006).

As lipases têm excelente atividade catalítica e estabilidade em meios não aquosos, e sua especificidade, regioseletividade e enantioseletividade podem ser utilizadas com sucesso para muitas aplicações em síntese orgânica, incluindo a resolução cinética e síntese assimétrica como também a catálise de reações do álcool com óleos vegetais e gordura animal (Lee *et al.*, 2002).

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. Dessa forma, particular atenção tem sido dedicada ao uso de lipases como biocatalisadores para a produção de biodiesel, devido à sua favorável taxa de conversão obtida em condições amenas e etapas de downstream relativamente simples para a purificação do biodiesel e subprodutos gerados resultando em um processo ambientalmente compatível (Tan *et al.*, 2010, Gog *et al.*, 2012). 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).

A maior parte das pesquisas sobre a transesterificação enzimática 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) e/ou fazendo uso da imobilização enzimática em suportes (Celite e polímeros, principalmente) (Watanabe *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2004; Antczak *et al.*, 2009; Dalla Rosa, 2009; Dizge *et al.*, 2009; Bajaj *et al.*, 2010, Yu *et al.*, 2010; Lam *et al.*, 2010, Tan *et al.*, 2010, Batistella, 2012; Michelin, 2013; Trentin, 2013, Gharat e Rathod, 2013, Aarthy *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2014, Trentin *et al.*, 2014).

O principal interesse em utilizar uma enzima imobilizada é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação a sua forma livre (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Além disso, o biocatalisador imobilizado pode ser facilmente recuperado e reutilizado em reações futuras. Dessa forma, a alcoólise de triglicerídeos com uma lipase imobilizada pode ser considerada uma reação interessante para a produção de biodiesel (Balat *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2010, Gharat e Rathod, 2013).

Visando eliminar o problema associado à utilização de solventes orgânicos para a eficiente transesterificação de óleos e gorduras, uma tecnologia para melhoria deste processo vem ganhando destaque. A tecnologia ultrassônica tem sido reconhecida como um método eficaz para aumentar a taxa de transferência de massa entre fases imiscíveis líquido-líquido no interior de um sistema heterogêneo. Por isso, esta técnica tem sido amplamente utilizada em várias reações químicas e biológicas para melhorar o rendimento dentro de um tempo de reação mais curto (Ji *et al.*, 2006).

A reação de transesterificação envolve duas fases imiscíveis, onde a fase menos densa apresenta o catalisador dissolvido em álcool e a segunda contém o óleo. A agitação vigorosa é necessária para aumentar a área de contato entre as duas fases produzindo velocidades significativas de reação e altas conversões de produto (Stavarache *et al.*, 2005, 2006).

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

reação, reduzem a quantidade de reagentes e aumentam o rendimento e a seletividade da reação (Yu *et al.*, 2010, Hingu *et al.*, 2010, Gole e Gogate, 2012, Gude e Grant, 2013).

O colapso das bolhas geradas pela cavitação perturba o limite de fase entre as fases imiscíveis causando emulsificação do sistema, ocasionada pelas ondas vibracionais do ultrassom que embatem um líquido contra o outro. Assim, este dispositivo pode ser utilizado como uma fonte para eliminar as limitações de transferência de massa associada à síntese de biodiesel utilizando-se óleos vegetais (Stavarache *et al.*, 2005, 2006)

Tem sido relatado que o ultrassom exerce um efeito significativo sobre a transesterificação enzimática. A irradiação do ultrassom pode ser um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima aumentando a velocidade da reação, assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura da proteína aumentando a sustentabilidade e a atividade catalítica da enzima (Liu *et al.*, 2008, Gharat e Rathod, 2013).

Além disso, com o uso de baixas frequências e entradas de energia ideais o ultrassom mostrou-se ser eficaz em operações biológicas, como ruptura da célula microbiana, desinfecção microbiana e tratamentos de efluentes biológicos (Gogate e Kabadi, 2009).

As ondas de ultrassom podem interferir nas características da enzima, alterando sua estrutura em resposta à perturbação dinâmica provocada pelo ultrassom. O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do micro-ambiente em função do efeito cavitacional (Babiczy, 2009).

Diferente da tradicional inativação das enzimas em temperaturas elevadas, o processo de sonicação não desnatura o sítio ativo das enzimas, entretanto, forças de cisalhamento que ocorrem no fluido durante a irradiação do ultrassom podem ter um papel significativo na inativação da enzima (Özbek e Ülgen, 2000).

No entanto, até o presente momento não se conhece o verdadeiro potencial do ultrassom. Porém, o efeito do ultrassom de baixa energia em

processos bioquímicos e biotecnológicos tem atraído grande atenção nos últimos anos onde trabalhos encontrados na literatura (Shah e Gupta, 2008, Tinkov *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2008, Yu *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010) sugerem que a energia liberada pelo ultrassom durante os fenômenos de cavitação pode ser utilizada para melhorar a transferência de massa (substrato / enzima), aumentando assim a taxa de velocidade de formação de produtos, e também contribuir para o aumento da atividade catalítica da enzima.

A consecução de reações enzimáticas em ultrassom pode ser considerada uma tecnologia relativamente nova, não havendo muitos estudos acerca do comportamento das enzimas neste sistema. Em alguns casos, nas aplicações com enzimas, o ultrassom tem mostrado um aumento na estabilidade e atividade catalítica da enzima, bem como a longevidade dos biocatalisadores enzimáticos (Rokhina *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, o ultrassom tem sido utilizado em processos enzimáticos, tais como a produção de ésteres com as características desejáveis para as indústrias farmacêutica, cosmética, e alimentar, bem como em processos de hidrólise e glicerólise de óleos vegetais, produção de biodiesel, etc (Lerin *et al.*, 2014)

Até o presente momento, apenas a Novozym 435, uma lipase comercial preparada da *Candida antarctica* imobilizada em resina poliacrílica, foi testada em estudos para reação de transesterificação de óleo de soja e resíduos de óleos com índice de acidez elevados utilizando ultrassom. (Veljkovic *et al.*, 2012). Trabalhos da literatura (Wang *et al.*, 2007; Sinisterra, 1992; Lin *et al.*, 1995, Yu *et al.*, 2010, Kumar *et al.*, 2011, Gharat e Rathod, 2013) relatam que a atividade da enzima Novozym 435 nas reações de transesterificação é aumentada pela irradiação do ultrassom.

Aliado ao desenvolvimento e aplicação de técnicas alternativas para a produção de biodiesel, a escolha da fonte oleaginosa a ser utilizada como substrato para este fim também apresenta fundamental importância para a viabilidade técnica e econômica do processo.

Atualmente, 90% do biodiesel produzido no país é obtido a partir do óleo extraído da soja virgem. Com a crescente demanda da produção de

biodiesel visando esta ser uma tecnologia limpa e renovável, a busca por fontes alternativas produtoras de óleos que venham a complementar a cadeia produtiva do biodiesel se faz necessária (Biodiesel BR, 2012).

Neste sentido, na comercialização do biodiesel de óleo vegetal comestível existe um importante obstáculo, o seu elevado custo de produção devido ao maior custo da matéria prima (Demirbas e Balat, 2006; Canakci, 2007; Lam *et al.*, 2010). Comparado ao diesel derivado do petróleo, o alto custo para produção do biodiesel é uma grande barreira para a sua comercialização. O custo é de aproximadamente 1,5 vezes maior que do diesel à base de petróleo, dependendo do tipo de óleo utilizado como matéria-prima (Prokop, 2002; Demirbas, 2008).

Assim, um grande desafio econômico na matriz energética para a comercialização de biodiesel é o custo elevado de óleos vegetais na sua forma purificada, o que neste caso, representa um custo global entre 70 e 85% da produção de energia através do uso destas matérias primas (Haas e Foglia., 2005).

Dias *et al.* (2008) mencionam que a utilização desses óleos virgens para produção de biodiesel é controverso, devido ao seu consumo doméstico. Por essa razão existem estudos alternativos para produção de biodiesel com a utilização de óleos de frituras e gorduras animais.

A utilização de resíduos de óleos como matéria prima para processo de obtenção de biodiesel apresenta vantagens, como: não competir com o alimento comercializado, recicla resíduos que poderiam ter destino inadequado, redução de custo do processo pelo baixo custo da matéria prima e menor impacto ao meio ambiente (Hindryawati e Maniam, 2015, Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2013, Araújo *et al.*, 2013, Gude e Grant, 2013, Maddikeri *et al.*, 2013).

Além disso, o uso de uma matéria prima de baixo custo como óleo de fritura derivado de soja agredado a tecnologia de ultrassom mostra-se como uma alternativa promissora na conversão de ésteres demonstrando ser um processo eficiente com elevados rendimentos, viável e relativamente simples gerando economia de tempo, reagentes e energia, além de apresentar-se como um processo ambientalmente limpo melhorando a redução de poluentes

gerados pelo processo de combustão de motores á diesel (Hingu *et al.*, 2010, Lin *et al.*, 2012, Pal e Kachhwaha, 2013, Gude e Grant, 2013, Pukale *et al.*, 2015, Hindryawati e Maniam, 2015).

Outra fonte promissora para produção de biodiesel é a palmeira de macaúba que apresenta grande potencial para esta aplicação devido a sua elevada produção de óleo e composição química favorável à produção de biodiesel. Isso se deve ao alto teor de ácido oléico presente no óleo derivado da polpa, podendo chegar de 66-70%, dependendo do clima e das características de solo onde a palmeira é cultivada (Hianne *et al.*, 2005).

A polpa da macaúba pode ser utilizada na produção de rações e tônicos capilares, e o seu óleo, além de apresentar-se como uma fonte promissora na utilização para o fabrico de biodiesel, também possui em sua composição propriedades anti-inflamatórias. A amêndoa da macaúba tem usos potenciais na alimentação humana e animal, e o óleo da castanha tem inúmeras aplicações industriais, tais como bioquerosene e produção sabonetes e cosméticos. Estas características podem ser usadas para direcionar os produtos e coprodutos do processamento do óleo da macaúba de acordo com os seus melhores usos: energia, alimentos, cosméticos, etc (Machado *et al.*, 2015).

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira oleaginosa nativa do Cerrado brasileiro, localizada principalmente no centro do país nas regiões de Minas Gerais, Goiás, São Paulo e parte do Mato Grosso do Sul. Essa palmeira apresenta um potencial para produzir até 30 toneladas de frutos/hectare/ano, apresentando teor de óleo entre 23 e 34% em peso seco (Moura *et al.*, 2009, Lopes e Steidle Neto, 2011; Lopes *et al.*, 2013).

Esta palmeira apresenta alta produtividade de óleo por hectare mesmo sem qualquer melhoramento genético, chegando a uma produção de cerca de 5000 kg de óleo/hectare. Outras culturas anuais apresentam rendimentos muito inferiores tais como: pinhão-manso (1000 kg óleo/hectare), girassol (890 kg óleo/hectare), mamona (1320 Kg óleo/hectare) e a soja vista como principal matéria-prima para produção de biodiesel com produção anual de 500 Kg de óleo/hectare. Com base nestes dados, essa palmácea é considerada uma das

plantas mais promissoras para obtenção de óleo para produção de biodiesel, dentre outros produtos (Nucci *et al.*, 2008; Oliveira, 2006).

Tendo como base os aspectos expostos neste capítulo, este trabalho tem como objetivo geral o estudo da produção enzimática de ésteres etílicos em sistema livre de solvente orgânico em banho de ultrassom utilizando óleo do fruto de macaúba e óleo de fritura derivado de soja como substratos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho consiste na produção enzimática de ésteres etílicos em sistema livre de solvente em banho de ultrassom nos processos modo batelada e contínuo utilizando óleo do fruto de macaúba e óleo de fritura como substratos.

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

Caracterização parcial do óleo do fruto da macaúba e óleo de fritura derivado de soja realizando:

- ✓ Determinação de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis (MAG, DAG e TAG) do óleo bruto do fruto de macaúba e óleo de fritura;
- ✓ Estudo de estabilidade do óleo de macaúba bruto e óleo de fritura em termos de índice de acidez e índice de peróxidos.
- ✓ Estudo preliminar para definição do tempo reacional a ser utilizado nas etapas posteriores;
- ✓ Estudo da influência das variáveis de processo (temperatura, concentração de enzima, razão molar óleo/etanol, potência de irradiação do ultrassom e uso de peneira molecular) na produção de ésteres etílicos;
- ✓ Estudo da condição maximizada anteriormente em etapa preliminar utilizando a aplicação de peneira molecular;
- ✓ Estudo da reutilização da lipase imobilizada comercial Novozym 435 em sucessivos ciclos com e sem o uso de ultrassom na condição experimental maximizada anteriormente, correspondente aos maiores rendimento em biodiesel do óleo do fruto de macaúba;

- ✓ Estudo da produção de ésteres etílicos em sistema livre de solvente em banho de ultrassom empregando processo em modo contínuo nas condições experimentais aplicadas ao óleo do fruto de macaúba usadas anteriormente.
- ✓ Estudo da produção de ésteres etílicos utilizando óleo de fritura e lipase Novozym 435 em ultrassom em modo batelada e contínuo nas condições experimentais maximizadas obtidas nos estudos anteriores com óleo de macaúba.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão sobre o estado da arte referente à produção enzimática de ésteres etílicos derivados do óleo do fruto de macaúba e óleo residual de fritura, iniciando-se pela definição e importância do biodiesel em relação aos seus aspectos econômicos, ambientais e sociais. Na sequência, serão apresentadas as principais rotas de produção e obtenção de biodiesel, a descrição dos óleos em estudo e o uso de biocatalisadores neste processo. Com base nos objetivos delineados para este trabalho, será dada ênfase especial para o uso do óleo do fruto de macaúba e óleo residual de fritura como fontes oleaginosas promissoras na produção de biodiesel empregando rota enzimática em sistema de ultrassom. Dados da literatura referente a esta pesquisa conduzirão à relevância na execução do presente trabalho.

3.1. OS BIOCOMBUSTÍVEIS E SUA IMPORTÂNCIA

Grande parte de toda a energia consumida no mundo provém de combustíveis fósseis derivados do petróleo, uma fonte considerada limitada, finita e não renovável. A cada ano que passa, o consumo de combustíveis derivados do petróleo aumenta consideravelmente e, conseqüentemente, o aumento da poluição atmosférica e da ocorrência de chuvas ácidas.

Estudos indicam que, além do efeito danoso direto à saúde e ao meio ambiente, a presença cada vez mais significativa de certos gases poluentes na atmosfera pode estar contribuindo para a intensificação do efeito estufa, e uma das principais causas deste desequilíbrio seria a queima de combustíveis de origem fóssil (Ferrari *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2008).

Neste contexto, o mundo procura cada vez mais por alternativas à matriz energética baseada no petróleo. Um dos pontos referente a isso está na elevação dos preços do petróleo e à crescente preocupação ambiental em relação às emissões de gases levando ao surgimento do biodiesel como uma

alternativa ao óleo diesel (Meher *et al.*, 2006, Sharma *et al.*, 2008, Balat e Balat, 2010).

O uso de energias limpas e renováveis, mais do que uma necessidade, é uma obrigação diante do quadro assustador apresentado pela Organização das Nações Unidas (ONU) sobre o futuro no Planeta. Diversas nações, dentre elas, os Estados Unidos, os países da Comunidade Europeia e a Argentina, estão desenvolvendo tecnologias e estimulando o consumo de combustíveis de fontes alternativas, destacando-se neste contexto o biodiesel, com o objetivo de diminuir a emissão de carbono e enxofre (Teixeira, 2012).

Em um mundo onde não há mais possibilidade de crescimento sem preocupação com a natureza, os combustíveis derivados de fontes renováveis assumem uma posição estratégica. Diante deste cenário, a agroenergia tem sido apontada como o grande caminho. Levando em consideração uma série de aspectos, o Brasil se apresenta como um campo fértil para a exploração desses novos potenciais (Serra, 2007).

O Brasil possui grande destaque a partir do seu potencial de produção de etanol e mais recentemente o biodiesel proveniente das mais diversas fontes de oleaginosas. O biodiesel, diante da grande diversidade de matérias primas, pode ser obtido em qualquer região do Brasil atribuindo uma versatilidade muito ampla para esse biocombustível (Oliveira *et al.*, 2008, Araújo *et al.*, 2013).

O País, aliás, é apontado como um dos únicos no mundo que reúne todas as condições para produzir as matérias primas necessárias dentro do propósito de suprir a demanda por energias limpas e renováveis.

As opções de fontes oleaginosas para produção do biodiesel variam conforme as regiões brasileiras atendendo às condições específicas de clima, solo, infraestrutura, arranjo produtivo, entre outros aspectos (Serra, 2007).

Entre as diversas vantagens da utilização do biodiesel, destaca-se o fato de ser isento de enxofre, ter maior valor agregado que o diesel de petróleo e oferecer um maior número de empregos no campo.

Além disso, um dos grandes responsáveis pelo crescente interesse do emprego dos biocombustíveis reside no aspecto ambiental. Os ésteres

produzidos a partir de gorduras animais e de óleos vegetais, denominado biodiesel, podem propiciar reduções significativas no teor de monóxido de carbono e nas emissões de material particulado e de hidrocarbonetos. Por exemplo, tomando-se por base o uso de biodiesel puro (B100) produzido com óleo de soja, constatam-se reduções de monóxido de carbono (CO) em 48%, dióxido de enxofre em 100%, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) (80-90%), de material particulado (MP) em 47%, e dos hidrocarbonetos totais (HC) em 67% (Szybist *et al.*, 2005, Wu e Leung, 2011, Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2013).

Comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em 78% as emissões líquidas de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas. Além disso, o mesmo reduz em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de óxido de enxofre (Demirbas, 2007).

O biodiesel está atualmente em evidência mundial por ser uma fonte renovável de energia e pelos benefícios ambientais gerados pelo seu uso, tem sido considerado um combustível alternativo limpo, e seu principal benefício para o meio ambiente reside na redução significativa nas emissões de poluentes atmosféricos (Gerpen, 2005; Canakci e Gerpen, 2001; Huang *et al.*, 2010).

Outra grande vantagem é que durante a produção agrícola que origina a matéria prima para o biodiesel, ocorre a captura de CO₂ para a fotossíntese onde as emissões totais de dióxido de carbono e gás metano proveniente do biodiesel são significativamente menores em comparação ao uso de diesel derivado de petróleo.

O biodiesel é um combustível biodegradável que apresenta um alto número de cetanos, não é tóxico e não contém enxofre e aromáticos, eliminando completamente as emissões finais de óxido de enxofre, que é o principal componente da chuva ácida (Ma & Hanna, 1999; Knothe *et al.*, 2006).

A significativa redução desses poluentes nas emissões deste biocombustível faz com que o mesmo seja mais seguro para as pessoas, pois

melhora a qualidade do ar, contribuindo assim para a diminuição da incidência de doenças respiratórias nos centros urbanos.

Assim o biodiesel pode ser um importante produto para exportação e para independência energética nacional, associada à geração de emprego e renda nas regiões mais carentes do Brasil (Holanda, 2004; Guarieiro, 2006).

3.2. BIODIESEL

Biodiesel se refere a um diesel equivalente, combustível transformado derivado de fontes biológicas, sendo esta uma fonte energética biodegradável, renovável com baixa produção de gases poluentes (Demirbas, 2008b, Lam *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2013).

Também denominados metil ou etil ésteres de óleos vegetais, o "biodiesel" é considerado um possível candidato como combustível alternativo para motores diesel. O termo biodiesel é dado como nome ao óleo vegetal transesterificado empregado como combustível para motores diesel (Demirbas, 2002, Badday *et al.*, 2012).

Neste sentido, tem-se demonstrado um interesse na utilização de óleos vegetais para a fabricação de biodiesel devido a sua natureza menos poluente. Os óleos vegetais são ésteres de ácidos graxos, que contêm três cadeias carbônicas ligadas a um radical de glicerina. Quando submetidos ao processo de transesterificação – reação química do óleo vegetal com o metanol ou etanol – na presença de um catalisador, geram a glicerina como coproduto e transformam-se em biodiesel, um combustível que, além de biodegradável, possui características muito similares ao óleo diesel de petróleo (Ma e Hanna, 1999; Ghadge Raheman, 2006; Babajide *et al.*, 2010)

Entretanto, em relação ao álcool utilizado nas reações de produção de biodiesel Demirbas (2003) menciona em seu trabalho que o etanol deveria ser mais utilizado no processo de transesterificação quando comparado com metanol, porque o etanol é um produto agrícola, renovável e biologicamente menos ofensivo ao meio ambiente e também proporciona um biodiesel com maior índice de cetano e maior lubricidade (Quintella *et al.*, 2009).

Kumar *et al.* (2010) e Hanh *et al.* (2009) justificam em seus trabalhos a utilização de etanol a fim de reduzir o risco associado com a utilização de metanol devido a sua elevada toxicidade em reações em processo batelada. Segundo os autores o etanol tem também mais átomos de carbono que o metanol, o que pode fornecer maior poder calorífico no meio reacional. No entanto, a transesterificação usando etanol tem sido relatada ser ligeiramente inferior devido ao seu peso molecular maior (Badday *et al.*, 2012).

Assim, a rota metílica é mais utilizada e consolidada, mas requer manipulação adequada do metanol, pois este é um produto bastante tóxico e obtido geralmente de matéria prima de origem fóssil (Quintella *et al.*, 2009).

O biodiesel demonstra ser tecnicamente competitivo oferecendo vantagens sobre o combustível convencional derivado de petróleo podendo ser considerado um substituto do diesel. É um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis. São ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos a partir da reação de transesterificação de triglicerídeos (Badday *et al.*, 2012).

A transesterificação consiste na reação dos triglicerídeos presentes nos óleos vegetais ou gorduras animais com álcool (metanol ou etanol) em presença de catalisador, como demonstra a Figura 1 (Demirbas, 2005; Patil e Deng, 2009; Demirbas, 2003b; Meher *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2005, Lam *et al.*, 2010, Yaakob *et al.*, 2013)

Figura 1. Representação da reação de alcoólise de triglicerídeos.



R: geralmente metila (-CH₃) ou etila (-CH₂CH₃)

R₁, R₂, R₃: radicais provenientes dos \u00e1cidos graxos que constitu\u00edam os triglicer\u00eddeos do \u00f3leo ou gordura.

(Fonte: Rodrigues, 2007).

Esse processo separa dos óleos os compostos sólidos, que são removidos através de decantação, tornando o óleo resultante (biodiesel) menos viscoso que o óleo cru. Essa diminuição da viscosidade evita a ocorrência de problemas operacionais nos motores diesel, como o acúmulo de material em partes do motor. Além disso, o subproduto dessas reações – a glicerina – é uma substância com razoável valor agregado, usado principalmente por indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de explosivos (Pereira, 2009).

Óleos vegetais, também conhecidos como triglicerídeos, estão se tornando uma das matérias-primas renováveis mais promissoras para produção de biodiesel por causa de seus benefícios ambientais (Demirbas, 2005, Leung *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2011, Yaakob *et al.*, 2013).

Óleos vegetais comestíveis, como óleo de canola, soja, palma, girassol, milho e óleos residuais de fritura têm sido utilizados para a produção de biodiesel onde se verificou ser considerado como um bom substituto do diesel (Banerjee e Chakraborty, 2009; Wen *et al.*, 2010, Tan *et al.*, 2011, Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2013, Gharat e Rathod, 2013, Liu *et al.*, 2014).

Vários países procuram diferentes tipos de óleos vegetais para produção de biodiesel, com intuito de substituir, ao menos parcialmente, o diesel de petróleo. Mas essas variedades de oleaginosas dependem das condições climáticas e do solo. Por exemplo, nos Estados Unidos usam óleo de soja, na Europa utiliza-se óleo de girassol e de colza, no sudeste da Ásia utiliza-se óleo de palma e nas Filipinas utiliza-se óleo de coco para produção de biocombustível (Barnwal e Sharma, 2005).

De acordo com Balat e Balat (2010), uma pesquisa em 226 países mostrou que países como Malásia, Indonésia, Argentina, Estados Unidos, Brasil, Holanda, Alemanha, Filipinas, Bélgica e Espanha apresentam grande potencial para produção de biodiesel devido as suas vastas fontes de matérias primas oleaginosas.

Assim é conhecido que os óleos vegetais são candidatos como combustíveis alternativos para os motores a diesel, por apresentar um elevado

poder calorífico. Entretanto, o uso direto destes óleos vegetais nos motores conduz a vários problemas.

Entre eles a elevada viscosidade dos óleos, que são cerca de 10 vezes maiores que a do diesel, ocasionando com isso uma baixa atomização do combustível, combustão incompleta, baixa volatilidade e queima, levando à carbonização dos injetores de combustível. Estas desvantagens, juntamente com a utilização de óleos vegetais insaturados, podem resultar em danos ao motor.

No entanto, essas desvantagens podem ser minimizadas através da modificação química dos óleos gerando-se o biodiesel, o qual tem características semelhantes ao diesel (Knothe, 2005; Barnwal e Sharma, 2005; Singh, 2010, Lam *et al.*, 2010, Huang *et al.*, 2010, Araújo *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2013).

A Tabela 1 destaca a composição de alguns ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras como promissores a produção de biodiesel.

Os ácidos graxos, conhecidos como unidades fundamentais da maioria dos lipídeos, são ácidos orgânicos, possuindo entre 4 átomos a 24 átomos de carbono. Eles podem ser de cadeias curtas (4 a 6 átomos de carbono), de cadeias médias (8 a 12 átomos) ou de cadeias longas (mais do que 12). Além do tamanho da cadeia de carbono, os ácidos graxos se diferenciam pelo número e pela posição das insaturações. Quase todos possuem número par de átomos de carbono. Os mais abundantes são os com 16 carbonos (palmítico) ou 18 carbonos (esteárico), respectivamente encontrados na maioria dos óleos vegetais (Colette e Monnier, 2011).

Percebe-se na tabela apresentada que os ácidos graxos palmítico (16:0) e esteárico (18:0) são os dois ácidos graxos saturados mais comuns. Da mesma forma, oléico (18:1) e linoléico (18:2) são os ácidos graxos insaturados mais comuns (Demirbas, 2008b; Nogueira *et al.*, 2010).

Os óleos e gorduras contêm diferentes tipos de ácidos graxos ligados ao glicerol, e dependendo do comprimento de sua cadeia e do grau de insaturação, é o parâmetro de maior influência sobre as propriedades dos óleos vegetais e gorduras animais de onde se originam (Knothe *et al.*, 2006).

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

Matéria - prima	N° átomos de Carbono:insaturações						
	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
Papoula	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
Rícino	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
Macaúba	17,5	2,2	2,7	66,0	11,6	0	0
Fritura (Soja)	11,6	0,21	3,95	25,5	52,9	4,85	0,7

Fontes: Demirbas (2008b); Nogueira (2010), Lam *et.al.* (2010), Gonzalez (2012)

Conforme destacado neste contexto, o biodiesel substitui total ou parcialmente o óleo diesel de petróleo. É produzido a partir de culturas oleaginosas (soja, girassol, dendê, mamona, canola, pinhão manso, óleo de fritura, macaúba, etc.), podendo ser misturado ao diesel de petróleo em diversas proporções, sendo utilizado em motores ciclo diesel, móveis ou estacionários (Demirbas, 2003; Pinto *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2010, Lam *et*

al., 2010, Pal e Kachhwaha, 2013; Yaakob *et al.*, 2013; Tabelian-Kiakalaieh *et al.*, 2013).

No Brasil, os motores do ciclo diesel são utilizados prioritariamente em veículos pesados de carga (caminhões, trens, etc.) ou de passageiros (ônibus) (Abreu *et al.*, 2004)

O nome biodiesel muitas vezes é confundido com a mistura diesel+biodiesel, disponível em alguns postos de combustíveis. A designação correta para a mistura vendida nestes postos deve ser precedida pela letra B (do inglês Blend). Segundo Pereira (2009) a concentração de biodiesel é informada por meio de uma nomenclatura específica definida por “BX”, onde “X” se refere à porcentagem em volume do biodiesel ao qual é misturado ao diesel do petróleo.

Por exemplo, 2% de biodiesel ao diesel de petróleo é chamada de B2, B5 e B20 indicam, respectivamente, as misturas de biodiesel/diesel contendo 5 e 20% de biodiesel e assim progressivamente até o biodiesel puro, B100 (Teixeira, 2012).

Uma das grandes vantagens da mistura de biodiesel com diesel é a sua adaptabilidade aos motores de ciclo diesel onde este biocombustível pode ser usado em motores já existentes, sem a necessidade de modificações mecânicas para uma proporção de até 30% de biodiesel para 70% de diesel (B30). Misturas com porcentagens maiores de biodiesel podem exigir algumas alterações no motor.

Ésteres derivados de biodiesel são caracterizados pelas propriedades físicas do combustível gerado, incluindo a densidade, a viscosidade, o índice de iodo, índice de acidez, ponto de névoa, número de cetano, poder calorífero de combustão e volatilidade.

O biodiesel produz uma energia de torque um pouco menor e consome mais combustível do que o diesel derivado de petróleo. Entretanto, este biocombustível constitui-se em uma energia renovável, sendo considerado melhor em termos de redução da emissão da maioria dos poluentes, capacidade de lubrificação, baixo risco de explosão (para sua ignição é preciso uma temperatura energética acima de 150°C), contribuindo para o ganho

ambiental reduzindo o efeito estufa, isento de teores de enxofre, elevado ponto de fulgor (que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros e diminuindo a possibilidade de produzir vapores de ar/combustível,) redução do teor de aromáticos, possui melhor qualidade de ignição (na mistura ar/combustível requer menos oxigênio para combustão), 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; Shuit, 2010, An, *et al.*, 2013).

É um combustível biodegradável, sua utilização aumenta a eficiência dos catalisadores. Em relação a sua biodegradabilidade o biodiesel é degradado aproximadamente de 4 a 6 vezes mais rápido que o diesel derivado de petróleo, causando menores problemas ambientais em caso de derramamento acidental dependendo da quantidade derramada (Knothe *et al.*, 2006). Além disso, traz benefícios sociais da sua produção, contribui para geração de empregos no setor primário reduzindo o êxodo do trabalhador no campo produzindo em terras cultiváveis uma enorme variedade de fontes de matérias-primas, além da redução da dependência do petróleo como única fonte energética (Bala, 2005; Tapanes, 2008).

A redução do teor de enxofre do diesel torna este combustível menos lubrificante, prejudicando e acelerando o desgaste do motor. O biodiesel é um combustível que possui alta capacidade de lubrificação. Desse modo, a mistura de biodiesel e diesel aumenta a lubrificação do combustível, aumentando a vida útil do motor (Fukuda *et al.*, 2001; Pacific Biodiesel, 2012).

No setor de transporte o biodiesel pode ser usado puro ou em mistura com o combustível de origem fóssil, sendo que, sua aplicação em frotas cativas nos grandes centros, onde os problemas de poluição atmosférica são mais relevantes, pode representar uma importante medida para a manutenção e melhoria da qualidade do ar, além de contribuir de forma positiva no balanço dos gases responsáveis pelo efeito estufa e para a geração de novos empregos na área agrícola, se levarmos em conta o fato de que eles são provenientes de recursos renováveis de origem vegetal. (Demirbas, 2003b;. Giannelos *et al.*, 2002; Bondioli, 2004, An, *et al.*, 2013).

3.3. REGULAMENTAÇÃO DO BIODIESEL

A utilização de óleos vegetais para fabricação de combustíveis de motores, associado ao óleo extraído do petróleo é, atualmente, uma prática no Brasil. Segundo a Agência Nacional de Petróleo (ANP, 2013), cerca de 45% da energia utilizada e 20% dos combustíveis consumidos no Brasil são derivados de fontes renováveis. Porém, em todo o mundo, aproximadamente 86% da energia é proveniente de fontes de energia não renováveis (Araújo *et al.*, 2013).

Pioneiro no uso de biocombustíveis, o Brasil alcançou uma posição almejada por muitos países na busca de fontes de energia renováveis e limpas como alternativas estratégicas ao emprego do petróleo para geração de energia.

De maneira geral, as pesquisas sobre o uso de óleos vegetais em motores de ciclo diesel se deram no século XX, e início do século XXI, para a produção de biocombustíveis. Conforme Lima (2011), pelo menos cinco são as alternativas possíveis de combustíveis que podem ser obtidos da biomassa, potencialmente capazes de fazer funcionar um motor de ignição por compressão (ciclo diesel). A classificação que agrupa as principais tecnologias estudadas para substituição total ou parcial do derivado de petróleo resumidamente é a seguinte: 1) *In natura*; 2) Processados em refinarias (craqueados ou hidroconvertidos); 3) Transesterificados e, 4) Diluídos em microemulsão com etanol ou metanol.

A análise dos aspectos técnicos, econômicos, ambientais e sociais pode definir a opção ideal entre essas formas de utilização do óleo vegetal como fonte energética.

Os motores movidos a óleo diesel exigem que o combustível tenha propriedades de lubrificação, em razão do funcionamento da bomba injetora para que o líquido que escoar lubrifique adequadamente as suas peças em movimento. Características estas encontradas no biodiesel derivado de diferentes fontes de óleos vegetais e gordura animal. (Holanda, 2004; Ramos *et al.*, 2003; Dermirbas, 2003; Vicente *et al.*, 2004).

O processo de padronização deste biocombustível é indispensável para a inclusão de produtores e consumidores da cadeia produtiva de biodiesel; para isso há a necessidade de se adequar às normas da Agência Nacional do Petróleo (ANP). Esta agência tem a atribuição de regular e fiscalizar as atividades relativas à produção, controle de qualidade, distribuição, revenda e comercialização do biodiesel e da mistura óleo diesel-biodiesel. Isso significa que somente as refinarias autorizadas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP) poderão proceder à mistura do diesel derivado de petróleo com o biodiesel e a consequente comercialização através de postos distribuidores conveniados.

No desempenho dessa função, a Agência Nacional do Petróleo editou normas de especificação do biodiesel e da mistura óleo diesel biodiesel (Lima, 2011).

Em 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.

Segundo esta lei: “O Biodiesel é um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou conforme regulamento para geração de outro tipo de energia que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”.

A lei ainda estabelece a obrigatoriedade da adição de um percentual mínimo de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor, em qualquer parte do território nacional.

Conforme definido nesta lei, autorizou-se a mistura de 2% em volume de biodiesel ao diesel (B2), desde janeiro de 2005, tornando-a obrigatória em 2008 (Ministério das Minas e Energia, 2004).

A partir de 1º de julho de 2008 o biodiesel passou a ser obrigatório em todos os postos que revendem óleo diesel no Brasil. Assim, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil passou a conter o B3 - mistura de 97% de óleo diesel derivado do petróleo e 3% de biodiesel (regra estabelecida pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE)). Esta regra passou a vigorar

seis meses após a implementação do B2, aumentando de 2% para 3% o percentual de mistura.

Em janeiro de 2010, a mistura de 5% - B5 passou a ser obrigatória. Esta adição de 5% de biodiesel ao diesel de petróleo não exige alteração nos motores (caminhões, ônibus, tratores, etc.) e os veículos que utilizem o B5 têm garantia de fábrica assegurada pela Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (Anfavea) (BIODIESEL 2012).

Segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP) 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 (CNPE), publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 26 de outubro de 2009, que aumentou de 4 para 5% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel.

Porém, em 28 de maio de 2014 foi oficializado o aumento da mistura obrigatória de biodiesel no óleo diesel de petróleo consumido no Brasil, estabelecendo o B6 como novo padrão de biocombustível para todo o país. Segundo a União, ao final do ano de 2014 estima-se um novo aumento nesta mistura passando-se de 6 para 7% (B7) a quantidade de biodiesel adicionado no diesel consumido no país. (BIODIESEL BR, 2014).

Desta forma, 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.

O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) é um programa interministerial do Governo Federal com o objetivo de implantar, de forma sustentável, tanto técnica quanto economicamente, a produção e uso do Biodiesel com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, através da geração de emprego e renda produzindo biodiesel a partir de diferentes oleaginosas e em regiões diversas.

Isso se deve a sua abundância em terras para o cultivo de diversas fontes oleaginosas e produção de etanol tornando o Brasil o país com o maior potencial para produção de biodiesel.

A sinergia entre o complexo oleaginoso e o setor de álcool combustível traz a necessidade do aumento na produção de álcool. A produção de biodiesel consome álcool etílico, através da transesterificação por rota etílica, o que gera incremento da demanda pelo produto. Conseqüentemente, o projeto de biodiesel estimula também o desenvolvimento do setor sucroalcooleiro, gerando novos investimentos, emprego e renda (BIODIESEL 2012).

Assim, além disso, 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 demonstre destaque atraindo o foco de novos olhares curiosos e empreendedores.

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, no ano de 2013, de 2,9 bilhões de litros e uma capacidade instalada, no mesmo ano, para cerca de 5,5 bilhões de litros. Até julho de 2014 a produção de biodiesel foi de 1,9 bilhões de litros, porém com o aumento da quantidade de biodiesel adicionado no diesel consumido no país estima-se que até dezembro de 2014 a produção de biodiesel no Brasil ultrapasse 3,6 bilhões de litros (ANP, 2014).

3.4. PROCESSOS DE OBTENÇÃO DO BIODIESEL

Entre as principais fontes de triacilgliceróis para produção do biodiesel estão os óleos vegetais, as gorduras animais e óleos residuais como os oriundos da fritura de alimentos. Os monoésteres alquílicos de ácidos graxos podem ser produzidos a partir de qualquer óleo vegetal.

Definido com um substituto natural e renovável do diesel de petróleo, o biodiesel pode ser produzido, entre outros processos, pela alcoólise de óleos vegetais ou gorduras animais ou pela esterificação de ácidos graxos, empregando alcóois mono-hidroxilados de cadeia curta na presença de um catalisador que pode ser homogêneo, heterogêneo ou enzimático (Kucek *et al.*, 2007; Sreeprasanth *et al.*, 2006; Cordeiro *et al.*, 2008, Lam *et al.*, 2010, Yaakob *et al.*, 2013, Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2013, Aarthy *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2014).

A aplicação direta dos óleos vegetais nos motores é limitada por algumas propriedades físicas dos mesmos, principalmente sua alta viscosidade em torno de 10-20 vezes maior que o biodiesel correspondente levando a sérios problemas operacionais como: ocorrência de gomas durante a estocagem dos óleos e diminuição da eficiência de lubrificação devido às reações de oxidação e polimerização dos mesmos, obstrução dos filtros de óleo e bicos injetores, sua baixa volatilidade, seu caráter poli-insaturado que implicam em alguns problemas no motor, comprometimento de sua durabilidade e aumento em seus custos de manutenção, bem como em uma combustão incompleta podendo levar a produção de acroleína, uma substância altamente tóxica e cancerígena, formada pela decomposição térmica do glicerol (Encinar, 1999; Demirbas, 2002; Ramos *et al.*, 2011).

A reação de transesterificação representa uma solução para o problema da viscosidade dos óleos vegetais produzindo monoésteres alquílicos (biodiesel) com viscosidades cinemáticas da ordem de 4 à 5 mm²/s, muito próximas à do diesel de petróleo, que apresenta valores de 1,8 à 3,0 mm²/s, enquanto os óleos vegetais apresentam de 27 à 35 mm²/s. Desta forma, a utilização de biodiesel pode dispensar várias adaptações dos motores, como a utilização de sistemas de injeção de alta pressão ou pré-aquecimento (Schuchardt e Ribeiro, 2001; Knothe *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2011).

Vários métodos que estão atualmente disponíveis têm sido estabelecidos para a produção de biodiesel. A modificação de óleos vegetais brutos traz benefícios de modo a reduzir as suas viscosidades obtendo assim um produto com propriedades adequadas para ser utilizado como um combustível de motores (Koh e Ghazi, 2011).

Há vários processos disponíveis para esta modificação produzindo desta maneira um biodiesel de melhor qualidade. Dentre os processos mais investigados a fim de melhorar o biocombustível derivado de óleos vegetais podem ser destacados as micro-emulsões, craqueamento catalítico térmico e transesterificação (Yaakob *et al.*, 2013, Leung *et al.*, 2010; Jain e Sharma, 2010; Ma e Hanna, 1999, Fukuda *et al.*, 2001). A Tabela 2 apresenta uma breve descrição destes processos com suas vantagens e desvantagens.

Tabela 2. Diferentes métodos para produção de biodiesel

<i>Método</i>	<i>Definição</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>	<i>Refêrencias</i>
Micro-emulsão	Uma dispersão coloidal de equilíbrio em um fluido opticamente isotrópico de microestruturas com dimensões geralmente entre 1-150 nm formado espontaneamente a partir de dois líquidos imiscíveis e um ou mais anfífilos iônico ou não-iônico.	Melhora os padrões de pulverização durante a combustão e reduz a viscosidade do combustível.	Gera um menor número de cetano e baixo teor de energia.	Shoo e Das, 2009; Zubr, 1997.
Craqueamento térmico (Pirólise)	A conversão da substância de cadeia longa e saturada (à base de biomassa) para biodiesel por meio de calor.	Produz um combustível quimicamente semelhante à gasolina e ao diesel derivado do petróleo.	Elevado custo energético.	Santos <i>et al.</i> , 2009; Saraf e Tomas, 2007; Singh, 2009; Srivastava e Prasad, 2000.
Transesterificação	Reação de um óleo ou gordura com um álcool na presença de catalisador para formação de ésteres e glicerol.	Renovabilidade; número maior de cetano; baixas emissões de poluentes e uma maior eficiência de combustão.	Desperdício de subprodutos (glicerol e águas residuais).	Schinas <i>et al.</i> , 2009; Maceiras <i>et al.</i> , 2009; Goodrum <i>et al.</i> , 2003; Bajaj <i>et al.</i> , 2010; Marchetti e Errazu, 2010; Ríos <i>et al.</i> , 2011, Somnuk <i>et al.</i> , 2012; Gude e Grant 2013; Aarthy <i>et al.</i> , 2014; Haigh <i>et al.</i> , 2014.

3.4.1. Transesterificação

O surgimento da transesterificação pode ser datado de 1846, quando Rochieder descreveu a produção de glicerol pela etanolise de óleo de mamona. Desde aquele momento, o processo de alcoólise tem sido largamente estudado (Dalla Rosa, 2006).

De acordo com Demirbas (2003), embora existam vários modos e processos para converter óleos vegetais em combustível, o processo de transesterificação se encontra como o mais viável método de modificação de óleos vegetais.

Atualmente este é o principal método de produção do biodiesel. Neste processo, um mol de triacilglicerol reage com três moles de álcool, usualmente metanol ou etanol, na presença de um catalisador, que pode ser homogêneo (empregando catalisador básico ou ácido), heterogêneo (zeólitas ou argilas) ou enzimático (lipases) para formar ésteres e glicerol (Narasinharao *et al.*, 2007; Ranganathan *et al.*, 2008; Lam *et al.*, 2010 Cordeiro *et al.*, 2011; Koh e Ghazi, 2011, Chesterfield *et al.*, 2012, Araújo *et al.*, 2013 Gharat e Rathod, 2013, Aarthy *et al.*, 2014, Haigh *et al.*, 2014).

Conforme a literatura, nesta reação estequiométrica, 1 mol de um triacilglicerol e 3 mol do álcool, resultam na produção de 3 mol de ésteres e 1 mol de glicerol (Meher *et al.* 2006, Yaakob *et al.*, 2013).

A razão molar estequiométrica de álcool e óleo na transesterificação é de 3:1 (três moles de álcool para um mol de óleo), porém, um amplo excesso de álcool, usualmente 6:1 ou 12:1, é utilizado para deslocar o equilíbrio químico a fim de maximizar a produção de ésteres graxos (Cordeiro *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2011, Yin *et al.*, 2012).

O rendimento em ésteres na transesterificação pode ser afetado por diversos fatores, incluindo o tipo de catalisador (ácido, alcalino ou enzimático), matéria-prima empregada, razão molar entre álcool/óleo vegetal, temperatura, pureza dos reagentes (principalmente índice de água) e de ácidos graxos livres afetando diretamente a taxa de reação (Holanda, 2004; Agarwal, 2007; Schuchardta *et al.*, 1998, Badday *et al.*, 2012).

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, melhorando o desempenho do mesmo em motores movidos a diesel (Demirbas, 2002; 2008b).

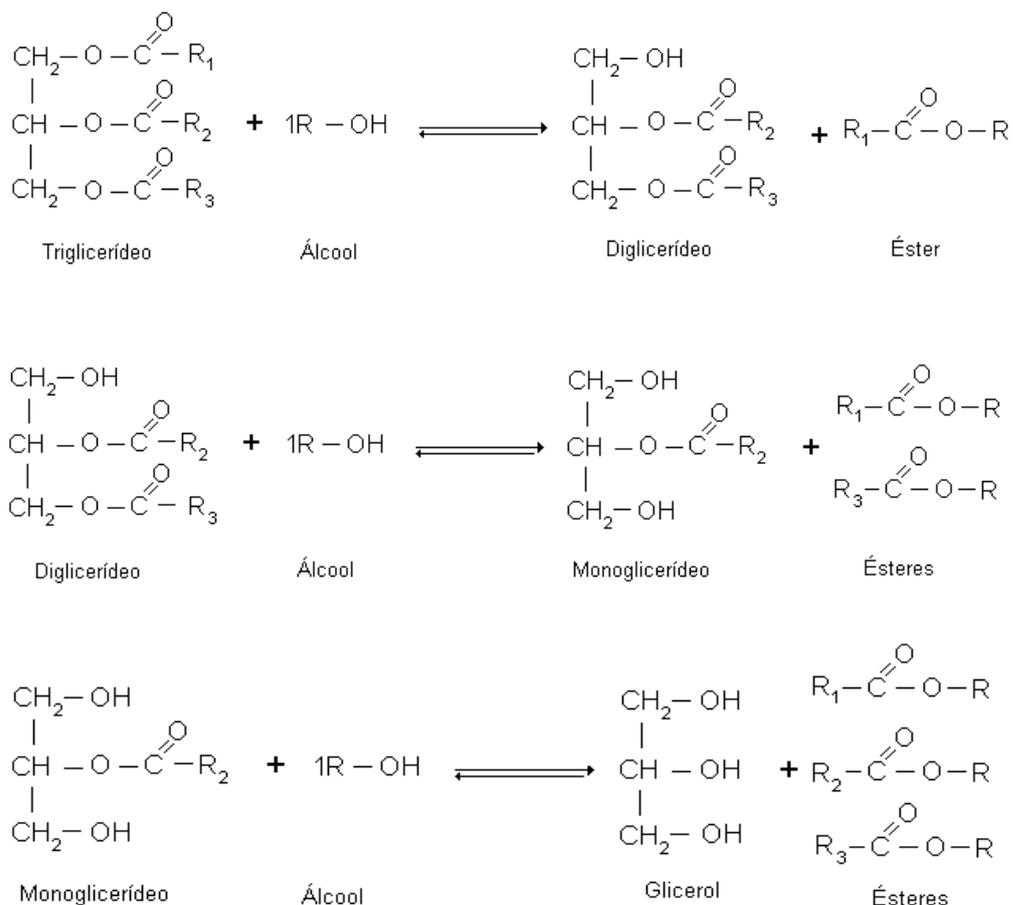
Quimicamente, a transesterificação é uma reação de um álcool (metanol, etanol, propanol ou butanol) e um triglicerídeo. Entretanto, o metanol e o etanol são os alcoóis mais empregados neste processo (Macedo e Macedo, 2004).

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 toxicidade para a população, é de fácil manuseio e proveniente de fontes naturais renováveis (cana-de-açúcar) obtendo-se assim um biodiesel 100% natural. O metanol, por outro lado, é obtido a partir do petróleo, o que torna o produto final, biodiesel, uma fonte de energia não totalmente renovável.

Além disso, o etanol 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; Marchetti *et al.*, 2007; Benedict *et al.*, 2003).

A transesterificação é uma reação reversível que ocorre em três etapas reacionais com formação de produtos intermediários. O primeiro passo é a conversão de um triglicerídeo a um diglicerídeo, seguido pela conversão de um diglicerídeo a monoglicerídeo e de monoglicerídeo para glicerol, gerando uma molécula de éster de cada glicerídeo a cada fase da reação (Rodrigues, 2009; Badday *et al.*, 2012; Veljkovic *et al.*, 2012;), conforme representado pela Figura 2.

Figura 2. Reações intermediárias da reação de alcoólise de triacilgliceróis.



O processo de transesterificação reduz o peso 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).

A transesterificação pode ser catalisada por sítios ácidos ou básicos, em meio homogêneo ou heterogêneo. Entretanto, a utilização de catalisadores básicos na transesterificação de óleos com elevado índice de acidez, ou umidade, pode gerar uma reação de saponificação, que é uma reação paralela e indesejada por consumir muito catalisador e formar emulsões no meio reacional (Dossin *et al.*, 2006; Serio *et al.*, 2006; Demirbas, 2009; Gog *et al.*, 2012; Yaakob *et al.*, 2013). A Tabela 3 apresenta algumas vantagens e desvantagens de catalisadores usados para produção de biodiesel.

Tabela 3. Vantagens e desvantagens de catalisadores usados na produção de biodiesel.

<i>Tipo</i>	<i>Catalisador</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>	<i>Refêrencias</i>
Alcalino Homogêneo	NaOH, KOH	Elevada atividade catalítica, baixo custo, cinética favorável, condições de operação simples.	Requer óleos com baixa quantidade de ácidos graxos, condições anidras, saponificação, formação de emulsão, descartável.	Thanh <i>et al.</i> , 2010, Hingu <i>et al.</i> , 2010, Gude e Grant, 2013, Maddikeri <i>et al.</i> , 2013, Yin <i>et al.</i> , 2014, Sakai <i>et al.</i> , 2009; Azcan e Danisman, 2007; Dias <i>et al.</i> , 2008.
Heterogêneo	CaO, CaTiO ₃ , CaZrO ₃ , KOH/Al ₂ O ₃ , Zeólitas, Alumina/Silica suportada K ₂ CO ₃ , K ₃ PO ₄ , Na ₃ PO ₄	Não corrosivos benéficos ambientalmente, recicláveis, fácil separação, alta seletividade, boa durabilidade do catalisador.	Requer óleos com baixa quantidade de ácidos graxos, condições anidras, requer elevada razão molar álcool/óleo, reações em temperatura e pressão elevadas, alto custo, baixa difusão.	Qian <i>et al.</i> , 2008; Kawashima <i>et al.</i> , 2009; Lukic <i>et al.</i> , 2009; Noiroj <i>et al.</i> , 2009, Hindryawati e Manian, 2015, Pukale <i>et al.</i> , 2015
Ácido Homogêneo	H ₂ SO ₄ concentrado	Catalisa simultaneamente reações de esterificação e transesterificação sem formação de sabão	Corrosão de equipamentos, mais resíduo para neutralização, dificuldade de reciclo, longos tempos de reação.	Canakci e Gerpen, 1999; Canakci e Gerpen, 2003, Ma e Hanna, 1999.
Heterogêneo	ZnO/l ₂ , ZrO ₂ /SO ₂ ² ₄ , TiO ₂ /SO ₂ ² ₄ , Fosfato de vanádio, ácido níobico, Amberlist -15.	Catalisa simultaneamente reações de esterificação e transesterificação, reciclável, benéfico ao meio ambiente.	Baixa atividade catalítica, difusão limitada, baixa concentração de sítios ácidos, alto custo, baixa microporosidade	Kurkarni <i>et al.</i> , 2006; Di Serio <i>et al.</i> , 2007; Silva <i>et al.</i> , 2008.
Enzimas	Lipase <i>Candida antarctica B</i> , Lipase <i>Rhizomucor mieher</i> .	Evita formação de sabão, fácil purificação, não poluente, elevada seletividade.	Alto custo, desnaturação em temperaturas e pHs elevados.	Liu <i>et al.</i> , 2014, Haigh <i>et al.</i> , 2014, Trentin <i>et al.</i> , 2014 Hama <i>et al.</i> , 2013, Chesterfield <i>et al.</i> , 2012, Ríos <i>et al.</i> , 2011, Maceiras <i>et al.</i> , 2009, Dizge <i>et al.</i> , 2009; Dizge e Keskinler, 2008; Shimada <i>et al.</i> , 2002

De acordo com Akgun e Iyscan (2007), dentre os fatores que interferem no rendimento da reação de transesterificação, pode-se citar: tipo e quantidade de catalisador, tempo e temperatura de reação, razão molar 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.

3.4.2. Catálise Enzimática e Imobilização

As enzimas apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores em diversas reações de biotransformações, sendo consideradas versáteis biocatalisadores, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). Além disso, os biocatalisadores destacam-se por acelerar a velocidade de uma reação bem como a utilização em condições brandas, podendo em alguns casos catalisar reações nos dois sentidos, além de apresentar seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam e gerar menor quantidade de resíduos ao final do processo (Faber, 2000; Hansan *et al.*, 2006, Fukuda *et al.*, 2008, Lam *et al.*, 2010).

A catálise enzimática utiliza enzimas como biocatalisadores. As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem um grupo de enzimas que vêm se destacando cada vez mais no cenário da biotecnologia enzimática, devido à sua vasta versatilidade de aplicações, permitindo a catálise de reações de hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres na interface lipídio-água (Brigida *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008), além de reações reversas como esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização (Paques e Macedo, 2006; Yin *et al.*, 2006, Ribeiro *et al.*, 2011).

As enzimas hidrolíticas tais como as lipases, são as mais comumente usadas na química orgânica constituindo o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas (Bon *et al.*, 2008). As razões para que estas tenham grande interesse atrativo à indústria deve-se a sua ampla disponibilidade, relativo baixo custo, condições suaves de síntese,

facilidade de utilização bem como a ampla especificidade por determinados substratos, grupo funcional específico, estereo especificidade em meio aquoso e a não necessidade de cofatores (substâncias orgânicas ou inorgânicas necessárias ao funcionamento das enzimas) (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004, Gupta *et al.*, 2004, Mamuro *et al.*, 2001, Lerin *et al.*, 2014; Christopher *et al.*, 2014).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 e 75 kDa, são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que apresentam maior estabilidade térmica (Castro *et al.*, 2004).

Entretanto, a viabilidade da utilização industrial destes biocatalisadores está diretamente ligada a dois fatores principais: potencial catalítico na reação e estabilidade as variáveis impostas pelo processo como pH e temperatura (Brígida, 2008).

Embora o uso de enzimas como catalisadores apresentem alguns inconvenientes, associados principalmente com menores taxas de reação, custos mais elevados e perda de atividade ou inibição enzimática, a rota de catálise via enzimática para a produção de alguns produtos como o biodiesel é atualmente considerado como uma alternativa ecológica (Christopher *et al.*, 2014).

Porém, apesar da alta eficiência catalítica das enzimas, fatores ligados ao custo e estabilidade limitam, muitas vezes, a utilização destes biocatalisadores. O uso de um catalisador relativamente caro como uma enzima exige, em muitos casos, sua recuperação e reuso para se ter um processo economicamente viável (Fernandez-Lorente *et al.*, 2007).

Neste sentido, as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo pode provocar a sua inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da

imobilização é utilizada para fornecer estabilidade, facilitar sua recuperação e reutilização (Villeneuve *et al.*, 2000). Além disso, a atividade catalítica da enzima imobilizada pode ser aumentada por screening ou seleção de microrganismos tolerantes aos diversos alcoóis utilizados na produção de produtos como o biodiesel através do uso de engenharia genética (Peralta *et al.*, 2012).

Segundo Brígida (2008), enzimas imobilizadas são aquelas que se encontram ligadas covalentemente ou não em um suporte que possa proteger a capacidade catalítica da enzima.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação a sua forma livre (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

De forma geral, os métodos de imobilização enzimática podem ser agrupados em dois grandes grupos ou categorias, baseadas na quimissorção (adsorção, ligações iônicas, ligações covalentes) ou na retenção física (trapeamento e encapsulamento) (Lee *et al.*, 2009; Tzialla *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Prlainovi`c *et al.*, 2011; Tran *et al.*, 2012; Yagiz *et al.*, 2007).

Entretanto, a atividade catalítica e outras características das enzimas podem mudar dependendo do tipo de retenção (química ou física), da força da interação entre a enzima e o suporte utilizado, que pode em alguns casos causar distorções estruturais da proteína alterando a sua atividade catalítica, podendo esta aumentar ou diminuir devido à fragmentação do suporte pela interação do sistema de agitação e o suporte (Yadav e Jadhav, 2005; Gomes *et al.*, 2006). Um dos benefícios da tecnologia reacional com o uso de enzimas imobilizadas é a possibilidade do desenvolvimento de processos reacionais contínuos, aumentando a produtividade e reduzindo os custos de produção (Brígida, 2008).

Outras vantagens é que a enzima passa a ser um catalisador heterogêneo permitindo a sua reutilização por vários ciclos consecutivos e facilitando a separação e extração de substratos e produtos do meio reacional maximizando a eficiência do biocatalisador e gerando efluentes livres do mesmo. Estas vantagens tornam as reações catalisadas por enzimas

imobilizadas potencialmente competitivas e econômicas frente ao uso de catalisadores químicos, além dos benefícios ambientais (Hass *et al.*, 2006, Tan *et al.*, 2010).

Técnicas de imobilização têm sido usadas na obtenção de catalisadores heterogêneos, visando a produção de biodiesel. Lipases de diversas fontes têm sido imobilizadas e usadas na produção de biodiesel, porém as mais utilizadas para esta finalidade foram obtidas de *Candida antarctica* (Novozym 435) e *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) (Jegannathan *et al.*, 2008, Antczak *et al.*, 2009, Dizge *et al.*, 2009; Maceiras *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2011; Ríos *et al.*, 2011; Chesterfield *et al.*, 2012).

Segundo Lee *et al.* (2002) pesquisas têm sido voltadas para a utilização de lipases na transesterificação de moléculas de ácidos graxos de elevado peso molecular. As lipases imobilizadas podem catalisar de forma eficaz a reação de transesterificação do álcool com óleos vegetais e gordura animal tanto em sistemas aquosos quanto não aquosos, superando os problemas relacionados ao conteúdo de água presente no meio reacional.

Entre as vantagens para o processo de produção de biodiesel por enzimas pode-se citar: processo de produção simplificado, menor consumo de energia durante o processo, pureza mais elevada do glicerol gerado como subproduto; não ocorre reações indesejadas de saponificação ou emulsificação do sistema reacional, fácil separação e reutilização de enzimas imobilizadas (Brun *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2012).

Dessa forma, a utilização de lipases imobilizadas como catalisadores para produção de biodiesel apresenta grande potencial comparado com os métodos químicos que fazem uso de catalisadores alcalinos e ácidos, tendo em vista que nenhuma operação complexa é necessária para a separação do glicerol e também do biocatalisador. A ação do uso de lipases sobre ligações ésteres é estudada com o intuito de explorar as vantagens deste biocatalisador na modificação de óleos e gorduras (Dalla Rosa, 2006; Lam *et al.*, 2010; Christopher *et al.*, 2014).

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; Marchetti *et al.*, 2008).

Na última década, uma atenção especial tem sido dedicada ao uso de lipases como biocatalisadores para produção de biodiesel (Fukuda *et al.*, 2008; Gog *et al.*, 2012).

Em geral, as lipases desempenham a sua atividade catalítica em condições mais amenas e com uma variedade de substratos derivados de triglicerídeos, incluindo óleos vegetais, gorduras e resíduos destes óleos com elevados teores de ácidos graxos livres (FFA). Além disso, a separação e purificação do biodiesel catalisado por rota enzimática são muito mais fáceis, o que resulta num processo ambientalmente correto (Nielsen *et al.*, 2008).

Os prós e contras do uso de lipases como biocatalisadores comparativamente a catalisadores alcalinos e ácidos para a produção de biodiesel estão resumidos na Tabela 4.

Segundo Balat e Balat (2010), a alcoólise de triglicerídeos com uma lipase imobilizada é considerada uma das reações mais eficazes para a produção de biodiesel visto a sua baixa complexidade reacional, alto rendimento do produto final e o baixo impacto ambiental ocasionado frente a outros catalisadores químicos.

Além disso, conforme demonstrado na tabela anterior o catalisador enzimático após imobilizado pode ser facilmente recuperado e reutilizado em reações futuras de esterificação e transesterificação apresentando bons rendimentos de conversão.

Com estas vantagens, a adsorção é ainda o método mais amplamente utilizado para a imobilização de lipases (Tan *et al.*, 2010).

Tabela 4. Comparativo da tecnologia enzimática versus tecnologia química (alcalina e ácida) para produção de biodiesel. Fonte: (Gog *et al.*, 2012).

Parâmetro	Processo enzimático	Processo alcalino	Processo ácido
Teor de ácidos graxos na matéria-prima	Os ácidos graxos livres são convertidos em biodiesel	Gera formação de sabão	Os ácidos graxos livres são convertidos em biodiesel
Teor de água na matéria-prima	Não é prejudicial para a lipase	Gera formação de sabão. A hidrólise do óleo resulta em saponificação	Pode gerar a desativação do catalisador
Rendimento em Biodiesel	Alta, usualmente próxima a 90%	Alta, usualmente superior a 96%	Elevado (>90%) em altas razões molar óleo/álcool. Elevada concentração de catalisador e altas temperaturas
Taxa de reação	Baixa	Alta	Menor que o alcalino
Recuperação do glicerol	Fácil	Complexa	Complexa
Recuperação do catalisador e reuso	Recuperação fácil, reutilização provada, uso por vários ciclos.	Recuperação difícil, neutralizada por um ácido, reutilização parcialmente baixa nas etapas de pós-processamento.	Recuperação difícil, o catalisador acaba junto com o subproduto sendo impossível o seu reuso
Custo Energético	Baixo, temperatura de uso: 20-50°C	Médio, temperatura de uso: 60-80°C	Alta, temperatura de uso acima de 100°C
Custo do catalisador	Elevado	Baixo	Baixo, mas pode gerar alto custo do equipamento devido à corrosão ácida.
Impacto Ambiental	Baixo, não necessita de tratamento de águas residuais.	Elevado; necessita de tratamento de águas residuais.	Elevado, necessita de tratamento de águas residuais.

A Tabela 5 traz em destaque este método usado para imobilização de lipases aplicadas para produção de biodiesel e os rendimentos em ésteres obtidos por estas lipases.

Tabela 5. Produção de biodiesel com várias lipases imobilizadas.

Método de imobilização	Lipase	Óleo	Acil acceptor	Rend. (%)	Referências
Adsorção	<i>Candida antarctica</i>	Óleo vegetal e de fritura	Metanol, 1-propanol	> 90	Du <i>et al.</i> , 2004; Maceiras <i>et al.</i> , 2009; Wang <i>et al.</i> , 2007, Yu <i>et al.</i> , 2010, Chesterfield <i>et al.</i> , 2012; Gharat e Rathod, 2013; Haigh <i>et al.</i> , 2013; 2014; Watanabe <i>et al.</i> , 2000, 2007.
Adsorção	<i>Candida sp.</i> 99-125	Banha de porco, resíduos de óleo de soja.	Metanol	> 87	Lu <i>et al.</i> , 2007, 2008, 2010; Liu <i>et al.</i> , 2014; Lv <i>et al.</i> , 2008; Nie <i>et al.</i> , 2006; Tan <i>et al.</i> , 2006.
Adsorção	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo Soja	Metanol	> 87	Iso <i>et al.</i> , 2001; Salis <i>et al.</i> , 2008;
Adsorção	<i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>E. aerogenes</i> lipase	Pinhão manso e óleo de Soja.	Etanol, Metanol, 2-butanol	> 98	Salis <i>et al.</i> , 2005; Shah e Gupta, 2007; Kumari <i>et al.</i> , 2009
Adsorção	<i>Porcine pancreatic</i> , <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Chrombacterium viscosum</i> ,	Óleo de soja, girasol, pinhão manso.	Etanol, metanol	> 80	Shah <i>et al.</i> , 2004; Shieh <i>et al.</i> , 2003; Yesiloglu, 2004, Soumanou e Bornscheuer, 2003
Ligação covalente	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Óleo de babaçu e canola	Etanol, metanol	> 97	Rodrigues <i>et al.</i> , 2011; Dizge <i>et al.</i> , 2009; Freitas <i>et al.</i> , 2009
Encapsulamento	<i>Pseudomonas cepacia</i> , NS44035	Óleo de soja, trioleína	Metanol, etanol	> 60	Meunier e Legge, 2010; Nouredini <i>et al.</i> , 2005
Ligação cruzada	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo de Mahua	Etanol	> 92	Kumari <i>et al.</i> , 2007

Conforme a tabela apresentada a produção enzimática do biodiesel pode ser realizada usando solventes orgânicos (geralmente hexano ou heptano) ou simplesmente usando a mistura dos substratos sem o uso de solventes (óleos ou gorduras e álcool). Neste último caso, é recomendado que o álcool seja adicionado em pequenas porções, de forma a manter baixas concentrações do mesmo, evitando assim a inativação da enzima. (Aarthy *et al.*, 2014).

Segundo Demirbas (2008) o aumento da quantidade de álcool adicionado além da concentração considerada ótima não melhora o rendimento em biodiesel, no entanto, às vezes apresenta-se como um impacto negativo sobre os custos de recuperação do álcool ao final do processo. Elevadas razões molares de álcool em relação ao óleo empregado, podem diminuir ou inibir a atividade catalítica da lipase além de interferir na separação de glicerol devido à sua solubilidade aumentada pelo álcool usado (Christopher *et al.*, 2014).

Shimada *et al.* (2002) apontaram a dificuldade na literatura da reutilização de enzimas no processo de transesterificação observando que o metanol insolúvel é o constituinte da reação que inativa irreversivelmente a lipase mesmo estando imobilizada na razão molar óleo/metanol 1:1. Dessa forma eles avaliaram a reação de metanólise em duas etapas empregando lipase de *Candida antarctica* imobilizada usando óleos de fritura. Na primeira etapa foi usado 1/3 de metanol da relação molar equivalente e na segunda etapa 2/3 da relação molar equivalente de metanol obtendo rendimentos maiores que 90% em biodiesel e a lipase imobilizada pode ser utilizada por 100 dias sem diminuição de atividade.

Rodrigues *et al.* (2008) descrevem em seu trabalho que temperaturas elevadas empregadas em processos químicos de transesterificação melhoram a miscibilidade entre o metanol e o óleo. Porém quando se utiliza um biocatalisador é necessário o uso de temperaturas mais brandas (30°C a 45°C) e isso por sua vez acaba não permitindo uma boa mistura do sistema reacional.

Assim conforme descrito ao longo deste capítulo, a razão molar de substrato é uma variável com grande influência na reação de síntese de

biodiesel. Álcool em excesso à razão estequiométrica de 3:1 é usado para assegurar uma alta taxa de reação e minimizar as limitações de difusão.

Entretanto, níveis excessivos de álcool podem inibir a atividade da enzima e assim diminuir sua atividade catalítica ao longo da reação de transesterificação. Assim, uma alta razão álcool:triglicerídeo significa uma maior polaridade do meio, produzida pelo álcool e pela água. Isso por sua vez inativa a enzima e, por consequência, reduz o rendimento de alquil ésteres (Rodrigues, 2009; Narasimharao *et al.*, 2007; Mata *et al.*, 2012).

Ésteres metílicos de ácidos graxos derivados de óleo de soja foram obtidos por Xu *et al.* (2003) com rendimentos de 92% em sistema livre de solvente usando as lipases de *Candida antarctica* (Novozym 435), *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL IM) e *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM). Estes rendimentos foram obtidos utilizando-se 30% de enzima em relação à massa de óleo e com razão molar metanol/óleo 12:1.

As mesmas três enzimas foram usadas por Rodrigues *et al.* (2008) na alcoólise dos óleos de soja, girassol e de arroz empregando metanol, etanol, propanol e butanol. Segundo os autores, cada lipase apresentou uma atividade de alcoólise mais elevada com um álcool diferente. Isso se deve a afinidade e interação química que cada enzima apresenta por um determinado tipo de álcool proporcional ao tamanho da cadeia carbônica destes alcoóis podendo assim as enzimas demonstrar um padrão cinético diferente dependendo do álcool usado.

Segundo os autores a Novozym 435 se mostra mais ativa na presença de alcoóis com baixo peso molecular como metanol e etanol, facilitando deste modo a sua capacidade de catalisar reações de metanólise ou etanólise. Já as enzimas Lipozyme TL-IM e Lipozyme RM-IM apresentam maiores rendimentos de conversão quando usado alcoóis de elevado peso molecular, possivelmente indicando que esta enzima é facilmente desativada por substratos com alcoóis de cadeia curta (metanol e etanol).

Novozym 435 apresentou maior atividade de metanólise na razão molar metanol/óleo 5:1. Lipozyme TL-IM apresentou maior atividade na etanólise, em uma razão molar etanol/óleo 7:1: e Lipozyme RM-IM apresentou

maior atividade na butanolise, a uma razão molar 9:1 butanol/óleo. A temperatura ótima para o desenvolvimento das reações foi na faixa de 30-35°C para todas as lipases.

Mais recentemente Maceiras *et al.* (2009), Hama *et al.* (2013) e Haigh *et al.* (2013) estudaram a produção enzimática de biodiesel em óleo de fritura por metanolise empregando a lipase Novozym 435 obtendo elevados rendimentos em ésteres metílicos (89%, 94% e 90%). Segundo os autores o uso da lipase resulta em uma grande diminuição na quantidade de metanol utilizado em relação ao método empregando-se catalisadores químicos. Entretanto esta redução muda a composição do meio reacional resultando em maior tempo de agitação para eliminar as limitações de transferência de massa.

Nelson *et al.* (1998) foram os primeiros a estudar a alcóolise enzimática de triglicerídeos com o objetivo de produzir biodiesel. Neste estudo foram empregados diferentes óleos e diferentes lipases em sistema livre de solvente. Na catálise enzimática a lipase de *M. miehei* foi mais eficiente para converter triglicerídeos em ésteres utilizando álcool primário com conversões superiores à 98% enquanto que a lipase de *C. antarctica* mostrou-se mais eficiente utilizando álcool secundário para conversão de biodiesel com conversões de aproximadamente 84%. Neste mesmo trabalho as enzimas foram usadas para transesterificação com os diferentes alcoóis, porém na presença de hexano como solvente. Conversões máximas de 94,8 – 98,5% foram obtidas nas reações com alcoóis primários, como metanol, etanol, propanol, butanol e isobutanol e 2-butanol empregando n-hexano como solvente.

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.

Dossat *et al.* (2002) realizaram estudo comparativo entre o uso e não de solvente em um sistema reacional de produção de biodiesel utilizando óleo de girassol e lipase comercial imobilizada (*Lipozyme IM*) como biocatalisador. Os rendimentos em éster do ácido oleico obtidos foram de 60% no meio

reacional sem a presença de solvente e 95% de conversão com o uso de solvente orgânico.

Shah *et al.* (2004) realizaram a transesterificação de óleo de pinhão manso utilizando as lipases de *Chromobacterium viscosum*, *Candida rugosa*, e de pâncreas suíno em um sistema livre de solvente. Apenas a lipase de *C. viscosum* apresentou um resultado satisfatório. Entretanto, essa mesma lipase foi imobilizada em Celite-545 e os rendimentos em biodiesel após transesterificação aumentaram de 62% para 71% após 8 horas de reação mostrando que a imobilização e a otimização das condições de transesterificação conduziram a bons resultados de rendimento em biodiesel.

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

Azócar *et al.* (2011) investigaram o uso da lipase Novozym 435 empregando um processo de transesterificação em meio anidro para produção de biodiesel com baixa acidez utilizando óleo de fritura e metanol. Segundo os autores um dos principais problemas na produção de biodiesel catalisada por lipases é a elevada acidez do produto final, causada principalmente pela presença de água no meio reacional produzindo reações paralelas de hidrólise e esterificação ao invés da transesterificação dos triglicerídeos. A reação em meio anidro ocasionou uma diminuição tanto no valor ácido quanto no teor de diglicerídeos do produto final melhorando consideravelmente o rendimento em biodiesel.

Embora os processos de transesterificação catalisados por enzimas ainda não estão comercialmente desenvolvidos, novos resultados foram reportados em artigos recentes empregando diferentes enzimas (Raman *et al.*, 2008; Talukder *et al.*, 2009, Shao *et al.*, 2008; Shah e Gupta, 2007; Talukder *et al.*, 2011, Nogueira *et al.*, 2010, Ríos *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011; Chesterfield *et al.*, 2012; Haigh *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014, Hama *et al.*, 2013; Gharat e Rathod, 2013). Os aspectos comuns nestes estudos consistem na

otimização das condições reacionais do processo (tipo de solvente, temperatura, pH, tipo de micro-organismo que produz a enzima, razão molar álcool/óleo, tempo de reação, etc), a fim de estabelecer as características adequadas para um processo de aplicação industrial. No entanto, os rendimentos e tempos da reação, ainda são desfavoráveis em comparação com os sistemas empregando catalisadores alcalinos. Isso leva à necessidade do uso de grandes quantidades de catalisadores, o que aumenta os custos de produção (Demirbas, 2007; Moreau, 2008).

Analisando a literatura, pode-se verificar que em muitos artigos, o uso de catalisadores enzimáticos para produção de biodiesel empregando lipases extracelulares na transesterificação, tem sido usado como uma alternativa que ajudaria a superar os problemas que são contínua e comumente associados à catálise homogênea alcalina.

Este argumento tem sido sistematicamente repetido na literatura, afirmando que o uso de biocatalisadores é atrativo, pois o biodiesel obtido enzimaticamente poderia ser usado diretamente sem a necessidade de nenhuma purificação (Fukuda *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2008). Entretanto, isso deve ser melhor avaliado, uma vez que mesmo se o rendimento de conversão em biodiesel fosse 100%, fato incomum na catálise enzimática até o presente momento, após a separação da glicerina, a fase que contém os ésteres deve ser submetida à evaporação para a completa remoção do álcool que foi usado em excesso (Talukder *et al.*, 2006).

Além desses pontos, existem tópicos que precisam ser mais bem estudados como, por exemplo, o efeito da água na reação de transesterificação enzimática. Segundo alguns trabalhos, um conteúdo de água mínimo de 0,48% em peso é necessário para promover a ativação das enzimas (Du *et al.*, 2004; Oda *et al.*, 2005) em função da formação de gotas água-óleo que aumentam a área interfacial disponível. Em contrapartida, o volume mínimo de água para essa ativação equivale a pelo menos dez vezes o teor de água permitido (500 ppm) para o biodiesel nas especificações de qualidade, (Dabdoub e Bronzel, 2009) o que poderia tornar necessária a adição de mais uma etapa no processo, a de secagem do biodiesel.

Conforme Talebian-Kiakalaieh *et al.* (2013), a quantidade de água, tipo de catalisador enzimático, temperatura, pH e álcool empregado são fatores fundamentais que afetam diretamente o rendimento nas reações de biodiesel.

Hsu *et al.* (2001) investigaram a produção de biodiesel a partir de resíduos de gordura com dois alcoóis (metanol e etanol) e enzima imobilizada (*Pseudomonas cepacia*). A transesterificação com metanol conduziu a conversões (47%-89%) enquanto que com o uso do etanol as conversões atingiram níveis melhores (84%-94%). Além disso, os autores relatam que a lipase imobilizada usando etanol pode ser utilizada por várias vezes sem sérias perdas de atividade catalítica.

Tamalampudi *et al.* (2008) compararam o uso da enzima *Rhizopus oryzae* imobilizada em partículas de poliuretano e a lipase comercial Novozym 435 na metanólise de óleo de pinhão manso. A presença de água no óleo demonstrou um efeito positivo na metanólise com a enzima imobilizada com rendimento máximo em ésteres de 89% com 5% (v/v) de água; entretanto com esta quantidade de água a atividade da lipase Novozym 435 foi inibida.

Outro ponto importante é que em meio aquoso as lipases promovem a hidrólise, que compete com a transesterificação, assim o teor de água deve ser cuidadosamente estudado para minimizar a hidrólise e maximizar a atividade enzimática para reação de transesterificação (Noureddini *et al.*, 2005, Aarthy *et al.*, 2014).

Além disso, o custo elevado desses biocatalisadores mesmo na forma imobilizada ainda faz com que este processo de transesterificação seja restritivo em termos econômicos para a aplicação industrial. Neste caso tem-se utilizado como justificativa o fato dos catalisadores enzimáticos imobilizados poderem ser reutilizados por vários ciclos sem perda de atividade ou com perda desprezível (Jegannathan *et al.*, 2008).

3.5. EMPREGO DO ULTRASSOM EM REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

Ultrassom é definido como som com frequência além da capacidade perceptível do ouvido humano. A frequência normal do som que pode ser detectado pela percepção humana esta entre 16 e 18 kHz, mas a frequência gerada pelo ultrassom geralmente situa-se entre 20 kHz e 100 MHz (Vyas *et al.*, 2010, Badday *et al.*, 2012).

Segundo Mason (2002) o ultrassom é uma onda mecânica que está no intervalo de frequência de 20 kHz a um limite superior que não é precisamente definido, mas geralmente é determinado para os gases em 5 MHz e de 500 MHz para líquidos e sólidos. O ultrassom é também definido como um fenômeno físico baseado no processo de criar, aumentar e implodir cavidades de vapor e gases, em um líquido promovendo efeitos de ativação em reações químicas.

Quando um líquido está sob influência do ultrassom de alta intensidade, as ondas sonoras se propagam no meio alternadamente, resultando em intervalos de alta e baixa pressão. Durante um intervalo de baixa pressão pequenas bolhas de vácuo são criadas no líquido. Quando estas bolhas atingem um volume que não podem mais absorver energia, elas colapsam violentamente gerando o fenômeno denominado cavitação (Hielscher, 2005).

A cavitação produz condições locais extremas, como aquecimento em torno de 5000 K, pressões de mais de 2000 atm, enormes taxas de aquecimento e resfriamento (>10⁹ K/s) e fluxos de mais de 400 Km/h (Stavarache *et al.*, 2005; Suslick e Skrabalak, 2008, Badday *et al.*, 2012).

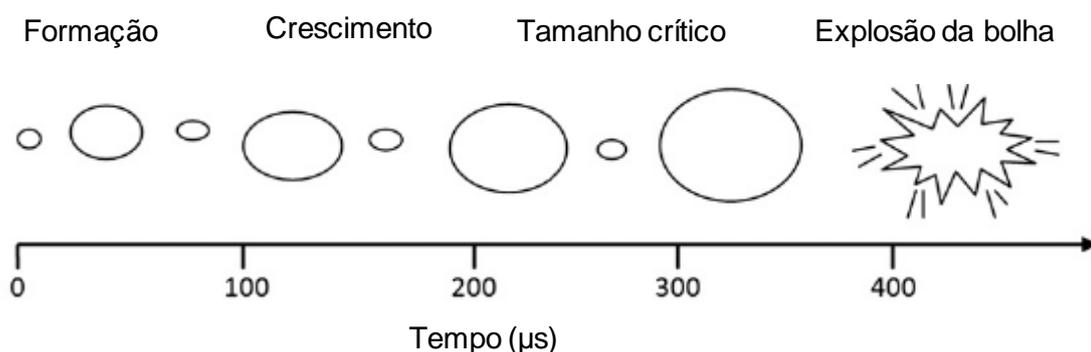
Esta onda de som de alta frequência comprime e estica o espaçamento molecular de um meio no qual ela passa. Assim, as moléculas serão continuamente vibradas e as cavidades serão criadas. Como resultado, finas microbolhas são formadas por meio de uma súbita expansão e violentamente colapsadas, gerando elevada energia por efeitos químicos e mecânicos (Colucci *et al.*, 2005).

Segundo Hielscher (2005) altas acelerações implicam em grandes gradientes de pressão que aumentam a probabilidade da criação de bolhas de vácuo e conseqüentemente a quantidade de cavitação. A amplitude da oscilação é proporcional à intensidade de aceleração.

O colapso assimétrico da cavitação das bolhas interrompe o limite de fase e começa instantaneamente a emulsificação. Em sistemas com líquidos imiscíveis este colapso pode promover uma altíssima agitação devido às condições extremas e às grandes velocidades alcançadas na implosão das bolhas que irão romper o limite de fases originando micro jatos de líquido de mais de 200 m/s levando instantaneamente desta forma a emulsificação do sistema. A causa para a geração de micro jatos é a repartição assimétrica das bolhas de cavitação. (Babiczy, 2009; Ji *et al.*, 2006, Badday *et al.*, 2012).

Conforme é demonstrado na figura 3 as bolhas são formadas no tempo zero e sofrem uma severa degradação após um período aproximado de 400 μ s. Pequenas áreas de tensão que são geradas a partir desses colapsos podem oferecer a energia necessária para a maioria das reações químicas (Badday *et al.*, 2012).

Figura 3. Formação, crescimento e colapso da bolha por cavitação em ultrassom. Fonte: (Badday *et al.*, 2012).



Segundo Liu *et al.* (2008) com o aumento na velocidade de formação de gotículas microscópicas e aumento da superfície de contato e das forças coesivas podem ser formadas ainda microemulsões.

Para o desenvolvimento das reações, as ondas ultrassônicas são geradas por transdutores ultrassônicos. Esses transdutores são feitos de materiais piezoelétricos que apresentam um fenômeno chamado efeito piezoelétrico. O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas. As chapas metálicas que envolvem a cerâmica amplificam estes sinais e o transdutor transmite os impulsos ultrassônicos ao meio reacional (Adewuyi, 2001).

O uso do ultrassom dentro de uma ampla faixa de frequência pode ser dividido em duas grandes áreas:

A primeira área envolve ondas de baixa amplitude e altas frequências e trata de efeitos físicos das ondas no meio, comumente referida como “baixa energia” ou “ultrassom de alta frequência”. Tipicamente, as ondas de alta frequência são usadas com propostas analíticas para medir a velocidade e coeficiente de absorção das ondas no meio no intervalo de 2 a 10 MHz. Essas medidas são informações que podem ser usadas nos diagnósticos de imagem para medicina e em análises químicas.

A segunda grande área envolve ondas de alta energia (baixa frequência), conhecido como ultrassom de alta energia, e encontra-se entre 20 e 100 kHz. É usada para limpeza, solda plástica e, mais recentemente, para sonoquímica. O intervalo para uso sonoquímico é estendido para 2 MHz com o desenvolvimento de equipamentos capazes de gerar cavitação dentro de sistemas líquidos em altas frequências (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).

Segundo Ji *et al.* (2006) a tecnologia ultrassônica tem sido reconhecida como um método eficaz para aumentar a taxa de transferência de massa entre fases imiscíveis líquido-líquido no interior de um sistema heterogêneo. Por isso,

esta técnica tem sido amplamente utilizada em várias reações químicas e biológicas para melhorar o rendimento dentro de um tempo de reação mais curto.

Quanto maior a intensidade, maior o tamanho das bolhas de cavitação o que conduz a um aumento da energia liberada durante o colapso. A propagação das ondas ultrassônicas é atenuada devido à vibração das moléculas do meio de propagação, como consequência ocorre o abaixamento da energia dessas ondas. Em líquidos mais viscosos ou com maior tensão superficial, a cavitação é mais difícil de ser produzida. Uma onda de pressão com maior amplitude (maior intensidade) é necessária para cavitatar o líquido, com isso a temperatura e pressão de implosão, respectivamente será maior, o que aumenta o efeito do colapso da bolha (Mason, 2002).

Tecnologia ultrassônica de transesterificação tem provado ser um recurso eficaz de mistura além de proporcionar a energia de ativação suficiente para iniciar a reação (Singh *et al.*, 2007).

Segundo Talebian-Kiakalaieh *et al.* (2013), o uso de energia ultrassônica no processo de produção de biodiesel é um procedimento novo, atraente e eficaz para resolver os problemas que são enfrentados por métodos convencionais. A irradiação ultrassônica pode aumentar a taxa de transferência de massa entre os reagentes que são líquidos imiscíveis e tem sido empregada por diversos autores da literatura (Thanh *et al.*, 2010; Babajide *et al.*, 2010; Hingu *et al.*, 2010; Somnuk *et al.*, 2012; Gude e Grant, 2013; Maddikeri *et al.*, 2013; Pal e Kachhwaha, 2013; Waghmare *et al.*, 2015; Hindryawati *et al.*, 2015; Pukale *et al.*, 2015) em uma ampla gama de processos químicos reduzindo significativamente o tempo de reação e melhorando o rendimento de produção de biodiesel. A eficiente mistura do óleo com o álcool ocasionado pelas ondas ultrassônicas de baixa frequência é um dos principais fatores deste aumento na conversão final (Ji *et al.*, 2006).

Em laboratório, o biodiesel pode ser produzido em baixas intensidades com banho ultrassônico (Stavarache *et al.*, 2005; Kelkar *et al.*, 2008), como também com a ponteira ultrassônica (Ji *et al.*, 2006).

Segundo Mason (2002) entre as vantagens e desvantagens do banho ultrassônico e ponteira ultrassônica podem-se destacar:

Banho ultrassônico: Vantagens

- Equipamento ultrassônico mais amplamente disponível;
- Boa distribuição de energia através das paredes do vaso de reação;
- Não necessita de uma adaptação especial para reação.

Desvantagens:

- Intensidade reduzida se comparado à ponteira ultrassônica;
- Frequência fixa;
- Controle de temperatura ausente ou, quando existe é de baixa precisão (oscilante);
- A posição da bandeja de reação em banhos pode afetar a intensidade de sonificação.

Ponteira ultrassônica: Vantagens

- Pode suportar altas intensidades de ultrassom ($10-1000 \text{ W cm}^{-2}$);
- A intensidade pode ser controlada.

Desvantagens:

- Frequência fixa;
- Dificuldade no controle da temperatura;
- Pode ocorrer erosão conduzindo à contaminação por partículas metálicas.

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

direto com o sistema reacional, por isso geralmente é mais eficiente (Barbosa e Serra, 1992).

O processo de produção de biodiesel utilizando ultrassom vem como alternativa ao processo convencional de produção que emprega agitação, 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 reduzindo em até 50% o seu consumo, reduzem o tempo de reação, reduzem a quantidade de reagentes (razão molar óleo/álcool e quantidade de catalisador), aumentam o rendimento e a seletividade da reação apresentado-se como um processo simples de purificação e separação do produto (Yu *et al.*, 2010; Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2013; Hindryawati *et al.*, 2015; Pukale *et al.*, 2015).

Conforme descreve Vyas *et al.* (2010) a transesterificação empregando a tecnologia do ultrassom não só reduz o tempo de reação, mas também minimiza a razão molar de álcool para óleo utilizada, possibilitando que a reação ocorra com baixíssimas concentrações de catalisador e reduzindo o consumo de energia em comparação com o método convencional de agitação mecânica.

Gude e Grant (2013) investigaram o efeito da sonificação direta por probe na conversão de óleo de fritura para biodiesel. Na condição otimizada após tempo de reação de 1 minuto, razão molar álcool/óleo (9:1) e 0,5% (m/m) de catalisador NaOH obteve-se rendimento em ésteres metílicos de 90%. Segundo os autores a vantagem da sonificação direta por probe é que elimina a necessidade de aquecimento externo devido ao aumento da temperatura gerada durante a mistura, além de a reação ser realizada em uma única etapa.

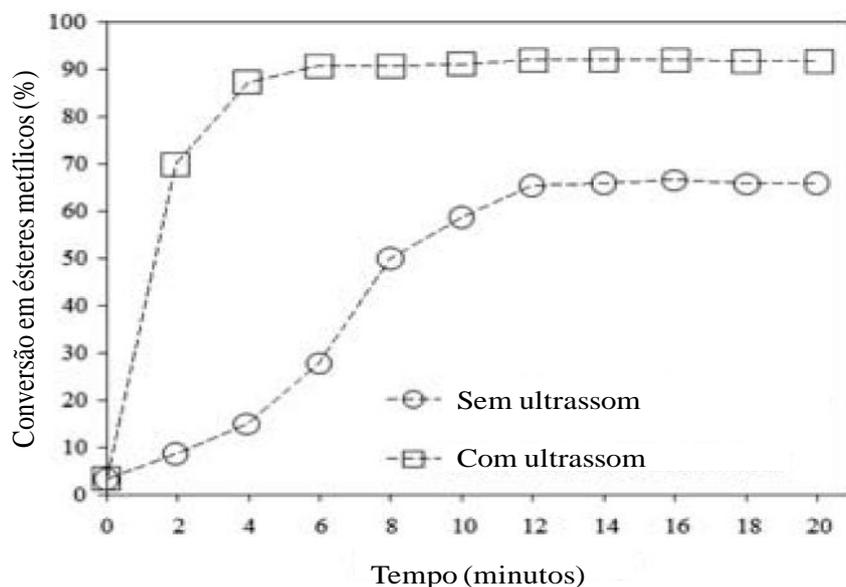
Pukale *et al.* (2015) também destacam em seu trabalho a eficiência do ultrassom no processo de transesterificação de óleo de fritura empregando K_3PO_4 como catalisador quando comparado ao processo convencional empregando agitação mecânica. Rendimentos em biodiesel de 92% foram obtidos em tempo de reação de 90 minutos, temperatura de 50°C e razão molar óleo/metanol (1:6). Este elevado rendimento pode ser atribuído ao efeito

cavitacional gerado pelo ultrassom que aumenta transferência de massa formando melhor emulsão entre os dois substratos (óleo/metanol).

Pal e Kachhwaha (2013) investigaram a produção de biodiesel empregando óleo de fritura e ultrassom de baixa frequência (28 – 33 kHz). Os experimentos foram realizados nas condições experimentais: razão molar álcool/óleo 6:1, 4,5:1 e três porcentagens (0,5%, 0,75% e 1,0%) do catalisador KOH. A condição otimizada conduziu a rendimentos de 95% em tempo reacional de 21 minutos, 0,5% de catalisador e razão molar 4,5:1. Segundo os autores o biodiesel produzido por energia ultrassônica mostrou ser um processo relativamente simples, eficiente, com tempo curto de reação, ecológico e industrialmente viável.

Somnuk *et al.* (2012) realizaram reação de transesterificação de óleo degomado e desacidificado de palma empregando ultrassom de baixa frequência (20 kHz) e potência de 100 W. Os resultados das conversões em ésteres metílicos com e sem o uso do ultrassom foram comparados e rendimento máximo de 92,5% em ésteres foram obtidos em tempo reacional relativamente curto de 6 minutos, temperatura de 45°C e 7 g de catalisador/litro de óleo (NaOH). Conversões de aproximadamente 65% sem o uso do ultrassom foram obtidas após tempo de reação de 12 minutos, mostrando assim que a irradiação do ultrassom reduz o tempo de reação e aumenta a conversão em ésteres conforme demonstrado na Figura 4.

Figura 4. Efeito da conversão de ésteres metílicos com e sem a presença de irradiação ultrassônica (45°C, 7 g catalisador NaOH/litro de óleo).



Fonte: Somnuk *et al.*, 2012.

Stavarache *et al.* (2005) observaram a influência do ultrassom de baixa frequência (28 e 40 kHz) em uma reação de transesterificação com razão molar álcool/óleo de 6:1 e compararam com o processo tradicional em batelada sob agitação de 1800 rpm. Os experimentos foram analisados para dois catalisadores (NaOH e KOH), os alcoóis empregados nas reações foram, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, iso-butanol e terc-butanol. Para reações com os alcoóis secundários constatou-se que a reação só ocorria mediante aplicação do ultrassom. Já para alcoóis terciários não foi observado conversão em nenhum caso. Para os demais alcoóis, os melhores rendimentos de um modo geral foram com metanol chegando a conversões entre 98-99% com 40 minutos de reação utilizando NaOH como catalisador reacional.

Siatis *et al.* (2006) empregaram o ultrassom para produção de metil ésteres de ácidos graxos (FAME) utilizando torta de sementes de algodão, girassol e gergelim. Segundo os autores os triglicerídeos contidos nas sementes foram extraídos e transesterificados utilizando metanol e uma solução de NaOH 1 mol/L.

O uso do ultrassom neste processo foi bastante significativo gerando rendimentos em tempos de 30 minutos de 85,5% para o óleo de algodão, 93% para óleo de girassol e 83,5% para o óleo de semente de gergelim.

As vantagens gerais desta metodologia incluem a eliminação da reação de saponificação, tempos curtos de reação, reação ocorre em condições brandas e o principal, os elevados rendimentos em ésteres metílicos.

Com o uso do ultrassom o biodiesel pode ser produzido sem aquecimento devido à cavitação que pode conduzir a um aumento localizado da temperatura no limite de fase e melhorar a reação (Leung *et al.*, 2010).

Ji *et al.* (2006) estudaram o método de produção de biodiesel com energia ultrassônica (19,7 kHz) em transesterificação utilizando óleo de soja e metanol como reagentes 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 5 pode-se observar que o rendimento de ésteres é obtido mais rapidamente para a reação assistida por ultrassom, se comparado ao processo reacional sob agitação mecânica.

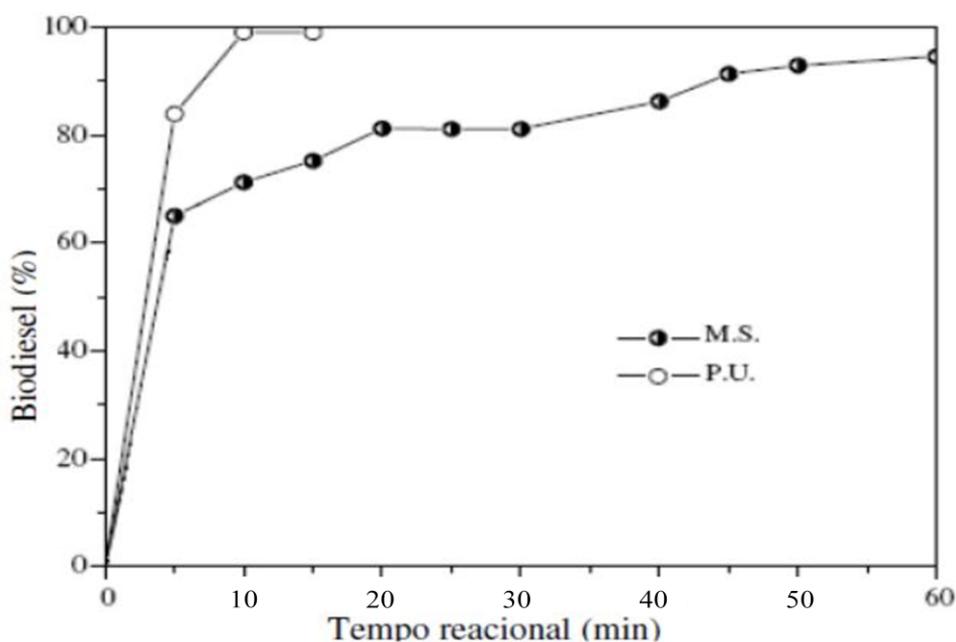
Esse fato é explicado pelo aumento do contato entre as fases álcool/óleo, reduzindo assim a barreira inicial da reação devido à imiscibilidade dos reagentes (Ji *et al.*, 2006).

Em um trabalho mais recente, Yin *et al.* (2012) compararam quatro diferentes métodos para melhorar a produção de biodiesel através da transesterificação do óleo de girassol, incluindo agitação mecânica, irradiação de ultrassom em placa plana, irradiação de ultrassom com agitação mecânica e irradiação por sonda de ultrassom variando a concentração molar metanol/óleo e concentração de catalisador (% em peso). Segundo os autores os métodos utilizando a sonda de ultrassom e a irradiação de ultrassom com agitação obtiveram os melhores rendimentos em biodiesel (95%) com razão molar metanol/óleo de 5:1, quantidade de catalisador (NaOH) de 1,5% (m/m) e tempo de reação de 25 minutos enquanto que as outras técnicas estudadas

necessitaram razões maiores (7:1) razão metanol/óleo e tempo de reação de 50 minutos.

Hindrayawati e Maniam, (2015) demonstraram o potencial do uso do ultrassom empregando resíduos de espoja marinha (Na-silica) como catalisador na transesterificação de óleo de fritura usando banho de ultrassom. Os resultados demonstraram rendimentos de $\pm 98\%$ em ésteres metílicos obtidos em temperatura de 55°C , razão molar 9:1, 3% (m/m) de catalisador e tempo reacional de 60 minutos. Ao final do processo o catalisador pode ser reutilizado por 7 ciclos mantendo conversões em ésteres metílicos de 86,3%.

Figura 5. Efeito entre o uso do ultrassom (PU) e processo reacional com agitação mecânica (MS) sobre os rendimentos de metil éster de ácidos graxos.



Fonte: Ji *et al.* (2006)

A transesterificação de ácidos graxos utilizando a técnica de ultrassom com catalisadores ácidos também é descrita pela literatura.

Hanh *et al.* (2009) estudaram a produção de etil ésteres de ácidos graxos utilizando ácido oleico com alcoóis de cadeia curta (etanol, propanol e butanol). Neste estudo, os autores variaram temperatura, razão molar álcool/ácido oléico, quantidade de catalisador (H_2SO_4) e tempo de irradiação no

ultrassom. As melhores condições experimentais foram: razão molar etanol/ácido oleico 3:1, 5% (m/m) de H₂SO₄, temperatura 60 °C com um tempo de ultrassom de 2 horas obtendo-se rendimentos de aproximadamente 94% em biodiesel.

Santos *et al.* (2010) empregaram a esterificação com a ajuda do ultrassom para produção de biodiesel a partir de óleo de peixe (*Oreochromis niloticus*). A reação foi realizada empregando frequência de 40 kHz em pressão atmosférica e temperatura ambiente. Os autores obtiveram rendimentos de 98,2% após 90 minutos de reação utilizando 2% de catalisador (H₂SO₄), temperatura de 30°C e razão molar metanol/óleo de 9:1. A título de comparação foi realizado um estudo utilizando processo de agitação mecânica nas mesmas condições experimentais. Os rendimentos obtidos ficaram abaixo em relação ao uso do ultrassom chegando a 83% de conversão em biodiesel.

Estes resultados mostram a eficiência do uso da tecnologia ultrassônica tanto na catálise básica quanto na catálise ácida em reações de transesterificação.

3.5.1. Produção enzimática de biodiesel em ultrassom

O uso de ultrassom em reações enzimáticas contribui para reduzir as limitações de transferência de massa substrato-enzima aumentando a velocidade da reação, mas ao mesmo tempo o aumento da temperatura promovido pela implosão das bolhas de cavitação, bem como altas tensões cisalhantes podem contribuir para a desativação da enzima ou proporcionar mudanças conformacionais na estrutura destas proteínas (Liu *et al.*, 2008; Suslick e Skrabalak, 2008).

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).

As ondas de ultrassom podem interferir nas características da enzima, alterando sua estrutura em resposta à perturbação dinâmica provocada pelo ultrassom.

Shah e Gupta (2008) reportaram em seu trabalho um aumento na conversão de ésteres de 34% para 79% empregando óleo de pinhão manso quando a lipase *Pseudomonas fluorescens* foi utilizada acompanhada do uso de irradiação ultrassônica em presença de solvente orgânico.

Waghmare *et al.* (2015) estudaram o uso do ultrassom na transesterificação de glicerol a glicerol carbonato empregando lipase comercial Novozyme 435 avaliando efeitos de temperatura, razão molar de substratos, quantidade de enzima e potência ultrassônica. Verificou-se que o uso do ultrassom se mostrou como uma potencial alternativa em relação ao método convencional sendo realizados os experimentos em condições de operação brandas: temperatura 60°C, razão molar de substratos de 3:1, 13% (m/m) de catalisador, potência de 100 W com conversão de 99,75% em tempo reacional de 4 horas. Empregando-se método convencional, conversões semelhantes foram obtidas somente após 14 horas de reação.

Özbek e Ülgen (2000) investigaram o efeito do ultrassom em seis enzimas: álcool desidrogenase (ADH), maleato desidrogenase (MDH), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), L-lactic desidrogenase (LDH), Fosfatase alcalina (AP) and β -galactosidase (β G) em sistemas aquosos. As enzimas apresentaram uma estabilidade variável. Apenas a fosfatase alcalina não apresentou desativação, enquanto a glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) apresentou mais de 70% de desativação para um minuto de exposição ao ultrassom.

Este estudo sugere diferentes comportamentos de enzimas em relação à influência do ultrassom, podendo em alguns casos ser um eficiente acelerador de reações chegando até a aumentar a atividade catalítica e em outros, ocasionar a total inibição do biocatalisador.

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 com enzimas, o ultrassom tem mostrado um aumento na estabilidade e atividade catalítica da enzima, bem como a longevidade de biocatalisadores enzimáticos (Rokhina *et al.*, 2009).

Segundo Veljkovic *et al.* (2012) poucos trabalhos foram encontrados na literatura acerca da influência do ultrassom nas reações enzimáticas para produção de biodiesel.

Até o presente momento apenas a Novozym 435, uma lipase comercial preparada da *Candida antarctica* imobilizada em resina poliacrílica, foi testada em estudos para reação de transesterificação de óleo de soja e resíduos de óleos com índice de ácidos elevados utilizando ultrassom e os alcoóis metanol e propanol (Veljkovic *et al.*, 2012).

Trabalhos da literatura (Wang *et al.*, 2007; Sinisterra, 1992; Lin *et al.*, 1995, Shah e Gupta, 2008; Yu *et al.*, 2010, Yin *et al.*, 2012, Gharat e Rathod, 2013; Waghmare *et al.*, 2015) relatam que a atividade da enzima Novozym 435 nas reações de transesterificação é aumentada pela irradiação do ultrassom.

Wang *et al.* (2007) exploraram o potencial da tecnologia de ultrassom em transesterificação enzimática de resíduos de óleo com elevado índice de acidez. A lipase comercial imobilizada Novozym 435 derivada de *Candida antarctica* foi utilizada como biocatalisador no sistema.

Verificou-se que a atividade enzimática foi aumentada com a ajuda da frequência baixa e a energia branda das ondas do ultrassom. Sob as condições ótimas de reação do ultrassom, tais como a quantidade de 8% (m/m) de Novozym 435 em relação ao óleo, uma razão molar de propanol/óleo de 3:1, frequência ultrassônica de 28 kHz e potência de 100 W, temperatura da reação a 40-45°C, conversão total de biodiesel (propil oleato) de 94,86% foi alcançada em apenas 50 minutos. Também se percebeu que alcoóis de cadeia linear curta e ramificada (C₁ – C₅) apresentam maiores índices de conversão para alquil ésteres de ácidos graxos (FAAE).

Além disso, a onda de ultrassom tende a reduzir a adsorção de biodiesel e glicerol sobre superfície da Novozym 435 imobilizada. Como resultado, a Novozym 435 pode ser reciclada para novas utilizações apresentando boa aparência, nenhuma aglomeração, fácil lavagem e boa estabilidade operacional.

Yu *et al.* (2010) estudaram a produção de biodiesel com óleo de soja e metanol através da transesterificação utilizando Novozym 435 e empregando

irradiação ultrassônica. A irradiação ultrassônica aumentou significativamente a atividade da Novozym 435. A taxa de conversão de biodiesel com o uso do ultrassom alcançou rendimento de 96% de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) em 4 horas. A condição otimizada para obtenção deste resultado: potência do ultrassom de 50% (500 W e frequência de irradiação de 40 kHz), vibração de 50 rpm, teor de água de 0,5%, razão em volume álcool terc-amil/óleo 1:1, razão molar metanol/óleo 6:1, 6% de Novozym 435 e temperatura de 40 °C.

Além disso, após cinco ciclos de reuso, a Novozym 435 não apresentou perda significativa da atividade, o que sugere que a enzima é estável sob as condições do ultrassom. Este resultado indica que a tecnologia ultrassônica é um método eficiente e rápido para produção de biodiesel.

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 em sistema de ultrassom. Foi avaliado o efeito do tempo (20-35 minutos), 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 minutos de reação, razão molar óleo/metanol de 1:4, concentração do catalisador de 5%, ultrassom com amplitude de 50% e ciclos cavitacionais de 0,7 s. Nestas condições otimizadas obteve-se o rendimento máximo $\geq 84,5\%$ de biodiesel.

Batistella *et al.* (2012) realizaram o estudo da produção enzimática de biodiesel utilizando ultrassom em sistema com solvente orgânico. Neste trabalho os autores estudaram a transesterificação do óleo de soja com etanol utilizando duas lipases comerciais imobilizadas (Novozym 435 e Lipozyme RM IM) em um sistema utilizando n-hexano como solvente e sob a influência de um banho de ultrassom. Os resultados apresentaram conversões próximas a 90% para a Lipozyme RM IM e 60% para Novozym 435 com potência de irradiação ultrassônica de 100 W, temperatura de 60°C e tempo reacional de 4 horas.

Trentin *et al.* (2012) e Popiolski (2011) realizaram processo de produção de biodiesel enzimático em sistema livre de solvente em banho de

ultrassom em modo batelada e modo contínuo empregando como substrato óleo de soja e etanol. No modo batelada os autores realizaram um estudo cinético nos intervalos de tempo de 15 minutos a 8 horas para determinar o melhor tempo reacional. Após realizaram um delineamento de Plackett & Burman com 12 ensaios, avaliando-se as 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); potência 40, 70 e 100% e concentração de água de 5% a 10% (m/m). A melhor conversão em biodiesel foi de 68%, atingida no tempo de 60 minutos, razão molar óleo/etanol 1:3, temperatura de 70 °C, 40% de potência do ultrassom de 132 W e 20% (m/m) de concentração de enzima. Para o modo contínuo de produção em leito empacotado verificaram-se conversões em biodiesel de 70% em 30 minutos de reação, razão molar óleo/etanol 1:3, temperatura de 65 °C e 40% de potência da capacidade do ultrassom de 132 W. Em relação ao estudo de reuso da enzima Novozym 435 os autores verificaram que a mesma manteve sua atividade durante dois ciclos, após o terceiro ciclo houve um declínio da atividade da lipase.

Gharat e Rathod (2013) estudaram o uso da lipase *Novozym 435* na transesterificação de óleo de fritura com dimetil carbonato empregando irradiação de ultrassom em sistema livre de solvente. Os experimentos foram conduzidos em banho de ultrassom e agitação mecânica para comparar os efeitos na conversão de ésteres metílicos. Em mesmo tempo reacional de 4 horas as conversões da transesterificação enzimática foram de 39% com agitação mecânica (método convencional) e 58% com o uso do ultrassom. Um teste adicional somando o uso do ultrassom a agitação mecânica apresentou considerável aumento no rendimento com conversão de 86% em ésteres metílicos. Entretanto após alguns ciclos da lipase *Novozym 435*, observou-se um declínio gradativo da conversão bem como da atividade enzimática.

Em um trabalho mais recente, Trentin *et al.* (2014) investigaram a esterificação de ácidos graxos de óleo de soja empregando a lipase *Novozym 435* em processo contínuo utilizando banho de ultrassom. Na condição otimizada empregando potência ultrassônica de 61,6 W, razão molar ácido graxo/etanol 1:6 e temperatura operacional de 65 °C após 6 minutos de reação

conversões de aproximadamente 98% foram obtidas mantendo-se essa conversão estável por mais de 60 minutos sem a enzima apresentar perda significativa de sua atividade catalítica.

O uso do ultrassom empregando enzimas também é aplicado em outros processos reacionais.

Babicz (2009) utilizou banho de ultrassom na reação de hidrólise enzimática de óleo de palma obtendo 30% de conversão de diacilglicerídeos (DAGs) para a reação sem a influência de ultrassom e 47,8% utilizando o ultrassom no sistema reacional.

Fiametti *et al.* (2011) investigaram o uso do ultrassom nas reações de glicerólise enzimática de azeite de oliva, em sistemas com e sem surfactantes à temperatura de 65°C, utilizando a lipase Novozym 435. Os resultados obtidos foram de 65% nas obtenções de diacilglicerídeos e triacilglicerídeos (DAGs+TAGs).

De uma maneira geral a produção enzimática de biodiesel por ultrassom vem atraindo considerável interesse, uma vez que os triglicerídeos, bem como ácidos graxos livres podem ser eficientemente transformados em biodiesel, aumentando a velocidade dos produtos formados por conta do aumento da transferência de massa entre os substratos, além de esta técnica ser altamente seletiva envolvendo baixo consumo energético e fácil operação, produzindo menos resíduos ou subprodutos que o método convencional sendo assim considerada uma tecnologia “verde”. Também, nenhuma operação complexa é necessária para recuperar o glicerol, eliminar o catalisador e o sal formado em comparação com os métodos utilizando catálise química (Yu *et al.*, 2010; Lerin *et al.*, 2014; Nielsen *et al.*, 2008).

Apesar de ainda haver poucos trabalhos na literatura apresentados até o presente momento sobre as aplicações de irradiação de ultrassom na produção de biodiesel catalisada por lipases, as vantagens relacionadas pelo uso do ultrassom como: redução do tempo de reação; redução da quantidade de reagentes empregados, baixo consumo energético e aumento de rendimentos ocasionados pela melhor transferência de massa entre os substratos, somada as vantagens do uso das lipases imobilizadas tornam o uso

desta tecnologia um método bastante promissor para produção de biodiesel, uma vez que 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 a diminuição da concentração de lipase no meio reacional (Liu *et al.*, 2008).

3.6. ÓLEO DE FRITURA: FONTE ALTERNATIVA PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Entre as principais fontes de matéria-prima oleaginosa para a produção de biodiesel estão os óleos de canola, palma, girassol e óleo de soja. No entanto, a disponibilidade destas para serem utilizadas na produção de biodiesel é limitada devido à concorrência que as mesmas possuem com os mercados de óleo comestível e o conseqüente aumento de preços envolvidos no processo (moagem, extração, transporte) (Kansedo *et al.*, 2009).

Um grande desafio econômico na matriz energética para a comercialização de biodiesel é o custo elevado de óleos vegetais na sua forma purificada, o que neste caso, representa um custo global entre 70% e 85% da produção de energia através do uso desta matéria prima (Haas e Foglia, 2005).

Além disso, a produção de biodiesel a partir de óleo comestível causa impactos negativos no meio ambiente, uma vez que requer grandes quantidades de terras disponíveis para o plantio de matérias primas oleaginosas. Assim, a busca de novas fontes de produção de biodiesel se faz necessário, como por exemplo, o óleo residual de fritura que pode ser adquiridos sem nenhum custo (Guabiroba e D'Agosto, 2009; Ruiz-Mendez *et al.*, 2008).

Patil (2012) reporta em seu estudo que aproximadamente 4,1 kg de resíduo de óleo de cozinha são gerados por pessoa anualmente. Considerando o cenário atual da população mundial com aproximadamente 7,2 bilhões de habitantes, cerca de 29 milhões de toneladas de óleo de cozinha usado é produzido anualmente. Desta forma o descarte de todo esse óleo residual

acaba tornando-se algo complicado devido a sua baixa importância comercial para outras aplicações e possível poluição de terras e fontes de água.

Assim todos esses fatos indicam que o óleo de cozinha usado deve ser reciclado de alguma forma e uma das opções é o seu uso como uma possível fonte potencial para a produção de biodiesel (Maddikeri *et al.*, 2013).

Existem basicamente dois destinos possíveis para os óleos residuais de fritura: sistemas de esgoto, causando um grave impacto ambiental com a poluição da água gerando conseqüentemente um elevado custo para o seu tratamento e o processamento de reciclagem com o uso de equipamentos e técnicas que podem transformar os resíduos gordurosos em um novo produto. Porém quantidades consideráveis destes resíduos ainda são descartados de forma incorreta na maioria dos lugares onde são produzidos, como cadeias de fast food's, bares e restaurantes, os quais vêm aumentando de forma gradativa devido ao crescimento da população brasileira (Enweremadu e Mbarawa, 2009).

Desta forma o óleo de cozinha usado é considerado uma matéria-prima de baixo custo, facilmente disponível, e a sua utilização na síntese de biocombustíveis oferece benefícios na conservação do meio ambiente com a diminuição de gases poluentes e contaminantes de águas e solo (Tan *et al.*, 2011; Noshadi *et al.*, 2012; An *et al.*, 2013).

Além disso, o emprego de óleo de cozinha usado em reações de transesterificação gera benefícios econômicos consideráveis, originando reduções de até 45% dos custos diretos de produção de biodiesel, em comparação com o uso de óleos virgens como o de soja, mesmo com os custos adicionais de pré-tratamento. Outro fator importante está relacionando a disponibilidade de matérias-primas, indicando que o óleo de cozinha usado apresenta um potencial para suprir de 15 a 20% da demanda de biodiesel no Brasil (Araujo *et al.*, 2013).

Entretanto infelizmente, o óleo de fritura muitas vezes contém alta carga de ácidos graxos livres e umidade decorrentes da sua utilização em casas, restaurantes e indústrias de alimentos. Assim é necessário um processo de duas etapas de transesterificação (esterificação de ácido graxo seguido por

transesterificação da base esterificada), para remover o elevado teor de ácidos graxos livres e para melhorar o rendimento final de biodiesel (Patil *et al.*, 2012).

De acordo com a Oil World (empresa alemã especializada em oleaginosas), o Brasil produz atualmente, 9 bilhões de litros de óleos vegetais por ano, sendo 1/3 (3 bilhões de litros) deste volume produzido destinado aos óleos comestíveis. Cada pessoa consome em média 20 litros de óleo vegetal por ano no Brasil. Dessa quantidade imensa de óleo comestível produzido, apenas 3% (aproximadamente 6,5 milhões de litros) do óleo usado é descartado de forma correta e coletado. O restante, 200 milhões de litros de óleo usado, é despejado em rios e lagos, fato que acaba comprometendo o meio ambiente. Se coletado, este volume poderia colaborar com 80% da produção do B5 aqui no Brasil com um custo 25% reduzido (Ecóleo, 2014).

Entretanto, a utilização de óleos residuais de fritura no Brasil em escala industrial na produção de biodiesel ainda é limitada pela pequena escala de coleta e armazenamento do óleo descartado, como apresentado em pesquisa do Instituto de Eletrotécnica e Energia (IEE) da USP. O estudo desenvolvido mostra que a produção evita que os resíduos poluam o meio ambiente.

No entanto, para isso ser possível são necessárias mudanças no processo de produção do biocombustível para viabilizar e ampliar o aproveitamento do óleo.

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), de janeiro a agosto de 2012, cerca de 0,5% do biodiesel produzido no Brasil foi proveniente de óleos residuais, volume que equivale a aproximadamente 10,1 milhões de litros de combustível. Os óleos residuais provenientes de processos de fritura são rejeitos produzidos diariamente nos grandes centros urbanos, tanto em estabelecimentos comerciais (como bares, padarias, restaurantes, hotéis, shoppings, redes de fast-food, etc) como também nas residências (Guabiroba, 2009; USP, 2014).

Do ponto de vista econômico a produção de biodiesel derivado de óleos virgens não é economicamente viável devido ao alto custo das matérias-primas, a elevada energia necessária para produção e a difícil separação dos

catalisadores homogêneos geralmente usados no processo (Maddikeri *et al.*, 2013).

Comparado ao diesel derivado do petróleo, o alto custo para produção do biodiesel é uma grande barreira para a sua comercialização. O custo é cerca de aproximadamente 1,5 vezes maior que do diesel à base de petróleo, dependendo do tipo de óleo utilizado como matéria-prima (Prokop, 2002; Demirbas, 2008).

Uma estratégia amplamente aceitável para reduzir o custo de produção do biodiesel é minimizar os custos de matéria-prima. Assim o uso de óleo de fritura para a produção de biodiesel, tem sido uma forma eficaz de reduzir os custos de matéria-prima, além de trazer substanciais benefícios ambientais, fornecendo uma alternativa ambientalmente correta para a disposição final do óleo usado previamente descartado diretamente no meio ambiente (Enweremadu e Mbarawa, 2009; Zhang *et al.*, 2003).

A Tabela 6 apresenta algumas comparações entre as vantagens e desvantagens do uso de óleos de fritura e óleo virgem como matérias primas para produção de biodiesel.

Tabela 6. Comparação de matérias primas para transesterificação: óleo de fritura X óleo virgem e uso de aquecimento não convencional (ultrassom) X aquecimento convencional (agitação convencional).

Óleo de fritura		Óleo virgem	
Vantagens	Desvantagens	Vantagens	Desvantagens
Baixo custo (matéria prima grátis ou baixo custo)	Índice elevado de ácidos graxos livres	Índice baixo de ácidos graxos livres	Alto custo da matéria prima (80% do custo total do produto)
Diminui poluição ambiental	Alto custo de processamento	Baixo custo de processamento	Gera poluição ambiental proveniente do cultivo, fertilizantes e processamento.
Razão de energia líquida alta			Razão de energia líquida baixa
Aquecimento não convencional		Aquecimento convencional	
Alta eficiência (acima 75%) Baixo uso de produtos químicos Baixo consumo de energia devido ao processamento fácil e rápido Controle do processo fácil e preciso	Elevado custo capital (tecnologia cara e ainda pouco conhecida) Planta de pequena escala	Planta de larga escala Baixo custo capital Processo bem conhecido e fontes de calor estabelecidas	Baixa eficiência (~ 35%) Elevado uso de produtos químicos Elevado consumo energético devido a condições severas de operação Controle do processo complexo

Fonte: Gude e Grant, 2013.

Além disso, tecnicamente, os métodos para a produção de biodiesel a partir de óleo de fritura não diferem dos processos de transesterificação convencionais usando catalisadores alcalinos, ácidos ou enzimáticos. Dependendo dos componentes indesejáveis presentes no óleo (em particular ácidos graxos livres e água), que retardam a reação ocasionando a diminuição do rendimento final do produto, cada catalisador têm suas vantagens e desvantagens no processo. Portanto, tendo em conta a qualidade do óleo a ser empregado, uma fase de pré-tratamento da matérias-prima às vezes, pode ser necessária com intuito de cumprir os padrões de qualidade exigidos para a reação de transesterificação (Araújo *et. al.*, 2013; Yaakob *et. al.*, 2013).

Segundo Araújo *et al.* (2013) o uso de catalisadores alcalinos nas reações de transesterificação é a técnica mais comumente empregada pela indústria atualmente, sendo o hidróxido de potássio (KOH) o catalisador mais

recomendado para as reações empregando-se óleo de cozinha usado devido a sua baixa acidez. Em caso de óleos processados com quantidade de água e índice de acidez mais elevado, são recomendadas técnicas de pré-tratamento para o uso deste catalisador ou o uso de outros tipos de catalisadores tais como os ácidos sólidos.

Entretanto, as desvantagens deste processo é o aumento do custo, por causa do uso de um catalisador adicional, maior tempo de reação e baixa recuperação do catalisador utilizado (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Patil *et al.*, 2012;). Também as taxas mais baixas na síntese do biodiesel derivado de óleos residuais de cozinha têm sido tipicamente atribuídas às limitações de transferência de massa, devido muitas vezes as condições heterogêneas existentes entre os substratos durante a reação de transesterificação (Hingu *et al.*, 2010).

A transesterificação com o auxílio de ultrassom pode amenizar esses problemas e o seu uso empregando óleo de fritura encontra-se vastamente reportado na literatura (Hingu *et al.*, 2010; Thanh *et al.*, 2010; Gole e Gogate, 2012; Patil *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012; Gharat e Rathod, 2013; Pal e Kachhwaha, 2013; Gude e Grant, 2013; Maddikeri *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2014; Maddikeri *et al.*, 2014; Pukale *et al.*, 2015; Hindryawati e Manian, 2015).

A transesterificação de óleos de cozinha usado empregando ultrassom mostra-se como uma forma muito eficiente de transesterificação devido ao aumento de transferência de massa/calor e os efeitos térmicos/atérmicos específicos a nível molecular. Assim, o consumo energético e químico no processo global é bastante reduzido (Gude e Grant, 2013).

Além disso, o uso do ultrassom promove um processo mais simples de operação com maior pureza do produto final e com baixo consumo de energia, sendo que, o processo pode ser realizado em menor tempo reacional reduzindo ou até eliminando totalmente a quantidade de solvente a ser utilizado, em comparação com os métodos convencionais empregando-se agitação mecânica e aquecimento (Gude e Grant, 2013).

Segundo Gogate (2008) e Kelkar *et al.*, 2008) a utilização de reatores sonoquímicos pode favorecer consideravelmente a reação química na síntese

de biodiesel melhorando a propagação dos substratos por meio de transferência de massa e a interface entre as fases da mistura diminuindo também a exigência de condições de operação mais severas em termos de temperatura e de pressão.

Segundo Gude e Grant (2013) o uso de um reator pequeno para a reação de transesterificação em óleos residuais pode melhorar em geral a eficiência do ultrassom devido ao aumento da densidade de energia e intensidade ultrassônica aplicada sobre o substrato.

A Tabela 7 apresenta alguns trabalhos da literatura realizados na produção de biodiesel utilizando óleo de fritura com o auxílio do ultrassom.

Tabela 7. Produção de biodiesel á partir de óleos residuais empregando tecnologia de ultrassom.

Álcool	Catalisador	Rendimento	Referência
Metanol	KOH	87%	Hingu <i>et al.</i> , 2010
Metanol	NaOH	96%	Yin <i>et al.</i> , 2014
Metanol	Na-Silica	86% - 98%	Hindryawati e Manian, 2015
Metanol	K ₃ PO ₄ , Na ₃ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄	92%, 81%, 70%, 63%	Pukale <i>et al.</i> , 2015
Metil Acetato	Metóxido de Potássio, KOH	90% - 86%	Maddikeri <i>et al.</i> , 2014
Metanol	NaOH	88% - 90%	Gude e Grant, 2013
Dimetil carbonato, Metanol	Novozym, 435	57% - 86%	Gharat e Rathod, 2013
Metanol	KOH	90% - 95%	Pal e Kachhwaha, 2013
Metil acetato	Metóxido de Potássio	90%	Maddikeri <i>et al.</i> , 2013
Metanol	NaOH	97%	Lin <i>et al.</i> , 2012
Metanol	KOH, BaO	96% - 92%	Patil <i>et al.</i> , 2012
Metanol	KOH	81% - 98%	Thanh <i>et al.</i> , 2010

Conforme o estudo desenvolvido neste trabalho, artigos recentes destacam a importância da tecnologia de ultrassom no processo de transesterificação com óleo de fritura derivado de soja.

Hindryawati e Manian (2015) realizaram o estudo de transesterificação em óleo de fritura com metanol empregando tecnologia de ultrassom na forma de banho (42 kHz) utilizando resíduos de esponja marinha (Na-silica) como catalisador. Os rendimentos em ésteres metílicos foram de 98% após uma hora de reação em temperatura de 55 °C, razão molar óleo/metanol 1:9 e 3% de catalisador (m/m). Segundo os autores o catalisador pode ser reutilizado por até sete ciclos, mantendo o teor de ésteres metílicos de 86,3%.

Pukale *et al.* (2015) estudaram a transesterificação de óleo de fritura com auxílio de ultrassom em forma de sonda empregando catalisadores heterogêneos (K_3PO_4 , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4) e metanol. Os resultados mostraram que o trifosfato de potássio apresentou elevada atividade catalítica para a transesterificação de resíduos de óleo de cozinha com conversões em biodiesel de 92% em tempo reacional de 90 minutos, 3% K_3PO_4 (m/m), 50 °C e razão molar óleo/metanol 1:6. Segundo os autores, este rendimento mais elevado foi obtido na presença de ultrassom o que pode ser atribuído aos efeitos cavitacionais gerados durante o processo. Em comparação com a abordagem convencional, nas mesmas condições experimentais o rendimento em ésteres metílicos obtido foi de 65%.

Gole e Gogate (2012), em seu trabalho de síntese de biodiesel utilizando óleo de fritura em reatores sonoquímicos, relatam que o tempo reacional, a temperatura e o percentual de reagentes necessários nas reações de esterificação e transesterificação foram substancialmente menores quando utilizado reatores sonoquímicos em comparação com método convencional levando a economia de energia na posterior separação de processos para obter o produto purificado.

Resultados semelhantes são apresentados por Pal e Kacchwaha (2013) onde os autores destacam que a produção de biodiesel empregando óleo de cozinha usado e energia de ultrassom demonstrou ser um processo eficiente, viável e relativamente simples gerando economia de tempo e energia além de apresentar-se como um processo ambientalmente limpo melhorando a redução de poluentes durante a operação de motores com biodiesel em relação ao diesel de petróleo.

Portanto, de um modo geral, a utilização de resíduos de óleo de fritura agregada à tecnologia de ultrassom para a produção de biodiesel mostra-se com uma alternativa promissora, uma vez que conforme apresentado anteriormente combina os aspectos econômicos, devido ao uso de um óleo com baixo custo de aquisição colaborando também com a preservação do meio ambiente, uma vez que evita a contaminação de solos, rios e fontes de águas e ao mesmo tempo, gera a produção de um combustível renovável menos poluente na formação de gases de menor impacto ambiental.

3.7. MACAÚBA [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart]

Em face à crescente demanda mundial por óleos vegetais para os mais variados fins, as palmeiras produtoras de frutos com alto teor de óleo passaram a ter uma importância crescente. As palmas representam os principais símbolos de florestas tropicais. Isto porque a maioria das espécies existentes ocorre exclusivamente nos trópicos, representando uma das maiores famílias de plantas, tanto em riqueza quanto em abundância, ocupando quase todos os habitats. No Brasil, 119 espécies estão distribuídas, pertencentes a 39 gêneros, entre elas a palma (mais conhecida como palmeira do dendê), a macaúba, o mucujá, dentre outras (Gorret *et al.*, 2004).

A *Acrocomia aculeata* foi primeiramente descrita por Jacquin em 1763 tendo como basônimo *Cocos aculeatus* Jacq.. Em 1824, foi inserida por Martius no gênero *Acrocomia*, sendo designada com *Acrocomia sclerocarpa*. Posteriormente, em 1845, Loddiges coloca ambos em sinônimo, designando-a como *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. (Missouri, 2005 apud Lisingen e Cervi, 2009).

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. Ex Mart. (macaúba) é uma palmeira nativa das florestas da América tropical e subtropical que habita áreas abertas com alta incidência solar como algumas regiões brasileiras, adaptando-se a solos arenosos e com baixo índice hídrico. Porém, desenvolve-se melhor em locais onde há solos férteis em regiões com estação chuvosa bem definida e

de baixas altitudes ocorrendo da extensão do México e Antilhas até o Paraguai, Bolívia e Argentina (Motta *et al.*, 2002)

No Brasil, a *Acrocomia aculeata* é conhecida por vários nomes, entre eles: bocaiúva, chiclete-de-baiano, coco-baboso, coco-de-espinho, macacauba, macaíba, macaibeira, macajuba, macaúba, macaúva, mucajá, e mucajaba (Lorenzi, 2006; Miranda *et al.*, 2001). Esta espécie de palmeira é encontrada em quase todo o território brasileiro com menores formações nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina devido ao clima. As maiores concentrações estão localizadas em São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e região norte do país (Henderson *et al.*, 1995, Fortes e Baugh, 1999). No estado de Minas Gerais, é encontrada em grande quantidade no Alto do Paraíba, na região de Montes Claros, no norte de Minas e na Zona Metalúrgica, próximo a Belo Horizonte (Motta *et al.*, 2002).

Segundo Melo (2012) há uma estimativa de aproximadamente 11,6 milhões de hectares plantados onde a Macaúba encontra-se presente, apresentando uma imensa potencialidade para produção de óleo como fonte de energia renovável como mostra a figura 6.

Figura 6. Mapa de regiões que possuem maior ocorrência de plantações de Macaúba no Brasil.



Fonte: Melo, (2012).

Macaúba (*Acrocomia aculeata*) apresenta um grande potencial para a produção de óleo, sendo superada apenas pelo óleo produzido da palma Africana (*Elaeis guineensis*). Estudos sobre o uso de óleo de macaúba para biocombustíveis estão em desenvolvimento, e os coprodutos do processamento do óleo são excelentes fontes nutricionais utilizado em alimentos e rações para animais (Machado *et al.*, 2015).

Se apenas 1% do território brasileiro for plantado com Macaúba, em aproximadamente 8,5 milhões de hectares poderemos produzir:

- 34 bilhões de litros de óleos vegetais, para produção de biodiesel, bioquerosene, e insumo como matéria prima para a indústria química;
- 40 milhões de toneladas de torta proveniente do esmagamento dos frutos da macaúba com fonte de matéria prima para rações para a pecuária;
- 12,3 milhões de toneladas de carvão de alto teor calorífico;
- 3,9 milhões de toneladas de farelo de castanha de macaúba com alto teor protéico para consumo humano;
- Geração de renda para 850.000 famílias, além de imensos benefícios ambientais como o sequestro de carbono e a recuperação de áreas degradadas pela produtividade de extrativismo.

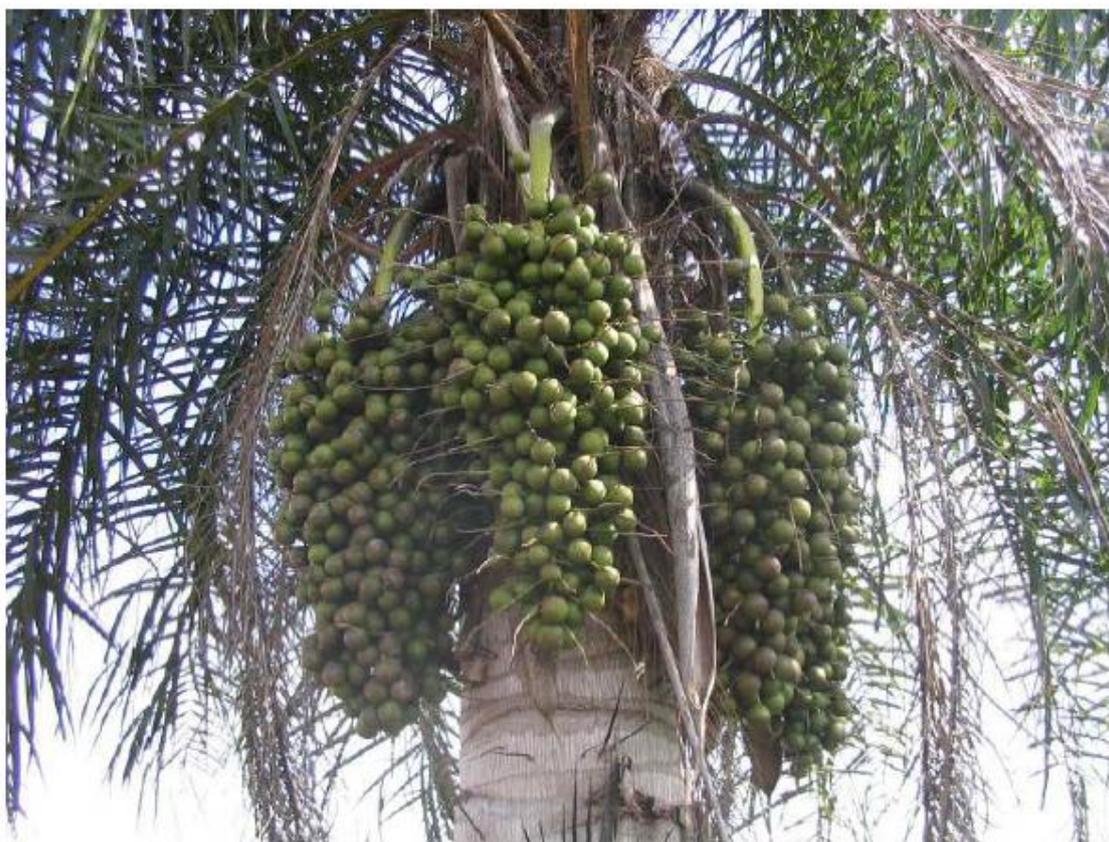
Além disso, a macaúba representa um imenso desenvolvimento para a indústria nos vários segmentos sendo que a polpa pode ser utilizada na produção de alimentos e tônicos, e o óleo, além da sua potencial utilização na produção de biodiesel, também tem propriedades anti-inflamatórias. A amêndoa tem uso diversificado na alimentação animal, e o óleo da castanha tem inúmeras aplicações industriais, tais como produção de bioquerosene e formulação de cosméticos (Mafio *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2015).

Nativa das florestas tropicais, a *Acrocomia aculeata* pode atingir de 10 a 20 metros de altura e 20 a 30 cm de diâmetro. A região dos nós é coberta de

espinhos escuros pontiagudos com cerca de 10 cm de comprimento. É uma árvore bastante resistente: brota mesmo depois de queimadas; não é atacada por pragas e doenças; e suporta grandes variações climáticas.

As folhas verdes são pinadas e ordenadas em diferentes planos, dando um aspecto plumoso à copa, com comprimento variando de 4 a 5 metros e apresentando aproximadamente 130 folíolos em cada lado do galho e espinhos na região central do tronco. Entre as folhas destaca-se a espata de até 2 metros de comprimento, as inflorescências amarelas e os cachos de frutos de tom marrom-amarelado (Miranda *et al.*, 2001; Lorenzi *et al.*, 1996; Sanjinez-Argandoña e Chuba, 2011). A Figura 7 apresenta a palmeira com seus respectivos frutos.

Figura 7. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. (Macaúba).



Fonte: (Rural Sementes, 2012).

A variação da época de colheita ocorre de acordo com as diversidades climáticas regionais encontradas no Brasil. A frutificação ocorre durante todo o

ano e os frutos amadurecem principalmente entre o período de setembro e janeiro. Entretanto, no Estado de Minas Gerais, o período entre dezembro e abril se constitui a época do auge da maturação, indicado quando os primeiros frutos começam a cair dos cachos (Andrade *et al.*, 2006).

O fruto maduro dessa palmeira é uma dupla esfera ligeiramente achatada, com diâmetro variando de 3,0 a 6,0 cm, constituído de uma casca externa dura de coloração marrom-amarelada, de uma polpa amarelo-escura fibrosa e oleosa, e de uma castanha interna dura, que contém em seu interior uma ou duas amêndoas oleaginosas. Em base seca, pode-se extrair das partes da casca, polpa e amêndoa, aproximadamente 10%, 65-70% e 55-60% (m/m) de óleo, o que corresponde a um percentual de 25 a 30% em massa úmida do fruto maduro. Os óleos da polpa e da amêndoa contêm, respectivamente, cerca de 80% (m/m) de ácidos graxos insaturados e 72% (m/m) de ácidos graxos saturados (Andrade *et al.*, 2006; Mafio *et al.*, 2011).

Conforme apresentado ao longo do capítulo, a macaúba é perfeitamente adaptável às mais diversas condições de clima e solo, sendo produzida em regiões com índices pluviométricos inferiores a 1500 mm e temperaturas oscilantes entre 15 e 35 °C.

A frutificação ocorre com 3 a 5 anos após o plantio podendo ser realizadas até duas colheitas anuais. Os cachos podem ter até 70 kg sendo produzidos em média por palmeira de 3 a 4 cachos por ano e chegando a uma produção total de aproximadamente 30 toneladas de frutos/hectare.

Seu cultivo é realizado uma única vez, podendo ser plantado até 400 palmeiras/hectare produzindo os frutos por um período prolongado superior a 90 anos. Por ser um fruto com alto teor de óleo seu rendimento anual pode chegar a 5 toneladas óleo/hectare. (Rural Sementes, 2012) A Figura 8 demonstra os frutos antes e após maturação.

Figura 8. Frutos da *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.

Fonte: (Rural Sementes, 2012).

Em um fruto inteiro há 42% de polpa (mesocarpo) e o epicarpo (casca) corresponde a 20%. O restante é formado pelo diásporo, sendo 31% de endocarpo e 7% de sementes. O mesocarpo é fibroso, mucilaginoso, de sabor adocicado, rico em glicerídeos, de coloração amarelo ou esbranquiçado, comestível. O endocarpo enegrecido é fortemente aderido ao mesocarpo. À amêndoa é oleaginosa, também comestível e coberta por uma fina camada de tegumento (Lorenzi, 1996, Silva *et al.*, 2001)

A polpa *in natura* obtida da fruta apresenta um alto teor de ácidos graxos insaturados, com uma predominância de ácido oléico, correspondente a 65,9% do total de ácidos graxos. O óleo da amêndoa da macaúba apresenta em sua composição principalmente, ácido oléico, ácido láurico e ácido palmítico.

O trabalho de Hiane *et al.* (2005) e Andrade *et al.* (2006) destacam estes dados mais especificamente através das Tabelas 8 e 9, descrevendo as propriedades físico-químicas e a composição de ácidos graxos presentes na polpa e amêndoa do coco de macaúba.

Conforme descrito anteriormente, a macaúba produz dois óleos. Um deles é extraído da polpa e tem características favoráveis tanto para consumo humano quanto para produção de biodiesel. Isso se deve ao alto teor de ácido oléico presente, podendo chegar até 70% dependendo do clima e das características regionais de solo onde a palmeira de macaúba é cultivada. A resistência à armazenagem também favorecem a fabricação do biocombustível.

O segundo óleo do coco da macaúba é extraído da amêndoa e possui características bem diferentes. Trata-se de um óleo altamente saturado com maior teor de ácido láurico. Sua aplicação tem destaque principalmente na indústria de alimentos e cosmética. Entretanto um novo mercado ganha potencial para sua aplicação em biocombustíveis para aviação justamente devido ao seu elevado teor de ácido láurico. A produtividade desse óleo é de cerca de 1000 Kg/hectare. (Biodiesel BR, 2012)

Tabela 8. Características físico-químicas da polpa e amêndoa *in natura* da macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.

Características	Polpa	Amêndoa
Acidez em ácido oléico (% m/m)	0,83	0,21
Índice de iodo (Wijs)	75,4	54,1
Índice de saponificação (mg KOH/g óleo)	210,5	258,0
Índice de peróxido (mEq/Kg óleo)	2,1	0
Quantidade de óleo (% m/m)	69,9	58,0
Peso molecular (g/mol)	866	710
Poder calorífico (Kcal/Kg)	9380	8520
Viscosidade a 37,8°C (cst)	46,4	35,2
Densidade do óleo (g/cm ³)	0,925	0,917

Fonte: (Hianne *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2006).

Tabela 9. Composição de ácidos graxos presentes no óleo da polpa e amêndoa *in natura* da macaúba *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.

Ácido graxo	Polpa (%)	Amêndoa (%)
Ácido caprílico (C8)	0,45	5,96
Ácido cáprico (C10)	0,27	1,79
Ácido láurico (C12)	1,97	12,98
Ácido mirístico (C14)	0,45	9,49
Ácido palmítico (C16)	15,96	12,67
Ácido palmitoleico (C16:1)	1,02	2,29
Ácido esteárico (C18)	5,95	6,60
Ácido oléico (C18:1)	65,9	40,2
Ácido linoléico (C18:2)	5,10	5,91
Ácido linolênico (C18:3)	2,52	1,92
Ácido araquídico (C20)	0,50	0,30
% Ácidos graxos saturados	25,52	49,71
% Ácidos graxos mono-insaturados	66,88	42,46
% Ácidos graxos poli-insaturados	7,62	7,83

Fonte: (Hianne *et al.*, 2005).

Outro fator de destaque da macaúba é a sua alta produtividade de óleo por hectare mesmo sem qualquer melhoramento genético, chegando a uma produção de cerca de 5000 kg de óleo/hectare. A polpa tem tanto óleo que basta apertar com os dedos que ele facilmente é extraído. A título de comparação às culturas anuais apresentam rendimentos muito inferiores tais como: pinhão-manso (1000 kg óleo/hectare), girassol (890 kg óleo/hectare), mamona (1320 Kg óleo/hectare) e a soja considerada atualmente a principal matéria-prima para produção de biodiesel com produção de 500 Kg de óleo/hectare. Logo, sem sombra de dúvida essa palmácea é uma das plantas mais promissoras para produção de óleo (Nucci *et al.*, 2008; Oliveira, 2006).

Lopes *et al.* (2013) estudaram a viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir de Macaúba no Brasil. Em seu estudo comprovaram que a cultura da macaúba mostrou grande potencial econômico relacionado as

características de produção do biodiesel empregando óleo de sementes e transesterificação alcalina. Entretanto segundo os autores a domesticação e melhorias no processamento empregados para esta cultura são indispensáveis para assegurar melhor qualidade do óleo e a sua disponibilidade de uso a longo prazo.

Iha *et al.* (2014) analisando as propriedades físico-químicas do óleo dos frutos de *Acrocomia aculeata* para produção de biocombustíveis verificaram que a mesma em sua composição de ácidos graxos apresenta cadeias longas e insaturadas gerando um biodiesel menos estável a oxidação devido ao elevado índice de acidez do óleo bruto porém, estando na faixa aceitável para uso como biocombustível em motores a diesel. Neste caso por conta da acidez é necessária uma etapa prévia de esterificação ácida para evitar a formação de sabões e emulsões estáveis.

Recentemente, Agueiras *et al.* (2014) realizaram o estudo de produção de biodiesel a partir de óleo ácido de macaúba (*Acrocomia aculeata*) por processo de hidroesterificação enzimática (*Rhizomucor miehei*). As reações de hidrólise produziram 99,6% de ácidos graxos livres após 6 horas de reação e 91% de conversão em ésteres após esterificação de 8 horas em sistema livre de solvente empregando razão molar etanol/ácido graxo (2:1) e temperatura reacional de 40°C. Segundo os autores uma das vantagens do uso deste óleo ácido para produção de biodiesel é que o mesmo não compete diretamente com a indústria de alimentos, permitindo uma diversificação das culturas oleaginosas utilizadas para a produção de biodiesel no Brasil.

Também, além do óleo para produção de biocombustíveis e outros produtos, a macaúba possui coprodutos que podem agregar valor à cadeia produtiva. Um desses é o endocarpo (a parte que protege a amêndoa). Ele tem um poder calorífico maior do que o eucalipto podendo ser usado como carvão vegetal. Por suas características estruturais, também tem sido usado como matéria-prima para obtenção de carvão ativado (Ramos *et al.*, 2008, Iha *et al.*, 2014).

Do ponto de vista socioeconômico, a produção de óleo vem sendo a utilização mais promissora da macaúba promovendo o desenvolvimento em

muitas regiões do Brasil garantindo emprego e renda para muitas famílias de agricultores. Assim diante dos benefícios econômicos, sociais e ecológicos que a macaúba oferece para a sociedade, fica evidente sua importância, necessitando da elaboração de políticas e manejos para que se realize uma exploração sustentável e produtiva empregando tecnologias de cultivo que, de certa forma necessitam de aprimoramentos para atingir o máximo de produção, uma vez que a exploração da macaúba ainda é realizada basicamente de forma extrativista onde na maioria dos casos os frutos são colhidos depois de caírem no chão o que compromete a qualidade do óleo. Além disso, muitas indústrias produtoras do óleo moem o fruto todo misturando os dois óleos (polpa e amêndoa), tornando-se necessário o desenvolvimento de tecnologias para separar a polpa e a castanha a fim de obter-se o avanço tecnológico da cultura dessa palmácea (Biodiesel BR, 2012).

Dessa forma, a palmeira de macaúba apresenta grande potencial para se tornar uma cultura que venha a complementar a cadeia de biodiesel.

3.8. 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.

O uso de matérias primas oleaginosas para produção de biodiesel como a macaúba vem ganhando destaque nos últimos anos devido às vantagens em termos de rendimento a óleo desta planta sobre outras culturas que ocupam atualmente posição de destaque no Brasil na produção de biodiesel, como a soja e o dendê.

A macaúba pode gerar uma quantia de biomassa que pode passar de 30 toneladas por hectare, enquanto que no caso da soja apenas 10% deste volume total é gerado, o que em termos de biodiesel resultaria em cerca de 5 mil litros para macaúba e mil litros para soja por hectare plantado. Além disso, a macaúba destaca-se por ser uma palmeira rústica, necessitando de pouca água para seu desenvolvimento e um solo sem muitos cuidados de preparo,

concorrendo nesse caso, também com outras palmáceas como a palma e o dendê.

Outra matéria prima oleaginosa que ganha destaque é o óleo de fritura por tratar-se de uma fonte barata ou praticamente sem custo algum, uma vez que grandes quantidades de resíduos de óleo são gerados em vários locais, principalmente em áreas urbanas com alto consumo de óleos vegetais refinados como no caso de restaurantes, lanchonetes, fast food's, indústria de alimentos pré-processados e até mesmo residências.

Além disso, o uso desta matéria prima para produção de biodiesel traz benefícios do ponto de vista econômico e ecológico diminuindo consideravelmente os impactos ambientais de solo e poluição de águas gerados pelo inadequado descarte destes resíduos gordurosos nos sistemas de esgoto e reduzindo o elevado custo da comercialização do biodiesel produzido por óleos vegetais na sua forma purificada, o que pode representar um custo global entre 70 e 85% da produção através do uso destas matérias primas.

O potencial de aplicações de lipases em processos tecnológicos para a modificação de óleos e gorduras tem sido objeto de grande interesse nos meios científicos, econômico e industrial devido suas vantagens frente ao uso de catalisadores químicos. As enzimas, em particular as lipases, são capazes de catalisar o processo de transesterificação, produzindo glicerol mais limpo e livre de contaminantes, não sendo necessária a neutralização dos mesmos, constituindo, assim, uma opção ambientalmente mais atrativa que os processos convencionais.

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 ésteres etílicos em sistema livre de solvente orgânico em banho de ultrassom utilizando como substratos o óleo do fruto de

macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.), óleo residual de fritura e etanol e como catalisador a lipase comercial Novozym 435 contemplando a caracterização físico-química do óleo em estudo, a otimização das condições operacionais do processo, o estudo cinético reacional, a influência da tecnologia de ultrassom na reação e a avaliação do possível reuso do catalisador enzimático na condição otimizada do processo de produção em modo batelada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais adotados durante a fase experimental realizada no âmbito deste trabalho, relacionados à produção de ésteres etílicos via rota enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom empregando óleo do fruto de macaúba e óleo residual de fritura.

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Reagentes

O estudo realizado na etapa inicial deste trabalho foi dividido na utilização de dois lotes de óleo do fruto de macaúba, definidos como Lote 1 e Lote 2: o Lote 1 foi utilizado nos testes preliminares para a produção de ésteres etílicos e o Lote 2 foi testado como substrato na avaliação das melhores condições experimentais para produção de ésteres etílicos em modos batelada e contínuo a partir dos resultados obtidos nos testes preliminares com o primeiro lote. As diferenças características entre ambos os lotes serão descritas no decorrer do trabalho.

Como sequência deste estudo, também utilizou-se óleo residual de fritura derivado de soja em reações de esterificação nos modos batelada e contínuo, para produção de ésteres etílicos utilizando como parâmetros experimentais as melhores condições estudadas anteriormente para o óleo de fruto de macaúba.

Os substratos utilizados para as reações de transesterificação foram o óleo bruto do fruto de macaúba (*Acrocomia Aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart) obtido da unidade de beneficiamento coco de macaúba (Associação Comunitária dos Pequenos Produtores Rurais de Riacho D'Antas e Adjacências – COOPER RIACHÃO – Montes Claros-MG), óleo residual de fritura derivado de soja obtido de uma empresa de Fast Food da cidade de Erechim-RS, e o álcool etílico (Merck, 99,9%).

A lipase comercial imobilizada *Novozym 435*, produzida pela Novozymes Brasil/ Araucária-PR foi utilizada como catalisador das reações. Além dos substratos já citados, nas reações de transesterificação empregou-se peneira molecular 4 Å (Sigma Aldrich), como agente dessecante. Após as reações o meio foi lavado com n-hexano (99% Vetec), por meio de filtragem simples em papel filtro.

Na quantificação dos ésteres formados da reação de transesterificação em modo batelada do óleo de macaúba em banho de ultrassom foram usados padrões comerciais dos ésteres majoritários do biodiesel tradicional derivado de óleo de soja e o padrão interno heptadecanoato de metila (99% Sigma-Aldrich), como solvente heptano (99% Sigma-Aldrich) e os gases de arraste, nitrogênio, hidrogênio e ar sintético (White Martins).

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

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

4.1.2. Enzima

A lipase comercial *Novozym 435* é produzida a partir de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, a qual atua randomicamente nas três posições do triglicerídeo.

A lipase imobilizada é constituída por partículas de formato esferoidal, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, e densidade de aproximadamente 430 kg/m³. Esse produto é fornecido com quantidade de água entre 1 e 2%. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40-70 °C (NOVO NORDISK, 1992).

4.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1. Pré-tratamento do óleo bruto do fruto de macaúba

Devido às possíveis condições de armazenamento do óleo após a sua extração pela Unidade de Beneficiamento Coco de Macaúba (COOPER RIACHÃO – Montes Claros-MG), imediatamente após o recebimento do óleo bruto do fruto de macaúba realizou-se um tratamento prévio de filtração a vácuo para remoção de partículas sólidas, conforme apresentado nas Figuras 9 e 10. É importante frisar que o óleo utilizado neste estudo é uma mistura, com proporção desconhecida, do óleo da polpa e do óleo da amêndoa da macaúba, sendo, portanto assim denominado de óleo do fruto da macaúba.

A remoção dos resíduos sólidos do óleo do fruto da macaúba após filtração acarretou uma perda em torno de 60% no volume inicial do óleo.

Figura 9. Aparato experimental de filtração a vácuo do óleo do fruto de macaúba.



Figura 10. Filtragem do óleo de macaúba: resíduo sólido de fibras presente no óleo (à esquerda); óleo do fruto de macaúba obtido após filtragem (à direita).



4.3 CARACTERIZAÇÕES DOS ÓLEOS DO FRUTO DE MACAÚBA E ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA

4.3.1 Cromatografia gasosa (Determinação de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG))

Para a quantificação do teor de monoacilgliceróis (MAGs), diacilgliceróis (DAGs) e triacilgliceróis (TAGs) empregou-se técnica de cromatografia gasosa utilizando as condições cromatográficas descritas pela norma EN14105 do Comitê Europeu para Padronizações. Estas análises foram realizadas no óleo bruto de macaúba a fim de determinar a composição e a qualidade do óleo em estudo

Na preparação das amostras, inicialmente pesou-se 100 mg da amostra de óleo em balão volumétrico de 10 mL, após adicionou-se 100 μ L do derivatizante MSTFA (N-metil-N-trimetilsilítrifluoroacetamida), após a solução foi agitada e deixada em temperatura ambiente por 15 minutos para promover a derivatização dos compostos em seus correspondentes ésteres trimetilsilil, em recipiente fechado. Em seguida, completou-se o volume (10 mL) com n-heptano. As soluções foram transferidas para os frascos de amostragem e levadas ao GC-FID para análise injetando-se (1 μ L) da amostra.

As análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC) – Shimadzu 2010, com injetor automático e on-column e detector de ionização de chama (FID).

Utilizou-se a coluna capilar DB-5 (J e W Scientific, nº de série: US7162944H), de 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm.

As condições de operação foram estabelecidas de acordo com a Norma nº 14105, do Comitê Europeu para Padronizações.

A temperatura inicial utilizada na coluna foi de 50 °C/min, aumentando 15 °C/min até 180 °C, após 7 °C/min até 230 °C, e 10 °C/min até 380 °C, permanecendo por 8 min. A temperatura do detector foi de 380 °C, pressão do gás de arraste (ar sintético e nitrogênio) de 80 kPa e o volume injetado foi de 1 µL. A norma EN 14105 (2003) está descrita na íntegra no Apêndice A bem como os cálculos utilizados para determinação da concentração de mono- di- e triacilgliceróis nas amostras.

4.3.2 Determinação do índice de acidez (IUPAC 2.201)

O índice de acidez é a medida do teor de ácidos livres em gorduras e ácidos graxos, sendo definido como a quantidade de hidróxido de potássio (em miligramas) necessária para neutralizar os ácidos livres presentes em 1 grama de amostra.

Para determinação do índice de acidez do óleo de macaúba e óleo de fritura foi utilizada a metodologia descrita pela IUPAC 2.201 através de titulação da amostra com hidróxido de potássio 0,1 N.

Na análise do índice de acidez em ambos os óleos foram pesados 3 gramas de amostra em um erlenmeyer (250 mL) e adicionados 50 mL de uma mistura éter etílico: etanol (1:1 v/v), previamente neutralizada com solução de hidróxido de potássio 0,1 N.

Após, foram adicionadas três gotas de fenolftaleína e a amostra foi titulada com solução de hidróxido de potássio 0,1 N, até atingir pH 11.

O cálculo do índice de acidez em mg KOH/g foi realizado pela Equação 1:

$$I. A = \frac{56,1 * V * N}{E} \quad (1)$$

Onde:

V = o volume de solução de hidróxido de potássio utilizado na titulação em mL;

N = a normalidade da solução de hidróxido de potássio;

E = a massa da amostra em gramas;

56,1 = a massa molecular do hidróxido de potássio.

4.3.3 Determinação do índice de peróxido (AOAC 965.33)

Uma das principais formas de deterioração dos óleos consiste no processo de oxidação, que ocorre quando o oxigênio atmosférico acaba sendo dissolvido no óleo e reage com os seus constituintes (ácidos graxos insaturados), sendo que, quanto maior o grau de insaturação mais reativos com o oxigênio serão.

Um dos métodos para avaliar os níveis de oxidação dos óleos e gorduras é o índice de peróxido. Para a determinação do índice de peróxido dos óleos em estudo foi utilizada a metodologia descrita pela AOAC 965.33 através de titulação da amostra com tiosulfato de sódio 0,01 N padronizado.

O índice de peróxido representa a quantidade de peróxidos expressa em miliequivalentes de oxigênio ativo por quilograma de amostra, ocasionada pela oxidação do iodeto de potássio, com a solução de amostra dissolvida em ácido acético e clorofórmio.

Na análise de índice de peróxidos foram pesados 5 g da amostra em um erlenmeyer (250 mL) com tampa e adicionou-se 30 mL de uma solução ácido acético/clorofórmio (3:2 v/v), agitando até total dissolução do óleo.

Após adicionou-se 0,5 mL de uma solução saturada de iodeto de potássio agitando a mesma e deixando em repouso por 1 minuto sendo acrescentado após este tempo 30 mL de H₂O destilada.

Posteriormente, titulou-se a mistura com tiosulfato de sódio 0,01 N até o desaparecimento parcial da coloração amarela, adicionando-se então 1 mL de solução de amido 1% e continuando a titulação com agitação vigorosa para liberar todo o iodo ainda presente na solução, até o desaparecimento da coloração azul.

Para determinação do índice de peróxido na solução denominada “branco” realizou-se o mesmo procedimento experimental descrito anteriormente sem a adição da amostra.

O cálculo do índice de peróxido em miliequivalente peróxido/Kg de óleo foi realizado pela Equação 2:

$$I.P = \frac{S*N*1000}{g(amostra)} \quad (2)$$

Onde:

S é o volume de tiosulfato gasto na titulação (corrigido com o branco) em mL;

N é a normalidade da solução de tiosulfato;

g é a massa da amostra em gramas.

4.4. REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM MODO BATELADA

Os experimentos para produção enzimática de ésteres etílicos com óleo do fruto de macaúba (*Acrocomia aculeata*) e óleo residual de fritura de soja em modo batelada foram realizados em um banho de ultrassom (Unique ultraSonic Cleaner, modelo: USC-1800A, frequência US: 40 KHz, potência US: 132 W), conforme apresentado na Figura 11.

Figura 11. Aparato experimental utilizado para a produção enzimática de ésteres etílicos em modo batelada em banho de ultrassom.



Nestas reações empregou-se como substratos etanol e os óleos do fruto da macaúba e óleo residual de fritura derivado de soja, sendo a lipase comercial imobilizada Novozym 435, utilizada como catalisador do processo. Devido ao pequeno volume de reação, para cada tempo reacional estudado, foram realizadas reações, utilizando balão volumétrico de 50 mL.

Em virtude do fato de que a produção de ésteres etílicos derivados do óleo do fruto da macaúba em sistema de ultrassom apresentar-se como uma nova e promissora tecnologia, não se tem ainda conhecimento do comportamento do óleo no sistema proposto.

Desta forma, inicialmente foi realizado um estudo cinético prévio, com o óleo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) proveniente do primeiro lote estudado (Lote 1) para determinar o tempo reacional e a concentração de enzima a serem fixados na etapa posterior visando a otimização das condições experimentais em termos de conversão em ésteres etílicos.

As condições experimentais para produção de ésteres etílicos a partir do óleo de macaúba basearam-se primeiramente na condição otimizada proposta por Trentin (2013), que estudou a transesterificação enzimática do óleo de soja com etanol em sistema de ultrassom e livre de solvente usando a

lípase comercial imobilizada Novozym 435. Estas condições foram: concentração de enzima 27% (em relação à massa total dos substratos), razão molar óleo/etanol 1:3, potência da ultrassônica 40% (em relação ao total da capacidade máxima o ultrassom (132 W)) e temperatura reacional de 63 °C.

Os experimentos foram realizados em tempos reacionais de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos em meio livre de solvente orgânico.

4.4.1 Planejamento de experimentos

Após os testes preliminares descritos anteriormente, os ensaios foram conduzidos com base em um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , de 11 ensaios com triplicata do ponto central, o qual visou o screening de variáveis de forma a verificar os efeitos destas sobre o processo.

O planejamento fatorial fracionado foi adotado neste estudo, uma vez que o objetivo deste não foi a otimização do processo, mas sim apenas o conhecimento do comportamento reacional no sistema proposto e o potencial de produção de ésteres etílicos da oleaginosa de macaúba em estudo para que em etapas subsequentes possa-se realizar a otimização do processo.

No planejamento foram avaliadas a influência de quatro variáveis: temperatura (40 à 70 °C); razão molar óleo/etanol (1:3 à 1:10); concentração da enzima Novozym 435 (5 à 20% (m/m em relação aos substratos)) e potência do ultrassom (40 à 100% em relação a potência máxima do equipamento (132 W)) mantendo-se fixo o tempo de reação em 90 minutos. As variáveis estudadas e os respectivos níveis são apresentados na Tabela 10. Os resultados foram analisados usando o software Statistica® 7.0 Statsoft Inc.

Tabela 10. Variáveis e níveis estudados no planejamento 2^{4-1} para produção enzimática de ésteres etílicos de óleo do fruto de macaúba em sistema livre de solvente e em banho de ultrassom.

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

4.4.2 Determinação da melhor condição experimental para o primeiro lote de óleo do fruto de macaúba

Após a realização do planejamento experimental descrito anteriormente, realizou-se um estudo visando definir as condições experimentais que conduzissem à melhor conversão em ésteres etílicos.

Os experimentos foram realizados à temperatura de 65 °C, 100% de potência em relação à capacidade máxima do ultrassom (132 W), razão molar óleo/etanol de 1:9, concentração de enzima de 20% (m/m), durante 360 minutos.

Devido a considerações pertinentes quanto a presença de água em reações de transesterificação feitas no decorrer deste trabalho, diferentes concentrações de peneira molecular 4 Å (Sigma Aldrich) para remover de água produzida no processo também foram testadas nesta etapa. As concentrações de peneira molecular utilizadas foram de 10, 20, 50 e 100% em relação à massa total de substratos. As reações de transesterificação ocorreram conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12. Representação esquemática das reações de transesterificação e tratamento da amostra até análise por cromatografia gasosa.



4.4.3 Quantificação do teor de água do óleo do fruto de macaúba

A porcentagem de água presente na amostra de óleo antes e após a reação de transesterificação foi determinada pelo método de titulação em Karl Fischer utilizando o equipamento Mettler Todelo DL 50 Graphix e empregando a metodologia da AOAC Official Method 984.20. Esse método está baseado na oxidação de SO_2 pelo I_2 em presença de água.

4.4.4 Estudo de transesterificação na melhor condição experimental para o segundo lote de óleo do fruto de macaúba e óleo residual de fritura

Após a realização dos testes com diferentes concentrações de peneira molecular utilizando o primeiro lote de óleo de macaúba, definiu-se a melhor condição para a sequência de experimentos utilizando óleo de macaúba proveniente do segundo lote recebido. Este segundo lote foi necessário para o decorrer do trabalho devido ao término de amostras de óleo de macaúba proveniente do primeiro lote.

Os parâmetros empregados neste segundo lote foram: temperatura de 65 °C, razão molar óleo/etanol de 1:9, 100% de potência do ultrassom (132 W), concentração de enzima de 20% (m/m) em relação aos substratos, 100% de peneira molecular (m/m) em tempos de reação de 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 360 minutos.

Para o óleo residual de fritura foram empregadas as mesmas condições experimentais.

Como teste comparativo da eficiência do banho de ultrassom no processo também foram realizadas reações nas mesmas condições descritas anteriormente, sem o uso do ultrassom.

4.5. ESTUDO DE REUSO DO BIOCATALISADOR NOVOZYM 435

Para avaliação do reuso da enzima Novozym 435 foram utilizadas apenas as condições experimentais de 30 e 120 minutos de reação com óleo do fruto de macaúba, 65 °C, 100% de potência do ultrassom de 132 W, razão molar óleo de macaúba:etanol 1:9 e concentração de enzima de 20% (m/m da enzima Novozym 435, em relação à massa de substratos) e 100% de peneira molecular (m/m) em relação à massa de substratos.

Para estes testes um aumento de escala no volume da reação em 10 vezes das massas de óleo de macaúba, etanol, enzima e peneira molecular foi necessário para que todas as determinações de atividade de esterificação fossem realizadas com a mesma quantidade de amostra de enzima. Então, nessa etapa, com razão molar óleo/etanol 1:9 utilizou-se 10 g de óleo para 4,8 g de etanol.

Os experimentos foram realizados em balões de fundo redondo (250 mL) imersos em banho de ultrassom. Para recuperar a enzima ao final de cada tempo de reação, o biocatalisador imobilizado foi separado do meio reacional por filtração utilizando papel filtro. O processo de filtragem consistiu na realização de duas lavagens com 15 mL de hexano para separação do biodiesel impregnado na enzima e filtrou-se à 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) para remoção do solvente.

Posteriormente, secou-se a enzima retida no papel filtro 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, antes de iniciar o procedimento de medida de atividade, a enzima recuperada foi ativada em estufa a 40 °C durante 1 hora (Oliveira *et al.*, 2006), para eliminação de possível umidade. Posteriormente, a atividade da mesma foi determinada para verificar possíveis perdas durante os ciclos de reação e torná-la apta para a reutilização. Este procedimento de secagem é adotado, uma vez que a lipase em estudo apresenta alta atividade catalítica em ambientes com baixo teor de água. O estudo de reuso da enzima foi acompanhado durante 8 ciclos sucessivos. A medida de atividade foi realizada no início e ao final das reações com a enzima recuperada.

4.6 REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO EM MODO CONTÍNUO

O sistema experimental utilizado neste trabalho para as reações de transesterificação enzimática em ultrassom em modo contínuo usando óleo do fruto de macaúba e óleo residual de fritura consistiu em um 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 m e volume de 27,05 mL (Figura 13) com alimentação da mistura reacional de óleo de fritura/álcool etílico e óleo de macaúba/álcool etílico (substrato), com uso de aproximadamente 8 gramas de catalisador, sendo este a enzima comercial Novozym 435 e 4 g de peneira molecular, um banho de ultrassom (Unique ultraSonic cleaner, modelo: USC-180A, frequência US: 40KHz, potência US: 154W). A Figura 13 a seguir apresenta o aparato experimental utilizado neste trabalho.

Figura 13. Aparato experimental utilizado para a produção enzimática de ésteres etílicos em modo contínuo e banho de ultrassom.



O procedimento experimental consistiu no empacotamento completo do reator com a enzima Novozym 435 e a peneira molecular. 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, iniciando-se o bombeamento contínuo dos substratos óleo de fritura/álcool etílico, óleo de macaúba/álcool etílico, 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 Acuflow).

Este tipo de bomba opera com vazão constante (0,1 a 10 mL/min) e pressão de trabalho de 0 a 415 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 cálculo 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:

$$\varepsilon_L = 1 - \left(\frac{V_S - V_P}{V_R} \right) \quad (3)$$

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;

ε_L = porosidade do leito.

Para o cálculo do volume de soluto (V_S) obteve-se as seguintes informações: número de unidades de enzima em determinada massa e diâmetro médio das partículas da enzima conforme descrito por Dalla Rosa (2009).

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_P = 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 ser utilizada no processo de acordo com Dalla Rosa (2009).

$$\tau = \frac{\varepsilon_L \times V_R}{q} \quad (4)$$

Onde:

V_R = volume do leito do reator;

q = vazão de alimentação;

ε_L = porosidade do leito.

Após a mistura reacional percorrer toda a extensão do reator, a coleta das amostras foi realizada em frascos de amostragem após decorrido um tempo de residência da mistura na zona reacional e analisadas por metodologia de titulação.

As condições experimentais aplicadas no modo contínuo foram: razão molar óleo:etanol (1:9), temperatura 65 °C e 100% da potência do ultrassom (154 W) sendo estas as mesmas utilizadas na melhor condição apresentada para o óleo de macaúba em modo batelada, conforme descrito anteriormente. A vazão de alimentação utilizada neste processo foi 2,0 mL/min.

4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O procedimento adotado para a determinação da atividade da enzima Novozym 435, foi descrito por Oliveira *et al.* (2006). 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.

Alíquotas de 150 µL 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 de enzima é definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 µmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas.

A Equação 5 foi empregada para o cálculo da atividade da lipase:

$$\text{Atividade (U / g)} = \frac{[(V^0_{\text{NaOH}}) - (V^{40}_{\text{NaOH}})]}{t \times ma} \times N \times 10^3 \quad (5)$$

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);

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

t = tempo de reação (min).

4.8. QUANTIFICAÇÃO DOS ÉSTERES ETÍLICOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Após a reação de transesterificação do óleo de macaúba em modo batelada feita em banho de ultrassom realizou-se a coleta e filtragem das amostras em papel filtro procedendo-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 65 °C.

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, transferiu-se uma alíquota de 50 µL desta solução para um balão volumétrico de 1 mL e adicionou-se 50 µL do padrão interno heptadecanoato de metila (C17:0) na concentração de 5000 mg/L e completou-se o volume até o menisco com n-heptano. As amostras foram transferidas para os frascos de amostragem e levadas ao GC-FID para análise.

As amostras de cada experimento foram preparadas em duplicata. Após este procedimento, 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 µm) nas condições cromatográficas descritas pela norma EN 14103 (2001), do Comitê Europeu para Padronizações. A temperatura inicial da coluna foi 120 °C

permanecendo por 1 min, 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 foram utilizados como gás de arraste e a temperatura do injetor e detector foram de 250 °C com a taxa de split de 1:50.

A norma EN 14103 (2001) está descrita na íntegra conforme Apêndice A bem como os cálculos utilizados para determinação da concentração de ésteres nas amostras.

4.9. CONVERSÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS VEGETAIS EM ÉSTERES ETÍLICOS POR TITULAÇÃO DE ÍNDICE DE ACIDEZ

Como a reação de esterificação produz além dos ésteres também água, as amostras coletadas após as reações foram analisadas através do método da titulação de índice de acidez.

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 residual, conforme apresentado por Trentin *et al.* (2014) comprovando a efetividade da técnica, com base na comparação realizada entre os dois métodos (cromatografia gasosa x conversão de ácidos graxos por titulação), empregando ácido graxo vegetal de óleo de soja e a literatura reportada pelos seguintes autores (Chen *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2012; Rattanaphra *et al.*, 2012; Rahman *et al.*, 2012; Lemaire *et al.*, 2011; Marchetti e Errazu, 2010), 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 dos ácido graxos correspondentes da amostra.

Este procedimento é realizado com a pesagem de uma alíquota de aproximadamente 1,5 g de amostra de óleo em um erlenmeyer de 250 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 anteriormente, a amostra não necessita de nenhum tratamento prévio por análise desta técnica, sendo a amostra, diretamente coletada do reator para ser analisada, sem necessidade de secagem para evaporação da água ou do excesso de solvente. As amostras de cada experimento foram preparadas e analisadas em duplicata por esta técnica.

O índice de acidez é determinado pela Equação (1) conforme apresentado anteriormente no item 4.3.2.

Para determinar 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.

$$AGL (\%) = \left(\frac{A_i - A_t}{A_i} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde:

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 ésteres etílicos utilizando como substratos óleo do fruto de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.), óleo residual de fritura e etanol em sistema livre de solvente orgânico em banho de ultrassom, conforme já descrito no capítulo anterior.

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA E ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA

De forma geral, os índices de acidez e de peróxido, assim como as quantificações, por cromatografia gasosa, de monoacilgliceróis (Mag), diacilgliceróis (Dag) e triacilgliceróis (Tag), têm a finalidade de verificar a qualidade de óleos e gorduras, sendo esta proporcional ao percentual de triglicerídeos presentes na amostra oleoginosa. Assim, valores altos de índice de acidez e de índice de peróxido implicam baixas porcentagens de triglicerídeos e, portanto, baixa qualidade da matéria-prima.

5.1.1. Determinação de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG)

Para o estudo de caracterização do óleo bruto de macaúba dos lotes 1 e 2 e óleo residual de fritura derivado de soja foram realizadas análises de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG) empregando-se cromatografia gasosa e as condições descritas pela norma EN14105 (2003) do Comitê Europeu de Padronizações.

No cromatograma, geralmente, as áreas obtidas entre 15 e 19 minutos correspondem à região de MAGs, de 23 a 28 minutos corresponde à região de DAGs e de 31 a 34 minutos corresponde à região de TAGs. A Tabela 11 apresenta os valores percentuais de MAG, DAG e TAG presentes nos óleo de macaúba bruto e óleo residual de fritura.

Tabela 11. Porcentagem de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG) nos lotes 1 e 2 do óleo do fruto de macaúba e óleo residual de fritura.

Amostra	MAG (%)	DAG (%)	TAG (%)
Lote 1	30,7	21,6	8,3
Lote 2	20,2	9,7	15,1
Óleo de Fritura	0,4	7,3	Indeterminado

Lemke Gonzalez (2012) realizou a quantificação dos monoacilglicerídeos (MAG), diglicerídeos (DAG) e triglicerídeos (TAG) do óleo de macaúba por cromatografia gasosa obtendo 7,4% (MAG), 18,9% (DAG) e 8,4% (TAG). Estes resultados para DAG e TAG estão dentro da faixa de valores encontrados neste trabalho.

Nos resultados obtidos neste estudo observa-se que no óleo do lote 2 há uma menor quantidade de mono e diacilgliceróis e um aumento na quantidade de triacilgliceróis em comparação ao lote 1, podendo-se dessa forma afirmar que o óleo proveniente do lote 2 encontra-se menos degradado possivelmente devido à realização da etapa de filtragem do óleo após recebimento do lote para remoção de contaminantes indesejados (bagaço, fibras, folhas, sujeiras) e em virtude disso o óleo pode apresentar uma maior capacidade de transesterificação, conduzindo a um maior rendimento em biodiesel ao final da reação.

Para o óleo de fritura os resultados acima confirmam a presença minoritária de monoacilglicerídeos e diacilglicerídeos, não tendo sido possível a quantificação dos triacilglicerídeos devido sua elevada concentração, ocasionando assim um impedimento no uso da técnica.

Segundo Regitano-D'arce (2006), óleos residuais brutos de alta qualidade, como o da soja, podem apresentar entre 95-97% de triacilglicerídeos.

Lemke Gonzalez (2012) apresentou resultados semelhantes a estes em seu trabalho comprovando através de cromatografia em camada delgada uma

maior intensidade de triacilglicerídeos, indicando assim que esta classe de compostos estaria presente em maior quantidade no óleo de fritura.

5.1.2. Determinação do índice de acidez, peróxido e quantificação do teor de água do óleo do fruto de macaúba e óleo residual de fritura.

Realizaram-se as análises físico-químicas de índice de acidez, índice de peróxido para ambos os óleos em estudo e teor de umidade do óleo de macaúba.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 12. As variações nos teores de água, índice de acidez e índice de peróxidos dos óleos estão relacionados com a natureza e a qualidade da matéria-prima, além do tipo de processamento e de conservação do óleo.

Na literatura, encontram-se disponíveis alguns trabalhos em que realizaram tais análises, tal como Tiwari *et al.* (2007) que encontraram um teor de água de 1,4% e um índice de acidez de 28,0 mg KOH/g no óleo de pinhão manso para produção de biodiesel por catálise homogênea.

Lemke Gonzalez (2012) estudou a caracterização físico-química do óleo de macaúba, encontrando valores de teor de água de 0,94% determinado através da titulação pelo método de Karl Fischer. Amaral (2007) em seu trabalho verificou 0,89% de teor de água no óleo da polpa de macaúba. Valores estes acima dos encontrados neste estudo.

Tabela 12. Resultados das análises físico-químicas realizadas no óleo do fruto de macaúba e óleo residual de fritura.

<i>Análise</i>	<i>Lote 1</i>	<i>Lote 2</i>	<i>Óleo de soja fritura</i>
Umidade (%)	0,713 ± 0,021	0,612 ± 0,027	N.D.
Índice de Acidez (mg KOH/g)	89,0 ± 0,52	73,0 ± 0,61	5,37 ± 0,2
Índice de peróxido (meq peróxido/kg óleo)	19,78 ± 0,24	14,22 ± 0,33	0,79 ± 0,04

No trabalho de Rezende (2009) o percentual de teor de água encontrado para o óleo bruto de macaúba foi de 0,36%.

Neste estudo a análise de teor de água no óleo de macaúba foi realizada em triplicata através do método de titulação de Karl Fischer, resultando em teores que variaram entre 0,713 e 0,612%. Estes valores estão abaixo dos resultados encontrados na literatura, conforme descrito anteriormente, e podem ser considerados satisfatórios para reações de transesterificação uma vez que o excesso de água presente no óleo pode ser prejudicial e afetar ao bom desempenho no processo reacional de produção de biodiesel.

Conforme Zanette (2010), uma quantidade pequena de água pode estar presente no óleo, o que não interfere na reação de transesterificação, especialmente se esta reação for catalisada por lipases.

A determinação do teor/índice de acidez do óleo tem o objetivo de expressar o estado de conservação do mesmo durante o armazenamento. Com o aquecimento e pela ação da luz ocorre a decomposição dos glicerídeos, que é acompanhada pela formação de ácidos graxos livres (Moretto *et al.*, 2002; Rezende, 2009).

Segundo Regitano-D'arce (2006), óleos brutos podem apresentar maior degradabilidade oxidativa em relação a óleos refinados e de alta qualidade, como o da soja. Dessa forma, valores altos de índices de acidez e de peróxido, implicam baixas porcentagens de triglicerídeos e, portanto, baixa qualidade da matéria-prima.

A análise de acidez foi realizada através de titulação sendo a unidade de medida utilizada em mg KOH/g. Utilizando este procedimento, valores de índices de acidez em torno de 81 mg KOH/g (macaúba) e 5,5 mg KOH/g (óleo de fritura) foram obtidos para os óleos em estudo.

Lemke Gonzalez (2012) também realizou análises de índice de acidez e peróxido para o óleo de macaúba e óleo de fritura em seu trabalho. Os valores encontrados pela autora em índice de acidez no óleo de macaúba foram 114,42 mg KOH/g e óleo de fritura derivado de soja 1,89 mg KOH/g, mostrando, como nos resultados obtidos neste estudo, 89 e 73 mg KOH/g (macaúba) e 5,37 mg KOH/g (óleo de fritura), que ambos óleos possuem grande quantidade de ácidos graxos livres. Em relação à macaúba isso pode

ser atribuído a danos causados durante o processo de colheita dos frutos (excesso de maturação, moagem do fruto com sujidades ou oxidados) ou mesmo na sua forma de armazenamento (exposto ao calor e umidade, armazenamento em tonéis sujos).

Entretanto, os valores encontrados neste trabalho para óleo de macaúba estão de acordo com Rodrigues (2007), que reporta valores na faixa de 10 - 91 mg KOH/g de índice de acidez para óleo de macaúba.

Segundo O'brien (2004), o óleo bruto extraído de plantas oleaginosas muitas vezes pode apresentar alto percentual de acidez e estes elevados valores de acidez inviabilizam o emprego da catálise básica clássica (homogênea) no processo de transesterificação, gerando reações competitivas indevidas de saponificação.

Assim, a catálise ácida e a catálise enzimática são as melhores opções para a produção de biodiesel a partir de óleos com alto conteúdo de ácidos graxos livres, porém quanto maior a acidez do óleo vegetal utilizado na reação de transesterificação, menor será a taxa de conversão esperada em ésteres (Lam *et al.*, 2010; Meher *et al.*, 2006).

Em relação a óleos residuais dados da literatura reportam a utilização de óleo de fritura para produção de biodiesel com índice de acidez variável entre 1,06 e 4,3 mg KOH/g. (Araújo *et al.*, 2013; Maddikeri *et al.*, 2013; Avellaneda e Salvadó, 2011; Wen *et al.*, 2010; Demirbas, 2009).

Neste estudo, conforme explicitado na tabela 12, o óleo de fritura apresentou acidez de 5,37 mg KOH/g. De acordo com o fornecedor, o óleo de fritura é utilizado por até 2 dias, entretanto o mesmo após o uso é colocado em tonéis de metal, ficando armazenado de 8 até 10 dias para ser encaminhado para descarte, apresentando assim por esta razão um valor elevado de acidez devido um estado oxidativo avançado gerado pelo longo armazenamento e possíveis resíduos de alimentos, água e sal contidos no óleo.

De acordo com Moretto *et al.* (2002), o índice de peróxido indica o grau de oxidação do óleo ou da gordura, sendo um indicador sensível no estágio inicial da oxidação, indicando a deterioração do sabor e odor.

No início do processo de rancificação do óleo há formação de peróxidos orgânicos, os quais degradam os triglicerídeos levando à formação de produtos como ácidos graxos, aldeídos, monoglicerídeos e diglicerídeos, os quais são indesejáveis, pois diminuem o rendimento em ésteres (Rodrigues, 2007).

Lemke Gonzalez (2012) obteve em seu trabalho índice de peróxido de 4,4 meq de peróxido/kg de óleo de macaúba e 0,75 meq de peróxido/Kg para óleo de fritura sendo este último valor próximo ao encontrado neste estudo, (0,79 meq de peróxido/Kg). Rodrigues (2007) obteve de 16 a 20 meq de peróxido por kg de óleo da polpa da macaúba. Neste estudo, a determinação do índice de peróxido foi conduzida logo após a extração do óleo. Estes valores estão dentro da faixa de índice de peróxido obtida neste trabalho, equivalente a 14,22 e 19,78 meq de peróxido/kg de óleo. De acordo com o fornecedor do óleo, o produto passa por um período de até seis meses de decantação após a prensagem. Dessa forma constata-se que, em condições favoráveis de armazenamento, o óleo de macaúba, mesmo com elevado índice de peróxido característico do óleo, apresenta-se estável.

O índice de peróxido, segundo O'brien (2004), é uma das análises mais utilizadas para caracterizar óleos e gorduras. Os valores de índice de peróxido compreendidos entre 1 e 5 meq/kg são classificados como de baixo estado de oxidação; os que apresentam valores entre 5 e 10 meq/kg são caracterizados por estado de oxidação moderado e os que apresentam valores compreendidos entre 10 e 20 meq/kg são classificados como em alto estado de oxidação.

Ao comparar os índices de peróxidos obtidos nas análises do óleo do fruto de macaúba com os valores sugeridos por O'brien (2004), verificou-se que o óleo em estudo pode ser caracterizado como de alto estado de oxidação.

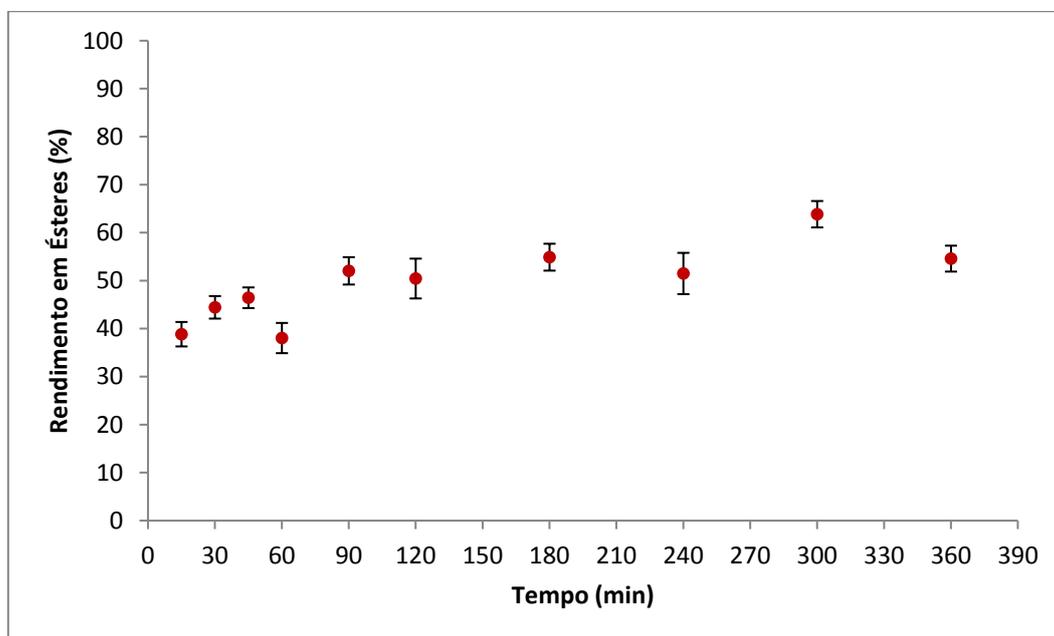
5.2. TESTE PRELIMINAR PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA

Nas reações de transesterificação enzimática em ultrassom foi avaliado o rendimento em ésteres etílicos produzidos durante a avaliação prévia do

processo de produção de ésteres etílicos com óleo de macaúba em sistema livre de solvente.

Este estudo preliminar teve como objetivo determinar o tempo reacional e a concentração de lipase para consecução dos experimentos visando à maximização das condições experimentais em relação ao rendimento em ésteres. As condições experimentais utilizadas foram baseadas inicialmente no estudo desenvolvido por Trentin (2013) empregando óleo de soja. O estudo foi desenvolvido em diversos tempos de reação variando de 15 a 360 minutos, sem o uso de solvente orgânico. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 14.

Figura 14. Rendimento em ésteres etílicos obtidos na transesterificação enzimática do óleo de macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom. Condições experimentais: concentração de enzima 27% (m/m), razão molar óleo/etanol 1:3, potência do ultrassom 40% do total da capacidade do equipamento (132 W) e temperatura de 63 °C.



De acordo com a Figura 14 pode-se observar que o rendimento em ésteres etílicos foi variável nos tempos iniciais, porém satisfatório com

conversões superiores a 45% nos primeiros tempos avaliados. No entanto, observa-se que no tempo de 300 minutos atinge-se a conversão máxima em ésteres etílicos de 67%, mostrando já neste primeiro teste que o ultrassom apresenta-se como sendo uma técnica promissora nas reações de transesterificação.

Tal fato está de acordo com dados da literatura. Singh *et al.* (2007) destacam que a tecnologia ultrassônica aplicada a reações de transesterificação tem provado ser um recurso eficaz, em relação à mistura óleo/álcool aumentando a transferência de massa entre estes substratos, além de proporcionar a energia de ativação suficiente para iniciar a reação.

Siatis *et al.* (2006) utilizaram o ultrassom para produção de ésteres metílicos via catálise alcalina. O uso do ultrassom neste processo gerou significativos resultados com rendimentos em ésteres de 85,5% para óleo de algodão, 93% para óleo de girassol e 83,5% para o óleo de semente de gergelim em tempos reacionais relativamente curtos de 30 a 90 minutos,

Outros trabalhos também destacam a eficácia do transesterificação com o auxílio de energia ultrassônica (Ji *et al.*, 2006; Hanh *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2010; Babajide *et al.*, 2010; Thanh *et al.*, 2010; Somnuk *et al.*, 2012; Maddikeri *et al.*, 2013). Segundo os autores o uso do ultrassom no processo conduziu a elevados rendimentos (93 a 99%) em temperaturas amenas e tempos relativamente curtos, devido à cavitação e emulsificação do sistema líquido-líquido imiscível.

Entretanto, apesar da vasta influência exercida pelo ultrassom nas reações de transesterificação de óleos e gorduras via catálise alcalina e ácida, poucos trabalhos foram encontrados na literatura relacionados à produção enzimática de biodiesel em banho de ultrassom bem como acerca da influência do ultrassom nas reações enzimáticas de esterificação e transesterificação para produção de biodiesel. 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. Para isso é necessário estudos mais aprofundados sobre este assunto.

Conforme Özbek e Ülgen (2000) estudos investigativos sugerem que dependendo do tipo de enzima empregado em um processo catalítico podem ocorrer diferentes comportamentos destas enzimas em relação à influência do ultrassom, podendo em alguns casos ser um eficiente acelerador de reações chegando a aumentar a atividade catalítica e em outros, ocasionar a total inibição do biocatalisador.

Entretanto conforme alguns trabalhos da literatura (Yu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Veljković *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013.) ao final das reações de transesterificação verificou-se que a atividade enzimática é aumentada com o auxílio da baixa frequência e a energia branda das ondas do ultrassom agregada ao uso de alcoóis de cadeia curta (metanol, etanol e propanol). Segundo estes autores, a baixa frequência aliada à energia ultrassônica leve são um fator chave para aumentar a atividade enzimática, emulsificando o sistema reacional óleo-álcool, e acelerando a velocidade do sistema.

Segundo Veljkovic *et al.* (2012), até o momento assim como apresentado neste estudo, apenas a enzima *Novozym 435*, uma lipase comercial preparada da *Candida antarctica* imobilizada em resina poliacrílica, foi testada utilizando ultrassom em estudos para reações de transesterificação de óleo de soja e óleos residuais com elevados índices de acidez, juntamente com alcoóis de cadeia curta metanol e propanol.

5.3. ESTUDO DE VARIÁVEIS DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES A PARTIR DA ETANÓLISE DE ÓLEO DE MACAÚBA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

Após os resultados preliminares obtidos na etapa anterior, e dados de trabalhos utilizando transesterificação enzimática de óleo de soja em banho de ultrassom (Trentin, 2013), realizou-se um planejamento de experimentos 2^{4-1} com 11 ensaios, e triplicata do ponto central, de modo a realizar um "screening" das variáveis importantes no processo.

O efeito das variáveis avaliadas nesta etapa foram: temperatura, razão molar óleo:etanol, concentração de enzima e potência de ultrassom, mantendo-se fixo o tempo de 90 minutos com base no resultado obtido na etapa anterior.

A Tabela 13 apresenta a matriz do planejamento de experimentos e as respostas em termos de rendimento em ésteres etílicos. A partir desta tabela pode-se verificar que o rendimento mais elevado foi obtido no experimento 7 (48,73%), correspondendo à temperatura de 40 °C, razão molar entre os substratos de 1:10, 20% (m/m) de enzima e 40% de potência de ultrassom.

Os resultados também demonstram boa reprodutibilidade do ponto central com conversões entre 47,8 e 48,7%. Entretanto, as respostas obtidas foram consideradas insatisfatórias, sendo as conversões inferiores a 50% e, portanto, menores em relação aos experimentos iniciais, o que é justificável, teoricamente, devido à menor concentração de enzima utilizada em relação anteriormente.

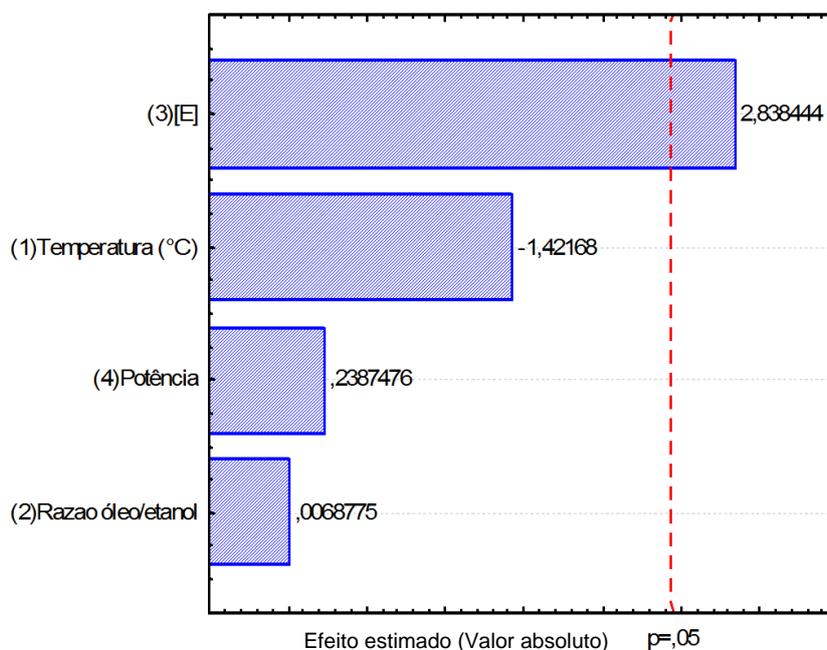
Tabela 13. Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} com 11 ensaios apresentando a resposta em termos de rendimento em ésteres etílicos (%), em sistema livre de solvente em banho de ultrassom, utilizando óleo de macaúba e etanol como substratos e *Novozym 435* como catalisador.

Exp.	Temperatura (°C)	Razão molar óleo/etanol	Concentração de enzima (%m/m)	Potência de ultrassom (%)	Rendimento em ésteres(%)
1	40	1:3	5	40	38,68
2	70	1:3	5	100	38,48
3	40	1:10	5	100	42,02
4	70	1:10	5	40	35,65
5	40	1:3	20	100	47,08
6	70	1:3	20	40	45,01
7	40	1:10	20	40	48,73
8	70	1:10	20	100	42,81
PC	55	1:6,5	12,5	70	47,81
PC	55	1:6,5	12,5	70	47,36
PC	55	1:6,5	12,5	70	48,72

Com base nos experimentos anteriores, um 12º experimento foi realizado empregando as condições experimentais: 40°C, razão molar óleo/etanol (1:10), concentração enzima 20% (m/m) e potência ultrassônica 100%, obtendo-se conversão em ésteres de 48,5%.

Os dados obtidos na Tabela 13 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 15).

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



Conforme apresentado na Figura 15 dentre as quatro variáveis analisadas, pode-se observar que somente a concentração de enzima apresentou efeito significativo neste processo, com 95% de confiança.

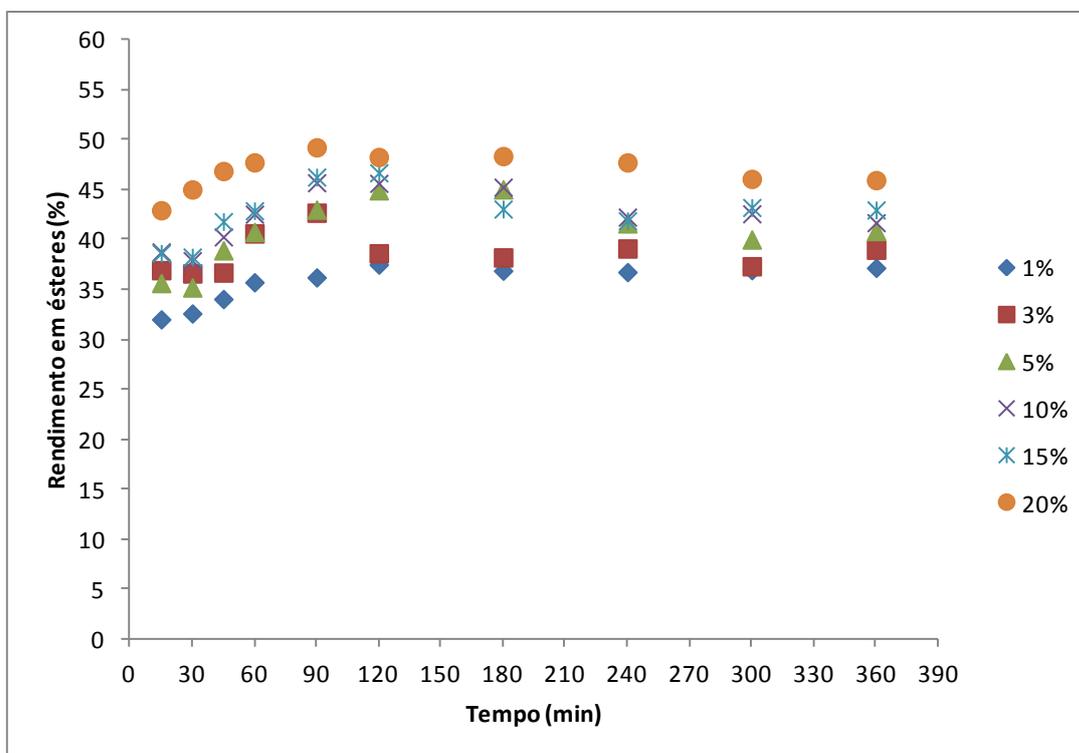
Batistella *et al.* (2012), investigando o efeito destas variáveis e concentração de água na produção de biodiesel por transesterificação de óleo de soja com solvente orgânico em sistema de ultrassom também observou o efeito positivo significativo da concentração desta enzima.

5.4. ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA NA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA

Nas reações de transesterificação enzimática em ultrassom avaliou-se o rendimento em ésteres etílicos produzidos durante o estudo prévio do processo de produção de biodiesel com óleo de macaúba em sistema livre de solvente.

Tendo em vista o fato de que somente a concentração de enzima apresentou-se como uma variável significativa no processo de produção de ésteres etílicos e em virtude da tentativa de redução de custos do processo, novos estudos, variando somente a concentração de enzima de 1 a 20% (m/m) foram realizados, mantendo as outras variáveis nas condições estabelecidas pelo experimento 1 do planejamento experimental: 40 °C, razão molar óleo/etanol 1:3 e 40% da potência do ultrassom (132 W). Os resultados obtidos nessas condições são apresentados na Figura 16.

Figura 16. Rendimento em ésteres etílicos obtidos na transesterificação enzimática do óleo de macaúba em banho de ultrassom com diferentes concentrações de lipase Novozym 435.



De acordo com a Figura 16 pode-se observar que o rendimento em ésteres etílicos foi variável entre as diferentes concentrações de enzima com conversões superiores a 32% nos tempos iniciais em todos os experimentos. Entretanto, observa-se que o estudo segue uma tendência à medida que se aumenta a concentração de enzima, também há um aumento na conversão em ésteres com os melhores rendimentos obtidos com a concentração de enzima de 20% e obtendo-se conversão máxima de 48,86% em tempo reacional de 90 minutos.

Desta forma, as etapas posteriores deste trabalho, relacionadas à melhoria da produção de ésteres etílicos, foram conduzidas utilizando concentração da enzima Novozym 435 de 20% em relação à massa dos substratos.

Na literatura são encontrados trabalhos com aplicação de enzimas para reações de transesterificação de óleos (Fukuda *et al.*, 2008; Jegannathan *et al.*, 2008; Hajar *et al.*, 2009; Lam *et al.*, 2010; Bajaj *et al.*, 2010; Brun *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2013, Chattopadhyay e Sen, 2013; Haigh *et al.*, 2014; Christopher *et al.*, 2014; Aarthy *et al.*, 2014) .

Faccio (2004) estudou a produção de biodiesel etílico de soja em sistema orgânico (n-hexano) com duas lipases (Novozym 435 e Lipozyme IM) em shaker à 200 rpm por 8 horas. A maior conversão observada experimentalmente foi de 95,6 para o sistema contendo óleo de soja- Lipozyme IM. Utilizando o mesmo procedimento, a condição experimental otimizada para o sistema óleo de soja-Novozym 435, empregou-se temperatura de 65 °C, concentração de enzima 5% (m/m), e razão molar óleo-etanol de 1:3. Nestas condições a conversão em ésteres foi de apenas 11,8%.

Talukder *et al.* (2009) produziram biodiesel a partir de óleo de palma bruto utilizando metanol e a lipase comercial Novozym 435 como biocatalisador. Os melhores rendimentos em metil ésteres (92%) foram obtidos quando utilizada 4% (m/m) da Novozym 435 em relação à massa de substratos, razão molar metanol/óleo 6:1 em tempo reacional de 10 horas sob agitação em shaker a 40 °C.

Du *et al.* (2004) realizaram um estudo para produção de biodiesel catalisada por lipase Novozym 435 empregando como matéria-prima óleo de soja bruto. Os autores obtiveram rendimentos em metil ésteres de 92% utilizando metil acetato na razão molar óleo/álcool 1:12, temperatura reacional de 40 °C em shaker à 150 rpm e utilizando 30% (m/m) de Novozym 435 em relação à massa de substratos.

5.5. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO USO DE PENEIRA MOLECULAR NA TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DO FRUTO DE MACAÚBA

Com a finalidade de melhorar os resultados iniciais obtidos novas investigações foram realizadas utilizando um mesmo lote de óleo de macaúba empregando 20% da lipase Novozym 435 em relação à massa dos substratos. As demais variáveis conduzidas neste momento do trabalho foram: temperatura 65 °C, relação molar óleo/etanol 1:9 (m/m), 100% da potência da capacidade máxima do ultrassom (132 W).

O parâmetro de temperatura utilizado nos testes reacionais foi baseado na temperatura ótima de atuação da enzima (Novozym 435) fornecida pelo fabricante (Novozymes A/S), que é entre 60 – 70 °C e em dados da literatura que sugerem outras temperaturas para a reação de transesterificação utilizando lípases (Yu *et al.*, 2010, Batistela *et al.*, 2012, Kruger *et al.*, 2011). Para as demais variáveis do processo foram levados em consideração dados de outros trabalhos de transesterificação enzimática (Trentin, 2012, Popiolski, 2011, Batistella *et al.*, 2012, Nogueira *et al.*, 2010).

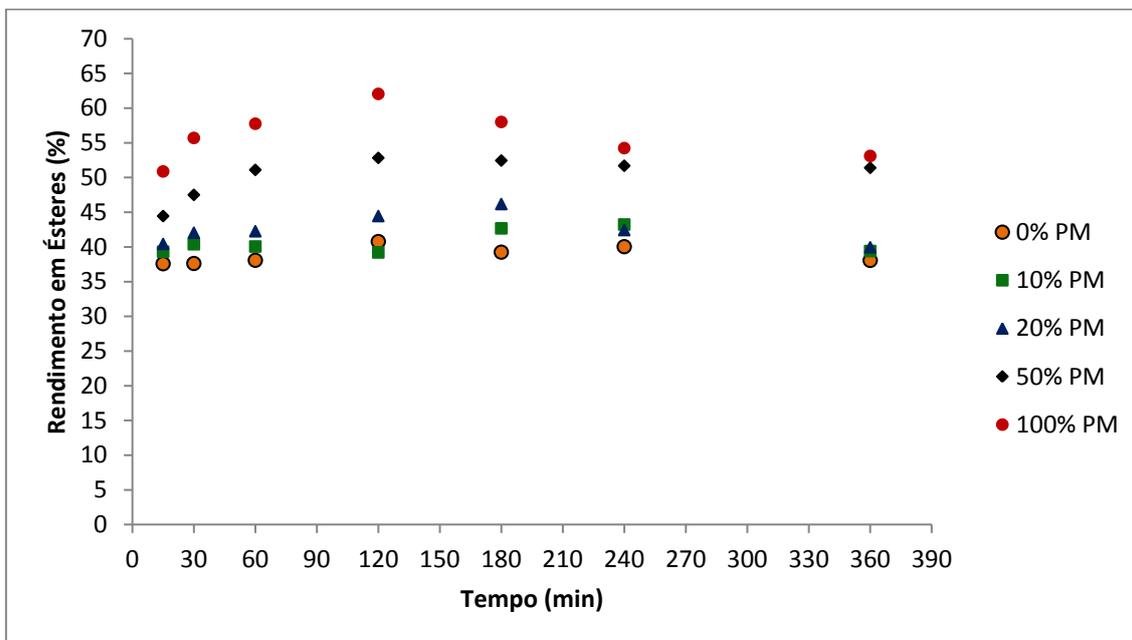
O estudo foi conduzido em diferentes tempos reacionais durante 360 minutos sendo adicionadas juntamente à reação de transesterificação diferentes concentrações de peneira molecular (0, 10, 20, 50 e 100% em relação à massa dos substratos) a fim de absorver o excesso de água produzida durante o processo reacional de transesterificação do óleo de macaúba usando etanol como acceptor de grupo acila para converter os triglicérides nos seus correspondentes ésteres etílicos.

Conforme destaca Jegannathan *et al.* (2008) óleos vegetais com elevada acidez e alta umidade apresentam a tendência de favorecer reações

de esterificação (quando em contato com álcool), a qual é indesejável sem o uso de um material adsorvente, uma vez que durante a reação pode-se, gerar como subprodutos glicerol e água. A água formada, provavelmente, levará à hidrólise de mais ácidos graxos e, conseqüentemente, a menores conversões.

Pelo óleo de macaúba apresentar elevada acidez, o uso de peneira molecular é uma alternativa necessária. A Figura 17 apresenta os resultados deste estudo reacional aplicando diferentes concentrações de peneira molecular.

Figura 17. Cinética enzimática de conversão de ésteres do óleo do fruto de macaúba com diferentes concentrações de peneira molecular em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.



Segundo Antczak *et al.* (2009), o teor de água na reação pode ser um fator determinante no rendimento da síntese enzimática de biodiesel. É consenso que um pouco de água é necessário para manter a enzima na sua forma cataliticamente ativa. Por outro lado, a água pode tomar parte na transesterificação, influenciando assim o equilíbrio (Kaieda *et al.*, 1999).

Nogueira *et al.* (2010) destacam que a transesterificação de óleos vegetais é muito sensível às condições experimentais de reação. A quantidade

de água no meio reacional é conhecida por influenciar fortemente a taxa de reação e este parâmetro algumas vezes é otimizado pela adição controlada de água no meio reacional.

O controle de água é importante, pois ela atua como “lubrificante” mantendo a enzima na sua conformação ativa, promove agregação de partículas de enzima, limita difusão de substrato e também a hidrólise do substrato. Com o aumento da quantidade de água as gotículas de óleo e água formadas aumentam a área interfacial para a enzima. Entretanto, a água pode estimular esta reação competidora do substrato e o seu excesso 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).

Segundo Rodrigues (2009) e Nourenddini (2005), o ótimo conteúdo de água é um fator fundamental entre minimizar a reação de hidrólise e maximizar a atividade da enzima para a reação de transesterificação.

Neste estudo, a quantidade residual de água presente no etanol e no óleo de macaúba foram assumidas como suficientes para evitar a desnaturação da enzima não sendo realizada desta forma a adição de água junto ao meio reacional.

Observando os resultados obtidos na Figura 17 percebe-se a influência positiva do uso da peneira molecular na reação de transesterificação mostrando-se como um processo eficiente, com conversões em ésteres de 62,9% com o uso de 20% de peneira molecular (em relação à massa total de substratos). Ao comparar com a reação sem o uso de peneira molecular nota-se um declínio significativo na conversão, 39,2%.

Conforme Azocar *et al.* (2011) materiais adsorventes, tais como pérolas de sílica gel azul e peneiras moleculares de diferentes tamanhos têm demonstrado serem recursos eficazes na remoção de água produzida durante a produção de biodiesel. A adsorção do excesso de água gerada durante a reação de transesterificação proveniente de álcoois utilizados pode ocorrer quando peneiras moleculares com tamanho de poros grandes (3 – 5 Å) são usadas. O uso destes materiais pode melhorar significativamente o rendimento

final em ésteres produzidos evitando reações paralelas indesejadas durante o processo tais como reações de hidrólise e esterificação produzindo assim metil ou etil ésteres de ácidos graxos, principalmente por transesterificação.

5.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE APÓS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE MACAÚBA EM ULTRASSOM

Devido à elevada acidez apresentada pelo óleo de macaúba, a reação predominante realizada por este óleo seria a esterificação dos ácidos graxos livres e nessa reação ocorre a formação de água e ésteres. De acordo com Lucena *et al.* (2008), para aumentar o rendimento de ésteres, a água deve ser removida da reação de esterificação através de adsorventes seletivos, como zeólitas e peneiras moleculares.

Com base na Figura 17 utilizou-se a melhor condição experimental com peneira molecular (100% PM) e realizou-se a quantificação do teor de água presente nas amostras do estudo cinético após processo de transesterificação.

A metodologia empregada foi pelo método de titulação em Karl Fischer. A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 14. Porcentagem de água presente no óleo de macaúba após reação de transesterificação e rendimento em ésteres.

AMOSTRA (1:9) (100% PM)	TEOR DE UMIDADE (%)	CONVERSÃO EM ÉSTERES (%)
15 minutos	0,8070	51,18
30 minutos	0,6128	56,31
60 minutos	0,5031	58,05
120 minutos	0,3724	62,88
180 minutos	0,4666	58,47
240 minutos	0,5144	54,62
360 minutos	0,5398	53,41

Ao analisar os resultados apresentados na Tabela 14, percebe-se que à medida que aumenta a conversão em ésteres ocorre o declínio do teor de umidade apresentado pelo óleo após reação de transesterificação. Porém,

após 120 minutos nota-se que o teor de umidade aumenta gradativamente e as conversões em ésteres diminuem. Isso se deve possivelmente à saturação da peneira molecular pela água adsorvida durante a reação.

Kucek *et al.* (2007) realizaram a transesterificação do óleo de soja com etanol de duas formas. Na primeira forma, a reação foi realizada sem adsorvente e obtiveram rendimento de 87%; na segunda forma, foi adicionado na reação o adsorvente Magnesol no teor de 2% (m/m), que resultou em um rendimento em ésteres de 98%.

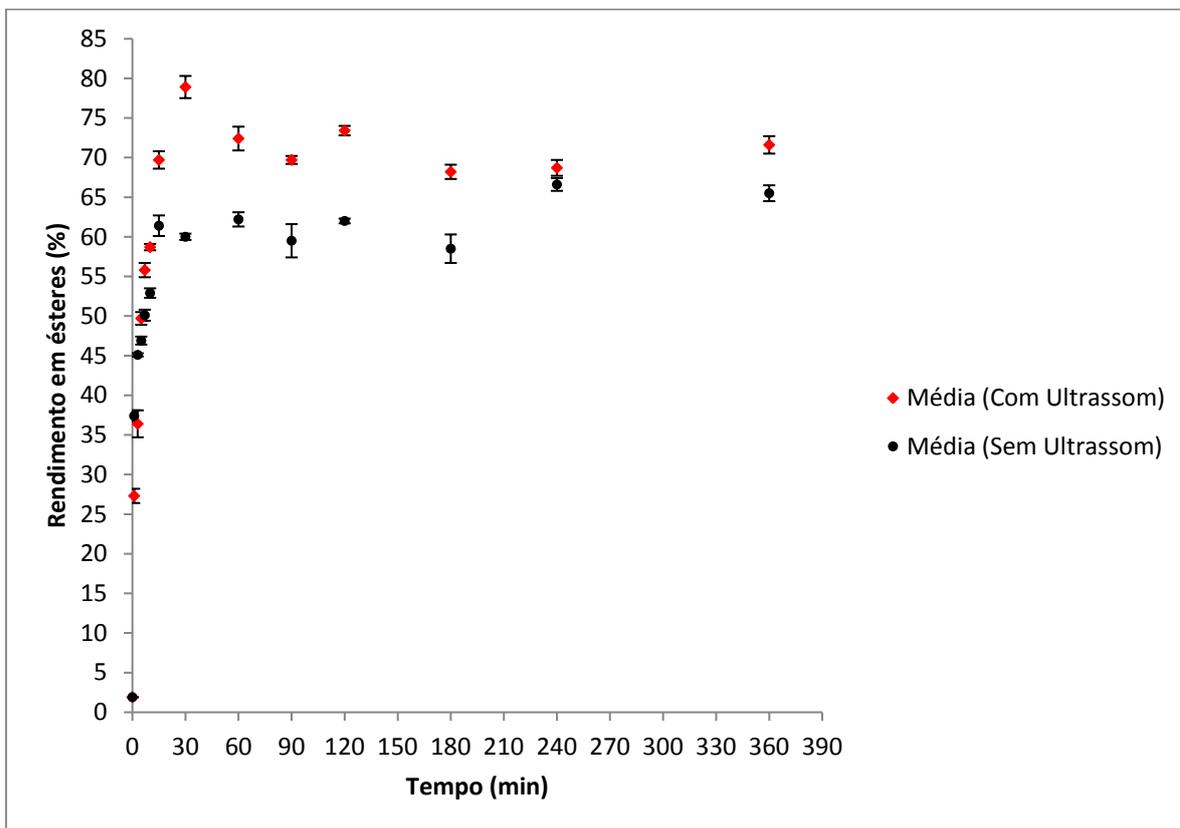
Semelhantemente, Azocar *et al.* (2011) estudaram a produção de biodiesel enzimático utilizando resíduo de óleo de fritura como substrato, metanol, Novozym 435 como catalisador e peneira molecular 4 Å para adsorver a água produzida durante a reação. Segundo os autores as condições anídras do processo conduziram a melhor esterificação dos ácidos graxos livres, derivados do óleo de fritura durante o tempo inicial da reação. Os rendimentos em ésteres obtidos usando 0,2 g de peneira molecular e tempo reacional de 12 horas foram de aproximadamente 75%. Usando as mesmas condições experimentais sem a adição de peneira molecular os rendimentos foram de aproximadamente 50%.

5.7. DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO EXPERIMENTAL PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÓLEO DE MACAÚBA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM ULTRASSOM

Após determinada a melhor condição experimental para produção enzimática de ésteres etílicos de óleo de macaúba em sistema livre de solvente em banho de ultrassom, novos testes foram realizados visando este mesmo objetivo, utilizando um segundo lote de óleo de macaúba, enviado pelo mesmo fornecedor. Conforme caracterização, este óleo apresenta um índice de acidez e índice de peróxidos menores que o primeiro lote e maior quantidade de triacilgliceróis (TAG). Essas características possibilitam ao óleo proveniente do segundo lote uma maior capacidade de transesterificação e conseqüentemente maior rendimento em ésteres ao final da reação.

Para a sequência dos experimentos, nesta etapa realizou-se um estudo detalhado com tempos de reação variando de 0 a 360 minutos. Visando verificar a eficiência do banho de ultrassom no processo reacional foram realizados testes nas mesmas condições experimentais sem o uso do ultrassom. As condições experimentais empregadas foram: razão molar óleo/etanol 1:9, temperatura 65 °C, 100% de peneira molecular (m/m), 20% da lipase comercial Novozym 435 em relação à massa dos substratos e potência máxima do ultrassom (132 W). Os resultados obtidos neste estudo são apresentados na Figura 18.

Figura 18. Transesterificação enzimática do óleo do fruto de macaúba (Lote 2) com e sem o uso de banho de ultrassom em modo batelada.



Visto o grande potencial para produção de biodiesel com o destaque apresentado para a macaúba referente à sua vasta produção de óleo em comparação com outras fontes oleaginosas (Nucci *et al.*, 2008; Oliveira, 2006), alguns trabalhos na literatura são encontrados referentes a esta aplicação com

significativas conversões (Rodrigues, 2007; Rezende, 2009; Melo, 2012; Lemke Gonzalez, 2012; Lopes *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Aguietas *et al.*, 2014; Navarro-Díaz *et al.*, 2014, Silveira; 2014).

Ao analisar os resultados obtidos percebe-se que em um processo de produção de ésteres é extremamente importante que conversões máximas sejam obtidas em tempos reacionais curtos, como ocorreu neste estudo, pois isso implica em um menor gasto energético e, portanto, maior viabilidade econômica do processo.

Entretanto, segundo Ruiz-Méndez *et al.* (2008), o óleo pode sofrer várias alterações durante os processos de extração e armazenagem onde ocorre a formação de polímeros, dímeros, triacilgliceróis oxidados, etc. Esses compostos formados não podem ser convertidos em ésteres, implicando assim em um decréscimo real do rendimento em biodiesel ao final da reação.

Navarro-Díaz *et al.* (2014) determinaram em seu estudo a convertibilidade máxima em ésteres de algumas amostras de óleo do fruto da macaúba não refinados com índices de acidez de 45 a 65%. Os valores máximos encontrados para convertibilidade em ésteres foram respectivamente variáveis, de 80,1 a 91,6% sendo assim assumido que uma quantidade significativa de compostos não conversíveis em ésteres estão presentes nestes óleos de macaúba brutos. Os autores definiram convertibilidade máxima como o conteúdo de ésteres obtidos por método de conversão completa dos ácidos graxos da amostra em ésteres metílicos/etílicos correspondentes, independente da sua forma no óleo.

Com base nestes parâmetros observa-se que os resultados obtidos no trabalho são promissores, atingindo conversões próximas a este patamar, com rendimentos em ésteres de aproximadamente 79% no tempo de 30 minutos com o uso do banho de ultrassom. Em estudo comparativo entre o uso do banho de ultrassom no processo percebe-se neste mesmo tempo reacional conversão em ésteres de aproximadamente 60% demonstrando assim a eficiência do emprego do ultrassom no processo. Conversões superiores a 65% sem o uso do ultrassom somente foram alcançadas após 240 minutos de reação.

Badday *et al.* (2013), durante a otimização do processo de produção de biodiesel a partir de óleo de pinhão-manso utilizando catalisador ácido e assistido por energia ultrassônica, observaram que o aumento da amplitude do ultrassom leva a um ligeiro aumento do rendimento nos tempos iniciais.

Ainda conforme Ji *et al.* (2006), o emprego da tecnologia de ultrassom tem sido amplamente utilizada em várias reações químicas e biológicas para melhorar o rendimento final do produto reacional dentro de um tempo mais curto de reação. Segundo os autores, este método tem sido reconhecido como um procedimento eficaz para aumentar a taxa de transferência de massa entre fases imiscíveis líquido-líquido no interior de um sistema heterogêneo.

Do mesmo modo, Vyas *et al.* (2010) destacam que a transesterificação empregando a tecnologia do ultrassom não só reduz o tempo de reação, mas também minimiza a razão molar de álcool para óleo utilizada, possibilitando que a reação ocorra com baixas concentrações de catalisador e reduzindo o consumo de energia em comparação com o método convencional de agitação mecânica.

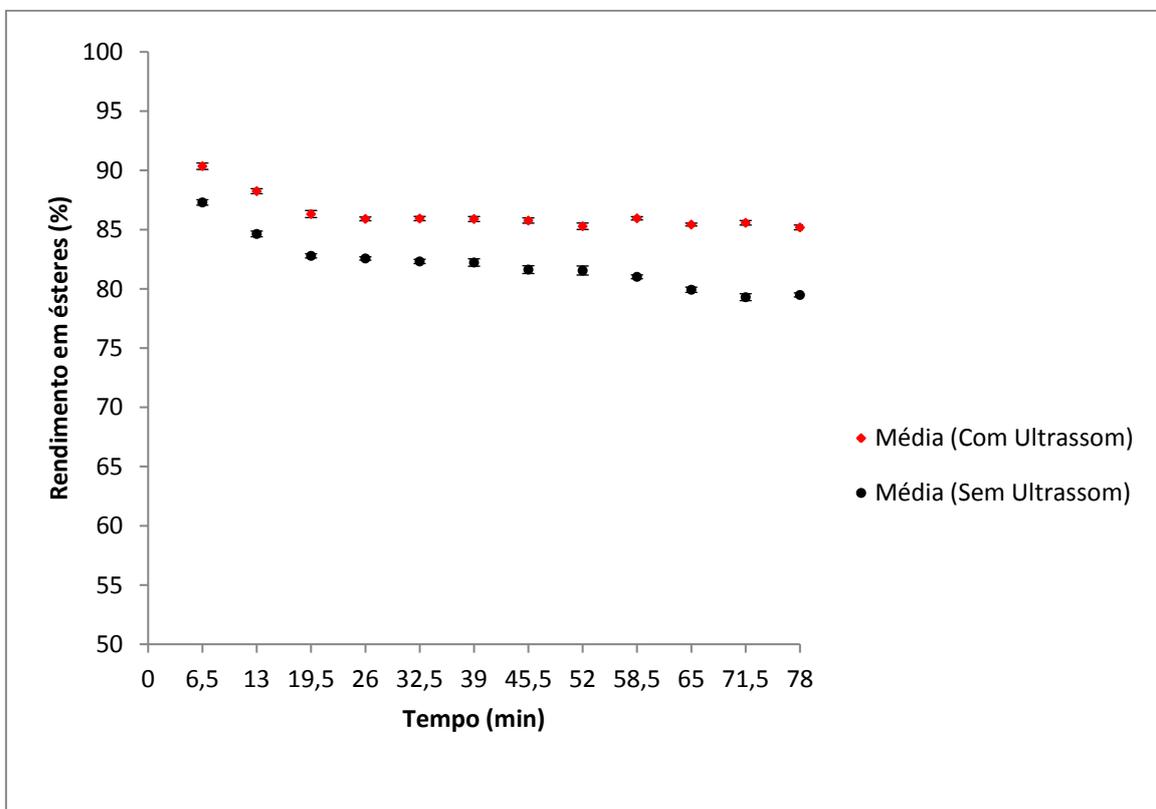
5.7.1 ESTUDO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÓLEO DE MACAÚBA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM ULTRASSOM EM PROCESSO CONTÍNUO

Determinada a melhor condição de experimentos para produção enzimática de ésteres etílicos empregando óleo do fruto de macaúba e sistema de ultrassom em modo batelada, realizou-se semelhante estudo empregando-se o mesmo óleo em processo em modo contínuo.

Para sequência dos experimentos, nesta etapa utilizou-se as mesmas condições experimentais empregadas na melhor condição em modo batelada (razão molar óleo/etanol 1:9, temperatura 65 °C, 0% e 100% da potência ultrassônica (154 W). O reator de polietileno foi empacotado com aproximadamente 8 g da lipase *Novozym 435* e 50% de peneira molecular (m/m em relação à massa de enzima) e a vazão de alimentação empregada foi 2,0 mL/min. O tempo espacial da 1ª gota percorrida pela mistura reacional dentro do reator ocorreu após 13 minutos de reação, sendo após realizadas

coletas de amostras para análise a cada 6,5 minutos com tempos de reação variando até 78 minutos, conforme apresentado na Figura 19.

Figura 19. Transesterificação enzimática do óleo do fruto de macaúba (Lote 2) com e sem o uso de banho de ultrassom em modo contínuo.



Conforme dados apresentados na Figura 19, verifica-se que assim como no processo batelada a potência ultrassônica exerce boa influência sobre conversão em ésteres etílicos quando comparado às reações sem o uso do ultrassom, com rendimento de 90% em ésteres no tempo reacional de 6,5 minutos. Após este período inicial observa-se que as conversões se mantêm praticamente estáveis durante todo o processo utilizando-se o ultrassom, com conversões em torno de 86%. Ao verificar-se o processo no qual a tecnologia ultrassônica não é empregada nota-se um leve e gradativo decaimento na conversão de ésteres no decorrer do período reacional estudado chegando ao rendimento final em ésteres de 79% após 78 minutos de reação.

Também a atividade enzimática ao final das reações foi determinada e os resultados comprovaram que o uso do ultrassom não interferiu na atividade enzimática das mesmas com atividade de 45,11 U/g na reação com o uso do

ultrassom (154 W) e 46,87 U/g para a reação realizada apenas com agitação, temperatura e 0% de potência ultrassônica.

Segundo Veljković *et al.* (2012) a produção de ésteres em 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.

Alguns trabalhos reportam o uso de enzimas como catalisadores adotando o processo em modo batelada, que apresentam algumas desvantagens reacionais em relação ao modo contínuo, tais como: tempo reacional de batelada longo, baixa qualidade dos produtos e elevado custo do processo (He *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2011; Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2013).

Assim, a viabilidade de um processo contínuo de transesterificação é de fundamental importância para assegurar um custo competitivo do biodiesel, uma vez que o método contínuo catalisado por lipases pode ser operado com um desempenho reacional mais elevado do que os reatores em batelada, com a qualidade do produto mais consistente e reproduzível (Silva *et al.*, 2007; Vieitez *et al.*, 2008).

Navarro-Díaz *et al.* (2014) estudaram a produção de ésteres a partir de óleo de macaúba em processo contínuo sem emprego de catalisador usando apenas alcoóis supercríticos. Os experimentos foram realizados em diferentes temperaturas, pressões, razão molar óleo/álcool e taxas de fluxo reacional variando de 1,0 a 3,0 mL/min. Conversões em ésteres de 78,5% empregando metanol e vazão de 2,5 mL/min e 69,6% utilizando etanol e vazão de 2,0 mL/min foram obtidas para o óleo de macaúba.

Santin *et al.* (2015) realizaram um estudo comparativo da produção de ésteres etílicos através do processo de transesterificação do óleo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) e do óleo de soja utilizando o modo contínuo e catalisador enzimático. Segundo os autores, ao final do processo o óleo de macaúba apresentou um melhor desempenho na conversão em ésteres (63,73%) quando comparado ao óleo de soja (51,06%), apesar do elevado teor de acidez.

Outros trabalhos são encontrados na literatura em relação à produção de biodiesel empregando óleo de macaúba e catálise enzimática (Freitas *et al.* 2012, Nogueira *et al.*, 2010). Empregando etanolise do óleo de macaúba por irradiação de microondas utilizando as lipases *Burkholderia cepacia* (PS), Novozym 435 (*Candida antarctica*) e Lipozyme IM (*Mucor miehei*) rendimentos de transesterificação de 70, 45 e 35,8% foram obtidos em tempos reacionais variando de 30 minutos a 12 horas de reação.

5.8. ESTUDO DE REUSO E ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE NOVOZYM 435

Na literatura, diversos autores (Villeneuve *et al.*, 2000; Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Nouredini *et al.*, 2005; Fernandez-Lorente *et al.*, 2007; Yagiz *et al.*, 2007; Ranganathan *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2012; Yaakob *et al.*, 2013; Gharat e Rathod, 2013; Hama *et al.*, 2013; Christopher *et al.*, 2014) destacam que entre as vantagens do uso de enzimas imobilizadas em reações de interesse estão a sua possibilidade de reciclo ao final do processo e reutilização das mesmas.

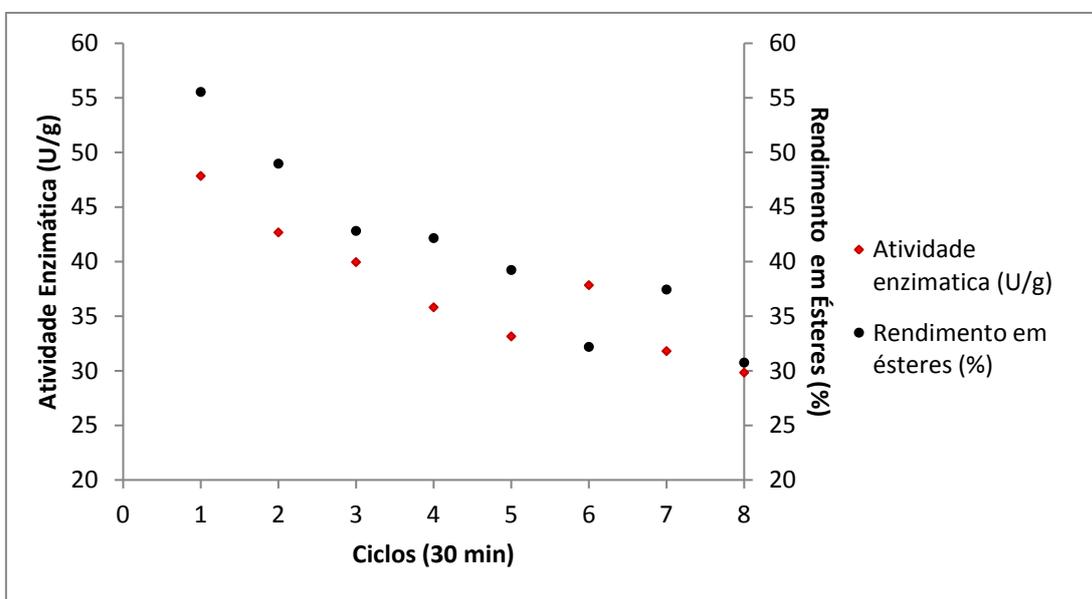
Devido ao alto custo para aplicação a nível industrial, a reutilização das enzimas torna-se um fator determinante para a competitividade frente aos processos de catálise química para a produção de biodiesel.

Com base nestes argumentos e a partir dos melhores resultados obtidos no estudo reacional com óleo de macaúba foram selecionados os tempos de 30 e 120 minutos para avaliação dos ciclos de reutilização da enzima Novozym 435. Os estudos de reutilização do biocatalisador foram realizados a fim de investigar a estabilidade da lipase imobilizada sob as condições da radiação ultrassônica empregada no trabalho após sucessivos ciclos de uso.

Para o desenvolvimento das análises de reuso da enzima empregou-se um aumento de escala de 10 vezes em relação as massas de óleo, etanol, enzima e peneira molecular usadas nos testes anteriores.

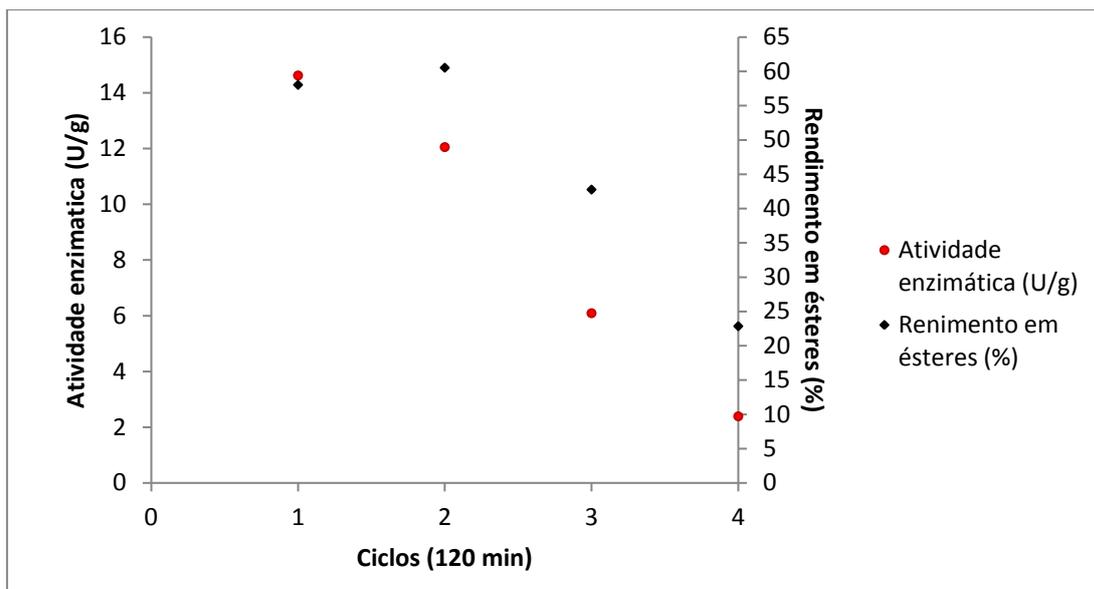
As Figuras 20 e 21 apresentam os resultados experimentais de conversão de ésteres etílicos e a respectiva atividade enzimática residual após cada ciclo.

Figura 20. Atividade de esterificação da Novozym 435 e rendimento em ésteres após cada ciclo de 30 minutos de uso para produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom nas condições experimentais: 65 °C, razão molar óleo etanol 1:9, 100% de peneira molecular (m/m), 20% (m/m) Novozym 435 e 100% de potência máxima do ultrassom (132 W).



Atividade enzimática inicial da Novozym 435: 60 U/g.

Figura 21. Atividade de esterificação da Novozym 435 e rendimento em ésteres após cada ciclo de 120 minutos de uso para produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom nas condições experimentais: 65 °C, razão molar óleo etanol 1:9, 100% de peneira molecular (m/m), 20% (m/m) Novozym 435 e 100% de potência máxima do ultrassom (132 W).



Atividade enzimática inicial da Novozym 435: 60 U/g.

Conforme apresentado nas Figuras 20 e 21, a enzima Novozym 435 manteve uma boa atividade durante 8 ciclos no tempo de 30 minutos de exposição a irradiação do banho de ultrassom, perdendo gradativamente a sua atividade até atingir perda de 49% no oitavo ciclo em relação a sua atividade inicial.

Para o tempo de exposição de 120 minutos percebe-se que o ultrassom afetou de forma drástica a atividade da enzima com perda de aproximadamente 76% já no segundo ciclo de reuso e perda quase total da atividade enzimática após 4 ciclos. O mesmo comportamento é observado em relação ao rendimento em ésteres.

Assim nota-se que a medida que a atividade de esterificação diminui, também percebe-se uma queda no rendimento em ésteres etílicos chegando à 30,76% com atividade enzimática de 29,84 U/g após o oitavo ciclo nos tempos

de 30 minutos e 22,84% em ésteres etílicos com atividade enzimática de apenas 2,39 U/g no quarto ciclo nos tempos de 120 minutos.

Conforme Zhu *et al.* (2010), baixas intensidades de ondas ultrassônicas podem favorecer o fluxo dos reagentes e substratos ao sítio ativo da enzima, favorecendo a reação. 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. No entanto, segundo os autores, a intensidade empregada e/ou o tempo de irradiação pode levar à inativação da enzima pelo colapso cavitationnal como observado neste estudo.

Hoshino *et al.* (2006) destacam que as ondas de ultrassom podem também interferir nas características da enzima, alterando sua estrutura em resposta à perturbação dinâmica provocada pelo ultrassom.

Entretanto, encontram-se resultados contraditórios referentes a inativação e ativação da enzima após serem submetidas ao ultrassom. Diferente da tradicional inativação das enzimas em temperaturas elevadas, o processo de sonicação às vezes não destrói o sítio ativo das enzimas. Esta constatação tem sido claramente demonstrada em trabalhos com α -amilase, lacase e fosfatase alcalina (Ozbek e Ülgen, 2000; Basto *et al.*, 2007; Tauber *et al.*, 2008).

Özbek e Ülgen (2000) investigaram o efeito do ultrassom em seis enzimas: álcool desidrogenase, maleato desidrogenase, glucose-6-fosfato desidrogenase, desidrogenase láctica, fosfatase alcalina and β -galactosidase em sistemas aquosos. As enzimas apresentaram uma estabilidade variável. Apenas a fosfatase alcalina não apresentou desativação, enquanto a glucose-6-fosfato desidrogenase apresentou mais de 70% de desativação para um minuto de exposição ao ultrassom.

Moreira *et al.* (2007), em seu trabalho de síntese de biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de palma com etanol usando lipase (*Pseudomonas fluorescens*) imobilizada em compósito de Sílica-PVA, observaram um decaimento de 25% da atividade catalítica após o reuso da enzima imobilizada em 5 ciclos de reação.

Na literatura diversos trabalhos (Wang *et al.*, 2007; Hajar *et al.*, 2009; Talukder *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2011; Lerin *et al.*, 2011; Batistella *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2012; Chattopadhyay e Sen, 2013; Yun *et al.*, 2013; Gharat e Rathod, 2013; Haigh *et al.*, 2014; Lerin *et al.*, 2014; Waghmare *et al.*, 2015; Trentin *et al.* 2015;) reportam o uso de enzimas imobilizadas, dando-se destaque para a aplicação da lipase Novozym 435, para produção de biodiesel e seu reciclo ao final do processo mantendo sua atividade por vários ciclos.

Assim como descrito ao longo do capítulo, ainda não há um conhecimento tecnológico específico em relação à influência das ondas ultrassônicas sobre as enzimas. Estudos investigativos sugerem diferentes comportamentos das enzimas em relação à influência do ultrassom, podendo em alguns casos ser um eficiente acelerador de reações chegando até aumentar a atividade catalítica e em outros, ocasionar a total inibição do biocatalisador.

5.9. ESTUDOS DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM ULTRASSOM EM PROCESSOS MODO BATELADA E CONTÍNUO

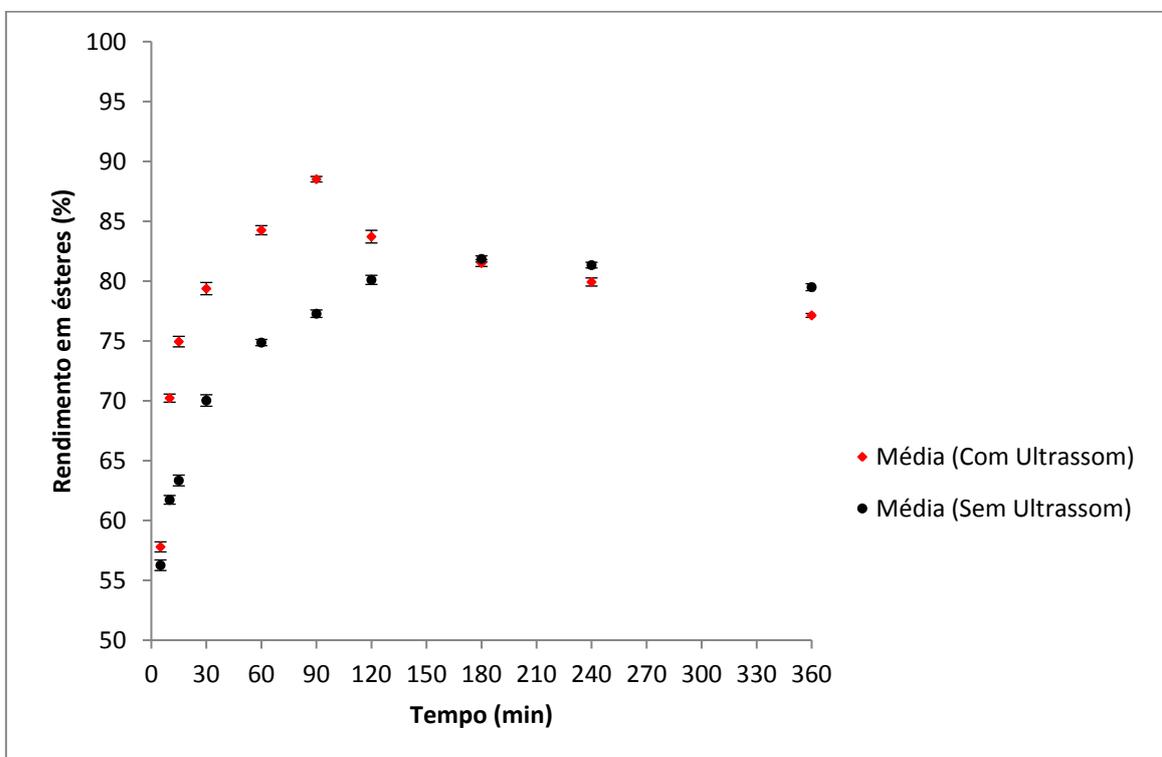
A produção de biodiesel derivado de óleos refinados ou puros tem um problema importante na sua comercialização em que o custo de produção é cerca de 1,5 vezes mais caro em comparação com o diesel derivado de petróleo. Assim, sua produção não é economicamente viável devido ao alto custo das matérias-primas, a elevada energia necessária para produção e a difícil separação do catalisador geralmente usado no processo. Com isso, o óleo de cozinha usado pode ser considerada uma matéria-prima alternativa de baixo custo, facilmente disponível, e a sua utilização oferece benefícios ao meio ambiente evitando seu descarte em lugares inadequados que podem por vezes contaminar solos e águas subterrâneas (Maddikeri *et al.*, 2013).

Em virtude das vantagens e benefícios descritos anteriormente, para sequência deste estudo foram realizadas reações de transesterificação

enzimática em modos batelada e contínuo com auxílio de banho de ultrassom empregando como substratos óleo residual de fritura e etanol.

Os experimentos desenvolvidos nesta etapa seguiram as mesmas condições experimentais empregadas nas reações com óleo de macaúba. No modo batelada: razão molar óleo/etanol 1:9, temperatura 65 °C, 20% da lipase comercial Novozym 435 (m/m em relação à massa dos substratos), 100% peneira molecular (m/m), potência máxima do ultrassom (132 W) e tempo reacional variando de 5 a 360 minutos. Em modo contínuo: razão molar óleo/etanol 1:9, temperatura 65 °C e 100% da potência ultrassônica (154 W). O reator de polietileno foi empacotado com aproximadamente 8 g da lipase Novozym 435 e 50% de peneira molecular (m/m em relação à massa de enzima) e a vazão de alimentação empregada foi 2,0 mL/min. A critério comparativo foram realizadas as mesmas reações sem o uso do ultrassom. As Figuras 22 e 23 apresentam os resultados obtidos nestas etapas.

Figura 22. Produção enzimática de ésteres etílicos derivados de óleo residual de fritura com e sem o uso de banho de ultrassom em modo batelada.



A análise da Figura 22 permite observar que o ultrassom conduziu a bons rendimentos em ésteres etílicos em um curto espaço de tempo reacional quando comparado às reações apenas com o uso da temperatura com rendimento de 88,5% em ésteres em tempo reacional de 90 minutos. Neste mesmo período de reação, a conversão em ésteres sem o uso da potência ultrassônica chegou à 77%. Conversões acima de 80% nestas condições reacionais só foram obtidas após 180 minutos de reação, comprovando-se assim que a produção de ésteres empregando óleo de fritura e energia de ultrassom demonstra ser um processo eficiente, viável e relativamente simples, gerando economia de tempo, reagentes e energia reacional, além de apresentar-se como um processo ambientalmente limpo, ocasionando a redução de poluentes e contaminantes de águas e solos podendo-se dar uma aplicação promissora ao grande acúmulo de resíduos gordurosos gerados diariamente em grandes restaurantes, redes de fast food's e preparo de alimentos em residências domésticas.

Além disso, segundo Talebian-Kiakalaieh *et al.* (2013), o uso de óleo de fritura pode ser um componente chave na redução de custos de produção do biodiesel, podendo esta redução variar de 60 – 90% no produto final.

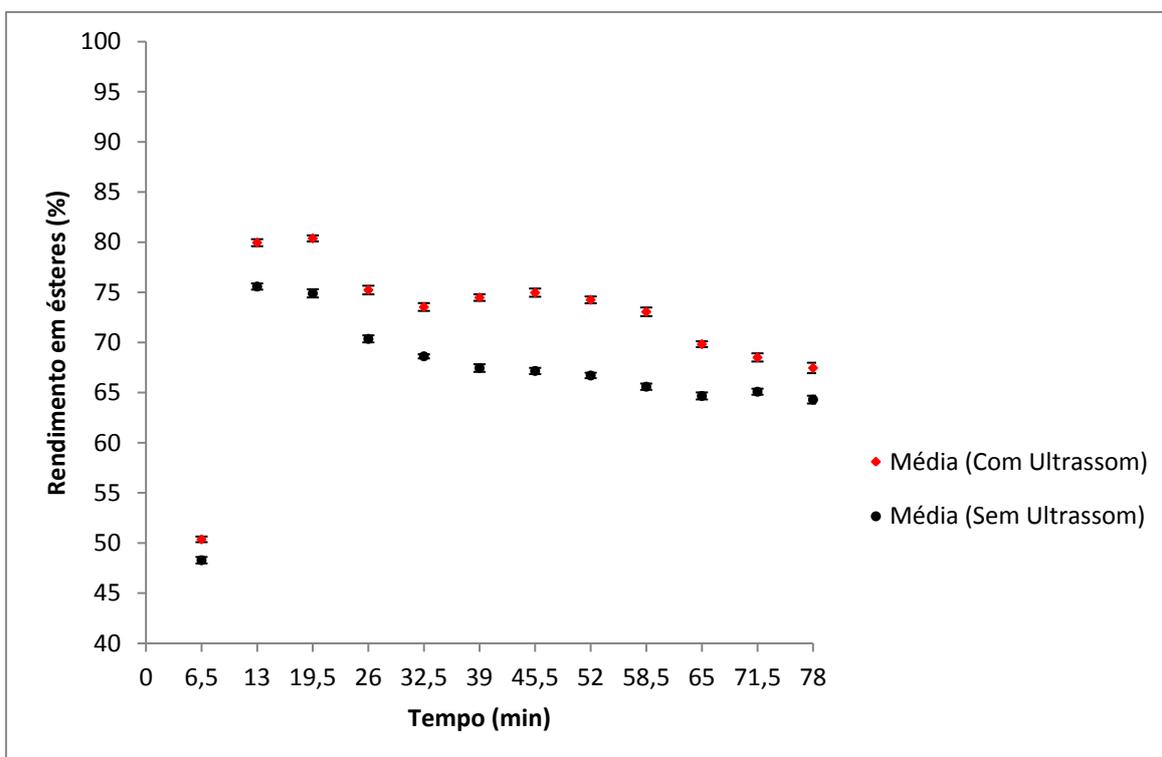
Foram realizadas medidas de atividade de esterificação enzimática nos tempos reacionais de 30, 60, 90, 120 e 360 minutos com o uso da potência ultrassônica para verificar a influência da mesma sobre a enzima. As atividades encontradas após cada tempo reacional foram: 47,61; 43,53; 37,88; 23,79 e 13,76 U/g, mostrando através destes resultados uma expressiva influência do ultrassom sobre a atividade da enzima e conduzindo a uma diminuição gradativa na conversão em ésteres no últimos tempos reacionais.

Em trabalho semelhante ao apresentado neste estudo, Gharat e Rathod, (2013) comparam o uso de ultrassom com agitação convencional na conversão de ésteres metílicos empregando óleo de fritura e lipase Novozym 435. Conversões de 38,7% em ésteres com o uso de agitação convencional foram obtidas após período reacional de 4 horas. Em mesmo tempo reacional com o uso de ultrassom conversões de 57,7% foram obtidas, comprovando a eficiência da técnica empregada. Entretanto, após alguns reusos e longos

tempos de exposição a lipase Novozym 435 mostrou um declínio gradativo em sua atividade enzimática.

Na literatura vários trabalhos são encontrando quanto ao uso de óleo de fritura como matéria prima para produção de biodiesel empregando diferentes técnicas (ultrassom ou agitação mecânica convencional) e catalisadores (enzimáticos e químicos) com conversões em ésteres semelhantes às encontradas neste estudo (Maceiras *et al.*, 2009; Hingu *et al.*, 2010; Babajide *et al.*, 2010; Haigh *et al.*, 2012; Chesterfield *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012; Maddikeri *et al.*, 2013; Gharat e Rathod, 2013^b; Lin *et al.*, 2013; Pal e Kachhwaha, 2013; Yaakob *et al.*, 2013; Haigh *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Lisboa *et al.*, 2014; Haigh *et al.*, 2014; Waghmare *et al.*, 2015; Hindryawati e Maniam, 2015; Pukale *et al.*, 2015; Nie *et al.*, 2015; Ullah *et al.*, 2015).

Figura 23. Produção enzimática de ésteres etílicos derivados de óleo residual de fritura com e sem o uso de banho de ultrassom em modo contínuo.



Ao analisar a Figura 23 observa-se o mesmo comportamento dos estudos anteriores, onde o uso do ultrassom conduziu as melhores conversões

em ésteres etílicos durante todo o período reacional estudado quando comparado às reações realizadas sem a sua utilização (apenas com aquecimento e agitação mecânica). Este comportamento também é evidenciado por alguns trabalhos da literatura (Babajide *et al.*, 2010; Thanh *et al.*, 2010; Avellaneda e Salvadó, 2011; Somnuk *et al.*, 2012; Trentin *et al.*, 2014; Waghmare *et al.*, 2015; Pukale *et al.*, 2015; Hindryawati e Maniam, 2015).

Foram realizadas também assim como em reações anteriores a medida de atividade de esterificação após os períodos reacionais e as atividades obtidas foram: 47,18 U/g com 0% de potência ultrassônica e 40,67 U/g com a potência máxima do ultrassom.

É possível observar-se também que as maiores conversões (80 e 80,38%) foram obtidas nos primeiros tempos reacionais (13 e 19 minutos) quando empregado tecnologia ultrassônica, ocorrendo após esse período um leve e gradativo decaimento de conversão em ésteres em ambas às reações (com e sem o uso do ultrassom). Este comportamento deve-se a alguns possíveis problemas que ocorrem durante a transesterificação de óleos empregando enzimas em processo contínuo onde à medida que aumenta o tempo de contato do óleo com a enzima dentro do reator pode vir a ocorrer a redução da atividade catalítica, ocasionada pela incrustação do glicerol formado durante a reação na superfície do suporte enzimático, conduzindo a um impedimento do acesso do substrato ao sítio ativo da enzima e, conseqüentemente, reduzindo o rendimento final da reação.

Entretanto, conforme Badday *et al.* (2012), o processo contínuo de produção de biodiesel empregando ultrassom apresenta vantagens técnicas e econômicas como: aplicação em larga escala, facilidade de operação, baixo custo de produção, alta eficiência na qualidade do produto e controle do processo.

Também outro aspecto bastante relevante no uso de enzimas em processos reacionais em modo contínuo, trata-se da relação de contato entre o substrato e a enzima que é maior em um reator de leito empacotado do que em reatores convencionais em batelada podendo ser aplicado mais facilmente em

escala industrial, resultando em um desempenho e rendimentos mais elevados ao final da reação.

Diversos trabalhos são encontrados destacando o emprego do processo contínuo para produção de biodiesel empregando enzimas (Kawakami *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011; Hama *et al.*, 2013; Yun *et al.*, 2013; Colombo *et al.*, 2015), ultrassom (Avellaneda e Salvadó, 2011; Somnuk *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2015) e outros catalisadores (Ren *et al.*, 2012; Noshadi *et al.*, 2012; Tanawannapong *et al.*, 2013; Melero *et al.*, 2014; Choedkiatsakul *et al.*, 2015; He *et al.*, 2015) com resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Chattopadhyay e Sen (2013) estudaram o emprego da lipase Novozym 435 com metanol em reações em reatores contínuo em série para produção de biodiesel. Os resultados demonstraram uma produtividade 5 vezes maior quando comparado ao processo batelada em sistema livre de solvente com rendimento de 72% (137,2 g/L/h) empregando taxa de fluxo de 0,74 mL/min, 1,5 g de enzima e temperatura reacional de 37 °C.

Hajar *et al.* (2009) estudaram a metanólise do óleo de canola utilizando a lipase comercial Novozym 435 em reator de leito fixo. Os autores avaliaram o efeito das condições de transesterificação enzimática utilizando metodologia de superfície de resposta. Rendimentos em ésteres metílicos de 99,5% foram obtidos com taxa de fluxo de 6,3 mL/min, temperatura de 38 °C e razão molar álcool/óleo 4,3:1.

Lemke Gonzalez (2012) estudou a produção contínua de biodiesel empregando óleo de fritura em metanol e etanol supercrítico. Os parâmetros estudados nas reações foram: temperatura de 300 a 375 °C, pressão de 10 a 20 MPa, razão molar óleo/álcool de 1:20 a 1:40 e teor de água de 0 a 10%. Os melhores resultados de conversão em ésteres foram obtidos nas reações de metanólise em comparação com a etanólise com rendimentos variáveis de 81,8% e 82,2% para o óleo de fritura.

Thanh *et al.* (2010), empregando óleo de fritura e KOH para produção de biodiesel com auxílio de sonda de ultrassom de baixa frequência (20 kHz) em modo contínuo, estudaram o uso de diferentes razões molares de

óleo/metanol e porcentagens de catalisador em temperatura ambiente com taxa de fluxo de 8 mL/min. Segundo os autores a conversão máxima em ésteres metílicos encontrada foi de 99% após 50 minutos de reação.

5.9.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No decorrer deste capítulo foram apresentados os resultados obtidos relacionados à produção enzimática de ésteres etílicos em sistema livre de solvente orgânico em banho de ultrassom utilizando como substrato o óleo do fruto de macaúba (*Acrocomia aculeata*) e óleo residual de fritura em processos modo batelada e contínuo.

De uma forma geral, após a consecução deste trabalho, pôde-se verificar que as estratégias utilizadas visando à produção enzimática de ésteres etílicos a partir dos óleos em estudo apresentaram potencialidade para serem aplicadas em diferentes sistemas reacionais, para obtenção de compostos de alto valor agregado.

Por tratar-se de uma tecnologia nova e diferenciada, o estudo reacional em diferentes tempos foi de fundamental importância para o melhor entendimento do processo de transesterificação para produção enzimática de ésteres etílicos em banho de ultrassom mostrando sua relevância e efeito positivo no processo de obtenção de ésteres etílicos.

Além disso, o uso tanto do óleo de macaúba como óleo de fritura mostram-se como matérias-primas promissoras de grande potencial econômico e ambiental para se tornarem fontes alternativas que venham a complementar ou até substituir a cadeia de biodiesel de outras culturas que ocupam atualmente posição de destaque no Brasil na produção de biodiesel, como a soja e o dendê.

Verifica-se também que o uso de enzimas como catalisadores em processos para obtenção de ésteres apresenta um perfeito cenário de perspectivas futuras positivas, porém a sua aplicação industrial ainda é pouco utilizada, pois, apesar das diversas vantagens mencionadas em comparação com outros catalisadores, as enzimas apresentam características que, embora

atraentes e com resultados promissores para a operação em escala de bancada, limitam a sua utilização em escala industrial, devido ainda ao seu elevado custo.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. CONCLUSÕES

Os resultados da produção de ésteres etílicos em sistema de ultrassom livre de solvente orgânico utilizando *Novozym 435* como biocatalisador e o óleo do fruto de macaúba como substratos em modo batelada mostraram uma perspectiva promissora para o uso da técnica, atingindo rendimentos de 79% em ésteres obtidos em condições brandas de operação, irradiação de energia (~ 132 W), temperatura (65 °C), em um tempo de reação relativamente curto (30 minutos). Com as mesmas condições experimentais e mesmo tempo reacional sem o uso do ultrassom percebeu-se que o rendimento em ésteres foi significativamente menor (60%).

O uso de peneira molecular com a finalidade de remover a água contida nos óleos e possivelmente produzida durante processo junto às reações de transesterificação mostrou-se eficiente conduzindo a rendimentos em ésteres etílicos mais elevados quando comparados a sua não utilização.

A reutilização da enzima mostrou-se interessante para o campo da catálise enzimática, evidenciando o comportamento complexo das lipases e apresentando considerável estabilidade deste biocatalisador para produção de biodiesel. Entretanto, percebe-se que longos e consecutivos períodos de exposição junto ao ultrassom conduziram a significativa perda de atividade enzimática.

Nas reações empregando óleo do fruto de macaúba em modo contínuo observa-se que potência ultrassônica exerce boa influência sobre conversão em ésteres etílicos quando comparado às reações sem o uso do ultrassom assim como constatado nas reações em modo batelada com rendimento de 90% em ésteres no tempo reacional de apenas 6,5 minutos e mantendo-se a conversão praticamente estável durante todo o decorrer do período avaliado.

A conversão obtida em modo contínuo para o óleo de macaúba mostrou-se bastante satisfatória estando bem próxima aos valores máximos de

convertibilidade em ésteres para este óleo destacado na literatura (80,1% a 91,6%), assumido que uma quantidade significativa de compostos não conversíveis em ésteres estão presentes em óleos de macaúba brutos.

No estudo da produção de ésteres etílicos derivados de óleo de fritura empregando tecnologia de ultrassom e a lipase Novozym 435 em modo batelada observa-se que assim como demonstrado para o óleo de macaúba o ultrassom mostrou-se eficiente conduzindo a elevados rendimentos em ésteres etílicos em um curto tempo reacional quando comparado às reações sem o emprego de potência ultrassônica, apenas com o uso da temperatura obtendo-se rendimento de 88% em ésteres em tempo reacional de 90 minutos. Neste mesmo período de reação a conversão em ésteres sem o uso da potência ultrassônica chegou a 77%.

Em modo contínuo utilizando-se óleo de fritura e empregando as mesmas condições experimentais observa-se que também o ultrassom conduziu as melhores conversões em ésteres etílicos durante todo o período reacional estudado quando comparado às reações realizadas sem a sua utilização (apenas com aquecimento e agitação mecânica) obtendo-se as conversões máximas em ésteres de 80% e 80,4% nos primeiros tempos reacionais (13 e 19 minutos). Sem o uso do ultrassom as máximas conversões foram de 74,9 e 74,5% nos mesmos tempos reacionais.

Observa-se um gradativo decaimento na conversão de ésteres após os tempos iniciais no decorrer de todo período estudado em ambas as reações (com e sem o uso do ultrassom), assim, conclui-se que este comportamento deva-se pela incrustação do glicerol formado durante a reação de esterificação na superfície do suporte enzimático, conduzindo a um impedimento do acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, diminuindo a atividade catalítica e, conseqüentemente, reduzindo o rendimento final da reação.

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 produção de ésteres etílicos, incluindo enzimas não comerciais.
- Estudar a produção de ésteres etílicos a partir de outras fontes de óleos vegetais.
- Realizar uma investigação mais aprofundada sobre a produção de ésteres etílicos em modos batelada e contínuo utilizando o óleo de fritura (variar razão molar óleo/álcool, quantidade de enzima, temperatura, vazão de alimentação, potência ultrassônica, uso de solventes orgânicos).
- Estudo da reação de transesterificação dos óleos de macaúba e fritura com outros alcoóis (metanol, propanol, butanol).
- Propor metodologia para viabilizar o reuso da enzima por vários ciclos.
- Empregar processo de hidroesterificação no modo contínuo para óleo de macaúba e óleo de fritura com a finalidade de minimizar o efeito do glicerol formado dentro do reator impedindo o acesso do substrato ao sítio catalítico e diminuindo a atividade catalítica da enzima.
- Construção de um reator contínuo, em série, para tentar remover o glicerol formado e acumulado durante o processo e melhorar o rendimento em ésteres.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARTHY, M.; SARAVANAN, P.; GOWTHAMAN, M. K.; ROSE, C.; KAMINI, N. R. **Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview.** Chemical Engineering Research and Desing. v. 92, p. 1591-1601, 2014.

ABBASZAADEH, A.; GHOBADIAN, B.; OMIDKHAH, M. R.; NAJAFI, G. **Current biodiesel production technologies: A comparative review.** Energy Conversion and Management. v. 63, p. 138-148, 2012.

ABREU, F. R.; LIMA, D. G.; HAMÚ, E. H.; WOLF, C.; SUAREZ P. A. Z. **Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols.** Journal Molecular Catalysis A Chemist. v. 209, p. 29-33, 2004.

ADEWUYI, Y. G. **Sonochemistry: environmental science and engineering applications.** Ind Eng Chem Res. v. 40, p. 4681–4715, 2001.

AGARWAL, A. K. **Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines.** Progress in Energy and Combustion Science. v. 33, p. 233-271, 2007.

AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; CASTRO, A. M.; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. M. G. **Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts.** Fuel. v. 135, p. 315–321, 2014.

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.

AMARAL, F. P. **Estudo das características físico-químicas dos óleos da amêndoa e polpa da macaúba [Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart].** Dissertação de mestrado em Agronomia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu-SP, 2007.

AN, H.; YANG, W. M.; MAGHBOULI, A.; LI, J.; CHOU, S. K.; CHUA, K. J. **Performance, combustion and emission characteristics of biodiesel derived from waste cooking oils.** Applied Energy. v. 112, p. 493-499, 2013.

ANDRADE, M. H. C.; VIEIRA, A. S.; AGUIAR, H. F.; CHAVES, J. F. N.; NEVES, R. M. P. S.; SALUM, A. **Óleo do fruto da palmeira macaúba: Uma aplicação potencial para indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos.** II ENBTEQ (Encontro Brasileiro sobre Tecnológica Indústria Química), 7º Seminário de Produtores de Olefinas e Aromáticos. São Paulo – SP, Outubro 2006.

ANP: **Agência Nacional de Petróleo.** (www.anp.gov.br). Acessado em agosto de 2012.

ANP: **Agência Nacional de Petróleo.** (www.anp.gov.br). Acessado em setembro de 2014.

ANP: **Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis** (www.anp.gov.br/?pg=9201&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1262617588151. Acessado em julho de 2013.

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.

ARAÚJO, C. D. M.; ANDRADE, C. C.; SOUZA E SILVA, E.; DUPAS, F. A. **Biodiesel production from used cooking oil: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. v. 27, p.445-452, 2013.

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

AZCAN, N.; DANISMAN, A. **Alkali-catalyzed transesterification of cottonseed oil by microwave irradiation.** Fuel. v. 86, p. 2639–2644, 2007.

AZÓCAR, L.; CIUDAD, G.; HEIPIEPER, H. J.; MUÑOZ, R.; NAVIA, R. **Lipase-catalyzed process in an anhydrous medium with enzyme reutilization to produce biodiesel with low acid value.** Journal of Bioscience and Bioengineering. v. 112, p. 583–589, 2011.

BABAJIDE, O.; PETRIK, L.; AMIGUN, B.; AMEER, F. **Low-cost feedstock conversion to biodiesel via ultrasound technology.** Energies. v. 3, p. 1691-1703, 2010.

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

BADDAY, A. S.; ABDULLAH, A. Z.; LEE, K. T.; KHAYOON, M. SH. **Intensification of biodiesel production via ultrasonic-assisted process: A critical review on fundamentals and recent development.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. v. 16, p. 4574-4587, 2012.

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

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

BALA, B. K. **Studies on biodiesels from transformation of vegetable oils for diesel engines.** *Edu Sci Technol*. v. 15, p. 1-45, 2005.

BALAT, M. **Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical ethanol.** *Energy Edu Sci Technol*. v. 16, p. 45-52, 2005.

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

BANERJEE, A.; CHAKRABORTY, R. **Parametric sensitivity in transesterification of waste cooking oil for biodiesel production: a review.** *Resour. Conserv. Recy.* v. 53, p. 490-497, 2009.

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

BARNWAL, B. K.; SHARMA, M. P. **Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 9, p. 363-378, 2005.

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.; 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.

BENEDICT, D. J., PARULEKAR, S. J., TSAI, S. P. **Esterification of Lactic Acid and Ethanol With/Without Pervaporation**. Ind. Eng. Chem. Res. v. 42, p. 2282-2291, 2003.

BIODIESEL BR.

(<http://www.biodieselbr.com/noticias/materia-prima/macauba.htm>).

Acessado em 28 de Setembro de 2012.

BIODIESEL BR.

(www.biodieselbr.com/biodiesel.htm) Acessado em 21 de agosto de 2012.

BIODIESEL BR.

(www.biodieselbr.com/noticias/regulacao/politica/senado-aprova-biodiesel) Acessado em julho de 2014.

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

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

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.

BRUN, N.; BABEAU-GARCIA, A.; ACHARD, M. F.; SANCHEZ, C.; DURAND, F. LAURENT, G. **Enzyme-based biohybrid foams designed for continuous flow heterogeneous catalysis and biodiesel production**. Energy & Environmental Science. v. 4, p. 2840-2844, 2011.

CANAKCI, M., GERPEN, V J. **Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids**. Am Soc Agric Eng. v. 4, p. 1429–1436, 2001.

CANAKCI, M.; GERPEN, V. J. **Biodiesel production via acid catalysis**. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers. v. 42, p. 1203-1210, 1999.

CANAKCI, M.; **The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks**. Bioresource Technology., v. 98, p. 183-190, 2007.

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

COLLETE, C.; MONNIER, L. **Acides gras : classification, fonction et équilibre entre les différentes familles: Fatty acids: Classification, function and balance between the different families**. Médecine des Maladies Métaboliques, v. 5, p. 237-245, 2011.

COLOMBO, T. S.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Enzymatic synthesis of soybean biodiesel using supercritical carbondioxide as solvent in a continuous expanded-bed reactor**. The Journal of Supercritical Fluids. v.97, p.16-21, 2015.

COLUCCI, J. A.; BORRERO, E. E.; ALAPE, F. **Biodiesel from an alkaline transesterification reaction of soybean oil using ultrasonic mixing.** Journal of the American Oil Chemists Society. v. 82, p. 525-530, 2005.

CORDEIRO, C. S., SILVA, F. R., WYPYCH L. P. R. **Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel)** Química. Nova. v. 34, p. 477-486, 2011.

CORDEIRO, C. S.; ARÍZAGA, G. G. C.; RAMOS, L. P.; WYPYCH, F. **A new zinc hydroxide nitrate heterogeneous catalyst for the esterification of free fatty acids and the transesterification of vegetable oils.** Catalysis Communications, v. 9, p. 2140-2143, 2008.

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

CHATTOPADHYAY, S.; SEN, R. **Development of a novel integrated continuous reactor system for biocatalytic production of biodiesel.** Bioresource Technology. v.147, p.395-400, 2013.

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.

CHESTERFIELD, D. M.; ROGERS, P. L.; AL-ZAINI, E. O.; ADESINA, A. A. **Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilized lipase.** Chemical Engineering Journal. v. 207-208, p. 701-710, 2012.

CHOEDKIATSAKUL, I.; NGAOSUWAN, K.; ASSABUMRUNGRAT, S.; MANTEGNA, S.; CRAVOTTO, G. **Biodiesel production in a novel continuous flow microwave reactor**. *Renewable Energy*. v. 83, p. 25-29, 2015.

CHRISTOPHER L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. **Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities**. *Applied Energy*. v. 119, p. 497-520, 2014.

DA SILVA, R. B.; LIMA NETO, A. F.; SOARES DOS SANTOS, L. S.; DE OLIVEIRA LIMA, J. R.; CHAVES, M. H.; DOS SANTOS Jr, J. R. **Catalysts of Cu(II) and Co(II) ions adsorbed in chitosan used in transesterification of soy bean and babassu oils – A new route for biodiesel syntheses**. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 6793-6798, 2008.

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

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

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

DE LOS RÍOS, A. P.; FERNANDEZ HERNANDEZ, F. J.; GÓMEZ, D.; RUBIO, M.; VÍLLORA, G. **Biocatalytic transesterification of sunflower and waste cooking oils in ionic liquid media**. *Process Biochemistry*. v. 46, p. 1475-1480, 2011.

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

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

DEMIRBAS, A. **Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods**. *Progress in Energy and Combustion Science*. v. 31, p. 466-487, 2005.

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

DEMIRBAS, A. **Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats**. *Energy Conversion and Management*. v. 49, p. 125-130, 2008.

DEMIRBAS, A. **Importance of biodiesel as transportation fuel**. *Energy Policy*. v. 35, nº 9 p. 4661-4670, 2007.

DEMIRBAS, A. **Fuel conversional aspects of palm oil and sunflower oil**. *Energy Source*. V. 25, p. 457-466, 2003b.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel from waste cooking oil via base-catalyca and supercritical methanol transesterification.** Energy Conversion an Management. v. 50, p. 923-927, 2009.

DEMIRBAS, M. F.; BALAT, M. **Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: A global perspective.** Energy Conversion and Management. v. 47, p. 2371-2381, 2006.

DI SERIO, M.; COZZOLINO, M.; TESSER, R.; PATRONO, P.; PINZARI, F.; BONELLI, B. **Vanadyl phosphate catalysts in biodiesel production.** Applied Catalysis A: General. v. 320, p. 1-7, 2007.

DIAS, J.M.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M.; ALMEIDA, M. F. **Comparison of the performance of different homogeneous alkali catalysts during transesterification of waste and virgin oils and evaluation of biodiesel quality.** Fuel. v. 87, p.3572–3578, 2008.

DIZGE, N.; AYDINER, C.; IMER, D. Y.; BAYRAMOGLU, M.; TANRISEVEN, A.; KESKINLER, B. **Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer.** Bioresource Technology. v.100, p.1983–1991, 2009.

DIZGE, N.; KESKINLER, B. **Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase.** Biomass Bioenergy. v. 32 p. 1274–1278, 2008.

DOSSAT, V.; COMBESA, D.; MARTY, A. **Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil.** Enzyme and Microbial Technology. v. 30, p. 90–94, 2002.

DOSSIN, T. F.; REYNIERS M. F.; BERGER, R. J.; MARIN, G. B. **Simulation of heterogeneously MgO-catalyzed transesterification for fine-chemical and biodiesel industrial production.** Applied Catalysis B: Environmental. v. 67, p. 136–148, 2006.

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.

ECÓLEO. 2014 (www.ecoleo.org.br/reciclagem.html.) Acessado em 25 de junho de 2014

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.

ENWEREMADU, C. C.; MBARAWA, M. M. **Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil: a review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. v. 1, p. 2205-2224, 2009.

FABER, K., Ed. **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook;** 4rd ed.; Springer Verlag: New York, 2000.

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.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; CABRERA, Z.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 565-569, 2007.

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, No. 1, pp. 19-23, 2005.

FIAMETTI, G. K.; SYCHOSKY, M. M.; CESARO, A.; FURIGO, A.; BRETANHA, L. C.; PEREIRA, C. M. P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono and diacylglycerol from olive oil.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, p. 981-987, 2011.

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.

FORTES, I.C.P.; BAUGH, P.J. **Study of analytical on-line pyrolysis of oils from Macauba fruit (*Acrocomia sclerocarpa* M) via GC/MS.** *Journal. Brazilian. Chem. Soc.* v.10, p. 469-477, 1999.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. **An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya* sp).** *Process Biochemistry*, v.44, p. 1068-1074, 2009.

FREITAS, L.; GARVES, L. F.; ANDRADE, G. S. S.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. **Etanolise do óleo de macaúba por catálise enzimática assistida por irradiação de micro-ondas**. XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ – 2012). Búzios – RJ, Setembro, 2012.

FUKUDA, H.; HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; NODA, H. **Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production**. Trends Biotechnology. v. 26, p. 668-673, 2008.

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.

GERPEN, J.V., **Biodiesel Processing and Production**, Fuel processing Technology, v.86, nº10, p. 1097-1107, 2005.

GHADGE, S. V.; RAHEMAN, H. **Process optimization for biodiesel production from mahua (Madhuca indica) oil using response surface methodology**. Bioresource Technology. v. 97, p. 379–384, 2006.

GHARAT, N.; RATHOD, V. K. **Ultrasound assisted enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate**. Ultrasonics Sonochemistry. v. 20, p. 900-905, 2013^a.

GHARAT, N.; RATHOD, V. K. **Enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 88, p. 36-40, 2013^b.

GIANNELOS, P. N.; ZANNIKOS, F.; STOURNAS, S.; LOIS, E.; ANASTOPOULOS, G. 2002. **Tobacco seed oil as an alternative diesel fuel: physical and chemical properties**. Ind Crop Prod v.16, p. 1–9, 2002.

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

GOGATE, P. R. **Cavitation reactors for process intensification of chemical processing applications: a critical review.** Chemical Engineering and Processing. v. 47, p. 515–527, 2008.

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. **A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology.** Biochemical Engineering Journal. v. 44, p. 60-72, 2009.

GOLE, V. L.; GOGATE, P. R. **Intensification of synthesis of biodiesel from nonedible oils using sonochemical reactors** Industrial and Engineering Chemistry Research. v. 51, p. 11866-11874, 2012.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V.; SILVA, G. S.; CASTRO, H. F. **Determinação da propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de Candida rugosa imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildimidazol.** Química Nova, v. 29, p. 710-718, 2006

GOODRUM, J. W.; GELLER, D. P.; ADAMS, T. T. **Rheological characterization of animal fats and their mixtures with fuel oil.** Biomass Bioenergy. v. 24, p. 249-256, 2003.

GORRET, N.; ROSLI, S. K.; OPPENHEIM, S. F.; WILLIS, L.; LESSARD, P.; RHA, C. SINSKEY, A. **Bioreactor culture of oil palm (Elaeis guineensis) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production.** Journal of Biotechnology. v. 108, p. 253-263, 2004.

GUABIROBA, R. C.; D' AGOSTO, M. A. **Modelo de cadeias de coleta de óleo residual de fritura para produção de biodiesel baseado em cenários nacional e internacional.** XXII ANPET. Fortaleza, CE, Brasil 2009.

GUARIEIRO, L.L.N. **Metodologia analítica para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel: diesel utilizando espectrometria na região do infravermelho.** Dissertação (mestrado). Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.

GUDE, V. G.; GRANT, G. E. **Biodiesel from waste cooking oils via direct sonication.** Applied Energy. v. 109, p. 135-144, 2013.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. **Bacterial lipases: an overview of production purification and biochemical properties.** Applied Microbiol Biotechnology. v. 64, p. 763-781, 2004.

HAIGH, K. F.; SAHA, B.; VLADISAVLJEVIC, G. T.; REYNOLDS J. C. **Kinetics of the pre-treatment of used cooking oil using Novozyme 435 for biodiesel production.** Procedia Engineering. v. 42, p. 1106-1113, 2012.

HAIGH, K. F.; ABIDIN, S. Z.; VLADISAVLJEVIC, G. T.; SAHA, B. **Comparison of Novozyme 435 and Purolite D5081 as heterogeneous catalysts for the pretreatment of used cooking oil for biodiesel production.** Fuel. v. 111, p. 186-193, 2013.

HAIGH, K. F.; VLADISAVLJEVIC, G. T.; REYNOLDS J. C.; NAGY, Z.; SAHA, B. **Kinetics of the pre-treatment of used cooking oil using Novozyme 435 for biodiesel production.** Chemical Engineering Research and Design. v. 92, p. 713-719, 2014.

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.

HAMA, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; NODA, H.; KONDO, A. **Enzymatic production of biodiesel from waste cooking oil in a packed-bed reactor: An engineering approach to separation of hydrophilic impurities.** *Bioresource Technology*. v. 135. p. 417-421, 2013.

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.

HASS, M. J.; MC. ALOON, A. J.; YEE, W. J.; FOGLIA, T. A. **A process model to estimate biodiesel production costs.** *Bioresource Technology*. v. 97, p. 671-678, 2006.

HAAS, M.J.; FOGLIA, T. A. **Matérias primas alternativas e tecnologias para a produção de biodiesel.**In: KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J. *Manual de Biodiesel*. Editora Edgard Blucher. 340p, São Paulo. 2005.

HE, B.; SHAO, Y.; REN, Y.; LI, J.; CHENG, Y. **Continuous biodiesel production from acidic oil using a combination of cation- and anion-exchange resins.** *Fuel Processing Technology*. v. 130, p. 1-6, 2015.

HE, H.; WANG, T.; ZHU, S. **Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process.** Fuel. v. 86, p. 442–447, 2007.

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

HIANNE, P. A.; RAMOS FILHO, M. M.; RAMOS M. I. L.; MACEDO, M. L. R. **Bocaiúva, Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd., Pulp and Kernel Oils: Characterization and Fatty Acid Composition.** Brazilian Journal of Food Technology. v. 8, p. 256-259, 2005.

HIELSCHER, T. **Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions.** arXiv:0708.1831v1, Dans European Nano Systems Workshop; Paris : France, 2005.

HINDRYAWATI, N.; MANIAM, G. P. **Novel utilization of waste marine sponge (Demospongiae) as a catalyst in ultrasound-assisted transesterification of waste cooking oil.** Ultrasonics Sonochemistry. v. 22, p. 454-462, 2015.

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

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.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. **Biodiesel production by microalgal biotechnology**. Applied Energy. v. 87, p. 38-46, 2010.

HUANG, X. J.; CHEN, P. C.; HUANG, F.; OU, Y.; CHEN, M. R.; XU, Z. K. **Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane**. Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 70, p. 95-100, 2011.

IHA, O. K.; ALVES, F. C. S.; SUAREZ, P. A. Z.; OLIVEIRA, M. B. F.; MENEGHETTI, S. M. P.; SANTOS, B. P. T.; SOLETTI, J. I. **Physicochemical properties of *Syagrus coronata* and *Acrocomia aculeata* oils for biofuel production**. Industrial Crops and Products. v. 62, p. 318–322, 2014.

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

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

JAIN, S.; SHARMA, M. P. **Prospects of biodiesel from *Jatropha* in India: a review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. v. 14, p. 763-771, 2010.

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

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

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

KANSEDO, J.; LEE, K. T.; BHATIA, S. ***Cerbera odollam* (sea mango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production.** Fuel. v. 88, p. 1148-1150, 2009.

KAWASHIMA, A.; MATSUBARA, K.; HONDA, K. **Development of heterogeneous base catalysts for biodiesel production.** Bioresource Technology, n 99, p. 3439-3443, 2009.

KAWAKAMI, K.; ODA, Y.; TAKAHASHI, R. **Application of a *Burkholderia cepacia* lipase immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude *Jatropha* oil.** Biotechnology for Biofuels, v.4, p.42-52, 2011.

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. **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.

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

KRUGER, R. L.; SYCHOSKI, M.; NINOW, J. L.; CORRAZA, M. L. **Estudo da Glicerólise Enzimática na Produção de Mono e Diacilgliceróis Utilizando Óleo de Oliva.** Revista Ciências Exatas e Naturais. v. 13, p. 331-351, 2011.

KUCEK, K. T., CESAR-OLIVEIRA, M. A. F., WILHELM, H. M., RAMOS, L. P. **Ethanolysis of refined soybean oil assisted by sodium and potassium hydroxides.** Journal of the American Oil Chemist's Society. v. 84, p. 385-392, 2007.

KULKARNI, M. G.; GOPINATH, R.; MEHER, L. C.; DALAI, A. K. **Solid acid catalyzed biodiesel production by simultaneous esterification and transesterification.** Green Chemistry. v.8, p.1056–1062, 2006.

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

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

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

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. **Enzymatic transesterification of *Jatropha* oil.** Biotechnology Biofuels. v. 2, p. 1-6, 2009.

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.

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

LEE K., FOGLIA T. A., CHANG K. **Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease.** Journal of the American Oil Chemists Society. v. 79, p. 191-195, 2002.

LEE, C. H.; LIN, T. S.; MOU, C. Y. **Mesoporous materials for encapsulating enzymes.** Nano Today. v. 4, p. 165-179, 2009.

LEMAIRE, A.; WANG, Q. Y.; WEI, Y.; LIU, Z.; SU, B. L. **Hierarchically structured meso-macroporous aluminosilicates with high tetrahedral aluminium content in acid catalysed esterification of fatty acids.** Journal of Colloid and Interface Science, v. 363, p. 511-520, 2011.

LEMKE GONZALEZ, 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.

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

LERIN, L. A.; LOSS, R. A.; REMONATTO, D.; ZENEVICZ, M. C.; BALEN, M.; NETTO, V. O.; NINOW, J. L.; TRENTIN, C. M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. **A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*. v. 37, p. 2381-2394, 2014.

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.

LIMA, M. M. **Análise Transdisciplinar, Evolutiva e Sustentável de uma Filíere de Biocombustível: A macaúba de Montes Claros/MG.** Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS; Porto Alegre 2011.

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

LIN, C.C.; HSIAO, M.C.; LIAO, P.H. **Ultrasonic-Assisted Production of Biodiesel from Waste Frying Oil Using a Two-Step Catalyzing Process.** *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*. v. 2, p. 117-121, 2012.

LIN, Y.C.; YANG, P.M.; CHEN, S.C.; LIN, J.F. **Improving biodiesel yields from waste cooking oil using ionic liquids as catalysts with a microwave heating system.** *Fuel Processing Technology*. v. 115, p. 57-62, 2013.

LISBOA, P.; RODRIGUES, A. R.; MARTÍN, J. L.; SIMÕES, P.; BARREIROS, S.; PAIVA, A. **Economic analysis of a plant for biodiesel production from waste cooking oil via enzymatic transesterification using supercritical carbon dioxide.** *The Journal of Supercritical Fluids*. v. 85, p. 31–40, 2014.

LISINGEN, L. V.; CERVI, A. C. **Acrocomia aculeata(Jacq.) Lodd ex Mart., nova ocorrência para a flora do Estado do Paraná.** Acta Biológica Paranaense. v. 38, p. 187-192, 2009.

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.

LIU, S.; NIE, K.; ZHANG, X.; WANG, M.; DENG, L.; YE, X.; WANG, F.; TAN, T. **Kinetic study on lipase-catalyzed biodiesel production from waste cooking oil.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 99, p. 43-50, 2014.

LOPES, D. C.; STEIDLE NETO, A. J.; MENDES, A. A.; PEREIRA, D. T. V. **Economic feasibility of biodiesel production from Macauba in Brazil.** Energy Economics. v. 40, p. 819–824, 2013.

LOPES, D. C.; STEIDLE NETO, A. J. **Potential crops for biodiesel production in Brazil: a review.** World Journal of Agricultural Sciences. v. 7, p. 206–217, 2011.

LORENZI, G. M. A. C. **Acrocomia aculeata (Lodd.) ex Mart. – Arecaceae: Bases para o Extrativismo Sustentável.** Tese. (Doutorado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Paraná (UFPR) Curitiba. 2006.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; MEDEIROS-COSTA, J. T.; CERQUEIRA, L. S. C.; BEHR, N. **Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas.** Nova Odessa: Editora Plantarum, p. 1-20, 1996.

LU, J.; DENG, L.; ZHAO, R.; ZHANG, R.; WANG, F.; TAN, T. **Pretreatment of immobilized Candida sp. 99–125 lipase to improve its methanol tolerance for biodiesel production.** Journal Molecular Catalysis B Enzyme. v. 62, p. 15-18, 2010.

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

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

LUCENA, I. L.; SILVA, G. F.; FERNANDES, F. A. N. **Biodiesel production by esterification of oleic acid with methanol using a water adsorption apparatus.** *Industrial and Engineering Chemistry Research*. v. 47, p. 6885–6889, 2008.

LUKIC, I.; KRSTIC, J.; JOVANOVIC, D.; SKALA, D. **Alumina/silica supported K_2CO_3 as a catalyst for biodiesel synthesis from sunflower oil.** *Bioresource Technology*. v. 100, p. 4690-4696, 2009.

LV, P.; WANG, X.; YUAN, Z.; TAN, T. **Conversion of soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida* lipase on textile cloth.** *Energy Sources Part A*. v. 30, p. 872-879, 2008.

MA, F., HANNA M. A., **Biodiesel production: a review.** *Bioresource 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.

MACEIRAS, R.; VEGA, M.; COSTA, C.; RAMOS, P.; MÁRQUEZ, M. C. **Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil.** *Fuel*. v. 88, p. 2130-2134, 2009.

MACHADO, W.; GUIMARÃES, M.F.; LIRA, F.F.; SANTOS, J.V.F.; TAKAHASHIA, L.S.A.; LEAL, A.C.; COELHO, G.T.C.P. **Evaluation of two fruit ecotypes (totali and sclerocarpa) of macaúba (*Acrocomia aculeata*).** Industrial Crops and Products. v. 63, p. 287–293, 2015.

MADDIKERI, G. L.; PANDIT, A. B.; GOGATE, P. R. **Ultrasound assisted interesterification of waste cooking oil and methyl acetate for biodiesel and triacetin production.** Fuel Processing Technology. v. 116, p. 241-249, 2013.

MADDIKERI, G. L.; PANDIT, A. B.; GOGATE, P. R. **Intensification approaches for biodiesel synthesis from waste cooking oil: a review.** Industrial & Engineering Chemistry Research. v. 51, p. 14610–14628, 2012.

MADDIKERI, G. L.; GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. **Intensified synthesis of biodiesel using hydrodynamic cavitation reactors based on the interesterification of waste cooking oil.** Fuel. v. 137, p. 285-292, 2014.

MAFIO, C. E.; YOSHIMITSU MOTOIKEL, S.; DO SANTOS, C. E. M. **Repetibilidade em características biométricas do fruto de macaúba.** Ciência Rural. v.41, p.70-76, 2011.

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.

MARCHETTI, J. M.; ERRAZU, A. F. **Biodiesel production from acid oils and ethanol using a solid basic resin as catalyst.** Biomass and Bioenergy. V. 34, p. 272-277, 2010.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. **Possible methods for biodiesel production.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. v. 11, p. 1300-1311, 2007.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. **Techno-economic study of different alternatives for biodiesel production.** Fuel Processing Technology. v. 89, p. 740–748, 2008.

MARTINS, A. B.; SCHEIN, M. F.; FRIEDRICH, J. L. R.; LAFUENTE, R. F.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. **Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym 435: enhanced activity and operational stability.** Ultrasonic Sonochemistry. v. 20, p. 1155-1160, 2013.

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

MARTINEZ, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JAFELLICI-JUNIOR, M. **O efeito do ultra-som em reações químicas.** Química Nova, v. 23, p. 251-256, ISSN 0100-4042, 2000.

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

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

MATA, T. M.; SOUSAB, I. R.; CAETANOAB, N. S. **Transgenic corn oil for biodiesel production via enzymatic catalysis with ethanol.** Chemical engineering transactions. v. 27, p. 20-24, 2012.

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.

MELERO, J. A.; BAUTISTA, L. F.; IGLESIAS, J.; MORALES, G.; VAZQUEZ, R. S. **Production of biodiesel from waste cooking oil in a continuous packed bed reactor with na agglomerated Zr-SBA-15/bentonite catalyst**. Applied Catalysis B: Environmental. v. 145, p. 197-204, 2014.

MELO, P. G. **Produção e caracterização de biodiseis obtidos a partir da oleaginosa macaúba (*Acrocomia Aculeata*)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia – MG, 2012.

MEUNIER, S. M.; LEGGE, R. L. **Evaluation of diatomaceous earth as a support for sol–gel immobilized lipase for transesterification**. Journal Molecular Catalysis B Enzyme. v. 62, p. 54-58, 2010.

MICHELIN, S. **Produção de biodiesel enzimático livre de solvente do óleo do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart) em sistema de ultrassom**. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim (URI), Erechim – RS, 2013.

MIRANDA, I. P. A.; RABELO, A.; BUENO, C. R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M. N. S. **Frutos de Palmeiras da Amazônia**. Manaus – MCT INPA, p. 7-10, 2001.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Acrocomia aculeata** Disponível em: <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>> Acesso em: outubro. 2005.

MME – MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Biodiesel. O novo combustível do Brasil**. Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel. p. 1-12, 2004. www.mme.gov.br, acessado em agosto de 2012.

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

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

MORETTO, E.; FETT, R.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M. **Introdução à ciência de alimentos.** Florianópolis: UFSC, 2002.

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

MOURA, E.F., MOTOIKE, S.Y., VENTRELLA, M.C., SÁ JUNIOR, A.Q., CARVALHO, M. **Somatic embryogenesis in macaw palm (Acrocomia aculeata) from zygotic embryos.** Scientia Horticulturae. v. 119, p. 447–454, 2009.

NARASINHARAO, K., LEE, A., WILSON, K. **Catalysts in Production of Biodiesel: A Review** Journal of Biobased Materials and Bioenergy, v. 1, p. 19-30, 2007.

NAVARRO-DÍAZ, J.; LEMKE GONZALEZ, S.; IRIGARAY, B.; VIEITEZ, I.; JACHMANIÁN, I.; HENSE, H.; OLIVEIRA, J. V. **Macauba oil as an alternative feedstock for biodiesel: Characterization and ester conversion by the supercritical method.** The Journal of Supercritical Fluids. v. 93, p. 130–137, 2014.

NELSON, L.; FOGLIA, T.; MARMER, W. **Lipase-catalyzed production of biodiesel**. Journal of American oil Chemical Society. V. 73, p. 1191–1195, 1998.

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

NIE, K.; WANG, M.; ZHANG, X.; HU, W.; LIU, L.; WANG, F.; DENG, L.; TAN, T. **Additives improve the enzymatic synthesis of biodiesel from waste oil in a solvent free system**. Fuel. v. 146, p. 13-19, 2015.

NIELSEN, P.M., BRASK, J., FJERBAEK, L. **Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations**. Eur. J. Lipid Sci. Technol. v. 110, p. 692-700, 2008.

NOGUEIRA, B. M.; CARRETONI, C.; CRUZA, R.; FREITAS, S.; MELO, P. A.; 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.

NOIROJ, K.; INTARAPONG, P.; LUENGNARUEMITCHAI, A.; JAI-IN, S. **A comparative study of KOH/Al₂O₃ and KOH/NaY catalysts for biodiesel production via transesterification from palm oil**. Renew Energy. v. 34, p. 1145-1150, 2009.

NOSHADI, I.; AMIN, N. A. S.; PARNAS, R. S. **Continuous production of biodiesel from waste cooking oil in a reactive distillation column catalyzed by solid heteropolyacid: Optimization using response surface methodology (RSM)**. Fuel. v. 94, p. 156-164, 2012.

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

NUCCI, S. M, AZEVEDO-FILHO, J. A, COLOMBO, C. A, PRIOLLI, R. H, COELHO, R. M, MATA, T. L, ZUCCHI, M. I. **Development and characterization of microsatellites markers from the macaw.** Molecular Ecology Resources. v. 8, p. 224-226, 2008.

O'BRIEN, R.D. **Fat an Oils. In: Fats and Oils Formulating and Processing for Applications.** Boca Raton, p. 175-232, 2004.

ODA, M.; KAIEDA, M.; HAMA, S.; YAMAGI, H.; KONDO, A.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H. **Facilitatory effect of immobilized lipase-producing Rhizopus oryzae cells on acyl migration in biodiesel-fuel production.** Biochemical Engineering Journal. v. 23, p. 45-51, 2005.

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

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

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, p. 373-382, 2006.

OLIVEIRA, F. A. M.; **A produção de óleos vegetais de macaúba e seus coprodutos na região metropolitana de Belo Horizonte.** 3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel. Varginha – MG; 2006.

OLIVEIRA, F. C. C.; SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, W. L. P. **Biodiesel: possibilidades e desafios**. Química Nova na Escola, v. 8, p. 3-8, 2008.

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

ÖZENER, O.; YÜKSEK, L.; ERGEÇ, A. T.; Özkan, M. **Effects of soybean biodiesel on a DI diesel engine performance, emission and combustion characteristics**. Fuel, v.115, p. 875–883, 2014.

PACIFIC BIODIESEL. **Biodiesel benefits**. www.biodiesel.com/index.php/biodiesel/biodiesel_benefits_why_use_biodiesel#emissions) Acesso em agosto 2012.

PAL, A.; KACHHWAHA, S. S. **Biodiesel production of waste cooking oil through ultrasound cavitation**. International Journal of Engineering Research and Technology. v. 6, p. 291-306, 2013.

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.

PATIL, P. D., DENG, S. **Optimization of biodiesel production from edible and nonedible vegetable oils**. Fuel. v. 88, p. 1302–1306, 2009.

PATIL, P. D.; GUDE, V. G.; REDDY, H. K.; MUPPANENI, T.; DENG, S. **Biodiesel Production from Waste Cooking Oil Using Sulfuric Acid and Microwave Irradiation**. Processes Journal of Environmental Protection. v. 3, p. 107-113, 2012.

PERALTA, Y. P. P.; ZHANG, F.; DEL CARDAYRE, S. B.; KEASLING, J. D. **Microbial engineering for the production of advanced biofuels.** Nature. v. 488, p. 320-328, 2012.

PEREIRA, M. J. **Energia, eficiência e alternativas.** Editora Ciência Moderna, Rio de Janeiro; 2009.

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 Brazilian Chemical Society, v. 16, p. 1313-1330, 2005.

POPIOLSKI, A. S. **Otimização do processo de produção enzimática de biodiesel em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.** Dissertação de Msc., Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil, 2011.

PUKALE, D. D.; MADDIKERI, G. L.; GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B.; PRATAP, A. P. **Ultrasound assisted transesterification of waste cooking oil using heterogeneous solid catalyst.** Ultrasonics Sonochemistry. v. 22, p. 278-286, 2015.

PRLAINOVIC, N. Z.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. D.; MIJIN, D. Z.; BEZBRADICA, D. I. **Immobilization of lipase from Candida rugosa on sepabeads the effect of lipase oxidation by periodates.** Bioprocess Biosystems Engineering. v. 34, p. 803-810, 2011.

PROKOP, T. **Personal Communication, Coachella CA: Imperial Western Products,** 2002

QIAN, W. W.; YANG, L.; LU, X.P. **Preparation of biodiesel catalyzed by KF/CaO with ultrasonic.** In: Zhuang X, editor. International conference on biomass energy technologies. Guangzhou, China; 2008.

QUINTELLA, C. M.; TEIXEIRA, L. S. G.; KORN, M. G. A.; COSTA NETO, P. R.; TORRES, E. A.; CASTRO, M. P.; JESUS, C. A. C. **Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D.** Química Nova. v.32, p.793-808, 2009.

RAMAN, J. K.; SARIAH, A.; DENIS, P.; CHAN, E. S.; POGAKU, R. **Production of biodiesel using immobilized lipase – a critical review.** Critical Reviews in Biotechnology. V. 28, p. 253-264, 2008.

RAMOS, L P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S; CORDEIRO, C. S **Tecnologias de Produção de Biodiesel.** Revista Virtual de Química, v. 3, p. 385-405, 2011.

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.

RAMOS, M. I.; RAMOS FILHO, M. M.; HIANE, P. A.; BRAGA NETO, J. A.; SIQUEIRA, E. M. A. **Qualidade nutricional da polpa de Bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. V. 28, p. 90-94, 2008.

RAMOS, M. I.; SIQUEIRA, E. M. A.; ISOMURA, C. C.; BARBOSA, A. M. J.; ARRUDA, S. F. **Bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd) improved vitamin A status in rats.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. V. 55, p. 3186-3190, 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.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. **An overview of enzymatic production of biodiesel.** Bioresource Technology. v. 99, p. 3975-3981, 2008.

RATTANAPHRA, D.; HARVEY, A. P.; THANAPIMMETHA, A.; SRINOPHAKUN, P. **Simultaneous transesterification and esterification for biodiesel production with and without a sulphated zirconia catalyst.** Fuel, v. 97, p. 467-475, 2012.

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

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

REN, Y.; HE, B.; YAN, F.; WANG, H.; CHENG, Y.; LIN, L.; FENG, Y.; LI, J. **Continuous biodiesel production in a fixed bed reactor packed with anion-exchange resin as heterogeneous catalyst.** Bioresource Technology. v. 113, p. 19-22, 2012.

REZENDE, J. R. **Desacidificação de óleo de macaúba por extração líquido-líquido, para produção de biodiesel.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga - BA, 2009.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. **Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production.** Enzyme Research. v. 2011, Article ID 615803, p.1-16 <http://dx.doi.org/10.4061/2011/615803>. 2011.

RÍOS, A. P.; HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, F. J.; GÓMEZ, D.; RUBIO, M.; VÍLLORA, G. **Biocatalytic transesterification of sunflower and waste cooking oils in ionic liquid media.** Process Biochemistry. v. 46, p. 1475-1480, 2011.

RODRIGUES, A. R.; PAIVA, A.; DA SILVA, M. G.; SIMÕES, P.; BARREIROS, S. **Continuous enzymatic production of biodiesel from virgin and waste sunflower oil in supercritical carbon dioxide.** The Journal of Supercritical Fluids. v. 56. p.259-264, 2011.

RODRIGUES, H. S. **Obtenção de ésteres etílicos e metílicos, por reações de transesterificação, a partir do óleo da palmeira Latino Americana – *Acrocomia aculeata*.** Tese de doutorado em Química - Universidade de São Paulo (USP), Riberão Preto, 2007.

RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; WADA, K.; AYUB, M. A. Z. **Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols.** Journal of the American Oil Chemists Society. v. 85, p. 925-930, 2008.

RODRIGUES, R. Costa. **Síntese de Biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalizada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual.** Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 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.

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, p. 45-50, 2008.

RURAL SEMENTES (<http://www.ruralsementes.com.br>). Acessado em 28 de setembro de 2012.

SAHOO, P. K.; DAS, L. M. **Process optimization for biodiesel production from Jatropha, Karanja and Polanga oils.** Fuel. v. 88, p. 1588-1594, 2009.

SAKAI, T.; KAWASHIMA, A.; KOSHIKAWA, T. **Economic assessment of batch biodiesel production processes using homogeneous and heterogeneous alkali catalysts.** Bioresource Technology. v. 100, p. 3268-3276, 2009.

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

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. **Comparison among immobilized lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis.** Journal Molecular Catalysis B Enzyme. v. 54, p. 19-26, 2008.

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.

SANJINEZ-ARGANDOÑA, E.J., CHUBA, C.A.M., **Caracterização biométrica, física e química de frutos da palmeira bociuva *Acrocomia aculeata* (Jacq Lodd. ex Mart)** Revista Brasileira de Fruticultura. v. 33, 1023–1028, 2011.

SANTIN, C. M. T.; OLIVEIRA, D. de.; OLIVEIRA, J. V.; **Análise comparativa entre o óleo de soja e óleo de macaúba na produção de ésteres etílicos em modo contínuo.** In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 Chemistry Engineering Proceedings, v.1, p. 7770-7777. São Paulo: Blucher, ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/chemeng-cobeq2014-0855-23240-171470. 2015.

SARAF, S.; THOMAS, B. **Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality.** Process Saf Environ Prot. V. 85, p. 360-364, 2007.

SCHINAS, P.; KARAVALAKIS, G.; DAVARIS, C.; ANASTOPOULOS, G.; KARONIS, D.; ZANNIKOS, F. **Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seed oil as an alternative feedstock for the production of biodiesel in Greece.** Biomass Bioenergy. v. 33, p. 44-49, 2009.

SCHUCHARDT, U., RIBEIRO, M. L. **A indústria petroquímica no próximo século: Como substituir o petróleo como matéria-prima?** Quimica Nova. v. 24, p. 247-251, 2001.

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

SERIO, M. DI; LEDDA, M.; COZZOLINO, M.; MINUTILLO, G.; TESSER, R.; SANTACESARIA, E. **Transesterification of Soybean Oil to Biodiesel by Using Heterogeneous Basic Catalysts.** Ind Eng. Chem. Res. v. 45, p. 3009-3014, 2006.

SERRA, C. **Anuário brasileiro da agroenergia 2007** Anuário brasileiro da agroenergia, 128, Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2007.

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.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. **The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media.** Chemistry Central Journal. 2:1, 2008. doi:10.1186/1752-153X-2-1.

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

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, Y.C., SINGH, B., **Development of biodiesel from karanja, a tree found in rural India.** Fuel Processing Technology, v. 87 n° 8 e 9, p. 1740–1742, 2008.

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

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. **Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing** . Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 17, p. 133-142, 2002.

SHUIT, S. H. S., LEE, K. T., KAMARUDDIN, A. H., YUSUP, S. **Reactive extraction and in situ esterification of *Jatropha curcas* L. seeds for the production of biodiesel** Fuel, v. 89, p. 527-530, 2010.

SIATIS, N. G.; KIMBARIS, A. C.; PAPPAS, C. S.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M. G. **Improvement of Biodiesel Production Based on the Application of Ultrasound: Monitoring of the Procedure by FTIR Spectroscopy.** Journal of the American Oil Chemists Society. v. 83, p. 53-57, 2006.

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, J. A.; SILVA, D. B.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. N. **Frutas nativas dos cerrados.** Brasília: EMBRAPA-CPAC, p. 166, 2001.

SILVA, N.C.A.; MIRANDA, J. S.; BOLINA, I.C.A.; SILVA, W. C.; HIRATA, D. B.; CASTRO, H. F.; MENDES, A.A. **Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor.** Biochemical Engineering Journal. v. 82, p. 139-149, 2014.

SILVA, C.; WESCHENFELDER, T.A.; ROVANI, S.; CORAZZA, F.C.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J. V. **Continuous production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed ethanol.** Industrial & engineering chemistry research, v. 46, p. 5304-5309, 2007.

SILVEIRA, S. D. **Produção de biodiesel de óleo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) via esterificação seguida de transesterificação metálica com catalisador básico.** Dissertação de Mestrado. UFRJ. Rio de Janeiro - RJ, 2014.

SINGH, A. K.; FERNAND, S. D.; HERNANDEZ, R. **Base-catalyzed fast transesterification of soybean oil using ultrasonication.** Energy Fuels. v. 21, p. 1161-1164, 2007.

SINGH, S. P.; SINGH, D. **Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of biodiesel: a review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. v. 12. p. 200-216, 2010.

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

SOMNUK, K.; SMITHMAITRIE, P.; PRATEEPCHAIKUL, G. **Feasibility of using ultrasound-assisted biodiesel production from degummed-deacidified mixed crude palm oil using small-scale circulation.** Kasetsart journal (Nat. Sci.). v. 46, p. 662-669, 2012.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. **Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil.** Enzyme and Microbial Technology. v. 97, p. 97-103, 2003.

SREEPRASANTH, P.S.; SRIVASTAVA, R.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. **Hydrophobic, solid acid catalysts for production of biofuels and lubricants.** Applied Catalysis A: General. v. 314, p. 148-159, 2006.

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 derivatives: Fatty Acid Methyl esters (FAME) – **Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents.** Asociación Española de Normalización y Certificación, Madrid, 2001.

STANDARD UNE-EN 14105. **Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents.** Asociación Española de Normalización y Certificación, Madrid, 2003.

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

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.

SUSLICK, K.S., SKRABALAK, S.E. **Handbook of Heterogeneous Catalysis**, vol. 4; Ertl, G.; Knzinger, H.; Schth, F.; Weitkamp, J., Eds.; pp. 2006-2017 Wiley-VCH: Weinheim, 2008.

SZYBIST, J. P.; KIRBY, S. R.; BOEHMAN, A. L. **NO_x Emissions of Alternative Diesel Fuels: A Comparative Analysis of Biodiesel and FT Diesel.** *Energy & Fuels*, v.19, p. 1484-1492, 2005.

TALEBIAN-KIAKALAIEH, A.; AISHAH, N.; AMIN, 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. M. R.; PUAH, S. M.; WU, J. C.; WON, C. J.; CHOW, Y. **Lipase-catalyzed methanolysis of palm oil in presence and absence of organic solvent for production of biodiesel.** *Biocatalysis and Biotransformation*. v. 24, p. 257-262, 2006.

TALUKDER, Md. M. R.; DAS, P.; FANG, T. S.; WU, J. C. **Enhanced enzymatic transesterification of palm oil to biodiesel.** Biochemical Engineering Journal. v. 55, p. 119–122, 2011.

TALUKDER, Md. M. R.; WU, J. C.; NGUYEN, T. B. V.; FEN, N. M.; MELISSA, Y. L. S. **Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: comparison of methanolysis methods.** Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic. v. 60, p. 106–112, 2009.

TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER, M. R.; HAMA, S.; NUMATA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. **Enzymatic production of biodiesel from jatropha oil: a comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst.** Biochemical Engineering Journal. v. 39, p. 185-189, 2008.

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

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

TAN, K.T.; LEE, K.T.; MOHAMED A.R. **Potential of waste palm cooking oil for catalyst-free biodiesel production.** Energy. v. 36, p. 2085-2088, 2011.

TANAWANNAPONG, Y.; KAEWCHADA, A.; JAREE, A. **Biodiesel production from waste cooking oil in a microtube reactor.** Journal of Industrial and Engineering Chemistry. v. 19, p. 37-41, 2013.

TAPANES, N. C. O., GOMES, A. DA, DE MESQUISTA CARNEIRO, J. W., CEVA ANTUNES, O. A. **Transesterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: theoretical and experimental studies of biodiesel reaction.** Fuel. v. 87, p. 2286–2295, 2008.

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.

TEIXEIRA, E. C. **Biodiesel: Impacto Ambiental, Agrônômico e Atmosférico.** FEPAM, Porto Alegre; 2012.

TEIXEIRA, L. S. G.; COUTO, M. B.; SOUZA, G. S.; ANDRADE FILHO, M.; ASSIS, J. C. R.; GUIMARÃES, P. R. B.; PONTES, L. A. M.; ALMEIDA, S. Q.; TEIXEIRA, J. S. R. **Characterization of beef tallow biodiesel and their mixtures with soybean biodiesel and mineral diesel fuel.** Biomass and Bioenergy, v. 34, p. 438-441, 2010.

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

TINKOV, S.; BERKEREDJIAN, R.; WINTER, G.; COESTER C. **Microbubbles as Ultrasound Triggered Drug Carriers.** Journal of Pharmaceutical Sciences. v. 98, p. 1935-1961, 2009.

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

TRAN, D. T.; CHEN, C. L.; CHANG, J. S. **Immobilization of Burkholderia sp. lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production.** Journal Biotechnology. v. 158, p. 112-119, 2012.

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

TRENTIN, C. M.; SCHERER, R. P.; DALLA ROSA, C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Solvent-free Enzymatic Production of biodiesel in batch and continuous mode under ultrasound-assisted system.** 16° IUFoST. 16th World Congress of Food Science and Technology.. Foz do Iguaçu – PR, Agosto, 2012.

TRENTIN, C. M. S. **Síntese de ésteres pela transesterificação e esterificação enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.** Tese de doutorado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim. URI. Erechim-RS, 2013.

TRENTIN, C. M.; SCHERER, R. P.; DALLA ROSA, C.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Continuous lipase-catalyzed esterification of soybean fatty acids under ultrasound irradiation.** Bioprocess Biosystems Engineering. v. 37, p. 841-847, 2014.

TRENTIN, C. M.; POPIOLSKI, A. S.; BATISTELLA, L.; DALLA ROSA, C.; TREICHEL, H.; OLIVIEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Enzyme-catalyzed production of biodiesel by ultrasound-assisted ethanolysis of soybean oil in solvent-free system.** Bioprocess Biosystems Engineering. v. 38, p. 437–448, 2015.

TRENTIN, C. M. S.; OLIVEIRA, D. de.; OLIVEIRA, J. V.; **Análise comparativa entre o óleo de soja e óleo de macaúba na produção de ésteres etílicos em modo contínuo.** In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 Chemistry Engineering Proceedings, v.1, p. 7770-7777. São Paulo: Blucher, 2015. ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/chemeng-cobeq2014-0855-23240-171470.

TZIALLA, A. A.; PAVLIDIS, I. V.; FELICISSIMO, M. P.; RUDOLF, P.; GOURNIS, D.; STAMATIS, H. **Lipase immobilization on smectite nanoclays: Characterization and application to the epoxidation of α -pinene.** Bioresource Technology. v. 101, p. 1587-1594, 2010.

ULLAH, Z.; BUSTAM, M. A.; MAN, Z. **Biodiesel production from waste cooking oil by acidic ionic liquid as a catalyst.** Renewable Energy. v. 77 p. 521-526, 2015.

USP, 2014. (www5.usp.br/19217/baixa-coleta-limita-biodiesel-com-oleo-residual-de-fritura-aponta-pesquisa-do-iee/) Acessado em 17 de junho de 2014.

VELJKOVIC, V. B.; AVRAMOVIC, J. M.; STAMENKOVIC, 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.

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.; SILVA, C.; BORGES, G. R.; CORAZZA, F. C.; OLIVEIRA, J. V.; GROMPONE, M. A.; JACHMANIÁN, I. **Continuous production of soybean biodiesel in supercritical ethanol– water mixtures.** Energy & Fuels. v. 22, p. 2805-2809, 2008.

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.

VYAS, A. P.; VERMA, J. L.; SUBRAHMANYAM, N. **A review on FAME production process.** Fuel. v. 89, p. 1-9, 2010.

WAGHMARE, G. V.; VETAL, M. D.; RATHOD, V. K. **Ultrasound assisted enzyme catalyzed synthesis of glycerol carbonate from glycerol and dimethyl carbonate.** Ultrasonics Sonochemistry. v. 22, p. 311-316, 2015.

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.** Chin. J. Biotechnol. v. 23, p. 121-128, 2007.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. **Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida Antarctica* lipase.** Journal of American oil Chemical Society. v. 77, p. 355-360, 2000.

WATANABE, Y.; PINSIRODOM, P.; NAGAO, T.; YAMAUCHI, A.; KOBAYASHI, T.; NISHIDA, Y. **Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida Antarctica* lipase.** Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 44, p. 99-105, 2007.

WEN, Z. Z.; YU, X. H.; TU, S. T.; YAN, J. Y.; ERIK, D. **Synthesis of biodiesel from vegetable oil with methanol catalyzed by Li-doped magnesium oxide catalysts.** Applied Energy. v. 87, p. 743-748, 2010.

WU, X.; LEUNG, D. Y. C. **Optimization of biodiesel production from camelina oil using orthogonal experiment.** Applied Energy. v. 88, p. 3615-3624, 2011.

XU, Y.; DU, W.; LIU, D.; ZENG, J. **A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium.** Biotechnol. Lett. v. 25, p. 1239-1241, 2003.

YAAKOB, Z.; MOHAMMAD, M.; ALHERBAWI, M.; ALAM, Z.; SOPIAN, K. **Overview of the production of biodiesel from waste cooking oil.** Renewable and Sustainable Energy Reviews. v. 18, p. 184-193, 2013.

YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. **Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium.** Microporous Mesoporous Materials. v. 86, p. 215-222, 2005.

YANG, W. M.; MAGHBOULI, A.; LI, J.; CHOU, S.K.; CHUA, K. J. **Performance, combustion and emission characteristics of biodiesel derived from waste cooking oils.** Applied Energy. v. 112, p. 493-499, 2013.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. N. **Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites.** Chemical Engineering Journal. V. 134, p. 262-267, 2007.

YESILOGLU, Y. **Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil.** Journal of American oil Chemical Society. v. 81, p. 157-160, 2004.

YIN, C.; LIU, T.; TAN, T. **Synthesis of vitamin A esters by immobilized *Candida* sp. lipase in organic media.** Chinese Journal of Chemical Engineering. v. 14, p. 81-86, 2006.

YIN, X.; MA, H.; YOU, Q.; WANG, Z.; CHANG, J. **Comparison of four different enhancing methods for preparing biodiesel through transesterification of sunflower oil.** Applied Energy. v. 91, p. 320-325, 2012.

YIN, X.; YOU, Q.; MA, H.; DAI, C.; ZHANG, H.; LI, K.; LI, Y. **Biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate enhanced by counter-current pulsed ultrasound.** Ultrasonics Sonochemistry. v. 23, p. 53–58, 2015.

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.

YUN, H.; WANG, M.; FENG, W.; TAN, T. **Process simulation and energy optimization of the enzyme-catalyzed biodiesel production.** Energy, v.54, p. 84-96, 2013.

ZANETTE, A. F. **Estudo da transesterificação do óleo de pinhão manso empregando catalisadores heterogêneos.** Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Toledo – PR, 2010.

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

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

ZHANG, Y.; DUBÉ, M. A.; MCLEAN, D. D.; KATES M. **Biodiesel Production from Waste Cooking Oil: 2. Economic assessment and sensitivity analysis.** *Bioresource Technology*, v. 90, p. 229-240, 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.

ZUBR, J. **Oil-seed crop: Camelina sativa.** *Ind Crops Prod.* v. 6, p.113-119, 1997.

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

APÊNDICE A – ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Neste apêndice é apresentada a metodologia de cálculo adotada para determinação do teor em termos de ésteres de ácidos graxos e quantificação de mono- (MAG), di- (DAG) e triglicerídeos (TAG).

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 A1.

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].

QUANTIFICAÇÃO DE MONO- (MAG), DI- (DAG) e TRIGLICERÍDEOS (TAG)

Conforme apresentado no capítulo de materiais e métodos, para a quantificação do teor de monogliceróis (MAGs), diacilgliceróis (DAGs) e triacilgliceróis (TAGs) empregou-se técnica de cromatografia gasosa utilizando as condições cromatográficas descritas pela norma EN14105 do Comitê Europeu para Padronizações.

CÁLCULOS PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MONO-, DI- E TRIGLICERÍDEOS

As amostras referentes a cada experimento foram preparadas conforme descrito nos materiais e métodos. A solução foi então injetada em duplicata de amostra em cromatógrafo gasoso Shimadzu, Modelo GC-2010, equipado com injetor automático e *on-column* e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar DB-5 (J e W Scientific, nº de série: US7162944H), de 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm. As condições de operação foram segundo a Norma nº 14105, do Comitê Europeu para Padronizações, sendo a programação de temperatura da coluna: 50 °C/1 min, 15 °C/min até 180 °C, 7°C/min até 230 °C, e 10 °C/min até 380 °C, permanecendo por 8 min. A temperatura do detector era 380 °C, pressão do gás de arraste (ar sintético e nitrogênio) de 80 kPa e o volume injetado foi de 1µL. O cálculo do teor (%) de mono-, di- e triglicerídeos da amostra foram obtidos através da Equação da reta das curvas de calibração, com base na EN 14105 (2003).

CURVAS DE CALIBRAÇÃO MONO-, DI-, TRIGLICERÍDEOS

Preparou-se uma solução mãe de cada padrão externo (monooleína, dioleína e trioleína), e a partir destas preparou-se, cuidadosamente, 3 soluções de calibração em diferentes concentrações, para os glicérides (Krüger, 2009), conforme a Tabela A.2.

Tabela A. 2. Preparação das soluções de calibração dos glicerídeos.

Padrão externo	Solução de calibração							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Monooleína (ppm)	100	500	1000	2000	3100	200	300	6200
Dioléina (ppm)	890	70	530	1000	1400	200	100	50
Trioléina (ppm)	500	5000	3000	50	10.000	7500	200	300

As condições de análise das soluções de calibração e das amostras foram segundo a Norma 14105, do Comitê Europeu para Padronizações, porém, sem a utilização de padrões internos, pelo fato de que ampliou-se as faixas de calibração sugeridas pelo método, que era de somente quatro pontos e assim teve-se dificuldade de encontrar as concentrações dos padrões internos que acompanhassem toda a faixa de abrangência escolhida. Optou-se então pela calibração somente com os padrões externos.

Em cada solução de calibração foi adicionado 100 μ L do derivatizante MSTFA, após a solução foi agitada e deixada em temperatura ambiente por 15 minutos para que o derivatizante reagisse. Em seguida, completou-se o volume (10 mL) com n-heptano. As soluções foram transferidas para os frascos de amostragem e levadas ao GC-FID para análise. Todas as soluções foram preparadas em duplicata.

As equações obtidas com as curvas de calibração (concentração versus área) para cada composto podem ser observadas nas Figuras A.1 a A.3.

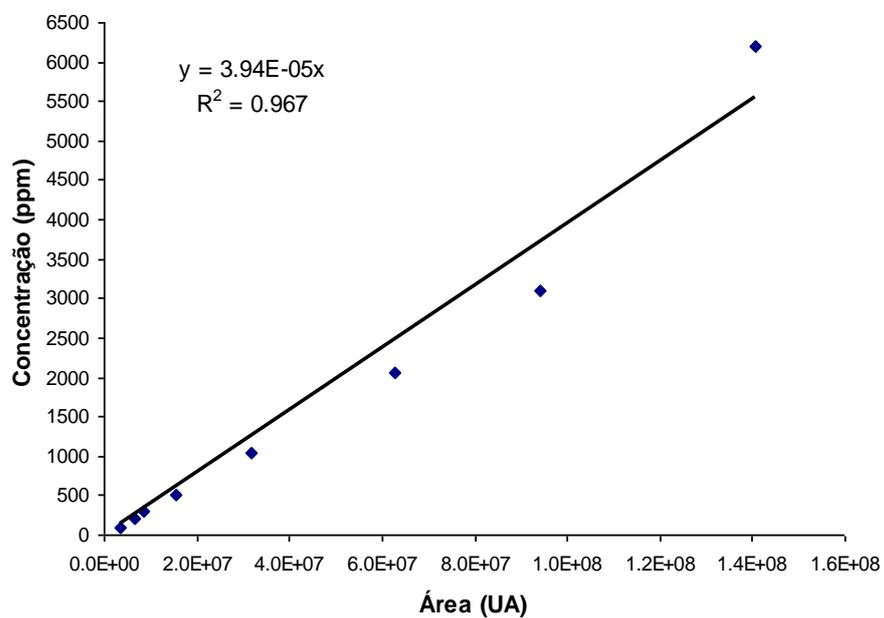
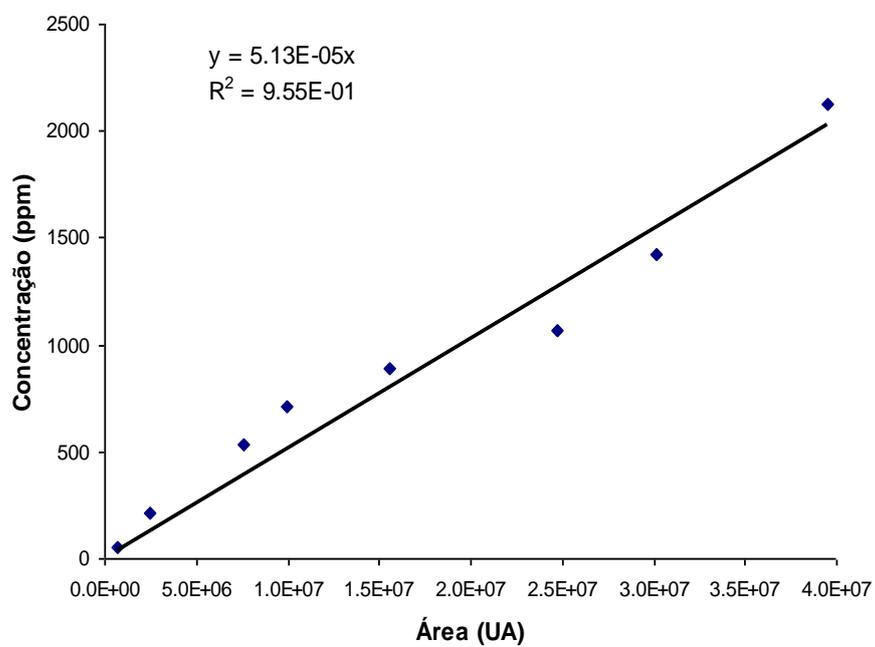
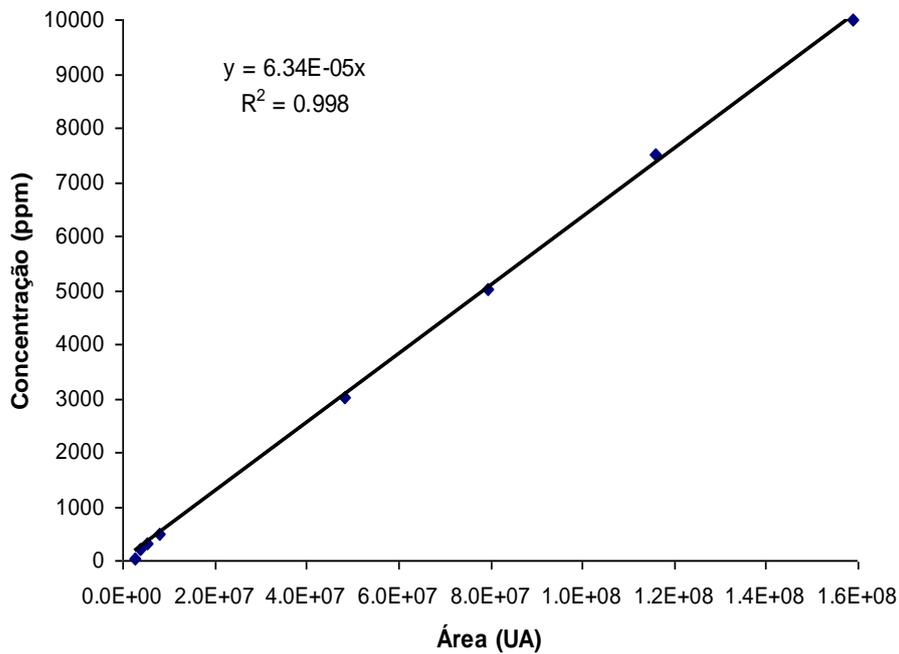
Figura A. 1. Curva de calibração para monooleína.**Figura A. 2.** Curva de calibração para dioleína.

Figura A. 3. Curva de calibração para trioleína.



EXEMPLO:

Teor de diglicerídeos.

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

$$C_{\text{amostra}} = \frac{63.6 \text{ (mg)}}{0,010 \text{ (L)}} = 6360$$

$C = 5,13 E 10^{-5} * \Sigma \text{Área DAGs}$

$C = \text{mg/L}$

$$\begin{array}{ccc} 6360 \text{ mg/L} & \longrightarrow & 100\% \\ C \text{ mg/L} & \longrightarrow & x \% \text{ de DAG na amostra} \\ x = \% \text{ de DAG na amostra} & & \end{array}$$