

**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DA  
ALCOÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS**

**CARINA FACCIO**

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

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**ABRIL DE 2004**

# ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DA ALCOÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS

CARINA FACCIO

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

Comissão Julgadora:

---

Débora de Oliveira, D. Sc.  
Orientadora

---

José Vladimir de Oliveira, D. Sc.  
Orientador

---

Jorge Luiz Ninow, D. Ing.

---

Cláudio Dariva, D. Sc.

Erechim, 29 de abril de 2004.

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

## **DEDICATÓRIA**

“A minha mãe, Véra Lúcia,  
pelo incentivo e apoio incondicional  
durante esta caminhada”.

“Aos meus familiares e amigos,  
pela compreensão e paciência nos momentos  
mais difíceis”.

“Ao Alexandre,  
por simplesmente tudo”.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos Professores Débora e José Vladimir de Oliveira, pelo aconselhamento e orientação, e que neste momento não tenho palavras para agradecer por tudo.

Aos professores do Curso de Engenharia de Alimentos e do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos que, de alguma forma contribuíram para a minha formação, em especial à Prof<sup>a</sup>. Eunice Valduga.

Aos Professores Cláudio Dariva e Irajá do Nascimento Filho, por estarem sempre dispostos a ajudar na realização deste trabalho.

Aos bolsistas do Projeto Biodiesel: Clarissa Dalla Rosa, Cristiana Amroginski, João Paulo Bender, Nádia Lipke e Silvana Menoncin: pois sem eles o caminho percorrido seria muito mais longo.

Aos colegas: Cristiane Marchesi, Elisandra Rigo, Gean Delise Vargas, Losiane Paviani Diehl, Marcelo Grings, Marcelo Lanza e Márcia Santin: pela amizade e companheirismo mostrados em momentos bons e/ou nem tão bons assim.

À Cláudia Kuiawinski, ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia e da Central de Materiais: pela colaboração, amizade e paciência.

À PETROBRAS e a Indústria Ervateira Barão SA pelo apoio financeiro.

A todos os outros que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

Quando tiver de escolher entre o sorriso e a lágrima, sorria sempre.

Se porém tiver que chorar, chore sem vergonha, pois suas lágrimas purificam sua alma.

Quando você tiver de escolher entre o amor e o ódio, ame com toda força do coração e quando tiver que odiar simplesmente não o faça.

Quando tiver de escolher entre a derrota e a vitória, lute, pois mesmo que não venças será vitorioso pôr não ter cruzado os braços.

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

## ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DA ALCOÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS

Carina Faccio

Abril/2004

Orientadores: Débora de Oliveira

José Vladimir de Oliveira

O potencial de aplicações de lipases em processos tecnológicos para a modificação de óleos e gorduras tem sido objeto de grande interesse nos meios científicos, econômico e industrial nos últimos anos. O principal objetivo deste trabalho foi o estudo comparativo da reação de alcoólise dos óleos de mamona e soja através do uso de catalisador químico e enzimático. Na reação catalisada por NaOH, os experimentos foram realizados variando a razão molar óleo-etanol, a temperatura, a concentração de catalisador e o tempo de reação, de acordo com um planejamento de experimentos pré-estabelecido. A conversão da reação foi determinada por gravimetria. Já para a reação enzimática, com uso de n-hexano como solvente, lipases comerciais imobilizadas (Lipozyme IM, Novozym 435) foram utilizadas, os experimentos foram realizados variando temperatura, concentração de água e de enzima e razão molar óleo-etanol. A conversão da reação foi determinada pela análise das amostras em GC/MS. Um modelo empírico foi construído para avaliar a influência das variáveis de processo, bem como determinar as condições que maximizam a conversão para cada sistema estudado. Os resultados mostram que tanto com o uso de catalisador químico como com o uso de enzimas em solvente orgânico conversões próximas a 100% foram obtidas.

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

## PRODUCTION OF FATTY ACID ETHYL ESTERS THROUGH THE ALCOHOLYSIS OF VEGETABLE OILS

Carina Faccio

Abril/2004

Advisors: Débora de Oliveira

José Vladimir de Oliveira

Recently, there has been a growing interest in the application of lipases for industrial process related to the modification of oils and fats. The main objective of this work was to perform a comparative study on the alcoholysis of soybean and castor oils by enzyme- and alkaline-catalyzed reactions. When using NaOH as catalyst, the effect of oil to ethanol molar ratio, temperature, catalyst concentration and reaction time were evaluated through the adoption of an experimental design. Conversion for this type of reaction was determined by gravimetric measurements. For the lipase-catalyzed reaction, two commercial immobilized enzymes were employed in n-hexane as solvents (Lipozyme IM and Novozym 435) and the experiments were carried out varying the temperature, water and enzyme concentration and the oil to ethanol molar ratio. Reaction conversion was determined by analysis of the products in a GC/MS. An empirical model was then built so as to assess the effects of process variables on the reaction conversion as well as for determining optimum operating conditions. The results show that conversions near 100% were obtained with the use of both chemical and enzyme catalysts.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 CONTEXTO.....	5
2.2 REAÇÕES DE TRANSFORMAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS.....	9
2.2.1 O uso de catalisadores químicos.....	9
2.2.2 O uso de lipases como catalisadores.....	10
2.3 ALCOÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS.....	27
2.3.1 Introdução.....	27
2.3.2 Vias de obtenção.....	28
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 ALCOÓLISE DE ÓLEO VEGETAL UTILIZANDO NaOH COMO CATALISADOR.....	37
3.1.1 Substratos.....	38
3.1.2 Catalisador.....	38
3.1.3 Procedimento experimental e análise estatística.....	38
3.1.4 Determinação da conversão em ésteres utilizando NaOH como catalisador.....	42
3.2 ALCOÓLISE DE ÓLEO VEGETAL UTILIZANDO LIPASES COMERCIAIS COMO CATALISADORES.....	42
3.2.1 Substratos e solvente.....	42
3.2.2 Enzimas.....	43
3.2.3 Procedimento experimental e análise estatística.....	43
3.2.4 Determinação da conversão em ésteres utilizando lipases como catalisadores.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47

4.1 ALCOÓLISE DE ÓLEO VEGETAL UTILIZANDO NaOH COMO CATALISADOR.....	47
4.1.1 Conclusões parciais: Alcoólise de óleo vegetal utilizando NaOH como catalisador.....	52
4.2 ALCOÓLISE DE ÓLEO VEGETAL UTILIZANDO LIPASES COMERCIAIS COMO CATALISADORES.....	53
4.2.1 Efeito das Variáveis.....	59
4.2.2 Otimização das condições de operação – maximização da conversão.....	63
4.2.3 Conclusões parciais: Alcoólise de óleo vegetal utilizando lipases comerciais como catalisadores.....	66
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	67
5.1 CONCLUSÕES.....	67
5.2 SUGESTÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICE A – DADOS EXPERIMENTAIS DA CONVERSÃO EM ÉSTERES EM FUNÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS CONSTITUINTES DO ÓLEO DE SOJA – ETANÓLISE CATALISADA POR LIPOZYME IM.....	79
APÊNDICE B – DADOS EXPERIMENTAIS DA CONVERSÃO EM ÉSTERES EM FUNÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS CONSTITUINTES DO ÓLEO DE SOJA – ETANÓLISE CATALISADA POR NOVOZYM 435.....	81
APÊNDICE C – PROCEDIMENTO UTILIZADO PARA OS CÁLCULOS DA CONVERSÃO E CROMATOGRAMAS TÍPICOS OBTIDOS DA REAÇÃO ENZIMÁTICA DOS ÓLEOS VEGETAIS.....	83

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 2.1 Esquema das principais reações enzimáticas de interesterificação.....	15
Figura 2.2 Diagrama esquemático da produção e usos de ésteres etílicos.....	29
Figura 3.1 Fluxograma do procedimento experimental para a reação de alcoólise utilizando catalisador químico.....	39
Figura 3.2 Fluxograma do procedimento experimental para a reação de alcoólise enzimática em solvente orgânico.....	44
Figura 4.1 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de mamona-Lipozyme IM (experimentos 1-4 e 9).....	54
Figura 4.2 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de mamona-Lipozyme IM (experimentos 5-9).....	55
Figura 4.3 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de mamona-Novozym 435 (experimentos 1-4 e 9).....	55
Figura 4.4 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de mamona-Novozym 435 (experimentos 5-9).....	56
Figura 4.5 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de soja-Lipozyme IM (experimentos 1-4 e 9).....	56
Figura 4.6 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de soja-Lipozyme IM (experimentos 5-9).....	57
Figura 4.7 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de soja-Novozym 435 (experimentos 1-4 e 9).....	57
Figura 4.8 – Curva cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de soja-Novozym 435 (experimentos 5-9).....	58

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 2.1 Produção mundial de óleos e gorduras no período de 1994 a 2001 (mil toneladas).....	6
Tabela 2.2 Principais países produtores, importadores e exportadores de óleo de mamona (1000t).....	7
Tabela 2.3 Brasil: área, produção e produtividade de soja.....	8
Tabela 2.4 Produção de óleo de soja no Mercosul (1000t).....	8
Tabela 2.5 Atividade e concentração de água das lipases utilizadas na alcoólise enzimática em n-hexano.....	11
Tabela 2.6 LogP de alguns solventes orgânicos.....	22
Tabela 3.1 Percentuais de ácidos graxos para o óleo de soja.....	36
Tabela 3.2 Percentuais de ácidos graxos para o óleo de mamona.....	37
Tabela 3.3 Intervalo de estudo das variáveis – catalisador químico.....	40
Tabela 3.4 Planejamento experimental empregado na reação de alcoólise dos óleos de mamona e soja utilizando NaOH como catalisador.....	41
Tabela 3.5 Intervalo de estudo das variáveis – solvente orgânico.....	45
Tabela 3.6 Planejamento experimental empregado na reação de alcoólise dos óleos de mamona e soja refinado utilizando lipases comocatalisador.....	45
Tabela 4.1 Alcoólise dos óleos de mamona, soja refinado e soja degomado, com catalisador convencional (NaOH).....	47
Tabela 4.2 Resultados da regressão para alcoólise do óleo de mamona e etanol com catalisador convencional (NaOH).....	48
Tabela 4.3 Resultados da regressão para alcoólise do óleo de soja refinado e etanol com catalisadorconvencional (NaOH).....	49
Tabela 4.4 Resultados da regressão para alcoólise do óleo de soja degomado e etanol com catalisador convencional (NaOH).....	51

Tabela 4.5 Resultados obtidos na otimização do óleo de soja degomado.....	52
Tabela 4.6 Condições experimentais ótimas para cada sistema.....	52
Tabela 4.7 Conversões obtidas na alcoólise enzimática dos óleos de mamona e soja refinado em solvente orgânico.....	54
Tabela 4.8 Resultados da regressão para o óleo de mamona e enzima Lipozyme IM.....	59
Tabela 4.9 Resultados da regressão para o óleo de mamona e enzima Novozym 435.....	60
Tabela 4.10 Resultados da regressão para o óleo de soja e enzima Lipozyme IM...	62
Tabela 4.11 Resultados da regressão para o óleo de soja e enzima Novozym 435.....	63
Tabela 4.12 Condições experimentais ótimas para cada sistema .....	64
Tabela 4.13 Conversões obtidas na otimização dos resultados da alcoólise enzimática do óleo de mamona utilizando enzima Novozym 435.....	65

## 1 INTRODUÇÃO

Com exceção de hidrelétricas e da energia nuclear, a maior parte de toda a energia consumida no mundo vem do petróleo, do carvão e do gás natural. Como essas fontes são limitadas e deverão se esgotar no futuro, a visão de uma fonte alternativa de energia é de vital importância (NASCIMENTO et al., 2001). Há estudos que permitem situar por volta do ano de 2030 uma aguda escassez de petróleo, com o correspondente encarecimento. A elevação do preço dos combustíveis deverá reduzir a competitividade industrial dos países que não tenham desenvolvido fontes alternativas (Relatório PETROBRAS – Etapa Agribusiness, 2003).

Tendo em vista estes aspectos, um crescente interesse na modificação de óleos e gorduras tem sido verificado nos últimos anos. Esta tendência pode ser principalmente atribuída ao fato de que os oleoquímicos (substâncias químicas derivadas das gorduras e dos óleos naturais) são obtidos de fontes renováveis, podendo ser produzidos em muitos países. Além disso, a crescente disponibilidade de óleos e gorduras nos países desenvolvidos tem estimulado tanto a pesquisa fundamental quanto à aplicada, na direção da produção de produtos alternativos de alto valor agregado, derivados de lipídeos (MALCATA et al., 1990).

Os lipídeos são uma importante matéria-prima para as indústrias química, farmacêutica e de alimentos, com uma produção mundial de óleos e gorduras de aproximadamente 117,302 milhões de toneladas em 2001 (Relatório PETROBRAS – Etapa Agribusiness, 2003).

Entre os processos mais promissores para modificação de lipídeos estão as reações de hidrólise, síntese de ésteres e transesterificação destes materiais na presença de catalisadores químicos (ácidos e bases) ou enzimáticos.

O biodiesel (mistura de ésteres etílicos) produzido a partir da transesterificação de óleos vegetais não produz óxido de enxofre e minimiza em 1/3 as partículas emitidas, em comparação com o óleo diesel obtido do petróleo. Em função destas vantagens em relação ao meio ambiente, o biodiesel pode ser esperado como um substituto para o óleo diesel convencional (MURAYAMA, 1994; ISO et al., 2001). Até o presente, o biodiesel tem sido produzido com o emprego de

catalisadores básicos ou ácidos usando óleos vegetais, na Europa e EUA. No entanto, a exigência de remoção do catalisador e o gasto excessivo de energia são os maiores inconvenientes do processo químico. Assim sendo, a substituição do catalisador químico por enzimas pode diminuir estes problemas, justificando o desenvolvimento de pesquisas utilizando lipases como catalisador (ISO et al., 2001). As lipases possibilitam a utilização de condições reacionais brandas, evitando, por exemplo, o emprego de altas temperaturas (acima de 70°C), que podem levar à formação de produtos com coloração escura, bem como conferir sabor e odor desagradáveis ao produto final (OLIVEIRA, 1999).

Dentre as matérias-primas nacionais que apresentam interesse na produção de compostos de alto valor agregado, a partir de oleaginosas, destacam-se o óleo de soja e óleo de mamona.

O metanol é o álcool comumente utilizado nas reações de transesterificação catalisadas por álcalis, ácidos ou enzimas (MA e HANNA, 1999; FUKUDA et al., 2001). Entretanto, no contexto brasileiro, o etanol tem força natural desde que o Brasil se tornou o maior produtor mundial, com uma tecnologia de produção bem estabelecida, grande capacidade industrial, com plantas instaladas em todo o país e devido ao fato de que o etanol é obtido de um recurso renovável.

O óleo de mamona é mais usado, em termos quantitativos, na fabricação de tintas, vernizes, cosméticos e sabões. É também importante na produção de plásticos e de fibras sintéticas e, devidamente processado, destaca-se como lubrificante (SANTOS et al., 2001). Conforme comentado acima e segundo citação de CHIERICE & CLARO NETO (2001) no Relatório PETROBRAS – Etapa Agribusiness (2003), o óleo de mamona que não entra na cadeia alimentícia, é um produto estritamente industrial, podendo ser considerado um petróleo verde. Podem ser obtidos a partir dele, inúmeros produtos químicos hoje extraídos do petróleo, além de poder ser utilizado como fonte energética renovável em substituição ao óleo diesel.

COELHO (1979) afirma que de cada 100kg de mamona em bagas se obtém, em geral, 45kg de óleo e 50kg de farelo e torta; do óleo, 36kg são do tipo 1, de melhor qualidade, obtido por prensagem que geralmente é hidráulica, e 9kg são do

tipo 3, de qualidade inferior, obtidos por extração com solvente químico. O teor de óleo das sementes de mamona varia em torno de 35 a 55%, cujo padrão comercial é de 45% (VIEIRA et al., 1997).

Em termos de óleo de mamona os três maiores produtores mundiais são a Índia, a China e o Brasil participando eles, em 2001, com 92% da produção mundial. Os três maiores importadores mundiais são a França, os Estados Unidos e a China. O Brasil aparece como segundo maior exportador mundial, mas a uma grande distância da Índia que, em 2001, participou com 85% das exportações mundiais ([www.embrapa.gov.br](http://www.embrapa.gov.br)).

No Brasil, de acordo com o Relatório de Acompanhamento de Safras da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento, jul/2001), a produção de soja chegou a 32,3 milhões de toneladas plantadas em 2000, o que representa em torno de 4,1 milhões de toneladas de óleo, segundo a ABIOVE (Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais).

A produtividade brasileira tem crescido continuamente. Porém, o rendimento do óleo de soja não é alto se comparado ao de outras leguminosas, devido ao fato da soja conter apenas em torno de 18% de óleo (Relatório PETROBRAS – Etapa Agribusiness, 2003).

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja. Inicialmente, o óleo de soja brasileiro era destinado ao mercado interno. Mais tarde começou a ser exportado para mercados de menor poder aquisitivo, como os mercados asiáticos. Mais recentemente, o óleo vem encontrando dificuldades de colocação, em função de produtores concorrentes (até mesmo, países não produtores de soja, que compram o grão para industrializá-lo) (Relatório PETROBRAS – Etapa Agribusiness, 2003).

Neste contexto, ésteres obtidos a partir destes óleos poderiam agregar valor a matérias-primas com perspectivas no desenvolvimento de novas aplicações.

Em que pese a relevância científica e tecnológica da produção de ésteres a partir da alcoólise de óleos vegetais, visando posterior aplicação tanto na indústria oleoquímica quanto na obtenção de um biocombustível, verificou-se a partir do

estado da arte a ausência de um estudo sistemático referente ao sistema reacional de interesse deste trabalho, quer seja com catalisador enzimático bem como na presença de catalisador alcalino.

Com base nestes aspectos, o presente trabalho tem por objetivo o estudo da produção de biodiesel (mistura de ésteres etílicos) através da realização de modificação de óleos vegetais (mamona e soja), via reação de alcoólise em meio orgânico. Para comparar os dados experimentais obtidos na alcoólise enzimática em meio orgânico será realizada a alcoólise utilizando catalisador químico.

Levando em consideração estes aspectos, as seguintes etapas foram realizadas as quais podem ser visualizadas como objetivos específicos: verificação da influência das variáveis – temperatura, razão molar óleo-etanol, concentração de catalisador químico e tempo de reação – na conversão do processo, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) como catalisador; otimização da conversão da alcoólise química de óleos vegetais – dados experimentais e modelagem estatística; verificação da influência das variáveis – temperatura, razão molar óleo-etanol, concentração de enzima e concentração de água adicionada – na conversão do processo, utilizando n-hexano como solvente e estudo cinético e otimização da conversão da alcoólise enzimática de óleos vegetais em solvente orgânico – dados experimentais e modelagem estatística.

Como forma de embasamento ao trabalho ora proposto, serão apresentados nos primeiros capítulos: a introdução e a revisão bibliográfica, procurando fornecer base teórica bem como os resultados obtidos na literatura referentes ao tema deste trabalho.

O Capítulo 3 apresenta os materiais e métodos analíticos utilizados no decorrer do trabalho, no Capítulo 4 encontram-se os resultados obtidos na alcoólise química e enzimática para os sistemas estudados. Como forma de finalizar o trabalho, as conclusões bem como sugestões para trabalhos futuros serão apresentadas no Capítulo 5.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Devido à grande variedade de assuntos que fazem parte da proposta deste trabalho, a revisão bibliográfica aqui apresentada foi dividida em temas distintos, procurando fornecer uma seqüência lógica de eventos, enquadrando, globalmente, todos os pontos relevantes do trabalho. Primeiramente, o contexto no qual o trabalho se insere é apresentado. A seguir, as reações de biotransformação de óleos e gorduras, objeto de estudo deste trabalho, são expostas. Especial atenção é dada à utilização de lipases como catalisadores para este tipo de reação, ressaltando importantes propriedades deste tipo de enzima, empregada ao longo do presente trabalho. Na seqüência deste capítulo, a utilização de solventes orgânicos, objeto de estudo deste trabalho, é relatada, principalmente no que se refere às vantagens e desvantagens na utilização dos mesmos. Após o fornecimento de todas as informações necessárias ao completo entendimento do trabalho, uma revisão relacionada à reação enzimática de particular interesse neste trabalho, alcoólise de óleos vegetais, é apresentada. Neste item, a compilação de todos os temas citados neste capítulo é realizada, enfocando a reação de interesse específico.

### 2.1 CONTEXTO

Cerca de dois terços da produção mundial de óleos e gorduras são destinados ao consumo humano e animal. Contudo, a produção restante é usada em uma ampla variedade de aplicações industriais. Recentemente, tem surgido um grande interesse na transformação biotecnológica de óleos e gorduras, visando a utilização destas matérias-primas na produção de compostos de alto valor agregado, de uso potencial na indústria farmacêutica, de alimentos, oleoquímica, entre outras. A Tabela 2.1 apresenta a produção mundial de óleos e gorduras classificadas por fontes no período de 1994 a 2001.

Tabela 2.1 – Produção mundial de óleos e gorduras no período de 1994 a 2001 (mil toneladas).

Óleos/Gorduras	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Óleo de Soja	18.684	20.404	20.322	21.052	24.038	24.809	25.546	27.779
Óleo de Palma	14.304	15.210	16.282	17.903	16.919	20.631	21.825	23.355
Óleo de Palmiste	1.861	1.945	2.083	2.230	2.168	2.557	2.688	2.872
Óleo de Colza	9.970	10.955	11.479	11.830	12.229	13.066	14.467	13.725
Óleo de Girassol	7.391	8.556	9.006	9.165	8.439	9.308	9.677	8.223
Óleo de Amendoim	4.309	4.423	4.563	4.521	4.502	4.694	4.573	5.073
Óleo de Algodão	3.566	3.905	4.119	4.047	4.043	3.822	3.852	4.006
Óleo de Coco	3.015	3.350	2.867	3.301	3.107	2.388	3.272	3.539
Óleo de Oliva	1.900	1.888	2.042	2.701	2.588	2.461	2.545	2.690
Óleo de Milho	1.675	1.855	1.834	1.858	1.880	1.938	1.968	1.962
Óleo de Gergelim	616	589	668	723	736	726	715	751
Óleo de Linhaça	636	701	666	691	694	730	698	621
Óleo de Mamona	446	483	479	442	441	442	494	515
Total de Óleo Vegetal	68.373	74.264	76.410	80.464	81.784	87.572	92.320	95.111
Sebo	7.550	7.507	7.500	7.572	7.784	8.175	8.199	8.196
Manteiga	5.677	5.677	5.648	5.685	5.761	5.918	6.026	6.059
Banha de Porco	5.430	5.692	5.936	6.150	6.520	6.703	6.716	6.815
Óleo de Peixe	1.490	1.285	1.336	1.194	865	1.354	1.416	1.121
Total Óleo Animal e Gordura	20.147	20.161	20.420	20.601	20.930	22.150	22.357	22.191
<b>TOTAL</b>	<b>88.520</b>	<b>94.425</b>	<b>96.830</b>	<b>101.065</b>	<b>102.714</b>	<b>109.722</b>	<b>114.677</b>	<b>117.302</b>

FONTE: Oil World Annual 2001, 2000, 1999, 1998 & Oil World Weekly (22 March & 5 April 2002); MPOB – Para dados sobre a Malásia.

Tecnologias como fracionamento e hidrogenação tornaram possível o uso de óleos e gorduras em diversas áreas da indústria de oleoquímicos. Além disso, reações envolvendo óleos e gorduras têm despertado grande interesse, tornando possível o uso de tais matérias-primas de baixo valor comercial como substratos para produção de compostos de importância para a indústria farmacêutica e de alimentos, principalmente. Dentre as matérias-primas nacionais que apresentam interesse na produção de compostos de alto valor agregado, destacam-se o óleo de soja e o de mamona.

Em termos de óleo de mamona os três maiores produtores mundiais são a Índia, a China e o Brasil participando eles, em 2001, com 92% da produção mundial. Os três maiores importadores mundiais são a França, os Estados Unidos e a China. O Brasil aparece como segundo maior exportador mundial, mas a uma grande distância da Índia que, em 2001, participou com 85% das exportações mundiais de acordo com a Tabela 2.2 ([www.embrapa.gov.br](http://www.embrapa.gov.br)).

Tabela 2.2 – Principais países produtores, importadores e exportadores de óleo de mamona (1000t).

<b>PRODUTORES</b>				
Países	Médias anuais			
	1998	1999	2000	2001
Índia	289,0	293,0	271,0	271,0
China	96,03	109,2	218,1	127,0
<b>Brasil</b>	<b>21,10</b>	<b>21,1</b>	<b>51,9</b>	<b>39,0</b>
Mundo	447,8	463,2	582,5	478,4
<b>IMPORTADORES</b>				
Países	Médias anuais			
	1998	1999	2000	2001
França	41,9	31,7	76,7	nd
EUA	48,5	46,7	40,7	nd
China	43,6	35,7	32,3	nd
Mundo	256,1	242,8	286,7	nd
<b>EXPORTADORES</b>				
Países	Médias anuais			
	1998	1999	2000	2001
Índia	185,7	244,5	238,9	nd
<b>Brasil</b>	<b>17,1</b>	<b>2,6</b>	<b>16,7</b>	<b>nd</b>
Alemanha	5,6	7,3	6,2	nd
Mundo	222,7	273,1	281,1	nd

nd = não definido

No Brasil, de acordo com o Relatório de Acompanhamento de Safras da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento, jul/2001), a produção de soja chegou a 32,3 milhões de toneladas plantadas em 1999 (Tabela 2.3), o que representa em torno de 4,1 milhões de toneladas de óleo, segundo a ABIOVE (Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais – Tabela 2.4).

Tabela 2.3 – Brasil: Área, produção e produtividade de soja.

Ano/Safra	Área (ha)	Produção (t)	Produtividade (kg/ha)
85/86	9.259	13.242	1.430
86/87	9.164	17.028	1.858
87/88	10.681	18.128	1.697
88/89	12.246	23.906	1.952
89/90	11.533	20.179	1.750
90/91	9.743	15.395	1.580
91/92	9.582	19.419	2.027
92/93	10.717	23.042	2.150
93/94	11.502	25.059	2.179
94/95	11.679	25.934	2.221
95/96	10.710	23.190	2.165
96/97	11.381	26.160	2.299
97/98	13.176	31.364	2.380
98/99	12.995	30.765	2.367
99/2000	13.508	32.345	2.395
2000/01	13.685	37.218	2.720

FONTE: Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB)

Tabela 2.4 – Produção de óleo de soja no Mercosul (1000t).

Ano	Paraguai	Uruguai	Argentina	Brasil	Mercosul
1990	32	991	1.144	3.028	5.194
1991	57	967	1.232	2.917	5.173
1992	89	1	1.402	2.646	4.138
1993	91	1	1.466	2.777	4.336
1994	119	3	1.541	3.174	4.836
1995	107	2	1.599	3.530	5.239
1996	119	2	1.838	4.074	6.033
1997	135	2	1.869	3.785	5.790
1998	125	3	2.696	3.559	6.383
1999	123	3	3.093	4.157	7.376

FONTE: Argentina (SAGyP), Uruguai/Paraguai (FAO) e Brasil (ABIOVE).

## 2.2 REAÇÕES DE TRANSFORMAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS

Neste cenário, dentre os processos mais promissores para modificação de óleos e gorduras estão as reações de hidrólise, síntese de ésteres e transesterificação destes materiais na presença de catalisadores químicos ou enzimáticos.

### 2.2.1 O uso de catalisadores químicos

Métodos químicos convencionais para transformação de óleos e gorduras envolvem a produção de triglicerídeos modificados, de importância para indústrias de alimentos e farmacêutica, na presença de catalisadores ácidos ou básicos, sendo o ácido sulfúrico comumente utilizado para esta função. No entanto, ele geralmente leva à formação de subprodutos indesejáveis que podem ser difíceis de serem separados e recuperados do produto (AL SAADI et al., 1981). Neste sentido, o uso de catalisadores ácidos, além de proporcionar baixos rendimentos, possui o inconveniente da ação corrosiva destes compostos, o que implicaria na necessidade de equipamentos específicos para tal fim.

Apesar dos elevados rendimentos obtidos quando da utilização de catalisadores básicos, como hidróxidos alcalinos, as reações devem ser conduzidas somente usando óleos vegetais neutros ou de baixa acidez, pois a presença de ácidos graxos livres neutraliza a ação catalítica. Além do mais, a separação dos sabões formados na reação apresenta algumas dificuldades, que conduzem quase sempre a perdas no rendimento da mistura de ésteres.

#### Aplicações

Pesquisas recentes sobre produção de biodiesel têm sido apresentadas na literatura: na Europa investiga-se os ésteres obtidos a partir do óleo de canola; na Malásia ésteres do óleo de palma; ésteres do óleo de soja também têm características potenciais para uso como diesel alternativo, existindo muitas pesquisas nesta área. O biodiesel já está sendo produzido a partir de resíduo de óleo comestível em escala piloto no Japão. Embora eficiente em termos de rendimento da reação e tempo, a abordagem química para sintetizar alquil-ésteres

de triglicerídeos, possui severos inconvenientes, incluindo dificuldades na recuperação do glicerol, a necessidade de remover o sal residual e a intensiva energia natural do processo. Por outro lado, o uso de biocatalisadores permite a síntese específica de alquil-ésteres, fácil recuperação do glicerol e transesterificação de glicerídeos com grande quantidade de ácido graxo livre (ASANO et al., 2002).

## 2.2.2 O uso de lipases como catalisadores

### Lipases

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3) e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. A hidrólise de triacilgliceróis utilizando lipases é uma reação reversível e, portanto, o equilíbrio pode ser alterado através da variação da concentração de reagentes e/ou produtos. A possibilidade de se deslocar o equilíbrio no sentido da síntese de éster tem sido estudada e comprovada (MACRAE e HAMMOND, 1985). Para a obtenção de altos rendimentos em reações de interesterificação de óleos vegetais é necessário promover o controle da quantidade ótima de água no sistema reacional.

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Antigamente, elas eram predominantemente obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano (FROST e MOSS, 1987). Atualmente, as lipases são produzidas, preferencialmente, a partir de microrganismos devido às facilidades de controle e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução do seu custo de obtenção. Em geral, os microrganismos mais utilizados para produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucor*.

Cabe ressaltar que revisões específicas sobre lipases são bastante frequentes na literatura (FREIRE, 1996; QUEIROZ JUNIOR, 1996; MEIRELLES, 1997; MERÇON, 1998 e OLIVEIRA, 1999).

### Propriedades físico-químicas

As lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente. A maioria das lipases apresenta sua atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 40°C. Sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (MACRAE e HAMMOND, 1985).

Em geral, lipases são ativas em uma ampla faixa de valores de pH, apresentando uma alta atividade na faixa de pH 5-9, com um máximo freqüentemente situado entre 6 e 8 (MACRAE e HAMMOND, 1985).

O peso molecular das lipases pode variar de 20000 a 60000 daltons. Algumas lipases são conhecidas por formar agregados em solução e isto pode explicar o alto peso molecular reportado para algumas lipases parcialmente purificadas (MACRAE e HAMMOND, 1985).

De acordo com OLIVEIRA (1999) que realizou a alcoólise enzimática de óleo de palma em solvente orgânico, a concentração de água e atividade das enzimas foram determinadas periodicamente, visando o acompanhamento destas variáveis e a detecção de possíveis problemas causados nos experimentos pela perda da atividade enzimática. As enzimas foram mantidas em geladeira a 5°C e, no dia anterior ao seu uso, foram colocadas em dessecador e levadas a estufa (50°C) para reativação das mesmas. Constataram, procedendo desta forma, que as enzimas mantiveram suas atividades e o teor de água permaneceu constante durante a realização de todos os experimentos. Ressaltando ainda que, medidas da atividade enzimática no final dos experimentos mostraram não haver nenhuma perda, em todas as condições experimentais estudadas. Na Tabela 2.5 encontram-se os valores de atividade e concentração de água das enzimas obtidas no estudo citado.

Tabela 2.5 – Atividade e concentração de água das lipases utilizadas na alcoólise enzimática em n-hexano (OLIVEIRA, 1999).

Enzima	Atividade Enzimática (U/g)	Concentração de Água (%p/p)
Lipozyme IM	0,179	4,95
Novozym 435	0,124	1,91

### Especificidade

A especificidade é uma característica importante das lipases. De forma geral, quatro tipos de especificidades podem ser definidas. A primeira é a especificidade em relação à classe de lipídeos. A enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo, tri-, di- ou monoglicerídeos, colesterol éster, metil éster, etc. A segunda é a regioespecificidade, que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula. O terceiro tipo é a especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo, na qual a lipase é específica em relação ao comprimento da cadeia ou em relação à presença de dupla ligação nesta cadeia. Finalmente, merece referência a estereoespecificidade, ou seja, algumas lipases catalisam apenas a hidrólise ou a esterificação de um ou dois estereoisômeros (VAN DER PADT, 1993).

### Atuação na interface

Uma característica específica das lipases é a sua capacidade de agir sobre substratos pouco solúveis em água, atuando somente na interface água/lipídeo, diferenciando-se, assim, das esterases, que atuam sobre a ligação éster de substâncias solúveis em água. A atividade catalítica das lipases é sensivelmente diminuída na ausência de uma interface, o que é evidenciado pela baixa conversão na hidrólise de ésteres solúveis em água por elas catalisada (OLIVEIRA, 1999).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a ativação de lipases nas interfaces e elas incluem: a) uma mudança conformacional induzida interfacialmente gerando uma enzima mais ativa; isto é explicado pelo fato de que os sítios de adsorção na interface não são os sítios ativos onde ocorre a reação, desta forma, ao entrar em contato com a interface a lipase assume uma nova conformação espacial; b) uma maior concentração do substrato no local; c) uma orientação mais favorável do substrato; d) um menor grau de hidratação do substrato, tendo em vista que a hidratação das moléculas de lipídeo representa uma proteção às ligações éster. Logo, devido à redução do número das moléculas de água, esta proteção diminui, favorecendo a ação de lipases (YANG e RUSSEL, 1996).

### Aplicações

Mais de 95% dos processos enzimáticos empregados atualmente utilizam hidrolases (proteases, carbohidrolases e lipases), sendo que 5-10% cabem as lipases. As lipases são extremamente versáteis, pois catalisam várias reações e diversos substratos, quando comparadas às outras hidrolases (GANDHI, 1997).

Apesar das lipases serem usadas industrialmente há várias décadas, o número de aplicações e a quantidade de lipases manufaturadas são limitados. Conseqüentemente, a importância econômica das lipases na indústria tem sido muito restrita em comparação com as principais enzimas industriais, tais como proteases e carbohidrolases. O mercado mundial de enzimas industriais foi estimado, em 1994, em cerca de cem milhões de dólares (YANG e RUSSEL, 1996). A partir de 1984, com os estudos pioneiros de KLIBANOV et al. (YANG e RUSSEL, 1996) sobre o uso de enzimas em solventes orgânicos contendo uma pequena quantidade de água ou mesmo sem a adição desta, novas aplicações para estas enzimas começaram a ser exploradas.

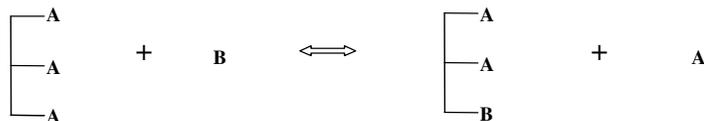
O potencial de aplicação de lipases em processos biotecnológicos para a modificação de óleos e gorduras tem sido objeto de grande interesse nos meios científico, econômico e industrial nos últimos anos (PRAZERES et al., 1993). Surgiu, então, a possibilidade de realização de vários tipos de reações enzimáticas de interesse científico e industrial, tais como síntese de ésteres, hidrólise e interesterificação.

A reação de hidrólise envolve ataque na ligação éster do triglicerídeo na presença de moléculas de água para produzir glicerol e ácidos graxos. A alta especificidade das lipases em relação ao substrato triglicerídeo com relação ao tipo e a posição estereoespecífica do resíduo de ácido graxo propicia um grande número de aplicações dentro da área de alimentos. Aromatizantes para uso em alimentos destinados ao consumo humano e animal têm sido obtidos através da hidrólise parcial de triglicerídeos (MALCATA et al., 1990). Processos comerciais incluem a modificação enzimática da gordura do leite bem como o desenvolvimento de preparações enzimáticas para utilização na produção de queijos.

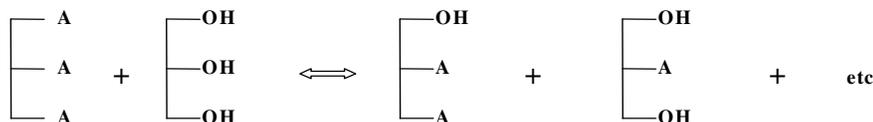
Após a realização de estudos que comprovaram que lipases mantêm sua atividade e estabilidade em solventes orgânicos, novas e importantes aplicações destes catalisadores naturais foram desenvolvidas (OLIVEIRA, 1999).

A reação de esterificação entre polióis e ácidos graxos livres é, em sua essência, a reação inversa da hidrólise do glicerídeo correspondente. As velocidades relativas da reação direta (hidrólise) e inversa (esterificação) são usualmente controladas pela atividade de água da mistura reacional. Exemplos de produtos químicos de alto valor obtidos pelo uso de lipases para esterificação incluem a síntese de ésteres de ácido oléico com álcoois alifáticos primários e secundários e álcoois terpênicos e a produção de ésteres dos álcoois geraniol e mentol com ácido butírico e ácido láurico, respectivamente (OLIVEIRA, 1999). O termo interesterificação refere-se à troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise) ou um éster e outro éster (transesterificação). Nessas reações o triglicerídeo reage com um ácido graxo, um álcool ou outro éster, resultando em um rearranjo dos grupos de ácidos graxos do triglicerídeo de forma a produzir-se um novo triglicerídeo (Figura 2.1). O rearranjo é o resultado de reações concorrentes de hidrólise e esterificação. A concentração ótima de água no meio reacional deve ser suficientemente baixa de forma a minimizar a formação de produtos de hidrólise indesejáveis, mas deve ser suficiente para que a enzima permaneça totalmente ativa (MALCATA et al., 1990).

**Acidólise**



**Alcoólise (Glicerólise)**



**Transesterificação**

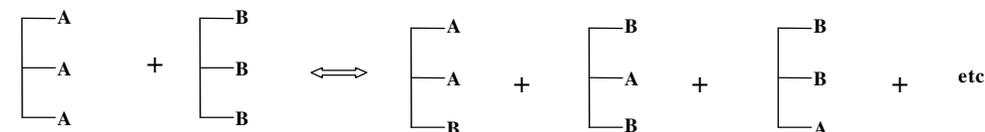


Figura 2.1 – Esquema das principais reações enzimáticas de interesterificação.

A distribuição dos triglicerídeos resultantes da interesterificação é controlada através da concentração relativa de espécies doadoras de grupo acil presentes, permitindo a predição da concentração de cada triglicerídeo no equilíbrio. As reações de interesterificação são utilizadas para alterar as propriedades físico-químicas de um óleo ou gordura de maneira desejada (MALCATA et al., 1990).

A especificidade das lipases pode ser explorada para produzir misturas específicas de triglicerídeos, o que não poderia ser obtido por interesterificação não enzimática, como por exemplo, substitutos da manteiga de cacau a partir de óleos vegetais mais baratos (CHANG et al., 1990).

A ação de lipases sobre ligações éster tem sido estudada e realizada em diferentes sistemas e contextos, com o intuito de explorar as vantagens deste catalisador natural. Regioseletividade, estereoespecificidade, especificidade pelo substrato e baixo consumo de energia são algumas das características que fazem com que os processos catalisados por lipases se tornem mais atrativos do que os processos convencionais não enzimáticos (PRAZERES et al., 1993).

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de otimizar os processos de modificação de óleos e gorduras catalisados por lipases, incluindo a utilização de meios não convencionais, imobilização da enzima, estudos cinéticos e de estabilidade da enzima, modificações químicas e desenvolvimento de bioreatores.

Embora a produção destes compostos possa ser realizada com altos rendimentos e razoável pureza quando da utilização de catalisadores convencionais, as reações catalisadas por lipases apresentam uma série de vantagens que são extremamente importantes à medida que se torna crescente a necessidade de elevados graus de pureza, como, por exemplo, para posterior utilização em cosméticos e alimentos.

A síntese enzimática através das lipases permite a redução da temperatura de reação. Temperaturas elevadas podem levar à degradação de substratos ou produtos, gerando perdas de rendimento e de pureza (ILLANES, 1994).

Outra importante vantagem baseia-se na seletividade das enzimas. As lipases apresentam regioespecificidade em relação a grupos hidroxila primário e secundário e estereoespecificidade reagindo preferencialmente com um isômero ótico (ILLANES, 1994).

As lipases podem também ser utilizadas na produção de compostos difíceis de serem obtidos por rota química devido ao comprimento da cadeia e as insaturações ou que são difíceis de serem separados das fontes naturais.

### Enzimas imobilizadas

Uma das grandes vantagens da catálise em meio não aquoso é que as enzimas são insolúveis em praticamente todos os solventes orgânicos. Contudo, quando enzimas livres estão suspensas em um solvente orgânico, elas tendem a agregar-se e prendem-se às paredes do reator, principalmente quando água é adicionada a este sistema para aumentar a atividade enzimática. Este problema pode ser solucionado através da imobilização de enzimas em suportes sólidos. A imobilização da enzima também pode minimizar o efeito desnaturante de muitos solventes orgânicos sobre a maioria das enzimas, através de um material hidrofílico,

que permite a manutenção de um microambiente de alta atividade de água em torno das moléculas de enzima (ILLANES, 1994).

A utilização de lipases imobilizadas facilita o desenvolvimento de processos contínuos, em escala comercial, ao contrário de operações em pequena escala, que geralmente empregam enzimas livres. O uso de reatores com lipase imobilizada também conduz a um decréscimo no potencial para a contaminação do produto com lipase residual. Isto permite a reutilização da lipase, resultando em processos mais econômicos. A imobilização geralmente aumenta a estabilidade térmica e química da lipase, podendo aumentar a resistência aos efeitos desnaturantes de vários solventes orgânicos, permitindo um melhor controle do processo e da qualidade do produto (MALCATA et al., 1990). Além disso, facilita a separação do biocatalisador do sistema de reação para posterior reutilização (ILLANES, 1994 e CASTRO, 1995).

A aplicação de enzimas imobilizadas como catalisadores de reações envolvendo triglicerídeos apresenta, desta forma, uma série de vantagens, tais como: maior estabilidade, necessidade de baixos teores de água e possibilidade de reutilização das enzimas em processos contínuos ou em batelada (NOVO NORDISK, 1992).

A baixa concentração de água é importante nas reações de esterificação e interesterificação catalisadas por lipases para que o equilíbrio seja deslocado no sentido da formação dos produtos.

As lipases diferem não só quanto ao tipo de reação catalítica (atuam na interface óleo-água), mas também quanto ao tipo de imobilização.

CARTA et al. (1995) estudaram reações de esterificação utilizando lipase de *Candida cylindracea* imobilizada em suporte de nylon em reatores contínuos e em batelada. Os autores verificaram que a enzima imobilizada foi efetiva na síntese de etilpropionato, isoamilpropionato e isometilbutirato. Utilizando etanol dissolvido em n-hexano como substrato, a velocidade específica máxima de esterificação foi de 0,02 mol/h.g de proteína imobilizada, mas a enzima só se mostrou estável quando a concentração de substrato era inferior a 0,2 molar. Quando álcool isoamílico dissolvido em hexano foi utilizado como substrato, velocidades da ordem de 0,085

moles/h.g de proteína imobilizada foram observadas, além do que a enzima permaneceu estável em concentrações maiores de substrato.

MUSTRANTA et al. (1993) utilizaram lipases de *Candyda cylindracea*, *Aspergillus niger* e *Pseudomonas fluorescens* imobilizadas em resina de troca iônica e terra diatomácea por adsorção, utilizando tampão ou hexano como solvente. As preparações enzimáticas foram empregadas na esterificação de ácido láurico com diferentes álcoois. Os autores observaram que todas as preparações de enzimas imobilizadas foram capazes de catalisar a síntese de metil, etil e amil lauratos.

ISO et al. (2001) compararam o desempenho da lipase de *Pseudomonas fluorescens* livre e imobilizada na produção de ésteres, usando trioleína e óleo de girassol e propanol e butanol como substratos. Com o uso de propanol e enzima imobilizada a conversão chegou a 100% em 10 horas, enquanto que para a enzima livre obteve-se 90% em 25 horas, a temperatura foi mantida em 50°C. Os autores constataram que para o butanol, a reação teve maior conversão em um menor tempo com o uso de enzima imobilizada.

### Estudos cinéticos

O estudo cinético de reações catalisadas por lipases é dificultado pela não afinidade entre o substrato e a fase aquosa. Normalmente, uma emulsão do substrato em uma fase aquosa contínua é utilizada e, alguns fatores irão afetar as propriedades interfaciais, influenciando as constantes cinéticas encontradas. A análise de uma cinética enzimática, geralmente, é realizada para a enzima e os substratos dissolvidos de forma homogênea. No caso das reações catalisadas por lipases este tratamento deve considerar a interação entre a enzima e o substrato insolúvel na interface. A concentração efetiva de substrato é difícil de ser determinada, pois somente aquelas moléculas que estão na interface estão disponíveis para a enzima (OLIVEIRA, 1999).

STAMATIS et al. (1993), estudando a cinética da reação de esterificação entre ácido láurico e (-)-mentol catalisada por lipase de *Penicillium simplicissimum* em um sistema de micela reversa formado por AOT/isooctano, propuseram o mecanismo

cinético do tipo *Ping-Pong bi-bi*, sendo que os parâmetros cinéticos obtidos são aparentes visto que a determinação de parâmetros cinéticos verdadeiros deve levar em consideração a concentração real dos substratos.

CHULALAKSANANUKUL et al. (1993) estudaram o mecanismo cinético da reação de esterificação catalisada por lipase de *Mucor miehei* imobilizada em resina aniônica (Lipozyme IM) tendo o ácido oleico e etanol como substratos e hexano como solvente. Os autores propuseram também o mecanismo *Ping-Pong bi-bi*, mas com inibição por excesso de etanol.

### Efeitos dos solventes orgânicos

A catálise enzimática era considerada um processo viável somente em fase aquosa. No entanto, pesquisas recentes demonstraram que as enzimas podem ser ativas em solventes orgânicos, solventes gasosos e fluidos supercríticos (ILLANES, 1994).

O estudo de enzimas em meio orgânico evoluiu significativamente nos últimos vinte anos. Tais estudos começaram com a investigação do comportamento das enzimas em sistemas predominantemente aquosos contendo pequenas quantidades de solventes orgânicos miscíveis em água. Posteriormente, desenvolveram-se sistemas enzimáticos para misturas de duas fases (aquosa/orgânica) e, em seguida, em meio orgânico contendo uma fase aquosa dispersa (microemulsões). Atualmente, observa-se um grande número de aplicações utilizando suspensões enzimáticas em solventes orgânicos praticamente anidros (OLIVEIRA, 1999).

Uma das principais vantagens da catálise enzimática em meio orgânico é a possibilidade de efetuar reações que utilizam substratos pouco solúveis em água. Além disso, é possível deslocar o equilíbrio termodinâmico de reações que não ocorreriam em meio aquoso, através da extração dos substratos e/ou produtos para a fase aquosa e/ou orgânica ou através da diminuição da quantidade de água do meio reacional. Desta forma, reações como a esterificação e a interesterificação tornam-se viáveis industrialmente. Segundo MONOT (1994), a catálise enzimática em meio orgânico apresenta como principais vantagens:

- Aumento da disponibilidade de substratos pouco solúveis em água;
- Deslocamento do equilíbrio das reações;
- Diminuição do número de reações indesejáveis;
- Simplificação dos procedimentos de recuperação do produto e do biocatalisador;
- Controle da estereoseletividade das reações enzimáticas;
- Diminuição do risco de contaminação microbiana;
- Redução de eventuais inibições por substratos e produtos;
- Aumento da estabilidade da enzima.

Por outro lado, estes sistemas também apresentam algumas desvantagens, como: desnaturação e/ou inibição do catalisador na presença do solvente orgânico, aumento da complexidade do sistema de reação e o aumento de custos adicionais dos solventes, co-solventes ou surfactantes (ILLANES, 1994).

Acredita-se, atualmente, que as enzimas são cataliticamente ativas em meio orgânico porque elas permanecem na sua conformação original. A incapacidade da proteína de se desdobrar em meio não aquoso deve-se em parte, ao fato das interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima serem aumentadas em solventes orgânicos, devido à baixa constante dielétrica da maioria dos solventes e também ao aumento do número de ligações hidrogênio intramoleculares. A integridade estrutural das proteínas em meio não aquoso tem sido verificada através de experimentos incluindo ressonância nuclear magnética do estado sólido e cristalografia de raios X (YANG e RUSSEL, 1996).

DOSSAT et al. (2002) analisaram a transesterificação realizada em sistemas usando solvente e sem solvente. Utilizaram como substratos o ácido oléico (óleo de girassol) e butanol e lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei*, concluíram que no sistema livre de solvente somente 60% do ácido oléico foi convertido em éster, já no sistema com n-hexano 95% foi convertido.

A natureza do solvente orgânico é um fator importante a ser considerado na catálise enzimática em meio não aquoso, pois o solvente não apenas afeta a atividade e a estabilidade da enzima, como também modifica a sua especificidade.

Os solventes menos nocivos às enzimas são aqueles mais hidrofóbicos, pois interagem menos com a água necessária para o funcionamento da enzima. Solventes hidrofílicos, ou seja, solventes que contém maior quantidade de grupos polares ou centros capazes de formar pontes de hidrogênio, tendem a retirar a água essencial das proximidades da enzima, acarretando a perda da atividade enzimática. ZAKS e KLIBANOV (1985) constataram que as enzimas suspensas em solventes hidrofóbicos requerem uma quantidade de água substancialmente menor para obtenção de sua atividade máxima quando comparadas àquelas suspensas em solventes hidrofílicos. De acordo com resultados experimentais, pôde-se concluir que a atividade enzimática em meio orgânico é primeiramente influenciada, não pelas interações do solvente com a enzima propriamente dita, mas pelas interações com a água ligada à enzima. Para uma dada quantidade de água presente no solvente, a atividade enzimática nos solventes hidrofóbicos é muito maior que nos seus correspondentes hidrofílicos (KLIBANOV, 1997).

Os critérios para determinação da hidrofobicidade de um solvente estão sujeitos a controvérsias. Os mais importantes indicadores de hidrofobicidade são: o parâmetro de Hildebrand ( $\delta$ ), a constante dielétrica ( $\Sigma$ ), o momento dipolar ( $\mu$ ) e o coeficiente de partição (P) (ILLANES, 1994). A melhor classificação proposta foi baseada no  $\log P$ , sendo P o coeficiente de partição do solvente em uma mistura octanol/água. O coeficiente de partição (P) de um composto é usualmente definido como a razão entre suas concentrações na fase orgânica e aquosa. Para obter elevadas concentrações de produto é essencial utilizar um solvente orgânico no qual o coeficiente de partição do produto seja alto. Isto implica em uma eficiente extração do produto para a fase orgânica, o que produz uma conversão mais elevada. Os solventes mais adequados são os que apresentam  $\log P$  maior que 2. Segundo CARTA et al. (1995), a biocatálise de reações de síntese, tais como esterificações, é geralmente considerada possível em solventes imiscíveis em água que apresentam  $\log P$  maior que 4. Exemplos de  $\log P$  de alguns solventes orgânicos estão ilustrados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 – LogP de alguns solventes orgânicos.

SOLVENTE	LogP	SOLVENTE	LogP
Triglima	-1,9	Clorofórmio	2,0
Diglima	-1,3	2-4-dimetil-3-pentanol	2,3
N-N-Dimetilformamida	-1,0	3-etil-3-pentanol	2,3
Monoglima	-0,75	2-metil-2-hexanol	2,3
4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	-0,34	Tolueno	2,5
Acetonitrila	-0,33	Trifluorotricloroetano	2,8
Acetona	-0,23	Butiléter	2,9
1-metil-2-pirrolidona	-0,20	2,6-dimetil-4-heptanol	3,4
2-butanona	0,28	Hexano	3,5
Diclorometano	0,60	Pentiléter	3,9
2-metil-2-propanol	0,79	Isoamiléter	4,0
2-pentanona	0,80	1-octeno	4,2
3-pentanona	0,80	Feniléter	4,3
Etiléter	0,85	Isooctano	4,5
1,2-dicloroetano	1,2	1-noneno	4,7
2-metil-2-butanol	1,3	Hexiléter	5,0
4-metil-2-pentanona	1,3	Nonano	5,1
Tert-butilmetiléter	1,4	Decano	5,6
2-metil-2-pentanol	1,8	1-dodecano	6,2
3-metil-3-pentanol	1,8	Dodecano	6,6
Isopropiléter	1,9		

FONTE: JANSSEN et al. (1993).

Contudo, esta classificação não pode ser aplicada para todas as enzimas, tendo em vista que ela não considera as interações específicas entre a enzima e o solvente, que são função da constante dielétrica do solvente. Admite-se que a diminuição da constante dielétrica do solvente permite o aumento das interações eletrostáticas entre os resíduos ionizáveis da molécula de enzima, o que pode causar uma redução da flexibilidade interna da proteína. Considerando que a mobilidade molecular é essencial para a atividade catalítica da enzima, uma redução na sua flexibilidade é normalmente acompanhada por uma diminuição da atividade enzimática. A modificação do valor da constante dielétrica também altera o valor de pKa dos resíduos ionizáveis da superfície da proteína. Se essa modificação ocorrer

no sítio ativo ou próximo a ele, pode haver a alteração da ligação e/ou da conversão dos substratos e, quando a mudança na constante dielétrica é drástica, a estrutura tridimensional da enzima pode ser afetada. É importante ressaltar que a adição de substratos e a formação de produtos ao longo da reação podem modificar a hidrofobicidade do meio e, conseqüentemente, o teor de água ao redor da enzima (MONOT, 1994).

Além do efeito dos solventes na atividade, na estabilidade e na especificidade da enzima ou nas suas relações com a água, deve-se também considerar o efeito do solvente na constante de equilíbrio das reações. A condição de equilíbrio será determinada pelas interações entre os reagentes, os produtos e o solvente; a natureza e o comportamento de qualquer catalisador influenciará apenas a velocidade com que o sistema atinge o equilíbrio (HALLING, 1990-a).

É possível prever o efeito do solvente sobre o equilíbrio utilizando dados sobre a distribuição dos componentes nas fases do sistema líquido-líquido (HALLING, 1990-b). Em um sistema bifásico, substratos e produtos irão se dividir entre as duas fases (aquosa-orgânica).

JANSSEN (1993) estudaram a esterificação do glicerol e ácido decanóico em vários solventes, incluindo hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, éteres, cetonas, aldeídos, álcoois terciários e hidrocarbonetos halogenados. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que altas frações molares de monoéster e baixas frações de triéster são obtidas em solventes polares ( $\log P < 1$ ). A adição de solventes menos polares provoca uma diminuição das frações molares de monoéster e um aumento das frações molares de triéster.

KUO e PARKIN (1996) também observaram que a predominância do produto formado em misturas de reação de multiprodutos, como na reação entre o glicerol e o ácido undecanóico, está relacionada com a similaridade da polaridade do solvente usado. Assim sendo, a produção de monoglicerídios ( $\log P = 2,5$ ) é favorecida em meio polar, enquanto que a de triglicerídeo ( $\log P = 13,7$ ) em meio apolar.

No entanto, segundo JANSSEN (1993),  $\log P$  não é o único parâmetro que controla a distribuição do produto. A solubilidade da água no solvente também é um

parâmetro útil para a seleção do solvente. Como esta solubilidade não era conhecida para todos os solventes utilizados, os autores a estimaram através do método de contribuição de grupos UNIFAC, que calcula os coeficientes de atividade nas duas fases. Observou-se, então, que há uma razoável correlação entre o logP e a solubilidade da água no solvente. A adição de um solvente polar (solvente com uma alta solubilidade em água) resultou em uma elevada concentração de monoacilglicerol, enquanto que solventes apolares, apresentaram maiores frações molares dos di- e triglicerídeos.

O desenvolvimento da catálise em meio orgânico evidenciou que a quantidade de água realmente necessária para propiciar a atividade enzimática é muito pequena. Portanto, a existência de uma fase aquosa definida, mesmo que em pequena proporção, não é um pré-requisito para a eficiência da catálise. Sendo assim, seria tecnologicamente mais atrativo dispensar o uso de solventes orgânicos e realizar a reação enzimática apenas com a mistura de substratos. Esta possibilidade, se viável, combina a precisão da catálise biológica com os altos níveis de produtividade alcançados nos melhores métodos convencionais. Entre algumas das vantagens deste sistema pode-se citar: evita problemas de separação, de toxicidade e de inflamabilidade dos solventes orgânicos, diminui o custo inicial do produto e permite a recuperação do produto sem as etapas de purificação ou evaporação e a utilização dos substratos em altas concentrações (SELMÍ et al., 1997). Geralmente, pode-se prever algumas dificuldades imediatas para implementação de um sistema livre de solvente: minimização da resistência a transferência de massa, homogeneidade do meio reacional, a mistura reacional deve ser e permanecer líquida durante o curso do processo e deve estar presente uma ação que desloque o equilíbrio no sentido do término da reação.

### Influência da água

Um fato bem estabelecido em todos os estudos sobre utilização de enzimas em meio orgânico é que a quantidade de água ligada à enzima é o fator determinante para a expressão de suas propriedades, como, por exemplo, a atividade, a

estabilidade e a especificidade. Embora a atividade de água em um sistema enzimático típico em meio orgânico seja muito baixa (em torno de 0,01% p/v), pequenas variações no conteúdo de água podem provocar grandes modificações na atividade enzimática. As enzimas são praticamente inativas em sistemas completamente anidros. A água, quando adicionada a estes sistemas, distribui-se entre o solvente e a enzima. A atividade enzimática é dependente da quantidade de água associada à enzima e em menor grau ao conteúdo total de água existente no sistema. Contudo que uma quantidade mínima essencial esteja ligada à enzima, sua atividade é mantida.

Admite-se que a enzima requer uma pequena camada de água, que atua como componente primário do microambiente da mesma, atuando como um tampão entre a superfície da enzima e o seio do meio reacional. Assim sendo, a biocatálise em fase orgânica é possível, desde que se conserve esta pequena quantidade de água indispensável à enzima. A quantidade de água requerida para a catálise orgânica depende da enzima utilizada. Segundo ILLANES (1994), cada enzima em particular deve ser examinada a vários níveis de hidratação em solventes orgânicos e é muito provável que enzimas que não exibiram atividade em determinado solvente, tenham sido empregadas em níveis sub-ótimos de hidratação.

A adição de água a preparações enzimáticas sólidas em solventes orgânicos pode aumentar a atividade enzimática através do aumento da polaridade e da flexibilidade do sítio ativo da enzima. No entanto, excesso de água facilita a agregação da enzima e pode provocar um decréscimo de sua atividade. O mecanismo de agregação da enzima, induzido pela água, em solvente orgânico, ainda não está totalmente esclarecido; acredita-se que a formação de ligações dissulfeto intermoleculares seja uma das causas deste processo. A quantidade de água necessária para manutenção da estrutura enzimática varia com a natureza da enzima (YANG e RUSSEL, 1996).

As propriedades físico-químicas exibidas por uma enzima estão relacionadas direta ou indiretamente ao papel da água nas interações não covalentes (eletrostáticas, pontes de hidrogênio, van der Waals e hidrofóbicas), as quais ajudam a manter a conformação cataliticamente ativa da enzima (ILLANES, 1994).

A hidratação dos grupos carregados e polares das moléculas de enzima parece ser um pré-requisito para a catálise enzimática. É possível que na ausência de água, esses grupos interajam produzindo uma conformação estrutural inativa. A função da água na manutenção da atividade enzimática em meio não aquoso parece estar relacionada com a sua capacidade de formar ligações de hidrogênio com esses grupos funcionais, protegendo, portanto, dieletricamente as interações eletrostáticas entre os grupos ionizados e neutralizando as interações dipolo-dipolo entre unidades peptídicas e grupos vizinhos polares da proteína (LANGONE, 1998).

As interações eletrostáticas, tais como pontes salinas e interações dipolo-dipolo, podem ser preponderantes no controle do comportamento catalítico das enzimas em solvente orgânico. Essa hipótese é sustentada pela verificação do aumento da atividade enzimática após a adição de várias substâncias formadoras de ligações de hidrogênio, tais como glicerol, etileno-glicol e formamida, ao solvente. Foi constatado que solventes contendo poliólcoois, diminuem a tendência de ruptura das ligações de hidrogênio, que desempenham um importante papel na manutenção da estrutura terciária da lipase (MALCATA et al., 1990). Neste contexto, vários estudos visando a estabilização de lipases através da adição de glicerol são encontrados na literatura. Sais de cálcio também têm sido empregados na estabilização de várias lipases, devido a sua capacidade de formar ligações iônicas com dois resíduos diferentes de aminoácidos da cadeia protéica. A maior desvantagem na adição de sais de cálcio ao meio reacional é a formação de sabões insolúveis com os ácidos graxos livres.

É previsível que a estabilidade da proteína em ambiente não aquoso deva ser sensivelmente diferente daquela em água. Desde que as moléculas de água que circundam uma enzima em solução aquosa contribuem para as principais forças intermoleculares que estabilizam a conformação terciária, incluindo interações do tipo van der Waals, pontes salinas e ligações de hidrogênio, a remoção dessa água pode alterar a estabilidade da enzima.

O aumento da termoestabilidade enzimática em meio não aquoso tem sido amplamente comprovado para a maioria das enzimas. A remoção de água ligada à proteína aumenta a força das ligações de hidrogênio intramoleculares e das pontes

salinas, que estabilizam as proteínas nas suas conformações originais, conferindo-lhes rigidez estrutural. A desnaturação das enzimas através do calor requer ampla mobilidade conformacional, o que envolve água livre. Além disso, a eliminação da água do sistema dificulta a ocorrência de um número de reações químicas indesejáveis, as quais são promovidas através do aumento da temperatura, tais como reações de hidrólise, de oxidação, de isomerização, entre outras, que promovem a inativação da proteína em soluções aquosas (YANG e RUSSEL, 1996). Segundo KLIBANOV (1989), subtilisina e lipase pancreática suína são mais estáveis em temperaturas superiores à 100°C durante horas quando mantidas em solventes orgânicos anidros, enquanto que, em meio aquoso, as mesmas tornam-se inativas rapidamente, mesmo quando submetidas a temperaturas muito menores. Conclui-se, portanto, que a termoestabilidade decresce quando o conteúdo de água no solvente aumenta. Neste trabalho, a lipase estudada apresentou-se cataliticamente ativa em solventes orgânicos a 100°C, indicando que além do aumento na termoestabilidade, ela permanece ativa em condições de reações mais severas.

Da mesma maneira, a água desempenha um papel crucial nas interações enzima-substrato, podendo, então, alterar a especificidade das enzimas em meio não aquoso. A rigidez estrutural conferida à enzima em meio orgânico pode permitir o controle do acesso do substrato ao sítio ativo da enzima e o posicionamento do substrato em relação ao sítio ativo pode ser diferente dependendo do meio reacional (MONOT, 1994).

## **2.3 ALCOÓLISE DE ÓLEOS VEGETAIS**

### **2.3.1 Introdução**

Ésteres obtidos a partir de álcoois e ácidos graxos possuem muitas aplicações e, aqueles obtidos a partir de ácidos de cadeia longa (12-20 átomos de carbono) e álcoois de cadeia curta (3-8 átomos de carbono) têm sido largamente utilizados em indústrias de alimentos, detergentes, cosméticos e farmacêutica (CARTA et al., 1995). Para estas aplicações, ésteres naturais, tais como aqueles derivados do óleo

de baleia, cera de carnaúba e óleo de jojoba têm sido utilizados. No entanto, estes óleos são caros e não estão disponíveis em grandes quantidades. Desta forma, é desejável desenvolver métodos para a produção de tais ésteres a partir de matérias-primas mais baratas e mais largamente disponíveis (MARTINEZ et al., 1988).

Métodos químicos convencionais para a produção destes ésteres envolvem sua síntese a partir de um álcool e um ácido carboxílico na presença de um ácido mineral como catalisador. Ácido sulfúrico é comumente utilizado para esta função; infelizmente, ele geralmente leva à formação de subprodutos indesejáveis que podem ser difíceis de serem separados e recuperados do produto (AL SAADI e JEFFREYS, 1981). Além disso, neste caso, parte-se de um substrato (ácido graxo) que possui, também, alto valor. Surge, então, o interesse em realizar a reação de alcoólise enzimática em solvente orgânico, utilizando um óleo vegetal, de baixo custo, como matéria-prima, obtendo-se uma mistura de ésteres.

Estudos têm mostrado a possibilidade de uso de um método alternativo para a produção de ésteres através do uso de enzimas, tais como lipases, como catalisadores (ABRAMOWICZ e KEESE, 1989; BARZANA et al., 1989; BRUNT, 1986; DORDICK, 1989; STEVENSON e STORER, 1991; YAMANE, 1988; YAMANE et al., 1990). A crescente ênfase no uso de biocatalisadores devido as suas propriedades favoráveis, tais como condições amenas e ambientalmente compatíveis de reação e sua alta especificidade, têm resultado num aumento do uso de enzimas imobilizadas, pois as interações entre o suporte e a enzima podem alterar favoravelmente as propriedades físicas e químicas da enzima (BASRI et al., 1996).

### **2.3.2 Vias de obtenção**

Independente de o processo ser realizado em meio convencional, dois processos são conhecidos para produção de ésteres de ácidos graxos: o primeiro e mais utilizado devido a suas inúmeras vantagens é a alcoólise de óleos e gorduras com um álcool (etanol ou metanol). O segundo método consiste em um processo em

duas etapas: a primeira é a hidrólise de óleos e gorduras, onde os ácidos graxos resultantes são, então, esterificados com um álcool (Figura 2.2).

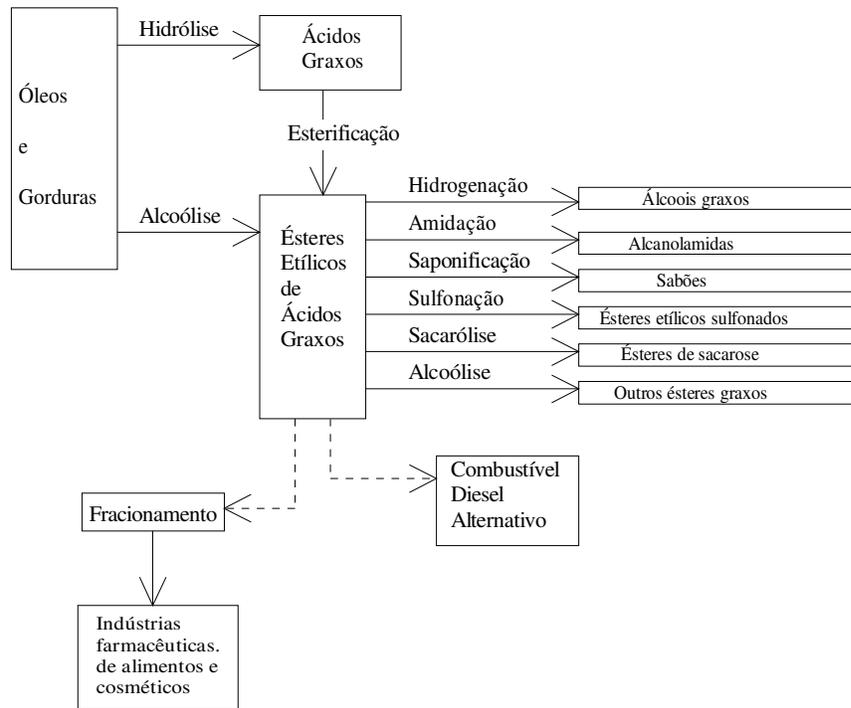
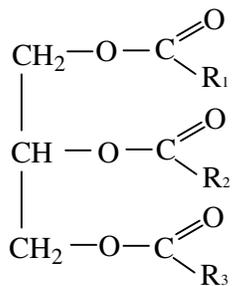


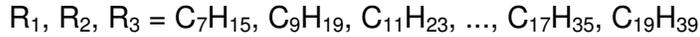
Figura 2.2 - Diagrama esquemático da produção e usos de ésteres etílicos (OLIVEIRA, 1999).

### Catálise Química

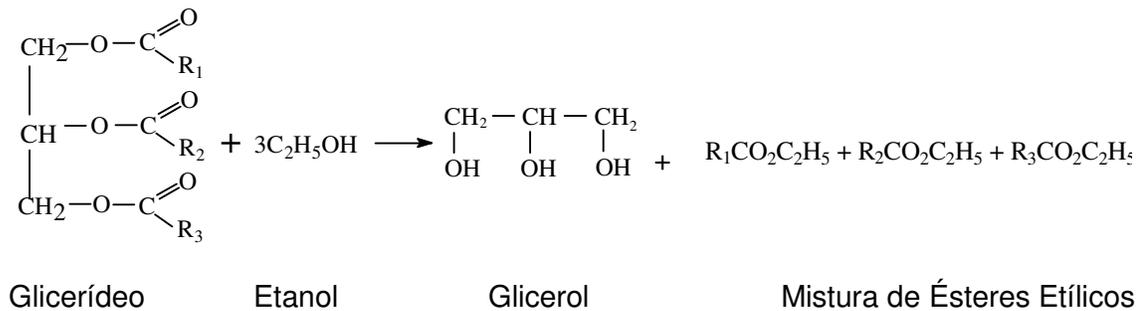
Os óleos vegetais ou glicerídeos são produtos naturais constituídos da mistura de ésteres derivados do glicerol, cuja cadeia de ácidos graxos contém de 8 a 20 átomos de carbono:



onde:



O processo convencional de alcoólise consiste basicamente em introduzir a carga de óleo vegetal a um reator, dotado de agitador e com sistema de aquecimento indireto, onde os glicerídeos são submetidos ao ataque por metanol ou etanol, em excesso, na presença de catalisadores ácidos ou básicos (OLIVEIRA, 1999):



A mistura resultante, principalmente ésteres, glicerina e catalisador, constitui-se de duas fases distintas que são separadas no próprio reator. A fase superior desta mistura representa os ésteres, enquanto a camada inferior é formada essencialmente de glicerina, obtida no curso da reação em rendimentos de 10-12% sobre o peso do óleo e que pode ser separada por decantação. No entanto, antes da filtração, a mistura de ésteres deve ser lavada com água quente de modo a eliminar traços do catalisador, de sabão, no caso de uso de catalisadores básicos, ou de glicerina residual.

Os equipamentos necessários para este processo incluem reatores, trocadores de calor, bombas de alimentação e de descarga, tanques de decantação, centrífugas, bombas de vácuo, destiladores e condensadores, filtros e outros.

O emprego de catalisadores ácidos além de proporcionar baixos rendimentos e longos tempos de reação quando comparado ao uso de catalisadores básicos, possui o inconveniente da ação corrosiva destes compostos, o que implicaria na necessidade de equipamentos específicos para este uso.

Apesar dos elevados rendimentos obtidos na esterificação dos glicerídeos em presença de catalisadores básicos, como os hidróxidos alcalinos, as reações devem ser conduzidas somente usando óleos vegetais neutros, ou de baixa acidez, não superior a 0,5% (p/p) (índice de acidez de 1), pois a presença de ácidos graxos livres neutraliza a ação catalítica. O teor máximo de água recomendado para aplicação de catalisadores alcalinos é de 0,06% (p/p) (FUKUDA et al., 2001; MA, F. e HANNA, M. A., 1999; ZHANG et al, 2003). Além do mais, a separação posterior dos sabões formados na reação apresenta algumas dificuldades, que conduzem quase sempre a perdas no rendimento da mistura de ésteres (MONACO, 1985).

A estequiometria da reação de transesterificação requer 3 moles de álcool para 1 mol de triglicerídeo, obtendo-se 3 moles de ésteres e 1 mol de glicerol. Uma razão molar óleo-etanol maior resulta em uma maior conversão em ésteres num curto tempo. Na transesterificação do óleo de amendoim com etanol, uma razão molar de 1:6 liberou significativamente mais glicerol que uma razão molar de 1:3 (FEUGE e GROSE, 1949). FREEDMAN et al. (1984) estudaram o efeito da razão molar (1:1 a 1:6) na conversão de óleos vegetais em ésteres. Os óleos de soja, girassol, amendoim e algodão tiveram comportamento similar, mas com maior conversão na razão 1:6. Assim, razão molar de 1:6 é normalmente empregada em processos industriais para obter metil éster com rendimento superior a 98% (FEUGE e GROSE, 1949 e FILLIERES et al., 1995).

Na metanólise do óleo de mamona a reação ocorreu mais satisfatoriamente entre 20-35°C, com razão molar de 1:6 a 1:12 e 0,0005 a 0,35%p/p de NaOH (SMITH, 1949). Para a transesterificação do óleo de soja refinado e metanol (1:6) usando 1%p/p de NaOH, três diferentes temperaturas foram usadas. Após 0,1h, a conversão em ésteres foi de 94, 87 e 64% para 60, 45 e 32°C, respectivamente. Após 1h, a conversão foi idêntica para 60 e 45°C e diminuiu ligeiramente em 32°C (FREEDMAN et al., 1984).

MUNIYAPPA et al. (1996) estudaram a redução do tempo de reação e da concentração de catalisador, sem que isso afetasse significativamente a conversão da reação. Usaram metanol (1:30) e óleo de soja, concluíram que a redução na concentração de catalisador (NaOH) de 0,5 para 0,05%p/p não teve efeito

significativo na conversão em metil éster em 90 min de reação. Com relação ao tempo de reação, observaram que com 0,10%p/p de NaOH a redução do tempo de reação foi de 90 para 5 min, sem efeito significativo na conversão. Estudos de otimização concluíram que maior conversão (98%) de triglicerídeos em metil ésteres pôde ser obtida com 0,10%p/p de catalisador após 5-10 min de reação.

Excelentes revisões acerca do emprego de catalisadores químicos na alcoólise de óleos vegetais encontram-se disponíveis na literatura (FUKUDA et al., 2001; MA, F. e HANNA, M. A., 1999; SRIVASTAVA, A. e PRASAD, R., 2000; ALTIN et al., 2001; ZHANG et al, 2003).

### Catálise Enzimática em Solvente Orgânico

Nos últimos anos, o uso de lipases como catalisadores para transformação de ácidos graxos tem sido largamente investigado. Neste sentido, a principal aplicação de lipases tem sido modificar as composições de ácidos graxos de triglicerídeos por interesterificação. Com relação à hidrólise de triglicerídeos e síntese direta de ésteres, resultados têm sido descritos. Surpreendentemente, pouca atenção tem sido dada ao uso direto de lipases na alcoólise de triglicerídeos. Neste sentido, poucos são os resultados apresentados na literatura referentes a esta reação. MITTELBAACH (1990) realizou a alcoólise de óleo de girassol, usando etanol, metanol e n-propanol como substrato em diversas razões molares e éter de petróleo como solvente. As reações enzimáticas foram iniciadas adicionando a lipase à mistura de substratos e solvente. A mistura foi colocada em um erlenmeyer fechado e levada a um shaker à 200 rpm a diferentes temperaturas por 5 horas.

No entanto, nenhum estudo sistemático foi realizado. Apenas a influência do álcool utilizado e da temperatura (25-45°C) na conversão da reação foi determinada. Conversões de 82% em ésteres foram obtidas utilizando etanol à 45°C e Lipozyme IM como catalisador. O autor termina por concluir que devido à toxicidade do solvente orgânico e dificuldade de separação dos ésteres e do glicerol no final da reação, novas metodologias devem ser estudadas. A alcoólise enzimática sem adição de solventes poderia ser uma alternativa interessante, não fosse a insolubilidade dos triglicerídeos em álcoois de cadeia curta. Baseado nestes fatos, é

de grande interesse a aplicação de outros tipos de solventes que possibilitem o uso destes compostos em indústrias de alimentos e farmacêuticas, agregando altos valores a estes produtos.

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

Conforme apresentado, pode-se concluir que a utilização de um determinado tipo de óleo vegetal requer o estabelecimento de condição experimental específica, visando o alcance de melhores conversões, cabendo, para tanto, a este trabalho uma exploração mais abrangente no que diz respeito à modificação dos óleos de mamona e soja.

## 2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na revisão da literatura apresentada no decorrer deste capítulo, procurou-se relatar o estado da arte no qual o presente trabalho se insere. Para isto, através de uma seqüência lógica, as reações de modificação de óleos vegetais foram expostas, mostrando a evolução obtida neste tema ao longo dos últimos anos, desde a utilização de solventes convencionais, passando por uma explanação sobre lipases e aplicação de solventes orgânicos.

Tendo como base a revisão da literatura, alguns pontos relevantes devem ser considerados. Com relação à aplicação de solventes orgânicos a alcoólise

enzimática de óleos vegetais, além de poucos trabalhos estarem disponíveis na literatura com relação aos sistemas estudados, uma lacuna pode ser verificada com relação à realização de um estudo sistemático, principalmente no que se refere à influência das variáveis do processo e cinética da reação.

Levando-se em conta a disponibilidade de matérias-primas nacionais, a relevância na obtenção de produtos de alto valor agregado a partir destes compostos e das lacunas existentes no tema, configurou-se a proposta do presente trabalho.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Baseado nas perspectivas do uso de lipases como catalisadores na transformação de óleos vegetais, surgiu o interesse particular na realização de reações de alcoólise enzimática de óleos vegetais para produção de uma mistura de ésteres, de muitas aplicações industriais. Além do estudo que permitisse a maximização da conversão e avaliação dos efeitos das principais variáveis do processo, a cinética desta reação foi também estudada, uma vez que uma grande lacuna referente a este assunto é encontrada na literatura, possibilitando, posteriormente, o uso destas informações num melhor entendimento do processo.

A realização dos experimentos em meio convencional (catalisador químico e enzimático) apresenta relevância científica e tecnológica, uma vez que poucos estudos relacionados a esta reação em solvente orgânico são apresentados na literatura.

Neste item serão listados os materiais e métodos analíticos utilizados no desenvolvimento das duas etapas do trabalho – alcoólise de óleos vegetais utilizando catalisador químico (NaOH) e lipases imobilizadas comerciais Lipozyme IM e Novozym 435 (Novozymes).

#### Caracterização química dos óleos

Óleo de soja comercial foi utilizado sem nenhum tratamento prévio. A composição química do óleo de soja foi determinada usando um cromatógrafo gasoso (HP5890) com detector de ionização de chama. As condições utilizadas foram: H<sub>2</sub> como gás de arraste; coluna de polietileno glicol modificada (FFAP2-25m x 0,20mm i.d. x 0,30µm); temperatura da coluna, 180-210°C (2°C/min); temperatura do injetor, 250°C e temperatura do detector, 280°C. Na Tabela 3.1 são listados os percentuais de ácidos graxos obtidos para o óleo de soja.

Tabela 3.1 – Percentuais de ácidos graxos para o óleo de soja (realizado no Laboratório Óleos e Gorduras, Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP).

Ácido Graxo	Composição (%)
Ácido palmítico (C16:0)	11,3 ± 0,01
Ácido esteárico (C18:0)	3,48 ± 0,03
Ácido oléico (C18:1)	23,63 ± 0,11
Ácido linoléico (C18:2)	54,71 ± 0,07
Ácido linolênico (C18:3)	6,88 ± 0,01

Com base na composição química, o peso molecular médio do óleo de soja e de seus ésteres etílicos foram determinados como 835g/gmol para o óleo de soja e 881g/gmol para sua mistura de ésteres etílicos.

Para a análise de caracterização do óleo de mamona foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu QP 5050A com coluna capilar SPB 1 (30 m x 0,25mm x 0,25µm) e HP 5 (60m x 0,25mm x 0,25µm). A temperatura da coluna foi programada inicialmente em 180°C e elevada em 1,3°C/min até 205°C, quando passou a elevá-la 5°C/min até 250°C; a temperatura do injetor em 280°C e do detector em 300°C; a injeção foi feita no modo split 1:50; o fluxo da fase móvel (He) foi 1mL/min e o volume injetado 0,2µL. Com a fase estacionária Dbwax-20M, a temperatura inicial da coluna a 180°C, aquecendo a 1,3°C/min até 220°C e as demais condições foram as mesmas. Na Tabela 3.2 encontram-se os percentuais de ácidos graxos obtidos para o óleo de mamona.

Tabela 3.2 – Percentuais de ácidos graxos para o óleo de soja (SCHNEIDER, 2003).

Ácido Graxo	Composição (%)
Ácido palmítico (C16:0)	1,4 ± 0,2
Ácido esteárico (C18:0)	0,9 ± 0,2
Ácido oléico (C18:1)	3,5 ± 0,2
Ácido linoléico (C18:2)	4,9 ± 0,2
Ácido linolênico (C18:3)	0,3 ± 0,1
Ácido ricinoleico (C18:1,OH)	88,9 ± 1,4

Com base nesta composição, o peso molecular médio do óleo de mamona e de seus ésteres etílicos foram determinados como 932g/gmol para o óleo de mamona e 978g/gmol para sua mistura de ésteres.

### 3.1 ALCOÓLISE DE ÓLEO VEGETAL UTILIZANDO NaOH COMO CATALISADOR

Esta etapa teve por objetivo a realização de experimentos que permitissem a comparação dos resultados da alcoólise utilizando catalisador químico (NaOH) e em solvente orgânico utilizando enzimas (lipases) como catalisador. Devido à lacuna encontrada na literatura referente a um estudo sistemático da alcoólise de óleos vegetais utilizando NaOH como catalisador, principalmente no que se refere à influência das variáveis do processo, um estudo mais aprofundado foi realizado. Os resultados obtidos nesta etapa apresentam, então, grande importância científica e tecnológica, além de terem possibilitado o confronto direto com os resultados obtidos quando da utilização de lipases em solvente orgânico. A relevância do trabalho deve-se, principalmente, à possibilidade de comparar dados obtidos em dois diferentes processos, bem como otimizar as condições experimentais em cada um deles para uma reação de grande interesse para a indústria de óleos e gorduras.

### 3.1.1 Substratos

Dentre as diversas matérias-primas nacionais de interesse, destacam-se os óleos de soja (pela produção) e de mamona (pela produtividade). Com base nestes aspectos, os óleos de mamona (DELAWARE), óleo de soja refinado (BUNGE) e soja degomado (BERTOL) comerciais foram utilizados como substratos sem nenhum tratamento prévio. Álcool etílico comercial (QUIMEX, 95% de pureza) também foi utilizado em todos os experimentos como substrato.

### 3.1.2 Catalisador

O catalisador utilizado nesta etapa do trabalho foi o hidróxido de sódio (NaOH) PA (NUCLEAR).

### 3.1.3 Procedimento experimental e análise estatística

Os experimentos foram realizados em um balão de 3 bicos (com controle de temperatura e condensador) acoplado a uma placa com agitação e aquecimento indireto (banho-maria), onde o óleo, o etanol e o catalisador químico (NaOH) reagem de acordo com as condições determinadas no planejamento experimental. A quantidade de óleo foi mantida fixa em 25 g, já a quantidade de etanol e catalisador químico seguiram os valores do planejamento de experimentos, de acordo com o intervalo de estudo das variáveis.

Depois de decorrido o tempo de reação, determinado pelo planejamento de experimentos, foi adicionado 10 mL de solução de ácido sulfúrico 10,0% para cessar a reação (neutralizar o hidróxido de sódio). Em seguida, o volume total foi transferido para um funil de separação, onde foram adicionados, primeiramente, 200 mL de água quente ( $\pm 80^{\circ}\text{C}$ ) e 50 mL de n-heptano PA para separação dos ésteres (fase superior), e após, 2 mL de solução saturada de cloreto de sódio para melhorar a visualização da separação das fases. Após esta etapa, a fase inferior foi descartada e então foi adicionado ao funil de separação 1 espátula de sulfato de sódio anidro para retirada da água residual, e efetuou-se a filtração. Assim, a fase superior foi

concentrada em ésteres por evaporação do n-heptano em estufa, na temperatura de  $\pm 80^{\circ}\text{C}$ , até peso constante. Na Figura 3.1 está representado o fluxograma do procedimento experimental.

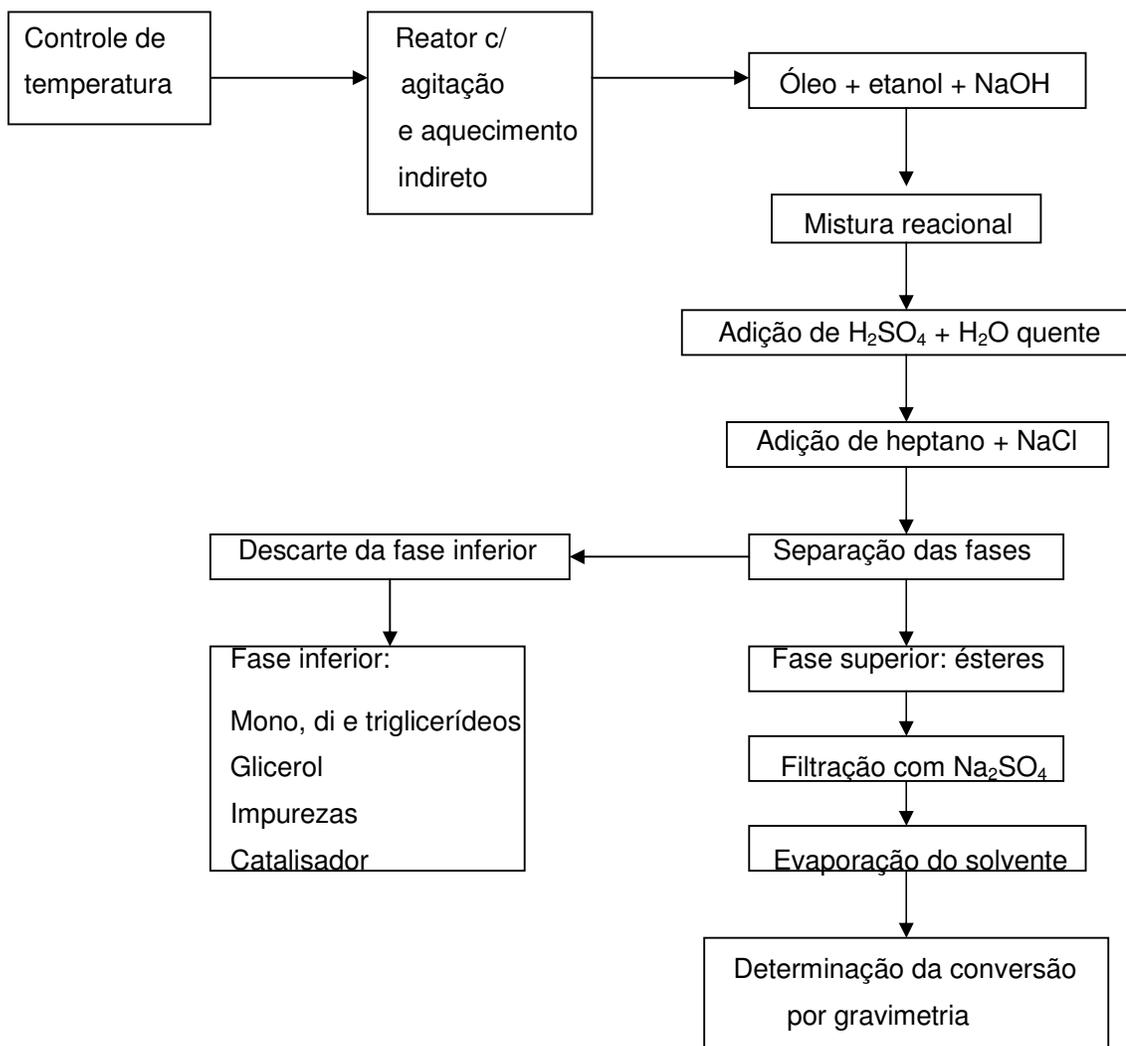


Figura 3.1 – Fluxograma do procedimento experimental para a reação de alcoólise utilizando catalisador químico.

Para determinação das condições experimentais que maximizassem a síntese de ésteres, resultantes da reação de alcoólise, foi realizado um planejamento experimental fatorial saturado com 2 níveis e 4 variáveis. As variáveis

estudadas nesta etapa foram: temperatura do sistema reacional, concentração de NaOH, razão molar óleo-etanol e tempo de reação. O intervalo de estudo das variáveis foi escolhido de modo a abranger grande parte dos estudos apresentados na literatura, referentes a alcoólise de óleos vegetais utilizando catalisadores alcalinos. Estes valores são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Intervalo de estudo das variáveis – Catalisador Químico.

Variável	Intervalo
Temperatura [T] (°C)	30-70
Concentração de NaOH [C] (%p/p)	0,5-1,5
Tempo [t] (h)	1-3
Razão molar óleo-etanol [R]	1:3-1:9

A matriz experimental para o planejamento fatorial é mostrada na Tabela 3.4. As variáveis foram normalizadas de modo que pudessem ser comparados os efeitos das variáveis do processo. Cabe ressaltar que os experimentos foram realizados randomicamente e com réplica de alguns pontos experimentais. O erro experimental para cada condição foi obtido através de média e desvio padrão.

Visando obter uma comparação direta do efeito de cada variável, as variáveis independentes foram normalizadas no intervalo de -1 a +1, de acordo com a equação abaixo:

$$x_i = [2(X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})] - 1 \quad (1)$$

onde  $x_i$  é o valor normalizado da variável  $X$  na condição  $i$ ;  $X_i$  é o valor real e  $X_{\min}$  e  $X_{\max}$  representam o limite inferior e superior, respectivamente. O nível -1 representa o limite inferior enquanto o nível +1 representa o limite superior de cada variável.

Tabela 3.4 – Planejamento experimental empregado na reação de alcoólise dos óleos de mamona e soja utilizando NaOH como catalisador.

Experimento	T (°C)	C (%p/p)	t (h)	R
1	30/-1	0,5/-1	1/-1	1:3/-1
2	30/-1	1,5/+1	3/+1	1:3/-1
3	70/+1	0,5/-1	3/+1	1:3/-1
4	70/+1	1,5/+1	1/-1	1:3/-1
5	30/-1	0,5/-1	3/+1	1:9/+1
6	30/-1	1,5/+1	1/-1	1:9/+1
7	70/+1	0,5/-1	1/-1	1:9/+1
8	70/+1	1,5/+1	3/+1	1:9/+1
9	50/0	1,0/0	2/0	1:6/0

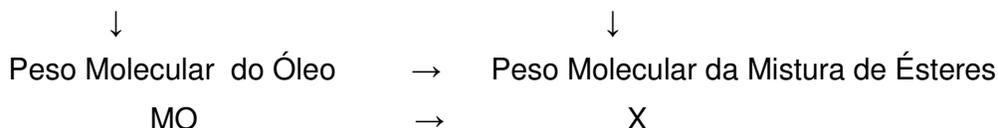
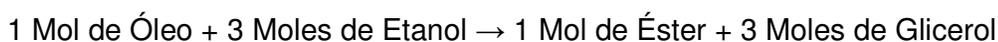
O uso do planejamento fatorial e análise estatística permitiu expressar a conversão do processo como um modelo polinomial, podendo a resposta do processo ser escrita como uma função das variáveis significativas.

Com o objetivo de verificar a significância dos parâmetros, o teste t de Student foi aplicado, adotando um nível de confiança de 95%. O teste t é um teste biparamétrico: número de graus de liberdade (número de experimentos – número de parâmetros) e confiança estipulada. De posse destes valores e consultando a tabela de Student (PINTO et al., 1987), obtém-se o valor de  $t^*$ . Este valor multiplicado pelo desvio padrão correspondente ao parâmetro é denominado t. Para verificar se o parâmetro é significativo ou não, o seguinte teste deve ser realizado:

- Se o parâmetro for positivo, faça a operação (parâmetro – t), caso obtenha um valor negativo o parâmetro não pode ser considerado significativo.
- Se o parâmetro for negativo, faça (parâmetro + t), se o valor obtido for positivo, o parâmetro não é significativo.

### 3.1.4 Determinação da conversão em ésteres utilizando NaOH como catalisador

Após a realização do procedimento descrito anteriormente, a conversão do processo foi determinada por gravimetria dos ésteres em relação à massa de óleo utilizada, de acordo com a relação apresentada a seguir:



onde: MO = massa de óleo utilizada para a reação (g)

X = massa de ésteres teórica (g).

Para obter-se a conversão em porcentagem faz-se:

$$\begin{array}{ccc} X & \rightarrow & 100\% \\ MA & \rightarrow & Y \end{array}$$

onde: MA = massa de amostra resultante da reação (g)

Y = conversão da reação (%).

## 3.2 ALCOÓLISE DE ÓLEO VEGETAL UTILIZANDO LIPASES COMERCIAIS COMO CATALISADORES

### 3.2.1 Substratos e solvente

Os óleos de mamona (DELAWARE) e soja refinado (BUNGE) comerciais foram escolhidos como substratos a serem utilizados na alcoólise enzimática em solvente orgânico. Álcool etílico comercial (QUIMEX, 95% de pureza) foi utilizado em todos os experimentos como substrato e o solvente orgânico escolhido para a realização deste estudo foi o n-hexano PA (MERCK).

### 3.2.2 Enzimas

Duas lipases imobilizadas comerciais foram utilizadas na realização deste trabalho, ambas gentilmente cedidas pela NOVOZYMES: *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM) imobilizada em resina de troca aniônica, a qual apresenta especificidade nas posições 1,3 do triglicerídeo e *Candida antarctica* (Novozym 435) imobilizada em resina acrílica macroporosa, a qual atua, não especificamente, nas 3 posições do triglicerídeo.

### 3.2.3 Procedimento experimental e análise estatística

Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250mL fechados com tampa de vidro. As quantidades de óleo e solvente (n-hexano) foram mantidas fixas em 1g e 40 mL, respectivamente. Já as concentrações de lipase comercial e de etanol foram pré-estabelecidas pelo planejamento de experimentos. O excesso de solvente foi definido visando garantir a completa solubilização dos substratos e produtos. Os erlenmeyers foram, então, incubados em agitador rotativo (shaker) à 200rpm por 8 horas. Amostras foram retiradas em intervalos de 1 hora visando a obtenção da cinética da reação. Após decorrido o tempo de reação, a amostra foi filtrada (retenção da enzima para posterior recuperação e reutilização) e levada a evaporação do solvente em estufa na temperatura de  $\pm 70^{\circ}\text{C}$ , e então diluída em 10 mL de n-heptano para o caso de óleo de mamona e 5 mL de n-propanol para o óleo de soja. Adotando este procedimento, a fase superior torna-se concentrada em ésteres etílicos (biodiesel) e a fase inferior contém os demais produtos da reação (mono e diglicerídeos, glicerol e impurezas) bem como os substratos não reagidos (óleo e etanol). Na Figura 3.2 está representado o fluxograma do procedimento experimental.

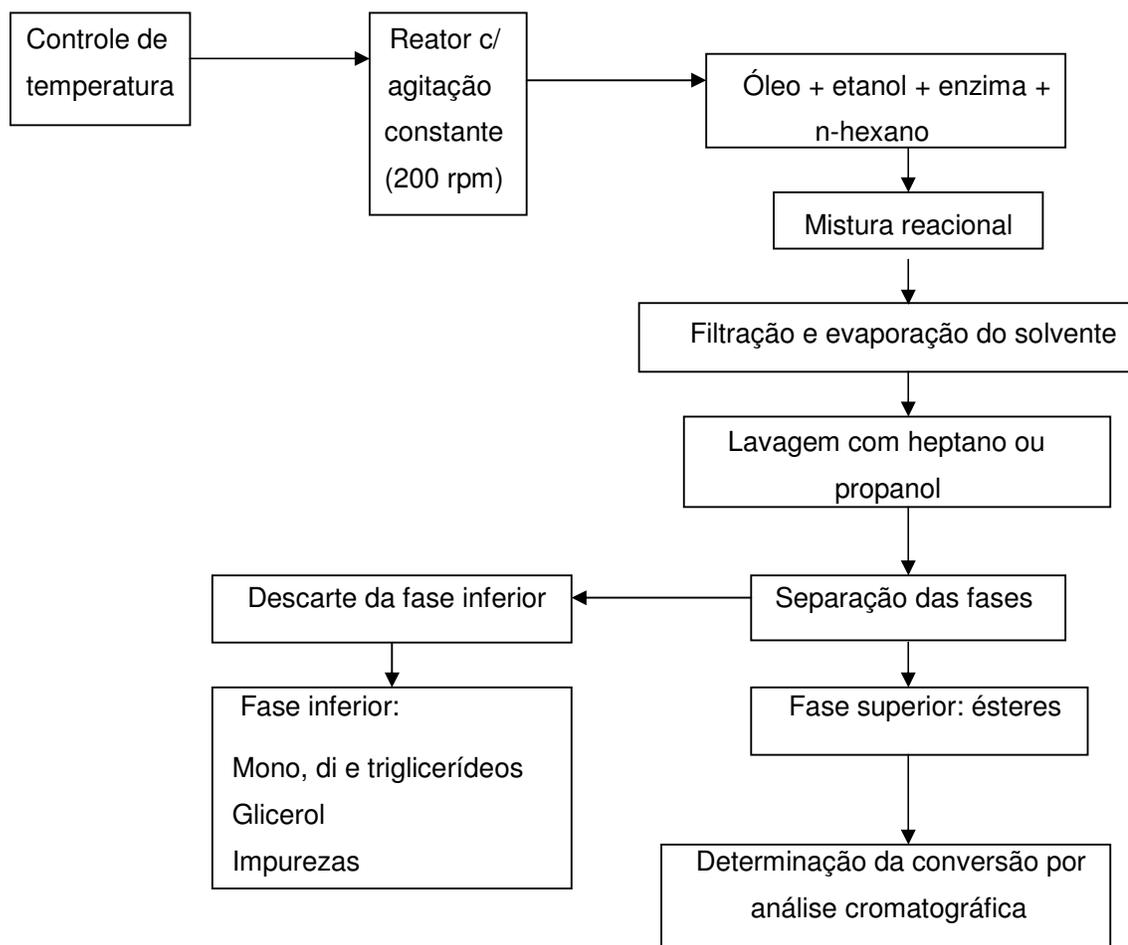


Figura 3.2 – Fluxograma do procedimento experimental para a reação de alcoólise enzimática em solvente orgânico.

Visando determinar as condições experimentais que maximizassem a síntese de ésteres, resultante da reação de alcoólise, bem como possibilitar a avaliação dos efeitos independentes das variáveis do processo, um planejamento experimental fatorial saturado com 2 níveis e 4 variáveis foi realizado. As variáveis estudadas nesta etapa foram temperatura do sistema reacional, concentração de água adicionada ao meio, concentração de enzima e razão molar óleo-etanol. O intervalo de estudo das variáveis foi escolhido de modo a abranger grande parte dos estudos

apresentados na literatura, referentes à reação de biomodificação de óleos vegetais. Estes valores são mostrados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Intervalo de estudo das variáveis – Solvente Orgânico.

Variável	Intervalo
Temperatura [T](°C)	35-65
Concentração de água adicionada [H](% p/p)	0-10
Concentração de enzima [E](% p/p)	5-20
Razão molar óleo-etanol [R]	1:3-1:10

O mesmo procedimento, com relação a análise estatística, para construção do modelo empírico e avaliação do efeito das variáveis foi realizado para a reação de alcoólise enzimática dos óleos de mamona e soja refinado em solvente orgânico . A matriz experimental para o planejamento fatorial é mostrada na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Planejamento experimental empregado na reação de alcoólise dos óleos de mamona e soja refinado utilizando lipases como catalisador.

Experimento	T(°C)	E(%p/p)	H(%p/p)	R
1	35/-1	5/-1	0/-1	1:3/-1
2	35/-1	5/-1	10/+1	1:10/+1
3	65/+1	20/+1	0/-1	1:3/-1
4	65/+1	20/+1	10/+1	1:10/+1
5	35/-1	20/+1	10/+1	1:3/-1
6	35/-1	20/+1	0/-1	1:10/+1
7	65/+1	5/-1	10/+1	1:3/-1
8	65/+1	5/-1	0/-1	1:10/+1
9	50/0	12,5/0	5/0	1:6,5/0

Nesta etapa, duas lipases comerciais foram usadas como catalisadores na reação de alcoólise dos óleos de mamona e soja refinado, utilizando n-hexano como solvente, a diferentes condições de operação, com o objetivo de selecionar a lipase que fornecesse maior conversão para a referida reação: Lipozyme IM e Novozym

435. O planejamento experimental apresentado na Tabela 3.6 foi, então, aplicado aos quatro sistemas em estudo.

### **3.2.4 Determinação da conversão em ésteres utilizando lipases como catalisadores**

#### Óleo de Mamona

Após a realização do procedimento descrito anteriormente, a conversão do processo foi determinada por cromatografia gasosa (HP 5890) acoplada a um espectrômetro de massas (HP 5970), utilizando uma coluna capilar DB-5 (30mx0,25mmx0,25 $\mu$ m). A temperatura da coluna foi programada de 210 a 300°C (10°C /min). Gás hélio foi utilizado como gás de arraste e a temperatura de injeção foi de 290°C e do detector de 300°C. Toda a amostra resultante da reação foi diluída em 10 mL de n-heptano e a quantidade injetada foi 0,5 $\mu$ L, sendo esta identificada e quantificada com base no padrão externo etil ricinoleato. O procedimento utilizado para os cálculos da conversão em ésteres encontra-se detalhado no APÊNDICE C.

#### Óleo de soja refinado

As amostras foram analisadas utilizando um espectrômetro de massas (HP 5970) acoplado a um cromatógrafo gasoso (HP 5890), utilizando uma coluna capilar DB-5 (30mx0,25mmx0,25 $\mu$ m). A temperatura da coluna foi programada de 200 a 310°C ( $\uparrow$ 5°C /min até 210°C onde permanece 6 min,  $\uparrow$ 10°C/min até 310°C onde permanece 5 min). Gás hélio foi utilizado como gás de arraste e a temperatura de injeção foi de 290°C e do detector de 300°C. Toda a amostra resultante da reação foi diluída em 5 mL de n-propanol e a quantidade injetada foi 0,5 $\mu$ L. O procedimento utilizado para os cálculos da conversão em ésteres está detalhado no APÊNDICE C.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ALCOÓLISE DE ÓLEO VEGETAL UTILIZANDO NaOH COMO CATALISADOR

Os resultados obtidos para a alcoólise dos óleos de mamona, soja refinado e soja degomado utilizando NaOH como catalisador são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Alcoólise dos óleos de mamona, soja refinado e soja degomado, com catalisador convencional (NaOH).

Experimento	Condições experimentais				Conversão (%)		
	T (°C)	NaOH (%p/p)	t (h)	R	Mamona	Soja Refinado	Soja Degomado
1	30	0,5	1	1:3	84,7 ± 3,4	91,7 ± 0,8	85,3 ± 2,2
2	30	1,5	3	1:3	88,5 ± 3,4	87,5 ± 4,6	80,4 ± 3,4
3	70	0,5	3	1:3	96,2 ± 3,4	90,7 ± 2,0	90,6 ± 2,2
4	70	1,5	1	1:3	92,9 ± 3,4	83,6 ± 2,0	67,8 ± 2,8
5	30	0,5	3	1:9	85,7 ± 3,4	90,4 ± 0,1	85,7 ± 2,2
6	30	1,5	1	1:9	86,5 ± 5,8	83,6 ± 2,0	85,5 ± 2,2
7	70	0,5	1	1:9	95,1 ± 3,4	94,1 ± 2,0	93,0 ± 2,2
8	70	1,5	3	1:9	94,7 ± 3,4	89,9 ± 2,0	86,1 ± 7,5
9	50	1,0	2	1:6	87,7 ± 3,5	84,0 ± 6,5	91,7 ± 1,5

#### Óleo de Mamona

Os resultados obtidos para a alcoólise do óleo de mamona utilizando NaOH como catalisador são apresentados na Tabela 4.1. De acordo com esta tabela pode-se verificar que conversões acima de 90,0% foram obtidas em diversas condições experimentais.

Uma vez determinada a conversão do processo, um modelo empírico foi construído, com o objetivo de representar os dados experimentais e verificar a

significância das variáveis, bem como avaliar possíveis interações entre elas. Temperatura, concentração de catalisador, tempo de reação e razão molar óleo-etanol e interação temperatura-razão molar óleo-etanol e temperatura-concentração de catalisador foram ajustadas por um modelo quadrático. A estimativa dos parâmetros foi efetuada pelo software comercial STATISTICA® 5.0. Os resultados da regressão são apresentados na Tabela 4.2.

Adotando esta metodologia, o efeito das variáveis (temperatura, concentração de catalisador adicionada, razão molar óleo-etanol e tempo de reação) bem como das interações foram estudados. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Resultado da regressão para alcoólise do óleo de mamona e etanol com catalisador convencional (NaOH).

<b>Conversão = <math>a_0 + a_1T + a_2t + a_3CC + a_4Rt</math></b>		
R= 0,998		
Variável	Parâmetro	Desvio Padrão ( $\sigma$ )
Independente	$a_0 = 87,69$	0,34
Temperatura (T)	$a_1 = 4,19$	0,12
Tempo (t)	$a_2 = 0,74$	0,12
Conc. de catalisador (C) x Conc. de catalisador (C)	$a_3 = 2,84$	0,36
Razão molar óleo-etanol (R) x Tempo (t)	$a_4 = -1,04$	0,12

Analisando a Tabela 4.2 e considerando um nível de confiança de 95%, pode-se observar que todas as variáveis são significativas, mas a temperatura e o termo quadrático foram as que mais afetaram a conversão do processo. A temperatura afetou positivamente a conversão da reação, mostrando que dentro do intervalo estudado uma temperatura mais elevada conduz a maiores conversões.

Uma vez avaliado o efeito das variáveis na conversão do processo, a otimização do mesmo foi realizada. Para isto, o modelo obtido anteriormente foi utilizado e a condição que otimiza a conversão em biodiesel foi determinada. A conversão predita pelo modelo de otimização foi de 95,4%, relacionada à temperatura de 70°C, concentração de catalisador 0,5%, razão molar óleo-etanol de

1:3 e tempo de 3 horas (Experimento 3, Tabela 4.1). A conversão experimental obtida foi de 96,2%, apresentando boa concordância com a predita pelo modelo.

### Óleo de Soja Refinado

Os resultados obtidos para a alcoólise do óleo de soja refinado utilizando NaOH como catalisador encontram-se apresentados na Tabela 4.1.

Uma vez determinada a conversão do processo, um modelo empírico foi construído, com o objetivo de representar os dados experimentais e verificar a significância das variáveis, bem como avaliar possíveis interações entre elas. Temperatura, tempo de reação, concentração de catalisador, razão molar óleo-etanol e interação concentração de catalisador-tempo e o termo quadrático concentração de catalisador foram ajustadas por um modelo empírico. Os resultados da regressão são apresentadas a seguir na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Resultado da regressão para alcoólise do óleo de soja refinado e etanol com catalisador convencional (NaOH).

<b>Conversão = <math>a_0 + a_1T + a_2t + a_3C + a_4R + a_5Ct + a_6CC</math></b>		
R = 0,999		
Variável	Parâmetro	Desvio Padrão ( $\sigma$ )
Independente	$a_0 = 84,00$	0,11
Temperatura (T)	$a_1 = 0,64$	0,04
Tempo (t)	$a_2 = 0,69$	0,04
Conc. de catalisador (C)	$a_3 = -2,79$	0,04
Razão molar óleo-etanol (R)	$a_4 = 0,56$	0,04
Conc. de catalisador (C) x Tempo (t)	$a_5 = 1,86$	0,04
Conc. de catalisador (C) x Conc. de catalisador (C)	$a_6 = 4,94$	0,11

Analisando a Tabela 4.3 e considerando um nível de confiança de 95%, pode-se observar que todas as variáveis são significativas, mas a concentração de catalisador, a interação concentração de catalisador-tempo de reação e o termo quadrático são as que mais afetaram a conversão do processo. A concentração de

catalisador apresentou efeito negativo, mostrando que, para este sistema, a diminuição da concentração de catalisador conduz a maiores conversões. A interação concentração de catalisador-tempo de reação e o termo quadrático apresentaram efeito positivo, mostrando que, na faixa estudada, estas variáveis influenciaram positivamente o processo.

O mesmo procedimento realizado para o óleo de mamona com relação à otimização do processo foi aplicado nesta etapa. Neste caso, a condição otimizada foi: temperatura de 30°C, concentração de catalisador de 0,5%, razão molar óleo-etanol de 1:9 e tempo de 1h, levando a uma conversão predita pelo modelo de otimização de 93,4%. A consecução desta condição experimental, não contemplada no planejamento de experimentos, levou a uma conversão de 94,6%, apresentando boa concordância com a proposta pelo modelo.

#### Óleo de Soja Degomado

Uma vez determinada a conversão do processo (Tabela 4.1), novamente um modelo empírico foi construído, com o objetivo de representar os dados experimentais e verificar a significância das variáveis para o sistema contendo óleo de soja degomado, bem como avaliar possíveis interações entre elas. Tempo de reação, concentração de catalisador, razão molar óleo-etanol e interação tempo-concentração de catalisador, tempo-razão molar óleo etanol e tempo-temperatura foram ajustados por um modelo quadrático. Os resultados da regressão obtidos pelo modelo são apresentados a seguir na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Resultado da regressão para alcoólise do óleo de soja degomado e etanol com catalisador convencional (NaOH).

<b>Conversão = <math>a_0 + a_1C + a_2t + a_3R + a_4CC + a_5Ct + a_6Tt + a_7Rt</math></b>		
<b>R = 0,999</b>		
Variável	Parâmetro	Desvio Padrão ( $\sigma$ )
Independente	$a_0 = 91,70$	0,21
Concentração de catalisador (C)	$a_1 = -4,35$	0,08
Tempo (t)	$a_2 = 1,40$	0,08
Razão molar óleo-etanol (R)	$a_3 = 3,27$	0,08
Conc. de catalisador (C) x Conc. de catalisador (C)	$a_4 = -7,40$	0,23
Conc. de catalisador (C) x Tempo (t)	$a_5 = 1,90$	0,08
Temperatura (T) x Tempo (t)	$a_6 = 2,58$	0,08
Razão molar óleo etanol (R) x Tempo (t)	$a_7 = -3,08$	0,08

Analisando a Tabela 4.4 e considerando um nível de confiança de 95%, pode-se observar que, para este sistema, todas as variáveis são significativas. A concentração de catalisador, seu termo quadrático e a interação tempo-razão molar óleo-etanol afetaram negativamente a conversão do processo enquanto que o tempo, a razão molar óleo-etanol, as interações entre concentração de catalisador-tempo e temperatura-tempo apresentaram efeito positivo.

Uma vez avaliado o efeito das variáveis na conversão do processo, novamente a otimização do mesmo foi realizada para este sistema. Para isto, o modelo obtido anteriormente foi utilizado e as condições que otimizam a conversão em biodiesel foram determinadas. Neste caso, as condições que otimizam a conversão do processo foram estabelecidas, sendo diferentes das realizadas no planejamento experimental. Os resultados obtidos nesta etapa são apresentados na Tabela 4.5, a partir da qual é possível constatar uma concordância apenas satisfatória entre os resultados experimentais e aqueles previstos pelo modelo.

Tabela 4.5 – Resultados obtidos na otimização do óleo de soja degomado.

Experimento	Condição experimental				Conversão (%)	
	T (°C)	NaOH (% p/p)	t (min)	R	Experimental	Predita
1	53,6	0,5	130	1:9	93,6	100,0
2	30	0,5	60	1:9	93,8	93,4
3	70	0,75	180	1:9	92,9	99,4
4	70	0,5	180	1:9	93,0	100,0

#### 4.1.1 Conclusões parciais: Alcoólise de óleo vegetal utilizando NaOH como catalisador

A Tabela 4.6 sumariza os resultados otimizados bem como as condições operacionais da produção de ésteres etílicos dos óleos de mamona, soja refinado e soja degomado obtidos pela ação do catalisador químico NaOH.

Tabela 4.6 – Condições experimentais ótimas para cada sistema.

Óleo	Conversão (%)	Condição experimental			
	Experimental	T (°C)	NaOH (%p/p)	R	t (min)
Mamona	96,2	70	0,5	1:3	180
Soja Refinado	94,6	30	0,5	1:9	60
Soja Degomado -1	93,6	53,6	0,5	1:9	130
Soja Degomado - 2	93,8	30	0,5	1:9	60
Soja Degomado - 3	92,9	70	0,75	1:9	180
Soja Degomado - 4	93,0	70	0,5	1:9	180

Analisando a Tabela 4.6 pode-se observar que para cada óleo a condição que maximiza a conversão da reação foi diferente, mas todas levaram a conversões acima de 90,0%, mostrando, assim, a viabilidade, em termos de conversão, do processo com catalisador químico.

A Agência Nacional do Petróleo (ANP) estabeleceu em Portaria (abril/2003) ainda não vigente, a especificação para a produção de biodiesel e utilização como aditivo ao óleo diesel. Definiu também que biodiesel é uma mistura de ésteres de ácidos graxos de origem vegetal que apresenta conformidade com a especificação contida no Regulamento Técnico ANP nº XX/2003, parte integrante desta portaria. A determinação das características do biodiesel será feita mediante o emprego das normas da Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM), da Organização Internacional de Padronização (ISO) e do Comitê Europeu de Normalização (CEN). As propriedades analisadas são: ponto de fulgor, água e sedimentos, viscosidade cinemática 40°C, cinzas sulfatadas, enxofre, corrosividade ao Cu 3h a 50°C, número de cetano, ponto de entupimento de filtro a frio, resíduo de carbono, índice de acidez, glicerina livre, glicerina total, aparência, destilação 95% v/v do recuperado, massa específica a 20°C, metanol ou etanol, índice de iodo, monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos, teor de metais alcalinos (Na + K), teor de fósforo e estabilidade à oxidação a 110°C.

Cabe salientar que o objetivo do presente trabalho é a avaliação técnica da produção de biodiesel utilizando NaOH como catalisador em termos de conversão do processo, não fazendo, portanto, parte do escopo deste trabalho a realização das análises supra citadas.

#### **4.2 ALCOÓLISE DE ÓLEO VEGETAL UTILIZANDO LIPASES COMERCIAIS COMO CATALISADORES**

Os resultados obtidos para a alcoólise enzimática dos óleos de mamona e de soja refinado utilizando as duas lipases comerciais como catalisadores são apresentados na Tabela 4.7.

O tempo de reação adotado foi o mesmo para os dois óleos, mas para avaliação da conversão, efeito de variáveis e otimização escolheu-se 6h para o óleo de mamona e 8h para o óleo de soja, pois no decorrer dos experimentos pôde-se observar maior conversão em ésteres nestes tempos, como pode ser visto a seguir nas Figuras 4.1 a 4.8 que apresentam a cinética da reação.

Tabela 4.7 – Conversões obtidas na alcoólise enzimática dos óleos de mamona e de soja refinado em solvente orgânico.

Experimento	Condições experimentais				Conversão (%)			
	T	E	H	R	Mamona	Mamona	Soja	Soja
	(°C)	(% p/p)	(% p/p)		Lipozyme	Novozym	Lipozyme	Novozym
					IM	435	IM	435
1	35	5	0	1:3	41,7	47,5	23,0	1,0
2	35	5	10	1:10	0,65	1,6	0,3	0,3
3	35	20	0	1:10	70,4	67,0	37,7	1,8
4	35	20	10	1:3	85,0	34,0	95,6	0,8
5	65	5	0	1:10	19,7	52,0	13,4	11,8
6	65	5	10	1:3	33,0	16,5	25,3	6,2
7	65	20	0	1:3	98,0	60,0	30,2	9,8
8	65	20	10	1:10	40,6	73,0	1,9	5,8
9	50	12,5	5	1:6,5	60,6	23,0	25,4	1,0

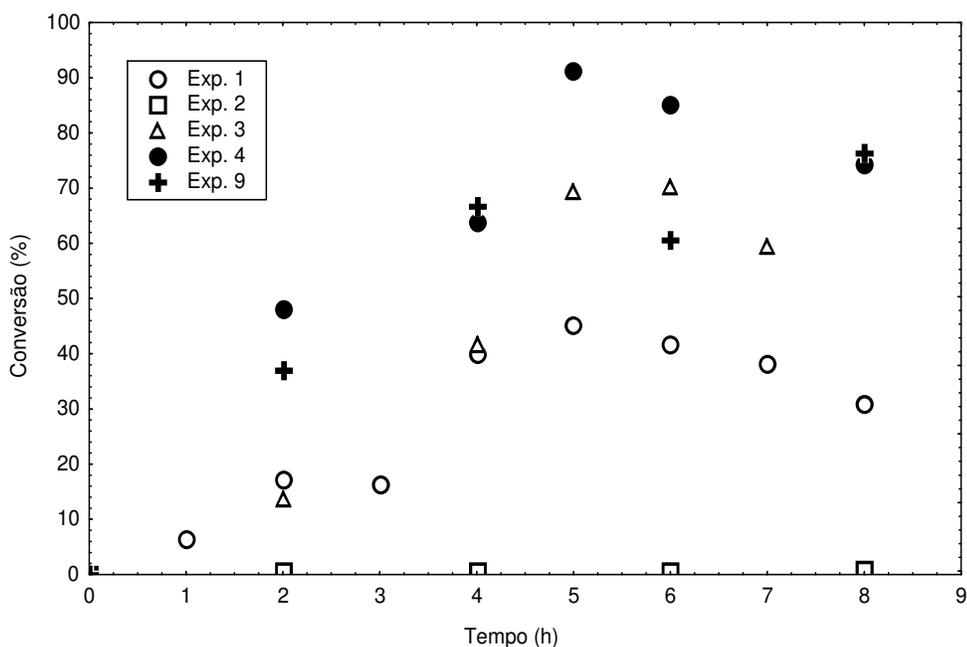


Figura 4.1 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de mamona-Lipozyme IM (experimentos 1 - 4 e 9).

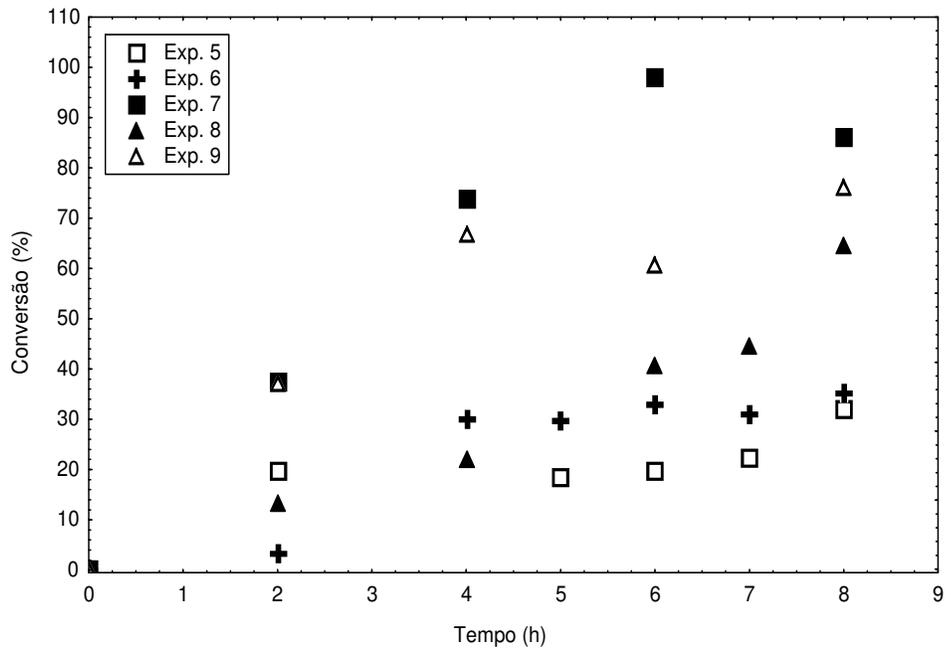


Figura 4.2 – Cinética da reação de alcoólise de sistema: óleo de mamona-Lipzyme IM (experimentos 5-9).

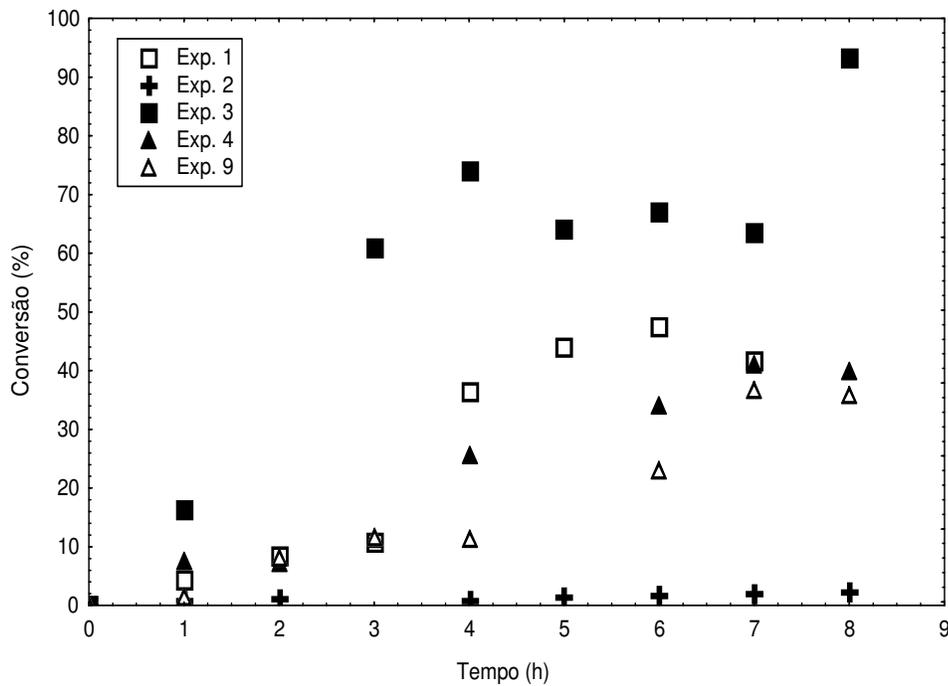


Figura 4.3 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de mamona-Novozym 435 (experimentos 1 - 4 e 9).

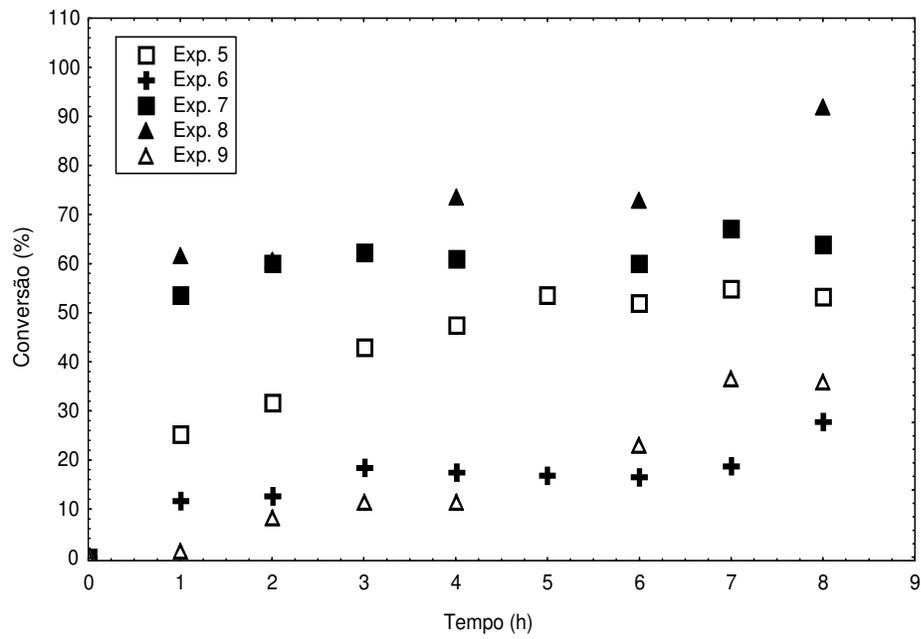


Figura 4.4 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de mamona-Novozym 435 (experimentos 5-9).

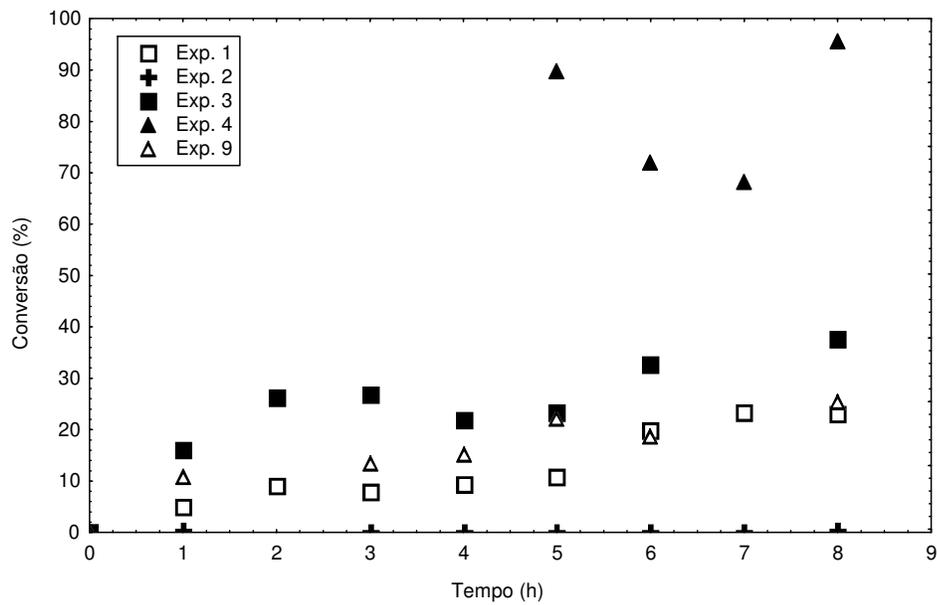


Figura 4.5 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de soja-Lipozyme IM (experimentos 1 - 4 e 9).

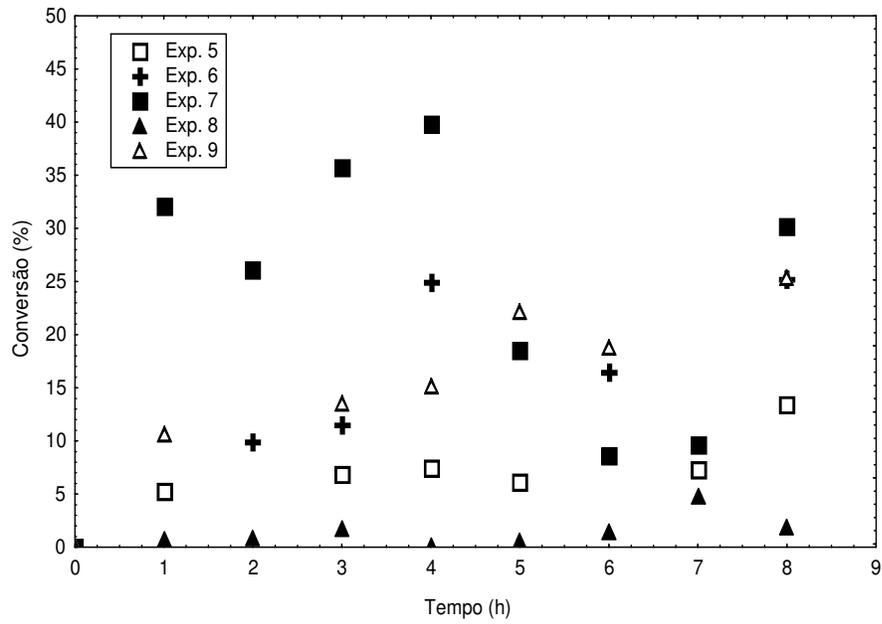


Figura 4.6 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de soja-Lipozyme IM (experimentos 5-9).

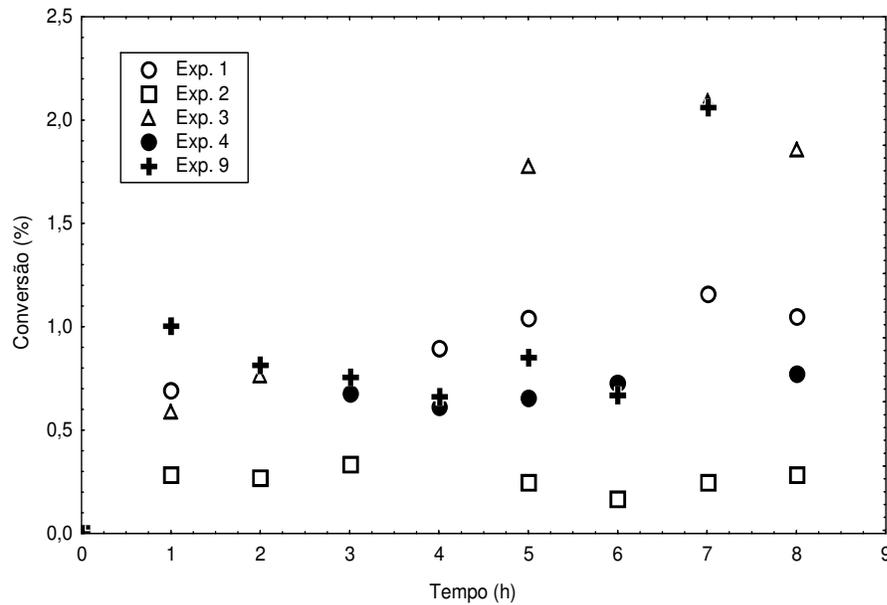


Figura 4.7 – Cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de soja-Novozym 435 (experimentos 1 - 4 e 9).

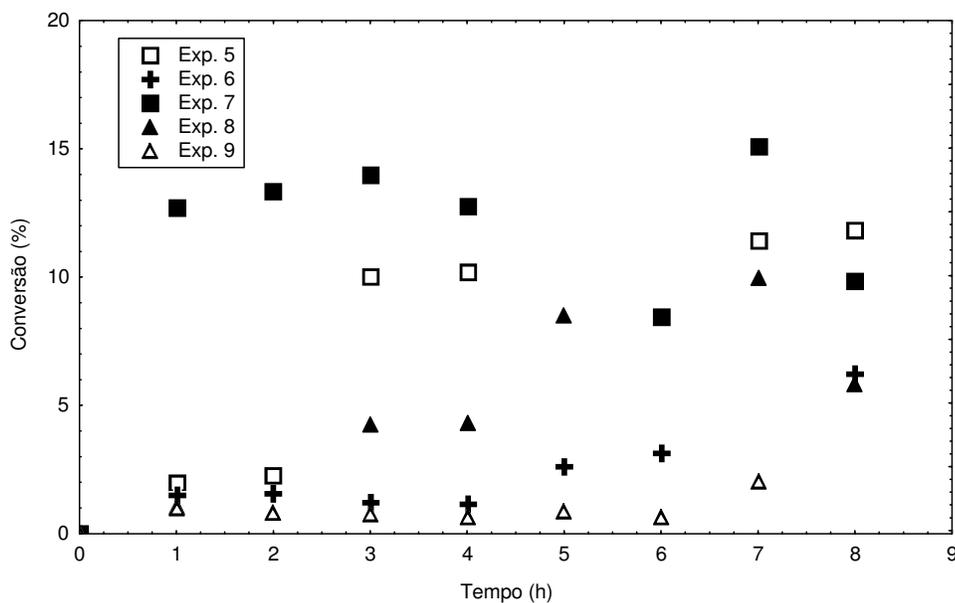


Figura 4.8 – Curva cinética da reação de alcoólise do sistema: óleo de soja-Novozym 435 (experimentos 5-9).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4.7, pode-se observar que para o sistema óleo de mamona-Lipozyme IM a maior conversão (98,0%) foi obtida na condição de maior temperatura (65°C) e maior concentração de enzima (20% p/p) e menor concentração de água (0% p/p) e razão molar óleo-etanol (1:3). Observa-se também que para o sistema óleo de mamona-Novozym 435 a maior conversão (73,0%) foi obtida na condição de maior temperatura (65°C), maior concentração de enzima (20% p/p), maior concentração de água (10% p/p) e maior razão óleo-etanol (1:10).

Para o sistema óleo de soja-Lipozyme IM, a maior conversão (95,6%) foi obtida na condição de menor temperatura (35°C) e razão molar óleo-etanol (1:3) e maior concentração de enzima (20% p/p) e concentração de água (10% p/p). Já para o sistema óleo de soja-Novozym 435 a maior conversão (11,8%) foi obtida na condição de maior temperatura (65°C) e maior razão óleo-etanol (1:10), menor concentração de enzima (5% p/p) e menor concentração de água (0% p/p).

### 4.2.1 Efeito das Variáveis

#### Sistema: Óleo de Mamona – Enzima Lipozyme IM

De acordo com o teste t de Student, adotando um nível de confiança de 95%, observa-se pela Tabela 4.8 a existência de parâmetros significativos, o que mostra que, dentro do intervalo estudado para cada variável, as mesmas exercem influência na conversão do processo. O mesmo procedimento visando verificar a significância dos parâmetros foi aplicado a todos os sistemas estudados.

Tabela 4.8 – Resultados da regressão para o óleo de mamona e enzima Lipozyme IM.

<b>Conversão = <math>a_0 + a_1R + a_2H + a_3E + a_4RR + a_5TE + a_6RE</math></b>		
<b>R = 0,998</b>		
Variável	Parâmetro	Desvio Padrão ( $\sigma$ )
Independente	$a_0 = 60,60$	4,09
Razão molar óleo-etanol (R)	$a_1 = -15,79$	1,45
Concentração de água (H)	$a_2 = -8,82$	1,45
Concentração de enzima (E)	$a_3 = 24,87$	1,45
Razão molar óleo-etanol (R) x	$a_4 = -11,97$	4,34
Razão molar óleo-etanol (R)		
Temperatura (T) x Conc. de enzima (E)	$a_5 = -3,39$	1,45
Razão molar óleo-etanol (R) x Conc. de enzima (E)	$a_6 = -2,21$	1,45

Para o sistema óleo de mamona – enzima Lipozyme IM (Tabela 4.8), verifica-se que todas as variáveis são significativas. A concentração de água teve efeito negativo, mostrando que água em excesso pode deslocar o equilíbrio da reação (no sentido da hidrólise), corroborando que a enzima necessita de apenas uma monocamada de água para manter sua atividade. A razão molar óleo-etanol também apresentou influência negativa na conversão do processo. Como esperado, a concentração de enzima, dentro da faixa estudada, apresentou efeito positivo na conversão, mostrando que um aumento na concentração de enzima conduz a um aumento na conversão do processo. Além de avaliar o efeito isolado das variáveis, deve-se considerar as interações entre temperatura-concentração de enzima e razão

molar óleo-etanol-concentração de enzima, pois neste sistema apresentaram efeito negativo significativo.

OLIVEIRA e OLIVEIRA (2001) realizaram estudo da alcoólise enzimática do óleo de dendê e etanol em solvente orgânico (n-hexano). Para o sistema contendo Lipozyme IM a temperatura e a razão molar óleo-etanol tiveram efeito mais pronunciado. A temperatura e a razão molar óleo-etanol também apresentaram efeito negativo. Além do efeito isolado das variáveis, as interações entre temperatura-razão molar óleo-etanol e temperatura-concentração de enzima, influenciaram significativamente a conversão do processo. O efeito negativo apresentado por todas estas variáveis isoladas foi ponderado pelo efeito positivo de suas interações.

#### Sistema: Óleo de Mamona – Enzima Novozym 435

O mesmo procedimento estatístico foi adotado. Desta forma, os resultados da regressão para este sistema são apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Resultados da regressão para o óleo de mamona e enzima Novozym 435.

<b>Conversão = <math>a_0 + a_1T + a_2R + a_3H + a_4E + a_5RR + a_6TR + a_7TH</math></b>		
<b>R = 0,998</b>		
Variável	Parâmetro	Desvio Padrão ( $\sigma$ )
Independente	$a_0 = 23,00$	4,64
Temperatura (T)	$a_1 = 6,48$	1,64
Razão molar óleo-etanol (R)	$a_2 = 4,39$	1,64
Concentração de água (H)	$a_3 = -12,73$	1,64
Concentração de enzima (E)	$a_4 = 14,61$	1,64
Razão molar óleo-etanol (R) x	$a_5 = 21,02$	4,92
Razão molar óleo-etanol (R)		
Temperatura (T) x	$a_6 = 7,61$	1,64
Razão molar óleo-etanol (R)		
Temperatura (T) x Conc. de água (H)	$a_7 = 6,98$	1,64

Para o sistema óleo de mamona – enzima Novozym 435 (Tabela 4.9), verifica-se que todas as variáveis são significativas. A temperatura, a razão molar óleo-etanol, a concentração de enzima e as interações entre temperatura-razão molar óleo-etanol e temperatura-concentração de água afetaram positivamente a conversão do processo, enquanto que somente a concentração de água teve efeito negativo, podendo a mesma discussão realizada no item anterior ser aplicada a este caso.

De acordo com o estudo da alcoólise enzimática do óleo de dendê e etanol, utilizando Novozym 435 como catalisador, em solvente orgânico (n-hexano) realizado por OLIVEIRA e ALVES (1999) a temperatura, as concentrações de água e enzima e a interação entre temperatura-razão molar óleo-etanol afetaram significativamente a conversão do processo. Como a temperatura ótima da enzima é abaixo de 70°C (NOVO NORDISK, 1992), um efeito negativo foi observado na conversão. A adição de água também apresentou efeito negativo, mostrando que água em excesso pode deslocar o equilíbrio da reação, diminuindo a formação de ésteres. A concentração de enzima na faixa estudada apresentou efeito positivo quando avaliada isoladamente, porém a interação entre temperatura e razão molar óleo-etanol apresentou efeito negativo na conversão da reação.

Diferentes resultados foram obtidos no que se refere à influência das variáveis de processo, podendo-se concluir também que a composição do óleo, o nível de saturação ou insaturação bem como as propriedades físico-químicas podem interferir na atividade enzimática e, conseqüentemente, na conversão do processo. Em comparação aos resultados obtidos por OLIVEIRA e ALVES (1999), OLIVEIRA e ALVES (2000) e OLIVEIRA e OLIVEIRA (2001) cabem os mesmos comentários.

#### Sistema: Óleo de Soja – Enzima Lipozyme IM

O mesmo procedimento estatístico adotado para os sistemas contendo óleo de mamona foi utilizado nesta etapa. Desta forma, os resultados da regressão para este sistema são apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Resultados da regressão para o óleo de soja e enzima Lipozyme IM.

$$\text{Conversão} = a_0 + a_1T + a_2E + a_3R + a_4TE + a_5TH + a_6TR$$

$$R = 0,996$$

Variável	Parâmetro	Desvio Padrão ( $\sigma$ )
Independente	$a_0 = 28,09$	1,70
Temperatura (T)	$a_1 = -10,73$	1,81
Concentração de enzima (E)	$a_2 = 12,93$	1,81
Razão molar óleo-etanol (R)	$a_3 = -15,10$	1,81
Temperatura (T) x Conc. de enzima (E)	$a_4 = -14,58$	1,81
Temperatura (T) x Conc. de água (H)	$a_5 = -6,45$	1,81
Temperatura (T) x Razão molar óleo-etanol (R)	$a_6 = 5,05$	1,81

Para o sistema óleo de soja – enzima Lipozyme IM (Tabela 4.10), verifica-se que todas as variáveis são significativas. A concentração de enzima apresentou efeito positivo, podendo a mesma discussão realizada para o sistema óleo de mamona – Lipozyme IM ser considerada. A interação entre temperatura-razão molar óleo-etanol também afetou positivamente a conversão da reação. A temperatura na faixa estudada apresentou efeito negativo, visto que a temperatura ótima da enzima é em torno de 40°C (NOVO NORDISK, 1992). A razão molar óleo-etanol também apresentou efeito negativo, mostrando que um excesso de etanol pode inibir a ação da enzima, levando a menores conversões.

#### Sistema: Óleo de Soja – Enzima Novozym 435

O mesmo procedimento estatístico adotado para os sistemas contendo óleo de mamona foi utilizado nesta etapa. Desta forma, os resultados da regressão para este sistema são apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Resultados da regressão para o óleo de soja e enzima Novozym 435.

<b>Conversão = <math>a_0 + a_1T + a_2H + a_3TT + a_4TE + a_5ER</math></b>		
R = 0,997		
Variável	Parâmetro	Desvio Padrão ( $\sigma$ )
Independente	$a_0 = 1,00$	0,52
Temperatura (T)	$a_1 = 3,71$	0,18
Concentração de água (H)	$a_2 = -1,41$	0,18
Temperatura (T) x Temperatura (T)	$a_3 = 3,69$	0,55
Temperatura (T) x Conc. de enzima (E)	$a_4 = -0,46$	0,18
Conc. de enzima (E) x Razão molar óleo-etanol (R)	$a_{05} = -0,99$	0,18

Para o sistema óleo de soja – enzima Novozym 435 (Tabela 4.11), verifica-se que todas as variáveis são significativas. A temperatura afetou positivamente a conversão do processo, enquanto que a concentração de água afetou negativamente, cabendo comentários anteriores sobre estas variáveis, e as interações entre temperatura-concentração de enzima e concentração de enzima-razão molar óleo-etanol também apresentaram efeito negativo, sendo que o parâmetro mais significativo foi a temperatura.

#### 4.2.2 Otimização das condições de operação – maximização da conversão

Tendo como base os resultados obtidos no planejamento experimental e análise estatística, a otimização das condições de operação para cada sistema em estudo foi realizada, visando à maximização da conversão da reação. Para isto, um programa de otimização foi aplicado a cada sistema, tendo como resposta a conversão maximizada e as condições experimentais referentes a este valor. Os resultados obtidos para cada sistema são apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Condições experimentais ótimas para cada sistema.

Óleo	Enzima	Conversão (%)		Condição experimental			
		Experimental	Predita	T (°C)	E (%p/p)	R	H (%p/p)
Mamona	Novozym 435	81,4	82,0	65	20	1:10	0
Soja	Novozym 435	9,1	12,1	65	5	1:3	0
Mamona	Lipozyme IM	98,0	99,6	65	20	1:3	0
Soja	Lipozyme IM	95,6	98,0	35	20	1:3	10

### Óleo de Mamona

Para o sistema contendo óleo de mamona-Lipozyme IM a condição otimizada foi 65°C, 20%p/p de enzima, razão molar óleo-etanol de 1:3 e 0% de água adicionada. Não houve a necessidade de se realizar esta etapa experimentalmente uma vez que a condição ótima estabelecida pela otimização foi a mesma já realizada no planejamento experimental (Experimento 7, Tabela 4.7). A conversão predita pelo modelo de otimização foi de 99,6%, apresentando boa concordância com o experimental (98,0%).

Utilizando o mesmo procedimento, a condição otimizada para o sistema óleo de mamona-Novozym 435, não contemplada no planejamento de experimentos, foi: temperatura de 65°C, concentração de enzima 20% p/p, 0% p/p de água adicionada e razão molar óleo-etanol de 1:10, com conversão predita pelo modelo de 82,0%. A Tabela 4.13 apresenta os dados cinéticos obtidos no experimento otimizado, mostrando certa discrepância com a conversão predita pelo modelo no tempo de 6h (74,5%), mas excelente concordância com o valor experimental encontrado para o tempo de 8 h (81,4%).

Tabela 4.13 – Conversões obtidas na otimização dos resultados da alcoólise enzimática do óleo de mamona utilizando enzima Novozym 435.

t (h)	T (°C)	E (% p/p)	R	H (%p/p)	Conversão (%)
1	65	20	1:10	0	51,2
2	65	20	1:10	0	75,4
3	65	20	1:10	0	31,1*
4	65	20	1:10	0	71,4
5	65	20	1:10	0	68,0
6	65	20	1:10	0	71,3
7	65	20	1:10	0	74,5
8	65	20	1:10	0	81,4

\* resultado espúrio

### Óleo de Soja

Para o sistema contendo óleo de soja-Lipozyme IM a condição otimizada foi 35°C, 20%p/p de enzima, razão molar óleo-etanol de 1:3 e 10% p/p de água adicionada. A condição ótima estabelecida na otimização foi a mesma já realizada no planejamento experimental (Experimento 4, Tabela 4.7). A conversão predita pelo modelo de otimização foi de 98,0%, apresentando boa concordância com o valor observado experimentalmente (95,6%).

Utilizando o mesmo procedimento, a condição otimizada para o sistema óleo de soja-Novozym 435, não contemplada no planejamento experimental, foi: temperatura de 65°C, concentração de enzima 5% p/p, 0% p/p de água adicionada e razão molar óleo-etanol de 1:3. A conversão predita pelo modelo (12,1%) apresentou concordância aceitável com o verificado experimentalmente (9,1%).

### **4.2.3 Conclusões parciais: Alcoólise de óleo vegetal utilizando lipases comerciais como catalisadores**

Com relação aos diferentes resultados obtidos, no que se refere à influência das variáveis de processo, pode-se concluir que a composição do óleo, o nível de saturação ou insaturação bem como as propriedades físico-químicas podem interferir na atividade enzimática e, conseqüentemente, na conversão do processo. Por isso há necessidade de estudos, com diferentes óleos vegetais, para se avaliar o real efeito das variáveis de processo, visto que para cada tipo óleo as variáveis apresentam influência diferente.

Analisando as tabelas apresentadas anteriormente (Tabelas 4.8 a 4.11) pode-se observar uma boa concordância entre os dados experimentais e os resultados obtidos pelos modelos empíricos propostos.

Desta forma, o emprego do planejamento de experimentos na otimização da conversão da reação de alcoólise de óleos vegetais usando lipases imobilizadas como catalisadores mostrou-se eficiente no estudo da influência das variáveis do processo. Um modelo empírico foi proposto para cada óleo e enzima, mostrando boa concordância com os dados experimentais obtidos. Os efeitos das variáveis em cada sistema puderam ser avaliados e uma análise minuciosa da influência destas na conversão do processo foi realizada.

## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 CONCLUSÕES

Tendo como perspectiva a utilização de biocatalisadores na reação de modificação de óleos e gorduras e devido à lacuna encontrada na literatura no que se refere ao uso de solventes orgânicos, um estudo sistemático da alcoólise enzimática de óleos vegetais – influência das variáveis de processo e cinética da reação – foi realizado neste trabalho. Como apresentado no capítulo anterior, este estudo permitiu a comparação da reação de alcoólise dos óleos de mamona e soja com o uso de catalisador químico e enzimático.

De acordo com o estudo realizado neste trabalho, algumas conclusões podem ser apresentadas, de acordo com o tipo de catalisador utilizado, para os sistemas que apresentam maior conversão em cada etapa.

Com relação à utilização de catalisador químico (NaOH), obteve-se conversão máxima de 96,2% para o sistema com óleo de mamona, nas condições de maior temperatura (70°C), concentração de catalisador (1,5%p/p) e razão molar óleo-etanol (1:9) e menor tempo (1h), mas como foi possível observar em várias condições experimentais para os diferentes sistemas estudados conversões acima de 90,0% também foram obtidas.

Quando da utilização de enzimas em solvente orgânico, a conversão mais elevada de 98,0% em 6 horas de reação, foi obtida para o sistema óleo de mamona – Lipozyme IM, nas condições de maior temperatura (65°C) e concentração de enzima (20% p/p) e menor concentração de água adicionada (0% p/p) e razão molar óleo-etanol (1:3), mostrando que na reação enzimática em solvente orgânico também conversão próxima a 100% foi obtida.

Tendo como base os resultados obtidos e as discussões para cada sistema apresentadas acima, algumas conclusões gerais podem ser apontadas:

- O emprego do planejamento de experimentos na otimização da conversão da reação de alcoólise enzimática de óleos vegetais usando lipases imobilizadas

como catalisadores mostrou-se eficiente no estudo da influência das variáveis do processo;

- Os resultados obtidos no planejamento experimental e análise da influência das variáveis são aplicáveis apenas no intervalo de estudo das variáveis. Como foi aplicado um planejamento com 2 níveis, apenas os extremos das variáveis foram analisados. Uma investigação mais aprofundada, estudo cinético, foi realizada objetivando a análise dos resultados obtidos dentro de todo o intervalo de interesse;
- Dependendo do sistema a ser estudado, uma nova avaliação deve ser efetuada. Como demonstrado neste estudo, as enzimas apresentam diferentes comportamentos, dependendo dos substratos, solventes e condições de operação.

## 5.2 SUGESTÕES

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

### Produção de ésteres utilizando NaOH como catalisador:

Avaliação do biodiesel obtido quanto às especificações que regulamentam o uso do produto como aditivo ao óleo diesel.

### Produção enzimática de ésteres em solvente orgânico:

- Avaliação da influência da quantidade de solvente orgânico adicionado ao meio reacional na conversão do processo;
- Avaliação do número de ciclos em que a enzima imobilizada possa ser utilizada sem perda considerável da atividade;
- Modelagem cinética dos dados experimentais obtidos;

- Avaliação do biodiesel obtido quanto às especificações que regulamentam o uso do produto como aditivo ao óleo diesel.

*Produção enzimática de ésteres em solventes alternativos:*

- Utilização de solventes alternativos (CO<sub>2</sub>, butano, propano) em substituição ao solvente orgânico;
- Avaliação da perda de atividade das lipases imobilizadas comerciais nos solventes alternativos;
- Avaliação do biodiesel obtido quanto às especificações que regulamentam o uso do produto como aditivo ao óleo diesel.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIA DE ÓLEOS VEGETAIS (ABIOVE). Disponível em: ><http://www.abiove.com.br>< Acesso em Janeiro de 2004.

ABRAMOWICZ, D. A. e KEESE, C. R. “Enzymatic transesterification of carbonates in water restrictes environments”. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, pp. 149-156, 1989.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO (ANP). Portaria nº XXX, de XX de abril de 2003. Regulamento Técnico ANP nº XX/2003.

AL SAADI, A. N. e JEFFREYS, G. V. “Esterification of butanol in a two phase liquid-liquid system”. **AIChE Journal**, v. 27, pp. 754-772, 1981.

ALTIN, R.; ÇETINKAYA, S. e YUCESU, H. S. “The potential of using vegetable oil fuels as fuel for diesel engines”. **Energy Conversion and Management**, v. 42, pp. 529-538, 2001.

ASANO, Y.; FUKUDA, Y. S.; TNAKA, A. e UEDA, M. “Biofuel production process by novel biocatalysts”. **Journal of molecular catalysis – B: enzymatic**, v. 17, pp. 111, 2002.

BARZANA, E.; KAREL, M. e KLIBANOV, A. M. “Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous phase”. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, pp. 1178-1185, 1989.

BASHEER, S.; SNAPE, J. B. e NAKAJIMA, M. “Interesterification kinetics of triglycerides and fatty acids with modified lipase in n-hexane”. **Journal of the American Oil Chemist Society**, v. 72, pp. 231-237, 1995.

BASRI, M.; YUNUS, W. Z. W.; YOONG, W. S.; AMPON, K.; RAZAK, C. N. A. E SALLEH, A. B. “Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer

beads for use in the synthesis of fatty esters". **Journal of Chemical, Technology and Biotechnology**, v. 66, pp. 169-173, 1996.

BRUNT, J. V. "Coaxing enzymes to act in organic solvents". **Biotechnology**, v. 4, n. 6, pp. 611, 1986.

CARTA, G.; GAINER, J. L. e ZAIDI, A. "Fatty acid esterification using nylon immobilized lipase". **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, pp. 601-605, 1995.

CASTRO, H. F. "Fine chemicals by biotransformation using lipase". **Química Nova**, v. 18, n. 6, pp. 544-554, 1995.

CHANG, M. K.; ABRAHAM, G. e JOHN, V. T. "Production of cocoa butter like fat from interesterification of vegetable oils". **Journal of the American Oil Chemist Society**, v. 67, n. 11, pp. 832-834, 1990.

CHULALAKSANANUKUL, W., CONDORET, J. S. e COMBES, D. "Geranyl acetate synthesis by lipase catalized transesterification in supercritical carbon dioxide". **Enzyme Microbiology Technology**, v. 15, pp. 691, 1993.

COELHO, I. "**Avaliação das exportações tradicionais baianas: caso de sisal e mamona**". Tese de M. Sc., Universidade Federal da Bahia –, 174p., 1979.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Disponível em: ><http://www.conab.gov.br><. Acesso em Janeiro de 2004.

DORDICK, J. S. "Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents". **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 11, pp. 194-211, 1989.

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

EMBRAPA: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: ><http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/CultivodaMamona/index.htm>< Acesso em Janeiro de 2004.

FEUGE, R. O. e GROSE, T. "Modification of vegetable oils. VII. Alkali catalized interesterification of peanut oil with ethanol". **Journal of the American Oil Chemist Society**, v. 26, pp. 97-102, 1949.

FILLIERES, R.; BENJELLOUN-MLAYAH, B.; DELMAS, M. "Ethanolysis of rapeseed oil: quantification of ethyl esters, mono-, di-, and triglycerides and glycerol by high performance size-exclusion chromatography". **Journal of the American Oil Chemist Society**, v. 72, pp. 427-432, 1995.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. "Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils". **Journal of the American Oil Chemist Society**, v. 61, pp. 1638-1643, 1984.

FREIRE, D. M. G. **Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. Tese de D. Sc., Instituto de Química da UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1996.

FROST, G. M. e MOSS, D. A. "Production of enzymes by fermentation". J. F. Kennedy (ed), **Biotechnology Enzyme Technology**, v. 7<sup>A</sup>, VCH Publishers, 1987.

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

GANDHI, N. N. "Applications of lipase". **Journal of the American Oil Chemist Society**, v. 74, n. 6, pp. 621-634, 1997.

HALLING, P. J. "High-affinity bindings of water by proteins is similar in air and in organic solvents". **Biochemistry Biophysics Acta**, v. 1040, pp. 225, 1990-a.

HALLING, P. J. "Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: predictions of effects on equilibrium position". **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 7, pp. 691-701, 1990-b.

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

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

JANSSEN, A. E. M. "**The effect of organic solvents on the equilibrium position of enzymatic acylglycerol synthesis**", Ph. D. dissertation, Landbouwwuniversiteit te Wageningen, Holanda, 1993.

KAUFMAN, A. J. e RUEBUSCH, P. J. "Oleochemicals: A world overview". **Proceedings of World Conference. Oleochemical**, Kuala Lumpur, Malaysia, 1990.

KLIBANOV, A. M. "Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents". **Trends in Biochemical Science**, v. 14, pp. 141-144, 1989.

KLIBANOV, A. M. "Why are enzymes less active in organic solvents than in water?" **Trends in Biochemical Science**, v. 15, pp. 97-101, 1997.

KUO, S. J. e PARKIN, K. L. "Solvent polarity influences product selectivity of lipase-mediated esterification reactions in microaqueous media". **Journal of the American Oil Chemist Society**, v. 73, n. 11, pp. 1427-1433, 1996.

LANGONE, M. A. P. “**Síntese de triglicerídeos catalisada por lipase**”. Tese de D. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1998.

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

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

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

MARTINEZ, M.; TORRANO, E. e ARACIL, J. “An analogue of jojoba oil. A statistical approach”. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 27, pp. 2179-2182, 1988.

MARTY, A.; CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; WILLEMOT, R. M. e DURAND, G. “Comparison of lipase-catalyzed Esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane”. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 1, pp. 11-16, 1990.

MEIRELLES, F. V. P. **Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica***. Tese de D. Sc., Instituto de Química da UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1997.

MERÇOM, F. **Hidrólise enzimática de óleo de babaçu em bio-reator de membrana**. Tese de D. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1998.

MITTELBAACH, M. “Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil”. **Journal of the American Oil Chemist Society**, v. 67, pp. 3, 1990.

MONACO, L. C. "Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais". **Relatório técnico – Ministério da Indústria e do Comércio – Secretaria de Tecnologia Industrial**, pp. 1-364, Brasília, DF, Brasil, 1985.

MONOT, F. "La catalyze enzymatique in milieu organique". **Revue de L'institut Français du Pétrole**, v. 49, n. 2, pp. 187-208, 1994.

MUNIYAPPA, P. R.; BRAMMER, S. C.; NOUREDDINI, H. "Improved conversion of plant oils and animal fats into biodiesel and co-product". **Bioresource Technology**, v. 56, n. 1, pp. 19-24, 1996.

MURAYAMA, T., "Evaluating vegetable oils as a diesel fuel", **Inform**, v.5, n.10, pp.1138-1145, 1994.

MUSTRANTA, A.; FORSELL, P. e POUTANEN, K. "Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems". **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 15, pp. 133-139, 1993.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R.; MAZZUCO, L. M. " Biotransformação de óleos e gorduras". **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, ano 3, n.19 , pp. 28-31, 2001.

NOVO NORDISK. "Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions". **Relatório interno da Novo Nordisk**, A-05948, 1992.

OLIVEIRA, D. **Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solvente orgânico e CO<sub>2</sub> supercrítico**. Tese de D. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro- COPPE, RJ, Brasil, 1999.

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

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

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. "Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO<sub>2</sub>". **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 19, pp. 141-148, 2001.

PINTO, J. C.; NORONHA, F. B.; MONTEIRO, J. L.; LOBÃO, M. W. e SANTOS, T. J. "**ESTIMA: um pacote computacional para estimação de parâmetros e projetos de experimentos**". PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 1987.

PRAZERES, D. M. F.; GARCIA, F. A. P. e CABRAL, J. M. S. "Na ultrafiltration membrane reactor for the lipolysis of olive oil in reversed micellar media". **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, pp. 761-770, 1993.

QUEIROZ JUNIOR, P. C. **Hidrólise enzimática de óleo de babaçu em reatores agitados**. Tese de D. Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1996.

RELATÓRIO FINAL PETROBRAS – ETAPA AGRIBUSINESS. **Projeto: Otimização do processo de produção de biodiesel**. Realizado pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões – Campus Erechim / Centro Tecnológico – Departamento de Ciências Agrárias, 2003.

SANTOS, R.F. dos; BARROS, A.L.; MARQUES, F.M.; FIRMINO, P. de T. e REQUIÃO, L.E.G. Análise Econômica. In: AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E.F. (eds.). "O agronegócio da mamona no Brasil": **EMBRAPA-SPI**, pp.17-35, 2001.

SELMI, B.; GONTIER, E.; ERGAN, F. e THOMAS, D. "Enzymatic synthesis of tricaprylin in a solvent-free system: Lipase regioespecificity as controlled by glycerol adsorption on silica gel". **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 8, pp. 543-547, 1997.

SMITH, M. K. "Process of producing esters". **USPatent 2**, pp. 444-486, 1949.

SCNEIDER, R. C. S. “**Extração, caracterização e transformação do óleo de rícino**”. Tese de D. Ms., UFRGS/Instituto de Química, Porto Alegre, RS, Brasil, 2003.

SRIVASTAVA, A. e PRASAD, R. “Triglycerides-based diesel fuels”. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 4, pp. 111-133, 2000.

STAMATIS, H.; XENATIS, A.; BORNSCHEVER, V.; SCHEPER, T.; MENGE, U. e KOLISIS, F. N. “*Pseudomonas cepacia* lipase: Esterification reactions in AOT microemulsion systems”, **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 7, pp. 703-708, 1993.

STEVENSON, D. E. e STORER, A. C. “Papain in organic solvents: determination of conditions suitable for biocatalysis and the effect on substrate specificity and inhibition”. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, pp. 519-527, 1991.

van DER PADT, A. “**Enzymatic acylglycerol síntesis in membrane reactor**”. Ph. D. dissertation, Landbouwniversiteit te Wageningen, Holanda, 1993.

VIEIRA, R.M.; LIMA, E.F. e BATISTA, F.A.S. “Diagnóstico e perspectivas da mamoneira no Brasil”. In: Reunião temática matérias-primas oleaginosas no Brasil: diagnóstico, perspectivas e prioridades de pesquisa, 1997, Campina Grande. **Anais... Campina Grande: EMBRAPA-CNPA/MAA/ABIOVE**, p.139-150 (Embrapa-CNPA. Documentos, 63).

YAMANE, T. “Importance of moisture content control for enzymatic reactions in organic solvents: a novel concept of microaqueous biocatalysis”. **Biocatalysis**, v. 2, pp. 1-9, 1988.

YAMANE, T.; ICHIRYU, T.; NAGATA, M.; UENO, A. e SIMIZU, S. “Intramolecular esterification by lipase in microaqueous benzene: effect of moisture content”. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, pp. 1063-1069, 1990.

YANG, Z. e RUSSEL, A. J. "Fundamentals of non-aqueous enzymology". In: Koskinen, A. M. D. e Klibanov, A. M. (eds), **Enzymatic Reactions in Organic Media**, 1ª ed., London, Blackie Academic & Professional, 1996.

ZHANG, Y.; DUBÉ, M. A.; McLEAN, D. D. e KATES, M. "Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment". **Bioresource Technology**, v. 89, pp. 1-16, 2003.

ZAKS, A. e KLIBANOV, A. M. "Enzyme catalyzed processes in organic solvents". **Proceedings of National Academy Science**, v. 82, pp. 3192, 1985.

## APÊNDICE A – DADOS EXPERIMENTAIS DA CONVERSÃO EM ÉSTERES EM FUNÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS CONSTITUINTES DO ÓLEO DE SOJA – ETANÓLISE CATALISADA POR LIPOZYME IM.

Experimento	Tempo (h)	Conversão (%)				Global
		Etil palmitato	Etil linoleato/ Etil oleato	Etil linolenato	Etil estearato	
1	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	1,094	3,846	0,065	0,027	5,032
	2	2,000	7,004	0,101	0,044	9,149
	3	2,727	4,832	0,359	0,056	7,975
	4	3,145	5,754	0,388	0,060	9,346
	5	3,730	6,558	0,454	0,076	10,818
	6	5,724	13,758	0,296	0,115	19,893
	7	6,591	16,268	0,381	0,146	23,386
	8	6,264	16,234	0,335	0,142	22,975
2	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	0,085	0,208	0,014	0,003	0,310
	2	-	-	-	-	-
	3	0,031	0,100	0,003	0,001	0,135
	4	0,023	0,074	0,001	0,000	0,098
	5	0,016	0,052	0,001	0,000	0,069
	6	0,047	0,091	0,000	0,000	0,139
	7	0,044	0,107	0,002	0,001	0,154
	8	0,084	0,172	0,003	0,002	0,260
3	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	3,677	12,198	0,087	0,062	16,024
	2	7,564	18,314	0,281	0,119	26,279
	3	8,230	18,024	0,546	0,154	26,954
	4	7,346	13,517	0,954	0,158	21,975
	5	7,995	14,267	0,904	0,162	23,328
	6	10,158	21,081	1,082	0,202	32,524
	7	-	-	-	-	-
	8	12,362	23,840	1,298	0,240	37,740
4	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	5	40,698	48,267	0,755	0,227	89,948
	6	18,860	50,869	2,104	0,233	72,066
	7	11,847	55,627	0,683	0,149	68,306
	8	15,505	78,456	1,463	0,211	95,635

	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	1,343	3,803	0,135	0,024	5,304
	2	2,116	6,404	0,232	0,034	8,786
	3	1,847	4,815	0,186	0,030	6,877
5	4	1,935	5,224	0,232	0,032	7,423
	5	1,786	4,054	0,196	0,031	6,067
	6	2,046	6,984	0,175	0,035	9,240
	7	1,700	5,381	0,184	0,032	7,297
	8	3,117	9,989	0,273	0,049	13,427
	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	5,334	17,049	0,243	0,072	22,698
	2	1,975	7,847	0,120	0,038	9,981
	3	2,683	8,587	0,243	0,048	11,560
6	4	6,788	17,462	0,577	0,109	24,936
	5	0,959	4,766	0,072	0,017	5,815
	6	2,924	13,251	0,187	0,056	16,481
	7	0,648	2,278	0,055	0,012	2,993
	8	5,961	18,950	0,278	0,076	25,264
	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	7,176	24,746	0,082	0,094	32,097
	2	5,084	20,863	0,073	0,084	26,104
	3	8,662	26,710	0,240	0,147	35,759
7	4	9,154	30,204	0,294	0,161	39,814
	5	4,047	14,174	0,180	0,117	18,517
	6	3,166	5,142	0,255	0,114	8,677
	7	4,024	5,210	0,285	0,140	9,660
	8	7,003	22,790	0,232	0,165	30,189
	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	0,256	0,497	0,008	0,005	0,766
	2	0,244	0,648	0,011	0,009	0,912
	3	0,499	1,244	0,022	0,013	1,778
	4	0,065	0,133	0,001	0,000	0,199
8	5	0,163	0,430	0,000	0,000	0,593
	6	0,487	1,009	0,008	0,009	1,514
	7	1,664	3,021	0,037	0,026	4,748
	8	0,610	1,230	0,013	0,011	1,863
	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	3,143	7,123	0,342	0,090	10,699
	2					
	3	3,969	9,044	0,425	0,110	13,548
9	4	4,209	10,446	0,443	0,119	15,217
	5	7,144	14,476	0,396	0,175	22,190
	6	4,775	13,660	0,211	0,152	18,798
	7	1,699	3,230	0,100	0,049	5,077
	8	8,272	16,216	0,672	0,242	25,403

## APÊNDICE B – DADOS EXPERIMENTAIS DA CONVERSÃO EM ÉSTERES EM FUNÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS CONSTITUINTES DO ÓLEO DE SOJA – ETANÓLISE CATALISADA POR NOVOZYM 435.

Experimento	Tempo (h)	Conversão (%)				Global
		Étil palmitato	Étil linoleato/ Étil oleato	Étil linolenato	Étil estearato	
1	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	0,225	0,409	0,052	0,009	0,695
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	0,336	0,492	0,054	0,013	0,895
	5	0,381	0,588	0,060	0,015	1,044
	6	-	-	-	-	-
	7	0,413	0,664	0,067	0,016	1,161
	8	0,371	0,603	0,062	0,015	1,051
2	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	0,081	0,174	0,024	0,004	0,283
	2	0,076	0,166	0,022	0,003	0,267
	3	0,099	0,203	0,029	0,004	0,336
	4	0,126	0,250	0,032	0,005	0,414
	5	0,065	0,156	0,022	0,002	0,246
	6	0,044	0,105	0,020	0,002	0,171
	7	0,069	0,151	0,027	0,003	0,249
	8	0,078	0,174	0,031	0,004	0,285
3	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	0,240	0,286	0,055	0,009	0,590
	2	0,293	0,406	0,056	0,012	0,767
	3	0,188	0,277	0,041	0,009	0,514
	4	-	-	-	-	-
	5	0,667	0,982	0,105	0,026	1,779
	6	-	-	-	-	-
	7	0,742	1,215	0,104	0,027	2,089
	8	0,746	0,960	0,124	0,027	1,857
4	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	-	-	-	-	-
	2	0,217	0,470	0,051	0,008	0,747
	3	0,247	0,379	0,041	0,007	0,675
	4	0,216	0,343	0,044	0,007	0,610
	5	0,214	0,391	0,043	0,008	0,657
	6	0,245	0,420	0,055	0,008	0,729
	7	0,215	0,375	0,046	0,008	0,644
	8	0,263	0,457	0,045	0,008	0,773

	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	0,763	1,071	0,149	0,028	2,011
	2	0,946	1,123	0,162	0,030	2,261
	3	3,297	5,438	0,833	0,448	10,015
5	4	4,186	5,322	0,600	0,118	10,227
	5	2,228	3,668	0,282	0,072	6,249
	6	3,384	4,533	0,385	0,100	8,401
	7	5,581	5,391	0,257	0,175	11,404
	8	4,534	6,226	0,873	0,184	11,816
	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	0,510	0,957	0,060	0,014	1,514
	2	0,550	0,937	0,080	0,018	1,584
	3	0,491	0,661	0,071	0,015	1,238
6	4	0,428	0,659	0,094	0,014	1,194
	5	1,173	1,312	0,088	0,026	2,599
	6	1,292	1,669	0,168	0,031	3,160
	7	0,995	1,324	0,106	0,026	2,451
	8	2,131	3,779	0,273	0,051	6,234
	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	5,020	7,177	0,429	0,103	12,729
	2	4,632	8,078	0,492	0,125	13,327
	3	5,815	7,607	0,453	0,142	14,017
7	4	4,393	7,318	0,943	0,136	12,789
	5	0,795	4,407	0,207	0,029	5,438
	6	2,504	5,551	0,350	0,072	8,476
	7	6,108	8,003	0,847	0,155	15,113
	8	3,214	6,022	0,488	0,105	9,829
	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	0,339	0,675	0,016	0,012	1,041
	2	-	-	-	-	-
	3	1,516	2,697	0,042	0,032	4,287
8	4	1,512	2,607	0,176	0,038	4,333
	5	3,453	4,587	0,384	0,080	8,504
	6	0,996	1,474	0,129	0,029	2,629
	7	3,469	5,696	0,719	0,105	9,989
	8	2,632	2,945	0,207	0,054	5,839
	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	1	0,366	0,556	0,063	0,018	1,004
	2	0,310	0,447	0,045	0,012	0,814
	3	0,278	0,437	0,033	0,008	0,756
9	4	0,238	0,382	0,034	0,007	0,662
	5	0,297	0,502	0,045	0,010	0,854
	6	0,184	0,460	0,023	0,006	0,672
	7	0,764	1,182	0,095	0,021	2,062
	8	0,333	0,618	0,051	0,013	1,014

## APÊNDICE C – PROCEDIMENTO UTILIZADO PARA OS CÁLCULOS DA CONVERSÃO E CROMATOGRAMAS TÍPICOS OBTIDOS DA REAÇÃO ENZIMÁTICA DOS ÓLEOS VEGETAIS.

### ÓLEO DE SOJA

Obteve-se as áreas de cada composto pelos cromatogramas das amostras injetadas. Para etil palmitato, etil estearato e etil linolenato observou-se áreas bem definidas, já o etil linoleato e etil oleato não foi possível observar a separação dos picos devido a grande semelhança estrutural destes compostos, que apresentaram praticamente o mesmo tempo de retenção.

Em paralelo às injeções das amostras, injetou-se amostras de padrões externos (etil palmitato, etil linolenato, etil linoleato, etil oleato e etil estearato na concentração de 100ppm) e interno (esqualeno) na concentração de 1000ppm.

Possíveis erros de injeção das amostras foram minimizados dividindo-se a área de cada composto pela área do padrão interno, obtendo uma área corrigida. A área de cada composto corrigida foi multiplicada pelo fator de resposta ( $F_i$ ) de cada composto e pelo volume de diluição (5 mL de n-propanol) da amostra a ser injetada. Assim, obteve-se a concentração de cada composto na amostra.

Cálculo para obtenção do  $F_i$  de cada composto :

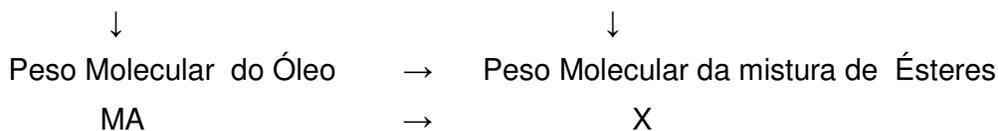
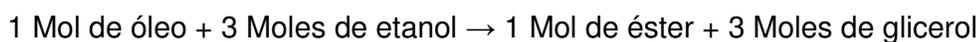
- $F_i$  etil palmitato:  $\frac{\text{área padrão}}{\text{área esqualeno}} = \frac{1270627}{1798084} = 0,7067$

- $F_i$  etil linoleato/oleato:  $\frac{\text{área padrão}}{\text{área esqualeno}} = \frac{790066}{1798084} = 0,4393$

• Fi etil linolenato:  $\frac{\text{área padrão}}{\text{área esqualeno}} = \frac{1139287}{1798084} = 0,6336$

• Fi etil estearato:  $\frac{\text{área padrão}}{\text{área esqualeno}} = \frac{1209096}{1798084} = 0,6724$

Tendo em mãos a concentração de cada composto em cada corrida, calculou-se a conversão da reação:



onde: MA = massa de óleo utilizada na reação (média utilizada = 1,005 g);

X = massa de ésteres teórica (g).

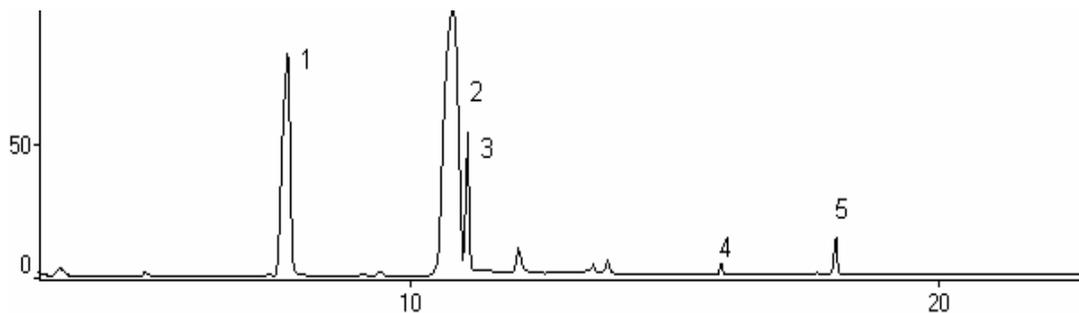
Para obter-se a conversão da reação em percentagem faz-se:

$$\begin{array}{ccc} \text{X} & \rightarrow & 100\% \\ \text{C} & \rightarrow & \text{Y} \end{array}$$

onde: C = concentração em etil éster (g);

Y = conversão da reação (%).

Cromatograma típico obtido da injeção das amostras.



(Pico 1: etil palmitato; pico 2: etil linoleato/etil oleato; pico 3: etil linolenato; pico 4: etil estearato e pico 5: esqualeno).

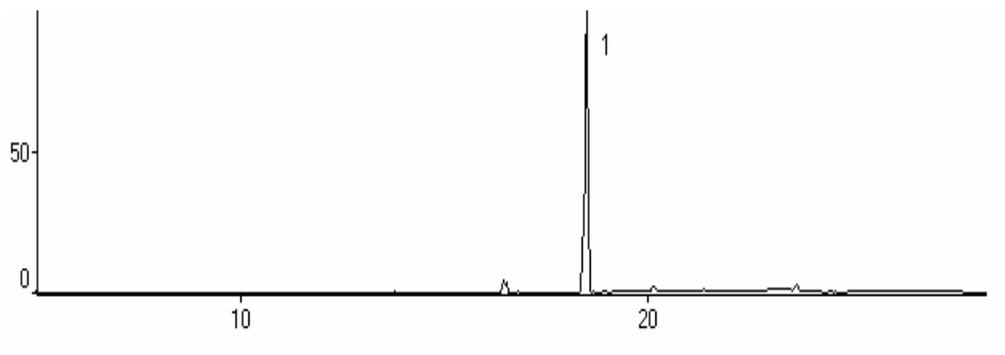
### **ÓLEO DE MAMONA**

Obteve-se a área do composto principal pelo cromatograma das amostras injetadas.

Em paralelo às injeções das amostras, injetou-se amostras de padrão externo (etil ricinoleato na concentração de 0,25ppm), onde a média das áreas foi utilizada para obtenção do fator de resposta ( $F_i = C / A$ ), necessário para o cálculo da concentração de éster ( $C = F_i \times A$ ). Como não foi utilizado padrão interno, o padrão externo foi injetado primeiramente, em todos os dias que foram realizadas injeções de amostras.

Tendo em mãos a concentração do composto em cada corrida, então calculou-se a conversão da reação da mesma forma que para o óleo de soja.

Cromatograma típico obtido da injeção das amostras.



(Pico 1: etil ricinoleato).