

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL / MG
CAMPUS AVANÇADO DE POÇOS DE CALDAS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA AMBIENTAL

CLEITON BARCOT TINTOR

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS GORDUROSOS PARA A PRODUÇÃO DE
BIODIESEL VIA ENZIMÁTICA**

Poços de Caldas / MG
2014

CLEITON BARCOT TINTOR

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS GORDUROSOS PARA A PRODUÇÃO DE
BIODIESEL VIA ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas - MG.

Orientador: Ernandes Benedito Pereira

Co-orientadora: Daniela Battaglia Hirata

Poços de Caldas / MG
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

T593u Tintor, Cleiton Barcot..
Utilização de resíduos gordurosos para a produção de biodiesel via enzimática./Cleiton Barcot Tintor. - Poços de Caldas, 2014.
86fls.: il.; 30 cm.

Orientador: Ernandes Benedito Pereira.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental). –
Universidade Federal de Alfenas- Poços de Caldas, MG, 2014.

Bibliografias: fls. 75-85

1. Transesterificação. 2. Lipase AK. 3. Residuo gorduroso. I. Pereira, Ernandes Benedito (orient.). II. Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL. III. Título.

CDD 662.88

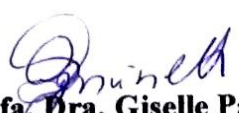
CLEITON BARCOT TINTOR

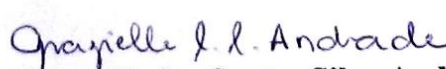
**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS GORDUROS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL
VIA ENZIMÁTICA**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 30 de julho de 2014.


Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira
Universidade Federal de Alfenas - MG


Profa. Dra. Giselle Patrícia Sancinetti
Universidade Federal de Alfenas - MG


Profa. Dra. Grazielle dos Santos Silva Andrade
Universidade Federal de Alfenas - MG

Dedico esta obra a Linda Amanda, a
Maravilhosa e mais que Perfeita Ana Claudia
e ao Ilustre Ernandes.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Ao Prof^o Dr. Ernandes Benedito Pereira, que me orientou com confiança e credibilidade, oferecendo conhecimentos e amizade, tornando capaz a realização deste trabalho.

A Prof^a Dra. Daniela Bataglia Hirata, pela ajuda sempre disponível.

Ao Prof^o. Dr. Adriano Aguiar Mendes, pelos conhecimentos transmitidos.

A Prof^a Dra. Grazielle dos Santos Silva Andrade, pela disponibilidade e interesse em transmitir conhecimentos.

Aos funcionários Gustavo e Ângela, sempre a disposição para ajudar nas análises.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos, em especial aos Mohamed e Luiz, que se envolveram e ajudaram na concretização deste trabalho.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O presente estudo trata da produção de etil-ésteres de ácidos graxos (EEAGs) por reação de transesterificação do resíduo gorduroso de fritura usado num sistema isento de solvente, catalisado pela lipase microbiana de *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), imobilizada em resíduo inerte do tipo polihidroxibutirato (PHB), por adsorção física. A atividade hidrolítica máxima, medida sobre a hidrólise de emulsão de azeite, a pH 7,0 e temperatura de 37 ° C, foi de 413,76 U / g de suporte , com uso de um carregamento de proteína igual a 30 mg / g suporte. No presente estudo, foi utilizado um planejamento fatorial completo com 22 variáveis do processo que tiveram uma influência significativa na síntese enzimática dos EEAGs por transesterificação do resíduo gorduroso usado. As reações foram realizadas a uma concentração de fixa do biocatalisador em 10% m / m, sob agitação contínua a 200 rpm, e tempo de reação de 15 h. Em condições ótimas de experimentação (razão molar de óleo: etanol de 1: 4,7 e temperatura de reação de 34 ° C), o percentual de rendimento máximo foi 67,9% de transesterificação foi atingido. No entanto, EEAGs purificados produzidos numa razão molar de óleo:etanol 1:3, em temperatura de 45 ° C exibiu uma viscosidade cinemática de 3,82 centipoise. Este estudo demonstrou que o design experimental é adequado para a maximização da síntese EEAGs por transesterificação de resíduo gorduroso de fritura usado num sistema livre de solventes. Esta metodologia também faz com que seja possível determinar uma região de trabalho desejável onde um melhor desempenho da reação de transesterificação pode ser obtido.

Palavras-chave: Transesterificação. Lipase AK. Resíduo gorduroso. Polihidroxibutirato (PHB). etil-ésteres de ácidos graxos.

ABSTRACT

The present study deals with the production of fatty acids ethyl esters (FAEEs) by transesterification reaction of waste cooking oil in a solvent-free system mediated by microbial lipase from *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK) immobilized by physical adsorption on polyhydroxybutyrate (PHB) particles. The maximum hydrolytic activity, measured on the hydrolysis of olive oil emulsion at pH 7.0 and 37 °C, was 413.76 U/g of support for the biocatalyst prepared by offering protein loading of 30 mg/g of support. In the present study, it was proposed a 2² full factorial design to find the variables of the process that have a significant influence on the enzymatic synthesis of FAEEs by transesterification of waste cooking oil. The reactions were performed at fixed biocatalyst concentration of 10 % m/m, continuous agitation of 200 rpm and time reaction of 15 h. Under optimal experimental conditions (molar ratio oil:ethanol of 1:4.7 and reaction temperature of 34 °C), maximum transesterification yield percentage of 67.9% was reached. However, purified FAEEs produced at molar ratio oil:ethanol 1:3 and 45°C exhibited kinematic viscosity of 3.82 centipoise. This study demonstrated that the experimental design is appropriate for the maximization of FAEEs synthesis by transesterification of waste cooking oil in a solvent-free system. This methodology also makes it possible to determine a desirable working region where a better performance for the transesterification reaction can be achieved.

Key-words: Transesterification. Lipase AK. Waste cooking oil. Polyhydroxybutyrate (PHB). Fatty acid ethyl esters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Evolução da produção e consumo de biodiesel.	24
Figura 2 - Foto do preparo da amostra por filtração.	38
Figura 3 - Foto do PHB após filtração, contendo lipase imobilizada.	48
Figura 4 - Fotos das Etapas de Purificação das Amostras:	51
Figura 5 - Fluxograma das ações desenvolvidas na pesquisa e suas correlações.	53
Figura 6 - Aferição da densidade com uso de picnômetros:	58
Figura 7 - Comportamento hidrolítico da Lipase AK livre, antes e depois da Imobilização, de acordo com os diferentes carregamentos de proteína (mg/g de PHB).	60
Figura 8 - Influência do pH na atividade hidrolítica da lipase AK livre e imobilizada em PHB.	63
Figura 9 - Influência da temperatura na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em PHB. Hidrólise do azeite de oliva por 5 minutos em pH 7,0.	64
Figura 10 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para % de ésteres em função da razão molar (m/m) e da temperatura (°C).	70
Figura 11 - Curva padrão de Bradford para Proteína.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de principais oleaginosas produzidas no Brasil.	23
Tabela 2 - Tratamentos aplicáveis aos óleos para sua purificação	25
Tabela 3 - Comparação de reações de transesterificação, com uso de diferentes catalisadores para produção de biodiesel.	30
Tabela 4 - Diluições de albumina para preparo das soluções de curva padrão.	46
Tabela 5 - Quantidades de enzima Lipase AK para preparação das soluções de avaliação da concentração, a partir de curva padrão já determinada.	46
Tabela 6 - Valores utilizados no DCCR para a reação de transesterificação enzimática utilizando a lipase AK.....	52
Tabela 7 - Caracterização da Matéria Prima em comparação a valores de referência ou da literatura.	54
Tabela 8 - Densidade média do Resíduo Gorduroso.....	57
Tabela 9 - Atividade hidrolíticas inicial e final, na análise do sobrenadante (proteína livre), em função dos diferentes carregamentos de proteína para imobilização em PHB.....	59
Tabela 10 - Percentual de ésteres obtidos na reação de transesterificação em diferentes tempos de reação	66
Tabela 11 - Matriz padrão para o experimento de síntese de biodiesel pela lipase imobilizada em PHB.....	67
Tabela 12 - Coeficientes de regressão para a porcentagem de conversão de ésteres.	68
Tabela 13 - Coeficientes de regressão estatisticamente significativos para a porcentagem de conversão de ésteres.	69
Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para a porcentagem de ésteres em função da razão molar e da temperatura.	69
Tabela 15 - Coeficientes de regressão tendo a viscosidade como resposta.....	71
Tabela 16 - Leituras de Absorbância em diferentes concentrações de Albumina Bovina.	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	ÓLEOS E GORDURAS.....	18
3.2	BIODIESEL.....	19
3.2.1	Aspectos Gerais	19
3.2.2	Vantagens do Biodiesel	20
3.2.3	Motivações	21
3.2.4	Matérias-primas para obtenção de Biodiesel	22
3.2.5	Demanda Atual de Biodiesel no Brasil	24
3.2.6	Produção do Biodiesel	25
3.2.6.1	Transesterificação por Catálise Alcalina.....	27
3.2.6.2	Transesterificação por Catálise Ácida.....	28
3.2.6.3	Transesterificação por Catálise Heterogênea	28
3.2.6.4	Transesterificação por Catálise Enzimática.....	29
3.2.7	Purificação do biodiesel	30
3.2.7.1	Recuperação do álcool presente na glicerina e nos ésteres	31
3.2.7.2	Desidratação do álcool	31
3.2.7.3	Purificação dos ésteres	32
3.3	ENZIMAS	32
3.4	ENZIMAS IMOBILIZADAS.....	32
3.5	LIPASES	33
3.5.1	Características e Propriedades das Lipases	34
3.5.2	Reações de Transesterificação com Lipases Imobilizadas	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	MATERIAIS	36
4.2	EQUIPAMENTOS	37
4.3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	37
4.3.1	Caracterização da Matéria Prima	37

4.3.1.1	Preparo da Amostra.....	37
4.3.1.2	Determinação do Teor de Ácidos Graxos Livres	38
4.3.1.3	Determinação do Índice de Acidez Total.....	39
4.3.1.4	Determinação do Índice de Iodo.....	40
4.3.1.5	Determinação do Índice de Saponificação	41
4.3.1.6	Determinação do Índice de Peróxido	42
4.3.1.7	Determinação do Teor de Umidade	43
4.3.1.8	Determinação da Densidade	44
4.3.2	Caracterização do Biocatalisador.....	44
4.3.2.1	Determinação da Atividade Hidrolítica	44
4.3.2.2	Determinação da Concentração de Proteína.....	45
4.3.2.3	Imobilização da Lipase por Adsorção Física.....	47
4.3.3	Análise dos Fatores de Interferência à Reação Transesterificação	48
4.3.3.1	Avaliação das Propriedades Catalíticas da Lipase Livre e Imobilizada	49
<i>4.3.3.1.1</i>	<i>Influência do pH.....</i>	<i>49</i>
<i>4.3.3.1.2</i>	<i>Influência da Temperatura</i>	<i>49</i>
<i>4.3.3.1.3</i>	<i>Reação de Transesterificação Enzimática do Resíduo Gorduroso e Etanol.....</i>	<i>49</i>
<i>4.3.3.1.4</i>	<i>Delineamento Experimental.....</i>	<i>51</i>
<i>4.3.3.1.5</i>	<i>Determinação da Viscosidade</i>	<i>52</i>
<i>4.3.3.1.6</i>	<i>Determinação do Teor de Ésteres Formados</i>	<i>52</i>
4.4	PLANO DE TRABALHO DA PESQUISA.....	53
5	RESULTADOS	54
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA	54
5.1.1	Densidade	57
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR	58
5.2.1	Determinação do Teor de Proteína.....	59
5.2.2	Influência de Diferentes Carregamentos de Lipase AK Imobilizada em PHB na Atividade Hidrolítica	59
5.3	ANÁLISE DOS FATORES DE INTERFERÊNCIA À REAÇÃO TRANSESTERIFICAÇÃO.....	61
5.3.1	Propriedades Catalíticas da Lipase Livre e Imobilizada.....	61
5.3.2	Influência do pH na Determinação da Atividade Hidrolítica.....	62
5.3.3	Influência da Temperatura na Determinação da Atividade Hidrolítica	64

5.3.4	Reação de Transesterificação Enzimática do Resíduo Gorduroso e Etanol	66
5.3.5	Estudos da Otimização na Reação de Transesterificação do Resíduo Gorduroso com Etanol por Planejamento Experimental	67
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	73
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE	86
	APÊNDICE A – Determinação do Teor de Proteína.....	86

1 INTRODUÇÃO

A questão energética sempre terá uma relevância ímpar para a história da humanidade. Tudo que consumimos ou utilizamos em nossos lares ou em nosso meio profissional, nossos carros e as vias que percorremos, as roupas que usamos, e os alimentos que comemos, requerem energia para serem produzidos e embalados, distribuídos às lojas ou em domicílio, operados e depois descartados (SAWIN, 2004).

A forma como se apresenta a sociedade organizada, dependente do conforto material desenvolvido e implantado a partir de processos produtivos bem elaborados, institui que a disponibilidade de energia seja um recurso cada vez mais valorizado. Potencializado pela utilização predominante de combustíveis fósseis, a utilização desta forma de energia vêm gerando graves problemas econômicos, sociais e ainda ambientais, como por exemplo, o efeito estufa e as alterações climáticas (LOFRANO, 2008).

A busca por combustíveis alternativos para motores a diesel está cada vez mais acirrada devido à diminuição das reservas de petróleo e as consequências ambientais da exaustão de gases dos motores abastecidos com combustíveis petroquímicos (RODRIGUES, 2009).

A queima dos combustíveis fósseis provoca emissões de dióxido e monóxido de carbono, óxidos de nitrogênio (NOx) e compostos sulfurados, gases que estão largamente associados a problemas como efeito estufa e chuva ácida, além de ser o petróleo proveniente de fontes não renováveis (WUST, 2004).

Desta forma, o biodiesel surge como alternativa, uma vez que é um combustível de origem vegetal, economicamente mais vantajoso e que tem vantagens como: ser renovável, não contribuir para o efeito estufa e possuir um nível de biodegradabilidade maior que o diesel. O biodiesel apresenta outras vantagens ambientais, como a do reaproveitamento de resíduos, para a produção de energia, permitindo a economia dos recursos naturais não renováveis, seja diretamente pelo não uso das fontes energéticas, ou indiretamente, pela não disposição destes resíduos nos esgotos, rios, solo, dentre outros. Há também outros benefícios do uso do biodiesel, como o a da queima limpa, uma vez que este combustível possui teor de enxofre 400 vezes menor que o encontrado no diesel oriundo do petróleo, reduzindo a possibilidade de ocorrência de chuvas ácidas (WUST, 2004).

A produção de biodiesel utilizando óleos vegetais como matéria prima (ou seus triglicerídeos) têm se tornado alvo em diversas pesquisas, sendo que os esforços concentram-se em transformar estes óleos em ésteres de comportamento similar ao diesel, ou seja, com menor viscosidade e alta volatilidade, quando comparado ao óleo empregado (RODRIGUES, 2009).

A reação química capaz de modificar os óleos em biodiesel é denominada transesterificação. A reação consiste na quebra das cadeias longas dos óleos, para que se ligue a um álcool de cadeia curta (usualmente metanol), mediado pela presença de um catalisador, produzindo ésteres alquílicos (SOLOMONS e FRYHLE, 2006.). Estes ésteres apresentam características equiparadas as do diesel tradicional e, sendo assim solucionam os problemas encontrados para a aplicação de óleos vegetais como combustíveis (RODRIGUES, 2009).

A reação de transesterificação admite o uso de uma grande gama de óleos ou gorduras capazes de serem utilizados como substrato na produção de biocombustível. Este substrato, para que possa ser empregado com capacidade de substituir parcial ou totalmente o diesel de petróleo, deve atender três aspectos fundamentais:

- a) Viabilidade técnica e econômica para a produção e obtenção do óleo ou gordura em escala suficiente para atender à demanda pelo biocombustível;
- b) Viabilidade técnica e econômica para transformá-lo em biocombustível;
- c) Garantias de que a qualidade do biocombustível produzido seja compatível com o seu uso em motores veiculares, estacionários, ou qualquer outro uso como forma de energia.

Se um desses três aspectos não for atingido, então não se deve utilizar a matéria prima pesquisada para programas bioenergéticos (SUAREZ, 2009).

A fim de que se tenha atendido os aspectos citados, uma alternativa é o uso do resíduo gorduroso como matéria prima reacional, mediado por um biocatalisador, os quais em conjunto eliminam as desvantagens da alcalinização da reação de transesterificação utilizada para a produção de biodiesel em escala industrial.

Como biocatalisador, a utilização de enzimas apresenta vantagens como: alta seletividade e condições brandas de operação, no entanto a desvantagem crítica do elevado custo tem limitado seu emprego nas reações de produção de biodiesel em escala industrial, em especial enzimas do tipo lipases. Desta forma, a proposta de reuso das lipases em diversas reações de transesterificação reduz o custo de produção e, por consequência, o custo de produto obtido. Para que se faça este reuso, a alternativa verificada foi a de fazer a imobilização da enzima em suportes inertes.

O interesse em trabalhar com o resíduo gorduroso de fritura é devido a ser um material de produção contínua, seja nos pequenos centros ou polos industriais e que, por vezes, apresenta dificuldade de descarte e/ou comprometimento de diversos recursos naturais. Quanto ao etanol, foi selecionado devido à crescente disponibilidade do produto no mercado nacional (VEIGA FILHO, 2008), além de ser um produto obtido de fontes renováveis e com eficácia comprovada para a reação química de produção de biodiesel.

2 OBJETIVOS

Com a finalidade de evidenciar os objetivos deste trabalho, este capítulo foi dividido em objetivos geral e objetivos específicos.

2.1 OBJETIVO GERAL

Produção de biodiesel com uso de resíduos gordurosos de fritura, utilizando a catálise enzimática.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para detalhar o objetivo geral, abaixo segue descrição dos diferentes objetivos específicos, considerando as diferentes etapas da pesquisa:

- a) Caracterização físico-química do resíduo gorduroso, quanto aos índices de: ácidos graxos livres, de acidez total, de saponificação, de iodo, teor de umidade, densidade e viscosidade;
- b) Imobilização da lipase comercial em Polihidroxibutirato (PHB) por adsorção física;
- c) Avaliação e validação da concentração de lipase imobilizada em suporte;
- d) Análise da lipase livre e imobilizada quanto ao desempenho catalítico com variações de pH e temperaturas no meio reacional;
- e) Otimização da reação de transesterificação no processo de produção de biodiesel por via enzimática, verificando a influencia das variáveis: temperatura e razão molar óleo-etanol.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo foi desenvolvida uma sucinta avaliação do principal produto de interesse deste trabalho.

3.1 ÓLEOS E GORDURAS

Os óleos e gorduras apresentam uma característica principal de permanecerem inalterados em água, devido a sua densidade e sua composição.

Do total constituinte de um óleo ou gordura, mais de 95% é composto por triacilglicerídeos, que são ésteres formados de glicerol e três ácidos graxos. Triacilglicerídeos são insolúveis em água e, a temperatura ambiente, variam em consistência de líquido a sólido. Em uso comum, quando eles são na maioria sólidos, são chamados de gorduras, e quando líquidos são chamados de óleos. Além de triacilglicerídeos, gorduras e óleos contêm vários componentes menores como: mono e di-glicerídeos (importantes como emulsionadores); ácidos graxos livres; tocoferol (importante antioxidante); esteróis e vitaminas de gorduras solúveis (FARIA et al. 2002).

Óleos e gorduras têm um papel fundamental na alimentação humana. Além de fornecerem calorias, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K1. Também são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoleico, linolênico e araquidônico e contribuem para a palatabilidade dos alimentos (CASTRO et al. 2004).

Há óleos e gorduras residuais que têm alterações nas suas propriedades físicas e químicas devido às reações tais como hidrólise, polimerização e oxidação, decorrentes dos processos térmicos de preparação ou processamento dos alimentos. Como consequência destas reações, as propriedades sensoriais, viscosidade e índice de acidez são alterados e variam de um óleo ou gordura residual para o outro, pois são de diferentes fontes e dependem dos alimentos processados (SOUZA, 2010).

A fritura por imersão é um processo comumente utilizado, o qual trabalha com óleos ou gorduras, especialmente os óleos vegetais, como meio de transferência de calor. Em estabelecimentos comerciais, utilizam-se fritadeiras elétricas descontínuas com capacidades que variam de 15 a 350 litros. Já em indústrias de produção de empanados, salgadinhos e

congêneres, o processo de fritura é normalmente contínuo e a capacidade das fritadeiras pode ultrapassar 1000 litros. O tempo de utilização do óleo varia de um estabelecimento para outro, principalmente pela falta de legislação que determine a troca do óleo usado (COSTA NETO et al. 2000).

3.2 BIODIESEL

Uma vez que o foco principal da pesquisa está relacionado diretamente a este biocombustível, algumas considerações se fazem necessárias.

3.2.1 Aspectos Gerais

Segundo a Lei Federal nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, o biodiesel é um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 2005).

A incorporação do biodiesel nos sistemas de fornecimento de energia é justificada por: (1) ser uma alternativa a dependência dos derivados de petróleo; (2) ser um componente obrigatório no curto prazo na composição do óleo diesel nacional; (3) criar um novo mercado para as oleaginosas, principalmente para os pequenos produtores; (4) perspectiva de redução da emissão de poluentes ao meio (LEIRAS, 2006).

O uso de óleos e gorduras como combustíveis apresenta dificuldades com relação a uma boa combustão, atribuídas à sua elevada viscosidade, o que impede sua adequada injeção nos motores diesel e, devido à queima imperfeita, propicia depósitos de carbono nos cilindros e nos injetores, requerendo uma manutenção intensiva. A conversão dos ácidos graxos (constituintes de óleos e gorduras) em seus respectivos ésteres (biodiesel) é a alternativa mais promissora a estas limitações. No uso da mistura de ésteres etílicos verificam-se menores: ponto de névoa, densidade e viscosidade em comparação ao óleo “*in natura*”, o que em motores a combustão permite a manutenção do poder calorífico constante (COSTA NETO et

al. 2000; BARROS et al. 2008). Desta forma, a utilização de biodiesel pode dispensar várias adaptações dos motores, como a utilização de sistemas de injeção de alta pressão ou pré-aquecimento (SCHUCHART et al. 2001; KNOTHE et al. 2006).

Em 2008 o PNPB (Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel), tornou obrigatório a mistura de 2% de biodiesel ao diesel. Em janeiro de 2010, a adição de 5% de biodiesel ao diesel passou a ser obrigatória. Os resultados alcançados demonstraram não haver a necessidade de qualquer ajuste ou alteração nos motores e veículos que utilizem essa mistura (ANP, 2011).

3.2.2 Vantagens do Biodiesel

A utilização do biodiesel em adição ou substituição ao óleo diesel apresenta diversas vantagens, tanto no âmbito econômico, ambiental, saúde pública, entre outros. Rodrigues (2009), em seu trabalho, descreve estas vantagens:

- a) É derivado de matérias-primas renováveis de ocorrência natural, reduzindo assim a atual dependência sobre os derivados do petróleo e preservando as suas últimas reservas;
- b) O gás carbônico liberado é absorvido pelas oleaginosas durante o crescimento, o que equilibra o balanço negativo gerado pela emissão na atmosfera;
- c) É biodegradável;
- d) Gera redução nas principais emissões presentes nos gases de exaustão (com exceção de óxidos de nitrogênio);
- e) Possui um alto ponto de fulgor, o que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros;
- f) Apresenta excelente lubricidade, fato que vem ganhando importância com o advento do petrodiesel de baixo teor de enxofre, cuja lubricidade é parcialmente perdida durante o processo de produção. A lubricidade ideal deste combustível pode ser restaurada através da adição de baixos teores de biodiesel.

3.2.3 Motivações

O biodiesel pode ser produzido a partir uma grande variedade de matérias primas: de gorduras de origem animal, de óleos vegetais, de resíduos da indústria, de resíduos de cozinhas, de resíduos de tratamento de efluentes, dentre outros. A produção de biodiesel a partir de resíduos originários da linha produção tem sido muito visada, uma vez que agrega “status” ao produto e reduz o custo de produção, tendo em vista dispensar a cadeia de descarte especial para este tipo de resíduo. Além disso, utilizando-se este tipo de resíduo, reduzem-se os impactos ambientais (FACCIO, 2004).

Comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas. Além disso, reduzem em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de óxido de enxofre. É importante enfatizar que o biodiesel pode ser usado em qualquer motor de ciclo diesel, com pouca ou nenhuma necessidade de adaptação (LIMA, 2004).

Além dos fatores econômicos e políticos, a partir da década de 90, devido a um aumento da conscientização acerca dos problemas ambientais causados pela queima de combustíveis fósseis, o biodiesel também tem sido apontado como uma motivação. Devido a esta “queima limpa”, o uso deste biocombustível é capaz de promover a manutenção de recursos naturais e, ainda, manutenção da saúde pública, o que reverte em economia a de dinheiro público (MEHER, 2006).

A reação química de transesterificação pela catálise química, usada comercialmente para a conversão dos óleos e gorduras em biodiesel proporciona algumas desvantagens, seja devido à perda do catalisador que ao final do processo fica junto com o subproduto da reação (glicerina), dificultando a separação e purificação do mesmo e impossibilitando sua reutilização; seja devido a maior número de etapas para a purificação dos ésteres.

Assim sendo, o uso da transesterificação enzimática com etanol apresenta as vantagens pela fácil disponibilidade e menor preço dos substratos de reação, além de menor toxicidade e maior biodegradabilidade. Como este produto é obtido através de biomassas, o processo de produção de biodiesel torna-se independente do petróleo.

Conforme pesquisado por alguns autores (CHRISTOFF, 2007; OLIVEIRA, 2012; SOUZA, 2006; SOUZA, 2003 e 2010; WUST, 2004), a produção de biodiesel, a partir da reação entre resíduos gordurosos (oriundos, em geral, da fritura) e etanol, atende as

necessidades do mercado de energia, com os referidos ganhos morais e financeiros acima citados. O uso de enzima para catálise da reação corrobora quase que integralmente com este propósito, faltando somente ter detalhada uma metodologia capaz de reduzir ou absorver o custo da lipase.

3.2.4 Matérias-primas para obtenção de Biodiesel

O biodiesel é produzido por hidrólise alcoólica dos óleos e gorduras de várias origens. Portanto, teoricamente, qualquer forma de óleos e gorduras proveniente de animais, plantas ou micro-organismos podem ser usados como matéria prima para produção de biodiesel (TIANWEI et al. 2010).

As matérias primas para a produção de biodiesel são classificadas em três categorias: (1) O óleo de plantas tais como óleo de soja (LV et al. 2008; SILVA et al. 2007), óleo de jatrofa (SHAH et al. 2004; TAMALAMPUDI et al. 2008) óleo de palma (HALIM et al. 2009; SIM et al. 2009; TALUKDER et al. 2006), óleo de algodão, óleo de girassol, etc. (DIZGE et al. 2009; SOUMANOU e BORNCHEUR, 2003; WU et al. 2007). (2) gordura de origem animal, como o sebo (DA CUNHA et al. 2009), banha e gordura de porco, etc. (LEE et al. 2002; NGO et al. 2008) e (3) óleo de cozinha e de resíduos industriais como óleos usados (DIZGE et al. 2009; LARA PIZARRO e PARK, 2003).

Cada país desenvolve a matéria prima do biodiesel de acordo com suas condições nacionais (MIN e ZHANG, 2006). Os Estados Unidos utilizam o óleo de soja geneticamente modificada, enquanto que a União Europeia e o Canadá usam óleo de colza. Países do Sudeste da Ásia, como Malásia e Indonésia usam o óleo de palma. Para a China, o óleo de cozinha usado tem sido uma alternativa, assim como há perspectivas promissoras para o óleo de jatrofa, uma vez que a árvore apresenta facilidade de desenvolvimento em condições adversas associado à impossibilidade do uso do óleo na alimentação, devido à presença de alguns fatores antinutricionais, como os ésteres de forbol tóxicos (JEGANNATHAN et al. 2008; SHAH et al. 2004).

As diversidades sociais, econômicas e ambientais geram distintas motivações para a produção e consumo dos diversos óleos e gorduras. No Brasil, devido a grande extensão territorial e a diversidade de clima, verifica-se uma condição propícia ao cultivo de sementes

oleaginosas, onde a produção e exploração desta biomassa são para fins alimentícios, químicos e energéticos (DELATORRE et al. 2011). A mamona, o dendê, a soja, entre outras, são exemplos de plantas capazes de ser utilizado para a produção de óleos e ainda promover inclusão social (LIMA, 2004),

Na Tabela 1, há exemplos das principais oleaginosas produzidas no país, com potencial para serem utilizadas como matéria prima para a produção de biodiesel (COSTA e de OLIVEIRA, 2006).

Tabela 1 - Exemplos de principais oleaginosas produzidas no Brasil.

Planta	Litros de óleo /ha	Planta	Litros de óleo /há
Palma (dendê)	5710	Arroz	790
Macaúba	4310	Búfalo Gourd*	760
Pequi	3580	Açafrão	750
Buriti	3130	Crambe	670
Oiticia	2870	Gergelim	660
Coco	2580	Canola	560
Abacate	2530	Mostarda	550
Castanha do Pará	2290	Coentro	510
Macadâmia	2150	Semente de abóbora	510
Pinhão Manso	1810	Euphorbia	510
Babaçu	1760	Avelã	460
Jojoba	1740	Linhaça	460
Pecan	1710	Café	440
Bacuri	1370	Soja	430
Mamona	1360	Cânhamo	350
Gopher Plant	1280	Caroço de algodão	310
Piassava	1270	Calêndula	290
Oliveira	1160	Kenaf	260
Colza	1140	Semente de seringueira	240
Papoula	1110	Lupino	220
Amendoim	1020	<i>Erythea</i> **	220
Cacau	980	Aveia	210
Girassol	920	Castanha de caju	170
Tungue	900	Milho	170

Nota: * Tipo de semente de cabaceira, ** Espécie de palma

Fonte: Dors, 2011.

Outras matérias-primas não convencionais são os óleos e gorduras produzidos a partir de cultivo de micro-organismos (algas, fungos e bactérias) e esgotos urbanos (DORS, 2011).

O óleo de microalgas é o que mais tem atraído à atenção nos últimos tempos. Em comparação as oleaginosas tradicionais, os benefícios são: cultivo em terras não aráveis e até em oceanos. Não tem nenhum efeito sobre a produção de alimentos e tem o potencial para a produção de elevadas quantidades de óleo comparado às oleaginosas tradicionais. Possíveis

melhorias podem vir da engenharia genética e metabólica pela utilização de diferentes fotobiorreatores (FU, 2009). No entanto, o uso destas matérias-primas ainda está em fase inicial de pesquisa e até o momento a sua utilização em escala industrial é inviável.

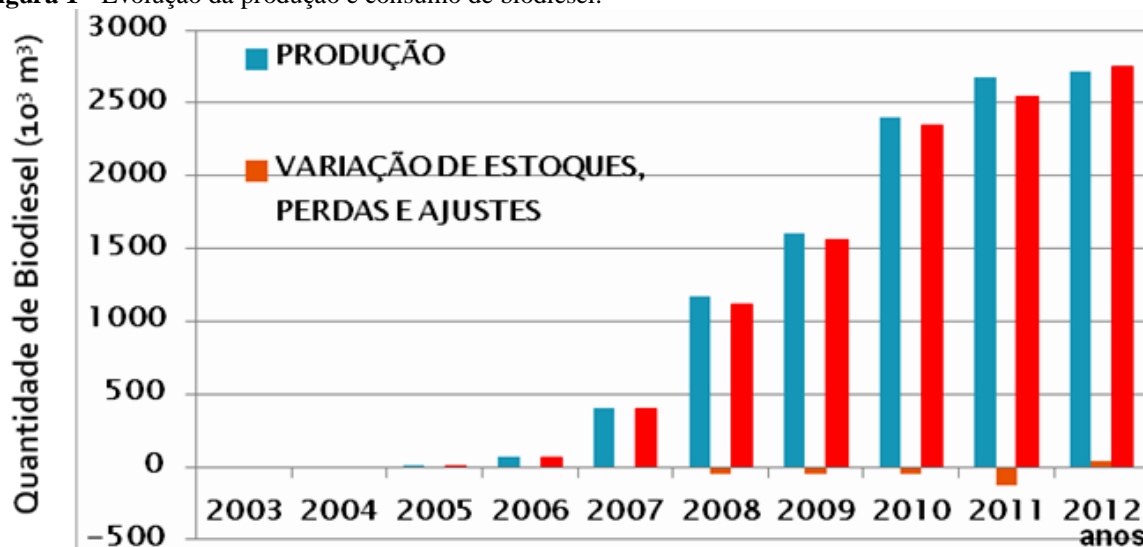
3.2.5 Demanda Atual de Biodiesel no Brasil

O Ministério de Minas e Energia publica anualmente o Relatório de Balanço Energético Nacional, onde a energia é discutida por suas: fontes, produção, demandas, importação, destinação de uso nos diferentes setores, reservas, reflexos na economia e também os preços praticados.

O último relatório publicado, o Relatório 2013, onde são apontados os dados do ano de 2012, verifica-se que o Biodiesel Puro, denominado B100, produzido no país, atingiu um montante de 2.717.483 m³ contra 2.672.760 m³ do ano anterior. Com isto, houve incremento na produção de 1,7% de biodiesel disponibilizado para o atendimento as necessidades do mercado interno (Empresa de Pesquisa Energética – EPE, 2013).

Em 2012 o percentual de B100 adicionado compulsoriamente ao diesel mineral ficou constante em 5%. A principal matéria-prima foi o óleo de soja (69,6%), seguido do sebo bovino (14,7%) (EPE, 2013).

Figura 1 - Evolução da produção e consumo de biodiesel.



Fonte: EPE, 2013

Na figura 1 verifica-se o aumento de demanda de biodiesel ao longo dos anos, identificando-o como fonte energética de mercado promissor. O consumo total é sempre gradativo, sendo que das variações de estoque negativas (devedora), no ano de 2012, a variação de estoque apresentou um salto positivo de 36000 m³. Tal resultado demonstra que o país ainda encontra-se despreparado para a oferta desta fonte energética, quando se verifica os incrementos anuais de consumo.

3.2.6 Produção do Biodiesel

Toda a matéria-prima para a produção de biodiesel tem de ter as condições desejáveis à reação, para que haja a maior taxa de conversão possível, ou seja, a matéria-prima deve estar isenta de impurezas e compostos indesejáveis. Deve apresentar, por isso, o mínimo de umidade (conseguida através de processos de secagem) e acidez possível (realiza-se neutralização com solução alcalina de hidróxido de sódio ou potássio, para remover ácidos graxos livres ou por destilação de AGL) (LIMA, 2004). Estes dois parâmetros são fundamentais para determinar a viabilidade de um óleo para a produção de biodiesel (BULE, 2014).

Na Tabela 2, verificam-se os diversos tratamentos possíveis a se fazer nos óleos vegetais e gorduras animais, a fim de que se obtenha um subtrato mais eficiente para a produção de biodiesel.

Tabela 2 - Tratamentos aplicáveis aos óleos para sua purificação

(continua)

Tratamento	Modo operacional / Funções
Remoção de gomas e resíduos sólidos	Consiste na precipitação das gomas após adição de ácido fosfórico e injeção de vapor de água. Comum para óleos e gorduras brutas que contêm, normalmente, grandes quantidades de fosfatídeos (ex. soja, milho)
Redução de ácidos graxos livres	Através de neutralização ou por extração por solvente. A neutralização consiste em adicionar uma base (NaOH, KOH), induzindo a formação de sabão, que deve ser removido antes de qualquer tratamento posterior. A extração por solvente permite remover os ácidos graxos livres ou os triacilgliceróis.

Tratamento	Modo operacional / Funções
Filtração	Pode ser realizada por gravidade ou a vácuo. Elimina pequenas proporções de sólidos existentes em suspensão e recupera líquidos contidos na fração sólida de uma pasta.
Secagem	Utilização de um agente como o sulfato de magnésio ou sódio anidro, para remover a água residual que possa existir no óleo. Secagem sob pressão reduzida.
Descoloração	Adição de carvão ou minerais ativados ao óleo, conseguindo-se a remoção de metais, água e pigmentos, reduzindo cor e a possível turvação dos óleos e gorduras.
Desodorização	Destilação sob vácuo (2 a 5 mmHg) a 240 – 270° C Reduz a quantidade de cetonas e aldeídos, aclara o produto através da destruição de carotenoides, reduz a quantidade de pesticidas, detergentes, metais, etc.

Fonte: Adaptado de Tyson, 2003; Lima, 2004 apud Bule, 2014.

O Biodiesel pode ser obtido por processos de esterificação e transesterificação (mais usado industrialmente) por diferentes rotas catalíticas. Outra forma de obter biocombustíveis é o craqueamento catalítico, porém o produto obtido por esse processo não se enquadra na definição de biodiesel (VASCONCELOS, 2011).

A esterificação consiste na reação de um ácido orgânico com um álcool (normalmente alcoóis primários de cadeia curta e usualmente metanol ou etanol, por apresentarem velocidade reacionais maiores), numa estequiometria de 1:1 (normalmente um excesso de álcool é usado, visando um maior deslocamento do equilíbrio para produto), na presença ou não de catalisador. Esse processo gera como único produto, ésteres de ácidos graxos e água, (SOLOMONS e FRYHLE,2006; POUSA, 2007).

Transesterificação é um termo que descreve uma reação orgânica onde um éster é transformado em outro através da troca do grupo alcoxila. É o processo mais utilizado em escala industrial. Os triglicerídeos reagem com alcoóis de cadeias curtas (metanol e etanol os mais usados) na presença ou não de um catalisador, dando origem a mono-ésteres e glicerina como coproduto (SOLOMONS e FRYHLE,2006; VASCONCELOS, 2011).

Quando há o uso de um catalisador, este pode ser homogêneo ou heterogêneo, ácido, básico ou enzimático, e podem atuar em meio homogêneo ou heterogêneo.

Quanto à conversão de gorduras em biodiesel, muitos estudos foram realizados, utilizando-se óleos vegetais novos ou provenientes de processos de fritura. Alguns dos procedimentos estudados utilizaram catálise enzimática, alcoóis supercríticos, metais complexos e reações de transesterificação com catálise ácida e básica, e diferentes tipos de alcoóis. As reações de transesterificação, com diferentes tipos de alcoóis como reagentes e,

catalisadores ácidos e básicos, têm sido as mais utilizadas. A alcoólise com metanol é tecnicamente mais viável do que a alcoólise com etanol (COSTA NETO et al. 2000; WUST, 2004; OLIVEIRA et al. 2004). O etanol pode ser utilizado desde que anidro (com teor de água inferior a 1%), visto que a água atua como inibidor da reação. É fundamental salientar que no Brasil, a vantagem da rota etílica é devida a oferta de álcool etílico, de forma disseminada em todo o território nacional. Assim, os custos diferenciais de fretes, para o abastecimento de etanol versus abastecimento de metanol, em certas situações, podem influenciar na tomada de decisão. O uso do etanol tem vantagem sobre o uso do metanol, quando o metanol é obtido de derivados do petróleo. No entanto, é importante considerar que o metanol pode ser produzido a partir da biomassa, quando a suposta vantagem ecológica do etanol pode desaparecer (PARENTE, 2003 apud DANTAS, 2006).

3.2.6.1 Transesterificação por Catálise Alcalina

O processo de transesterificação via catalisa alcalina é usado quando a quantidade de ácidos graxos livres não é elevada, pois o alto teor desses ácidos favorece as reações de saponificação, diminuindo assim a eficiência da conversão. Trata-se do processo mais atrativo industrialmente para produção de biodiesel, devido ao catalisador básico ter baixo custo, ser mais eficiente, menos corrosivo, mais rápido e requerer menores temperaturas de reação. Entretanto, possui problemas quanto à separação de fases (BENEVIDES, 2011; BULE 2014).

As bases mais empregadas nesse processo são o hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, e os alcóxidos que podem ser os metóxidos de sódio ou metóxidos de potássio. Os alcóxidos são os catalisadores mais ativos, pois conduzem o processo com rendimentos elevados e reduzido tempo reacional (cerca de 30 minutos é suficiente). No entanto, como estes catalisadores são consumidos pela saponificação, é necessário controlar o teor de água no álcool e no óleo. A utilização dos hidróxidos de sódio e de potássio como catalisadores é uma boa alternativa aos alcóxidos, apesar de serem menos ativos, sendo possível alcançar as mesmas conversões, desde que a quantidade de catalisador seja aumentada (BENEVIDES, 2011).

Neste tipo de transesterificação, os acilgliceróis e alcoóis devem ser anidros, pois a presença de água favorece a saponificação produzindo sabões a partir da reação dos ácidos

graxos livres com o catalisador. Com a formação destes sabões, resulta um consumo do catalisador alcalino, reduzindo a eficiência catalítica e pode levar à formação de subprodutos indesejáveis que comprometem o rendimento reacional (BULE, 2014).

Embora seja este o método mais utilizado nas indústrias, apresenta algumas desvantagens (ADAMCZAK et al. 2009 apud BULE, 2014):

- a) Problemas na recuperação do glicerol;
- b) Necessidade de se inativar e remover o catalisador do produto;
- c) Necessidade de utilização de óleos sem ácidos graxos livres ou água residual;
- d) Fase aquosa resultante do processo requer tratamento como resíduo industrial;
- e) Elevado consumo energético.

3.2.6.2 Transesterificação por Catálise Ácida

Os ácidos utilizados como catalisadores neste método incluem o ácido sulfúrico, fosfórico, hidrolórico e ácidos sulfônicos orgânicos. Esse processo é mais utilizado quando os ésteres de glicerina possuem alto teor de ácidos graxos livres, como os óleos usados em frituras. O processo por catálise ácida esterifica os ácidos graxos livres e não forma sabões, fazendo com que o rendimento da reação aumente, facilitando a separação e purificação das fases (BENEVIDES, 2011; BULE, 2014)

Trata-se de uma reação muito lenta, quando comparada com aquela que ocorre pela via alcalina, mas apresenta um rendimento elevado, aproximadamente 99%. Requer temperaturas elevadas (acima de 100 °C) e mais de 3 horas para atingir uma boa taxa de conversão. A catálise ácida ainda tem como desvantagem o alto poder de corrosão devido aos ácidos empregados, que podem danificar os equipamentos (BENEVIDES, 2011).

3.2.6.3 Transesterificação por Catálise Heterogênea

Com o propósito de contornar os inconvenientes descritos nas rotas produtivas de biodiesel, desenvolveu-se a reação por transesterificação heterogênea, que se vale da

utilização de catalisadores heterogêneos. Esta técnica de produção de biodiesel permite uma redução significativa no número das etapas na purificação, além de facilitar a reutilização do catalisador, o que, conseqüentemente, reduz o custo do produto final. Há que se considerar, ainda, que é uma rota que facilita significativamente a purificação da glicerina e a reutilização do álcool utilizado em excesso. Assim, essa rota tecnológica de produção de biodiesel apresenta vantagens significativas sobre as catálises químicas convencionais (CARTONI, 2009; CARRAMENHA, 2007; GEORGOGIANNI, et al. 2009; SOUZA, 2006).

A presença de ácidos graxos livres em alguns óleos e gorduras usados como matérias primas, dificulta a síntese do biodiesel devido à formação de sabão, quando usada à catálise básica. Dessa forma, os catalisadores heterogêneos, que promovem simultaneamente reações de alcoólise de triacilglicerídeos e de esterificações dos ácidos graxos livres, apresentam-se como substitutos promissores a estes catalisadores. Ainda, os catalisadores heterogêneos viabilizam a produção do biocombustível com reatores de leito fixo operando no modo contínuo, devido à redução significativa no número de etapas de purificação dos produtos (KRAUSE, 2008).

3.2.6.4 Transesterificação por Catálise Enzimática

A transesterificação por catálise enzimática utiliza as lipases, que são capazes de aumentar a velocidade da reação de quebra de gorduras e de óleos vegetais, com a subsequente liberação de ácidos graxos livres, diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos e glicerol livre. A utilização destes biocatalisadores é bastante atrativa comercialmente, uma vez que as condições de reação são brandas, além de proporcionar a síntese de ésteres alquílicos específicos e a fácil recuperação do glicerol. Nesse tipo de catálise não ocorrem reações indesejáveis com formação de subprodutos, o que reduz gastos com a posterior purificação do produto (BENEVIDES, 2011; BULE, 2014; KRAUSE, 2008; SILVA et al. 2011).

A transesterificação via catálise enzimática apresenta outras vantagens, dentre elas, a inexistência de rejeito aquoso alcalino (não formam sabões), menor produção de outros contaminantes, maior seletividade, menor sensibilidade à presença de água, melhores condições de separação do biodiesel, além de ser uma opção mais atrativa ambientalmente. A

principal desvantagem desse processo é o alto custo das enzimas puras, que está relacionado com a disponibilidade de enzimas no mercado e a exigência de tempos reacionais considerados excessivos para um processo industrial. Entretanto a técnica de imobilização das enzimas permite a reutilização da mesma. A enzima imobilizada em um suporte adequado é sempre mais ativa que a livre em condições reacionais comparáveis. Isto devido a maior eficácia do sistema heterogêneo devido a maior disponibilidade dos sítios ativos das enzimas quando confinadas nos poros do sólido, uma vez que em sistema homogêneo ocorre a formação de agregados, ficando os sítios não disponíveis no interior dos mesmos (CASTRO et al. 2004, HA et al. 2007).

Na Tabela 3 é possível verificar as condições de reação, podendo estabelecer comparação entre os métodos de produção de biodiesel por diferentes rotas catalíticas.

Tabela 3 - Comparação de reações de transesterificação, com uso de diferentes catalisadores para produção de biodiesel.

Fator	Base	Ácido	Enzima
Ácidos graxos livres no óleo	Saponificação	Esterificação	Esterificação
Recuperação do glicerol	Complexa	Complexa	Simple
Temperatura de reação	Média	Alta	Baixa
Possibilidade de recuperação do catalisador	Sim, porém complexa	Não	Sim
Rendimento da transesterificação (em condições ótimas)	>99%	>96%	Geralmente >90%
Presença de água na matéria-prima	Saponificação	Inativação (leva a um maior gasto)	Pode levar a reações de hidrólise
Tempo de processamento	Baixo	Mais alto que na catálise básica	Médio a alto
Custo do catalisador	Baixo	Baixo	Alto

Fonte: Sette de Abril, 2012

3.2.7 Purificação do biodiesel

Finalizada a reação de transesterificação, que converteu o óleo/gordura em ésteres (biodiesel), a massa reacional constituída por duas fases é separada por decantação e/ou centrifugação. A fase mais densa é composta pela glicerina bruta, impregnada pelos excessos usados de álcool, água, e de impurezas inerentes à matéria-prima. Enquanto que, a fase menos

densa é constituída por uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, que também é impregnada pelos excessos reacionais de álcool e de impurezas (PARENTE, 2003). No final, qualquer que seja o processo e as condições utilizadas na transesterificação, à reação nunca é completa, isto é, existem no produto final triacilgliceróis que não reagiram, álcool, catalisador, sabões e/ou glicerol (BULE, 2014).

No processo de separação, o principal objetivo é remover os ésteres dessa mistura, a baixo custo, e assegurar um produto de alta pureza. O glicerol na sua forma pura é visto como um produto secundário da reação, mas, para manter a competitividade do custo de produção, a remoção e a revenda de glicerol é essencial (LIMA, 2004).

3.2.7.1 Recuperação do álcool presente na glicerina e nos ésteres

Na recuperação do álcool da glicerina, a fase pesada, contendo água e álcool, é submetida a um processo de evaporação, no qual se elimina da glicerina bruta os constituintes voláteis, cujos vapores são liquefeitos num condensador apropriado. A recuperação do álcool residual dos ésteres, a fase mais leve, é realizada da mesma forma, liberando para as etapas seguintes, os ésteres metílicos ou etílicos (PARENTE, 2003).

3.2.7.2 Desidratação do álcool

Após os processos de recuperação, os excessos residuais de álcool, que contêm quantidades significativas de água, necessitam de um processo de separação. Normalmente, essa desidratação do álcool é feita por destilação.

A desidratação do metanol é realizada por uma destilação simples, uma vez que a diferença de volatilidade dos constituintes dessa mistura é muito grande, além da inexistência do fenômeno da azeotropia, (que dificulta a completa separação). Contrariamente, a desidratação do etanol é complicada em razão da azeotropia, que está associada à volatilidade relativa não ser tão acentuada entre o etanol e a água, como ocorre na separação da mistura metanol – água (PARENTE, 2003).

3.2.7.3 Purificação dos ésteres

Com o intuito de que se atendam aos padrões de comercialização, por vezes, o biodiesel deve passar pelos processos de evaporação do álcool, lavagens ácidas, lavagens com água e por fim evaporação da água residual. A lavagem ácida serve para neutralizar e remover o catalisador residual (caso o catalisador básico tenha sido usado), que pode estar presente no biodiesel. A lavagem com água tem como objetivo a remoção das impurezas e dos sabões residuais, que contaminam o biodiesel (MARCELLINO, 2007). Além da lavagem, há a desumidificação dos ésteres, onde que a separação final do produto de interesse será por centrifugação.

3.3 ENZIMAS

As enzimas têm a função de catalisar a hidrólise de gorduras e óleos vegetais com a subsequente liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol livre. Também podem atuar como catalisadores de reações de acidólise, aminólise, alcoólise (transesterificação), esterificação e interesterificação. Com o uso de catalisadores enzimáticos, verificam-se algumas vantagens sobre os catalisadores clássicos, como a especificidade, a regioselectividade e a enantioselectividade, que permitem a catálise de reações com um número reduzido de subprodutos que demandam condições brandas de temperatura e pressão, a facilidade na remoção do catalisador do meio onde se encontra o produto e a possibilidade de reutilização do mesmo em vários ciclos reacionais (PAQUES e MACEDO, 2006; LECA et al. 2010).

3.4 ENZIMAS IMOBILIZADAS

A imobilização é uma técnica utilizada para melhorar o desempenho operacional de enzimas em processos industriais, especialmente para sistemas não aquosos. Várias

abordagens têm sido utilizadas para a imobilização de lipases para a síntese de biodiesel, incluindo a adsorção, a encapsulação, imobilização covalente em um suporte, bem como a imobilização livre de suporte, por exemplo, granulados de enzima cross-linked (CLEAs), cristais de enzima cross-linked (CLECs) e micro cristais revestidos de proteína (PCMCs) (LEE, et al. 2002; SHAH et al. 2004; DORS, 2011).

Para ser competitivo o uso de enzimas, a sua reutilização é uma necessidade, e apesar de boas produtividades serem reportadas em exemplos da literatura empregando enzimas livres, os experimentos são conduzidos em regime de batelada de uso único, sem tentativas de recuperação da atividade enzimática (NIELSEN et al. 2008). A imobilização consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização do biocatalisador, tornando o processo menos oneroso (GUISAN, 2006).

Desta forma, pode-se considerar que a vantagem fundamental das enzimas imobilizadas é que elas podem ser recuperadas e reutilizadas após um processo batelada, por filtração simples. Além disso, o empacotamento de enzimas imobilizadas em colunas permite uma fácil implementação do processo contínuo. Deve ser levado em conta que a imobilização da enzima tem um efeito benéfico na estabilidade da enzima, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima. A imobilização também auxilia na dispersão homogênea da enzima no meio, o que é essencial para a condução de reações enzimáticas em meio não aquoso. As principais desvantagens deste processo são: alteração da conformação nativa da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização (KNOTHE et al. 2006; DORS, 2011).

3.5 LIPASES

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas classificadas como hidrolases e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Inicialmente, eram obtidas a partir de pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. Em função do baixo rendimento do processo fermentativo, as lipases microbianas tinham também um custo bem mais elevado quando comparado com outras hidrolases, como proteases e carboxilases. (CASTRO et al. 2004).

As razões para o enorme potencial biotecnológico de lipases microbianas incluem os fatos de que elas são (1) estáveis em solventes orgânicos, (2) não necessitam de cofatores, (3) possuem uma grande especificidade de substrato e (4) exibem uma alta enantioseletividade (JAEGER e REETZ, 1998).

Estudos comparativos mostram diferenças acentuadas no desempenho de lipases imobilizadas nos vários suportes, e evidenciam que apesar das várias experiências reportadas na literatura, a imobilização de lipases ainda é um desafio complexo, uma vez que a extensão da imobilização depende da estrutura da enzima, método de imobilização, e do tipo de suporte. Em muitos casos, suportes que proporcionam uma elevada atividade e estabilidade da enzima apresentam sérias limitações de resistência mecânica e de queda de pressão, que os tornam inviáveis para a utilização em alguns tipos de reatores (YAHYA, 1998).

3.5.1 Características e Propriedades das Lipases

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. As lipases são divididas em três grupos baseados em sua especificidade: (1) Lipases não específicas quebram as moléculas de acilglicerol na posição randômica, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior. (2) Lipases 1,3 específicas, são as que liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 e formam, por esta razão, produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não regiosseletivas, ou mesmo pelo catalisador químico. (3) Lipases de ácidos graxos específicas, que são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em cis no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos insaturados, ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases (CASTRO, et al. 2004).

3.5.2 Reações de Transesterificação com Lipases Imobilizadas

A produção enzimática de biodiesel tem sido geralmente conduzida em temperaturas entre 20 e 60°C. Após a conclusão do processo de alcoólise, a fase inferior (glicerol), é simplesmente separada da fase superior (biocombustível), facilitando as etapas seguintes de purificação.

Um pequeno excesso de álcool proporciona alto rendimento na produção do biodiesel, e o biocatalisador poderá ser utilizado várias vezes, desde que imobilizado em um suporte inerte, que facilmente decanta quando a reação for estabilizada.

A alcoólise catalisada por lipase é aplicável as diferentes formas disponíveis dos óleos vegetais, ácidos graxos livres presentes no óleo e óleos e gorduras residuais, e diversos alcoóis, como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, e isobutanol podem ser utilizados (DORS, 2011).

A alcoólise enzimática tem a vantagem de permitir maior controle sobre a distribuição posicional dos acilgliceróis no produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases. As aplicações atuais são reservadas a produtos de alto valor agregado, mas o desenvolvimento de processos mais econômicos tornará possível o emprego em produtos de maior consumo (CASTRO, et al. 2004). Entretanto, as dificuldades associadas ao controle do processo e ao aumento de escala, bem como ao elevado custo das lipases, têm reduzido a aplicação industrial desses catalisadores para modificação de óleos e gorduras. Todavia, o procedimento de imobilização da lipase possibilita uma posterior reutilização do biocatalisador, o que pode tornar o processo viável sob o ponto de vista comercial e econômico (VILLENEUVE et al., 2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente capítulo está estruturado em três linhas gerais: (1) Caracterização da matéria prima de reação de transesterificação (gordura residual - fritura); (2) Caracterização do biocatalisador: lipase e (3) Análise dos fatores que interferem na produção de biodiesel.

Toda a parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), campus sede, Alfenas - MG.

4.1 MATERIAIS

O substrato utilizado para a reação de transesterificação foi o resíduo gorduroso de fritura, obtido no Restaurante Universitário da UNIFAL-MG, campus sede, Alfenas, no total de uma única amostra com volume de dois litros.

A enzima utilizada foi a Lipase AK, comercialmente distribuída pela empresa Sigma Aldrich Co. (USA) na forma de pó liofilizado, de origem microbiana extraída do fungo *Pseudomonas fluorescens*.

O suporte inerte Polihidroxibutirato (PHB) utilizado também é comercializado na forma de pó, pela empresa Sigma Aldrich Co. (USA).

Como substrato padrão na caracterização da lipase livre e imobilizada, utilizou-se o azeite de oliva extra virgem, da marca Carbonell, adquirido no comércio local.

Outros materiais foram utilizados: solventes (acetona, álcool etílico, hexano, éter, clorofórmio); sais (fosfato bibásico e monobásico de potássio, periodato de sódio, sulfato de sódio anidro, tiosulfato de sódio, biftalato de potássio); ácidos (sulfúrico, nítrico, fosfórico, acético, clorídrico); bases (hidróxido de potássio, de sódio); emulsificante (goma arábica em pó); indicadores (fenolftaleína, azul de bromotimol, iodo ressublimado, amido solúvel, iodeto de potássio); reagentes específicos (albumina sérica bovina e Coomassie Brilliant Blue G-250); papel filtro; água destilada, entre outros.

4.2 EQUIPAMENTOS

Durante o desenvolvimento das análises, foram utilizados: pH metro, shaker orbital, banho metabólico tipo dubnoff (shaker banho maria), rotaevaporador, centrífuga, destilador, agitador magnético com aquecimento, estufas de secagem, balanças analíticas de precisão, bomba extratora vácuo, funil de buchner, bureta digital, pipetas de vidro, ponteiras para pipetadores e micropipetadores, dentre outros equipamentos.

4.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Diante de todos os procedimentos experimentais desenvolvidos ao longo da pesquisa, este capítulo faz referência a estes, de forma individualizada e detalhada.

4.3.1 Caracterização da Matéria Prima

A caracterização foi importante para que pudesse ter evidenciada as condições químicas e físicas da matéria prima, com o propósito de melhorar seu potencial de conversão de ésteres, durante a reação de transesterificação.

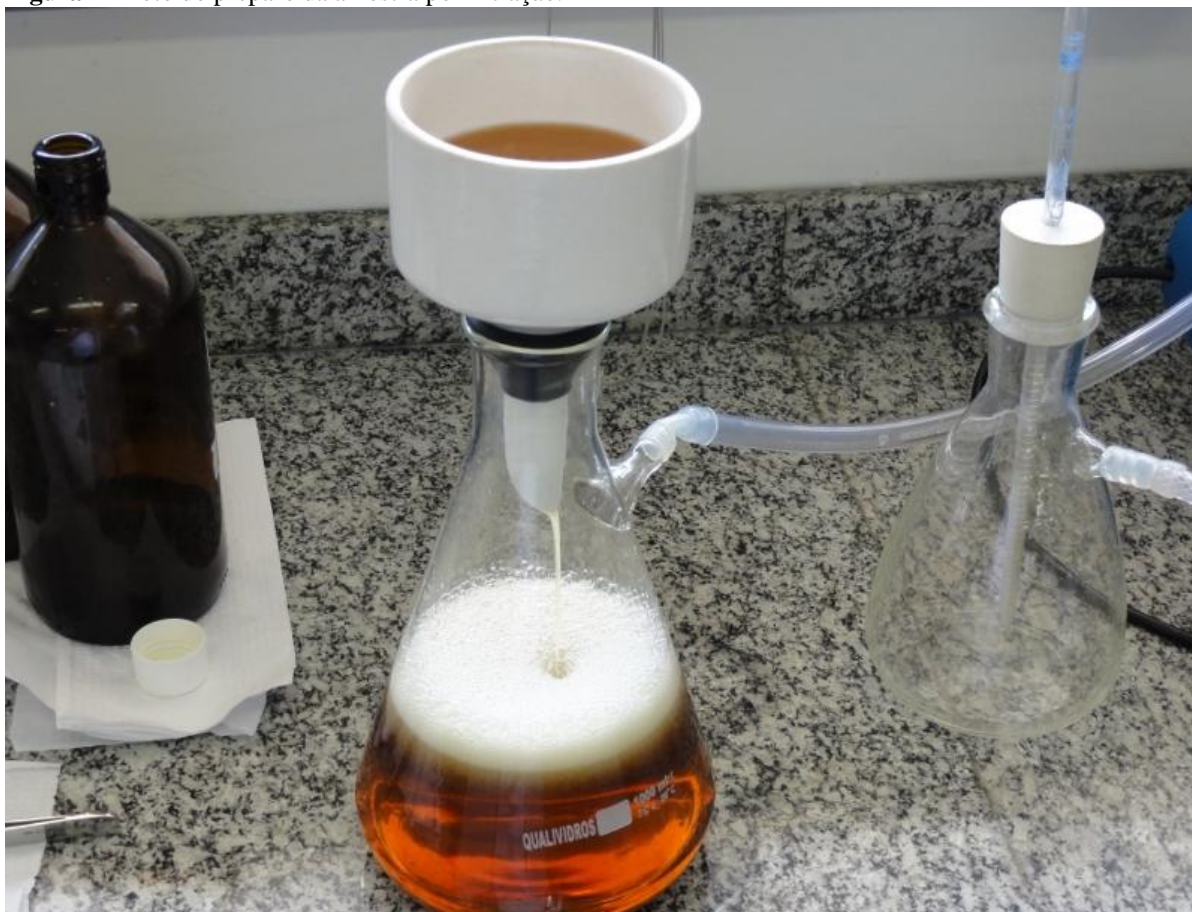
4.3.1.1 Preparo da Amostra

De acordo com Martins (2006), antes de iniciar o processo por via enzimática, é necessária uma preparação prévia da matéria prima para que esta tenha o mínimo de partículas, acidez e umidade. Atividades como: filtração, centrifugação, lavagem da amostra com soluções tampão, e desumidificação foram citadas como necessárias para que a reação tenha o melhor rendimento.

Neste trabalho, optou-se por utilizar a amostra previamente filtrada, com o uso de bomba a vácuo e papel filtro.

A amostra antes e após a filtração foi sempre acondicionada em temperaturas 3–5 ° C.

Figura 2 - Foto do preparo da amostra por filtração.



Fonte: Do autor

4.3.1.2 Determinação do Teor de Ácidos Graxos Livres

Os procedimentos utilizados para a determinação do teor de ácidos graxos foram baseados na teoria da titulação ácido-base e adaptados a partir de metodologia oficial da “American Oil Chemist’s Society” – AOCS (AOCS, 1998 apud DA SILVA, 2010). Pesou-se 1 grama em triplicata, da amostra aclimatada em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), previamente fundida e homogeneizada, em frascos erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se 75 mL de álcool etílico quente ($40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) e neutralizado. A neutralização do álcool etílico foi realizada com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, a qual, na presença de

fenolftaleína, evidenciou uma coloração levemente rósea. Após a adição do álcool, a amostra foi titulada utilizando-se solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,081M (previamente padronizado com solução de biftalato de sódio), na presença de fenolftaleína, até mudança de coloração para rosa.

Para a determinação do teor de ácidos graxos livres utilizou-se a equação:

$$AGL = \frac{(V_t * M * 28,2)}{m}$$

onde:

AGL é o valor de ác. graxos livres como o ác. oleico expresso em mg de KOH/g de amostra;

V_t é o volume gasto de solução de hidróxido de potássio expresso em mL;

M é a molaridade da solução de hidróxido de potássio usada na titulação expresso em mol/L;

m é massa da amostra expresso em g.

4.3.1.3 Determinação do Índice de Acidez Total

De acordo com MORETTO e FETT (1998) o índice de acidez total é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos em um grama da amostra. O índice de acidez revela o estado de conservação do óleo.

Foram pesados 2 g em triplicata, da amostra já aclimatada em temperatura ambiente (25°C ± 5°C), previamente fundida e homogeneizada, em frascos erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 25 mL de solução de éter e álcool 2:1 (v:v), seguindo em agitação e posterior adição de 2 gotas de fenolftaleína.

Por fim, procedeu-se a titulação com solução de hidróxido de potássio a 0,0083M (previamente padronizado com solução de biftalato de sódio), na presença de fenolftaleína, até mudança de coloração para rosa. Da mesma forma, como controle, foram tituladas três amostras de éter e álcool 2:1, com fenolftaleína.

Para a determinação do índice de acidez total foi utilizada a equação:

$$IAT = \frac{(Vt - Vc) * M * 56,11}{m}$$

Onde:

IAT é o índice de acidez total expresso em mg de KOH/g de amostra;

Vt é o volume de hidróxido de potássio gasto na titulação das amostras expresso em mL;

Vc é o volume de hidróxido de potássio gasto na titulação dos controles expresso em mL;

M é a molaridade da solução de hidróxido de potássio usada na titulação expresso em mol/L;

m é massa da amostra expresso em g.

4.3.1.4 Determinação do Índice de Iodo

Quanto maior a insaturação de um ácido graxo, maior será a sua capacidade de absorção de iodo e, conseqüentemente, maior será o índice de iodo. Insaturações em ésteres e ácidos graxos expostos a altas temperaturas podem proporcionar a polimerização das cadeias e levar à formação de goma, deixando resíduos no interior dos motores, principalmente derivados do ácido linolênico. Por isso a importância de se avaliar essa propriedade (DA SILVA, 2010).

O índice de iodo foi determinado pelo método de Wijs de acordo com adaptação das normas da “American Oil Chemist’s Society” - AOCS (AOCS, 1998 apud DA SILVA, 2010).

Pesou-se 1,0 g em triplicata, da amostra em erlenmeyers com tampa de 250 mL. Adicionou-se 3 mL de clorofórmio em cada um dos três erlenmeyers contendo amostra e em outros três erlenmeyers sem amostra (para titulação do controle).

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica, foram adicionados 10 mL de solução de Wijs, preparada previamente com 6,5 g de iodo ressublimado diluído em 500 mL de ácido acético glacial levemente aquecido (40°C ± 5°C).

Após homogeneização da solução, os frascos foram reservados em local escuro, com temperatura entre 20 e 30°C, por um período de tempo de 2 horas.

Decorrido o tempo, foram adicionados 8 mL de iodeto de potássio (KI) 10% e 100 mL de água destilada para que fossem feitas as titulações com a solução de tiosulfato de sódio 0,1M, sob vigorosa agitação até que a coloração da amostra ficasse praticamente incolor.

Em seguida, foi adicionado aproximadamente 1 mL de solução de amido a 2 % e a titulação era continuada até que a fase inferior mudasse de coloração rosa para incolor. Para se calcular o índice de iodo na amostra, utilizou-se a equação:

$$II = \frac{(V_c - V_t) * M * 12,69}{m}$$

onde:

II é o Índice de Iodo expresso em g I₂/100 g de amostra;

V_c é o volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação dos controles expresso em mL;

V_t é o volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação das amostras expresso em mL;

M é a molaridade real do tiosulfato de sódio usada na titulação expresso em mol/L;

m é a massa da amostra expressa em g.

4.3.1.5 Determinação do Índice de Saponificação

O índice de saponificação da matéria prima foi determinado de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para esta medida uma amostra de 2 g foi pesada em balão de fundo chato de 250 mL. Em seguida foram adicionados 25 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio a 0,5M (previamente preparada com a diluição de 2,81 g de hidróxido de potássio em 100 mL de álcool). A preparação foi feita com dois balões, um contendo amostra de resíduo gorduroso e outro sem, para que se obtivesse o controle.

A mistura ficou em agitação magnética e aquecimento até o início da ebulição. Para isso foi necessário o uso de condensador com arrefecimento da água. A mistura foi mantida em repouso por 10 minutos.

A mistura ainda quente foi titulada com ácido clorídrico a 0,5M (previamente preparado com 4,17mL de ácido diluído em 100 mL de água destilada), na presença de indicador de fenolftaleína, até que a coloração rósea desaparecesse por completo.

Para se calcular o índice de saponificação na amostra, utilizou-se a equação:

$$IS = \frac{(V_c - V_t) * 28,05}{m}$$

onde:

IS é o Índice de Saponificação expresso em mg KOH/ g de amostra;

V_c é o volume de ácido clorídrico gasto na titulação do controle expresso em mL;

V_t é o volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra expresso em mL;

m é a massa da amostra expressa em g.

4.3.1.6 Determinação do Índice de Peróxido

A determinação do índice de peróxido indica os níveis de oxidação em que se encontra o óleo/gordura no ato da análise. Em outras palavras, determina o grau de deterioração da matéria, dada sua condição inicial, quando obtida ou purificada.

O índice de peróxido foi determinado de acordo com o método oficial Cd 8b-90 da American Oil Chemist's Society - AOCS (2004).

Para esta determinação, em erlenmeyer de 250 mL, uma massa de 5g, em triplicata, foi dissolvida com 30 mL da solução ácido acético-clorofórmio 3:2 (v:v). Adicionou-se, então, 0,5 mL da solução saturada de iodeto de potássio, sendo que a solução resultante foi acondicionada ao abrigo da luz por 1 minuto.

Acrescentou-se 30 mL de água destilada e procedeu-se a titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01M até que a coloração amarela ficasse praticamente incolor. Em seguida acrescentou-se 0,5 mL de solução indicadora de amido (amido solúvel 2%) e continuou-se a titulação até o completo desaparecimento da coloração azul.

Da mesma forma, procedeu-se outra análise para obtenção do controle, a qual se desenvolveu a mesma metodologia, no entanto, sem a adição de amostra.

Para se calcular o índice de peróxidos na amostra, utilizou-se a equação:

$$IP = \frac{(V_t - V_c) * M * 1000}{m}$$

onde:

IP é o Índice de Peróxidos expresso em meq / Kg de amostra;

V_t é o volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra expresso em mL;

V_c é o volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação do controle expresso em mL;

m é a massa da amostra expressa em g.

4.3.1.7 Determinação do Teor de Umidade

A determinação de umidade foi efetuada com base no método de perdas por dessecação em estufa. Inicialmente 5 gramas de óleo foram pesados em cadinhos de porcelana, com peso previamente aferidos.

Em seguida, os cadinhos com as amostras foram aquecidos a 105°C durante 1h em estufa. Após o aquecimento, as amostras foram tampadas e resfriadas em dessecador até atingirem temperatura ambiente. Novamente os cadinhos com as amostras foram pesados.

O teor de umidade foi determinado pela equação (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985):

$$U = 1 - (m_i / m_f) * 100$$

onde:

U é a Umidade da amostra expresso em %;

m_i é a massa de amostra pesada antes da secagem expressa em g;

m_f é a massa de amostra pesada após da secagem expressa em gramas.

4.3.1.8 Determinação da Densidade

As densidades foram medidas em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) e para tal, as amostras foram pesadas em picnômetros de 50 mL, que já haviam tido aferição prévia do volume, com água destilada. Após a pesagem a densidade foi determinada utilizando a relação entre massa medida (em balança analítica com quatro casas de precisão) e o volume do balão utilizado (previamente aferido com água destilada à temperatura de 25°C). O procedimento de medida para todas as amostras foi realizado em triplicata, tendo sido obtido então um valor de densidade média medida e seu respectivo desvio padrão (σ).

4.3.2 Caracterização do Biocatalisador

Para que a pesquisa tenha caracterizado os principais fatores de interferência, a caracterização do biocatalisador foi imprescindível, com o interesse de avaliar a Lipase AK.

4.3.2.1 Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade enzimática das lipases nas formas livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 50 mL de azeite de oliva e 50 mL de goma arábica a 7% (p/v). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 1 mL da solução enzimática (5 mg sólido/ mL) ou cerca de 100 mg de lipase imobilizada (massa seca). Os frascos foram incubados a 37°C por 5 minutos. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de uma mistura de acetona e etanol 1:1 (v:v). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,02 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados utilizando a equação abaixo, onde Soares et al. (1999) estabeleceu que uma unidade (U) de atividade define a quantidade de enzima capaz de liberar $1\mu\text{mol}$ de ácido graxo por minuto de

reação, nas condições do ensaio. Para cada análise de atividade, foi realizado um branco utilizando água destilada ou 100 mg do suporte seco. As atividades foram expressas em $\mu\text{moles/mg}\cdot\text{min}$ (U), onde miligrama refere-se à massa de sólido para a lipase livre e suporte seco para lipase imobilizada.

$$AH = \frac{(V_t - V_c) * 10^3 * M}{me * t}$$

Onde:

AH é a atividade hidrolítica expressa em U

V_t é o volume de hidróxido de sódio gasto na titulação das amostras, expresso em mL

V_c é o volume de hidróxido de sódio gasto na titulação dos controle, expresso em mL

M é a molaridade da solução de hidróxido de sódio usada na titulação, expresso em mol/L.

me : massa de enzima utilizada, proporcional à alíquota utilizada, seja livre ou imobilizada, podendo então ser expressa em gramas ou mL.

t : tempo de reação em minutos.

4.3.2.2 Determinação da Concentração de Proteína

Com o propósito de dosar a quantidade de proteína no preparado enzimático comercializado da Sigma Aldrich Co. (Lipase AK) e no sobrenadante resultante da imobilização, procedeu-se quantificação pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), o qual se baseia na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Albumina bovina cristalina (BSA) foi usada como padrão para construir a curva de calibração na faixa de 0 a 0,6 mg/mL.

Numa primeira etapa foi preparada a solução de Coomassie: dissolveu-se 0,1 g de Coomassie Brilliant Blue G 250 ($MM = 854,04 \text{ g/mol}$) em 50 mL de etanol 95% (v/v). A esta solução foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85 %. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L, onde completou-se o volume com água destilada. Por fim, foi filtrado algumas vezes, com bomba a vácuo e papel filtro, para que na aferição da

absorbância, obtivesse um valor entre 0,6 a 0,7, no comprimento de onda de 595 nm, quando fosse feita a leitura no espectrofotômetro.

Numa segunda etapa foi preparada uma solução de 1 mg/mL de albumina de soro bovino: dissolveu-se 0,01 g de albumina de soro bovino (BSA- bovine serum albumin) em 10 mL de água destilada. Então o procedimento dividiu-se em duas etapas distintas:

Na primeira prepararam-se, em eppendorfs, as soluções para a construção da curva padrão, conforme a Tabela 4. Esta curva permitiu calcular a concentração total de proteína nas amostras analisadas através de regressão linear.

Tabela 4 - Diluições de albumina para preparo das soluções de curva padrão.

Eppendorf	[Proteína] (mg/mL)	Solução BSA (µL)	Água Destilada (µL)	Volume total (µL)
1	0,05	5	95	100
2	0,1	10	90	100
3	0,2	20	80	100
4	0,3	30	70	100
5	0,4	40	60	100
6	0,5	50	50	100

Fonte: Do autor

De posse destas soluções em diferentes concentrações de enzima, foi coletada uma alíquota 0,1 mL de cada uma e colocado em reação com 5 mL de solução de Bradford. Aguardou-se aproximadamente 5 minutos e procedeu-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro, comprimento de onda de 595 nm, sendo que o aparelho foi calibrado com a solução de Bradford, acrescida de 0,1 mL de água destilada. A leitura se dá da solução mais diluída para a mais concentrada em albumina.

Na segunda etapa, para calcular a quantidade de proteína no formulado comercial “Lipase AK”, preparou-se uma solução de 100 mg de pó diluído em 2 mL de água destilada (concentração igual a 50 mg/mL). A partir desta solução mãe, procederam-se diferentes diluições conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Quantidades de enzima Lipase AK para preparação das soluções de avaliação da concentração, a partir de curva padrão já determinada.

Eppendorf	[Proteína] (mg/mL)	Solução Lipase AK (µL)	Água Destilada (µL)	Volume total (µL)
1	16,67	50	100	150
2	8,33	20	100	120
3	4,55	10	100	110
4	3,13	10	150	160

Fonte: Do autor

Assim como na determinação da curva padrão, foi a partir destas soluções em diferentes concentrações de enzima, que se coletou uma alíquota 0,1 mL de cada uma e colocado em reação com 5 mL de solução de Bradford. Aguardou-se aproximadamente 5 minutos e procedeu-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro, comprimento de onda de 595 nm, sendo que o aparelho foi calibrado com a solução de Bradford, acrescida de 0,1 mL de água destilada. A primeira leitura, utilizando a solução mãe foi suficiente para fazer a determinação do teor de enzima.

4.3.2.3 Imobilização da Lipase por Adsorção Física

O modo de preparo da imobilização da Lipase AK foi selecionado com base nos resultados satisfatórios obtidos na síntese de biodiesel a partir do óleo de café e óleo de soja, conforme pesquisado por Scamilhe et al.. (2012).

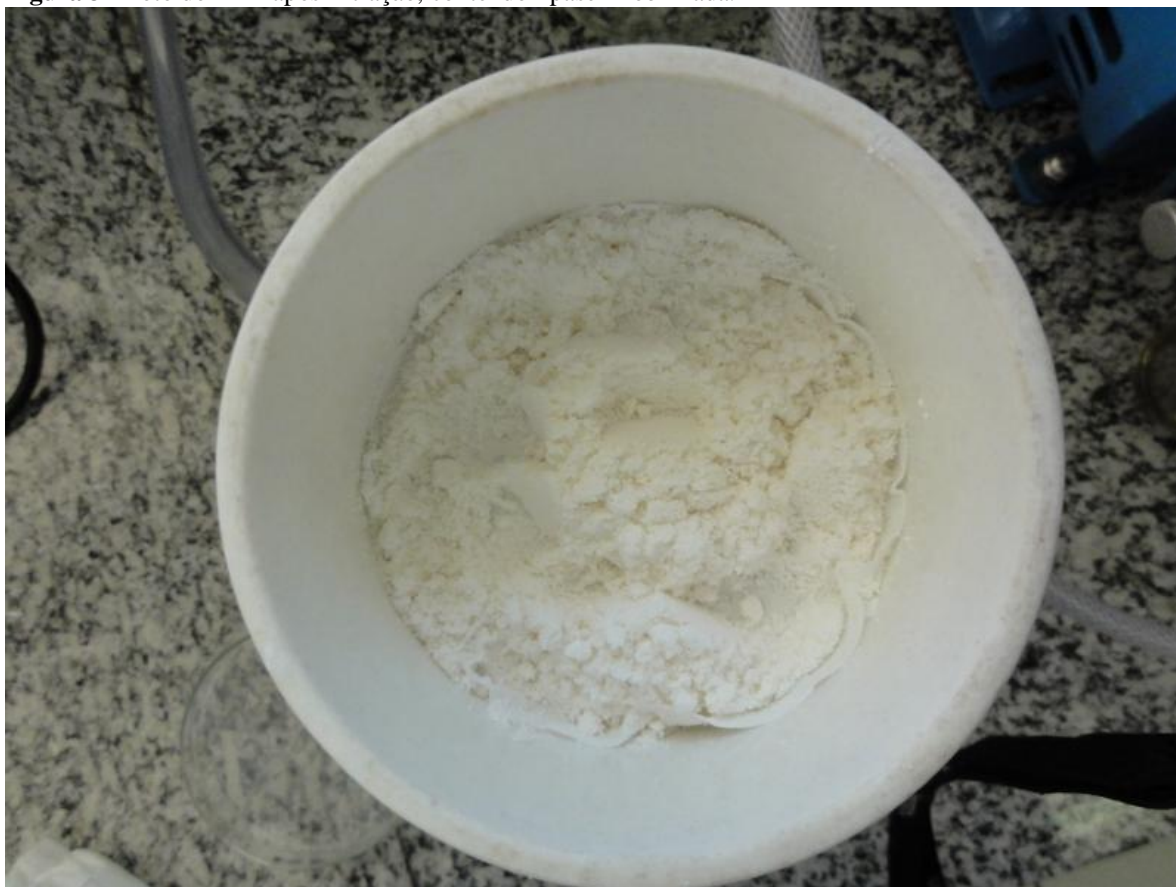
O suporte foi ativado em etanol absoluto, num total de 10 mL para cada grama de PHB, em agitação de 150 rpm no shaker, por 30 minutos.

Após esse período de tempo, foi lavado com água destilada, numa proporção de 250 mL para cada grama de PHB.

A etapa seguinte foi a da adição da Lipase AK, sendo que esta foi pesada de acordo com o carregamento de enzima pré-determinado. Com a enzima em pó pesada, utilizou-se um tubo do tipo falcon de 50 mL e juntamente, foram adicionados 20 mL de solução tampão fosfato 0,01 M. A homogeneização da solução foi obtida com o uso de misturador vortex. Em seguida adicionou-se 1 grama de PHB a solução enzimática, o qual ficou em agitação por 12 horas, a 125 rpm, em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).

Após esta etapa, o derivado imobilizado foi filtrado em bomba a vácuo (figura 3) e lavado com água destilada, numa proporção de 50 mL para cada grama de imobilizado.

Figura 3 - Foto do PHB após filtração, contendo lipase imobilizada.



Fonte: Do autor

O derivado foi acondicionado em embalagem aberta para secagem. A fixação da lipase ao suporte foi considerada completa após o tempo de permanência de 48 h de condições estáticas a 4° C.

O sobrenadante foi guardado, após a primeira filtração, com a finalidade de determinar a atividade hidrolítica.

4.3.3 Análise dos Fatores de Interferência à Reação Transesterificação

Foram analisados alguns fatores de interferência na reação para produção de biodiesel, conforme listados a seguir.

4.3.3.1 Avaliação das Propriedades Catalíticas da Lipase Livre e Imobilizada

Neste item há o detalhamento do comportamento catalítico da Lipase AK, na sua forma livre e imobilizada no suporte PHB, em função de variações no meio reacionário, seja por mudanças de pH, ou seja por mudanças de temperatura.

4.3.3.1.1 Influência do pH

As atividades das lipases livre e imobilizada foram estudadas utilizando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva na faixa de pH entre 5,0 a 9,0 com incremento de 0,5. Para este estudo foi empregada à mesma metodologia descrita anteriormente no item 3.3.2 variando o pH do tampão (0,1 M) utilizado na temperatura de 37 °C (SOARES et al., 1999).

4.3.3.1.2 Influência da Temperatura

Foi verificada a influência da temperatura na atividade das lipases livre e imobilizada empregando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita no item 3.3.2, nas temperaturas de 30, 37 a 70 °C, com incremento de 5 °C, com uso de solução tampão para controle de pH 7,0 (SOARES et al. 1999).

4.3.3.1.3 Reação de Transesterificação Enzimática do Resíduo Gorduroso e Etanol

As reações foram realizadas em frascos de 250 mL, hermeticamente fechados e incubados em um shaker rotativo, com banho-maria para controle de temperatura, a 200 rpm. As quantidades de substrato de reação eram variáveis, de acordo com as combinações molares propostas, sendo a massa reacionária fixada em 20 g, assim como a concentração de derivado

imobilizado, que ficou estabelecido como sendo 10% em relação à massa total dos reagentes. Após 15 h de reação, a amostra foi retirada e em seguida foi feita a purificação do biodiesel.

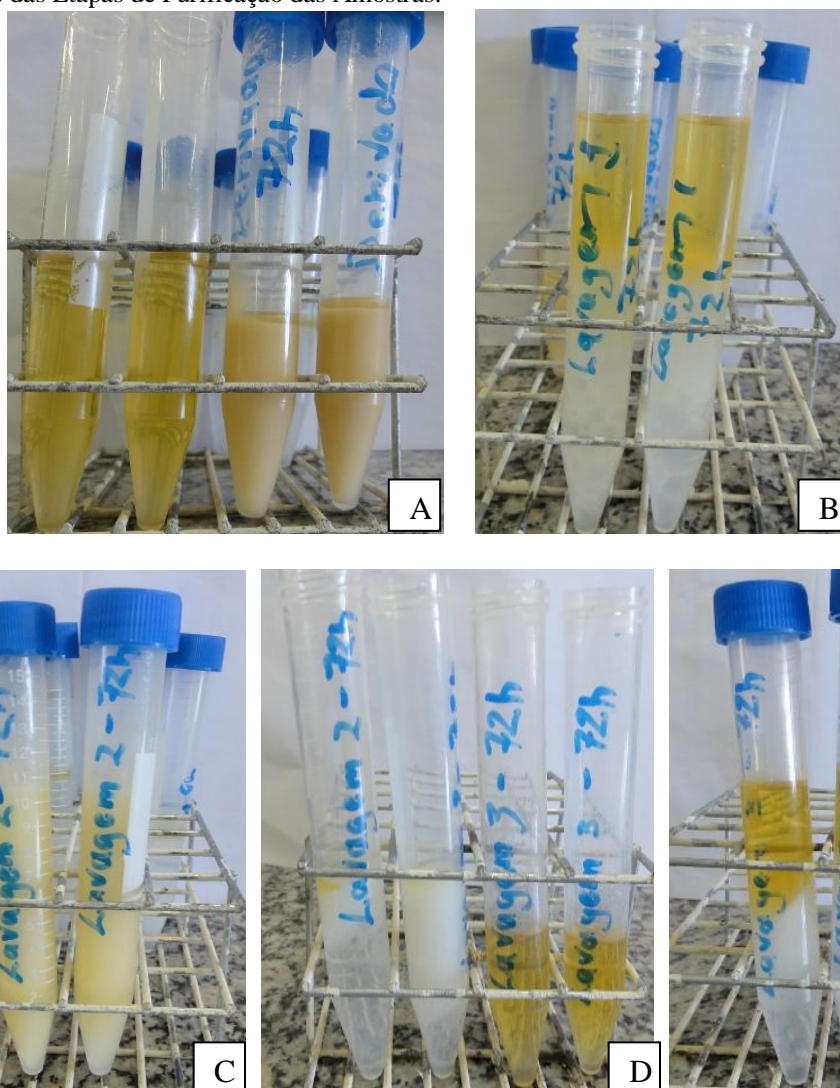
A primeira etapa (Figura 4 - A) foi de retirada da enzima imobilizada em Polihidroxibutirato (PHB). Considerando a densidade do PHB, o uso de centrífuga laboratorial para tubo falcon de 15 mL foi funcional. Após a rotação, verificou-se que a amostra separava-se em duas fases: na porção mais baixa do tubo estava o derivado imobilizado e na porção superior estava a amostra de interesse, a qual continha o biodiesel em mistura com glicerol, o etanol não reagido e água resultante da reação. Com a ajuda de ponteiros e pipetador, a solução superior foi toda coletada.

Na etapa seguinte (Figura 4 - B, C e D), foi feita a lavagem da amostra. Nessa etapa, utilizou-se água quente, ($65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), emulsificando os subprodutos da reação (glicerina) e, por meio de centrifugação foi possível retê-los na fase inferior. A lavagem foi repetida por três vezes.

Numa etapa final, tendo como objetivo a evaporação do etanol, a amostra foi submetida a evaporador rotativo a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ e rotação de 100 rpm e em seguida, considerando a existência de umidade dispersa na amostra, adicionou-se sal sulfato de sódio anidro, numa proporção de até 1/3 do total do volume amostrado e aguardou-se 24 h.

Para a separação do sal, foi realizada uma nova centrifugação. A cada etapa de centrifugação, utilizou-se uma rotação de 2000 rpm, por período de 5 minutos.

Figura 4 - Fotos das Etapas de Purificação das Amostras:



Nota: (A) Separação do Derivado Imobilizado. (B) Primeira Lavagem. (C) Segunda Lavagem (mistura água/amostra homogeneizadas), (D) Separação da glicerina e ésteres e (E) Terceira Lavagem após centrifugação (separação das fases).

Fonte: Do autor

4.3.3.1.4 Delineamento Experimental

Com a finalidade de encontrar a melhor combinação dos diferentes fatores que afetam a reação, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), ou seja, um planejamento 2^2 incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes avaliadas foram temperatura (x1) e razão molar entre óleo e etanol (x2) tendo como repostas a formação do éster etílico e a viscosidade. Os níveis das variáveis foram escolhidos baseados na importância dos mesmos para o

processo de transesterificação e em ensaios preliminares. O tempo de reação foi fixado em 15 horas e agitação em 200 rpm. A concentração do derivado foi mantida fixa no experimento (10%), bem como o carregamento do derivado (30 mg de lipase AK).

O software Statistica versão 7,0 (StatSoft Inc., USA) foi usado para análise e construção das superfícies de respostas.

Tabela 6 - Valores utilizados no DCCR para a reação de transesterificação enzimática utilizando a lipase AK.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Razão Molar (X_1)	1:3	1:4,7	1:9	1:13,3	1:15
Temperatura ($^{\circ}$ C) (X_2)	30	34	45	56	60

Fonte: Do autor

4.3.3.1.5 Determinação da Viscosidade

A viscosidade absoluta foi medida em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd., Inglaterra) empregando o cone CP 42 (faixa de viscosidade de 0,3 a 6000 cP) na Escola de Engenharia de Lorena – USP, Universidade parceira da UNIFAL-MG. As medidas foram feitas no resíduo gorduroso bruto (não reagido) e no biodiesel purificado.

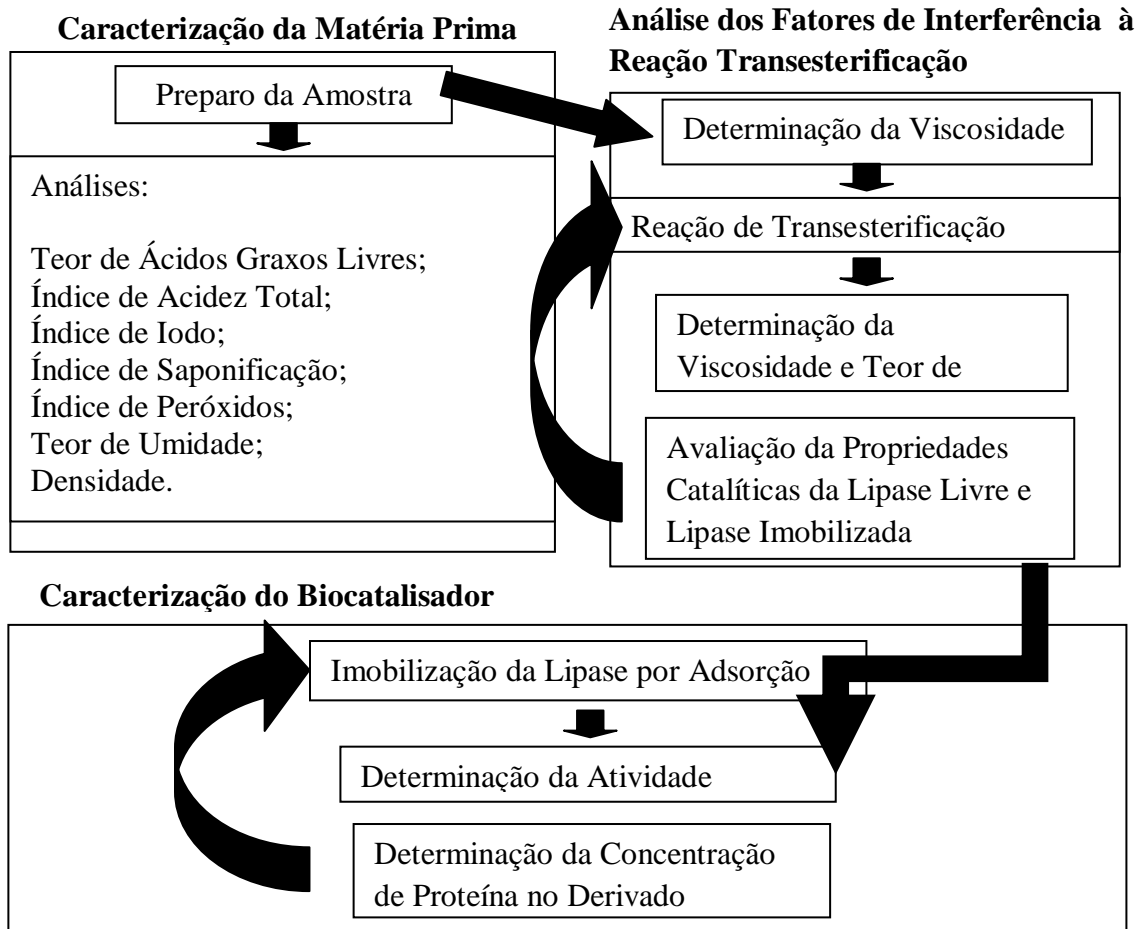
4.3.3.1.6 Determinação do Teor de Ésteres Formados

Para a determinação do teor de monoésteres de ácidos graxos, foi utilizado cromatógrafo de fase gasosa, realizado no Departamento de Engenharia Química – UFSCar, Universidade parceira da UNIFAL-MG. O rendimento 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 determinado a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial do extrato de resíduo gorduroso preparado (M_0), da massa molecular correspondente a cada ácido (M_{Ma}) e do éster correspondente (M_{Me}).

4.4 PLANO DE TRABALHO DA PESQUISA

Com o propósito de ter uma sequencia das ações desenvolvidas durante todo o período de experimentação, fundamentou-se um fluxograma que ilustra a metodologia de trabalho:

Figura 5 - Fluxograma das ações desenvolvidas na pesquisa e suas correlações.



Fonte: Do autor

5 RESULTADOS

Neste capítulo, são apresentados os resultados das propriedades do resíduo gorduroso e a caracterização da Lipase AK, bem como seu na reação de transesterificação.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

Independente do tipo de catalisador selecionado, a qualidade da matéria-prima lipídica na reação de transesterificação é de fundamental importância, tendo em vista que inibidores catalíticos podem reduzir o rendimento da reação. O resíduo gorduroso oriundo de fritura foi caracterizado quanto aos teores de interesse para controle de qualidade, incluindo teor de ácidos graxos livres, índice de acidez, iodo, peróxido e saponificação, teor de umidade, densidade e viscosidade. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Caracterização da Matéria Prima em comparação a valores de referência ou da literatura.

Parâmetro Avaliado	Valor Obtido	Desvio padrão	Valores de Referência	Valores da Literatura
Teor de Ácidos Graxos Livres (mg/ g)	0,79	0,25	< 0,6 ^a	0,13 – 4,57 ^b
Índice de Acidez Total (mg/ g)	0,39	0,01	< 0,5 ^c	0,14 – 5,77 ^d
Índice de Iodo (g/100 g)	26,83	0,58	120 – 143 ^e	119,35 - 121,82 ^f
Índice de Saponificação (mg/g)	106,88	---	189 – 195 ^e	---
Índice de Peróxido (meq/Kg)	8,79	0,53	< 10 ^e	---
Viscosidade (cP)	23,49		---	---
Teor de Umidade (%)	0,10	0,01	---	0,11 ^b
Densidade (g/dm³)	0,92	---	---	---

Nota: ^a BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA , Instrução Normativa MAPA n° 49/06 (2006)

^b Arruda Botelho (2012)

^c BRASIL, Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, Resolução ANP n° 14/12 (2012)

^d Silva (2010)

^e BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução RDC n° 482/99 (1999)

^f Souza (2010)

Fonte: Do autor

O teor de Ácidos Graxos Livres presente na amostra de resíduo gorduroso apresentou valor de 0,7886 mg de KOH/g de amostra. Considerando que a amostra tinha origem a partir do óleo de soja refinado, comparativamente verificou-se que a Instrução Normativa MAPA nº 49, de 22/12/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA disciplina que o índice de acidez seja sempre inferior a 0,2 mg KOH/g para óleos comerciais de uso alimentício do tipo 1 e que esteja entre 0,2 – 0,6 mg KOH/g de amostra para óleos do tipo 2.

Mesmo que a equação de determinação do teor de ácidos graxos livres (equação 3.1) determine o valor expresso em mg de KOH/g de amostra, não é incomum verificar referência ao tema, com valores expressos em percentual (%).

É o caso da revisão de Arruda Botelho (2012), que verificou, da análise de diversas amostras de resíduo gorduroso, por diferentes autores, no que diz respeito aos percentuais (%) de ácidos graxos livres, os valores obtidos variavam entre 0,13 % a 4,57 %, sendo que boa parte dos resultados ficaram abaixo de 1,0 %.

Os índices de acidez e peróxido indicam a deterioração da material lipídico em termos de rancidez hidrolítica (pelo índice de acidez) a partir da concentração de ácidos graxos livres e rancidez oxidativa (pelo índice de peróxido). O índice de saponificação é útil para verificar a massa molecular média e a possível adulteração por outros óleos com índices de saponificação muito diferentes. O índice de iodo revela o grau de insaturação da matéria prima. Portanto, quanto maior a quantidade destas insaturações, maior será a capacidade de retenção do iodo na cadeia do ácido graxo, ou seja, maior será o índice de iodo determinado.

Quanto ao Índice de Acidez Total o valor encontrado foi de 0,3858 mg de KOH/ g. Da literatura consultada, verificou-se certa divergência entre as metodologias descritas como sendo a de determinação do índice de acidez total, o que dificultou estabelecer inferências comuns. Não é incomum verificar autores fazendo referência ao Índice de Acidez, como sinônimo do teor de ácidos graxos livres, expressando inclusive valores obtidos em percentual.

Esta foi uma situação que dificultou a avaliação dos valores obtidos, uma vez que muitas vezes as referências obtidas não permitiam estabelecer qualquer correlação, seja pela ausência de metodologia ou por diferença nas equações e valores obtidos.

Ainda sobre o índice de acidez, Silva (2010) utilizando a mesma metodologia do presente estudo, verificou uma variação de valores entre 0,14 a 5,77 mg de KOH/ g em seis amostras de resíduo gorduroso analisadas.

Cabe ressaltar que o presente índice é um dos parâmetros de identificação da qualidade em que se encontra o resíduo gorduroso, afinal relaciona-se diretamente a quantidade e variedade dos ácidos graxos oxidados ou hidrolisados, devido a interferências como o tempo de uso e a ação direta do processo de fritura.

Para a transesterificação enzimática, o índice observado, não afeta a reação ou qualidade do biodiesel produzido, uma vez que a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, estabelece por meio da Resolução ANP nº 14 de 11 de maio de 2012, que o teor de acidez máximo não pode ultrapassar 0,5 mg de KOH/ g de Biodiesel.

Matérias primas intensamente utilizadas antes do descarte, podem gerar um biocombustível com altos valores de acidez, o que pode ser considerado comprometedor a respeito da viabilidade do processo do ponto de vista da qualidade do biodiesel produzido (SUAREZ et al. 2009).

O valor encontrado para o índice de iodo foi de 26,8303 g de I_2 / 100 g de amostra. Verifica-se um valor baixo, quando considerada as referências bibliográficas da ANVISA (Resolução RDC N°482/99), que estabelece o índice de iodo do óleo soja esteja numa faixa de 120 a 143 g I_2 /100 g de amostra e de Souza (2010), que faz referência a um índice de iodo em óleos residuais na faixa dos 120 g de I_2 / 100 g de amostra. Isso pode indicar que muitas das insaturações foram degradadas, devido às altas temperaturas a que foi submetido o óleo, durante o seu uso.

O índice de saponificação é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessários para saponificar os ácidos graxos, resultantes da hidrólise de um grama da amostra, ou seja, quanto mais alto for o índice de saponificação, melhor é a qualidade do óleo (MORETTO e FETT, 1998).

A ANVISA estabelece em sua Resolução RDC N°482/99, que o índice de saponificação do óleo soja esteja numa faixa de 189 a 195 mg KOH/g de amostra. O valor encontrado no resíduo foi de 106,8770 mg KOH/g de resíduo gorduroso.

Assim, é possível inferir que a degradação dos ácidos graxos que compõem o resíduo amostrado encontra-se em estágio avançado, uma vez que o valor do índice verificado corresponde a pouco mais do que 50% do limite inferior disciplinado pela ANVISA, para óleos de soja.

O Índice de Peróxidos (I.P) encontrado foi de 8,7911 meq de peróxido/Kg de amostra. Contrariando os outros resultados verificados, o valor obtido para o índice de peróxido

encontra-se dentro o disciplinado em legislação (< 10 meq de peróxido/Kg – ANVISA Resolução RDC nº 482/99).

Do teor de umidade, nas normas e legislações analisadas, não se verificou descrição a este respeito, concluindo que não há uma quantidade de umidade permissível para óleos e gorduras comercializados. Arruda Botelho (2012) faz referências a valores muito próximos ao verificado.

Comercialmente, quando a produção de biodiesel é por via catalítica alcalina, a presença de umidade prejudica a ação do catalisador, devido à formação de complexos saponáceos, ou seja, produção de subprodutos sem interesse comercial e que diminuem efetividade da reação.

Neste trabalho, no entanto, a umidade presente na reação de transesterificação é fator positivo, uma vez que o uso de um catalisador enzimático do tipo Lipase atua exatamente na interface entre o óleo e água. Desta forma, a Lipase somente terá seu máximo desempenho em reações de transesterificação, se durante a reação houver a presença de fração úmida.

5.1.1 Densidade

Tabela 8 - Densidade média do Resíduo Gorduroso.

Tratamento da Amostra	Peso Água Corrigido (g)	Peso do Óleo (g)	Dens. (g/dm ³)	Média Dens. (g/dm ³)	Desvio Padrão
Óleo s/ filtrar	51,2312	47,2128	0,9216	0.9217	0,000266
Óleo s/ filtrar	49,9442	46,0225	0,9215		
Óleo s/ filtrar	49,7232	45,8436	0,9220		
Óleo filtrado	51,0044	46,9911	0,9213	0.9212	0,000125
Óleo filtrado	50,9956	46,9830	0,9213		
Óleo filtrado	52,6236	48,4714	0,9211		
Óleo Lavado	50,0825	46,1688	0,9219	0.9215	0,000369
Óleo Lavado	50,6166	46,6239	0,9211		
Óleo Lavado	50,3575	46,4007	0,9214		
Óleo de soja	51,2110	47,1850	0,9214	0.9212	0,000391
Óleo de soja	49,9630	46,0016	0,9207		
Óleo de soja	51,0153	47,0053	0,9214		

Fonte: Do autor

Nos diferentes tratamentos aplicados, conforme mostrado na Tabela 8, não foi verificado nenhuma alteração na densidade, mesmo em comparação com a densidade do material de origem, que era o óleo de soja. Com este experimento realizado, permitiu a escolha de aplicar somente o tratamento filtrando a amostra para utilização nos experimentos futuros.

Tal escolha é justificada pela menor quantidade de tratamentos e, aliado a esta facilidade, ocorre pouca alteração e perdas de amostra. Quando a amostra era lavada com solução tampão fosfato e submetida à desumidificação, por haver mais etapas durante o tratamento da amostra, verificavam-se perdas expressivas de volume de amostra, em comparação ao volume inicial tomado.

Figura 6 - Aferição da densidade com uso de picnômetros:



Nota: (A) Detalhe do óleo de soja. (B) Amostras com diferentes preparos.
Fonte: Do autor

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOCATALISADOR

A seguir são indicados os resultados das características avaliadas da lipase AK.

5.2.1 Determinação do Teor de Proteína

Com o uso do método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976) e utilizando-se a proteína Albumina bovina cristalina (BSA) para preparar a curva de calibração, foi possível determinar a concentração de proteína na forma livre presente na lipase AK, sendo que obteve-se um valor de 68 mg de proteína/g de pó.

5.2.2 Influência de Diferentes Carregamentos de Lipase AK Imobilizada em PHB na Atividade Hidrolítica

Conforme verificado por Dabaja et al. (2013) e Bezerra et al. (2013), o presente estudo confirmou que o carregamento com melhor atividade hidrolítica foi o que usava 30 mg de Lipase AK/g de PHB. A melhor atividade hidrolítica específica obtida foi de 190,80U/g para um carregamento de 30 mg.

No presente estudo, as concentrações avaliadas foram 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 30,0 e 40,0 mg/g de suporte. A metodologia escolhida para comprovação do melhor carregamento foi pela avaliação do sobrenadante, no qual se obtém a curva de rendimento da atividade hidrolítica teórica. Nesta análise, empregando o método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al. 1999) foram trabalhadas duas análises: uma com o sobrenadante (tampão e enzima) anterior à imobilização, avaliando a enzima livre em solução e outra analisando o sobrenadante após a retirada do derivado imobilizado, verificando a capacidade de retenção do PHB e capacidade catalítica da enzima. Nesta análise, obtiveram-se os valores constantes na Tabela 9.

Tabela 9 - Atividade hidrolíticas inicial e final, na análise do sobrenadante (proteína livre), em função dos diferentes carregamentos de proteína para imobilização em PHB.

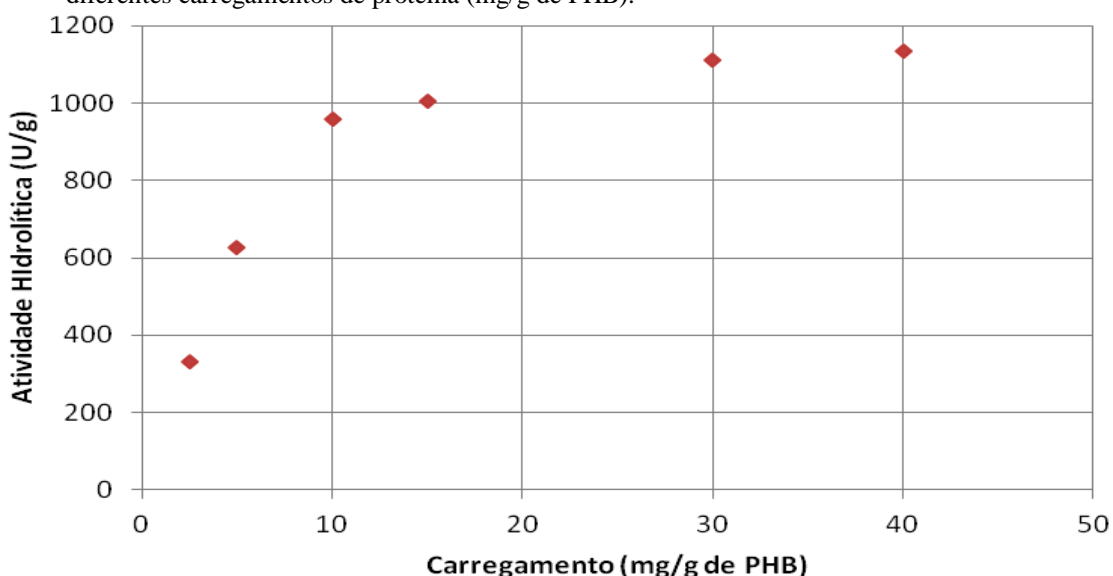
Carregamento (mg/g)	Ativ. Hidrolítica Inicial (U/g)	Ativ. Hidrolítica Final (U/g)	Ativ. Hidrolítica Teórica (U/g)
2,50	413,4725	80,65387	332,82
5,00	917,8021	291,0341	626,77
10,00	1798,678	839,5776	959,10
15,00	2123,635	1119,94	1003,70
30,00	4446,89	3335,475	1111,42
40,00	5768,857	4636,07	1132,79

Fonte: Do autor

Este método foi proposto para a obtenção de dados complementares: a obtenção de uma atividade hidrolítica teórica, diferente da atividade hidrolítica real, obtida a partir do PHB com a lipase imobilizada, permite inferências diversas a respeito do método de reuso da lipase e sua eficácia. Além disso, foi uma metodologia que permitiu uma melhor logística do uso dos reagentes (como os derivados imobilizados em diferentes carregamentos), bem como propostas de reuso do sobrenadante após imobilização.

Desta análise, resultou que o melhor carregamento foi o de 30 mg, uma vez que, o carregamento de 40 mg o rendimento da atividade hidrolítica foi considerado igual. A Figura 7 mostra esta situação, conforme a curva de rendimento de atividade hidrolítica teórica.

Figura 7 - Comportamento hidrolítico da Lipase AK livre, antes e depois da imobilização, de acordo com os diferentes carregamentos de proteína (mg/g de PHB).



Fonte: Do autor

Verificou-se que o sistema de imobilização não estava sendo funcional, dado a grande atividade presente no sobrenadante após a imobilização. Esta situação era recorrente quando se trabalhava com um Polihidroxibutirato (PHB) de outro fornecedor, que não da Sigma Aldrich Co. Por fim, não foi possível continuar com este parâmetro da pesquisa.

Utilizando o PHB da Sigma Aldrich Co., somente na concentração de 30 mg de proteína, obteve-se o valor de 413 U/g, no método de hidrólise do azeite (SOARES, 1999). Este rendimento foi superior que o de Dabaja et al.. (2013) e Bezerra et al.. (2013).

Na avaliação do sobrenadante resultante da imobilização com PHB da Sigma Aldrich Co., não havia atividade hidrolítica quantificável por titulação com NaOH, indicando máxima eficiência de imobilização.

Mendes (2009) identifica que atividade hidrolítica real é inferior a teórica devido à existência de agentes protetores de enzima, presentes no pó comercial e, por consequência, na solução com enzima livre. Além disso, quando imobilizada, a enzima forma ligações diversas com o suporte, que podem distorcer ou inibir a ação dos sítios ativos das enzimas.

5.3 ANÁLISE DOS FATORES DE INTERFERÊNCIA À REAÇÃO TRANSESTERIFICAÇÃO

A seguir são indicados os resultados das análises desenvolvidas, no que diz respeito aos fatores de interferência à reação de transesterificação.

5.3.1 Propriedades Catalíticas da Lipase Livre e Imobilizada

Como a principal característica das enzimas é a catálise das reações químicas e biológicas que ocorrem nos seres vivos, o estudo de sua função catalítica baseia-se na medida quantitativa da velocidade da reação em que participam. Devido à sua natureza proteica são altamente sensíveis às variações de pH, temperatura, concentração da própria enzima, entre outros. Portanto, o conhecimento da atuação desses parâmetros sobre a reação enzimática permite o melhor emprego das propriedades catalíticas das enzimas.

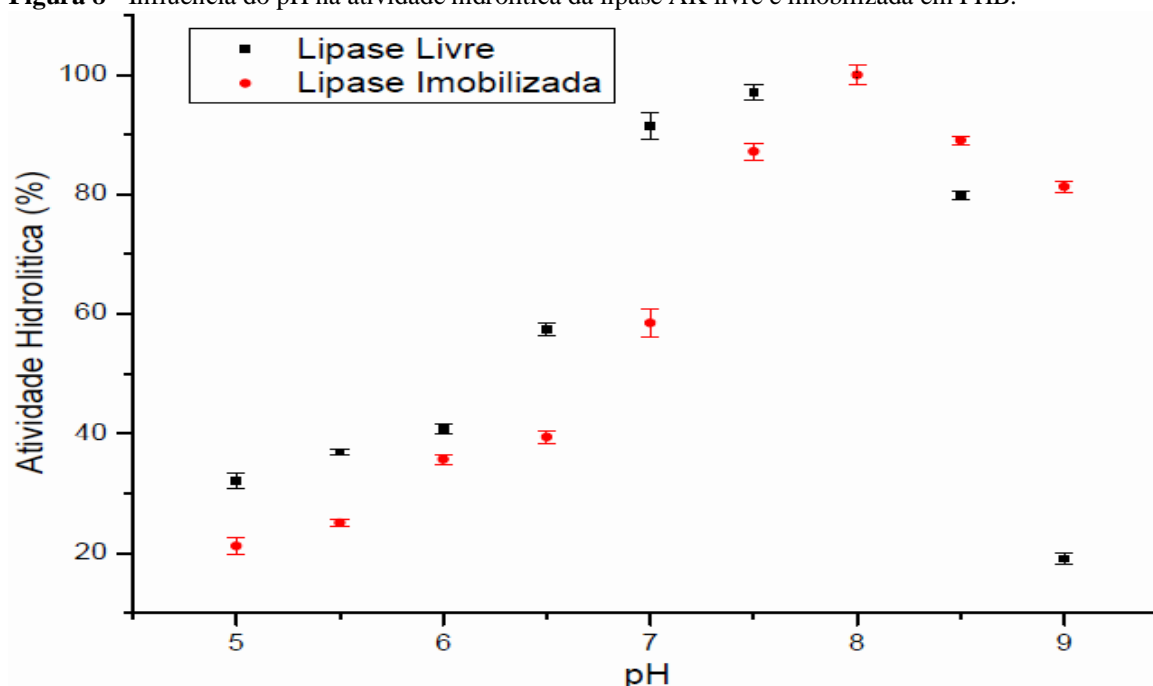
Qualquer que seja o método de imobilização de enzimas, deseja-se preservar, tanto quanto possível, a atividade biocatalítica e a especificidade da enzima. Apesar da superioridade das enzimas imobilizadas sobre as livres, o processo de imobilização pode modificar a cinética e as propriedades físico-químicas da enzima, normalmente, reduzindo sua atividade específica. Para verificar as alterações causadas nas propriedades originais da lipase livre, foi determinada a influência do pH e temperatura na atividade enzimática das lipases livre e imobilizadas.

5.3.2 Influência do pH na Determinação da Atividade Hidrolítica

As enzimas somente são ativas numa faixa restrita de pH e na maioria dos casos há um pH ótimo definido. O efeito do pH sobre a enzima deve-se às variações no estado de ionização dos componentes do sistema à medida que o pH varia. Como as enzimas são proteínas que contém muitos grupos ionizáveis, elas existem em diferentes estados de ionização, por isso, a atividade catalítica é restrita a uma pequena faixa de pH (PEREIRA, 1999 apud HARTMEIER, 1988). As enzimas imobilizadas também apresentam o comportamento típico das enzimas livres, porém o perfil de pH da enzima solúvel e imobilizada nem sempre coincide, uma vez que o processo de imobilização pode induzir a mudanças conformacionais, bem como alterar o estado de ionização e dissociação da enzima e seu macroambiente. Nos métodos de imobilização de enzimas, quando o suporte tem uma carga elétrica o comportamento cinético da enzima imobilizada pode diferir daquele observado para a enzima solúvel, mesmo na ausência de efeitos difusionais. Esta diferença deve-se às interações eletrostáticas no microambiente da enzima imobilizadas serem diferentes das existentes em solução (macroambiente) (PEREIRA, 1999 apud HARTMEIER, 1988; ZANIN, 1989).

Na Figura 8 apresentam-se os resultados obtidos no estudo da atividade da enzima lipase AK livre e imobilizada em PHB. A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Soares et al. (1999), empregando-se azeite de oliva como substrato. Os ensaios foram realizados a 37 °C, sendo a atividade determinada após um tempo de 5 minutos.

Figura 8 - Influência do pH na atividade hidrolítica da lipase AK livre e imobilizada em PHB.



Fonte: Do autor

Observa-se na Figura 8 que a lipase AK na sua forma livre e imobilizada apresentam atividade máxima em pH igual a 8,0. Geralmente, o processo de imobilização confere uma maior estabilidade ao pH à enzima imobilizada, uma vez que em pH 5,0 a enzima imobilizada ainda apresentava cerca de 20% de atividade. Este fato corrobora o observado na literatura, que em muitos casos o processo de imobilização atua no sentido de aumentar a estabilidade ao pH (PEREIRA et al. 2001).

Na lipase livre, a atividade hidrolítica diminuiu a partir de pH 8,0, sendo que é possível inferir que sua faixa ideal está entre pH 7,0 e 8,0, onde seu rendimento é sempre superior a 90 %. A melhor atividade hidrolítica atingiu 7000 U/g de pó (atribuída eficiência de 100% no gráfico). Após o seu pico de máxima expressão catalítica, a enzima livre perde funcionalidade de forma abrupta, a considerar que pequenas alterações no pH comprometeram sua ação catalítica na hidrólise do azeite.

A enzima imobilizada, o crescimento da curva de rendimento catalítico tem comportamento logarítmico contínuo até o ponto de máximo, em pH 8,0, situação em que a atividade hidrolítica mensurada chegou a 24409 U/g de pó (atribuída eficiência de 100% no gráfico).

Da avaliação da atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada, considerando os valores reais expresso em “U/g”, o desempenho da enzima imobilizada é superior ao da enzima livre, uma vez que a menor atividade verificada da enzima imobilizada foi em pH 5,0,

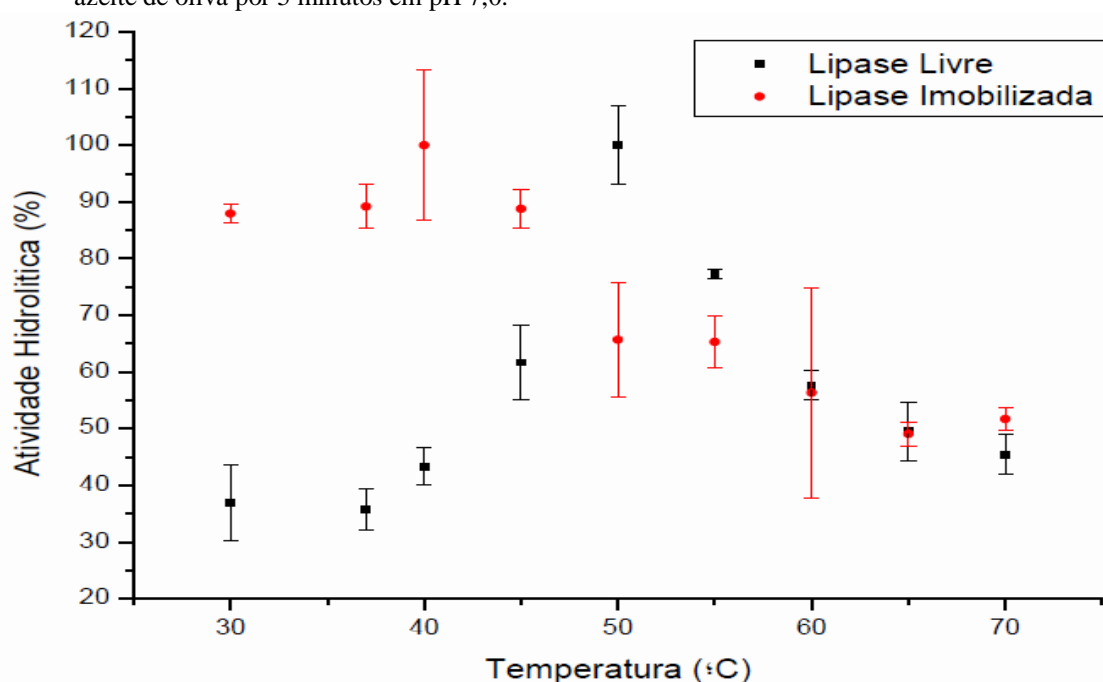
situação em que foi quantificado 6872 U/g, contra 2248 U/g medido para o mesmo pH, quando a enzima encontrava-se livre em solução. A mesma situação foi verificada nos valores com maior rendimento de atividade, pois quando o pH era 8,0, a atividade hidrolítica medida para a enzima imobilizada era 24409 U/g, contra 7000 U/g medido no mesmo pH, porém com a enzima livre.

De acordo com a literatura para a lipase AK (*P. fluorescens*) imobilizada em quitosana também não foi observada mudança de pH ótimo de atuação em relação à enzima livre (ITOYAMA et al. 1994).

5.3.3 Influência da Temperatura na Determinação da Atividade Hidrolítica

A influência da temperatura sobre a atividade da enzima livre ou imobilizada é, geralmente, representada em termos de atividade ou velocidade de reação em função da temperatura. A dependência da temperatura na atividade enzimática foi investigada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, numa faixa de temperatura entre 30 a 70 °C. Na Figura 9 estão apresentadas as temperaturas ótimas de atuação da lipase livre e da imobilizada obtida neste trabalho. O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia apresentada no item 4.3.3.

Figura 9 - Influência da temperatura na atividade hidrolítica da lipase livre e imobilizada em PHB. Hidrólise do azeite de oliva por 5 minutos em pH 7,0.



Fonte: Do autor

Nota-se na Figura 9 que a máxima atividade da lipase livre ocorreu a 50 °C quando alcançou 6883 U/g de pó (atribuída eficiência de 100% no gráfico), enquanto a lipase imobilizada em PHB apresentou uma atividade máxima igual a 172,78 U/g suporte seco a 40 °C. Nesse caso, o processo de imobilização não atuou no sentido de aumentar a temperatura ótima da enzima, não sendo favorável, pois quanto maiores as temperaturas de operação menores são os riscos de contaminação microbiana, mas pode ocorrer o fenômeno de desnaturação térmica da enzima.

No caso da influencia da temperatura, o comportamento da enzima livre muda, quando comparado ao seu comportamento nas alterações de pH. Verifica-se que a ascensão e declínio é logarítmica, sendo que o ponto de máxima eficácia catalítica, dista dos outros valores extremos em 20% no mínimo. Isso demonstra um comportamento instável da enzima, quando em condições de pequenas variações de temperatura, a considerar que seu uso fora da temperatura ideal pode não ser indicado quando ela é utilizada como biocatalisador da reação de transesterificação.

No caso da lipase imobilizada, a expressão da atividade foi mais lenta, sendo que na faixa de temperatura de 30 a 45°C, sua variação em eficiência catalítica ficou entre 88% a 100%. A máxima atividade hidrolítica foi em 40°C, onde a com atividade medida foi de 23497 U/g de pó (atribuída eficiência de 100% de atividade relativa no gráfico). Dentro da faixa de temperatura ideal, a enzima imobilizada apresenta-se funcional, uma vez que a oscilação de sua eficiência é sutil, permitindo inferir que a enzima é estável nas alterações de temperatura durante a reação de transesterificação.

Associado a esta característica positiva, da mesma forma que nas análises de pH, a avaliação da atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada, considerando os valores reais expresso em “U/g”, o desempenho da enzima imobilizada é superior ao da enzima livre. Uma vez que a menor atividade verificada da enzima imobilizada foi na temperatura de 65°C, situação em que foi quantificado 11529 U/g, contra 2537 U/g medido para a temperatura de 30°C, quando a enzima encontrava-se livre em solução. A mesma situação foi verificada nos melhores valores de rendimento de atividade, pois quando a temperatura era de 40°C, a atividade hidrolítica medida para a enzima imobilizada foi de 24409 U/g, contra 7000 U/g medido no mesmo pH, porém com a enzima livre.

Na literatura são encontrados exemplos de alteração da temperatura ótima da enzima livre e imobilizada tanto no sentido de aumento como diminuição. Por exemplo a enzima amiloglicosidase apresenta ótimos diferentes em função do tipo de substrato (amido,

milho, batata, mandioca, entre outros) e do suporte empregado na imobilização (ZANIN, 1989; ZANIN e MORAES, 2004).

5.3.4 Reação de Transesterificação Enzimática do Resíduo Gorduroso e Etanol

A produção de ésteres etílicos (biodiesel) por via enzimática envolve um mecanismo complexo dependente do tipo de substrato, enzima, solvente orgânico e concentração do meio reacional. Para verificar a atividade catalítica da preparação de lipase imobilizada em PHB, inicialmente foi realizado um teste preliminar mantendo condições fixas de temperatura, massa de biocatalisador e razão molar do óleo/ álcool baseado em estudos já pesquisados na literatura (BARON, 2008; FACIO, 2004; SILVA, 2010; SILVA, 2011).

As reações de síntese de biodiesel a partir do resíduo gorduroso foram realizadas em recipientes fechados, utilizando agitação mecânica (200 rpm), na temperatura de 45°C e razão molar fixa 1:9 resíduo gorduroso/ etanol. As reações foram incubadas com a lipase imobilizada em proporção 10% em relação à massa total dos reagentes e conduzidas por determinados períodos de tempo (12, 24, 48, 72 e 96h), com retirada dos recipientes amostrais para purificação e posterior dosagem dos ésteres etílicos formados.

Após os tempos pré-determinados, as amostras foram coletadas e purificadas, sendo removidos: o derivado imobilizado, a glicerina, o etanol e a umidade. A análise por cromatografia gasosa apresentou os seguintes percentuais de ésteres, mostrados na Tabela 10.

Observando a Tabela 10, na reação de transesterificação, verifica-se que o rendimento no tempo de 48 h atingiu uma porcentagem de 73,5% em éster etílico bastante similar ao tempo de 96 h. Neste caso, novos testes foram necessários, a fim de verificar a aplicabilidade de uma reação de transesterificação ocorrendo em tempos menores que 48 h, com a finalidade de produção de 100% de conversão em biocombustível.

Tabela 10 - Percentual de ésteres obtidos na reação de transesterificação em diferentes tempos de reação

Tempo (h)	12	24	48	72	96
Éster Etílico (%)	63,8	64,7	73,5	69,9	74,4

Fonte: Do autor

5.3.5 Estudos da Otimização na Reação de Transesterificação do Resíduo Gorduroso com Etanol por Planejamento Experimental

Preliminarmente foi efetuado um planejamento fatorial fracionário. Este fatorial possui uma característica importante: os seus contrastes não misturam os efeitos principais com interações de dois fatores, e sim com interações de três fatores, que em princípio devem ser menos significativas, e por isso desprezível (BOX et al. 1978).

A partir da técnica de planejamento de experimentos foi possível avaliar a influência dos parâmetros mais significativos no rendimento da transesterificação do resíduo gorduroso com etanol utilizando a preparação comercial de lipase imobilizada em PHB. Foi determinada a influência da temperatura (X_1) e da razão molar entre óleo e etanol (X_2) no rendimento de formação do éster etílico e na viscosidade (variável resposta). A massa de lipase imobilizada manteve-se fixa no experimento (2 g), bem como, a agitação (200 rpm). Para estimativa do erro experimental foram realizados ensaios adicionais no ponto central (3 repetições).

Na Tabela 11 são apresentados o rendimento em éster etílico e a viscosidade para as diversas condições testadas num período de 15h de reação. Inicialmente, o resíduo gorduroso bruto apresentou um valor médio de viscosidade 23,49 Cp.

Tabela 11 - Matriz padrão para o experimento de síntese de biodiesel pela lipase imobilizada em PHB.

Ensaio	Razão Molar	Temperatura (°C)	Viscosidade (Cp)	Ésteres (%)
1	1:4,7	34	6,83	67,9
2	1:13,3	34	4,71	61,0
3	1:4,7	56	8,09	53,9
4	1:13,3	56	8,29	55,8
5	1:3	45	3,82	67,1
6	1:15	45	8,44	57,0
7	1:9	30	7,47	61,8
8	1:9	60	10,85	47,6
9	1:9	45	7,08	63,9
10	1:9	45	6,53	63,5
11	1:9	45	6,53	59,3

Nota: Volume de substrato 20 mL; 15 horas de reação. Lipase imobilizada 30 mg/g de suporte seco.

Fonte: Do autor

Os resultados obtidos indicaram que a lipase AK foi capaz de converter os triglicerídeos presentes no resíduo gorduroso em todas as condições avaliadas pelo planejamento. As porcentagens de ésteres etílicos formados variaram de 47% a 68% após 15h de reação. A maior porcentagem de ésteres (67,9%) foi observada para a reação realizada nas

condições do ensaio 1 (razão molar óleo:etanol de 1:4,7 e temperatura de 34 °C). Pode-se afirmar que para esta condição, a razão molar no meio reacional aliado à temperatura de 34°C favoreceu a maior liberação de ésteres. Uma possível explicação para este resultado é de que à temperatura de 34°C a enzima imobilizada em PHB é mais ativa do que a 56 °C. Verificou-se que no ensaio 8, no qual foi utilizado a maior temperatura (60°C), foi obtido o menor valor de porcentagem de ésteres (47,6 %). A enzima também apresentou uma boa resistência ao etanol, isto pode ser observado nos ensaios do ponto central, no qual a razão molar era de 1:9, sendo observados bons resultados de porcentagem de ésteres (63,9; 63,5; 59,3%). Observou-se que para a condição do nível +1,41 (ensaio 6), no qual foi utilizada a maior razão molar (1:15) a porcentagem de ésteres obtida foi de 57%, comprovando dessa forma, que a influência da temperatura foi superior a da razão molar para as condições analisadas pelo planejamento fatorial.

O segundo maior valor de porcentagem de ésteres foi observado para o ensaio 5, no qual foi utilizado a razão estequiométrica entre o óleo e o álcool, mas o ensaio ocorreu na temperatura de máxima atividade da enzima imobilizada (45°C), reafirmando mais uma vez de que a temperatura foi a variável que apresentou maior influência para as os ensaios realizados.

A viscosidade variou de 10,85 a 3,82 Cp. Ressalta-se que a viscosidade do resíduo gorduroso inicial na forma bruta era de 23,49 Cp indicando que houve formação de biodiesel em todos os ensaios analisados.

No planejamento foram considerados estatisticamente significativos os termos em que $p < 0,05$, ou seja, a 5% de significância. Na Tabela 12 é possível observar que o termo linear da razão molar e os termos linear e quadrático da temperatura foram estatisticamente significativos. Desta forma os termos não estatisticamente significativos foram retirados do modelo e adicionados aos erros, gerando a Tabela 13.

Tabela 12 - Coeficientes de regressão para a porcentagem de conversão de ésteres.

	Coef. de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim.de Conf. 95%
Média	62,23	1,35	46,29	0,000000	58,78	65,68
(x ₁) razão molar(L)	-2,41	0,82	-2,93	0,032707	-4,53	-0,29
razão molar(Q)	0,23	0,98	0,23	0,825914	-2,29	2,75
(x ₂) temperatura(L)	-4,91	0,82	-5,97	0,001896	-7,03	-2,80
Temperatura (Q)	-3,45	0,98	-3,52	0,016940	-5,97	-0,93
1L by 2L	2,20	1,16	1,89	0,117409	-0,79	5,19

Fonte: Do autor

Tabela 13 - Coeficientes de regressão estatisticamente significativos para a porcentagem de conversão de ésteres.

	Coef. de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. 95%
Média	62,44	1,09	57,52	0,000000	59,88	65,01
(x ₁) razão molar (L)	-2,41	0,91	-2,64	0,033526	-4,57	-0,25
(x ₂) temperatura (L)	-4,91	0,91	-5,37	0,001038	-7,07	-2,75
Temperatura (Q)	-3,51	1,04	-3,38	0,011741	-5,97	-1,06

Fonte: Do autor

A ANOVA (Tabela 14) para os termos estaticamente significativos apresentou uma boa porcentagem de variação ($R^2 = 87\%$) explicada pelo modelo. O valor obtido de 15,76 para o F_{calc} foi significativo, sendo possível a construção da superfície de resposta para a análise dos resultados por superfície (Figura 10). O modelo, somente para os parâmetros significativos, com as variáveis codificadas para a porcentagem de ésteres formados em função da razão molar e da temperatura para a faixa estudada está representado pela Equação abaixo.

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para a porcentagem de ésteres em função da razão molar e da temperatura.

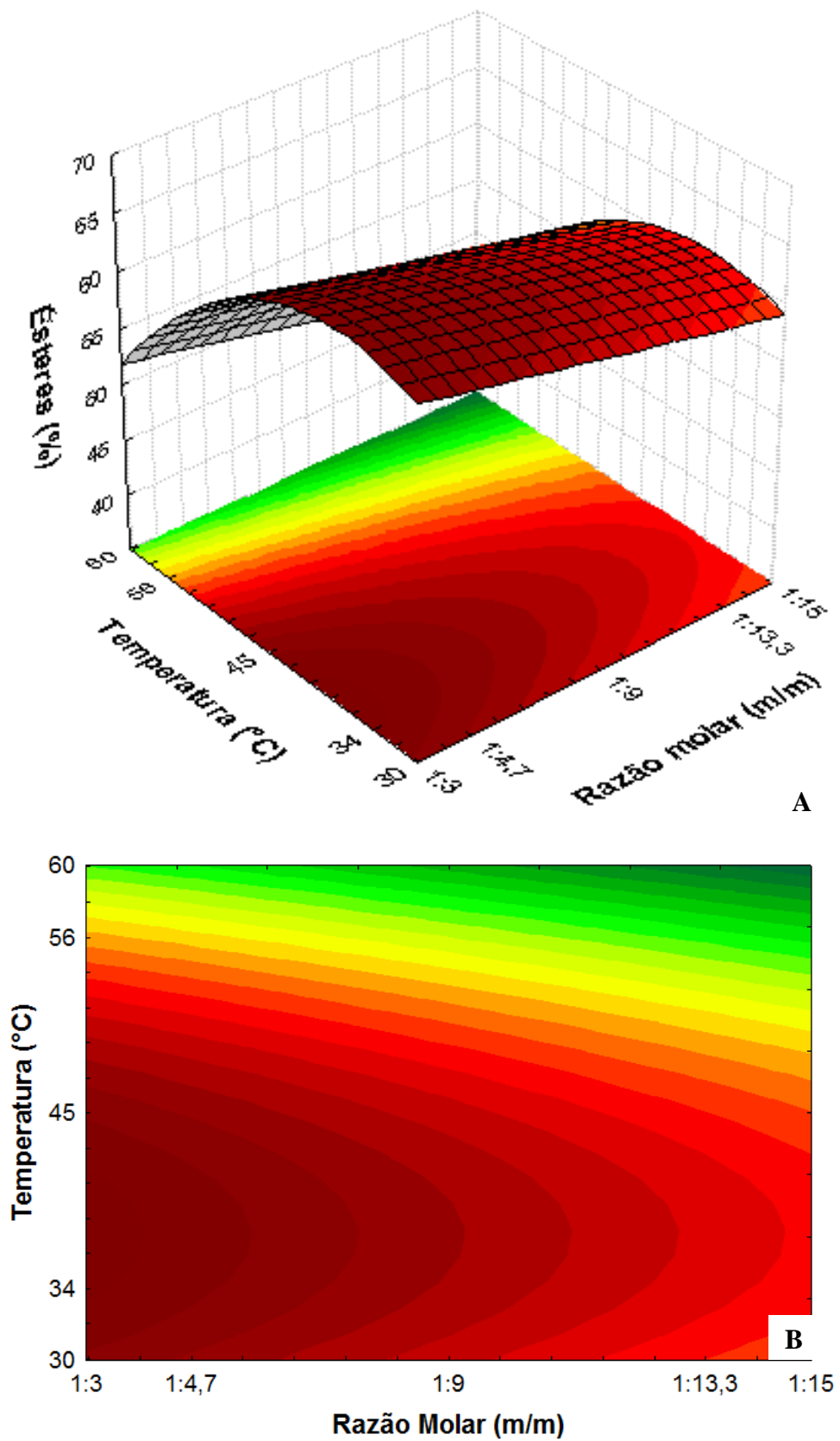
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F_{Calc}	p-valor
Regressão	315,7291	3	105,24	15,76	0,001702
Resíduos	46,76	7	6,68		
Falta de Ajuste	33,77				
Erro Puro	12,99				
Total	362,4891	10			

Nota: % variação explicada (R^2) = 87,1%; $F_{3;7;0,05} = 4,347$

Fonte: Do autor

$$\% \text{ de Ésteres} = 62,44 - 2,41 x_1 - 4,91 x_2 - 3,51 x_2^2$$

Figura 10 - Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para % de ésteres em função da razão molar (m/m) e da temperatura (°C).



Fonte: Do autor

Observando a superfície de reposta e a curva de contorno geradas pelo modelo é possível afirmar que é esperada uma elevada conversão de ésteres para toda a faixa de razão molar estudada e para valores inferiores ao nível +1 (56°C) da temperatura.

Com relação à temperatura, os dados obtidos neste planejamento confirmaram os resultados referentes à influência da temperatura na atividade da lipase imobilizada. Desta forma, o progresso da transesterificação catalisada por lipase imobilizada em PHB dependeu principalmente da temperatura, porém também foi influenciada pela razão molar em menor escala.

Esses resultados sugerem que a preparação de lipase imobilizada, não perde sua atividade frente a elevadas concentrações de álcool etílico, ao contrário de outras preparações, esta não sofreu uma influência tão marcante da razão molar entre os materiais de partida na formação do produto (ensaios 3, 4 e 6) (CASTRO et al., 2004), uma vez que somente para os níveis mais elevados de razão molar (+1,41) é que a reação foi levemente desfavorecida.

Em relação à viscosidade, não foram observadas variáveis significativas a 5% de significância. Porém, a 10% de significância o termo linear da temperatura foi significativo (Tabela 15).

Tabela 15 - Coeficientes de regressão tendo a viscosidade como resposta.

	Coef. de Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim.de Conf. 95%
Média	6,71	0,82	8,2	0,000435	5,07	8,36
(x ₁) razão molar(L)	0,58	0,50	1,15	0,301301	-0,43	1,59
razão molar(Q)	-0,46	0,60	-0,77	0,476791	-1,70	0,74
(x ₂) temperatura (L)	1,20	0,50	2,40	0,061419	-0,19	2,21
temperatura (Q)	1,06	0,60	1,77	0,136153	-0,14	2,26
1L by 2L	0,59	0,71	0,82	0,449816	-0,85	2,01

Fonte: Do autor

O valor de R^2 ficou em 71,82% quando foram utilizadas todas as variáveis a 10% de significância, o que significa que o modelo gerado não se ajustou bem aos dados experimentais e que não é aconselhável a construção da superfície de resposta para a análise dos dados experimentais.

Apesar de não ter sido feita a análise de superfície, pôde-se obter bons valores de viscosidade quando comparado à viscosidade do óleo inicial. Além disso, esses ensaios foram importantes para avaliar a interação entre as variáveis, visto que tais interações não poderiam ser previstas de outra maneira. Sendo assim, pôde-se concluir que para a viscosidade a temperatura também foi a variável mais importante, pois foi para o ensaio no

qual foi utilizada a maior temperatura (ensaio 8, 60°C) em que foi observado o maior valor de viscosidade (10,85 Cp). Pode-se afirmar que a menor conversão em ésteres levou a um maior valor de viscosidade da amostra, e que isto foi consequência de uma menor atividade da enzima imobilizada frente à temperatura de 60°C durante a reação de transesterificação.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O objetivo principal deste trabalho foi o de produzir biodiesel usando resíduos gordurosos via catálise enzimática, sendo que os resultados obtidos foram promissores e nesse conjunto de dados, podem ser destacados que:

- a) De uma maneira geral a matéria-prima testada atendeu o grau de pureza requerido para ser utilizada na reação de transesterificação, apresentando índices de acidez e peróxido dentro dos padrões;
- b) A imobilização por adsorção física da lipase AK com PHB apresentou um rendimento em imobilização bastante satisfatório;
- c) O melhor carregamento de proteína no derivado imobilizado foi de 30 mg de lipase AK a cada grama de PHB, apresentando uma atividade catalítica de 413 U/g;
- d) A melhor expressão em atividade relativa da lipase livre e imobilizada em termos de pH foi em 8,0, enquanto que a atividade relativa ótima na temperatura foi de 40°C para lipase imobilizada e 50° com a lipase livre;
- e) O desempenho do catalisador bioquímico foi eficiente para a matéria-prima testada fornecendo rendimentos de transesterificação superiores a 50%. Nas condições testadas, o resíduo gorduroso foi à matéria-prima escolhida para produção de biodiesel, alcançando conversões máximas de 75% num período de 48h;
- f) Na otimização da reação de transesterificação na produção de biodiesel por via enzimática, foi verificado a influencia das variáveis: temperatura e razão molar óleo-etanol num período de 15h atingiu 68% de conversão em ésteres etílicos e uma redução na viscosidade de 83,73%;
- g) O conjunto de dados obtidos sugere que a formação de ésteres etílicos a partir do resíduo gorduroso é viável para o catalisador testado. O biocatalisador atuou de forma eficiente convertendo os ácidos graxos presentes na matéria-prima lipídica nos ésteres etílicos correspondentes. Entretanto, a qualidade da matéria-prima lipídica está diretamente relacionada com a ação desses catalisadores.

Para dar continuidade e complementar os estudos de síntese de biodiesel por catálise heterogênea recomendam-se as seguintes etapas:

- a) Novas análises físico-químicas de resíduos gordurosos, bem como revisão das análises já descritas, a fim de que se tenha uma caracterização geral desta potencial matéria prima, podendo ser possível sugerir um sistema de classificação para a produção de biodiesel;
- b) Detalhamento das características físicas e ou químicas das matérias primas utilizadas na imobilização de Lipase em Polihidroxibutirato (PHB), por adsorção física, a fim de que se tenha a metodologia otimizada, com faces na difusão de um protocolo, que seja no mínimo difundido no meio técnico-científico;
- c) Como forma de melhor caracterizar os dados experimentais obtidos, referente ao rendimento por percentual de ésteres formados, considera-se necessário à complementação deste estudo pelo acompanhamento da cinética de reação nas diferentes condições estudadas;
- d) Desenvolvimento de metodologias capazes de qualificar e quantificar a prática do reuso de enzimas imobilizadas, em especial no método de imobilização de lipase AK em Polihidroxibutirato (PHB) por adsorção.

REFERÊNCIAS

ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U. T.; BEDNARSKI W. The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. **Review Article**. Eur. J. Lipid Sci. Technol, v.111, p. 800 – 813, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. **Biodiesel – Introdução**. 2011. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 16 11 12.

AOCS. (**Ca 5a-40**): American Oil Chemists' Society. 5 ed., USA, 1998.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: American Oil Chemists' Society, USA, 2004.

ARRUDA BOTELHO, C. A. V. de. **Viabilidade Técnica e Aspectos Ambientais do Biodiesel Etílico de Óleos Residuais de Fritura**. 2012. 121 f. Tese (Mestrado em Energia) – EP / FEA / IEE / IF da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2012.

BARON, A. M. **Preparação e Caracterização de Lipases Imobilizadas para a Utilização em Biocatálise**. 2008. 138f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2008.

BARROS, A., A., C.; WUST, E.; MEIER, H. F.; Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos. **Eng. Sanit. Ambient.** vol.13, n. 3, p. 255-262, Rio de Janeiro. July/Sept. 2008.

BENEVIDES, M. de S. L.; **Estudo sobre a Produção de Biodiesel a partir das Oleaginosas e Análise de Modelos Cinéticos do Processo de Transesterificação via Catálise Homogênea**, 2011. 75f. Tese (TCC Bacharel em Ciência e Tecnologia), Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Angicos. 2011. Disponível em: <<http://www2.ufersa.edu.br/portal/view/uploads/setores/232/arquivos/Mar%C3%ADlia%20de%20S%C3%A1%20Leit%C3%A3o%20Benevides.pdf>>. Acesso em: 11 06 14.

BEZERRA, P. H. A.; HIRATA, D.B.; PEREIRA, E.B. Aplicação de lipase AK comercial de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte PHB na síntese de bioaromas. **Anais SIC 2013 UNIFAL**, Alfenas, 2013. Disponível em: <<http://www.unifal-mg.edu.br/prppg/trabalhosSIC2013>>. Acesso em: 28 04 14.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; WUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: An Introduction to Designs, Data analysis and Model Building**. New York:Wiley, 1978.

BRASIL. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP nº 14 de 11 de maio de 2012. Especificação do Biodiesel contida no Regulamento Técnico ANP nº 4/2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, seção 1, 18 maio. 2012.

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 482 de 23 de setembro de 1999. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Poder Executivo, 13 outubro. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº. 49, de 22 de dezembro de 2006. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Óleos Vegetais Refinados; a Amostragem; os Procedimentos Complementares; e o Roteiro de Classificação de Óleos Vegetais Refinados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, seção 1, 26 dez. 2006.

BRASIL . União. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, p. 195, 14 jan. 2005.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, 1976.

BULE, M. J. G. M.; **Produção de biodiesel por catálise enzimática, em sistemas descontínuo e contínuo, a partir de óleo de cardo**. 2014. 91f. Tese (Mestrado em Eng. Alimentar). Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa, Portugal, 2014. Disponível em: <<https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/6804>>. Acesso em 12 06 14.

CARRAMENHA, F. **Estudo da viabilidade técnica e econômica da produção de biodiesel em escala industrial no Brasil**. 2007. 386f. Tese (Mestrado Processos Indústrias), Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, São Paulo, 2007.

CARTONI, C. R. **Avaliação de catalisadores alcalinos na produção de biodiesel metílico derivado do óleo de soja: análise técnica, econômica e ambiental**. 2009. 83 f. Tese (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

CASTRO, H. F. de; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.

CASTRO, H. F. de; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. dos; AGUIAR, C. L. de. Modificação de óleos e Gorduras por Biotransformação. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27., n. 1, p. 146-156, Jan/Feb. 2004.

CHRISTOFF, P.; **Produção de biodiesel a partir do óleo residual de fritura comercial estudo de caso: Guaratuba, litoral paranaense**. 2007. 82f. Tese (Mestrado em Desenvolvimento de Tecnologia) – Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento – LACTEC, Curitiba, 2007.

COSTA, B. J.; DE OLIVEIRA, S. M. M. **Dossiê Técnico - Produção de biodiesel**. Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar. Curitiba, 2006.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de Biocombustível Alternativo ao Óleo Diesel através da Transesterificação de Óleo de Soja usado em Frituras. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 23, p. 531-537, 2000.

DABAJA, M. Z.; HIRATA, D.B.; PEREIRA, E.B. Imobilização da lipase AK em PHB e sua aplicação na reação de transesterificação de óleo de açaí. Anais SIC 2013 UNIFAL, Alfenas, 2013. Disponível em: <<http://www.unifal-mg.edu.br/prppg/trabalhosSIC2013>>. Acesso em 28 04 14.

DA CUNHA, M. E.; KRAUSE, L. C.; MORAES M. S. A.; FACCINI, C. S.; JACQUES, R. A.; ALMEIDA S. R.; et al.. Beef tallow biodiesel produced in a pilot scale. **Fuel Process Technology**, USA, v. 90, p. 570–575, 2009.

DANTAS, M. B.; **Obtenção, Caracterização e Estudo Termoanalítico de Biodiesel de Milho (Zea mays L.)**. 2006. 114f. Tese (Mestrado Química), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

DA SILVA, A. E. **Estudo do Processo Enzimático de Produção de Biodiesel a Partir de Óleos e Gorduras Residuais de Fritura**. 2010. 62 f. Tese (mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2010.

DELATORRE, A. B., RODRIGUES, P. M.; AGUIAR, C. DE J.; ANDRADE, V. V. V.; ARÊDES A.; PEREZ, V. H. Produção de Biodiesel: Considerações sobre as Diferentes Matérias Primas e Rotas Tecnológicas de Processos. **Perspectivas online Ciências Biológicas e da Saúde**. Rio de Janeiro, V 01, nº 01, p. 21-47, 2011.

DIZGE, N.; KESKINLER, B.; TANRISEVEN, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, USA, v. 44, p. 220–225, 2009.

DORS, G. **Etanolise Enzimática do óleo de Palma Visando a Produção de Biodiesel em Sistema Contínuo**. 2011. 197f. Tese (Doutorado Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2011.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (BRASIL) - EPE. **Balço Energético Nacional 2013: Ano base 2012 – Relatório Final**. Empresa de Pesquisa Energética. Rio de Janeiro, 2013.

FACCIO, C. **Estudo da Produção de Ésteres Etílicos a partir da Alcoólise de Óleos Vegetais**. 2004. 86f. Tese (Mestrado Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 2004.

FARIA, E. A.; LELES, M. I. G.; IONASHIRO, M.; ZUPPA, T. O.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Thermal stability of vegetal oils and fats by TG/DTG and DTA. **Encicl. Química**, São Paulo, v.27, 2002.

FU, B. Y.; VASUDEVAN, P. T. Effect of Organic Solvents on Enzyme-Catalyzed Synthesis of Biodiesel. **Energy & Fuels**, USA, v. 23, n. 8, p. 4105-4111, 2009.

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

GEORGOGIANNI, K. G.; KATSOULIDIS, A. K.; POMONIS, P. J.; MANOS, G.; KONTOMINAS, M. G. Transesterification of rapeseed oil for the production of biodiesel using homogeneous and heterogeneous catalysis. **Fuel Processing Technology**, USA, v. 90, n. 7-8, p. 1016-1022, 2009.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Ed. Totowa: Humana Press, v. 22, NJ. 2006.

HA, S.H., LAN, M.N., LEE, S.H., HWANG, S.M., KOO, Y. M. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**. USA. V. 41, p. 480–483, 2007.

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3 ed. São Paulo :Instituto Adolfo Lutz,.v.1, 533 p, São Paulo 1985.

ITOYAMA, K.; TOKURA, S. e HAYASHI, T. Lipoprotein lipase immobilization onto porouschitosan beads. **Biotechnology Progress**, v. 10, p 225 – 229. 1994

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

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

KRAUSE, L. C. **Desenvolvimento do processo de produção de biodiesel de origem animal**. 2008. 130 f. Tese (Doutor em Química) - Departamento do Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

KNOTHE, G. Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? **Journal of the American Oil Chemists' Society**, USA, v.79, p. 847-854, 2002.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de Biodiesel**, 1a. ed., Edgard Blücher: São Paulo, 2006.

LARA PIZARRO, A. V.; PARK, E. Y. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, USA, v. 38, p. 1077–1082, 2003.

LECA, M.; TCACENCO, L.; MICUTZ, M.; STAICU, T. Optimization of biodiesel production by transesterification of vegetable oils using lipases. **Romanian Biotechnological Letters**, Romênia, v. 15, n. 5, 2010.

LEE, K.T.; FOGLIA, T.; CHANG K.S. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. **Journal of the American Chemists' Society**, USA, v. 79, p. 191–195, 2002.

LEIRAS, A. **A cadeia produtiva do biodiesel: uma avaliação econômica para o caso da Bahia**. 2006. 156f. Tese (Mestrado em Engenharia Industrial) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2006.

LIMA, P. C. R. **O Biodiesel e a Inclusão Social**. Câmara dos Deputados Praça 3 Poderes Consultoria Legislativa. Brasília, DF, 2004. Disponível em: <http://apache.camara.gov.br/portal/arquivos/Camara/internet/publicacoes/estnottec/pdf/2004_676_Estudo.pdf>. Acesso em: 16 11 12.

LOFRANO, R. C. Z. Uma revisão sobre biodiesel. **Pensamento Plural: Rev. Científ. do. São João da Boa Vista**, v. 2, n. 2, p. 82-88, 2008.

LV, P.; WANG, X.; YUAN, Z.; TAN, T. Conversion of soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida* lipase on textile cloth. **Energy Source**, USA, parte A, v. 30, p. 872–879, 2008.

MACEDO, G. A.; MACEDO J. A. Produção de Biodiesel por Transesterificação de Óleos Vegetais. **Biotecnologia Ciencia & Desenvolvimento**, São Paulo, n.32, p. 38 - 46, 2004.

MARCELLINO, C. E. H. **Estudo comparativo de obtenção de biodiesel utilizando C catalisadores homogêneos**. 2007. 58 f. Tese (TCC Graduação em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MARTINS, D. J. M.; **Biodiesel, a alternativa Energética Brasileira para o Setor de Transportes Públicos e de Cargas**. 2006. 11 f. Resenha Técnica COOPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <<http://waste.com.br/textos/Biodiesel-Deraldo.pdf>>. Acesso em: 16 11 12.

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

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009 194 f., Tese (Doutorado Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MIN, E.; ZHANG, L.; **Development of biodiesel industrial chain**. Beijing: China Petrochemical Press; China, 2006.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. Varela, São Paulo, 1998.

NGO, H. L. N.; ZAFIROPOULOS, N. A.; FOGLIA, T. A.; SAMULSKI E.T.; LIN W. Efficient two-step synthesis of biodiesel from greases. **Energy Fuel**, USA, v. 22, p.626–634, 2008.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 8, p. 692-700, 2008.

OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; DALLAROSA. C.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; MENONCIN S.; AMROGINSKI, C.; OLIVEIRA, J.V. Optimization of Enzymatic Production of Biodiesel from Castor Oil in Organic Solvent Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, USA, v.113-116, p. 771-780, 2004.

OLIVEIRA, J. P. **Estudo da Geração de Biodiesel a partir de Resíduos Oleosos do Saneamento Ambiental**. 2012. 91f. Tese (Mestre Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012. Acesso em 14 de agosto de 2013, disponível em: <http://www.ct.ufes.br/ppgea/files/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Jairo_Oliveira.pdf>.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S., SOCCOL, C. R., NIGAN, P., KRIEGER, N. and SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, USA, v. 29, p. 119–131, 1999.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetal: propriedades e aplicações industriais. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PARENTE, E. J. S.; **Biodiesel – Uma aventura tecnológica num país engraçado**, 1ª edição, Tecbio. Fortaleza, 2003.

PEREIRA, E. B. **Lipase Livre e Imobilizada em Quitosana: Caracterização e Potencial de Aplicação em Reações de Hidrólise e Síntese**. 1999. 128 f. Tese (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Maringá. Maringá. 1999.

PEREIRA, E.B.; MORAES, F. F.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M. Kinetic studies of Lipase from *Candida rugosa*: A Comparative study of the free and the immobilized enzyme on porous chitosan beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91/93. P. 739-752. 2001.

POUSA, G. P.; **Avaliação do desempenho de óxidos metálicos em reações de esterificação de ácidos graxos obtidos a partir de óleo de soja para produção de biodiesel**, 55p. Brasília, DF. 2007.

RODRIGUES, R. C.; **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. 2009.** 177f. Tese (Doutor Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em:
<<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/15447/000681060.pdf?sequence=1>>. Acesso em 14 08 13.

SAWIN, J. L.; Mainstreaming renewable energy in the 21st century, **Worldwatch Paper 169: Worldwatch Institute**, p. 7-37, 2004. Disponível em:
<<http://books.google.com.br/books?id=RDypMDiConIC&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em 16 11 12.

SAXENA, R. K.; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S.; BRADDOO, S.; GULATI, R. Microbial Lipases: Potential Biocatalyst for the Future Industry. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 101-115, 1999.

SCAMILHE, E. de P.; SMITH, L. P.; RÓS, P. M. da; PEREIRA, E.B. Análise de Rendimento dos Óleos de Café e de Soja na Produção de Biodiesel via Rota Enzimática. **Resumo. ENZITEC 2012 – Xth Brazilian Seminar on Enzyme Technology – 7th –10th of October, 2012**, Blumenau, SC, 2012. Disponível em:
<http://www.furb.br/enzitec/2012/_app/_FILE_RESUMO_CD/90.pdf>. Acesso em 06 06 14.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. A indústria Petroquímica no Próximo Século: Como Substituir o Petróleo como Matéria Prima? **Quím. Nova**, São Paulo v. 24, nº 2, p. 247-251, 2001.

SETTE DE ABRIL, P. A. **Transesterificação enzimática de óleo de soja por lipase presente no concentrado bruto do fungo Colletotrichum gloeosporioides: Uma abordagem alternativa ao uso de lipases comerciais.** 2012. 99f. Tese (Mestrado em Química). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2012

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

SILVA, C.; WESCHENFELDER, T. A.; ROVANI, S.; CORAZZA, F. C.; CORAZZA M. L.; DARIVA, C. et al. Continuous production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed ethanol. **Industrial Engineering Chemistry Research**, USA, v. 46, p.5304–5309, 2007.

SILVA, A.E. **Estudo do Processo Enzimático de Produção de Biodiesel a partir de Óleos e Gorduras Residuais de Fritura.**2010. 62f. Tese (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Alagoas. Maceió. 2010.

SILVA, G. DOS S.; INOUE, D. Y.; DORS, G.; FURIGO JR., A. e CASTRO, H. F. Desempenho de diferentes lipases imobilizadas na síntese de biodiesel de óleo de palma. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 2, p. 197-203, Maringá. 2011.

SIM J. H.; HARUN K. A.; BHATIA S. Effect of mass transfer and enzyme loading on the biodiesel yield and reaction rate in the enzymatic transesterification of crude palm oil. **Energy Fuel**. USA, v. 23; p. 4651–4658; 2009.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, USA, v. 77-9, p. 745-757, 1999.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 8 Edição, LTC: São Paulo 2006.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T.; Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme Microbial Technology**, USA, v. 33, p. 97-103, 2003.

SOUZA, C. A. de. Sistemas catalíticos na produção de biodiesel por meio de óleo residual. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 6., Campinas, 2006. Disponível em: <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC000000022006000200040&lng=en&nrm=abn>. Acesso em: 16 11 12.

SOUZA, M. A. **Desemulsificação e Purificação de Resíduos Gordurosos provenientes de esgotos domésticos**. 2003. 156f. Tese (Mestrado Engenharia Ambiental) – Universidade Regional de Blumenau. Blumenau. 2003.

SOUZA, M. A. **Conversão de Resíduos Gordurosos de Frituras com a Produção de Biodiesel por Rota Catalítica Heterogênea**. 2010. 178f. Tese (Doutorado Engenharia Ambiental) Universidade Federal de Santa Catarina; Santa Catarina. 2010.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Quím. Nova**, vol.32, n.3, p. 768-775, São Paulo, 2009.

TALUKDER M. M. R.; PUAH S.M.; WU J.C.; WON C.J.; CHOW Y. Lipase catalyzed methanolysis of palm oil in presence and absence of organic solvent for production of biodiesel. **Biocatalysis and Biotransformation**, USA, v. 24, p. 257–262, 2006.

TAMALAMPUDI, S.; TALUKDER M.R.; HAMA S., NUMATA T.; KONDO A.; FUKUDA H. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: a comparative study of immobilized whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochemical Engennier Journal**. USA, v. 39, p. 185–189, 2008.

TIANWEI, T.; JIKE, L.; KAILI, N.; LI D.; FANG W.; Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, USA, v. 28, p. 628–634; 2010.

TYSON, K. S; **Biodiesel Technology and Feedstocks**. National Renewable Energy Laboratory. Biodiesel for New England Eastern Connecticut State Univ. USA. 2003. Disponível em: <http://nutmeg.easternct.edu/sustainenergy/energy_solutions/biodiesel_technology_n_feedstocs.pdf>. Acesso em: 14 06 14.

VASCONCELOS, L. G. de; **Produção e Biodiesel em Meio Ácido induzido por Microondas (2,45 GHz) em reator de escala piloto**. 2011. 173f. Tese (Mestre Engenharia Química) Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

VEIGA FILHO, A. A. Novo ciclo do Proálcool: Problemas derivados do aumento da produção do etanol. **Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**. 2008.

VILLENEUVE, P. et al.. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9 n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WU, Q.; CHEN, H.; HAN M.; WANG D.; WANG J. Transesterification of cottonseed oil catalyzed by Bronsted acidic ionic liquids. **Industrial Engeneering Chemitry Ressearch.**, USA, v. 46, p. 7955–7960, 2007.

WUST, E. **Estudo da Viabilidade Técnico-científica da Produção de Biodiesel a Partir de Resíduos Gordurosos**. 2004. 101f. Tese (Mestrado Engenharia Ambiental). Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2004.

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

ZANIN, G. M. **Sacarificação do amido em reator de leito fluidizado com enzima Amiloglicosidase imobilizada**. 1989. 78f. Tese (Doutorado Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1989.

ZANIN, G. M. e MORAES, F. F. **Enzimas Imobilizadas. In: Said, S., Pietro, R. C. L.. (Org.). Enzimas como Agentes Biotecnológicos.** 1a ed. Ribeirão Preto: Legis Summa Ltda, v.01, p. 35-85. 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Determinação do Teor de Proteína

O conteúdo de proteína da lipase solúvel foi determinado pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o reagente de brilhante de Comassie. Albumina bovina cristalina (BSA) foi usada para preparar a curva de calibração na faixa de 0 a 0,5 mg/mL.

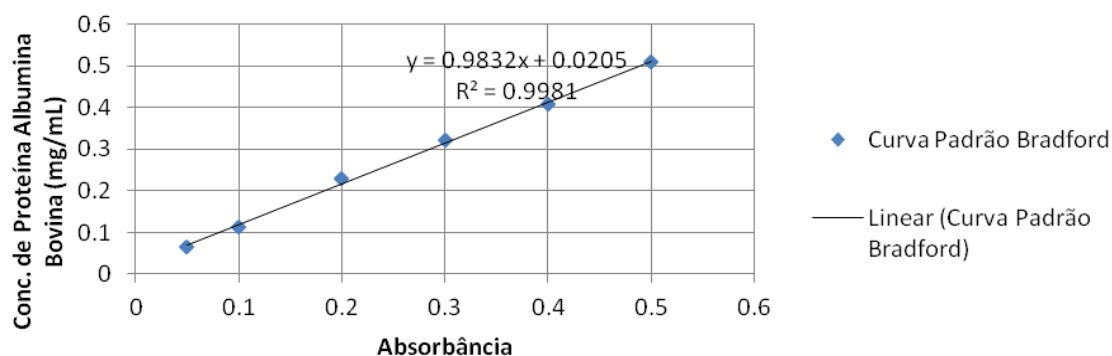
Na figura 11 apresenta-se dados analisados para obtenção da curva padrão da determinação de proteína pelo Método de Bradford (1976), empregando-se como padrão a BSA, mostrado na Tabela 16

Tabela 16 - Leituras de Absorbância em diferentes concentrações de Albumina Bovina.

Eppendorf	[Proteína] (mg/mL)	Leitura Média de Absorbância
1	0,05	0,066
2	0,1	0,112
3	0,2	0,229
4	0,3	0,322
5	0,4	0,409
6	0,5	0,509

Fonte: Do autor

Figura 11 - Curva padrão de Bradford para Proteína



Fonte : Do autor