

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS DE FONTE VEGETAL E  
ANIMAL CATALISADA POR  
PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE LIPASE IMOBILIZADA NA PRESENÇA DE  
ETANOL VISANDO A  
PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Poliana Carneiro Tiosso  
Engenheiro Químico, UEM, 2006  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisella Maria Zanin (DEQ/UEM)  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Heizir Ferreira de Castro (EEL/USP)  
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli (UFSFCar)

Dissertação de Mestrado submetida à  
Universidade Estadual de Maringá, como parte  
dos requisitos necessários à obtenção do Grau de  
Mestre em Engenharia Química, área de  
Desenvolvimento de Processos.

Maringá – PR – Brasil  
Agosto de 2010

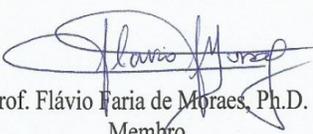
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por Poliana Carneiro Tiosso perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 23 de agosto de 2010.

COMISSÃO JULGADORA

  
Profª Drª Gisella Maria Zanin  
Orientadora

  
Profª Drª Cleide Mara Faria Soares  
Membro

  
Prof. Flávio Faria de Moraes, Ph.D.  
Membro

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central – UEM, Maringá – PR., Brasil)

T594t	<p>Tiosso, Poliana Carneiro</p> <p>Transesterificação de triglicerídeos de fonte vegetal e animal catalisada por preparações comerciais de lipase imobilizada na presença de etanol visando a produção de biodiesel / Poliana Carneiro Tiosso. -- Maringá, 2010. 78 f. : il. algumas color.</p> <p>Orientadora: Prof.a Dr.a Gisella Maria Zanin. Coorientadora: Prof.a Dr.a Heizir Ferreira de Castro. Coorientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2010.</p> <p>1. Biodiesel. 2. Óleo de babaçu. 3. Óleo de pinhão manso. 4. Óleo de palma (dendê). 5. Óleo de andiroba. 6. Sebo bovino. 7. Etanol. 8. Enzimas. 9. Enzimas imobilizadas. 10. Lipases. I. Zanin, Gisella Maria, orient. II. Castro, Heizir Ferreira de, coorient. III. Tardioli, Paulo Waldir, coorient. IV. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.</p> <p>CDD 22.ed. 660.2842</p>
-------	---

TIOSSO, POLIANA CARNEIRO

Transesterificação de Triglicerídios  
de Fonte Animal e Vegetal por Preparações  
Comerciais de Lipase Imobilizada na Presença  
de Etanol Visando a Produção de Biodiesel  
[Paraná] 2010 Xiii, 93p. 29,7cm (PEQ/UEM,  
M.Sc., Engenharia Química, 2010).

Dissertação – Universidade Estadual de  
Maringá – PEQ

1. Biodiesel
2. Óleo de Babaçu
3. Óleo de Pinhão Manso
4. Óleo Palma (dendê)
5. Óleo de Andiroba
6. Sebo Bovino
7. Etanol
8. Enzimas
9. Enzimas Imobilizadas
10. Lipases

I. PEQ/UEM      II. Título (série)

**DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais: Sueli e José Carlos,  
Obrigada por terem me concebido a vida,  
e me ensinarem a vive-la com dignidade,  
iluminando os caminhos obscuros com afeto e dedicação.  
Obrigada por todos os ensinamentos, por todo carinho, e paciência,  
que assim possibilitaram a realização de mais este sonho.*

*À minha linda irmã Kauhana,  
obrigada pela amizade, pelo carinho,  
sempre me ajudando nos momentos difíceis.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, tornando possível a realização desta conquista. Obrigado Senhor, por ter me concedido forças e capacidade em todos os momentos difíceis.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Gisella Maria Zanin, minha orientadora. Obrigada pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela confiança e incentivo. Agradeço pela ótima orientação, amizade, paciência, dedicação, pelos conselhos e acima de tudo por estar ao meu lado sempre que precisei de seu apoio.

Ao Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli pela co-orientação.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Heizir Ferreira de Castro por toda ajuda em meus experimentos e permissão ao uso das instalações do laboratório de Biocatálise do Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP).

A todos os alunos do Grupo de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) que me receberam prontamente e auxiliaram em minhas análises em seu laboratório.

A todos os funcionários e professores do DEQ-UEM e DEQUI-EEL que, de um modo ou de outro, são parte deste trabalho, especialmente os engenheiros Lauro e Luiza.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro recebido para o desenvolvimento deste trabalho

**TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS DE FONTE VEGETAL E  
ANIMAL CATALISADA POR  
PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE LIPASE IMOBILIZADA NA PRESENÇA DE  
ETANOL VISANDO A  
PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

**AUTOR: POLIANA CARNEIRO TIOSSO**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. GISELLA MARIA ZANIN**

**CO-ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> HEIZIR FERREIRA DE CASTRO, PhD**

**CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. PAULO WALDIR TARDIOLI**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química;  
Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 –  
Maringá – PR, Brasil, defendida em 23 de agosto de 2010. 93 p.

**RESUMO**

Neste trabalho foram sintetizados ésteres etílicos de óleo de babaçu, pinhão manso, palma, andiroba e sebo bovino, através da transesterificação enzimática. Inicialmente foram determinadas as propriedades físico-químicas das matérias-primas; como os índices de acidez, peróxidos, iodo e suas composições de ácidos graxos. Para as reações de transesterificação, três lipases diferentes foram utilizadas: lipase de *Candida antarctica* (Novozym 435) imobilizada em resina acrílica macroporosa, lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) imobilizada em sílica porosa granulada e a lipase de *Burkholderia cepacia* (Lipase PS) imobilizada em terra diatomácea. As reações foram conduzidas em reatores fechados contendo 20g de substrato, que consistia de óleo ou gordura animal, e etanol anidro sem a presença de solventes, em uma razão molar óleo-etanol de 1:9 para os óleos vegetais e 1:6 para o sebo bovino. A mistura foi incubada com as lipases de diferentes fontes sob carregamento de 10% de enzima em relação à massa do meio reacional (%m/m). Os experimentos foram realizados a 50°C, sob agitação magnética, por um período máximo de 48h. Foram retiradas amostras para quantificar os ésteres etílicos formados por cromatografia gasosa. A viscosidade cinemática do biodiesel obtido também foi determinada. Os maiores rendimentos foram obtidos para os óleos de babaçu e pinhão manso, com as enzimas Novozym 435 (94,90 e 98,85%) e Lipase PS (96,92 e 100%). Apesar de apenas o biodiesel

produzido a partir do óleo de babaçu ter alcançado em 48h viscosidade na faixa de 3,0 a 6,0cSt, como determina a Agência Nacional de Petróleo para uso de biocombustíveis no país, o processo enzimático foi capaz de produzir biodiesel com boa qualidade.

**TRANSESTERIFICATION OF TRIGLYCERIDES FROM PLANT AND ANIMAL  
SOURCES CATALYZED BY IMMOBILIZED COMERCIAL LIPASE PREPARATIONS  
IN THE PRESENCE OF ETHANOL AIMING A  
PRODUCING OF BIODIESEL**

**AUTHOR: POLIANA CARNEIRO TIOSSO**

**SUPERVISOR: PROF<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. GISELLA MARIA ZANIN**

**CO-SUPERVISOR: PROF<sup>a</sup> HEIZIR FERREIRA DE CASTRO, PhD**

**CO-SUPERVISOR: PROF. Dr. PAULO WALDIR TARDIOLI**

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brasil, presented on August, 23<sup>rd</sup>, 2010. 93 p.

**ABSTRACT**

In this work we synthesized ethyl esters of babassu oil, *Jatropha*, palm, andiroba and tallow by enzymatic transesterification. Initially the physicochemical properties of the raw materials were determined, such as, as acidity, peroxide and iodine indices and fatty acid composition. Three different lipases were used for doing the transesterification reactions: lipase from *Candida antarctica* (Novozym 435) immobilized on macroporous acrylic resin, lipase from *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) immobilized on porous silica and granulated lipase from *Burkholderia cepacia* (Lipase PS) immobilized in diatomite. The reactions were conducted in a closed reactor containing 20 g of substrate, which consisted of oil or animal fat and anhydrous ethanol, without the presence of solvents in an oil-ethanol molar ratio of 1:9 for vegetable oils and 1:6 for tallow. The mixture was incubated with lipases from different sources under a loading of 10% w/w of enzyme and reaction mass of the medium. The experiments were performed at 50°C under magnetic stirring, for a maximum period of 48 hours. Samples were collected to quantify ethyl esters formed by gas chromatography. The kinematic viscosity of biodiesel produced was also measured. The highest yields were obtained by babassu oil and *Jatropha*, with enzymes Novozym 435 (94,90 and 98,85%) and Lipase PS (96,92 and 100%). Although only biodiesel made from babassu oil had reached in 48h viscosity in the range 3,0 to 6,0 cSt, as determined by the National Petroleum Agency for

the use of biofuels in the country, the enzymatic process was able to produce biodiesel with good quality.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÍNDICE.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. ÓLEOS E GORDURAS.....	4
2.2. USO DE ÓLEOS E GORDURAS COMO COMBUSTÍVEL.....	5
2.2.1. Microemulsão.....	5
2.2.2. Pirólise.....	6
2.2.3. Transesterificação.....	7
2.3. Biodiesel.....	9
2.3.1 Normas e propriedades do biodiesel.....	9
2.3.1.1. Viscosidade.....	12
2.3.1.2. Número de cetano.....	13
2.3.1.3. Ponto de névoa.....	14
2.3.1.4. Ponto de fulgor.....	14
2.3.1.5. Água e sedimentos.....	15
2.3.1.6. Índice de iodo.....	15
2.3.1.7. Glicerina livre ou total.....	15
2.3.1.8. Resíduos de carbono.....	16
2.3.1.9. Teor de enxofre.....	16
2.3.1.10 Índice de Acidez.....	16
2.3.2. Matérias-primas para a produção de biodiesel.....	16
2.3.2.1. Babaçu.....	18
2.3.2.2. Palma.....	22
2.3.2.3. Andiroba.....	21
2.3.2.4. Pinhão manso.....	24
2.3.2.5. Sebo Bovino.....	27
2.4. Enzimas.....	28

2.4.1. Lipases.....	30
2.4.1.1. Especificidade das lipases.....	31
2.4.1.2. Estrutura e mecanismo de atuação das lipases.....	32
2.4.1.3. Reações catalisadas pelas lipases.....	34
2.4.2. Enzimas Imobilizadas.....	35
2.4.2.1. Métodos de Imobilização.....	36
2.4.2.2. Lipases Imobilizadas.....	38
2.4.2.2.1. Novozym 435.....	38
2.4.2.2.2. Lipozyme TL IM.....	38
2.4.2.2.3. PS Amano IM.....	39
2.5 TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEOS E GORDURAS.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 MATERIAIS.....	43
3.1.1. Fontes de lipases.....	43
3.1.2. Substratos.....	43
3.1.3. Outros reagentes.....	43
3.2. EQUIPAMENTOS.....	44
3.3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	44
3.3.1. Caracterização das fontes de lipase.....	44
3.3.2. Caracterização das matérias-primas lipídicas.....	45
3.3.2.1. Índice de Acidez (I.A.).....	45
3.3.2.2. Índice de Peróxido (I.P.).....	46
3.3.2.3. Índice de Saponificação (I.S.).....	46
3.3.2.4. Índice de Iodo (I.I.).....	47
3.3.2.5. Quantificação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa.....	47
3.3.3 Refino do óleo de pinhão manso.....	48
3.3.4 Síntese de biodiesel.....	49
3.3.4.1. Separação dos ésteres (recuperação do glicerol).....	50
3.3.5 Análises do biodiesel.....	51
3.3.5.1. Determinação dos ésteres formados nas reações de transesterificação.....	51
3.3.5.2. Análise de viscosidade da matéria lipídica e do biodiesel.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53

4.2. Caracterização das matérias-primas lipídicas.....	53
4.2.1. Composição química e propriedades.....	53
4.3. Resultados referentes à triagem de lipases imobilizadas na síntese de biodiesel pela transesterificação de diferentes matérias-primas lipídicas (óleos vegetais e sebo bovino).....	59
4.3.1. Viscosidade cinemática do biodiesel.....	57
5. CONCLUSÕES.....	62
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	63
7. REFERÊNCIAS.....	64
8. ANEXOS.....	76
ANEXO 8.1.....	76
ANEXO 8.2.....	76
ANEXO 8.3.....	77
ANEXO 8.4.....	77
ANEXO 8.5.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Hidrólise de um triacilglicerídeo.....	4
<b>Figura 2.2.</b> Transesterificação de triacilglicerídios (triglicerídios).....	7
<b>Figura 2.3.</b> (a) Palmeira de babaçu, (b) frutos de babaçu, (c) amêndoas de babaçu.....	19
<b>Figura 2.4.</b> (a) Palmeira do dendê, (b) frutos do dendê.....	21
<b>Figura 2.5.</b> (a) Árvore de andiroba, (b) frutos de andiroba, (c) amêndoas de andiroba.....	22
<b>Figura 2.6.</b> (a) Frutos verdes de pinhão manso, (b) frutos maduros de pinhão manso, (c) sementes de pinhão manso onde ficam as amêndoas.....	25
<b>Figura 2.7.</b> Estrutura genérica de um polipeptídeo mostrando, à direita o resíduo C-terminal e à esquerda o N-terminal.....	28
<b>Figura 2.8.</b> Reações catalisadas por lipases tipo não-específica e 1,3 específica.....	31
<b>Figura 2.9.</b> Diagrama de fitas da lipase de <i>Candida rugosa</i> com as tampas abertas e fechadas. As folhas $\beta$ (azul claro) e N-terminal (azul escuro). As hélices que envolvem as folhas $\beta$ -centrais são representadas em amarelo e a aberta em vermelho. Os resíduos aminoácidos que formam a tríade catalítica são mostrados em vermelho.....	33
<b>Figura 2.9.</b> Reações catalisadas por lipases.....	35
<b>Figura 2.10.</b> Métodos de imobilização de enzimas.....	37
<b>Figura 3.1.</b> Reator de vidro utilizado para a síntese de biodiesel.....	49
<b>Figura 3.2.</b> Decantação do biodiesel.....	51
<b>Figura 4.1.</b> Rendimento de transesterificação empregando diferentes lipases imobilizadas (-■- Lipozyme TL IM; -●-Novozym 435, -▲-PS Amano IM) em função do tempo de reação da etanolise de diferentes fontes lipídicas: (a) Óleo de babaçu, (b) Óleo de pinhão manso(c) Óleo de Palma, (d) Óleo de Andiroba, (e) Sebo Bovino.....	58

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial.....	9
<b>Tabela 2.2.</b> Algumas das especificações brasileiras para o biodiesel e números das normas.....	11
<b>Tabela 2.3.</b> Campos e aplicações das enzimas.....	29
<b>Tabela 2.4.</b> Exemplos de aplicações industriais de lipases.....	30
<b>Tabela 2.5.</b> Comparação entre o processo enzimático e o processo alcalino para a produção de biodiesel.....	40
<b>Tabela 2.6.</b> Produção enzimática de biodiesel por transesterificação de óleos e gorduras.....	42
<b>Tabela 3.1.</b> Tipo de análise e equipamentos utilizados nos ensaios.....	44
<b>Tabela 3.2.</b> Condições experimentais das reações de transesterificação.....	50
<b>Tabela 3.3.</b> Condições para determinação dos ésteres de etila.....	52
<b>Tabela 4.1.</b> Valores de atividade hidrolítica das fontes de lipase.....	53
<b>Tabela 4.2.</b> Caracterização das matérias lipídicas.....	53
<b>Tabela 4.3.</b> Composição percentual em ácidos graxos dos óleos de babaçu, palma, pinhão manso, andiroba e sebo bovino.....	55
<b>Tabela 4.4.</b> Valores de rendimento (%), e produtividade (mg/g.h) obtidos nas reações de transesterificação para cada material lipídico catalisados por diferentes lipases imobilizadas.....	56
<b>Tabela 4.5.</b> Concentração em ésteres de etila formados das reações de transesterificação enzimática de diferentes fontes lipídicas e etanol, no tempo de 48horas.....	57
<b>Tabela 4.6.</b> Valores de viscosidade cinemática (cSt) obtidos nas reações de etanolise para cada material lipídico catalisados por diferentes lipases imobilizadas.....	60

## 1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a política energética, que há alguns anos restringia-se, em termos gerais, às variações de preço do barril do petróleo, hoje se impõe como assunto estratégico na agenda de prioridades dos governos. A mudança de perspectiva dos países sobre os investimentos em energia reflete, em grande medida, a relevância que o tema veio a adquirir. A emergência de fenômenos contemporâneos relacionados à atividade energética e à observância de suas consequências no desenvolvimento econômico e na estabilidade política dos países, transformaram o tema em assunto de segurança nacional para os Estados.

Como principais exemplos desses acontecimentos, pode-se mencionar: o potencial esgotamento das reservas de petróleo fóssil em contraponto ao seu consumo contínuo pelas nações; o aumento do preço do petróleo em descompasso com a baixa inflação do mercado; a garantia incerta de fornecimento de petróleo devido à instabilidade política nas principais regiões produtoras no mundo; a adoção de medidas para redução da poluição advindas do consumo dos combustíveis, com vistas à preservação do meio ambiente; a existência do Tratado de Kyoto que traça a política dos países sobre o meio ambiente, estabelecendo metas de controle das emissões de CO<sub>2</sub> a partir de 2008; a elevação de preços dos alimentos e conseguinte diminuição de seu consumo como consequência da exploração de novas reservas de petróleo, entre outras (BRANCO, 2009).

Por essas razões, torna-se imprescindível uma mudança radical na matriz energética mundial, com forte aumento da participação das fontes renováveis. Nesse cenário, os biocombustíveis surgem como uma alternativa altamente viável.

O Brasil tem, portanto, uma oportunidade ímpar de se firmar como um dos líderes mundiais no setor de energia. Impulsionado por seu gigantesco potencial hídrico, uma enorme biodiversidade de matérias-primas e contando com um forte programa de combustíveis alternativos capitaneado pelo etanol, o país sai na frente dos demais (VICHI e MANSOR, 2009).

Os dois principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil são o etanol (álcool) extraído de cana-de-açúcar e, em escala crescente, o biodiesel, que é produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais e adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis. Cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos no Brasil já são renováveis. No resto do mundo, 86% da energia vêm de fontes energéticas não-renováveis. Pioneiro mundial no uso de biocombustíveis, o Brasil alcançou uma posição almejada por

muitos países que buscam fontes renováveis de energia, como alternativas estratégicas ao petróleo (ANP, 2010).

A produção de biodiesel é considerada área prioritária para o desenvolvimento no país desde 2002 quando foi anunciado pelo Governo Federal o Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel (PROBIODIESEL), tendo como objetivo estabelecer um arcabouço regulatório para o desenvolvimento e a produção nacional de biodiesel (KNOTHE *et al.*, 2006). O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo, com uma produção anual, em 2009, de 1,6 bilhões de litros e uma capacidade instalada, em janeiro de 2010, para cerca de 4,7 bilhões de litros (ANP, 2010).

Desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 26 de outubro de 2009, que aumentou de 4% para 5% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel. A contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis (ANP, 2010).

Atualmente a produção de biodiesel ainda depende das produtoras de óleo vegetal, sendo a produção por matéria prima correspondente a 81% à soja, 8% ao caroço de algodão, 5% ao sebo, 4% ao óleo de palma, 2% à mamona e 1% ao girassol (ABDALLA *et al.*, 2008). Levando-se em conta a grande diversidade de matérias-primas que o Brasil possui, é necessário analisar adequadamente os diversos parâmetros envolvidos, como custos de produção, taxas de emissões ao longo do ciclo de vida do produto e nível de empregos gerados. Por exemplo, de acordo com levantamento feito pelo NAE (Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República), o balanço energético do biodiesel de soja, sem levar em consideração os subprodutos, resulta em uma relação produção/consumo de 1,43, ou seja, para cada unidade de energia investida na produção de soja para combustível, é produzida 1,43 unidade de energia renovável. Para o dendê, o balanço energético chega a 5,6, e para a macaúba, 4,2 (RIBEIRO, 2010).

A metodologia comercial de obtenção de biodiesel utiliza freqüentemente catalisadores homogêneos (alcalinos ou ácidos) para a transesterificação do óleo ou gordura. Mas a rota enzimática já vem sendo investigada no país por diversos pesquisadores. Ela tem como principal vantagem a obtenção de biodiesel com maior

pureza, uma vez que o processo permite uma separação mais fácil de seu co-produto (QUINTELLA *et al.*, 2009).

Neste contexto, objetivou-se no presente trabalho a síntese enzimática de biodiesel com o uso de diferentes materiais lipídicos: óleo de babaçu, óleo de pinhão manso, óleo de palma, óleo de andiroba e sebo bovino. Todos buscando não comprometer a cadeia alimentar e apresentando alta produtividade. Este trabalho foi desenvolvido com a meta de analisar a influência do tipo de óleo/gordura, e o tipo de lipase utilizados sobre o rendimento de ésteres etílicos para um período máximo de reação estipulado.

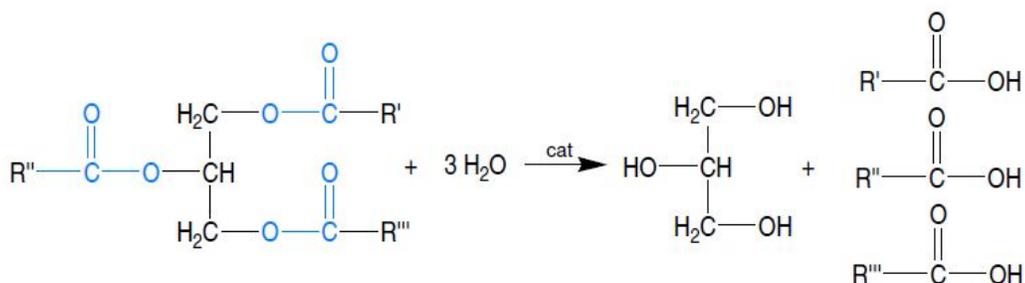
Os resultados deste estudo e outros complementares permitirão aprimorar a síntese enzimática de biodiesel, a fim de atingir maior rendimento de processo, menor consumo de energia, redução de resíduos, permitindo desta forma a obtenção de resultados satisfatórios que possam competir com a via química nas biotransformações de compostos de interesse do setor oleoquímico e energético.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta sessão serão revisados alguns aspectos importantes que auxiliarão a análise do trabalho realizado.

### 2.1. ÓLEOS E GORDURAS

As primeiras pesquisas sobre a constituição de óleos e gorduras foram realizadas pelo químico e físico francês, Michel-Eugène Chevreul, no início do século XIX. O cientista mostrou que a hidrólise de óleos e gorduras dava origem a ácidos graxos e glicerol (Figura 2.1) (GUNSTONE, 1967).



**Figura 2.1.** Hidrólise de um triacilglicerídeo.

Fonte: GUNSTONE, 1967.

A partir destas observações, as gorduras e os óleos passaram a ser denominados de ésteres de glicerol (glicerídeos, acilglicerídeos ou triglicerídeos). Portanto, o triglicerídeo é um éster formado a partir de ácidos carboxílicos de cadeia longa (ácidos graxos) e glicerol (STREITWIESER *et al.*, 1992).

Os ácidos graxos, constituintes dos triglicerídeos, mais comuns apresentam 12, 14, 16 ou 18 átomos de carbono, embora ácidos com menor ou maior número de átomos de carbono possam ser encontrados em vários óleos e gorduras. Devido à enorme variedade de ácidos graxos fica evidente que os óleos e gorduras são compostos de muitos tipos de triglicerídeos com diferentes graus de insaturação.

O ponto de fusão dos triglicerídeos depende da quantidade de insaturações em seus ácidos graxos. Os triglicerídeos líquidos à temperatura ambiente são denominados óleos, sendo o seu conteúdo de ácidos graxos insaturados elevado; os sólidos ou pastosos à

temperatura ambiente são referidos como gorduras e nessas há predominância de ácidos graxos saturados. Além dos triglicerídeos, os óleos vegetais apresentam em sua composição quantidades apreciáveis de ácidos graxos livres, fosfolipídeos, esteróis e tocoferóis.

## **2.2 USO DE ÓLEOS E GORDURAS COMO COMBUSTÍVEL**

Dentre as fontes de biomassa prontamente disponíveis, os óleos vegetais merecem grande enfoque, apesar de seu uso como combustíveis não ser uma novidade. Inventor do motor Diesel, o alemão Rudolf Diesel apresentou um motor abastecido com óleo de amendoim em uma exposição em Paris em 1900 (SHAY, 1993).

No entanto, apesar de energeticamente favorável, o uso direto de óleos vegetais como combustíveis para motores é problemático. Devido à sua alta viscosidade (aproximadamente 11 a 17 vezes maior que a do óleo diesel) e baixa volatilidade, eles apresentam algumas desvantagens: combustão incompleta, formação de depósitos de carbono nos sistemas de injeção, diminuição da eficiência de lubrificação, obstrução nos filtros de óleo e sistemas de injeção, comprometimento da durabilidade do motor (TASHTOUSH *et al.*, 2003) e formação de acroleína (uma substância altamente tóxica e cancerígena) pela decomposição térmica do glicerol. Muitas abordagens diferentes têm sido consideradas para reduzir a viscosidade de óleos vegetais, as quais são descritas a seguir.

### **2.2.1. Microemulsão**

As microemulsões são formadas por três tipos de componentes: óleo, álcool e um composto anfifílico. Os compostos anfifílicos são selecionados principalmente por sua capacidade de emulsificar as misturas de óleo/álcool, mas sua estrutura também contribui nas propriedades finais do combustível formulado. A formulação de um combustível híbrido, tal como as microemulsões, são geralmente mais baratas de se preparar do que o biodiesel, uma vez que se usa a simples tecnologia de misturar os componentes em temperatura ambiente. Todavia, apesar das microemulsões apresentarem boas características, no que diz respeito aos padrões de atomização, verificou-se que, em longo prazo, provocam a deposição de carbono no motor, a combustão incompleta e o aumento da viscosidade dos óleos lubrificantes (KNOTHE *et al.*, 2006).

### 2.2.2. Pirólise

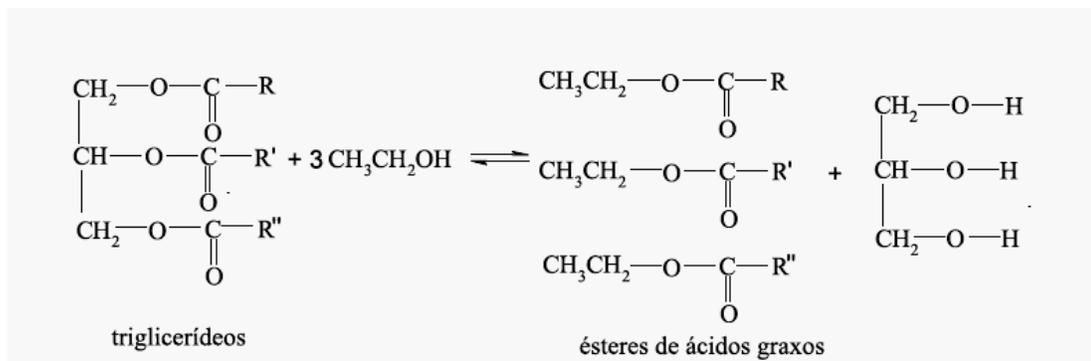
O craqueamento térmico, ou pirólise, é a conversão de uma substância em outra por meio do uso de calor, isto é, pelo aquecimento da mesma, na ausência de ar ou oxigênio, em temperaturas superiores a 450°C, sendo que esse processo pode, ou não, ser catalisado. A decomposição térmica de triglicerídeos produz compostos tais como alcanos, alcenos, alcadienos, compostos aromáticos e ácidos carboxílicos (MA e HANNA, 1999). Os produtos gerados por esse processo são similares aos derivados de petróleo, tanto diesel quanto gasolina, porém, apresentam algumas desvantagens, tais como:

- (i) muitas vezes gera-se um combustível mais equivalente à gasolina que ao diesel,
- (ii) o elevado custo dos equipamentos utilizados nesse processo e
- (iii) rendimentos modestos.

### 2.2.3. Transesterificação

Dentre todas essas alternativas, a transesterificação pode ser considerada como a melhor escolha, pois esse processo é relativamente simples e as características físico-químicas dos ésteres de ácidos graxos (biodiesel) são muito semelhantes às do óleo diesel. A transesterificação é largamente empregada para a redução da viscosidade dos triglicerídeos, melhorando as propriedades físicas dos combustíveis para o motor a diesel (SCHUCHARDT *et al.*, 1998). Na transesterificação (Figura 2.2) um triglicerídeo reage com um álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador que pode ser ácido básico, metálico ou biológico, produzindo uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos e glicerol, sendo que a mistura de ésteres é o que se denomina biodiesel (LIMA *et al.*, 2007).

O processo global de síntese de biodiesel é uma sequência de três reações consecutivas e reversíveis nas quais diglicerídeos e monoglicerídeos são formados como intermediários. A estequiometria da reação requer um mol de triglicerídeo para três de álcool. No entanto, excesso de álcool é utilizado para aumentar a conversão em ésteres monoalquílicos. A reação de transesterificação pode ser catalisada tanto por catalisadores homogêneos quanto heterogêneos – os quais podem ser ácidos ou básicos (MA e HANNA, 1999).



**Figura 2.2.** Tansesterificação de triacilglicerídios (triglicerídios).

Fonte: FROEHNER *et al.*, 2007.

Industrialmente o processo mais empregado para a obtenção de biodiesel é a transesterificação química de óleos vegetais (triglicerídeos) ou gordura animal com metanol ou etanol, na presença de catalisador alcalino (PINTO *et al.*, 2005; MARCHETTI *et al.*, 2007). Entretanto, o uso de catalisadores alcalinos apresenta alguns inconvenientes, como a dificuldade na recuperação do glicerol, impossibilidade de retirada do catalisador do meio reacional, a necessidade de tratamento dos efluentes, a existência de reações competitivas entre os ácidos graxos livres e a água da reação (MARCHETTI *et al.*, 2007).

Para superar essas limitações, algumas alternativas têm sido propostas, entre as quais a rota enzimática pode ser considerada como uma das mais promissoras, em função das vantagens apresentadas em termos de condições reacionais mais brandas, facilidade de recuperação do glicerol e facilidade de purificação dos ésteres obtidos (PINTO *et al.*, 2005; KNOTHE *et al.*, 2006).

### 2.3. BIODIESEL

De um modo geral, o biodiesel foi definido pela “National Biodiesel Board” dos Estados Unidos como o derivado monoalquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores do ciclo Diesel) (COSTA NETO, 2000).

O biodiesel reduz significativamente a emissão de gases, como partículas de carbono e monóxido de carbono (FELIZARDO, 2003); possibilita a redução de

importações de petróleo e diesel refinado, além de gerar trabalho, principalmente no setor primário, pelo cultivo de oleaginosas (QUINTELLA *et al.*, 2009).

Além de ser totalmente compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades, o biodiesel ainda apresenta várias vantagens adicionais em comparação com esse combustível fóssil. A Tabela 2.1 apresenta algumas características complementares usualmente atribuídas ao biodiesel, em comparação com o diesel convencional (COSTA NETO, 2000).

O biodiesel pode ser utilizado puro, na forma de mistura, como complemento ao diesel extraído de petróleo, ou em baixas proporções como aditivo. As misturas binárias de biodiesel e óleo diesel de petróleo são designadas pela abreviação BX, onde X é a porcentagem de biodiesel na mistura. Por exemplo, B2 é uma mistura binária cuja porcentagem de biodiesel é igual a 2 %, B5 possui 5 % de biodiesel (PARENTE, 2003).

Um das grandes vantagens do biodiesel é sua adaptabilidade aos motores do ciclo diesel. Enquanto o uso de outros combustíveis limpos, como o gás natural ou biogás, requer adaptação dos motores, a combustão de biodiesel pode dispensá-la, configurando em uma alternativa técnica capaz de atender a frota movida a diesel (RAMOS *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, 2005).

Contudo, estudo da União Européia mostra aumento das emissões de NOx associado ao biodiesel em relação as do diesel de petróleo e esse aumento tem sido confirmado por muitos estudos, entretanto, não é impedimento para a disseminação do biodiesel devido às grandes vantagens em relação aos outros poluentes, mas deve ser considerado porque é um dos principais precursores do ozônio troposférico, atualmente o mais grave problema de qualidade do ar na maior cidade brasileira. É um incremento pequeno se comparado com as reduções de grande magnitude dos outros poluentes. Ademais, há estudos em andamento visando reduzir a formação do NOx mediante o emprego de catalisadores adequados, a identificação da fonte ou propriedade que pode ser modificada para minimizar as emissões e a mudança do tempo de ignição do combustível, com a finalidade de alterar as condições de pressão e temperatura de modo a proporcionar menor formação de óxido de nitrogênio (<http://www.biodieselbr.com/efeito-estufa/gases/emissoes.htm>).

**Tabela 2.1.** Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial.

<b>Características</b>	<b>Propriedades Complementares</b>
Características químicas Apropriadas	Livre de enxofre e compostos aromáticos, alto número de cetanos, ponto de combustão apropriado, excelente lubrificidade, não tóxico e biodegradável.
Menos poluente	Reduz sensivelmente as emissões de (a) partículas de carbono (fumaça), (b) monóxido de carbono, (c) óxidos sulfúricos, e (d) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.
Economicamente competitivo	Complementa todas as novas tecnologias do diesel com desempenho similar e sem a exigência de instalação de uma infra-estrutura ou política de treinamento.
Reduz o aquecimento global	É constituído por carbono neutro, ou seja, o combustível tem origem renovável ao invés da fóssil. Desta forma, sua obtenção e queima não contribuem para o aumento das emissões de CO <sub>2</sub> na atmosfera, zerando assim o balanço de massa entre emissão de gases dos veículos e absorção dos mesmos pelas plantas.
Economicamente atraente	Permite a valorização de subprodutos de atividades agroindustriais, aumento na arrecadação regional de ICMS, aumento da fixação do homem no campo, e de investimentos complementares em atividades rurais.
Regionalização	Pequenas e médias plantas para a produção de biodiesel, podem ser implantadas em diferentes regiões do país, aproveitando a matéria-prima disponível em cada local.

Fonte: (COSTA NETO, 2000).

### 2.3.1. Normas e propriedades do biodiesel

Para que a qualidade do biodiesel produzido esteja dentro de uma faixa normal de qualidade, foram estabelecidas especificações nacionais e internacionais que estabelecem os limites que determinadas características físico-químicas a que os (bio) combustíveis devem atender.

Cada norma, específica, portanto, traz consigo uma metodologia padrão adequada, com todos os detalhes sobre equipamentos e calibrações a serem utilizados na determinação em questão. A maioria das normas para o biodiesel foi adaptada das normas para combustíveis derivados do petróleo, o que pode ser observado pelas normas da ASTM - American Society for Testing and Materials.

As especificações de qualidade para os biocombustíveis devem atender às necessidades do país consumidor e, portanto, cada país produtor, tem autonomia para decidir sobre os limites de suas especificações. Os fatores específicos vão desde o tipo de matéria-prima empregada na produção, condições climáticas em que o combustível é armazenado, até o tipo de motor e sistema de injeção que podem influenciar na eficiência energética do biocombustível.

A Áustria foi o primeiro país a definir e aprovar os padrões de qualidade para biodiesel, aplicados a ésteres metílicos de colza. Subsequentemente, padrões de qualidade foram sendo estabelecidos em outros países. Atualmente o padrão de qualidade americano, elaborado pela ASTM (*American Society of Testing and Materials*), através da norma ASTM D6751, e o estabelecido na União Européia através da norma EN 14214 do Comitê Europeu de Normalização (*Comité Européen de Normalisation - CEN*) figuram como os mais conhecidos e são geralmente usados como referência ou base para outros padrões (LÔBO *et al.*, 2009).

No Brasil, as normas americanas e européias são utilizadas como padrões. As especificações do B100, a ser misturado com o diesel mineral, são estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), através da Resolução nº 07 de 2008 (RANP 07/08) que substituiu a Resolução nº 42 de 2004, tornando os critérios de avaliação da qualidade do biodiesel brasileiro mais restritivos. Os padrões de qualidades presentes nesta resolução foram constituídos com base nas normas ASTM D6751 e EN 14214 (Tabela 2.2) (LÔBO *et al.*, 2009).

**Tabela 2.2.** Algumas das especificações brasileiras para o biodiesel e número das respectivas normas.

Característica	Unidade	Limite	Método		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII <sup>(1)</sup>	-	-	-
Massa específica a 20° C	kg/m <sup>3</sup>	850-900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 - EN ISO 12185
Viscosidade cinemática a 40°C	Mm <sup>2</sup> /s	3,0-6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água, máx. <sup>(2)</sup>	mg/kg	500	-	6304	EN ISO 12937
Ponto de fulgor, mín. <sup>(3)</sup>	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Resíduo de carbono <sup>(4)</sup>	% massa	0,050	15586	4530	-
Número de cetano <sup>(5)</sup>	-	Anotar	-	613 6890 <sup>(6)</sup>	EN ISO 5165
Ponto de névoa, máx.	°C	19 <sup>(7)</sup>	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448 -	664 -	- EN 14104
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 15771 - -	6584 -	- EN 14105 EN 14106
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344 -	6584 -	- EN 14105
Mono, di, triacilglicerol <sup>(5)</sup>	% massa	Anotar	15342 15344	6584	- - EN 14105
Metanol ou etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de iodo <sup>(5)</sup>	g/100g	Anotar	-	-	EN14111

Fonte: Modificado ANP, 2010.

<sup>(1)</sup> Límpido e isento de impurezas com anotação da temperatura de ensaio.

<sup>(2)</sup> O limite indicado deve ser atendido na certificação do biodiesel pelo produtor ou importador.

<sup>(3)</sup> Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130°C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.

<sup>(4)</sup> O resíduo deve ser avaliado em 100% da amostra.

<sup>(5)</sup> Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da tabela de especificação a cada trimestre civil. Os resultados devem ser enviados pelo produtor de biodiesel à ANP, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de matéria-prima, o produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de matérias-primas utilizadas.

<sup>(6)</sup> Poderá ser utilizado como método alternativo o método ASTM D6890 para número de cetano.

<sup>(7)</sup> O limite máximo de 19°C é válido para as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Bahia, devendo ser anotado para as demais regiões. O biodiesel poderá ser entregue com temperaturas superiores ao limite supramencionado, caso haja acordo entre as partes envolvidas. Os métodos de análise indicados não podem ser empregados para biodiesel oriundo apenas de mamona.

Alguns parâmetros importantes de análise para biocombustíveis, bem como a importância de sua determinação, consideradas as normas vigentes serão descritas a seguir.

### **2.3.1.1. Viscosidade**

A viscosidade é a medida da resistência oferecida pelo diesel ao escoamento. Seu controle visa permitir uma boa atomização do óleo e preservar sua característica lubrificante. A viscosidade do biodiesel aumenta com o comprimento da cadeia carbônica e com o grau de saturação e tem influência no processo de queima na câmara de combustão do motor. Alta viscosidade ocasiona heterogeneidade na combustão do biodiesel, devido à diminuição da eficiência de atomização na câmara de combustão, ocasionando a deposição de resíduos nas partes internas do motor (LÔBO *et al.*, 2009).

Menores valores de viscosidade reduzem a emissão de fumaça e de materiais particulados e um melhor desempenho no consumo de combustível. A viscosidade cinemática do biodiesel aumenta com o aumento da cadeia carbônica e é inversamente proporcional ao número de insaturações nela presentes. Para um mesmo composto insaturado a viscosidade apresenta uma maior dependência da configuração da dupla ligação (cis ou trans) do que da posição das mesmas (KNOTHE, 2005).

Apesar de ser favorável do ponto de vista energético o uso de óleos *in natura*, como alternativa para combustíveis, foi relativamente abandonado principalmente devido ao problema da alta viscosidade dos óleos. Estudos efetuados em diversos óleos vegetais mostraram que a sua combustão direta conduz à carbonização na cabeça do injetor,

resistência à injeção nos segmentos dos êmbolos, diluição do óleo do cárter, contaminação do óleo lubrificante, entre outros problemas. As causas desses problemas foram atribuídas à polimerização dos triacilgliceróis por meio de suas duplas ligações que conduzem à formação de depósitos, assim como à baixa volatilidade e à elevada viscosidade dos óleos vegetais que geram problemas na atomização do combustível (KNOTHE *et al.*, 2006).

O processo de transesterificação deve reduzir a viscosidade inicial do óleo ou gordura para valores similares às do diesel (KNOTHE *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2003). Assim a determinação da viscosidade é essencial à especificação do produto.

### **2.3.1.2. Número de cetano**

O número de cetano (NC) é o primeiro indicativo da qualidade de um combustível para motores do ciclo diesel. A qualidade de ignição de um combustível para máquina diesel pode ser medida pelo número de cetano (NC) ou calculado pelo índice de cetano (IC). (PARENTE, 2003). O tempo decorrido entre o início da injeção e o início da combustão é chamado de atraso de ignição. Este atraso é consequência do tempo requerido para que ocorra a pulverização, aquecimento e evaporação do combustível, e a sua mistura com o ar seguido das reações químicas precursoras da combustão e finalmente da auto-ignição da mistura. Quanto menor for o atraso melhor será a qualidade de ignição do combustível (GERPEN *et al.*, 2004).

O número de cetano é obtido por meio de um ensaio padronizado do combustível em um motor mono-cilíndrico, onde se compara o seu atraso de ignição em relação a um combustível padrão com número de cetano conhecido. O combustível padrão é uma mistura equivalente de n-hexadecano ou cetano (NC = 100) e alfa-metilnaftaleno (NC = 0). Portanto, um combustível com NC = 45 tem a mesma qualidade de ignição que uma mistura dos padrões acima contendo 45% de cetano. O heptametilnonano (HMN), com NC = 15, foi adotado como o limite inferior da escala, em substituição ao alfa-metilnaftaleno do procedimento original, por ser um composto mais estável (GERPEN *et al.*, 2004). O número de cetano é determinado a uma velocidade constante em câmara de pré-combustão do tipo utilizada em motores de ignição por compressão.

Valores fora de uma faixa adequada para combustível diesel ocasionam problemas no bom funcionamento do motor. Combustíveis com alto número de cetano, a combustão pode ocorrer antes do combustível e do ar estarem apropriadamente misturados, resultando na emissão de fumaça e uma combustão incompleta. Valores de número de cetano muito

baixos podem ocasionar trepidações no motor, falhas no funcionamento, aumento excessivo na temperatura do ar, aquecimento lento do motor na partida fria (1ª partida do dia). Portanto, existe uma faixa para o número de cetano que os fabricantes de motores diesel recomendam que seja entre 40 e 50. A escala de cetano esclarece a causa dos triacilgliceróis encontrados nos óleos e gorduras serem adequados para uma alternativa de combustível diesel. A cadeia longa, linear e não ramificada dos ácidos graxos, similar às existentes em *n*-alcanos dos combustíveis dieleis tradicionais de boa qualidade, remetem a um alto número de cetano.

Estudos feitos nessa área investigaram a relação que as matérias-primas e os álcoois reagentes têm sobre as diversas propriedades do biodiesel. Geralmente, número de cetano, calor de combustão, ponto de fusão e viscosidade aumentam claramente com o aumento da cadeia dos ácidos graxos e decrescem quando aumentam a insaturação (KNOTHE, 2005).

#### **2.3.1.3. Ponto de névoa**

O ponto de névoa é a temperatura inicial de cristalização dos componentes saturados do combustível (KNOTHE, 2005). Valores do ponto de névoa superiores à temperatura ambiente conduzem a maiores dificuldades de partida do motor e a perdas de potência do equipamento devido à obstrução das tubulações e filtros do sistema de combustível. A estabilidade ao frio representa um inconveniente para a aceitação do biodiesel como combustível alternativo, principalmente em países de clima temperado.

A melhora nessas propriedades implica em diminuir a temperatura inicial de cristalização dos componentes saturados e de solidificação do combustível. Isto pode ser alcançado pela mistura de biodiesel ao óleo diesel mineral, adição de aditivos redutores de cristalização e misturas de ésteres graxos de álcoois ramificados com os ésteres metílicos ou etílicos (GERPEN *et al.*, 2004, KNOTHE, 2005).

#### **2.3.1.4. Ponto de fulgor**

O ponto de fulgor é a temperatura mínima onde é observada a liberação de vapores de um líquido, em quantidade suficiente para formar uma mistura inflamável com o ar. Para o biodiesel, os valores de ponto de fulgor são, consideravelmente, mais elevados que os valores encontrados para o diesel mineral. Para o biodiesel puro o valor do ponto de fulgor encontra-se próximo aos 170 °C, porém, mínimas quantidades de álcool adicionadas ao

biodiesel ocasionam um decréscimo bastante significativo neste valor. Este comportamento torna o ponto de fulgor um parâmetro muito importante quanto à segurança no armazenamento e no transporte, principalmente quando a transesterificação foi realizada com metanol que, além de altamente inflamável, apresenta elevada toxidez (LÔBO *et al.*, 2009).

#### **2.3.1.5. Água e sedimentos**

A presença de água e de sedimentos em níveis superiores aqueles prefixados é altamente prejudicial ao biodiesel, pois acelera sua deterioração e prejudica sua combustão, além de acelerar a saturação dos filtros e provocar danos ao sistema de combustível (GERPEN *et al.*, 2004). A água também ocasiona o crescimento de microorganismos na interface do sistema água/combustível.

#### **2.3.1.6. Índice de iodo**

O número de iodo é uma medida do grau de saturação, ou do número de duplas ligações carbono-carbono que se encontram presentes nas cadeias dos ácidos graxos que compõem o biodiesel (KNOTHE *et al.*, 2006). O número de insaturações não tem apenas efeito nos valores de densidade e de viscosidade dos biodieseis, mas também é de grande importância na estabilidade oxidativa dos biodieseis (LÔBO *et al.*, 2009).

#### **2.3.1.7. Glicerina livre ou glicerina total**

O teor de glicerina livre refere-se ao glicerol presente no combustível devido à separação incompleta das fases após o término da transesterificação (FREEDMAN *et al.*, 1986). Embora o glicerol seja insolúvel no biodiesel, esse subproduto pode permanecer suspenso no biodiesel ou ligeiramente solubilizado no combustível. Uma alta quantidade de glicerina pode levar a problemas no injetor e pode contribuir para a formação de depósitos no sistema de injeção, pistões e válvulas.

### **2.3.1.8. Resíduos de carbono**

A porcentagem de resíduo de carbono correlaciona-se com a quantidade de depósitos que podem ser deixados pelo combustível na câmara de combustão. Valores altos de resíduo de carbono podem levar à formação de uma quantidade excessiva de resíduo na câmara de combustão e causar contaminação de óleo lubrificante por fuligem (GERPEN *et al.*, 2004). A causa mais comum de carbono residual excessivo no biodiesel é um nível elevado de glicerina total, uma vez que esses contaminantes apresentam combustão incompleta e conseqüentemente geram depósito de carbono no motor (MEHER *et al.*, 2006). Os ácidos graxos livres, sabões e polímeros também resultarão em excesso de carbono residual.

### **2.3.1.9. Teor de enxofre**

O teste de teor de enxofre indica a contaminação do biodiesel por material protéico, principalmente se a matéria-prima empregada para produzir o biodiesel for óleo ou gordura residual (GERPEN *et al.*, 2004). Outras possíveis fontes de contaminação são os catalisadores a base de enxofre empregados no processo e os reagentes utilizados nas etapas de purificação do biodiesel (ácidos utilizados na neutralização e lavagem do produto). A presença de enxofre no combustível pode acarretar a formação de compostos que liberados na queima são responsáveis por sérios danos ao meio ambiente a exemplo da chuva ácida.

### **2.3.1.10 Índice de Acidez**

O monitoramento da acidez no biodiesel é de grande importância durante a estocagem, na qual a alteração dos valores neste período pode significar a presença de água (LÔBO *et al.*, 2009).

## **2.3.2. Matérias-primas para a produção de biodiesel**

Com relação ao álcool, somente álcoois simples, tais como, metanol, etanol, propanol, butanol e pentanol têm sido usados na produção do biodiesel. Os ésteres mais comumente empregados são os ésteres metílicos, principalmente porque o metanol

geralmente é o álcool mais barato, embora existam exceções em alguns países. No Brasil, por exemplo, onde o etanol é mais barato, ésteres etílicos são utilizados como combustível (KNOTHE *et al.*, 2006).

A razão molar entre o óleo e o álcool é um dos principais fatores que influenciam na extensão da reação de transesterificação. Na literatura são reportadas várias razões molares e as mais citadas variam de 6:1 (óleo:álcool) até 43:1, no caso de condições supercríticas (DABDOUB *et al.*, 2009). Encinar *et al.*, (2002) estudaram a etanólise de óleo de *Cynara* variando as razões molares de óleo/etanol entre 1:3 a 1:15. Os melhores resultados foram obtidos para as reações realizadas com razões molares ente 1:9 e 1:12. Já as reações empregando razões molares inferiores a 1:6 foram incompletas e com baixos rendimentos. Com razão molar igual a 1:15 houve maiores problemas na etapa de separação do glicerol.

Qualquer lipídio de origem animal ou vegetal pode ser considerado como adequado para a produção de biodiesel. Os fatores importantes e que deverão nortear as pesquisas, os avanços e, conseqüentemente, o sucesso do biodiesel no que diz respeito à escolha da matéria-prima são: composição química do óleo extraído da fonte em questão; elevado rendimento energético por unidade de área; produção abundante de óleos a custos reduzidos (DABDOUB *et al.*, 2009).

Os triglicerídios de óleos vegetais, com cadeias curtas ou longas de ácidos graxos, têm grau de saturação que é função do tipo da semente que originou o óleo. Óleos que possuem maior número de ácidos graxos saturados, como por exemplo, o óleo de babaçu (rico em ácidos láurico), apresenta-se em estado sólido à temperatura de 20–25°C; aqueles cujo teor de poliinsaturados é mais elevado, por exemplo, soja, algodão, amendoim (ricos em ácidos linoléico/ oléico) apresentam-se em estado líquido à temperatura ambiente ou abaixo desta (DA RÓS, 2009).

Embora o biodiesel produzido a partir do óleo de soja seja o mais usado no Brasil, algumas desvantagens são pertinentes a esse óleo; como a formação de depósitos de carbono por combustão incompleta, devido à redução da eficiência de lubrificação do óleo, decorrente da polimerização de ácidos graxos poliinsaturados, como exemplo, os ácidos linoléico e linolênico, presentes em grande concentração nesse óleo e também pela presença de gomas e fosfolipídios que auxiliam no entupimento dos sistemas de injeção (DA RÓS, 2009).

O Brasil possui condições edafoclimáticas favoráveis à produção de uma gama considerável de espécies oleaginosas com potencial imediato para a produção de biodiesel

e para a forte demanda prestes a se instalar. Algumas dessas espécies são de ocorrência nativa, como o babaçu, a mamona e o buriti. Outras constituem culturas ditas de ciclo curto (soja, girassol, milho, amendoim etc.) e outras, culturas perenes, como a palma ou o dendê (COUTO *et al*, 2006). Estas duas últimas espécies são produzidas nacionalmente, e seus óleos apresentam reduzida concentração de ácidos poliinsaturados, gomas e fosfolipídios, o que torna atrativo suas aplicações em reações de síntese de biodiesel.

Dentre as gorduras animais com potencial para a produção de biodiesel, destacam-se o sebo bovino, os óleos de peixes, o óleo de mocotó, a banha de porco, entre outros. Os óleos e gorduras de animais possuem estruturas químicas semelhantes às dos óleos vegetais, sendo moléculas triglicéridicas de ácidos graxos. As diferenças estão nos tipos e distribuições dos ácidos graxos combinados com o glicerol.

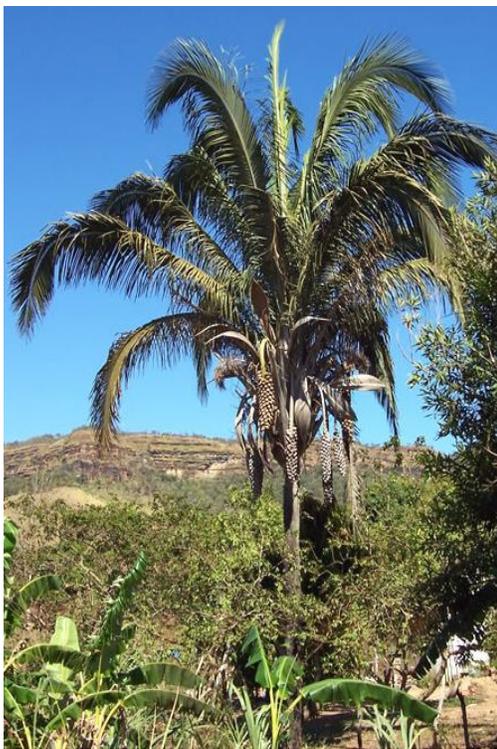
Também são surpreendentes os volumes ofertados de sebo de animais, especialmente de bovinos, nos países produtores de carnes e couros, como é o caso do Brasil. Tais matérias-primas são ofertadas, em quantidades substantivas, pelos curtumes e pelos abatedouros de animais de médio e grande porte. O sebo bovino é a matéria-prima mais barata dentre as disponíveis atualmente para a produção de biodiesel no Brasil. (COSTA NETO, 2002)

Recentemente, o sebo bovino tem-se revelado como uma promissora fonte de matéria-prima para a produção industrial de biodiesel devido à sua alta produção e baixo custo de comercialização. Essa matéria-prima tem potencial para contribuir com uma parcela de 12% na produção industrial de biodiesel.

A seguir são abordados alguns tópicos das matérias-primas graxas empregadas no desenvolvimento do trabalho.

### **2.3.2.1. Babaçu**

O coco de babaçu conhecido como baguaçu ou coco-de-macaco (*Orrbignya speciosa*), pertence à família botânica da Palma original no Brasil - Região Amazônica e Mata Atlântica na Bahia (Figura 2.3). Os frutos são ovais alongados, de coloração castanha; a polpa é farinácea e oleosa, envolvendo de 3 a 6 sementes oleaginosas. Cresce espontaneamente nas matas da região amazônica, sem cultivo, multiplica-se por sementes. Cada palmeira pode produzir até 2.000 frutos anualmente, preferindo clima quente (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2010).



(a)



(b)



(c)

**Figura 2.3.** (a) Palmeira de babaçu, (b) frutos do babaçu, (c) amêndoas do babaçu.

Fonte: <http://www.google.com.br/images>

O principal produto extraído do babaçu, e que possui valor mercantil e industrial, são as amêndoas contidas em seus frutos. Constituindo cerca de 60% do peso da amêndoa, o óleo delas extraído é matéria prima para a fabricação de sabão, glicerina, sabonete, xampu, cremes, amida, gorduras especiais e óleo comestível. A torta ou ralão como é chamada a massa com até 8% de óleo que resta do processo de prensagem para obtenção do óleo, é utilizada na produção de ração animal (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2010).

Apesar dessa potencialidade, medida pela dimensão de ocorrência e valor econômico das várias aplicações já testadas, a exploração do coco de babaçu é ainda realizada em grande parte do nordeste de forma muito artesanal (PARENTE, 2003), tendo em vista que essas pequenas comunidades não têm acesso aos equipamentos existentes

para a quebra automática do coco de babaçu, com a separação de seus constituintes, bem como as tecnologias de aplicações das matérias-primas resultantes.

No que tange à produção de óleo combustível, o óleo de babaçu possui características excelentes para a produção de biodiesel, devido à sua composição ser predominantemente láurica. Este fato facilita a reação de transesterificação, pois os ésteres láuricos são compostos de cadeias curtas que interagem mais eficaz e efetivamente com o agente transesterificante e com o catalisador, de modo a se obter um produto, biodiesel, de excelentes características físico-químicas, inclusive quando o catalisador é diferente do hidróxido de sódio (NaOH), que é o mais utilizado. Por exemplo, quando se emprega catalisador heterogêneo e óleo de babaçu para a síntese de biodiesel, se obtêm maiores rendimentos em relação ao de outros óleos (LIMA *et al.*, 2007).

### **2.3.2.2. Palma**

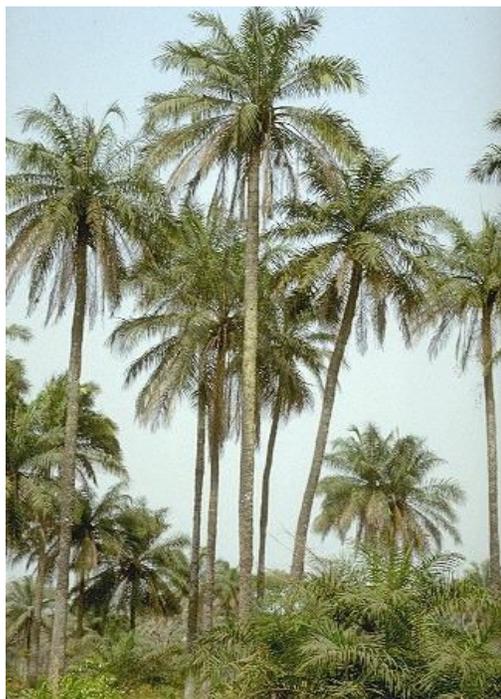
Desde a época dos faraós egípcios, há quase 5000 anos, a palma oleaginosa constitui-se numa importante fonte alimentícia para o gênero humano. O óleo chegou ao Egito vindo da África Ocidental, de onde se origina a *Elaeis guineensis*. No início do século XX, a palma oleaginosa foi introduzida na Malásia como uma planta ornamental e somente plantada comercialmente pela primeira vez em 1917, o que originou a indústria de óleo de palma da Malásia, plantada em larga escala e surgiu como o óleo mais produtivo no mundo inteiro (<http://www.biodieselbr.com/plantas/palma/palma.htm>).

No Brasil, chamada de “palmeira do dendê”, foi introduzida pelos escravos no século XVI. As áreas produtoras no Brasil são encontradas no Pará, Amazonas, Amapá e Bahia, sendo o Pará o maior produtor de óleo de palma do Brasil e onde se concentra mais de 80% da área plantada.

O fruto do dendê produz dois tipos de óleo: óleo de dendê ou óleo de palma (palm oil), encontrado na parte externa do fruto, o mesocarpo (a polpa do fruto); e óleo de palmiste (palm kernel oil), encontrado na semente (amêndoas). Da extração do óleo de palmiste, obtém-se como subproduto, uma torta com 15% de proteína, amplamente empregada na alimentação animal (<http://www.cpaa.embrapa.br/portfolio/sistemadeproducao/dende/projetodendepalmaamazonas.pdf>).

A palmeira chega a 15m de altura. Seus frutos são de cor alaranjada, e a semente ocupa totalmente o fruto (Figura 2.4) Seu rendimento é muito grande, produz 10 vezes

mais óleo que a soja, quatro vezes mais que o amendoim e duas vezes mais que o coco. (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Dendzeiro>).



(a)



(b)

**Figura 2.4.** (a) Palmeira do dendê, (b) fruto do dendê.

Fonte: <http://www.google.com.br/images>

A Amazônia brasileira possui o maior potencial para o plantio de dendê no mundo, com área estimada de 70 milhões de hectares. Isto corresponde à produção anual de 350 milhões de metros cúbicos de petróleo e a possibilidade de ocupação e desenvolvimento sócio econômico para 7 milhões de famílias diretamente envolvidas com a cultura (MIRANDA e MOURA, 2003).

O óleo de palma tem sua maior utilização na área alimentícia. Cerca de 80% da produção mundial é destinada a alguma aplicação alimentícia, os outros 20% restante são para finalidades não alimentícias. Dentre as finalidades alimentícias pode-se citar: azeite de dendê, margarinas, frituras, sorvetes, bolachas, entre outras. O óleo de palma é uma das fontes mais ricas em tocotrienóis, um tipo de vitamina E, e permite também a redução de colesterol, entre outros benefícios (ABOISSA, 2010).

O óleo de palma pertence ao grupo do ácido-linoléico, por apresentar uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados, oléico e linoléico (D'AGOSTINI, 2001). O biodiesel obtido a partir do óleo de palma apresenta grande qualidade, devido ao maior teor

de ácidos graxos de baixa massa molar e com alto nível de saturação que esse apresenta (MACEDO e MACEDO, 2004).

### 2.3.2.3. Andiroba

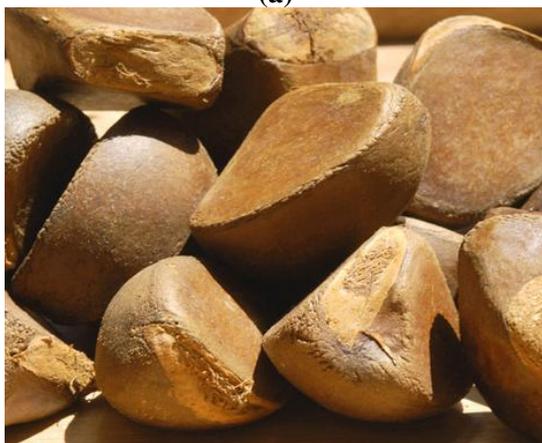
No estado do Amazonas, o nome andiroba é atribuído a duas espécies: *Carapa guianensis* Aubl. com ocorrência em toda a bacia Amazônica, preferencialmente em ambiente de várzea e *Carapa procera* D.C. espécie mais restrita a algumas áreas na Amazônia, porém com ocorrência também na África (FERRAZ *et al.*, 2002). A andiroba é de uso múltiplo: a madeira é empregada para a fabricação de móveis, construção civil, lâminas e compensado; e as sementes para a extração de óleo.



(a)



(b)



(c)

**Figura 2.5.** (a) Árvore de andiroba, (b) flores da andiroba, (c) amêndoas da andiroba.

Árvore de grande porte, que chega a atingir 30 metros de altura. Copa de tamanho médio e bastante ramosa. A inflorescência é uma panícula (espécie de cacho) (Figura 2.5). As flores têm cor creme e o fruto é uma cápsula que se abre quando cai no chão, liberando de quatro a seis sementes (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Andiroba>).

O óleo contido na amêndoa da andiroba é amarelo-claro transparente e extremamente amargo, solidifica em temperaturas inferiores a 25 °C com consistência parecida com a vaselina, e rancifica rapidamente após a extração das sementes pelo processo artesanal, sendo considerado impróprio para a alimentação. Entretanto, é muito usado na medicina indígena como anti-reumático, antiinflamatório e cicatrizante (SILVA, 2005).

Ao longo da história do Amazonas o óleo de andiroba teve uma importante participação na economia regional e continua sendo muito apreciado, principalmente, na medicina popular. Em comparação com a exploração madeireira, a coleta das sementes necessita pouco investimento e, além de não ser destrutiva, a produção do óleo pode assegurar um retorno econômico anual para a população local. O óleo e seus subprodutos, tais como sabonetes, xampus, cremes e velas repelentes são geralmente encontrados em feiras livres. O óleo também tem sido comercializado para outras regiões do país, além de ser exportado, principalmente, para a indústria de cosméticos da França, Alemanha e dos Estados Unidos (MENDONÇA e FERRAZ, 2007).

A andiroba começa a frutificar após 10 anos de plantio, com cada fruto contendo de 4 a 6 sementes. Uma árvore de andiroba é capaz de produzir de 180 a 200kg/ano de sementes, que contêm, aproximadamente, 60% de óleo em massa. A extração do óleo é feita por dois métodos (MENDONÇA e FERRAZ, 2007):

- Método tradicional: processo usado pelas comunidades indígenas e caboclas. Consiste em cozinhar as sementes frescas em água por 2 a 3h, em seguida, colocá-las em descanso na sombra por algumas semanas. Ao iniciar o processo de desprendimento do óleo, as sementes são amassadas. A massa obtida da semente é então colocada sob o sol numa calha inclinada para que o óleo escorra gradativamente. O rendimento do processo é estimado em 40g de óleo/kg de semente.

- Método industrial: consiste em quebrar as sementes em pedaços cada vez menores e colocá-los numa estufa a 60-70°C. Depois, o material é prensado a 90°C. O rendimento industrial alcança do dobro do artesanal, 80g de óleo/kg de semente.

O óleo de andiroba tem se mostrado como uma grande promessa na produção de biodiesel. Os ésteres etílicos desse óleo são menos insaturados que o de outros óleos, assim possuem a vantagem de terem maior estabilidade oxidativa, diminuindo a tendência para a formação de gomas que provocariam o entupimento em mangueiras, injetores, maquinarias e pequenas tubulações. Silva (2005) demonstrou a viabilidade da produção de ésteres etílicos das sementes desta espécie lenhosa por via química, e os resultados foram muito similares aos alcançados com o óleo de soja e de milho (até 98% de conversão), que são obtidos em escala comercial.

O autor ressaltou ainda que o óleo de andiroba pode ser uma alternativa energética para motores dieleis utilizados na geração de energia em regiões distantes e de difícil acesso, como por exemplo, na Região Amazônica. Nesta região, existem muitas comunidades que se enquadram neste perfil de elevada escassez de energia elétrica, dispendo de uma significativa disponibilidade de sementes de andiroba, além de deter tradicionalmente o conhecimento para a extração do respectivo óleo, o qual poderia atender às suas necessidades imediatas para a geração de energia elétrica.

#### **2.3.2.4. Pinhão manso**

O pinhão-manso (*piñón de leche*) é uma planta originária da América Latina, da família das Euforbiáceas de nome científico *Jatropha curcas*, a mesma da mamona e da mandioca. Segundo Cortesão (1956), os portugueses distinguem duas variedades, catártica medicinal, a mais dispersa no mundo, com amêndoas muito amargas e purgativas e a variedade árvore de coral, medicinal-de-espanha, árvores de nozes purgativas, com folhas eriçadas de pêlos glandulares que segregam látex, límpido, amargo, viscoso e muito cáustico.

É um arbusto ou árvore com até 4 m de altura, flores pequenas amarelo-esverdeadas, cujo fruto é uma cápsula com sementes escuras, lisas, dentro das quais se encontra uma amêndoa branca rica em óleo (Figura 2.6). A semente pode ter 33,7 a 45% de 2 cascas e 55 a 66% de amêndoa. Esta fornece de 50 a 52% de óleo, extraído com solvente, e 30 a 35% em casos de extração por prensagem (HAAS, 2000; OPENSHAW, 2000; AKINTAYO, 2004).

A distribuição geográfica do pinhão manso é bastante vasta devido à sua rusticidade, resistência a longas estiagens, bem como a pragas e doenças, sendo adaptável a condições edafoclimáticas muito variáveis. Desenvolve-se bem tanto em regiões tropicais

secas como nas zonas equatoriais úmidas, assim como em terrenos áridos e pedregosos podendo suportar longos períodos de seca (PRAMANIK, 2003).



(a)



(b)



(c)

**Figura 2.6.** (a) Frutos verdes do pinhão manso, (b) frutos maduros do pinhão manso, (c) sementes do pinhão manso, onde ficam as amêndoas.

Fonte: <http://www.google.com.br/images>

Nos países importadores, basicamente Portugal e França, as sementes de pinhão manso sofrem o mesmo tratamento industrial que as bagas de mamona, isto é, cozimento prévio e esmagamento subsequente em prensas tipo “expeller”, para extração do óleo, que em seguida, é filtrado, centrifugado e clarificado, resultando um produto livre de impurezas. A torta, que contém ainda aproximadamente 8% de óleo, é re-extraída com solventes orgânicos, geralmente hexano, sendo o farelo residual ensacado para aproveitamento como fertilizante natural, em virtude dos teores elevados de nitrogênio, fósforo e potássio (ARRUDA *et al.*, 2004)

Apesar de também ser empregado na indústria de fiação de lã, de tinta para escrever, tinta de impressão e tintas para pintura, além de ser utilizado como óleo de lustrar

e quando cozido, misturado com óxido de ferro, utilizado para envernizar móveis, seu maior emprego ainda é nas saboarias. Além de produzir óleo, o pinhão manso também pode ser empregado para outros fins, tais como: a) substituto parcial do arame em cercas vivas, uma vez que os animais evitam tocá-lo devido ao látex cáustico que escorre das folhas arrancadas ou feridas; b) suporte para plantas trepadeiras como a baunilha (*Vanilla aromática*), visto que o tronco possui casca lisa e macia e c) fixador de dunas na orla marítima (PEIXOTO, 1973). Na medicina doméstica, aplica-se o látex da planta como cicatrizante hemostático e também como purgante.

O pinhão manso (*Jatropha curcas L.*) está sendo considerado uma opção agrícola para a região nordeste por ser uma espécie nativa, exigente em insolação e com forte resistência à seca. Atualmente, essa espécie não está sendo totalmente explorada comercialmente no Brasil, mas segundo Carnielli (2003) é uma planta oleaginosa viável para a obtenção do biodiesel, pois produz, no mínimo, duas toneladas de óleo por hectare, levando de três a quatro anos para atingir a idade produtiva, que pode se estender por 40 anos.

O pinhão manso tem se mostrado uma ótima alternativa para a produção de biodiesel, pois além de não concorrer com a produção de alimentos, ele contém 20% de ácidos saturados, enquanto o restante é de ácidos insaturados. O ácido oléico é o mais abundante seguido pelo ácido linoléico (34%), ácido palmítico (12,8%) e ácido esteárico (7,3%) (SHAH *et al.*, 2003). Óleos contendo ácido oléico em sua composição estão sendo preferidos na produção de biodiesel, pois este ácido aumenta a estabilidade ao armazenamento do seu armazenamento e melhora as suas qualidades como combustível (AKOH *et al.*, 2007).

#### **2.3.2.5. Sebo bovino**

O sebo bovino é um resíduo gorduroso constituído por triglicerídeos que tem na sua composição principalmente os ácidos palmítico (~30%), esteárico (~20-25%) e oléico (~45%). Considerando a sua alta produção e baixo custo de comercialização, o sebo bovino apresenta-se como uma opção de matéria-prima para a produção de biodiesel, combustível alternativo ao diesel de petróleo (<http://www.facabiodiesel.com.br/biodiesel/sebo.htm>).

Muitos resíduos de frigoríficos podem causar problemas ambientais se não forem gerenciados adequadamente. A maioria é altamente putrescível e pode, por exemplo, causar odores se não processada rapidamente nas graxarias anexas, ou removida

adequadamente das fontes geradoras no prazo máximo de um dia, para processamento adequado (KRAUSE, 2008).

Assim, a produção de biodiesel a partir da gordura animal proporciona uma grande vantagem ambiental, evitando a disposição inadequada desses resíduos, que na maioria dos casos chegam a rios e córregos, provocando inúmeros problemas ao meio ambiente; como a eutrofização (LANG *et al.*, 2001; ALCANTARA *et al.*, 2000).

Historicamente, o comprador tradicional da gordura animal é a indústria de sabão e sabonetes. Um estudo feito em 2007 calculou que aproximadamente 61% do sebo de bois, porcos e aves abatidos no Brasil era vendido para o setor de higiene e limpeza; 13% para a indústria oleoquímica; 12% para usinas de biodiesel; 10% para fábricas de ração; e 4% era queimado como combustível de caldeiras (GOMES *et al.*, 2009).

Com o início da produção de biodiesel, os investidores despertaram para o papel estratégico desta matéria-prima, devido à sua alta produtividade e baixo custo de comercialização.

O biocombustível apresenta propriedades comparáveis às do diesel, exceto pela sua alta viscosidade (esta característica depende diretamente da quantidade de compostos saturados como os ésteres dos ácidos palmítico e esteárico), que pode vir a causar problemas no sistema de injeção de motores (CONCEIÇÃO *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2006).

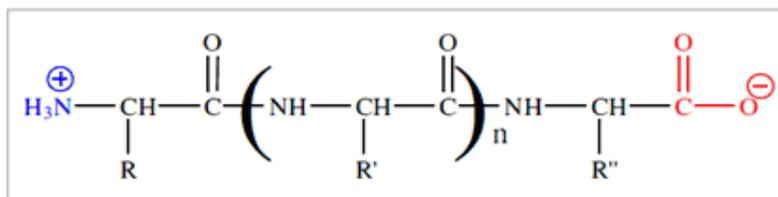
A gordura animal difere de alguns óleos animais como o de soja e o de colza, com respeito às suas propriedades químicas. Estes óleos vegetais apresentam em sua composição uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados. Entretanto nas gorduras animais, como o sebo, ocorre o contrário, elas apresentam uma maior quantidade de ácidos saturados (MA *et al.*, 1998; LEBEDEVAS *et al.*, 2006). A presença de grande concentração de compostos saturados influencia também em duas propriedades importantes dos combustíveis que são inversas: a estabilidade à oxidação e o ponto de névoa (KERSCHBAUM e RINKE, 2004; IMAHARA *et al.*, 2006; CANAKCI *et al.*, 2007). O tempo de estabilidade à oxidação aumenta com o aumento de compostos saturados no biodiesel obtido de gordura animal. Porém o ponto de névoa aumenta para o biodiesel com o aumento da concentração de compostos saturados e como consequência o desempenho do motor pode diminuir (CANAKCI *et al.*, 2007; LEBEDEVAS *et al.*, 2006).

Entretanto, do lado positivo, o biodiesel de gorduras animais, devido ao seu alto teor de ésteres de ácidos graxos saturados, geralmente apresenta números de cetano superiores ao observado em biodiesel de óleos vegetais (KNOTHE *et al.*, 2006).

## 2.4. ENZIMAS

As enzimas, em geral, são catalisadores de natureza protéica, produzidas por organismos vivos. Atuam em sistemas biológicos com alta especificidade de reação e provavelmente sem a atuação enzimática a vida não existiria (PLISSÃO, 2006).

Quimicamente, as enzimas são macromoléculas de alta massa molar formadas por subunidades conhecidas por aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. Os resíduos de aminoácidos formam ligações covalentes entre si, pelo grupo amino de um aminoácido com o grupamento carboxílico de outro, constituindo cadeias polipeptídicas extensas, que assumem um arranjo espacial complexo, sendo a sua forma estrutural difícil de ser determinada, Figura 2.7 (COSTA NETO, 2002).



**Figura 2.7.** Estrutura genérica de um polipeptídeo mostrando, à direita o resíduo C-terminal e à esquerda o N-terminal.

Fonte: COSTA NETO, 2002.

O interesse em utilizar enzimas como catalisadores aumenta gradativamente devido à sua alta versatilidade e às condições suaves de temperatura e pH em que se realizam as reações, apresentando grande importância na pesquisa científica, nos diagnósticos clínicos e na indústria. A Tabela 2.5 apresenta as principais aplicações de enzimas.

**Tabela 2.3.** Campos e aplicações das enzimas.

<b>Campos</b>	<b>Aplicações</b>
Pesquisas científicas	Usadas como ferramenta em pesquisa em análises, biotransformações e separações.
Cosméticos	Formulações de creme para tratamento de cútis, clareamento dos dentes.
Diagnóstico medicinal e análises químicas	Dosagem de glicose no sangue, uréia, colesterol.
Terapêutica	Agentes antitromboses, tratamentos antitumores, agentes antiinflamatórios, AIDS, digestivo.
Catálises industriais em sistemas especializados	Vinhos, laticínios, frutas, carnes, modificação de amido, produção de frutose, formulação de detergentes, síntese de aminoácidos, tratamento de efluentes, branqueamento de polpas celulósicas, entre outras.

Fonte: SHARMA *et al.*, 2001.

Entre as muitas vantagens da utilização de enzimas, três características são consideradas as mais importantes (PLISSÃO, 2006):

- Quimiosseletividade: capacidade das enzimas de atuar em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos reativos;
- Regiosseletividade: as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais somente com a mudança do meio reacional e;
- Enantiosseletividade: enzimas são catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas.

As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais comumente empregados em síntese orgânica. Nesta classe estão incluídas as amidases, proteases, nitrilases, fosfatases, epoxidases, sendo de particular e grande interesse as lipases (FABER, 1997).

### 2.4.1. Lipases

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas que têm como função natural a hidrólise de triacilglicerídeos em ácidos graxos e glicerol. Entretanto, em ambientes aquo-restritos, as lipases se mostram muito ativas em reações de esterificação, transesterificação, inter-esterificação, álcoolise e aminólise (BARON *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2007).

Muitas vezes as lipases são confundidas com esterases (E.C. 3.1.1.3), que são carboxil éster hidrolases com atividade restrita à hidrólise de substratos hidrossolúveis e de cadeia carbônica curta, enquanto lipases exibem elevada atividade sobre ácidos graxos de cadeia longa e de baixa solubilidade em água (FOJAN *et al.*, 2000; JAEGER *et al.*, 1994).

As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (bactérias e fungos) e vegetal, com variação em suas propriedades catalíticas. Suas aplicações são muitas, sendo que normalmente em escala industrial são empregadas as lipases de origem microbiana (Tabela 2.6). Dentre os processos bioquímicos reportados na literatura, as lipases representam cerca de 35% dentre as enzimas empregadas. No entanto, mesmo com uma vasta variedade de lipases microbianas, o uso dessas enzimas em escala industrial ainda é escasso, devido aos elevados custos de produção (PAQUES e MACEDO, 2006).

**Tabela 2.4.** Exemplos de aplicações industriais de lipases.

Área Industrial	Aplicação	Produto
Alimentação	Hidrólise de gordura de leite Síntese de ésteres	Aromas para produtos matinais Aromas para alimentos e bebidas
Química	Hidrólise de óleos e gorduras Remoção de gorduras/manchas Síntese de ésteres	Ácidos graxos, diglicerídios, monoglicerídios. Detergente para lavanderias ou uso doméstico Ésteres, emulsificantes.
Alimentação/ Química/ Farmacêutica	Transesterificação de óleos naturais	Óleos e gorduras (análogo de manteiga de cacau)
Cosméticos	Síntese de ésteres	Fragrância para perfumes
Médica	Ensaio de triglicerídios no sangue	Kits para diagnósticos

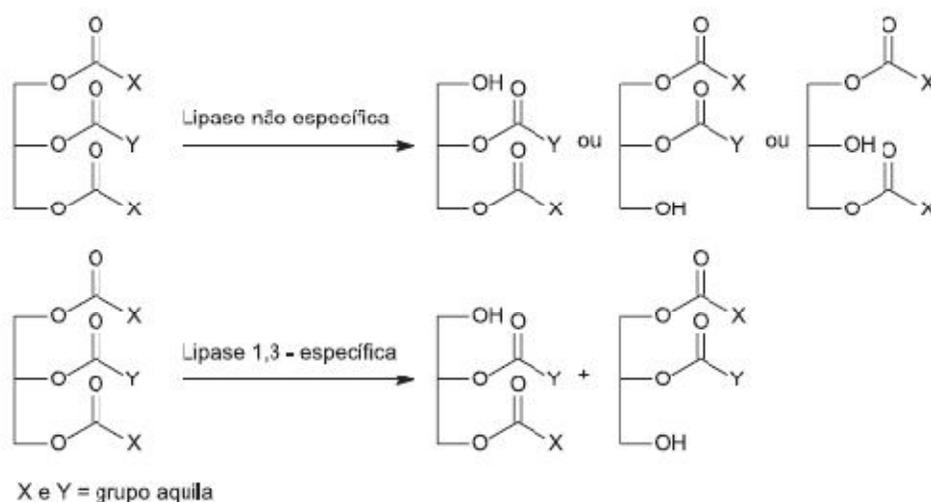
Fonte: PAQUES e MACEDO, 2006.

A especificidade ao substrato também é empregada como parâmetro para a diferenciação entre lipases e esterases, uma vez que os substratos naturais das lipases são os óleos e gorduras contendo triacilgliceróis formados por ácidos graxos de cadeia longa, enquanto as esterases atuam sobre substratos constituídos por ligações ésteres únicas. É também importante mencionar, que a maioria das lipases atua sobre substratos de esterases, porém o inverso não ocorre (FOJAN *et al.*, 2000).

#### 2.4.1.1. Especificidade das lipases

As lipases são classificadas em três grupos de acordo com sua especificidade. Lipases não específicas quebram moléculas de triacilgliceróis na posição randômica, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química (CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases 1,3-específicas atuam somente sobre os ácidos graxos das posições 1 e 3 dos triacilgliceróis. Em uma reação de interesterificação usando esse tipo de lipase, inicialmente será formada uma mistura de triacilgliceróis, 1,2- e 2,3- diacilgliceróis (Figura 2.8). Depois de um tempo prolongado de reação, poderá ocorrer a migração acil com a formação de 1,3-diacilgliceróis (AKOH e MIN, 2008). Pertencem a esse grupo as lipases de *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus* e *Rhizopus delamar*.



**Figura 2.8.** Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica.

Fonte: PAQUES E MACEDO, 2006.

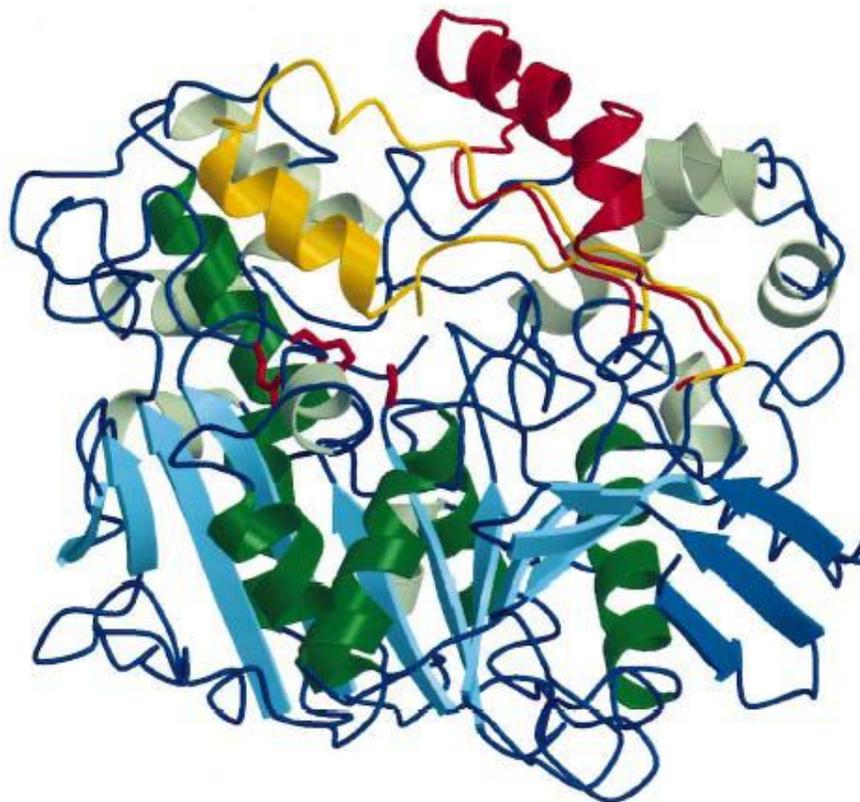
As lipases ácido graxo específicas têm ação particular na hidrólise de ácidos graxos de cadeia longa contendo dupla ligação cis na posição 9. O exemplo mais estudado é o da lipase de *Geotrichum candidum* (CASTRO *et al.*, 2004). Também merece referência a estereoespecificidade, ou seja, a capacidade que algumas lipases possuem de discriminar os enantiômeros de misturas racêmicas quirais ou pró-quirais, propriedade muito explorada na produção de fármacos (JAEGER e EGGERT, 2002).

#### **2.4.1.2. Estrutura e mecanismo de atuação das lipases**

As lipases são enzimas que apresentam um mecanismo peculiar de atuação, chamado ativação interfacial. Em 1958, Sarda e Desnuelle definiram as lipases em termos cinéticos baseados neste fenômeno de ativação interfacial, que difere do modelo cinético clássico de Michaelis-Menten.

Este mecanismo de atuação é facilmente explicado por meio da sua estrutura tridimensional e de seu sítio ativo. O sítio ativo da lipase é geralmente caracterizado pela tríade composta dos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico (ou glutâmico), complexos acil-enzima sendo intermediários cruciais em todas as reações catalisadas por lipases (JAEGER e REETZ, 1998). Ademais, este sítio ativo é coberto por uma cadeia polipeptídica em forma de  $\alpha$ -hélice comumente chamada de tampa, ou *lid* (CAJAL *et al.*, 2000).

Em presença de meios aquosos homogêneos, com ausência de solventes orgânicos e interfaces, estruturas obtidas por meio de técnicas de cristalografia mostram que o sítio ativo das lipases está totalmente isolado do meio de reação pela tampa, o que se chama de conformação fechada, apresentando uma baixa atividade lipolítica (Figura 2.8a) (GROCHULSKI *et al.*, 1994). Por outro lado, quando a lipase se adsorve a uma interface hidrofóbica, este *lid* se desloca, expondo o sítio ativo para o meio de reação, tornando-o acessível ao substrato, ao que se chama de conformação aberta da enzima em interfaces lipídicas (Figura 2.8b) (GROCHULSKI *et al.*, 1993). Nesta conformação o movimento do *lid*, não apenas abre o acesso ao sítio ativo com também expõe uma extensa zona hidrofóbica, o que provavelmente interage favoravelmente com a interface lipídica (DEREWENDA *et al.*, 1992).



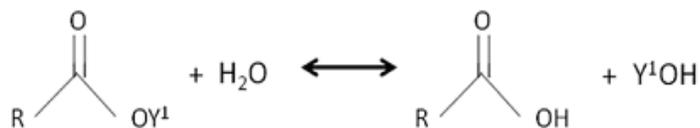
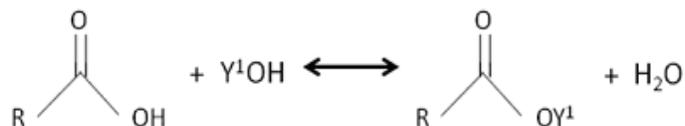
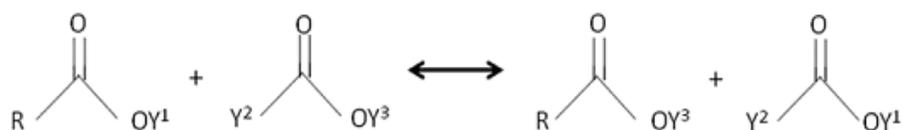
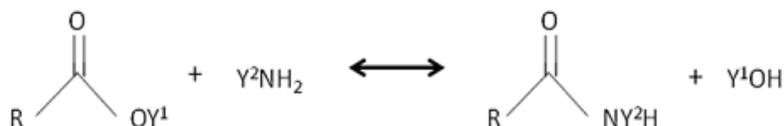
**Figura 2.9.** Diagrama de fitas da lipase de *Candida rugosa* com as tampas abertas e fechadas. As folhas  $\beta$  (azul claro) e N-terminal (azul escuro). As hélices que envolvem as folhas  $\beta$ -centrais são representadas em amarelo e a aberta em vermelho. Os resíduos aminoácidos que formam a tríade catalítica são mostrados em vermelho.  
Fonte: CYGLER e SCHRAG, 1999.

Recentemente, revelou-se que a presença de uma estrutura em forma de tampa não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial. Lipases de origem microbiana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B) e uma lipase pancreática não específica não mostraram ativação interfacial, embora apresentem uma “tampa” anfifílica cobrindo seus sítios ativos. Esta observação sugere que a presença de uma tampa dominante e a ativação interfacial não são critérios adequados para classificar uma enzima como a lipase. Portanto, a definição atual é bastante simples: uma lipase é uma carboxiesterase que catalisa a hidrólise de acilglicerol de cadeia longa (CASTRO *et al.*, 2004).

### 2.4.1.3. Reações catalisadas pelas lipases

Lipases catalisam a clivagem de ligações éster via reações de hidrólise (com comitante consumo de água) (PAIVA *et al.*, 2000). Também podem catalisar a reação reversa, isto é, a formação de ésteres a partir de um álcool, como glicerol, e um ácido carboxílico de cadeia longa, como um ácido graxo, com liberação de moléculas de água, num processo denominado esterificação (YAHYA *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 2004). O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direito (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional (Figura 2.8).

Esses dois processos básicos podem ser combinados num padrão sequencial para originar um grupo de reações usualmente denominadas de interesterificações, que, dependendo do substrato de partida, podem ser acidólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um ácido carboxílico), alcoólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um álcool) e transesterificação (quando dois grupos acila são deslocados entre dois ésteres), sem ocorrer nem consumo nem formação de água (Figura 2.9) (CASTRO *et al.*, 2004).

**Hidrólise****Esterificação****Transesterificação****Alcoólise****Acidólise****Aminólise****Figura 2.9.** Reações catalisadas por lipases.

Fonte: Adaptado de PAQUES E MACEDO, 2006.

**2.4.2. Enzimas Imobilizadas**

A definição mais aceita para enzimas imobilizadas é a recomendada pela Primeira Conferência sobre Engenharia Enzimática, realizada em 1971, que estabelece que “enzimas imobilizadas são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou

localizados em certa região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetida e continuamente” (KENNEDY e CABRAL, 1987).

Uma das vantagens da utilização de enzimas imobilizadas é a possibilidade de reutilização da preparação enzimática, que tem implicações no custo do processo catalisado enzimaticamente, além de possibilitar a execução de processos contínuos e a fácil separação da enzima dos produtos (SALIS *et al.*, 2005).

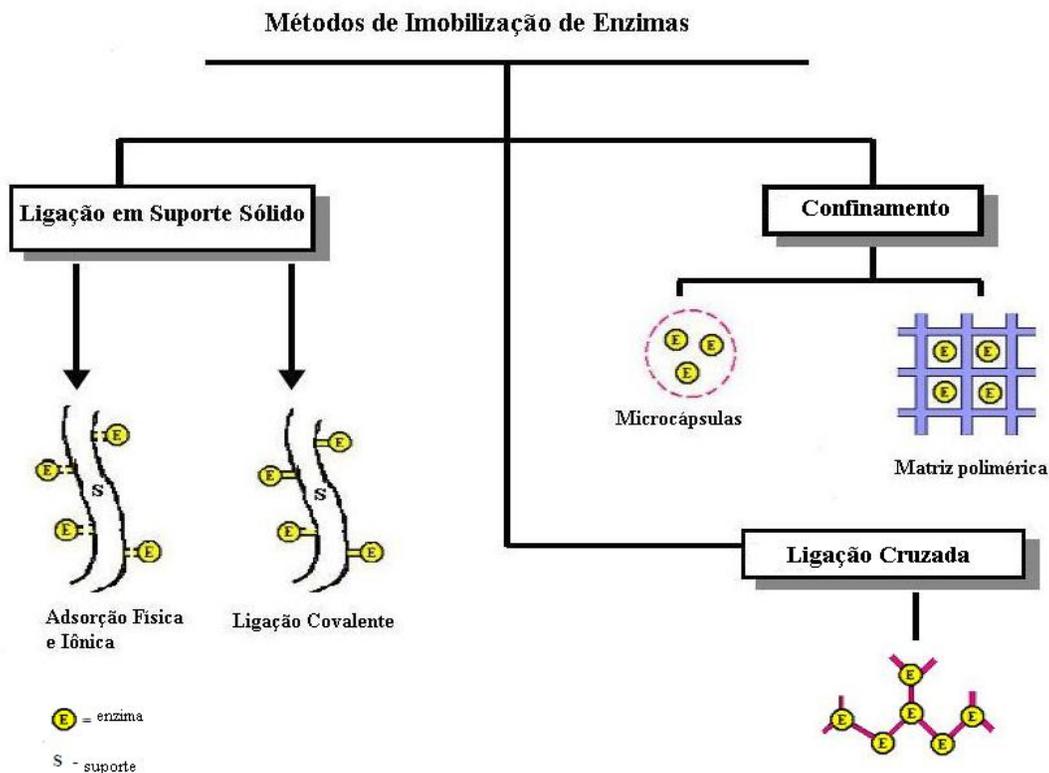
A natureza do suporte é muito importante para a eficiência da imobilização. Os suportes utilizados para a imobilização podem ser classificados morfológicamente em porosos e não-porosos, hidrofílicos e hidrofóbicos, naturais e sintéticos (MATEO *et al.*, 2007).

#### **2.4.2.1. Métodos de imobilização**

A imobilização pode ocorrer por adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional por ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação em membrana polimérica. A Figura 2.9 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para a imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

A adsorção é o método mais simples e de menor custo. Este método consiste na adsorção física da enzima em um suporte inerte, por meio de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, como de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo. Este tipo de imobilização causa uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima, se comparado aos outros tipos de imobilização, e por isso, geralmente não promove perda da atividade catalítica (VINU *et al.*, 2005). Por apresentarem interações mais fracas, as enzimas imobilizadas por adsorção são desorvidas com mais facilidade quando em meio aquoso, não sendo adequadas para aplicação em processos no quais as mesmas não devem estar presentes no produto final (WU *et al.*, 2007).

Na ligação covalente os átomos são unidos por meio da partilha de pares de elétrons. As reações requeridas são relativamente complicadas e não suaves (SOARES, 2004). Este método é o mais pesquisado, pois envolve frequentemente perdas de atividade. Mas ele apresenta muitas vantagens como aumento da estabilidade enzimática e ausência de perdas para o meio reacional.



**Figura 2.10.** Métodos de imobilização de enzimas.

Na ligação cruzada ocorre a formação de múltiplas ligações covalentes entre as enzimas, os chamados *crosslinks*. As ligações intermoleculares e irreversíveis obtidas garantem estabilidade em valores extremos de pH e temperatura. Porém, as dificuldades de controle da reação de imobilização, a necessidade de grande quantidade de enzima e perdas de atividade envolvendo o sítio catalítico são algumas das desvantagens apresentadas por esse método (ZANIN e MORAES, 2004).

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto as pequenas moléculas como substratos e produtos, se difundem. A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

### 2.4.2.2. Lipases imobilizadas

As lipases podem ser imobilizadas pelos métodos descritos, mas o método mais usado é o da adsorção, onde a enzima é aprisionada à superfície do suporte por forças fracas, como as de Van der Waals, interações hidrofóbicas ou forças de dispersão.

As lipases imobilizadas empregadas na produção de biodiesel são derivadas de diferentes fontes, por exemplo: *Candida antarctica*, *Candida sp. 99-125*, *Pseudomonas fluorescences*, *Pseudomonas cepacia*, pâncreas de porco, *Rhizomucor Mihei* e *Cromobacterium viscosum* (TAN *et al.*, 2010).

Os suportes empregados incluem resina acrílica, membranas têxteis, polipropileno, celite e terra diatomácea. Em geral, os rendimentos obtidos quando se usa uma lipase imobilizada por adsorção na produção de biodiesel, são superiores a 80%. Há dois tipos de lipase que são frequentemente empregadas, especialmente para larga escala industrial. Uma delas é a lipase de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica, chamada Novozym 435. A outra é a lipase de *Candida sp. 99-125* imobilizada em uma membrana têxtil de baixo custo (TAN *et al.*, 2010).

#### 2.4.2.2.1. Novozym 435

Novozym 435 é uma preparação de lipase de *Candida antarctica* (lipase B) produzida por fermentação submersa do fungo *Aspergillus niger* geneticamente modificada e imobilizada por adsorção em resina aniônica macroporosa, comercializada pela Novozymes Latin America Ltda. Essa preparação de lipase é classificada como não específica e termo-estável, tem atividade máxima na faixa de 70-80°C, mas a melhor estabilidade térmica encontra-se na faixa de 40-60°C.

Essa preparação é provavelmente o biocatalisador mais usado em biotransformação com lipases, podendo ser usada em meio livre de solvente ou na presença de solventes, sendo empregada na resolução de uma grande escala de álcoois primários e secundários, bem como de ácidos carboxílicos (OLIVEIRA, 2007).

#### 2.4.2.2.2. Lipozyme TL IM

Lipozyme TL IM é uma preparação de lipase de *Thermomyces lanuginosus* produzida por fermentação submersa de *Aspergillus oryzae* geneticamente modificada e

imobilizada em sílica porosa granulada, comercializada pela Nozymes Latin America Ltda. Esta preparação é termoestável e particularmente usada na síntese e hidrólise de ésteres. Lipozyme TL IM tem uma ampla especificidade (1,3-específica), promovendo reações entre uma grande variedade de álcoois primários e secundários, bem como, ácidos carboxílicos. Sua melhor estabilidade térmica encontra-se na faixa de 40-60°C para ótima produtividade (OLIVEIRA, 2007).

#### **2.4.2.2.3. PS Amano IM**

Lipase PS IM é uma nova preparação enzimática lipolítica desenvolvida pela Amano Enzyme Inc, obtida por fermentação submersa de uma linhagem selecionada proveniente de *Burkholderia cepacia* e imobilizada em terra diatomácea, comercializada pela Sigma (EUA). Essa preparação de lipase é classificada como não específica e termoestável, podendo ser usada em temperaturas entre 25-60°C. É adequada para a transesterificação e esterificação em presença de solventes orgânicos. Dados descritos pelo fabricante revelam que esta preparação apresenta um grande potencial para mediar reações de transesterificação (AMANO, 2009).

### **2.5. TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEOS E GORDURAS**

As lipases são facilmente manipuladas, razoavelmente estáveis, frequentemente tolerantes a solventes orgânicos, regioseletivas e/ou enantiosseletivas. Devido a essas características, esses biocatalisadores são ferramentas valiosas em síntese orgânica e há muitas pesquisas sobre a produção de biodiesel catalisada por lipases.

A transesterificação de triglicerídeos com um álcool, na presença de uma lipase extracelular ou intracelular tem sido utilizada para a produção de biodiesel, sendo que a maioria das pesquisas publicadas tem usado preparações comerciais de lipases extracelulares em sistemas reacionais pseudo-homogeneos e também na forma imobilizada (DABDOUB *et al.*, 2009).

A reação de transesterificação catalisada por lipases encontra interesse atual, por se tratar de uma via eficiente, altamente seletiva, envolver menor consumo de energia (as reações podem ser realizadas em condições brandas de pressão e temperatura), e facilitar a recuperação do subproduto formado na reação: glicerol. A maioria dessas pesquisas refere-se à determinação da melhor fonte de enzima e dos fatores que influenciam na reação de

transesterificação para melhorar o rendimento do biodiesel comparável às reações catalisadas por catalisadores químicos e para possível ampliação da escala industrial (AKOH *et al.*, 2007).

Atualmente, a abordagem enzimática para a produção de biodiesel recebe muita atenção, pois ela tem muitas vantagens sobre os métodos químicos: a capacidade de esterificar os ácidos graxos livres presentes tanto em acilgliceróis como na forma livre em uma única etapa; a produção de uma fração glicerínica com teor mínimo de água e pouco ou nenhum material contaminante; a possibilidade de reciclagem do catalisador; (KNOTHE *et al.*, 2006) e a possibilidade de trabalhar em condições amenas de reação (temperaturas e pressões baixas) (FUKUDA *et al.*, 2001).

A Tabela 2.3 mostra as vantagens e desvantagens da utilização das lipases para a síntese do biodiesel em comparação ao processo alcalino. A transesterificação de triglicerídeos com um álcool, na presença de uma lipase extracelular ou intracelular tem sido utilizada para a produção de biodiesel, sendo que a maioria das pesquisas publicadas emprega preparações comerciais de lipases extracelulares em sistemas reacionais pseudo-homogêneos e também na forma imobilizada (DABDOUB *et al.*, 2009).

**Tabela 2.5.** Comparação entre o processo enzimático e o processo alcalino para a produção de biodiesel.

<b>Problema</b>	<b>Processo Alcalino</b>	<b>Processo Enzimático</b>
Ácidos graxos livres presentes no óleo	Os ácidos graxos livres presentes no óleo são transformados em sabão.	Os ácidos graxos livres presentes no óleo são transformados em biodiesel.
Presença de água no óleo	A água pode hidrolisar o óleo, formando mais sabão.	A água não interfere na reação.
Rendimento da reação	Alto	Alto
Recuperação do glicerol	Complexa, glicerol de baixa qualidade.	Fácil, glicerol de alta qualidade.
Custo do processo	Baixo	Alto
Recuperação do Catalisador	Difícil ou inviável	Fácil
Impacto Ambiental	Médio, são gerados efluentes alcalinos e salinos	Baixo
Produtividade	Alta	Média

Fonte: FUKUDA *et al.*, 2001; ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009.

Por outro lado, em geral, o custo de produção das lipases é significativamente maior do que o de um catalisador alcalino (DU *et al.*, 2008). Essas dificuldades podem ser superadas pelo uso dessas enzimas na sua forma imobilizada, permitindo o reuso desse biocatalisador várias vezes, reduzindo custos e ainda melhorando a qualidade do produto obtido (DABDOUB *et al.*, 2009).

A Tabela 2.4 resume os diversos trabalhos publicados empregando a catálise enzimática como rota de produção de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas lipídicas.

**Tabela 2.4.** Produção enzimática de biodiesel por transesterificação de óleos e gorduras.

Fonte lipídica	Biocatalisador	Agente acilante	Solvente	Rendimento (%)	Referência
pinhão manso óleo de laranja óleo de girassol	Novozym 435	acetato de etila	isento	91,3 90,0 92,7	MODI <i>et al.</i> , 2007
óleo de algodão	Novozym 435	Metanol	terc-butanol	97,0	ROYON <i>et al.</i> , 2007
óleo de palma	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	etanol	isento	90,9 75,1	MOREIRA <i>et al.</i> , 2007
pinhão manso óleo de laranja óleo de girassol	Novozym 435	propanol	hexano	92,8 91,7 93,4	PAULA <i>et al.</i> , 2007
óleo de soja	<i>Burkholderia cepacia</i>	metanol etanol	isento	67,0 65,0	NOUREDDINI <i>et al.</i> , 2005
óleo de algodão	Novozym 435	metanol	isento	91,5	KOSE <i>et al.</i> , 2002
óleo de palmiste	<i>Burkholderia cepacia</i>	etanol, terc-butanol, n- butanol metanol	Isento	72,0 62,0 42,0 15,0	ABIGOR <i>et al.</i> , 2000
óleo de girassol	Lipozyme	etanol	Isento	83,0	SELMI, TOMAS; 1998

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os principais materiais e as técnicas empregadas na pesquisa são apresentados neste capítulo.

#### **3.1. MATERIAIS**

Entre os materiais empregados destacam-se as enzimas e os substratos.

##### **3.1.1. Fontes de lipases**

Como biocatalisadores foram testadas três preparações de lipase imobilizada, disponíveis comercialmente. Lipozyme TL IM e Novozym 435 foram gentilmente doadas pela empresa Novozymes Latin America Ltda – Araucária/PR e a Lipase PS manufaturada pela AMANO (Japão) adquirida da Sigma Co, St. Louis, MO, EUA.

##### **3.1.2. Substratos**

Como substratos na síntese de biodiesel foram utilizados: etanol anidro Cromoline 99,8%, (São Paulo, Brasil), amostras de óleo de babaçu refinado fornecidas gentilmente pela COGNIS (Jacareí, São Paulo, Brasil), amostras de óleo de palma refinado fornecidas gentilmente pela AGROPALMA (Belém, Pará, Brasil), amostras de óleo de pinhão manso bruto fornecida gentilmente pelo IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná - Londrina-PR, Brasil), amostras de óleo de andiroba fornecidas pela FORMIL QUÍMICA DIVISION FLORABRASIL e as amostras de sebo bovino refinado, fornecidas pela FERTIBOM (Catanduva-SP, Brasil).

##### **3.1.3. Outros reagentes**

Outros reagentes empregados foram: solventes etanol 95% (Reagen), hexano – (Cromoline), hidróxido de potássio (Merck), indicador ácido-base (fenolftaleína - Coleman), Peneira molecular (pellets) 13X; 3,2mm de diâmetro (Sigma Aldrich). Padrões cromatográficos (ésteres etílicos) previamente sintetizados por via química (URIOSTE *et*

al., 2008). Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

### 3.2. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão apresentados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Tipo de análise e equipamentos utilizados nos ensaios.

<b>Tipo de análise e/ou ensaio</b>	<b>Equipamento</b>	<b>Modelo/ fabricante</b>
Medidas de pH	Potenciômetro	Modelo TEC2, Tecnal
Dosagem de ésteres etílicos (biodiesel)	Cromatógrafo a gás	Modelo GC-3800, Varian
Pesagem de materiais	Balança analítica	Modelo AY220, Shimadzu
Agitação de reações	Placa de agitação magnética e temperatura controlada	Modelo 752A, Fisatom
Purificação do produto	Rota evaporador	Modelo 801, Fisatom
Análise qualitativa	Espectrômetro no infravermelho	Spectrun One, Perkin Elmer
Atividade hidrolítica	Bureta digital (50mL)	Hirshmann Techcolor
Teor de umidade	Balança analítica	ID 50, Marte
Aquecimento do meio das reações	Banho termostático	
Medidas de viscosidade	Viscosímetro	Modelo LVDVIIIICP-CP 520, Brookfield
Medidas de densidade	Densímetro	Modelo DMA 35N, Anton Paar

### 3.3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Nesta seção apresentam-se as técnicas experimentais empregadas para a realização do trabalho.

#### 3.3.1. Caracterização das fontes de lipase (determinação da atividade hidrolítica)

A atividade enzimática das preparações de lipase imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 50mL de azeite de oliva e 50mL de goma arábica a 7% (m/v). Em frascos Erlenmeyer de 125mL foram adicionados: 5mL de substrato, 4mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1M, pH variável) e 0,05g do

biocatalisador imobilizado. Os frascos foram incubados a 37°C por 5 min, em banho termostaticado com agitação.

Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10mL de mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02N, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela equação abaixo e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições de ensaio. As atividades foram expressas em µmoles/mg.min (U/g).

$$\text{Atividade hidrolítica} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{g} \cdot \text{min}} \right) = \frac{(V_A - V_B) \cdot N \cdot 10^6}{t \cdot m} \quad \text{Equação 3.1}$$

Em que:  $V_A$  = volume de KOH gasto na titulação da amostra (L),  $V_B$  = volume do KOH gasto na titulação do branco (L),  $N$  = normalidade da solução de KOH,  $t$  = tempo de reação em min,  $m$  = massa em gramas.

### 3.3.2. Caracterização das matérias-primas lipídicas

As matérias-primas, ricas em triglicerídeos foram caracterizadas quanto aos índices de acidez, peróxido, saponificação, iodo e ácidos graxos.

#### 3.3.2.1. Índice de Acidez (I.A.)

O índice de acidez da matéria-prima foi determinado de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008) (Norma 325/IV). Para esta determinação em um Erlenmeyer pesou-se cerca de 2,0g da amostra, seguida da adição de 25mL de uma mistura de éter etílico e álcool etílico (95%) preparada na proporção 2:1 em volume. Em seguida, titulou-se com solução de hidróxido de potássio (KOH) de concentração 0,01M previamente padronizada, utilizando-se fenolftaleína como indicador. O resultado foi calculado pela relação entre a massa em miligramas de hidróxido de potássio consumidos por grama de amostra analisada, conforme a Equação 3.2.

$$I.A. = \frac{(V_{amostra} - V_{branco}) \times MM_{base} \times C_{base}}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.2}$$

Em que:  $V_{\text{amostra}}$  = Volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL),  $V_{\text{branco}}$  = Volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL),  $MM_{\text{base}}$  = Massa Molar do KOH (56,1g/mol),  $C_{\text{base}}$  = Concentração molar da solução de KOH (mol/L),  $m_{\text{amostra}}$  = Massa de amostra (g).

### 3.3.2.2. Índice de Peróxido (I.P.)

O índice de peróxido da matéria-prima foi determinado de acordo com o método oficial Cd 8b-90 da AOCS (2004). Para esta determinação, pesou-se em um erlenmeyer aproximadamente 5g da amostra em balança analítica, adicionou-se 50mL da mistura ácido acético:isooctano (3:2 v/v) e 0,5mL de uma solução de Iodeto de potássio saturada, deixando-se reagir por 1 min sob agitação constante. Em seguida, adicionou-se 30mL de água e titulou-se o  $I_2$  formado com solução de tiosulfato de sódio, de concentração 0,01N, previamente padronizada. Adicionou-se 1,0mL de solução indicadora de amido (1,0%), 0,5mL de Lauril sulfato de sódio (10% m/v) e prosseguiu-se a titulação até descoloração da solução. O mesmo procedimento foi realizado com o branco. O resultado foi calculado com base na quantidade, em miliequivalentes, de peróxido por 1000g de amostra conforme mostrado na Equação 3.3:

$$I.P. = \frac{(V_{\text{amostra}} - V_{\text{branco}}) \times C_{\text{Tiosulfato}} \times 1000}{m_{\text{amostra}}} \quad \text{Equação 3.3}$$

Em que:  $V_{\text{amostra}}$  = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL),  $V_{\text{branco}}$  = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL),  $C_{\text{tiosulfato}}$  = Concentração molar da solução de tiosulfato de sódio (eq/L),  $m_{\text{amostra}}$  = Massa de amostra (g).

### 3.3.2.3. Índice de Saponificação (I.S.)

O índice de saponificação da matéria-prima foi determinado de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008) (Norma 328/IV). Para esta medida, uma amostra de 2,5g foi saponificada com solução alcoólica de hidróxido de potássio (4% m/v) e titulada com ácido clorídrico (0,5N). O cálculo do índice de saponificação foi realizado de acordo com a Equação 3.4.

$$I.S. = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times MM_{KOH} \times C_{HCl}}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.4}$$

Em que:  $V_{amostra}$  = Volume de solução de HCl gasto na titulação da amostra (mL),  $V_{branco}$  = Volume de solução de HCl gasto na titulação do branco (mL),  $MM_{base}$  = Massa Molar do KOH (56,1g/mol),  $C_{HCl}$  = Concentração molar da solução de HCl (mol/L),  $m_{amostra}$  = Massa de amostra (g).

### 3.3.2.4. Índice de Iodo (I.I.)

O índice de iodo da matéria-prima foi determinado pelo Método de Hübl de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008). Para esta determinação, uma amostra (cerca de 0,25g) foi submetida à reação com solução de iodo por 30min ao abrigo da luz e posteriormente titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,1N. O branco foi realizado com 10mL de clorofórmio e 20mL de solução alcoólica de iodo 5%. O cálculo do índice de iodo foi realizado pela Equação 3.5:

$$I.I. = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times MM_{I_2} \times C_{Tiosulfato} \times 0,1}{2 \times m_{amostra}} \quad \text{Equação 3.5}$$

Em que:  $V_{amostra}$  = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL),  $V_{branco}$  = Volume de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL),  $MM_{I_2}$  = Massa Molar do  $I_2$  (253,8g/mol),  $C_{tio}$  = Concentração molar da solução de tiosulfato de sódio (mol/L),  $m_{amostra}$  = Massa de amostra (g)

### 3.3.2.5. Quantificação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa

As composições dos óleos vegetais e do sebo em ácidos graxos foram determinadas no Laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. Foram utilizados os Métodos Oficiais da AOCS (American Oil Chemists' Society): usando um cromatógrafo de fase gasosa Capilar – CGC AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM, Coluna capilar: DB-23 AGILENT (50% cyanopropyl) – methylpolysiloxane, dimensões 60m, Ø int: 0,25mm, 0,25µm filme. As condições foram:

fluxo coluna = 1,00mL/min.; Velocidade linear = 24cm/seg; Temperatura do detector: 280°C; Temperatura do injetor: 250°C; Temperatura Forno: 110°C – 5minutos, 110 – 215°C ( 5°C/min), 215°C – 34minutos; Gás de arraste: Hélio; Volume injetado: 1,0µL. Metodologia: Métodos Oficiais da AOCS (American Oil Chemists' Society).

### 3.3.3. Refino do óleo de pinhão manso

O óleo de pinhão manso estava no estado bruto e por isso precisou ser refinado. A metodologia utilizada se dividia em quatro fases:

*Degomagem:* o procedimento utilizado para a degomagem do óleo bruto foi à adição de 1% ácido fosfórico (85%), em relação à massa de óleo. A mistura foi aquecida até aproximadamente 80°C e mantida vigorosamente sobre agitação mecânica por 2h. Em seguida, foi centrifugada (3000rpm, 10min) para a separação da goma (proteínas, fosfolipídios, cinzas e impurezas). O centrifugado foi lavado para remoção dos últimos traços de impurezas retidas no óleo.

*Neutralização:* o procedimento utilizado na neutralização foi a adição de 1% de solução de hidróxido de sódio (20%) em relação ao índice de acidez determinado previamente na amostra bruta. Essa mistura foi submetida à agitação mecânica por 20min à 65°C. As borras foram removidas por decantação e posterior centrifugação (3000rpm, 10min).

*Lavagem:* em um funil de separação contendo 100g de óleo foi adicionado aproximadamente 15ml de água quente ( $\approx 80^\circ\text{C}$ ). A mistura foi agitada até a completa homogeneização, esse procedimento foi repetido por três vezes. Após a separação das fases, a fase aquosa foi removida e a fase superior foi centrifugada por 10min com 3000rpm.

*Secagem:* para cada 200g de óleo foi necessária a adição de 50g de sulfato de sódio anidro. A mistura foi deixada por 24h, após esse período adicionou-se éter etílico, removeu-se o sulfato de sódio por filtração a vácuo.

### 3.3.4 Síntese de biodiesel

As reações foram realizadas em reatores de vidro cilíndrico (50mL, 6cm de altura e 4cm de diâmetro interno) de duas bocas (Figura 3.1), acoplados com condensador de refluxo, sob agitação magnética.



Figura 3.1. Reator de vidro utilizado para síntese de biodiesel.

Os reatores foram encamisados para facilitar o aquecimento, a água que circulava pela jaqueta térmica era aquecida por um banho termostático. Os meios reacionais foram deixados por 24h em contato com peneiras moleculares, para que toda água do meio fosse retirada e assim fosse aumentado o rendimento da reação (ANTCZAK *et al*, 2009; LI *et al*, 2006).

Posteriormente, os meios foram preparados nas razões molares óleo/etanol requeridas para cada óleo e incubados com as preparações de lipase imobilizada em proporções definidas pelo fabricante. As condições de reações estão resumidas na Tabela 3.2. As reações foram conduzidas por um período máximo de 48h com amostragens em

períodos de tempo definidos, para a quantificação dos ésteres de etila formados por cromatografia de fase gasosa.

**Tabela 3.2.** Condições experimentais das reações de transesterificação.

<b>Óleo</b>	<b>Enzima</b>	<b>Temperatura de Reação ° C</b>	<b>Razão Molar<sup>1</sup></b>	<b>Concentração de Enzima (% mássica)<sup>2</sup></b>	<b>Tempo de Reação (h)</b>
<b>Babaçu</b>	PS Amano IM	50	1:9	10	48
	Novozym 435				
	Lipozyme TL IM				
<b>Sebo Bovino</b>	Novozym 435 PS	50	1:6	10	48
	Lipozyme TL IM				
	PS Amano IM				
<b>Pinhão manso</b>	Novozym 435	50	1:9	10	48
	Lipozyme TL IM				
	PS Amano IM				
<b>Palma</b>	Novozym 435	50	1:9	10	48
	Lipozyme TL IM				
	PS Amano IM				
<b>Andiroba</b>	Novozym 435	50	1:9	10	48
	Lipozyme TL IM				
	PS Amano IM				

<sup>1</sup> Razão molar óleo:etanol; <sup>2</sup> a concentração de enzima é em relação ao meio (óleo+álcool).

### 3.3.4.1. Separação dos ésteres (recuperação do glicerol)

Para a separação da glicerina liberada na síntese do biodiesel, o meio reacional foi submetido a uma etapa de purificação, constituída de uma lavagem com água destilada. O volume da amostra recolhido foi medido e em seguida adicionado o mesmo volume de água destilada. A mistura foi transferida para um funil de decantação (Figura 3.2), efetuando-se uma agitação e deixando a mistura em repouso por 30min para a separação das fases. A fase superior era composta pelos ésteres de etila (biodiesel) e a fase inferior por glicerol e água de lavagem. A fase inferior foi descartada e a fase superior submetida à evaporação em rota-evaporador.



**Figura 3.2.** Decantação do biodiesel.

### 3.3.5. Análises do biodiesel

O biodiesel produzido foi analisado quanto às concentrações de ésteres e viscosidade cinemática.

#### 3.3.5.1. Determinação dos ésteres formados nas reações de transesterificação

As concentrações dos ésteres formados nas reações de transesterificação foram determinadas por cromatografia de fase gasosa, utilizando-se um cromatógrafo Modelo GC-3800, Varian (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA) uma coluna empacotada (5%DEGS CHR-WHP 80/100 6ft 2.0mmID 1/8inOD, RESTEK), operando nas condições definidas na Tabela 3.3, conforme estabelecido por URIOSTE *et al.* (2008). As amostras foram previamente diluídas com hexano numa proporção de 1:3 (biodiesel:hexano).

O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila ( $M_t$ ) em relação à massa teórica esperada de ésteres de etila ( $M_e$ ).  $M_e$  foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presentes na massa inicial de cada material lipídico ( $M_0$ ), da massa molar correspondente a cada ácido ( $MM_a$ ) e do éster correspondente ( $MM_e$ ). Este cálculo é representado pela Equação 3.6 (a), em que  $M_0$  corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo ( $C_a$ ), com a massa inicial de óleo utilizada ( $M_i$ ) Equação 3.6 (b). O rendimento foi calculado utilizando a massa total de ésteres obtida pela análise por cromatografia gasosa ( $M_t$ ) pela massa teórica de ésteres de etila ( $M_e$ ), conforme mostrado na Equação 3.6 (c).

$$Me = \frac{(Mo.MMe)}{MMa} \quad (a) \quad Mo = Ca.Mi \quad (b) \quad R = \frac{Mt}{Me} \times 100 \quad (c) \quad \text{Equação 3.6}$$

**Tabela 3.3.** Condições para determinação dos ésteres de etila.

<b>Padrão interno</b>	Hexanol (0,0275g/g)	
<b>Programa de temperaturas</b>	120 °C por 10 min e 170°C por 18min	
<b>Rampa de Aquecimento</b>	25 °C/min	
<b>Gás de arraste</b>	Nitrogênio	
<b>Atenuação do cromatógrafo</b>	A, B e C = 16	
<b>Preparação da amostra</b>	0,1g da amostra em 0,3g de hexano	
<b>Preparação para injeção</b>	1:1 (amostra : padrão interno)	
<b>Tempos de retenção dos Monoésteres de etila</b>	Padrão Interno (P.I.)	1,17min
	C8 EtOH	4,13min
	C10 EtOH	8,26min
	C12 EtOH	10,77min
	C14 EtOH	12,31min
	C16 EtOH	15,04min
	C18 EtOH	20,96min
	C18:1 EtOH	23,57min
	C18:2 EtOH	26,83min

### 3.3.5.2. Análise de viscosidade da matéria lipídica e do biodiesel

Os valores da viscosidade absoluta foram medidos em um viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas em duplicata a 50 °C para o sebo bovino, a 40°C para o biodiesel e para o óleo vegetal, empregando 1mL de amostra. As análises do produto transesterificado foram efetuadas após a etapa de purificação, conforme descrito no item 3.3.2.1.

Para o cálculo da viscosidade cinemática, mediu-se a densidade, utilizando um densímetro Modelo DMA 35N (Anton Paar, Suíça) a 15°C. Os valores da viscosidade cinemática foram obtidos pela Equação 3.7.

$$\text{Viscosidade Cinemática (cSt)} = \frac{\text{Viscosidade Absoluta (cP)}}{\text{Densidade (g/cm}^3\text{)}} \quad \text{Equação 3.7}$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção apresenta-se e analisam-se os principais resultados alcançados na pesquisa.

### 4.1. Caracterização das fontes de lipases

Os valores encontrados para atividade hidrolítica (em massa seca) das preparações de lipase imobilizada foram os seguintes (Tabela 4.1):

**Tabela 4.1.** Valores de atividade hidrolítica das fontes de lipase.

Enzima	Atividade (U/g)
Novozyme 435	68,02
Lipozyme TL IM	2991,15
Amano PS	3138,98

### 4.2. Caracterização das matérias-primas lipídicas

#### 4.2.1. Composição química e propriedades

Independente do tipo de catalisador selecionado, a qualidade do material lipídico empregado na reação de transesterificação é de fundamental importância, tendo em vista que venenos ou inibidores catalíticos podem reduzir o rendimento da reação.

Na Tabela 4.2 apresentam-se as propriedades de cada matéria lipídica utilizando a metodologia descrita na seção 3.3.1. Os resultados obtidos permitem discutir sobre as características das matérias-primas empregadas; os índices de acidez e peróxido indicam a deterioração da gordura em termos de rancidez hidrolítica (pelo índice de acidez) a partir da concentração de ácidos graxos livres e rancidez oxidativa (pelo índice de peróxido).

Os índices de acidez e oxidação indicam o estado de conservação da matéria-prima. Valores superiores a 10,0 não são recomendados para a produção enzimática de biodiesel. Assim, todos os materiais analisados estavam dentro da faixa recomendada. O índice de saponificação é útil para a verificação da massa molecular média de uma gordura e da adulteração por outros óleos com índices de saponificação muito diferentes (CECCHI, 2003), o valor deste índice é inversamente proporcional à massa molar média dos ácidos graxos dos triacilglicerídios presentes na amostra de óleo. Os resultados encontrados para este índice mostram que não há contaminação nos materiais lipídicos, o óleo de babaçu, por exemplo, apresentou maior índice de saponificação, já que é o que apresenta ácidos

graxos de cadeia menor.

**Tabela 4.2.** Caracterização das matérias lipídicas.

<b>Características</b>	<b>Óleo de Babaçu</b>	<b>Óleo de Palma</b>	<b>Óleo de Pinhão Manso</b>	<b>Óleo de Andiroba</b>	<b>Sebo Bovino</b>
<b>Índice de acidez (mg KOH/g)</b>	0,65	0,33	0,30	0,8	1,96
<b>Índice de peróxido (I. P.) (mEq/kg)</b>	1,82	2,05	4,23	5,20	2,54
<b>Índice de iodo (I. I.) (gI<sub>2</sub>/100g)</b>	25,38	98,04	101,39	72,4	33,49
<b>Índice de saponificação (I. S.) (mgKOH/g)</b>	238,20	198,39	141,44	194	197,03
<b>Viscosidade Cinemática (cSt)</b>	29,51	36,80	34,53	40,60	51,15

O índice de iodo revela o grau de insaturação da matéria-prima. Neste caso, por se tratar de óleos refinados, os valores encontrados, já que o limite máximo é de 120 gI<sub>2</sub>/100g de amostra (DABDOUB *et al.*, 2009). Dentre os materiais lipídicos analisados, o que apresentou maior teor de ácidos graxos insaturados foi o óleo de pinhão manso, com índice de iodo de 101,39gI<sub>2</sub>/100g de amostra.

Deve-se ressaltar que estes valores dos índices do óleo de pinhão manso, são para o óleo após passar pelo processo de refino descrito no item 3.3.3, pois antes disso o óleo bruto exibia índices de acidez e de peróxido superiores (3,63 e 5,48, respectivamente), que poderiam vir a prejudicar a reação. Com o tratamento de refino, diminuiu-se a acidez e os peróxidos.

Os componentes dos óleos vegetais, como os tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídeos, fosfolipídeos e outras substâncias são na maior parte constituintes oxidáveis em diferentes graus. Os ácidos graxos insaturados são os compostos mais susceptíveis ao processo oxidativo que pode ocorrer durante a fase de extração, no transporte ou na estocagem.

A composição química dos óleos têm sido objeto de revisões na literatura (MA e HANNA, 1999; CANAKCI, 2007, HAAS *et al.*, 2006) devido ao fato de que essa análise pode servir de base para uma análise preliminar sobre a viabilidade ou não do seu uso como matéria-prima para a produção de um biodiesel, que atenda completamente as especificações de qualidade (DABDOUB *et al.*, 2009). Por isso as amostras foram

analisadas por cromatografia gasosa pela metodologia apresentada no item 3.3.1.5.

Na Tabela 4.3 observa-se que o óleo de pinhão manso é o que mais apresenta ácidos graxos insaturados, 80,94% e o óleo de babaçu o que possui moléculas de cadeias menores, cerca de 45% de seus ácidos graxos são compostos pelo ácido láurico. Por isso eles são os óleos que possuem menor viscosidade (Tabela 4.2), pois essa característica é inversamente proporcional ao grau de insaturação das moléculas dos ácidos graxos e diretamente proporcional ao tamanho dessas (PINTO *et al*, 2005).

O sebo bovino possui um grande número de ácidos graxos de cadeia longa e saturada (ácidos palmítico e esteárico), essa característica faz com que o ponto de névoa seja maior, facilitando entupimento de canos quando for se utilizar o biodiesel produzido.

**Tabela 4.3.** Composição percentual em ácidos graxos dos óleos de babaçu, palma, pinhão manso, andiroba e sebo bovino.

Ácidos Graxos		Valores (%m/m)*				
		Babaçu	Palma	Pinhão Manso	Andiroba	Sebo Bovino
C8:0	Octanóico	3,50	-	-	-	-
C10:0	Cáprico	4,50	-	-	-	0,07
C12:0	Láurico	<b>44,70</b>	0,10	0,02	0,05	0,13
C14:0	Mirístico	17,50	1,20	0,07	0,06	2,62
C15:0	Pentadecanóico	-	-	0,03	0,02	0,52
C16:0	Palmítico	9,70	<b>46,80</b>	<b>12,90</b>	<b>29,01</b>	<b>22,94</b>
C16:1	Palmitoléico	-	-	0,87	0,90	2,40
C17:0	Margárico	-	-	0,12	0,13	1,25
C17:1	Margaroléico	-	-	0,05	0,05	0,52
C18:0	Esteárico	3,10	3,80	<b>5,63</b>	<b>9,95</b>	<b>18,90</b>
C18:1 Trans	Elaídico	-	-	-	-	5,68
C18:1	Oléico	<b>15,20</b>	<b>37,60</b>	<b>39,73</b>	<b>46,90</b>	<b>34,92</b>
C18:2 Trans	Linoelaídico	-	-	-	-	0,23
C18:2	Linoléico	1,80	10,50	<b>40,0</b>	<b>10,74</b>	<b>5,76</b>
C18:3 Trans	Translinolênico	-	-	-	-	0,15
C18:3	Linolênico	-	-	0,22	0,25	0,68
C18:4	Estearidônico	-	-	-	-	0,39
C20:0	Araquídico	-	-	0,18	1,35	0,23
C20:1	Gadoléico	-	-	0,07	0,10	0,22
C22:0	Behênico	-	-	0,05	0,31	0,07
C24:0	Lignocérico	-	-	0,06	0,18	0,04
NI	Não Identificado	-	-	-	-	2,28
Saturados		83,00	51,90	19,06	41,06	46,77
Insaturados		17,00	48,10	80,94	58,94	50,95
Massa molar média (g/mol)		709,40	864,18	860,00	830,00	856,76

\* massa de ácido graxo em relação à massa total de lipídios.

### 4.3. Resultados referentes à triagem de lipases imobilizadas na síntese de biodiesel pela transesterificação de diferentes matérias-primas lipídicas (óleos vegetais e sebo bovino).

Os ensaios de transesterificação foram efetuados nas condições descritas no item 3.3.3 e os resultados são apresentados a seguir.

Os resultados apresentados na Tabela 4.5 indicam que todas as preparações de lipase imobilizada nas condições testadas foram capazes de formar os principais ésteres de ácidos graxos presentes nas fontes lipídicas usadas e que todas as lipases apresentaram um comportamento similar em termos de seletividade para os ácidos graxos presentes em maior concentração em cada material lipídico.

Os resultados obtidos referentes ao rendimento da reação de transesterificação em função do tempo são apresentados na Figura 4.1 e detalhados nos Anexos 8.1 a 8.4. Os rendimentos em ésteres e produtividades alcançados para 48h de reação e cada preparação de lipase testada são mostrados na Tabela 4.4.

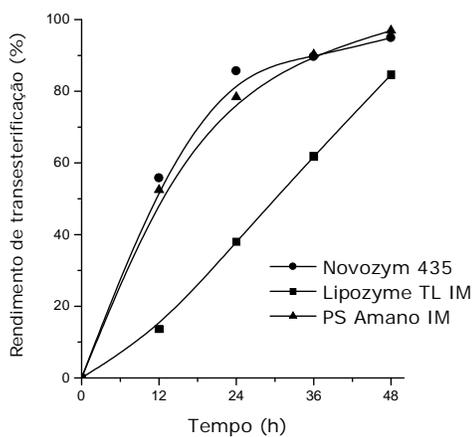
**Tabela 4.4.** Valores de rendimento (%), e produtividade (mg/g.h) obtidos nas reações de transesterificação para 48h de reação e cada material lipídico catalisados por diferentes lipases imobilizadas.

Fonte lipídica	Enzimas	Rendimento (%)	Produtividade (mg/g.h)
Babaçu	Novozym 435	94,90	13,96
	Lipozyme TL IM	84,63	12,54
	PS Amano IM	96,92	15,65
Pinhão manso	Novozym 435	98,85	15,02
	Lipozyme TL IM	94,00	14,59
	PS Amano IM	100,00	16,53
Palma	Novozym 435	82,73	12,74
	Lipozyme TL IM	74,00	11,39
	PS Amano IM	96,70	14,89
Andiroba	Novozym 435	86,95	13,54
	Lipozyme TL IM	73,77	11,46
	PS Amano IM	72,82	11,25
Sebo bovino	Novozym 435	83,37	13,76
	Lipozyme TL IM	66,74	10,88
	PS Amano IM	92,03	14,94

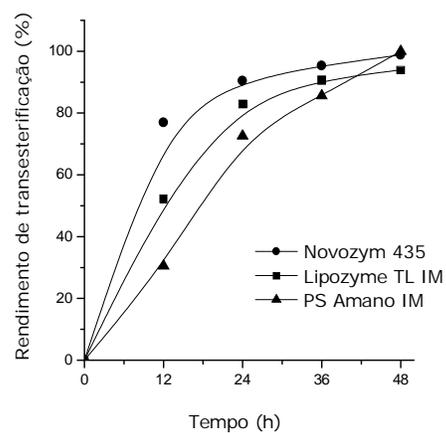
**Tabela 4.5.** Concentração em ésteres de etila formados nas reações de transesterificação enzimática de diferentes fontes lipídicas e etanol, no tempo de 48 horas.

Fonte lipídica	Enzimas	Concentração Total (g/g) <sup>1</sup>	Ésteres etílicos (%m/m) <sup>1</sup>							
			C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	C18:2
Babaçu	Novozym 435	0,6747	2,88	3,17	37,20	10,40	5,20	0,08	7,29	1,26
	Lipozyme TL IM	0,6017	3,00	2,94	30,98	8,90	5,09	0,11	7,79	1,36
	PS Amano IM	0,7514	3,63	3,63	38,69	11,68	6,61	0,53	8,44	1,92
Pinhão manso	Novozym 435	0,7212	-	-	-	-	11,50	9,42	24,59	26,61
	Lipozyme TL IM	0,7002	-	-	-	-	10,79	8,03	24,04	19,98
	PS Amano IM	0,7936	-	-	-	-	12,06	3,02	25,22	39,05
Palma	Novozym 435	0,6114	-	-	-	0,025	28,79	3,11	23,97	5,24
	Lipozyme TL IM	0,5467	-	-	-	0	26,55	2,86	21,05	4,19
	PS Amano IM	0,7149	-	-	-	0,16	37,04	4,38	24,71	5,19
Andiroba	Novozym 435	0,6500	-	-	-	-	23,41	6,29	27,98	6,84
	Lipozyme TL IM	0,5500	-	-	-	-	21,77	5,79	22,14	5,01
	PS Amano IM	0,5400	-	-	-	-	22,81	6,29	20,21	4,70
Sebo bovino	Novozym 435	0,6607	-	-	-	2,14	22,19	6,88	27,84	7,01
	Lipozyme TL IM	0,5222	-	-	-	1,34	17,24	7,02	21,65	4,97
	PS Amano IM	0,7174	-	-	-	1,69	24,22	10,06	28,86	6,69

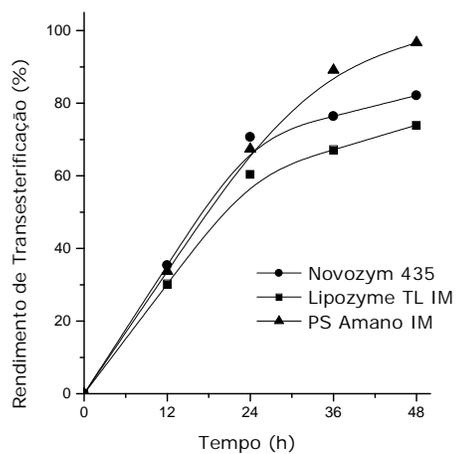
<sup>1</sup> massa de éster em relação à massa de meio reacional.



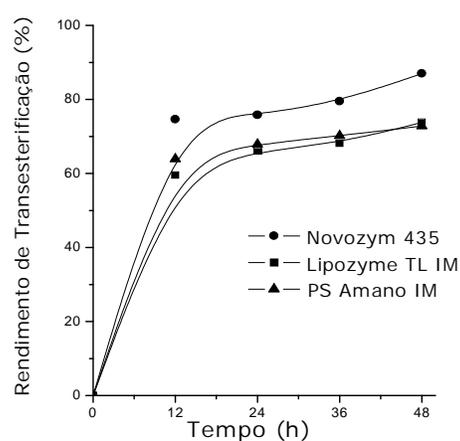
(a)



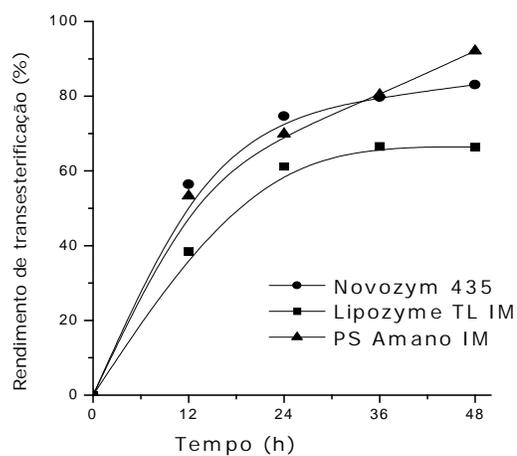
(b)



(c)



(d)



(e)

**Figura 4.1.** Rendimento de transesterificação empregando diferentes lipases imobilizadas (-■-Lipozyme TL IM; -●-Novozym 435, -▲-PS Amano IM) em função do tempo de reação da transesterificação de diferentes fontes lipídicas: (a) Óleo de babaçu, (b) Óleo de pinhão manso, (c) Óleo de palma, (d), Óleo de andiroba, (e) sebo bovino.

Analisando a Figura 4.1 e a Tabela 4.5, verifica-se que tanto a velocidade de reação quanto o rendimento em ésteres foram dependentes da fonte de lipase e do material lipídico empregados. Os maiores rendimentos foram obtidos para os óleos de pinhão manso e babaçu. Com o óleo de pinhão manso os rendimentos foram de 100% com a enzima PS Amano IM; 98,85% para a enzima Novozym 435 e 94% para a Lipozyme TL IM. Com o óleo de babaçu as enzimas PS Amano IM e Novozym 435 apresentaram comportamento semelhante, 96,92% e 94,90%, respectivamente. A enzima Lipozyme TL IM foi a que apresentou menor resultado com o óleo de babaçu, 84,63%, e com as outras fontes lipídicas.

O maior rendimento encontrado para os óleos de pinhão manso e babaçu para as enzimas PS Amano e Novozym pode ser explicado pelo fato de as duas serem não específicas. A enzima Lipozyme TL IM apresentou comportamento diferente destas duas, por se uma enzima 1-3 específica, mas seus resultados foram satisfatórios com os óleos de pinhão manso e babaçu. O menor rendimento também pode ser atribuído ao papel da água no meio reacional, que apesar de ser essencial para manter a flexibilidade conformacional da enzima, pode, no entanto ter contribuído para reduzir a atividade da preparação enzimática deste biocatalisador.

A maior velocidade de reação inicial foi obtida para as enzimas Novozym 435 e PS Amano IM com o óleo de babaçu (Figura 4.1-a), o que pode ser explicado devido às menores cadeias desse óleo que interagem de forma mais eficaz com a enzima e o álcool. As reações com o óleo de andiroba foram as mais lentas (Figura 4.1- d), pode ter ocorrido a formação de água nessas reações, reduzindo a atividade das enzimas.

O menor rendimento obtido com o óleo de andiroba pode ser atribuído também a alguma característica da matéria-prima, como por exemplo, grande tempo de estocagem, que veio a oxidar o óleo, diminuindo a atividade da enzima na reação de transesterificação.

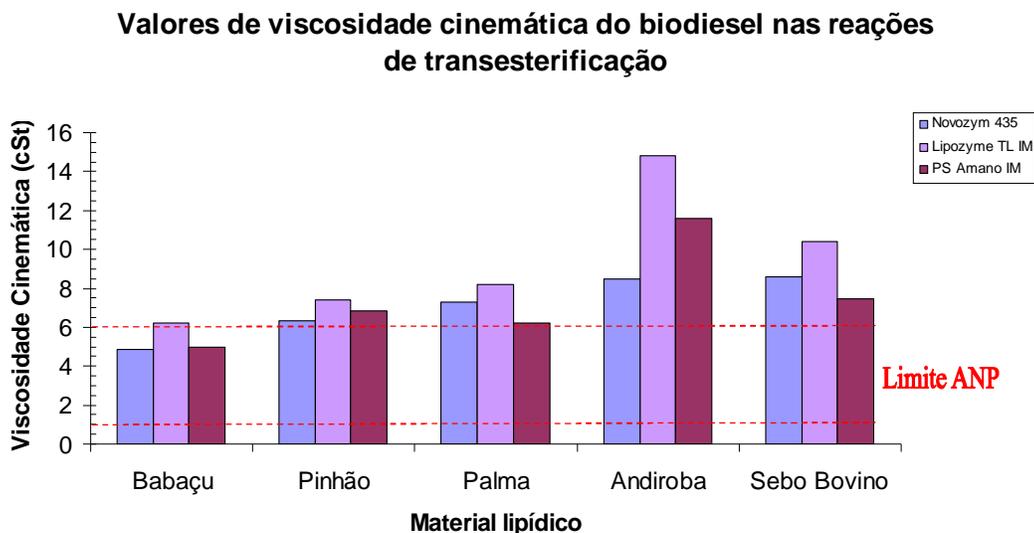
#### **4.3.1. Viscosidade cinemática do biodiesel**

A viscosidade pode ser usada como um parâmetro para o controle da reação de biodiesel, confirmando a conversão dos óleos vegetais ou gorduras animais em ésteres (KNOTHE *et al.*, 2006) pela redução acentuada da viscosidade da matéria-prima e do biodiesel. Para a determinação da viscosidade do biodiesel foi adotada a metodologia descrita no item 3.3.4.2.

A Tabela 4.5 mostra os valores encontrados para a viscosidade das amostras de biodiesel obtidas em cada reação. Todas as amostras apresentaram consistente redução da viscosidade em relação ao seu material lipídico original, o que também confirma a conversão dos triglicerídeos em ésteres etílicos, como determinado por cromatografia de fase gasosa (Tabela 4.6).

**Tabela 4.6.** Valores de viscosidade cinemática (cSt) obtidos nas reações de transesterificação para 48h de reação e cada material lipídico catalisados por diferentes lipases imobilizadas.

Fonte lipídica	Enzimas	Viscosidade Cinemática (cSt)
Babaçu	Novozym 435	4,85
	Lipozyme TL IM	6,22
	PS Amano IM	4,98
Pinhão manso	Novozym 435	6,34
	Lipozyme TL IM	7,39
	PS Amano IM	6,86
Palma	Novozym 435	7,32
	Lipozyme TL IM	8,21
	PS Amano IM	6,23
Andiroba	Novozym 435	8,46
	Lipozyme TL IM	11,60
	PS Amano IM	14,84
Sebo bovino	Novozym 435	8,61
	Lipozyme TL IM	10,39
	PS Amano IM	7,45



**Figura 4.2.** Gráfico da viscosidade do biodiesel produzido por diferentes materiais lipídicos comparada ao limite estabelecido pela ANP.

As amostras de matérias-primas com maior concentração de ácidos graxos saturados em sua composição deveriam apresentar-se mais viscosas que aquelas com maior presença de ácidos graxos insaturados, e isso foi observado nos resultados obtidos.

Na Figura 4.2 são apresentados os valores de viscosidade para cada material lipídico em relação às normas da ANP (3,0 a 6,0 cSt), observa-se que somente as amostras de biodiesel de babaçu com as enzimas Novozym 435 e PS Amano IM apresentaram valores de viscosidade dentro dessas normas.

Para os outros materiais lipídicos, os altos valores de viscosidade podem ser atribuídos à conversão insuficiente. Para aumentar a conversão, pode-se pensar em aumentar a massa de biocatalisador ou o tempo de reação.

Como os valores de viscosidade obtidos ainda não se encontram na faixa estabelecida pela ANP é necessário um estudo de otimização desta reação em função de vários parâmetros de controle, tais como viscosidade, rendimento de transesterificação e estabilidade térmica (termogravimetria). Uma alternativa seria a mistura de diferentes matérias-primas, como realizado em RAMPIN, (2007) e DABDOUB *et al.*, (2009).

## 5. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo selecionar a fonte de lipase mais adequada para sintetizar biodiesel a partir de diferentes fontes lipídicas e etanol, tomando como parâmetros de avaliação do processo o rendimento global da reação e a produtividade. Assim também foi possível avaliar qual a melhor fonte lipídica para cada enzima.

Os resultados obtidos foram altamente satisfatórios, e com base nos dados relatados neste trabalho pôde-se concluir que:

- As enzimas Novozym 435 e PS Amano IM apresentaram resultados muito semelhantes, principalmente para os óleos de babaçu (94,90 e 96,42%) e pinhão manso (98,98 e 100%).
- A preparação enzimática PS Amano IM apresentou um comportamento muito semelhante ao da Novozym 435, que é a mais usada para mediar reações típicas das lipases. Desta forma apresenta-se como mais uma fonte promissora para aplicação nessas reações.
- O menor desempenho obtido pela lipase Lipozyme TL IM pode ser atribuído à sua especificidade ou ao papel da água no meio reacional.
- Os óleos de pinhão manso e babaçu apresentaram os resultados mais satisfatórios para todas as enzimas, o que se deve a suas composições em ácidos graxos, mostrando-se assim excelentes alternativas na produção de biodiesel.
- O óleo de palma e o sebo bovino apresentaram resultados excelentes para as enzimas PS Amano IM (96,70 e 92,03%) e Novozym 435 (82,73 e 83,37%), o único problema destas fontes lipídicas está na alta viscosidade, o que ainda não é totalmente revertido com a transesterificação enzimática.
- O óleo de andiroba foi o único que apresentou rendimentos inferiores a 90% para todas as enzimas, que pode ser atribuído a alguma característica da matéria-prima, como por exemplo, grande tempo de estocagem.
- As propriedades do produto transesterificado e semi-purificado não atenderam às normas estabelecidas pela ANP para uso como combustível, principalmente em relação à viscosidade.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Apresentam-se algumas sugestões para a continuidade da pesquisa

- Determinar a estabilidade operacional dos biocatalisadores na síntese de biodiesel em regime de bateladas consecutivas.
- Avaliar a possibilidade de emprego de outras configurações de reatores , bem como, estudar outras formas de agitação do meio reacional (agitação mecânica, por exemplo), tornando possível uma melhor homogeneidade das matérias-primas, que é fundamental para a reação de transesterificação.
- Avaliar o emprego de outras condições para o processo como meio com fluido supercrítico e aquecimento por microondas.
- Avaliar a preparação de *blends* preparados com a adição de biodiesel produzido a partir de óleo de soja (que é um óleo menos viscoso), para diminuir a viscosidade do biodiesel final.

## 7. REFERÊNCIAS

<http://www.google.com.br/images>

ABIGOR, R., UADIA, P., FOGLIA, T., 2000, “Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from Nigerian lauric oils”, *Biochemical Transactions*, v. 28, pp. 979-981.

ABDALLA, A. L., SILVA, J. C. F., GODOI, A. R., 2008, “Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes”, *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, suplemento especial, pp.260-258.

ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: <[www.aboissa.com.br](http://www.aboissa.com.br)>. Consultado em 29 de março 2010.

AKINTAYO, E. T., 2004, “Characteristics and composition of *Parkia biglobbosa* and *Jatropha curcas* oils and cakes”, *Bioresource Technology*, v. 92, pp. 307-310.

AKOH, C. C., CHANG, S. W., LEE, G. C., 2007, “Enzymatic approach to biodiesel production”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n.22, pp. 8995-9005.

AKOH, C. C., MIN, D. B., 2008, *Food Lipids*. 3<sup>rd</sup> ed. Boca Raton, Fl. EUA, CRC Press.

ALCANTARA, R., AMORES, J., CANOIRA, L., 2000, “Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow”, *Biomass and Bioenergy*, v. 18, n. 6, pp. 515-527.

AMANO ENZYME Inc. Disponível em: < <http://www.amano-enzyme.co.jp/>>. Consultado em: 12 mar. 2010.

ANP, AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, 2010. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=17680&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1271625362156>> Consultado em: 18 abr. 2010.

ANTCZAK, M. S., KUBIAK, A. ANTCZAK, T., 2009, “Enzymatic biodiesel synthesis –Key factors affecting efficiency of the process”, *Renewable Energy*, v. 34, pp. 1185-1194.

AMERICAN OIL CHEMISTS’ SOCIETY, 2004, *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 5<sup>th</sup> Edition, AOCS Press: Champaign.

ARRUDA, F. P., BELTRÃO, N. E. M., ANDRADE, A. P., 2004, “Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino”, *Revista de oleaginosas e fibrosas*, v. 8, pp. 789-799.

BARON, A. M., SARQUIS, M. I. M., BAIGORI, M., MITCHELL, D. A., 2005, “Comparative study of the synthesis of n-butyl-oleate using a crude lipolytic extract of *Penicillium coryophilum* in water-restricted environments”, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 34, n. 1-6, pp. 25-32.

BRANCO, L. G. B., 2009, “Biocombustíveis brasileiros e o mercado internacional: desafios e oportunidades”, *Revista CEJ*, Ano XIII, n. 46, pp. 39-48.

CAJAL, Y., SVENDSEN, A., GIRONA, V., 2000, “Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase”, *Biochemistry*, v. 39, n. 2, pp. 413-423.

CANAKCI, M., 2007, “The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks”, *Bioresource Technology*, v. 98, n.1, pp.183-190.

CARNIELLI, F., 2003, “O combustível do futuro.” Disponível em:  
<<http://www.ufmg.br/boletim/bol1413/quarta.shtml>> Consultado em: 06 abr. 2010.

CASTRO, H. F., MENDES, A. A., SANTOS, J. C, 2004, “Modificação de óleos e gorduras por biotransformação”. *Química Nova*, v.27, n.1, pp.146-156.

CONCEIÇÃO, M. M., CANDEIA, R. A., SILVA, F. C., 2007, “Thermoanalytical characterization of castor oil biodiesel”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 11, n. 5, pp. 964-975.

CECCHI, H. M., 2003, *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. 2ed.rev. Campinas: Editora da Unicamp.

CORTESÃO, M., 1956, *Culturas tropicais: plantas oleaginosas*. Ed. Livraria Clássica, Lisboa.

COSTA NETO, P. R., ROSSI, L. F. S., RAMOS, L. P., 2000, “Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras”, *Química Nova*, v. 23, n.4, pp. 531-537.

COSTA NETO, P. R., 2002, *Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

COUTO, L. C., COUTO, L., WATIZLAWICK, L. F., 2006, “Biodiesel: Uma Revisão”, *Biomassa e Energia*, v.3, n.2, pp. 137-183.

CYGLER, M., SCHRAG, J. D., 1999, “Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase”, *Biochimica et Acta*, v. 1441, pp. 205-214.

DABDOUB, M. J., BRONZEL, J. L., RAMPIN, M. A., 2009, “Biodiesel: visão crítica no status atual e perspectivas na academia e na indústria”, *Química Nova*, v. 32, n. 3, pp. 776-792.

D’AGOSTINI, D., 2001, *Obtenção de lipídios estruturados por interesterificação de triacilglicerídeos de cadeia média e longa*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo-SP, Brasil.

DALLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M. G., SOLDI, V., 2004, “Synthetic applications of lipases immobilized on polymers”, *Química Nova*, v. 27, n. 4, pp. 623-630.

DA RÓS, P. C. M., 2009, *Etanolise de óleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de microondas*. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de Lorena-USP. Lorena-SP, Brasil.

DEREWENDA, U., BRZOZOWSKI, A. M., LAWSON, D. M., 1992, “Catalysis at the interface: the anatomy of conformational change in the triglyceride lipase”, *Biochemistry*, v. 31, pp.1532-1541.

DU, W., SUN, T., CHEN, X., 2008, “Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 79, pp. 331-337.

ENCINAR, J. M., GONZÁLEZ, J. F., RODRÍGUEZ, J. J., 2002, “Biodiesel fuels from vegetable oils: transesterification of *Cynara cardunculus* L. oils with ethanol”, *Energy Fuels*, v. 16, n. 2, pp. 443–450.

FELIZARDO, P. M. G., 2003, *Produção de biodiesel a partir de óleos usados de frituras*. Monografia, Centro de Informação de Resíduos, Instituto Superior Técnico – Departamento de Engenharia Química, Lisboa, Portugal.

FERNANDES, M. L. M., SAAD, E. B., MEIRA, J. A., 2007, “Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media”, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, v. 44, n.1, pp.8-13.

FERRAZ, I. D. K., CAMARGO, J. L. C., SAMPAIO, P. T. B., 2002, “Sementes e Plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D.C.): Aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos”, *Acta Amazonica*, v. 32, n. 4, pp. 647-661.

FOJAN, P.; JONSON, P. H., PETERSEN, M. T. N., 2000, “What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach”, *Biochemie*, v. 82, n. 11, pp. 1033-1041.

FREEDMAN, B., BUTTERFIELD, R. O., PRYDE, E. H., 1986, “Transesterification kinetics of soybean oil”, *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, v. 63, n. 10, pp.1375-1380.

FROEHNER, S., LEITHOLD, J., LIMA, L. F. J., 2007, “Transesterificação de óleos vegetais: caracterização por cromatografia em camada delgada e densidade”, *Química Nova*, v.30, n.8, pp. 2016-2019.

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

GERPEN, V., SHANKS, B., KNOTHE, G., 2004, “*Biodiesel Production Technology*”, publicação do National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, EUA.

GOMES, M. BIONDI, A. BRIANEZI, A., 2009. “O Brasil dos Agrocombustíveis – Gordura animal, dendê, algodão, pinhão manso, girassol e canola”. In: *Quinto Relatório do Centro de Monitoramento de Agrocombustíveis*, ONG Repórter Brasil.

GROCHULSKI, P., LI, Y., SHRAG, J. D., 1993, “Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase”, *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, pp.12843-12847.

GROCHULSKI, P., LI, Y., SHRAG, J. D., 1994, “Two conformational states of *Candida rugosa* lipase”, *Protein Science*, v. 3, pp. 82-91.

GUNSTONE, F. D., 1967, *An Introduction to the Chemistry and Biochemistry of Fatty Acids and their Glycerides*. 2<sup>nd</sup> Edition, Chapman & Hall, London.

HAAS, W., MITTELBAACH, M., 2000, “Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L”, *Industrial Crops and Products*, v. 12, pp. 111-118.

HAAS, M. J., McALOON, A. J., YEE, W. C., 2006, “A process model to estimate biodiesel production costs”, *Bioresource Technology*, v.97, n.4, pp.671-678.

IMAHARA, H., MINAMI, E., SAKA, S., 2006, “Thermodynamic study on cloud point of biodiesel with its fatty acid composition”, *Fuel*, v. 85, n. 13/12, pp. 1666-1670.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008, *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 1ª edição digital, São Paulo-SP, Brasil. Disponível em: < [http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf)> Consultado em: 12 de janeiro de 2010.

JAEGER, K. E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B. W., 1994, “Bacterial lipases”, *FEMS Microbiology Reviews*, v. 15, pp.29-63.

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

JAEGER, K., REETZ, M. T., 1998, “Microbial lipases form versatile tools for biotechnology”, *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 9, pp. 396-403.

KENNEDY, J.F., CABRAL, J.M.S., 1987, *Enzyme Technology. In: Biotechnology – A Comprehensive Treatise in 8 vol.* Edited by H.J.REHM and G.REED: v.7 Editor John F. Kennedy, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, USA.

KERSCHBAUM, S., RINKE, G., 2004, “Measurement of the temperature dependent viscosity of biodiesel fuels”, *Fuel*, v. 83, n. 3, pp. 287-291.

KNOTHE, G., 2005, “Dependence of biodiesel fuel properties on the structures of fatty acid alkyl esters”, *Fuels Processing Technology*, v.86, pp.1059-1070.

KNOTHE, G., GERPEN, J. V., RAMOS, L.P., 2006, *Manual do Biodiesel*. 1ª ed. São Paulo, Edgard Blucher.

KOSE, O., TÜTER, M., AKSOY, H. A., 2002, “Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium”, *Bioresource Technology*, v. 83, pp. 125-129.

KRAUSE, L. C., 2008, *Desenvolvimento do processo de produção de biodiesel de origem animal*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS-Brasil.

KUMAR, M. S., KERIHUEL, A., BELLETTRE, J., 2006, "Ethanol animal fat emulsions as a diesel engine fuel – Part 2: Engine test analysis", *Fuel*, v. 85, n. 17-18, pp. 2646-2652.

LANG, X., DALAI, A. K., BAKHSHI, N. N., 2001, "Preparation and characterization of biodiesels from various bio-oils", *Bioresource Technology*, v. 80, n. 1, pp. 53-62.

LANGONE, M. A. P., MATASSOLI, A. L. F., CORRÊA, I. N. S., 2009, "Enzymatic synthesis of biodiesel via alcoholysis of palm oil", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 155, pp. 347-355.

LEBEDEVAS, S., VAICEKAUSKAS, A., LEBEDEVA, G., 2006, "Use of waste fats of animal and vegetable origin for the production of biodiesel fuel: quality, motor properties, and emissions of harmful components", *Energy and Fuel*, v. 20, n.5, pp. 2274-2280.

LI, L., DU, W., LIU, D., 2006, "Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 43, pp. 58-62.

LIMA, J. R. D. O., DA SILVA, R. B., DOS SANTOS, L. S. S., 2007, "Biodiesel from babassu (*Orbignya* sp.) synthesized via ethanolic route", *Química Nova*, v. 30, pp. 600-603.

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

MA, F., CLEMENTS, L. D., HANNA, A., 1998, "Biodiesel fuel from animal fat. Ancillary studies on transesterification of beef tallow", *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 37, n. 9, pp. 3768-3771.

MA, F., HANNA, M.A., 1999, "Biodiesel Production: a review", *Bioresource Technology*, v.70, n. 1, pp. 1-15.

MACEDO, G. A., MACEDO, J. A., 2004, "Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais", *Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 7, n. 32, pp. 38-46.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F., 2007, "Possible methods for biodiesel production", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.11, pp. 1300-1311.

MATEO, C., PALOMO, J. M., FERNANDEZ-LORENTE, G., 2007, "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques", *Enzyme Microb. Tech.*, v.40, pp. 1451-1463.

MEHER, L.C., SAGAR, D. V., NAIK, S.N., 2006, "Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 10, n. 3, pp. 248-268.

MENDONÇA, A. P., FERRAZ, I. D. K., 2007, "Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil", *Acta Amazônica*, v. 37, n. 3, pp. 353-364.

MIRANDA R. de M.; MOURA R. D., 2003, "Óleo de dendê, alternativa ao óleo diesel como combustível para geradores de energia em comunidades da Amazônia", In: *Encontro de Energia no Meio Rural*, 3, Campinas-SP, Brasil. Anais eletrônicos... Disponível em: <[http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=MSC0000000022000000200042&lng=pt&nrm=abn](http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC0000000022000000200042&lng=pt&nrm=abn)>. Consultado em: 25 Maio 2010.

MODI, M. K., REDDY, J. R. C., RAO, B. V. S. K., 2007, "Lipase-catalyzed mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor", *Bioresource Technology*, v. 98, pp.

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

OLIVEIRA, M. A., 2007, *Resolução Enzimática de Álcoois Secundários*. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil.

OPENSHAW, K., 2000, "A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise", *Biomass and Bioenergy*, v. 19, pp. 1-15.

PAIVA, A. L., BALCÃO, V. M., MALCATA, F. C., 2000, "Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases", *Enzyme and Microbial Technology*, v.27, n.3-5, pp.187-204.

PAQUES, F. W., MACEDO, G. A., 2006, "Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais", *Química Nova*, v. 29, n. 1, pp. 93-99.

PARENTE, E. J. S., 2003, *Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado*. Disponível em: <[www.xitizap.com/Livro-Biodiesel](http://www.xitizap.com/Livro-Biodiesel)>. Acesso em 28 de abril 2010.

PAULA, A. V., MOREIRA, A. B. R., De CASTRO, H. F., 2008, "Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias", *Química Nova*, v. 31, pp. 35-40.

PEIXOTO, A.R., 1973, *Plantas oleaginosas arbóreas*. Ed. Nobel, São Paulo-SP, Brasil.

PINTO, A. C., GUARIEIRO, L. N. L., REZENDE, M. J. C., 2005, "Biodiesel: an overview", *J. Braz. Chem. Soc.*, v.16, n. 6b, pp.1113-1130.

PLISSÃO, C., 2006, *Aminólise enantiosseletiva do (R,S)-mandelato de metila síntese do acetato de geranoíla mediada por lipases*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

PRAMANIK, K., 2003, "Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine", *Renewable Energy*, v. 28, N. 2, pp. 239-248.

QUINTELLA, C. M., TEIXEIRA, L. S. G., KORN, M. G. A. K., 2009, "Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I", *Química Nova*, v. 32, pp. 793-808.

RAMOS, L. P., KUCEK, K. T., DOMINGOS, A. K., 2003, “Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil”, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 31, pp. 28-37.

RAMPIN, M. A., 2007, *Síntese de ésteres etílicos a partir dos óleos de soja e de mamona utilizando a lipase imobilizada de Thermomyces lanuginosus (LIPOZYME TL IM)*. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil.

RIBEIRO, S. K., 2010, “Aposta no Biodiesel”, Disponível em: <[http://74.125.155.132/scholar?q=cache:lOm8lkfdAfEJ:scholar.google.com/+ind%C%BAstria+biodiesel+brasil+soja&hl=pt-BR&as\\_sdt=2000](http://74.125.155.132/scholar?q=cache:lOm8lkfdAfEJ:scholar.google.com/+ind%C%BAstria+biodiesel+brasil+soja&hl=pt-BR&as_sdt=2000)>. Consultado em: junho de 2010.

ROBLES-MEDINA, A., GONZALEZ-MORENO, P. A., ESTEBAN-CERDAN, L., 2009, “Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production”, *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 4, pp. 398-408.

RODRIGUES, R. C., 2009, *Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

ROYON, D., DAZ, M., ELLENRIEDER, G., 2007, “Enzymatic production of biodiesel from cottonseed oil using t-butanol as a solvent”, *Bioresource Technology*, v. 98, pp. 648-653.

ROZENAAL, A., 1992, “Interesterification of oils and fats”, *Inform*, v. 3, n. 11, pp. 1232-1237.

SALIS, A., PINNA, M., MONDUZZI, M., 2005, “Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis”, *J. Biotechnol.*, v. 119, pp. 291-299.

SARDA, L., DESNUELLE, P., 1958, “Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion”, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 30, n. 3, pp. 513-521.

- SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS, R. M., 1998, "Transesterification of vegetable oils: a review", *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 9, n. 1, pp. 199-210.
- SELMİ, B., THOMAS, D., 1998, "Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in solvent-free medium", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 75, pp. 691-695.
- SHAH, S., SHARMA, S., GUPTA, M., 2003, "Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil", *Energy and Fuels*, v.18, pp. 154-159.
- SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C., 2001, "Production, purification, characterization, and applications of lipases", *Biotechnology Advances*, v. 19, pp. 627-662.
- SHAY, E. G., 1993, "Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities", *Biomass and Bioenergy*, v. 4, n. 4, pp. 227-242.
- SILVA, C. L. M., 2005, *Obtenção dos ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol*. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil.
- SOARES, C. M. F., CASTRO, H. F., MORAES, F. F., ZANIN, G. M., 1999, "Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.79, pp. 745-757.
- SOARES, C. M. F., 2004, *Encapsulação da Enzima Lipase em Matrizes Sol-Gel e sua Aplicação em Reações de Hidrólise e Esterificação*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, Brasil.
- STREITWIESER, A., HEATHCOCK, C. H., KOSOWER, E.M., 1992, *Introduction to Organic Chemistry*. 4<sup>th</sup> ed., Macmillan, New York.
- TAN, T., LU, J., NIE, K., 2010, "Biodiesel production with immobilized lipase: A review", *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 5, pp. 628-634.

TASHTOUSH, G., AL-WIDYAN, M. I., AL-SHYOUKH, A. O., 2003, "Combustion performance and emissions of ethyl ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace", *Applied Thermal Engineering*, v. 23, n. 3, pp. 285-293.

URIOSTE, D., CASTRO, M. B. A., DE CASTRO, H. F., 2008, "Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu", *Química Nova*, v. 31, n.2, pp. 407-412.

VICHI, F. M., MANSOR, M. T. C., 2009, "Energia, meio ambiente e economia: o Brasil no contexto mundial", *Química Nova*, v. 32, n. 3, pp. 757-767.

VINU, A., MIYHARA, M., ARIGA, K., 2005, "Biomaterial immobilization in nanoporous carbon molecular sieves: influence of solution pH, pore volume and diameter", *J. Physical Chem. B*, v. 109, n. 13, pp. 6439-6441.

WU, J. C., LEE, S. S., MAHMOOD, M. M. B., 2007, "Enhanced activity and stability of immobilized lipases by treatment with polar solvents prior to lyophilization", *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, v.45, pp. 108-112.

YAHYA, A. R. M., ANDERSON, W. A., MOO-YOUNG, M., 1998, "Esters synthesis in lipase-catalyzed reactions", *Enzyme and Microbial*, v.23, n.7-8, pp.438-450.

ZANIN, G. M., MORAES, F. F., 2004, "Enzimas Imobilizadas". In: Said, S., Pietro, R. C. L. R. (Ed.), *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*, 1ª ed., capítulo 4, Ribeirão Preto-SP, Legis Summa.

## 8. ANEXOS

### ANEXO 8.1

Dados referentes aos testes de transesterificação do óleo de babaçu no reator de três bocas.

#### Materiais:

- **PS Amano IM:** 6,26 g de etanol e 13,74 g de óleo de babaçu (razão molar 1:6)  
quantidade de lipase massa seca: 2,18g (10%), com umidade de 9,09%.
- **Lipozyme TL IM:** 7,4g de etanol e 12,6 e óleo de babaçu (razão molar 1:9)  
quantidade de lipase massa seca: 2,19g (10%), com umidade de 9,70%.
- **Novozym 435:** 7,4g de etanol e 12,6 e óleo de babaçu (razão molar 1:9)  
quantidade de lipase massa seca: 2,16g (10%), com umidade de 7,80%.

Tempo de Reação (h)	Rendimento de transesterificação (%)		
	Novozym 435	Lipozyme TL IM	PS Amano IM
12	55,79	13,69	52,46
24	85,64	37,69	78,37
36	89,64	61,91	90,26
48	94,90	84,93	96,92

### ANEXO 8.2

Dados referentes aos testes de transesterificação do óleo de pinhão manso no reator de três bocas.

#### Materiais:

- **PS Amano IM:** 6,50 g de etanol e 13,50 g de óleo de pinhão manso (razão molar 1:9)  
quantidade de lipase massa seca: 2,18g (10%), com umidade de 9,09%.
- **Lipozyme TL IM:** 6,50 g de etanol e 13,50 g de óleo de pinhão manso (razão molar 1:9)  
quantidade de lipase massa seca: 2,19g (10%), com umidade de 9,70%.
- **Novozym 435:** 6,50 g de etanol e 13,50 g de óleo de pinhão manso (razão molar 1:9)  
quantidade de lipase massa seca: 2,16g (10%), com umidade de 7,80%.

Tempo de Reação (h)	Rendimento de transesterificação (%)		
	Novozym 435	Lipozyme TL IM	PS Amano IM
12	76,96	52,21	30,47
24	90,42	83,05	72,56
36	95,34	90,70	85,60
48	98,85	94,00	100,00

### ANEXO 8.3

Dados referentes aos testes de transesterificação do óleo de palma no reator de três bocas.

#### Materiais:

- **PS Amano IM:** 6,50 g de etanol e 13,50 g de óleo de palma (razão molar 1:9)  
quantidade de lipase massa seca: 2,18g (10%), com umidade de 9,09%.
- **Lipozyme TL IM:** 6,50g de etanol e 13,50 e óleo de palma (razão molar 1:9)  
quantidade de lipase massa seca: 2,19g (10%), com umidade de 9,70%.
- **Novozym 435:** 6,50g de etanol e 13,50 e óleo de palma (razão molar 1:9)  
quantidade de lipase massa seca: 2,16g (10%), com umidade de 7,80%.

Tempo de Reação (h)	Rendimento de transesterificação (%)		
	Novozym 435	Lipozyme TL IM	PS Amano IM
12	35,35	30,19	33,70
24	70,69	60,37	67,39
36	76,41	67,19	89,10
48	82,13	74,00	96,70

### ANEXO 8.4

Dados referentes aos testes de transesterificação do óleo de andiroba no reator de três bocas.

#### Materiais:

- **PS Amano IM:** 6,65 g de etanol e 13,35 g de óleo de andiroba (razão molar 1:6)  
quantidade de lipase massa seca: 2,18g (10%), com umidade de 9,09%.
- **Lipozyme TL IM:** 6,65g de etanol e 13,35 e óleo de andiroba (razão molar 1:9)  
quantidade de lipase massa seca: 2,19g (10%), com umidade de 9,70%.
- **Novozym 435:** 6,65g de etanol e 13,35 e óleo de andiroba (razão molar 1:9)  
quantidade de lipase massa seca: 2,16g (10%), com umidade de 7,80%.

Tempo de Reação (h)	Rendimento de transesterificação (%)		
	Novozym 435	Lipozyme TL IM	PS Amano IM
12	74,59	59,60	63,89
24	75,75	66,10	67,90
36	79,47	68,18	70,18
48	86,95	73,77	72,82

**ANEXO 8.5**

Dados referentes aos testes de transesterificação do sebo bovino no reator de três bocas.

**Materiais:**

- **PS Amano IM:** 4,9 g de etanol e 15,10 g de sebo bovino (razão molar 1:6)  
quantidade de lipase massa seca: 2,18g (10%), com umidade de 9,09%.
- **Lipozyme TL IM:** 4,9 g de etanol e 15,10 g de sebo bovino (razão molar 1:6)  
quantidade de lipase massa seca: 2,16g (10%), com umidade de 9,70%.
- **Novozym 435:** 4,9 g de etanol e 15,10 g de sebo bovino (razão molar 1:6)  
quantidade de lipase massa seca: 2,19g (10%), com umidade de 7,80%.

<b>Tempo de Reação (h)</b>	<b>Rendimento de transesterificação (%)</b>		
	<b>Novozym 435</b>	<b>Lipozyme TL IM</b>	<b>PS Amano IM</b>
12	56,40	38,52	53,29
24	76,50	61,19	69,90
36	76,73	66,51	80,38
48	83,67	66,41	92,01