



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química

**“Síntese de ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de mamona
e soja utilizando a lipase imobilizada de *Thermomyces
lanuginosus* (LIPOZYME TL IM)”**

Márcia Alexandra Rampin

Dissertação apresentada a Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como
parte das exigências para a obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área: Química

Ribeirão Preto – SP

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química

**“Síntese de ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de mamona
e soja utilizando a lipase imobilizada de *Thermomyces
lanuginosus* (LIPOZYME TL IM)”**

Márcia Alexandra Rampin
(Dissertação de Mestrado)

Orientador: Prof. Dr. Miguel Joaquim Dabdoub

Dissertação apresentada a Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como
parte das exigências para a obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área: Química

Ribeirão Preto – SP

2007

“E aqui estamos nós, abrindo portas com as perguntas que geraram as nossas chaves.”

(Ruben Alves)

Fernando Lucas Primo

*Obrigada pelo amor, carinho e enorme paciência.
Você sempre esteve presente, me apoiando e abrindo
caminhos para que eu pudesse percorrê-los suavemente.*

***Mãe, Marco , Ana Paula, Luísa,
César, Vânia, Brenda, Luiz Fernando, Lindaura e Alberto Rampin:***

O amor incondicional e desprendido é tudo que alguém pode querer pra si e desejar ao outro. É tão leve de se sentir , mas tão forte que ninguém, nem o tempo e nem a distancia conseguem apagar. Muitas vezes não desejei que assim o fosse, mas busquei não contrariar a lei soberana. Hoje sei que muitas coisas só fazem sentido na vida depois de vividas e como sou grata pelo mundo dar tantas voltas.

Prof. Dr. Miguel Joaquim Dabdoub

*Pela oportunidade de trabalho em seu grupo de pesquisa,
pelos questionamentos, ensinamentos, pela amizade e
pela paciência, meus mais sinceros agradecimentos.*

AGRADECIMENTOS

A amiga Carolina Ramos Hurtado.

“Não existem palavras para lhe expressar o meu muito obrigada, minha amiga!”

Aos amigos e companheiros de laboratório Alexandre Wentz, Andressa Tironi Vieira, Antonio Carlos Ferreira Batista, Beny Francis Marques Cantele, Cássio Pedro da Silva, Daniel Armelin Bortoleto, Gabriela Ramos Hurtado, Juan Rota, Saulo Alexandre Petkevivius Gonçalves, Vânia M. B. Dabdoub, Vinicius Demacq Selani, Ana Flávia Martinez *pele exercício de nossa convivência diária* e em especial ao amigo Hugo Rodrigues de Souza que *contribuiu diretamente com sua valorosa amizade e dividiu comigo momentos de descoberta em nossa jornada no aprendizado da ciência.*

Aos amigos Janaína, Rose, Jorge, Neila, Santones, Ricardo, Fernanda, Luciana, Edna, Jennifer, pela paciência, convivência e amizade.

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, pelas valiosas sugestões, durante a correção deste trabalho.

A Cristina, ao Professor Norberto Peoporine Lopes, a Virgínia, ao Djalma e Mércia pelo apoio nas análises.

A Lâmia, ao Emerson, ao André, a Sonia, a Bel, a Inês e a Denise pelo suporte profissional e pela amizade.

Ao COSEAS e especialmente as amigas Cláudia e Márcia, pela bolsa moradia concedida durante parte do período de desenvolvimento deste trabalho científico.

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Sumário

Resumo

Abstract

1. Contexto e motivação.....	p. 1
2. Revisão Bibliográfica.....	p. 12
3. Objetivos.....	p. 91
4. Materiais e Métodos.....	p. 92
5. Resultados e Discussão.....	p. 137
6. Conclusões.....	p. 229
7. Referencias bibliográficas.....	p. 233
8. Anexos	

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada à FFCLRP-USP como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc)

“Síntese de ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de mamona e soja utilizando a lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* (LIPOZYME TL IM)”

MARCIA ALEXANDRA RAMPIN

Novembro /2007

Orientador: Prof. Dr. Miguel J. Dabdoub

Programa: Química

Com o objetivo de se estabelecer uma metodologia eficiente para obtenção de ésteres etílicos por transesterificação enzimática de óleos de soja e de mamona, utilizando um catalisador mais barato do que o anteriormente estudado em nosso grupo de pesquisa, Cândida Antarctica A (Novozym 435), é que a lipase 1,3- específica de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) foi escolhida. Foram realizadas várias reações para estudo das melhores condições reacionais tanto para o óleo de soja, quanto para o óleo de mamona. Nestes estudos foi observada a influencia dos efeitos do teor de etanol no meio reacional, da trituração da enzima imobilizada, da pré-incubação da enzima imobilizada, da concentração da enzima no meio reacional e da temperatura do meio reacional na alcóólise enzimática utilizando a lípase Lipozyme TL IM como catalisador.

A conversão dos materiais de partida a ésteres etílicos foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) aliada a quantificação através dos padrões de ricinoleato de etila e linoleato de etila através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Tendo sido estabelecidas as melhores condições para a conversão dos óleos de soja e mamona utilizando o catalisador enzimático em questão, foram realizadas novas reações de modo a otimizar as condições das reações através da utilização dos parâmetros estabelecidos, porém de forma conjunta. A observação destes últimos resultados apontou a presença de intermediários residuais não convertidos e, portanto para a necessidade de uma segunda etapa de reação posterior à reação com a Lipozyme TL IM. Nesta segunda etapa, optou-se por utilizar a lípase do tipo inespecífica, a Novozym 435, sendo que a mesma apresentou bons resultados na conversão em último

estágio reacional dos monoglicerídeos e diglicerídeos presentes no meio de forma residual.

Posteriormente, foram realizadas etapas de purificação dos produtos obtidos, bem como estudos de características físico-químicas tais como, viscosidade, densidade, índice de iodo e ponto de fulgor para os ésteres obtidos a partir dos óleos de soja e mamona em sua forma pura e em mistura entre os mesmos, para que fosse possível verificar sua adequação quanto às normas internacionais de qualidade para biocombustíveis, EN 14214 e ASTM D 6571.

Abstract of the Thesis presented to the FFCLRP-USP for the Master degree defense in Science (M.Sc)

“Synthesis of Ethyl esters from Castorbeans oils and Soybean oil employing the immobilized lipase *Thermomyces lanuginosus* (LIPOZYME TL IM) as a catalyst”

MARCIA ALEXANDRA RAMPIN

Novembro /2007

Advisor: Prof. Dr. Miguel J. Dabdoub

Program: Chemistry

The main objective of this work was to establish an efficient methodology for the production of ethyl esters by the enzymatic transesterification of soybean and castorbean oils, using a cheaper catalyst than those used previously in our research group, *Candida Antarctica A*. In this research we used a 1,3-non specific lipase, isolated from *Thermomices lanuginosus* commercially named Lipozyme TL IM. Several reactions were performed to determine the best reaction conditions for both, the castorbean and the soy-beans. In this study we analyzed the influence of different parameters for the transesterification to occur in an efficient way, like the ethanol ratio in the reaction media, the granulometry of the enzyme support, the temperature of the reaction medium, , the concentration of catalyst used (enzyme), specifically Lipozyme TL IM.

The starting material transformation to ethyl esters was qualitatively monitored using TLC (Thin Layer Chromatography), while the quantitative analysis was done using ethyl ricinoleate and ethyl linoleate as standard in High Performance Liquid Chromatography (HPLC). After the best reaction conditions were determined for both castor and soybean oil, using the enzymatic catalyst, it were performed new experiments in order to optimize the reaction conditions using the established individual parameters, however combining all it.

Even working with the combination of the best parameters, it was still observed the presence of residual intermediates such as mono and di-glicerides, that are not converted in just one step. Consequently, we decided to perform a second reaction step after the transformation with Lipozyme TL IM. In this second reaction, a non-specific enzyme, the Novozymes 435, was used showing good results in the further

transformation of mono- and di-glycerides that were present in residual amounts after the first reaction step.

Furtherly, the obtained products from castor and soybean were purified and their physico-chemical quality parameters like viscosity, density, iodine number and flash point were determined for their pure form and for the blend of both products (castor and soy biodiesel), in order to correct some of these quality parameters that are out of the international quality standard, EN 14214 and ASTM D 6751.

1. Contexto e motivação

O desenvolvimento sustentável tem se tornado dia após dia, uma ferramenta imprescindível na obtenção de recursos que possam suprir as necessidades do homem do século XXI (GRIMONI *et al*, 2004).

Nesta jornada que envolve interesses econômicos, sociais e políticos, também os químicos estão se deparando com a missão de desenvolver produtos que possam ser obtidos através de processos ambientalmente amigáveis, com o mínimo de consumo de energia, recicláveis ou obtidos a partir de materiais com este tipo de característica. Além disso, durante o tempo de vida destes novos produtos, os mesmos devem ser passíveis de utilização sem causar nenhum tipo de prejuízo humano ou poluição ao meio ambiente (METZGER, 2001).

Neste sentido, percebe-se que os químicos têm uma grande responsabilidade na manutenção do desenvolvimento sustentável, pelo desenvolvimento de produtos e processos que lancem mão da otimização de recursos a exemplo da utilização de materiais recicláveis, bem como de processos limpos, e que ainda, possam chegar ao seu destino final com características de um produto seguro e de custo acessível.

Devido ao fato do desenvolvimento humano em todas as suas formas, estar intimamente relacionado aos processos de produção e utilização de recursos energéticos, o biodiesel como fonte renovável, voltou a ser o foco das atenções dentre as opções de combustíveis renováveis líquidos, na última década.

O biodiesel, combustível líquido cuja produção é tema deste trabalho, como fonte de energia renovável é capaz de propiciar vantagens econômicas, sociais, políticas e ambientais intrínsecas a sua produção e utilização.

Estas vantagens vão desde a diminuição na importação de derivados de petróleo, geração de empregos e inclusão social de famílias pertencentes a regiões menos favorecidas sócio-economicamente, até a diminuição dos gases causadores do efeito estufa e chuva ácida, bem como, possibilidade de comercialização de créditos de carbono através do Fundo Protótipo de Carbono no Banco Mundial (HOLANDA, 2004).

Percebe-se que as vantagens da produção e utilização do biodiesel são inúmeras, entretanto, é necessário que o mesmo seja obtido através de processos de produção efetivos que permitam suprir a demanda vigente necessária a implantação deste biocombustível na matriz energética mundial e em especial na matriz energética brasileira.

1.1. Estatística das pesquisas em biodiesel referentes à última década

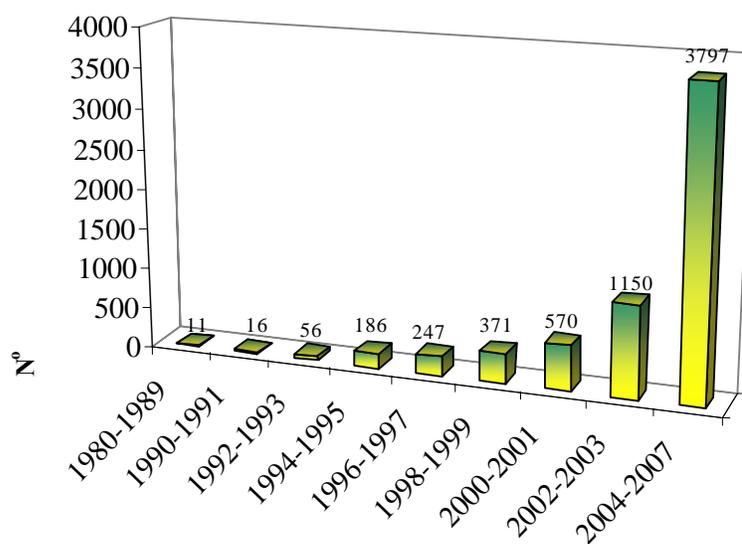
Na última década, o biodiesel como fonte renovável, voltou o foco das atenções para os combustíveis renováveis, resultando em uma explosão de estudos científicos e no aumento crescente do número de artigos publicados, com o objetivo de desenvolver novos métodos de produção bem como o de aperfeiçoamento de métodos analíticos existentes para monitoramento da qualidade do biocombustível produzido (KNOTHE, 2006).

É possível verificar que entre os anos de 1980 e 1989 apenas 11 artigos foram listados na procura pela palavra “biodiesel”, no tópico “qualquer parte do texto”, através do sistema de buscas avançadas do Google Acadêmico, cujo endereço eletrônico é <http://www.scholar.google.com>.

Já na pesquisa para os anos entre 2004 e 2007, este número passou para 3.797 (pesquisa realizada antes do término de 2007 – Junho). **(FIGURA 1)**

O site referido trata-se de uma poderosa ferramenta de pesquisa acadêmica da atualidade e os números indicados refletem uma grande corrida no campo científico em função da demanda produtiva.

Esta demanda é fruto da necessidade do desenvolvimento de novos produtos e processos ambientalmente corretos através do desenvolvimento sustentável.



Além disso, pelo fato de a energia, o desenvolvimento sustentável e meio ambiente estarem intimamente relacionados, o biodiesel oferece a vantagem de atuar como uma via dos Mecanismos de Desenvolvimentos Limpos (MDL) (GRIMONI, 2004).

Na pesquisa, mais intimamente, os conceitos de desenvolvimento e utilização de recursos e processos limpos e renováveis tem sido tratados com igual importância. Assim, no caso do biodiesel etílico obtido através de conversão total, ou seja, a partir de processo de produção eficiente e usando somente matérias primas 100% renováveis, tanto produto, quanto processo estarão de acordo com os “12 princípios da Química Verde” (DABDOUB, 2007).

O primeiro registro do que hoje conhecemos como biodiesel, trata-se de uma patente belga: 422,877 (BE422,877A), de 31 de Agosto de 1937. O seu autor, Charles Chavanne descreve nesta patente a utilização de óleo vegetal de palma e metanol (ou etanol) no emprego de reação de transesterificação utilizando ácido sulfúrico como catalisador na produção de ésteres metílicos (ou etílicos) a serem utilizados como combustíveis em motores diesel (CHAVANNE, 1937)

No tocante a necessidade de domínio do processo de produção do biodiesel e introdução do mesmo na economia global, sobrepõe-se a necessidade de diminuição da dependência de importação de petróleo como mecanismo de regulação da balança comercial bem como de substituição dos recursos fósseis, uma vez que estes devem se esgotar no futuro e sendo, portanto, capazes de explicar o aumento na busca de produtos que possam substituir sua utilização, e de conhecimento tecnológico que permita sua obtenção de forma viável.

1.2. LADETEL (Laboratório de Desenvolvimento de Tecnologias Limpas)

Com esta motivação, o presente projeto de pesquisa vem a compor o elenco de resultados contemplados no **PROJETO BIODIESELBRASIL**, que visa o desenvolvimento de pesquisas sobre fontes de energias alternativas viáveis para a matriz energética Brasileira, com destaque para a produção de biodiesel pela rota etílica e utilização da vasta gama de oleaginosas agricultáveis no país.

O presente projeto de pesquisa foi desenvolvido pelo LADETEL (Laboratório de Desenvolvimento de Tecnologias Limpas) e coordenado pelo Prof. Dr. Miguel Joaquim Dabdoub, atual Presidente da Câmara Setorial de Biocombustíveis do Estado de São Paulo e conta com o apoio de empresas da iniciativa privada, diretamente envolvidas em testes desenvolvidos pelo LADETEL na utilização de biodiesel tanto em sua forma pura quanto em misturas com diesel de petróleo, em veículos leves, de médio ou de grande porte, inclusive em tratores.

As pesquisas desenvolvidas pelo LADETEL englobam quatro programas de testes autorizados pela ANP (Agência Nacional do Petróleo) que visam a homologação do biodiesel no Brasil estando, portanto, contemplados no programa de testes oficiais do Governo Federal.

Estas empresas são representantes dos setores sucroalcooleiro, equipamentos, óleos vegetais, automobilístico, fabricantes de motores e de sistemas de injeção diesel, dentre outros que, no início do projeto se mantinham distantes por temerem que o biodiesel não fosse se consolidar no Brasil.

Diante das dificuldades o LADETEL, lutou junto ao Governo do Estado e ao Governo Federal para aprovação de um programa nacional de produção e utilização do biodiesel, de modo a atestar as vantagens e a qualidade do biocombustível produzido.

Hoje, o LADETEL coordena o maior programa de testes com biodiesel do mundo. São quatro programas de testes realizados oficialmente, ou seja, com a autorização da ANP (Agência Nacional do Petróleo) e contemplados dentro do programa oficial de biocombustíveis do governo federal.

O grupo francês PSA Peugeot – Citroen realizou durante aproximadamente dois anos e meio, experiências no uso da mistura B30 de soja (mistura de 30% em volume de biodiesel de soja no diesel de petróleo) em veículos de passeios com excelentes resultados. No dia 06 de outubro 2006, tendo em vista o sucesso obtido na primeira fase, iniciou-se uma segunda fase de testes onde foram incluídos seis veículos utilitários usando B30 de palma (Dendê), B30 de soja e também B30 de uma mistura de biodiesel de soja (22.5%) e mamona (7.5%) com diesel de petróleo. Nestes testes, participam também os fabricantes de sistemas de injeção Bosch e Delphi.

Um segundo teste de grande relevância desenvolvido pelo LADETEL, entre setembro de 2004 e dezembro de 2006, tratou-se da utilização de misturas B5 de soja e B5 de mamona alternativamente, em uma frota de 140 caminhões e 12 vans em da Companhia de Bebidas Ipiranga, representante da Coca-Cola em Ribeirão Preto- S.P. Estes veículos rodaram 7 milhões de quilômetros e consumiram 108 mil litros de biodiesel de soja e 3,7 mil litros de biodiesel de mamona, produzidos pelo Ladetel em Ribeirão Preto. Este trabalho está sendo responsável pela validação e homologação da mistura B5 de soja por parte do Governo Federal em conjunto com a indústria automobilística (ANFAVEA- Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotivos) . A ANFAVEA tem participado dos testes em forma mais expressiva através das indústrias Volkswagen, Fiat, Ford, Cummins e MWM – International, representando a parcela dos fabricantes de motores. Além disso, este mesmo teste conta com a participação da Bosch, fornecedor do sistemas de injeção. As empresas de filtros

Mahle, Mann e Fleetguard participaram através do fornecimento de seus filtros, bem como a Esso através do fornecimento de diesel e ainda a Exxon Mobil no fornecimento do óleo lubrificante.

Um terceiro teste concluído em novembro de 2006, trata-se da utilização de biodiesel também produzido pelo LADETEL, na frota off-road da maior mineração de ouro do Brasil, a Rio Paracatu Mineração (RPM). Neste caso, as misturas de biodiesel de soja (20 a 100% em volume) e diesel, tiveram desempenho avaliado em máquinas de grande porte da marca Caterpillar. Os resultados comprovaram a eficiência do combustível utilizado após utilização de 200 mil litros de biodiesel durante quatro mil horas de trabalho. Posteriormente, os motores destes veículos foram desmontados e submetidos à análise técnica.

Outro teste, trata-se da utilização de biodiesel na frota de tratores da marca Valtra, pertencentes a Usina Catanduva, no interior de São Paulo. Foram utilizadas diferentes misturas de biodiesel de soja ou mamona, de B0 a B100, que permitem avaliar consumo do biocombustível nos tratores, além de desempenho e durabilidade do motor e de seus sistemas de injeção.

Com o sucesso dos testes do uso do biodiesel, o LADETEL conseguiu unir não apenas as empresas e instituições já citadas como PSA Peugeot Citroen, Companhia de Bebidas Ipiranga, Bosch, Delphi, Esso, Wolkswagem, Cummins, MWM, Filtros Mann, Filtros Mahle, mas também outras como o instituto de pesquisas do Lactec, Shell, Sabó, International Engines, Ford, Fiat-Ducato, Iveco, Boc Edwards, Carrefour, Valtra, Branco, USP-Pirassununga, Chevron Texaco Copercitrus. Bebedouro, CrystalSev Comércio e Representação Ltda, Prosint Química S.A. , Panamericana S.A. Industrias Químicas, Brejeiro Produtos Alimentícios, Bom Brasil Óleo de Mamona Ltda,

McDonalds, Usina Catanduva, USP-São Paulo, USP-São Carlos, USP-ESALQ, Unesp-Jaboticabal, dentre outras.

Entretanto, o esforço realizado tem sido recompensado com a implantação e regulamentação do programa brasileiro de produção e uso do biodiesel na Matriz Energética Brasileira através da Lei sancionada no dia 13 de janeiro de 2005, que autoriza a utilização de 2% de biodiesel na mistura com o diesel de petróleo em caráter optativo até 2008, sendo que a partir de então se tornaria-se obrigatório o uso da mistura de 2% e optativa a mistura de 5%. Em 2013 a mistura de 5% de biodiesel e diesel de petróleo, por sua vez, passará a ser obrigatória.

Com essa Lei, estima-se que o Brasil reduza em 33%, suas importações de diesel, gerando uma economia anual de US\$ 350 milhões, além de um grande número de empregos diretos e indiretos.

As pesquisas no LADETEL para obtenção de biodiesel, envolvem desde a extração de óleos vegetais a partir de diversas oleaginosas, sua transesterificação utilizando álcool etílico ou metílico e análise da qualidade do produto final, bem como do subproduto, a glicerina.

A maior preocupação do LADETEL sempre esteve relacionada à qualidade do biodiesel produzido, portanto, são utilizados equipamentos que atendem as metodologias adequadas para a produção e análise do mesmo, de modo que todo o biodiesel produzido esteja dentro das mais rígidas especificações exigidas para comercialização como a EN 14214.



FIGURA 2 - Alguns dos veículos utilizados em programas de teste com biodiesel coordenados pelo LADETEL: dois veículos de passeio Peugeot 206 e X-Sara Picasso utilizados na primeira fase dos testes desenvolvidos em parceria com a PSA Peugeot Citroen. Ônibus circular pertencente a prefeitura do Campus administrativo da USP de Ribeirão Preto.

Neste sentido, o LADETEL (Laboratório de Desenvolvimento de Tecnologias Limpas- USP- Ribeirão Preto) tem buscado o desenvolvimento de novos processos de produção do biodiesel, sendo um dos pioneiros no desenvolvimento de processos empregando o álcool etílico como matéria-prima estratégica, uma vez que o Brasil é líder mundial na produção deste álcool a partir da cana-de-açúcar, além de ser esta, uma opção ecologicamente correta.

Além disso, o biodiesel etílico possui propriedades combustíveis iguais as do biodiesel metílico produzido na Europa e EUA, com a vantagem de tratar-se de um combustível obtido totalmente a partir de fontes renováveis. Com o domínio da produção do biodiesel pela rota etílica, pode dizer que o Brasil encontra-se mais uma vez, na dianteira dos processos de produção dos combustíveis renováveis, podendo destacar-se ainda mais, pela utilização de recursos como sua vasta extensão territorial e clima tropical, propícios ao cultivo de oleaginosas para a produção do biodiesel.

Nos processos de inovação tecnológica para a produção de biodiesel, o estudo de novos catalisadores tem despertado o interesse da comunidade científica, a fim de se obter processos mais rápidos e, portanto economicamente mais viáveis que os processos convencionalmente empregados (LOTERO *et al*, 2006).

A utilização de enzimas em forma imobilizada em processos industriais tem seu potencial cada vez mais explorado devido a vantagens como a especificidade na obtenção dos produtos de interesse, capacidade de reutilização por vários ciclos reacionais e a não geração de resíduos.

Dessa forma, o presente projeto de pesquisa descreve os resultados obtidos a partir da utilização de uma enzima imobilizada no processo de conversão de triglicerídeos a biodiesel. A lipase de *Thermomices Lanuginosus* imobilizada em sílica porosa, conhecida comercialmente por Lipozyme TL IM, teve seus parâmetros de reação estudados de modo a obter-se uma otimização do processo de produção enzimático do biodiesel.

Buscou-se aqui, utilizar os óleos de soja e mamona como matéria-prima base do processo de transformação para obtenção do biodiesel, uma vez que a mamona tem recebido incentivos por parte do governo federal como sendo uma fonte capaz de proporcionar o desenvolvimento social e econômico de regiões menos favorecidas do Brasil nestes aspectos. Entretanto, como a soja é até o presente momento, a oleaginosa com maior volume de produção e conseqüentemente de maior volume de óleo extraído no país, não se pode ignorar seu potencial no incremento da produção de biodiesel em um primeiro momento onde se tenta viabilizar a implantação deste novo biocombustível na matriz energética brasileira.

1.3. Legislação

A ANP (Agencia Nacional do Petróleo) estima que a atual produção brasileira de biodiesel seja da ordem de 176 milhões de litros anuais, sendo este biodiesel na sua maioria obtidos a partir de óleo de soja seguindo a rota metfílica. Entretanto, há de se considerar a diferença entre capacidade instalada e capacidade produtiva.

Apesar de a dita capacidade instalada para a produção de biodiesel pelas usinas existentes no Brasil até o presente momento serem capazes de ultrapassar o volume necessário à implantação do biodiesel na matriz energética brasileira, o volume produzido atualmente ainda não atingiu este patamar.

Dessa forma, o volume de produção constitui o grande desafio para o cumprimento das metas estabelecidas no âmbito do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, que necessitará de, aproximadamente, 800 milhões/L em sua fase inicial. Ou seja, a capacidade produtiva atual supre somente 17% da demanda, considerando a mistura B2.

Porém, com a aprovação das usinas cuja solicitação tramita na ANP, a capacidade produtiva coincidirá com a demanda prevista para 2008. Esta capacidade terá que ser triplicada até 2013, com o incremento de adição de 5% de biodiesel ao petrodiesel, de forma a que a Lei nº 11097 que torna obrigatório o seu uso na forma de mistura com o diesel de petróleo possa ser aplicada e cumprida (ANP, 2004).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Fontes de energia não renováveis

O movimento de preservação do planeta tornou-se necessário a fim de se conseguir reduzir os efeitos causados pela atividade humana no meio ambiente. Assim, com o decorrer dos anos tornou-se inevitável a procura de um meio para conciliar o desenvolvimento humano e todas as vantagens dele advindas, paralelamente a preservação ambiental (GRIMONI *et al*, 2004).

Entretanto, desenvolvimento e energia estão intimamente relacionados e por isso devem ser observados de forma conjunta. Pode-se afirmar que os países mais pobres, ou menos desenvolvidos, consomem menos energia do que os países ricos, ou desenvolvidos e estes utilizam diferentes fontes de energia, o que ocasiona diferentes tipos de impactos ambientais. Sobre esta ótica, que relaciona o desenvolvimento humano com a necessidade de utilização de recursos energéticos e preservação do ambiente criou-se um novo paradigma, o do desenvolvimento sustentável.

O desenvolvimento sustentável trata-se da utilização de recursos de modo a satisfazer as necessidades atuais sem prejudicar a capacidade das gerações futuras em satisfazer suas necessidades próprias (GRIMONI *et al*, 2004). A poluição do ar, o efeito estufa, o aquecimento global, o desmatamento, a desertificação, a degradação costeira e marinha, entre outros efeitos da poluição, tem como principal responsável à produção, transmissão ou o uso final de energia, sendo, portanto, a energia apontada como uma das principais fontes do desequilíbrio da natureza causada pelo homem.

Todas as etapas envolvidas no uso final da energia, tais como extração de matéria-prima para conversão em combustíveis, produção de energia, transformação, transporte, distribuição e o próprio uso final, causam impactos significativos ao meio ambiente.

Dentre as principais atividades responsáveis por grandes impactos ambientais, destaca-se a utilização de combustíveis fósseis. A utilização deste tipo de combustível é responsável pelos problemas mais graves causados pelo atual uso da energia: as mudanças climáticas e o efeito estufa (MITTELBAACH, 1985).

O efeito estufa é causado pelo aumento da concentração dos gases na atmosfera, tais como o gás carbônico (CO_2), o metano (CH_4), o óxido nitroso (N_2O) e os clorofluorcarbonos (CFC). Esses gases capturam parte da radiação infravermelha que a Terra devolve para o espaço, fazendo com que ocorra um aumento na temperatura da superfície terrestre, o qual pode levar ao degelo das calotas polares e a elevação no nível das marés causando prejuízos as regiões costeiras (METZGER, 2001).

O consumo de derivados de petróleo por veículos automotores como combustíveis é responsável por aproximadamente um terço da produção mundial de petróleo. Dessa forma os poluentes lançados por veículos na atmosfera, são responsáveis por:

- mais de 70% de todas as emissões de CO mundiais;
- mais de 40% das emissões de NOx;
- quase 50% dos hidrocarbonetos totais;
- aproximadamente 80% das emissões de benzeno;
- aproximadamente 50% das emissões atmosféricas de chumbo.

Estes impactos podem ter alcance regional ou global. Os impactos regionais são causados principalmente pela chuva ácida com a emissão de óxidos sulfurados, já os globais são responsáveis por cerca de 15% das emissões mundiais de CO₂ (GRIMONI, 2004).

Estas emissões acarretam graves problemas ambientais e, além disso, oferecem sérios riscos à saúde pública como problemas respiratórios a exemplo do câncer de pulmão, além de doenças alérgicas (ELROAD, 1999).

Outro ponto importante a ser considerado, decorre do fato que a constante produção e consumo de derivados fósseis tem tornado estas fontes cada vez mais escassas e com previsão de esgotamento em um futuro próximo.

A utilização destes combustíveis representam aproximadamente 80% do consumo atual de combustíveis no mundo. Estima-se 41 anos de exploração para as reservas de petróleo em exploração. Esta estimativa tende a tornar as tecnologias de obtenção de petróleo e seus derivados cada vez mais caros e aumentar as áreas de instabilidade política no globo (GOLDEMBERG, 2007).

Todos estes problemas têm sido exaustivamente discutidos em âmbito mundial, no sentido de se diminuir o consumo de derivados fósseis e ao mesmo tempo, substituí-los por outras fontes de energia que não comprometam a saúde humana e o meio ambiente e que possam ser uma alternativa viável economicamente (DMYTRYSHYN *et al*, 2004).

Uma opção viável adotada pelo Brasil desde a década de 70 trata-se da utilização do etanol como combustível alternativo. Seu consumo tanto na forma pura quanto misturado com a gasolina, tem provado ser eficiente na diminuição da emissão de gases poluentes a atmosfera. Além disso, o etanol produzido no Brasil tem custo menor do que qualquer outro obtido a partir de diferente tecnologia, o que possibilitou ao mercado

brasileiro, após vários estudos de adaptação de motores, a comercialização de carros movidos apenas a álcool e mais recentemente, os do tipo “flexible fuel”, pela combustão eficiente de álcool ou gasolina em um mesmo motor (GOLDEMBERG, 2007).

Entretanto, pode-se dizer que o Brasil é ainda, essencialmente movido a diesel (FIGURA 3), pois 57,7 % do consumo total de combustíveis no país referem-se ao diesel. Desta parcela, 30% ou 10 bilhões de litros são importados por ano (ANP, 2004).

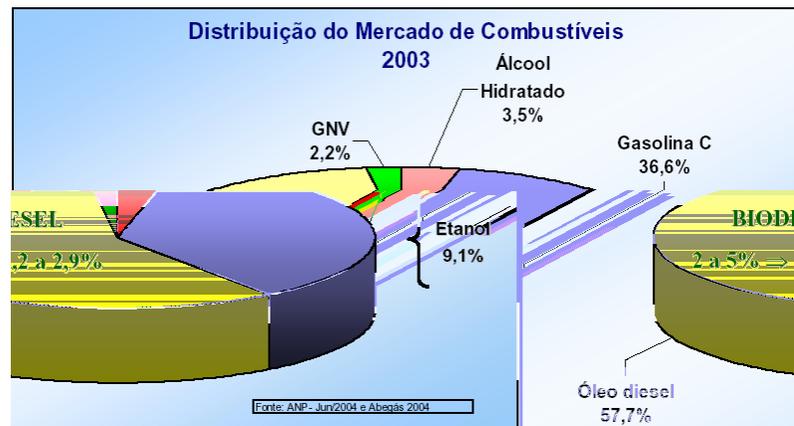


FIGURA 3 - Distribuição do mercado de combustíveis no Brasil. **Fonte:** ANP – Jun/2004 e Abegás 2004.

Mesmo tendo alcançado teoricamente a auto-suficiência em petróleo, permanece a necessidade de importar diesel comum, pois o petróleo extraído em nossa bacia petrolífera não tem qualidade para a produção deste combustível e ao mesmo tempo, as características das refinarias brasileiras não permitem o incremento na produção de diesel.

2.2. Fontes de energia renováveis

Um dos meios mais importantes para se atingir o desenvolvimento sustentável, trata-se, da utilização de fontes de energias renováveis (GRIMONI *et al*, 2004).

A questão do petróleo, além de constituinte importante da matriz energética mundial, também é um assunto economicamente estratégico. O fato de ser um recurso limitado e de suas maiores reservas estarem localizadas em uma região geopoliticamente conturbada traz graves conseqüências econômicas. Isso traz à tona a necessidade de diversificação das fontes energéticas e investimentos em novas fontes de energia e tecnologias de obtenção das mesmas, a exemplo dos mecanismos de desenvolvimento limpo e utilização de recursos renováveis.

Goldemberg relatou que, a maioria dos recursos renováveis está em fase de desenvolvimento para a adaptação a escala comercial, sendo que atualmente, sua utilização não ultrapassa 13,6% de toda a energia consumida no mundo. Dentre as energias renováveis atualmente existentes, a biomassa tradicional tem sido a mais explorada (8,5%) mesmo que por vezes de forma ineficiente, ocasionado a deflorestação. (GOLDEMBERG, 2007).

A exploração de *novas fontes de energia renovável* pode ser considerada a forma mais viável de utilização de recursos energéticos em potencial. Dentre estas fontes de energia destacam-se as energias hidroelétrica, eólica, solar, geotérmica, das marés e biomassa moderna, cujas utilizações somadas chegam a apenas 3,4% do total da energia atualmente explorado. A biomassa moderna inclui o bioetanol (obtido a partir da celulose) e o biodiesel, dentre outras.

Muito tem sido pesquisado dentre estas duas últimas alternativas, entretanto, devido à tecnologia de produção ainda não totalmente estabelecida, o bioetanol (etanol

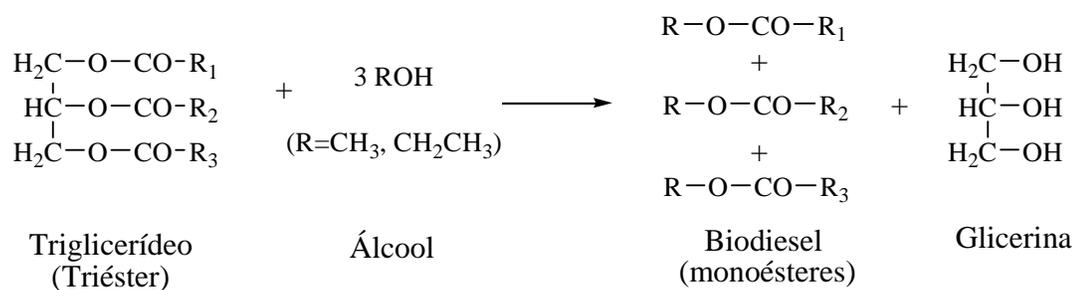
celulósico) trata-se, por enquanto, de uma opção economicamente inviável e que necessita de maiores estudos (PNA, 2005).

Assim, um número de políticas econômicas e sociais devem ser adotadas pelos governos de países industrializados, de modo a incentivar o uso de novas energias, tais como a diminuição de impostos e implementação de subsídios.

A utilização do biodiesel, por sua vez, surgiu do potencial aproveitamento dos óleos vegetais como combustíveis em motores diesel, idealizada inicialmente por Rudolf Diesel em 1895. Além disso, por se tratarem de fontes de energia renováveis, os óleos vegetais têm despertado cada vez mais, o interesse em programas nacionais de energias renováveis podendo lançar mão inclusive, da utilização de matéria-prima já utilizadas em outros processos como no caso de óleo de fritura para a sua produção (MA, HANNA, 1999).

2.3. Biodiesel

O Biodiesel é definido pela “National Biodiesel Board” (EUA) como ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, provenientes de fontes renováveis como óleos vegetais (triglicerídeos- TGs) cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores ciclo diesel) (NATIONAL BIODIESEL BOARD, 1998).



EQUAÇÃO 1. Reação de transesterificação de óleos vegetais.

Quimicamente óleos e gorduras, matéria-prima do biodiesel são constituídos de moléculas de triglicerídeos que por sua vez possuem longas cadeias de ácidos graxos ligados a uma única molécula de glicerol. Estes ácidos graxos podem diferir no comprimento da cadeia carbônica, no número e posição das duplas ligações nestas cadeias. Assim, o biodiesel trata-se de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, que são sintetizados tanto por transesterificação com álcoois de cadeia curta quanto por esterificação destes ácidos graxos.

A transesterificação tem sido o método mais conveniente para a obtenção do biodiesel (**EQUAÇÃO 1**).

Na transesterificação, utilizam-se catalisadores que podem ser ácidos ou básicos, homogêneos ou heterogêneos quanto ao meio reacional, de modo a obter-se o biodiesel e como co-produto, a glicerina (MA, HANNA, 1999).

As grandes motivações para a produção do biodiesel são os benefícios sociais e ambientais que este combustível pode trazer. Contudo em razão dos diferentes níveis de desenvolvimento econômico e social dos países, esses benefícios devem ser considerados diferentemente.

O biodiesel, de forma geral, tem as seguintes características:

- (a) é virtualmente livre de enxofre e aromáticos;
- (b) tem alto número de cetano;
- (c) possui teor médio de oxigênio em torno de 11%;
- (d) possui maior viscosidade e maior ponto de fulgor que o diesel convencional;
- (e) possui nicho de mercado específico, diretamente associado a atividades agrícolas;

(f) no caso do biodiesel obtido a partir de óleo de fritura, caracteriza ferramenta ambiental;

(g) tem preço superior ao diesel de petróleo podendo ser otimizado a partir da recuperação e aproveitamento dos subprodutos (glicerina e catalisador), bem como aumento na produção de oleaginosas para a produção do biodiesel em específico ou do aproveitamento de culturas locais, podendo chegar a preços competitivos com o diesel de petróleo (COSTA NETO *et al*, 2000).

2.3.1. Biodiesel no Brasil e no mundo

A transesterificação tem sido o processo mais comumente utilizado para a obtenção do biodiesel devido a facilidade operacional, propiciando de forma direta a diminuição da viscosidade dos TGs, bem como a adequação dos produtos formados, os ésteres alquílicos, a classe dos combustíveis renováveis.

No cenário mundial, temos no início dos anos 90, o processo de industrialização do biodiesel na Europa, sendo este o primeiro mercado produtor e consumidor.

As refinarias de petróleo da Europa têm buscado a eliminação do enxofre do óleo diesel devido aos fatores ambientais, porém isso reduz significativamente a lubricidade do óleo diesel mineral (HOLANDA, 2004).

A correção na lubricidade do óleo diesel mineral com menor teor de enxofre, tem sido feita pela adição de biodiesel já que sua lubricidade é extremamente elevada. Dessa forma, este combustível tem sido designado, por muitos distribuidores europeus, como “Super Diesel”. A Alemanha estabeleceu um expressivo programa de produção de biodiesel a partir da canola, sendo hoje o maior produtor-consumidor desse

combustível e tendo produzido dois milhões de toneladas em 2005, seguida da França com produção de 460 mil toneladas por ano (HOLANDA, 2004).

Os EUA iniciaram nos últimos anos, sua produção de biodiesel tendo como principal motivação, a qualidade do meio ambiente. Entretanto, com a queda do dólar, fontes de energia renováveis que possibilitem a descentralização da economia baseada até o presente momento, principalmente no petróleo, tem se tornado estratégicas. Assim, o investimento deste país na produção de biocombustíveis tem crescido agressivamente. A reação para a produção do biodiesel nos EUA é feita principalmente, utilizando o metanol (álcool proveniente de fontes fósseis não renováveis) (HOLANDA, 2004).

Várias iniciativas, desde então têm sido lançadas para a viabilização técnica da produção deste biocombustível. Entretanto, até o presente momento, devido a diversos fatores, que vão desde a menor disponibilidade do etanol no mundo, seu maior preço em relação ao metanol, até a falta do domínio completo no processo de produção do biodiesel etílico, é que os ésteres etílicos não são usados na grande maioria dos mercados consumidores e (ou) produtores de biodiesel.

Deve-se considerar também que existem diferenças significativas nos processos de obtenção e purificação dos ésteres metílicos e etílicos. Apesar do metanol (álcool metílico) ser altamente tóxico, podendo causar cegueira ou morte quando inalado ou ainda ser queimado sem produzir chama visível, não transfere nenhuma dessas características ao produto final da transesterificação, portanto, o biodiesel obtido a partir dele pode ser considerado um produto ecologicamente correto.

Desde o ponto de vista estratégico, assim como da necessidade ambiental, econômica, política e social, muito se têm investido na pesquisa para viabilização de fontes alternativas aos combustíveis de origem fóssil.

O biodiesel, portanto, pode exercer um papel importante na substituição de parte do diesel importado pelo país, impulsionando a economia de forma direta e também indireta, devido à capacidade de geração de empregos que estão relacionados à sua cadeia produtiva (HOLANDA, 2004).

Além disso, o biodiesel tem produção passível da utilização de qualquer tipo de oleaginosa, o que torna possível o desenvolvimento de regiões menos favorecidas, gerando uma melhor distribuição de renda no território nacional.

Desde 1980, têm-se pesquisado a utilização de biocombustíveis como os ésteres metílicos no Brasil, pela utilização diferentes tipos de óleos vegetais e álcool metílico (PARENTE, 2003).

Estes estudos resultaram inclusive em uma patente PI-8007957, de autoria do Professor Expedito Parente, da Universidade Federal do Ceará, que, no entanto acabou expirando, assim como espiraram outras patentes internacionais anteriores, a exemplo da patente de Chavanne, sem que o país adotasse o biocombustível obtido como uma alternativa viável.

Com a evolução na pesquisas, atualmente pode-se dizer que o Brasil já dispõe de conhecimento tecnológico suficiente para impulsionar a produção de biodiesel em escala comercial, embora se deva continuar avançando nas pesquisas e testes no sentido de que a tecnologia brasileira, pioneira no desenvolvimento de biodiesel produzido a partir de álcool de cana-de -açúcar, mantenha-se em nível das melhores tecnologias para produção de biodiesel do mundo.

Muitas iniciativas já foram realizadas por parte do governo brasileiro e instituições de pesquisa no sentido de consolidar o biodiesel como combustível alternativo e viável a matriz energética brasileira (DABDOUB, 2007).

Dentre elas, a Lei sancionada no dia 13 de janeiro de 2005, autorizou a utilização de 2% de biodiesel na mistura com o diesel de petróleo em caráter optativo até 2008, sendo que a partir de então se tornará obrigatório o uso da mistura de 2% e optativa a mistura de 5%. E ainda, em 2013 a mistura de 5% de biodiesel no diesel de petróleo, por sua vez, passará a ser obrigatória.

A adição de 2 a 5% de biodiesel no diesel de petróleo trata-se de uma redução de 1,2 a 2,9% na importação de diesel consumido na matriz energética brasileira **(FIGURA 3)** (HOLANDA, 2004).

No que diz respeito aos benefícios sociais propiciados pelo biodiesel, estudos desenvolvidos pelos Ministérios do Desenvolvimento Agrário, ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Ministério da Integração Nacional e Ministério das Cidades mostraram que a cada 1% de substituição de óleo diesel por biodiesel produzido com a participação da agricultura familiar podem ser gerados cerca de 45 mil empregos no campo (HOLANDA, 2004).

Quanto aos benefícios ambientais, estudos desenvolvidos pelo LADETEL (Laboratório de Desenvolvimento de Tecnologias Limpas - Ribeirão Preto), mostraram que a substituição do óleo diesel mineral pelo biodiesel resulta na redução de emissões em 9,8% de anidrido carbônico e 14,2% de hidrocarbonetos não queimados, 26,8% de material particulado e 4,6% de óxido de nitrogênio (HOLANDA, 2004).

Estes benefícios ambientais, podem, ainda, gerar outras vantagens econômicas para o país tais como a capacidade de enquadrar o biodiesel no protocolo de Quioto e nas diretrizes dos Mecanismos de Desenvolvimento Limpo- MDL, o que possibilitaria a venda de cotas de carbono por meio do fundo Protótipo de Carbono – PCF, devido a redução das emissões de gases poluentes, e também de créditos de seqüestro de

carbono, por meio do Fundo Bio de Carbono – CBF, administrados pelo Banco Mundial. (HOLANDA, 2004).

Neste sentido, especialistas acreditam que o Brasil possa se torna a “Arábia Saudita dos biocombustíveis” devido a fatores naturais e climáticos que englobam a produção de oleaginosas no país, além da experiência pioneira de aproximadamente 30 anos na produção e comercialização de etanol a partir da cana-de-açúcar no país, podendo ser utilizada como exemplo no desenvolvimento de tecnologias para utilização de recursos renováveis.

2.3.2. Normas ASTM, EN, NBR e propriedades físico-químicas do Biodiesel

Para que a qualidade do biodiesel produzido e antes de ser empregado em veículos ou motores esteja dentro de uma faixa normalizada de qualidade, foram estabelecidas especificações nacionais e internacionais que determinam os limites que determinadas características físico-químicas a que os (bio)combustíveis devem atender. Estas especificações contemplam desde os limites até as normas e técnicas de análises a serem utilizadas na determinação de cada um dos parâmetros considerados.

Cada norma específica, portanto, traz consigo uma metodologia padrão adequada, com todos os detalhes sobre equipamentos e calibrações a serem utilizados na determinação em questão. Além disso, cada norma traz informações pertinentes sobre a necessidade de determinação daquele parâmetro da análise para combustíveis. A maioria das normas para o biodiesel foram adaptadas das normas estabelecidas para especificação da qualidade dos combustíveis derivados de petróleo, o que pode ser claramente observado no descritivo das normas ASTM (ASTM D 6571)

As especificações de qualidade para biocombustíveis devem atender as necessidades do país consumidor e, portanto, cada país produtor tem autonomia para decidir sobre o limite de suas especificações, uma vez que fatores específicos que vão desde o tipo de matéria-prima utilizada na produção, condições climáticas em que o combustível é armazenado no tanque antes de sua queima, até o tipo de motor e de sistema de injeção, irão influenciar na eficiência energética global do biocombustível.

Sendo assim, foram estabelecidas as normas americanas **ASTM D 6751**, européias **EN 14214**, brasileiras **ABNT NBR**, dentre outras, para a comercialização de biocombustíveis nos EUA, países da Europa e Brasil, respectivamente.

As normas americanas (*ASTM- American Society for Testing and Materials*) e européias (*EN- Normas Européias*) (**TABELA I**), são comumente utilizadas como padrões, e muitas vezes acabam por nortear as especificações regulamentadas em outros países, a exemplo do Brasil (*NBR- Normas Brasileiras*) (**TABELA II**) (KNOTHE, 2006). Entretanto, as especificações brasileiras ainda não foram completamente estabelecidas.

TABELA I - Especificações americanas (ASTM D 6751) e europeias (EN ISO 14214) para a qualidade do biodiesel. Fonte: KNOTHE, 2006.

Características	Unidade	USA (ASTM D 6751)	Européia (EN 14214)
Densidade a 15°C	Kg/m ³	-	860-900
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	1,9- 6,0	3,5-5,0
Água e sedimentos	% volume	0,05 máx.	0,05
Ponto de fulgor	°C	130	120 min
Ponto de névoa	°C	-	-
Enxofre	mg/kg	0,0015 máx	10,0 máx
Cinzas Sulfatadas	% (mol/mol)	0,02	0,020 máx
Corrosão ao cobre (3h, 50°C)	Grau de corrosão	3 máx	1 máx
Contaminação total	mg/kg	-	24 máx
Estabilidade a oxidação, 110°C	horas	-	6 min
Teor de ésteres	% (mol/mol)	-	96,5 min
Conteúdo de ácido linoléico	% (mol/mol)	-	12,0 máx
Conteúdo de ésteres com 4 ou mais ligações duplas	% (mol/mol)	-	1 máx
Resíduo de Carbono	% (mol/mol)	0,05 máx.	0,30 máx
Número de Cetano	-	47 min	51 min
Sódio/Potássio	-	5 ppm máx	5,0 mg/kg máx
Cálcio/ Magnésio	mg/kg	-	5,0 máx
Conteúdo de Fósforo	% (mol/mol)	10,0 máx	10,0 máx
Destilação a T _{amb} , (90% rec.)	°C	360	-
Índice de acidez	mg KOH/g	0,5 máx	0,50 máx
Índice de Iodo	g I ₂ / 100 g	-	120
Glicerina livre	% (mol/mol)	0,02 máx	0,020 máx
Glicerina total	% (mol/mol)	0,24 máx	0,25 máx
Monoglicerídeos	% (mol/mol)	-	0,80 máx
Diglicerídeos	% (mol/mol)	-	0,20 máx
Triglicerídeos	% (mol/mol)	-	0,20 máx
Metanol ou Etanol	% (mol/mol)	-	0,20 máx

TABELA II – Especificação brasileira para a qualidade do biodiesel e número das respectivas normas Fonte:
<http://www.anp.gov.br>

Características	Unidade	Limite - L II	ABNT NBR	ASTM D	ISO
Massa específica a 20°C	Kg/m ³	Anotar	7148 14065	1298 4052	- -
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	Anotar	10441	445	EN ISO 3104
Água e sedimentos, máx.	% volume	0,05	-	2709	-
Contaminação Total	mg/Kg	Anotar	-	-	EN 12662
Ponto de fulgor, min	°C	100	14598	- 93	- EN ISO 3679
Teor de éster	% massa	Anotar	-	-	EN 14103
Destilação 90% vol. Recuperados, máx.	°C	360	-	1160	-
Resíduo de Carbono, máx.	% massa	0,1	-	4350 189	EN ISO 10370 -
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,02	9842	874	ISO 3987
Enxofre total	% massa	Anotar	-	4294 5453	- -
Sódio + Potássio, máx.	mg/Kg	10	-	-	EN ISO 14596 EN 14108
Cálcio + Magnésio	mg/Kg	Anotar	-	-	EN 14109
Fósforo	mg/Kg	Anotar	-	4951	EN 14538 EN 14107
Corrosividade ao Cu, 3h a 50°C	-	Classe I	14359	130	EN 2160
Número de Cetano	-	Anotar	-	613	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio máx.	°C	Variável (região)	14747	6371	-
Índice de acidez, máx.	Mg KOH/g	0,8	14448	- 664	EN 14104
Glicerina livre, máx.	% massa	0,02	-	6884	- EN 14105
Glicerina total, máx.	% massa	0,38	-	-	EN 14106
Monoglicerídeos	% massa	Anotar	-	6584	- EN 14105
Diglicerídeos	% massa	Anotar	-	6584	- EN 14105
Triglicerídeos	% massa	Anotar	-	6584	- EN 14105
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,5	-	-	EN 14105 EN14110
Índice de Iodo (6)		Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação 110 °C/min	h	6	-	-	EN 14112

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

2.3.2.1. Viscosidade

A viscosidade relaciona-se diretamente com o processo de atomização (pulverização) das moléculas no estágio inicial da combustão. Assim, a determinação da viscosidade é essencial à especificação do produto (ASTM D 445).

2.3.2.2. Número de cetano

O número de cetano é a medida das características de ignição do combustível em motores de ignição por compressão.

Este teste é usado por fabricantes de motores, refinarias de petróleo e vendedores no comércio, como uma especificação de medida primária relativa à partida do combustível e do motor. O número de cetano é determinado a uma velocidade constante em câmara de pré-combustão do tipo utilizada em motores de ignição por compressão. (ASTM D 613).

Um maior número de cetano resulta em menor barulho no funcionamento do motor, em melhor partida a frio e numa menor emissão de material particulado.

2.3.2.3. Ponto de névoa

Para produtos derivados de petróleo e biodiesel, o ponto de névoa de um produto é o índice referente a temperatura mais baixa de sua utilização. Abaixo do ponto de névoa o combustível apresenta princípio de mudança para o estado sólido, acarretando problemas a utilização direta deste combustível na queima em motores (ASTM D 2500).

2.3.2.4. Ponto de Fulgor

A medida do ponto de fulgor é uma medida da tendência da amostra para formar uma mistura inflamável com o ar, sob condições controladas em laboratório.

O ponto de fulgor é utilizado no transporte e em regulamentos de segurança que definem os materiais *inflamáveis* e *combustíveis*. Deve-se consultar o regulamento específico para se obter definições precisas destas classificações (ASTM D 93).

Desde o ponto de vista de composição química o ponto de fulgor baixo sinaliza a presença indesejada de substâncias voláteis e inflamáveis como resíduos de metanol ou etanol que por sua vez não são tolerados por motores no processo de combustão quando se

2.3.2.6. Índice de acidez

Um alto índice de acidez para o biodiesel pode ser considerado fruto da degradação ou falhas no processo de produção do mesmo. A quantidade relativa destes produtos pode ser determinada por titulação com bases. O índice de acidez é a medida da quantidade de ácido no combustível. Este valor é também usado algumas vezes como uma medida da degradação de um óleo vegetal ou óleo utilizado como lubrificante.

Entretanto, os limites devem ser empiricamente estabelecidos. Levando-se em consideração ainda, que uma variedade de produtos de oxidação contribui para o valor do índice de acidez e que os ácidos orgânicos variam enormemente quanto a suas capacidade de corrosão, o teste não pode ser usado para prever a corrosividade do óleo em condições de trabalho (ASTM D 664).

2.3.2.7. Glicerina livre e glicerina total

O conteúdo de glicerina livre e de glicerina ligada reflete na qualidade do biodiesel. A presença de glicerina pode causar problemas durante a estocagem, ou no sistema, devido à separação da glicerina. Além disso, a queima da glicerina resulta na formação de acroleína promovendo a corrosão de partes metálicas com as quais estes produtos entram em contato.

Uma alta quantidade de glicerina total pode levar a problemas no injetor e pode contribuir para a formação de depósitos no sistema de injeção, pistões e válvulas (ASTM D 6584).

2.3.2.8. Enxofre total

Alguns processos catalíticos utilizando petróleo e refino químico podem ser envenenados quando traços de enxofre estão presentes nos materiais de partida. A presença de enxofre no combustível pode acarretar formação de compostos que liberados na queima são responsáveis por sérios danos ao ambiente a exemplo da chuva ácida (ASTM D 5453). Entretanto, a maioria dos biodieseis não contem enxofre, entretanto isso pode depender da matéria prima utilizada.

2.3.2.9. Resíduo de Carbono

O valor do resíduo de carbono de vários materiais derivados de petróleo serve como uma aproximação da tendência do material para formar o tipo de depósito carbonáceo sobre condições de degradação. Esta mesma característica é aplicada e monitorada para o biodiesel . Porém no caso dos derivados de petróleo a determinação é realizada nos 10% finais, considerados resíduo da destilação, enquanto no caso do biodiesel é feito sobre a totalidade da amostra (ASTM D 4530).

2.3.2.10. Corrosividade ao cobre

O petróleo cru contem compostos de enxofre, a maioria dos quais são removidos durante o refino. Entretanto, os compostos de enxofre permanecem em alguns produtos acabados, podendo ter ação corrosiva sobre vários metais e esta corrosividade não é necessariamente diretamente relacionada com o total de enxofre presente. O efeito pode variar de acordo com o tipo químico dos compostos de enxofre presentes. O teste de corrosividade ao cobre permite obter o grau de corrosividade relativa dos produtos de petróleo e outros combustíveis (ASTM D 130).

Esta mesma análise é aplicada no caso do biodiesel, porém a corrosão é proveniente das reações de óxido-redução que o biodiesel pode sofrer catalisadas por metais “amarelos” como cobre, bronze e latão.

2.3.2.11. Índice de iodo

O índice de iodo proporciona uma medida do grau de instaurações nas cadeias de ácidos graxos que constituem o biodiesel. Por esta razão um alto valor de índice de iodo significa um aumento no risco de polimerização do combustível em motores (EN 14111)

2.3.2.12. Teor de ésteres

O teor de ésteres trata da quantidade mínima de ésteres que deve conter o biodiesel para que possa ser considerado um combustível livre de impurezas e de modo que possa ser utilizado em motores ciclo diesel com segurança (EN 14103).

2.3.3. Matérias-primas empregadas na produção do biodiesel

2.3.3.1. Etanol

O Brasil tem mais de 30 anos de experiência na produção de etanol e é hoje um dos líderes neste setor produtivo. Este pioneirismo tem despertado o interesse de países do mundo todo sobre a sua tecnologia de produção, inclusive de países desenvolvidos como os EUA (PNA, 2005).

A produção de açúcar foi responsável pela vinda da primeira muda de cana de açúcar para o Brasil, trazida da ilha da madeira em 1532 e por séculos, as bebidas foram o único álcool produzido. Com a ampliação da capacidade produtiva das usinas de cana de açúcar sobrava melaço e então iniciou-se a produção e utilização de etanol para fins farmacêuticos, para a produção de produtos químicos derivados, para produção de bebidas e como fonte de energia térmica por combustão. A I Guerra Mundial (1914/1918) contribuiu para a produção em grande escala devido à necessidade de utilização do álcool como combustível líquido em motores de explosão.

Em 1929 a grande crise internacional comprometeu a economia de todos os países inclusive a do Brasil. Dessa forma sobrava cana de açúcar e faltavam divisas para a aquisição de combustível líquido.

A primeira destilaria de álcool anidro foi então instalada e o Governo federal em 1931, estabeleceu a obrigatoriedade da mistura 5% de etanol a gasolina (Decreto 19.717) como medida de economia na importação de combustível e para amparar a lavoura cafeeira abalada pela crise (LIMA *et al*, 2001).

Novamente durante a II Guerra Mundial (1939/1945) faltou gasolina e fez-se necessário o incremento da produção de etanol no Brasil. Passada a guerra o preço do petróleo caiu e o etanol perdeu sua importância, entretanto, continuou a mistura na gasolina em grande escala (LIMA *et al*, 2001).

Nova crise internacional do petróleo na década de 70 fez com que se iniciasse no Brasil uma nova fase na produção de etanol e em pouco tempo a indústria deu um salto de 700 milhões para 15 bilhões na produção com incentivo do governo brasileiro. Ampliou-se o parque canavieiro, modernizou-se a produção nas destilarias e houve rápida evolução na construção de motores para etanol anidro. Esta decisão política tomada durante o regime militar, fez com que a produção do etanol crescesse rapidamente de 0.9 bilhões de galões por ano em 1980 para 3.0 bilhões em 1990 e para 4.2 bilhões em 2006 (Lima *et al*, 2001).

Tornou-se necessário a economia brasileira que o custo do etanol declinasse com o aumento da produção além da introdução de novos produtos na mesma cadeia produtiva contribuindo aos ingressos de produtos e reduzindo os gastos promovendo a consolidação desta cadeia produtiva no mercado provocando esta queda de preço do etanol em um perfil que se conhece como “curva do aprendizado”. Assim, em 1980 o custo do etanol chegou a três vezes o preço da gasolina. Entretanto, o governo forneceu subsídios sobre o produto que chegaram a somar cerca de 30 bilhões de dólares em 20 anos.

Nos anos 90 estes subsídios foram sendo gradativamente removidos e em 2004 o etanol tornou-se competitivo com a gasolina sem a necessidade da continuação da intervenção do governo brasileiro.

Hoje existe um interesse mundial sobre a produção de etanol devido ao fato dele ser um combustível líquido obtido a partir de fontes renováveis, com tecnologia de produção que possibilita sua expansão para diversos países.

O domínio na sua produção tornou-se, portanto, estratégica para a economia mundial e neste sentido o Brasil encontra-se um passo a frente devido a sua experiência na tecnologia a partir da cana-de-açúcar. Muitos especialistas consideram o etanol a energia renovável mais promissora para o desenvolvimento sustentável do futuro, podendo auxiliar inclusive no desenvolvimento da economia de países do terceiro mundo a exemplo do que ocorreu no Brasil, sendo, portanto um exemplo a ser seguido.

O programa brasileiro de utilização do etanol começou como forma de reduzir a importação de petróleo, entretanto trouxe enormes benefícios econômicos e sociais ao país.

A via fermentativa é a maneira mais importante para a obtenção de etanol no Brasil devido a fatores econômicos.

Um dos fatores que tornam a produção de etanol por fermentação a forma mais econômica na sua obtenção é o grande número de matérias primas naturais existentes em todo país. Sua distribuição geográfica, que encerra diversos climas e tipos de solos, permite seu cultivo em quase todo o território durante todo o ano. Na obtenção do álcool por via fermentativa, distinguem-se três fases: o preparo do substrato; a fermentação e a destilação (Lima *et al*, 2001).

O preparo do substrato é o tratamento da matéria-prima para dela se obterem os açúcares que irão para a fermentação.

Na fermentação, reações enzimáticas são responsáveis pela transformação química do açúcar em etanol e gás carbônico no interior da levedura *Saccharomyces*.

A fermentação para produção de etanol pode se dar a partir do melaço, resíduo da fabricação do açúcar cristal branco obtido da cana-de-açúcar, como ocorre no Brasil, ou a partir do amido de cereais, como ocorre nos EUA pela utilização do milho na fermentação

(FIGURA 4). Entretanto, muitos estudos vêm sendo realizados de modo a aperfeiçoar a produção de etanol a partir destas matérias-primas.

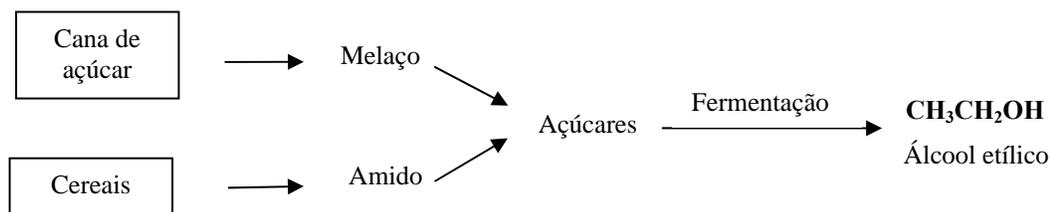


FIGURA 4 - Obtenção industrial do etanol por via fermentativa (MORRISON, 1983).

Após a destilação obtém-se um azeótropo de 95% de etanol com a água de onde é possível obter-se o álcool etílico anidro ou absoluto pela destilação do etanol a 95% a partir de um azeótropo ternário que arrasta a água, constituído de água, benzeno e etanol, que destila a temperatura inferior a do ponto de ebulição do etanol puro, ou por utilização de peneira molecular (MORRISON, 1983). Entretanto, considerando –se as características carcinogênicas do benzeno, nos últimos anos este tem sido substituído por substâncias menos perigosas como o ciclo-hexano ou ainda o monoetilenoglicol (MEG).

Alguns estudos têm buscado a utilização de resíduos de materiais celulósicos, representados por palhas, folhas, resíduos de exploração da madeira e outros para o uso na obtenção do etanol. Entretanto, fatores como dificuldade de preparação do mosto, presença de elementos tóxicos nos substratos hidrolisados de celulose, capazes de dificultar a fermentação alcoólica, somados ao baixo rendimento em açúcares fermentescíveis (2 a 3%) e a alto volume de resíduos da destilação, reduzem no Brasil, as possibilidades de seu emprego para a produção de etanol.

O etanol, assim como outros álcoois de cadeia curta, pode ser utilizado na produção do biodiesel. Neste caso obtém-se a partir do etanol, um combustível substitutivo para a utilização em motores diesel, não a gasolina.

Entretanto, devido a menor disponibilidade e maior preço do etanol e em outros países que não o Brasil ‘a falta principalmente do domínio completo no processo de produção a partir do álcool etílico, tem-se uma produção mundial de biodiesel ainda sustentada no metanol.

Além disso, deve-se considerar que existem diferenças significativas nos processos de obtenção e purificação dos ésteres metílicos e etílicos. Quando se utiliza etanol, a separação da glicerina fica mais complicada e para que se consiga boa separação, o álcool em excesso na reação deve ser retirado do meio.

Assim, a maioria das pesquisas desenvolvidas tem utilizado o álcool metílico no processo de transesterificação (MEHER *et al*, 2006).

Apesar disto, utilização do etanol em um programa brasileiro de produção de biodiesel é vantajoso devido a sua produção em larga escala que também resulta em menor preço. Além disso, o Brasil possui uma enorme diversidade em oleaginosas distribuídas por todo o seu território e potencialidade para incremento no cultivo de várias outras, favorecidas pelo tipo de solo e clima. Estes fatores aliados devem alavancar a produção do biodiesel no Brasil e impulsionar a economia brasileira de forma ímpar.

Um dos fatores que favorecem a utilização do etanol ao invés do metanol trata-se do fato do metanol ser altamente tóxico, podendo causar cegueira ou morte quando inalado ou ainda ser queimado sem produzir chama visível, inferindo em riscos no seu manuseio.

Apesar disto, nenhuma dessas características são transferidas ao produto final da transesterificação, portanto, o biodiesel metílico, assim como o etílico podem ser considerados ecologicamente corretos.

2.3.3.2. Oleaginosas

O Brasil explora menos de um terço de sua área agricultável, e há grande diversidade de opções em oleaginosas que podem ser aproveitadas na produção do biodiesel (**FIGURA 5**), tais como a palma (dendê) e o babaçu no norte, a soja, o girassol e amendoim nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, e a mamona opção para o semi-árido nordestino. Essa gama de oleaginosas permite a criação de programas de desenvolvimento regionais e estaduais baseados na produção e comercialização de biodiesel.



Fonte: www2.camara.gov.br/ (modificado)

FIGURA 5 - Potencialidade para produção e consumo de combustíveis vegetais. Distribuição das oleaginosas no território Brasileiro. Fonte: www2.camara.gov.br/ (modificado).

Além disso, as palmeiras em geral como o babaçu, o dendê, a macaúba, além de plantas como o pequi e outras, possuem enorme potencial a ser explorado neste sentido, pois se tratam plantas olíferas com alta produtividade de óleo por hectare. Por exemplo, enquanto a soja fornece 0,2- 0,4 toneladas de óleo por hectare, o dendê pode fornecer 3,0- 6,0 toneladas de azeite por hectare e o babaçu 0,1- 0,3 toneladas de óleo por hectare (TABELA III).

Estas espécies estão largamente distribuídas no Brasil, podendo ser encontradas inclusive em sua forma nativa. Estas oleaginosas têm potencial para serem cultivadas em qualquer região do território brasileiro de modo a se tornarem a base produtiva de matéria-prima para a obtenção do biodiesel (DABDOUB, 2007).

Entretanto, a produção de oleaginosas no país é atualmente compreendida por 96% de soja, 3% de algodão e 1% divide-se entre as outras oleaginosas.

O Brasil é o segundo maior exportador mundial de soja em grão, farelo e óleo. Estes fatos fazem com que a implantação de um programa nacional para a produção de biodiesel em grande escala no país, venha apoiar-se inicialmente no óleo de soja.

TABELA III- Produtividade em toneladas de óleo por hectare de algumas oleaginosas no Brasil.
Fonte: <http://www.embrapa.com.br>. Acessado em junho de 2007.

Oleaginosas	Produção média em kg de óleo/ ha
Soja	517
Algodão	683
Amendoim	608
Mamona	350
Dendê	4.400

Apesar disto, o governo brasileiro tem dado incentivo à produção de biodiesel utilizando óleos como o de mamona com intuito de promover a inclusão social de cidadãos de áreas menos desenvolvidas como do Nordeste do país.

O cultivo da mamona hoje é praticado por pequenos agricultores, exige baixo uso de agrotóxicos e é de fácil adaptação a qualquer tipo de solo inclusive em regiões do semi-árido nordestino, o que a tornaria uma matéria prima interessante para a introdução do biodiesel no Nordeste.

Além disso, cada hectare cultivado com mamona absorve dez toneladas de gás carbônico, sendo este valor, o quádruplo da média de qualquer outra oleaginosa. Entretanto, a produção de mamona no Nordeste é baixa e o fomento á ricinocultura deve ser acompanhado de investimentos e pesquisa, que poderiam inclusive ser custeados pela venda de cotas de carbono através do Banco Mundial (FREITAS, FREDO, 2005).

É importante ressaltar que processos convencionais para a produção de biodiesel utilizando óleo de mamona são muito mais dispendiosos tanto economicamente, quanto operacionalmente (energeticamente), em relação aos mesmos processos utilizando qualquer outro tipo de óleo vegetal. Esta diferença se deve as propriedades físico-químicas extremamente peculiares apresentadas pelo óleo de mamona, como por exemplo, sua alta viscosidade e sua alta afinidade pela água (FREITAS, FREDO, 2005).

O Brasil tem um grande potencial na produção de oleaginosas, apoiado tanto por suas condições de clima e solo, quanto por sua extensão territorial. Estes fatores aliados permitem que o país possa desenvolver um expressivo programa de produção de biocombustíveis a partir de diferentes oleaginosas, gerando o desenvolvimento de economias locais.

Ainda, os óleos vegetais residuais de frituras também têm sido estudados na produção do biodiesel, como uma alternativa economicamente viável.

Os óleos residuais são utilizados com frequência na produção de sabões, de massa de vidraceiro e de ração animal. Entretanto, os animais que se alimentam destas rações são impróprios para o consumo humano (CHAO *et al*, 2001).

Ao utilizarem-se óleos residuais de fritura na produção de biodiesel, evita-se o descarte destes óleos residuais no meio ambiente, fornecendo um destino mais adequado aos mesmos e obtém-se um produto de alto valor agregado a partir de matéria prima reciclável. O biodiesel produzido com óleos residuais tem as mesmas características do biodiesel obtido a partir de óleos refinados. Dessa forma o biodiesel tem se mostrado como uma eficiente solução para o aproveitamento desses resíduos, ou seja, atua como protetor do meio ambiente (ZANG *et al*, 2003)

2.3.3.2.1. Definições (óleos, gorduras e azeites)

Quimicamente, óleos e gorduras pertencem a uma extensa classe de compostos chamados de lipídeos. Os lipídeos são biosintetizados a partir do metabolismo de várias espécies vivas. Como resultado, estes estão largamente distribuídos na natureza.

Óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana, formadas predominantemente de produtos de condensação entre o glicerol e ácidos graxos, mais conhecidos como triglicerídeos **(FIGURA 6)** (MORETO, 1998).

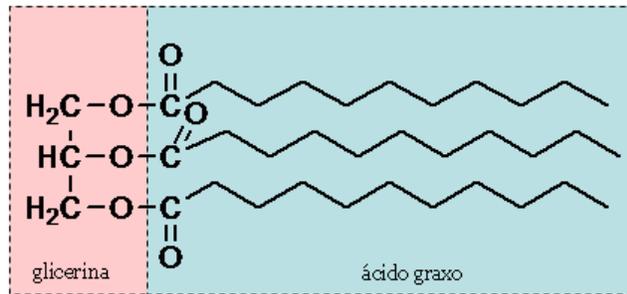


FIGURA 6 - Estrutura química de um triacilglicerídeos.

A diferença entre óleos e gorduras reside na proporção de grupamentos acila saturados e insaturados presentes nos triglicerídeos. Os óleos possuem em sua constituição uma maior porcentagem de grupamentos acila insaturados, enquanto as gorduras possuem uma grande parte de ácidos graxos saturados em sua composição final. Isto faz com que os óleos sejam líquidos e as gorduras sejam sólidas a temperatura ambiente. A resolução n° 20/77 do CNNPA (Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos) define a temperatura de 20°C como limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando os triglicerídeos como óleo quando o ponto de fusão situa-se abaixo de tal temperatura (MORETO, 1998).

A palavra azeite é usada somente para óleos provenientes de frutos, como por exemplo, o azeite de oliva.

Os óleos e gorduras apresentam como componentes, substancias que podem ser reunidas em duas categorias ditas: glicerídeos e não-glicerídeos.

Os glicerídeos são definidos como produtos da condensação do glicerol com até três moléculas de ácido graxo. Os triglicerídeos constituem a maior fração presente nos óleos enquanto ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos correspondem a uma fração inferior a 5% (MORETO, 1998).

Os não-glicerídeos compreendem os fosfatídeos, esteróis, ceras, carotenóides, tocoferóis, lactonas, metilcetonas e vitaminas A, D, E e K. Nos óleos refinados os não glicerídeos estão presentes em proporção inferior a 2% (MORETO, 1998).

Os ácidos graxos têm uma participação importante na constituição das moléculas de glicerídeos e não-glicerídeos chegando a representar até 96% do peso total das moléculas e contribuem nas propriedades características dos diferentes tipos de óleos e gorduras.

Os ácidos graxos têm estrutura molecular do tipo R-COOH, onde R é geralmente uma cadeia de hidrocarbônica longa, saturada ou insaturada, com número par de átomos de carbono (a não ser no caso de ácidos graxos ditos *incomuns*). Os ácidos graxos insaturados predominam sobre os saturados particularmente nas plantas superiores e em animais que vivem a baixas temperaturas.

A **TABELA IV** apresenta as estruturas mais comuns para os ácidos graxos livres que podem estar presentes na composição dos triglicerídeos em sua forma condensada a uma molécula de glicerol. A estrutura dos ácidos graxos pode ser descrita pela notação simplificada **C_n:x**, onde **n** é igual ao número de átomos de carbono presentes no ácido-graxo e **x** indica o número de insaturações da molécula.

TABELA IV - Composição média em percentual de ácidos graxos em óleos vegetais de soja e mamona.
Fonte: ANVISA, 1999.

Ácido graxo	Estrutura	Fórmula	Mamona	Soja
Caprílico	C8:0	$C_8H_{16}O_2$	0	0
Cáprico	C10:0	$C_{10}H_{20}O_2$	0	0
Láurico	C12:0	$C_{12}H_{24}O_2$	0	0
Mirístico	C14:0	$C_{14}H_{28}O_2$	0	0
Palmítico	C16:0	$C_{16}H_{32}O_2$	1,2	14,0
Esteárico	C18:0	$C_{18}H_{36}O_2$	1,0	3,4
Oléico	C18:1	$C_{18}H_{34}O_2$	3,3	25,0
Linoléico	C18:2	$C_{18}H_{32}O_2$	3,6	53,0
Linolenico	C18:3	$C_{18}H_{30}O_2$	0,2	7,5
Ricinoleico	C18:1(OH)	$C_{18}H_{34}O_3$	89,2	0
Eicoisanóico	C20:0	$C_{20}H_{40}O_2$	0	0
Eicosenóico	C20:1	$C_{20}H_{38}O_2$	0,3	0

O óleo de soja, por exemplo, apresenta 18 átomos de carbono na cadeia carbônica de seu principal ácido graxo, o ácido linoléico (44 – 62%) que contém 2 insaturações (C 18:2 (9,12)). Já o seu segundo maior componente, o ácido oléico (19 - 30%), apresenta também 18 átomos de carbono e 1 insaturação (C 18:1(9)).

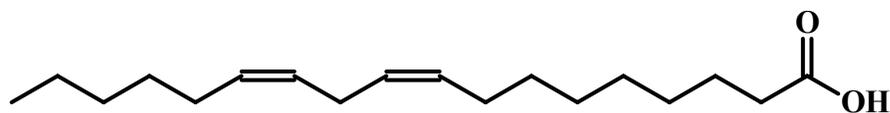


FIGURA 7 - Estrutura química do ácido linoléico.

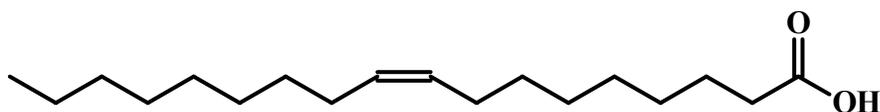


FIGURA 8 - Estrutura química do ácido oléico.

Já o óleo de mamona é conhecido por ser um óleo atípico, apresentando em maior proporção, o ácido ricinoléico (89 – 91%), o qual contém uma hidroxila (OH) ligada ao décimo segundo carbono, densidade de $0,96 \text{ g/cm}^3$, resultando em uma alta viscosidade para este óleo (260 cSt a 40°C) comparada aos outros óleos vegetais (geralmente 30 cSt a 40°C).

Estes valores característicos são decorrentes da formação de ligações intermoleculares de hidrogênio entre os grupamentos R dos ácidos graxos do triglicerídeo.

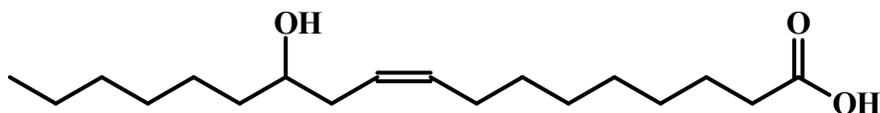


FIGURA 9 - Estrutura química do ácido ricinoleico.

2.3.3.2.2. Utilização de óleos vegetais como combustíveis

Os óleos vegetais foram utilizados como combustível em motores diesel bem antes da crise energética entre os anos de 1970 e 1980, entretanto não existem muitos registros na literatura dos feitos antes de 1950.

Os óleos vegetais foram utilizados como combustíveis estratégicos durante a Segunda Guerra Mundial. Nessa época, o Brasil optou por proibir a exportação do óleo de algodão, de modo a substituir a importação do diesel. Também durante a Segunda Guerra Mundial, a China incrementou a produção do óleo de Tung e outras oleaginosas para transformá-los em gasolina e querosene.

Uma indicação comum da literatura é a criação do motor diesel por Rudolf Diesel em 1895, lançado em Paris na exposição Universalle. O motor que hoje leva seu nome utilizava amendoim como combustível (SHAY, 1993).

Sabe-se atualmente que fatores inerentes à composição dos óleos vegetais (longa cadeia carbônica da molécula dos triglicerídeos e de sua alta massa molecular) (**TABELA V**), como a alta viscosidade (11 a 17 vezes maior que a do diesel), baixa volatilidade e a necessidade de altas temperaturas para a combustão inviabilizam a utilização direta destes óleos em motores diesel. Como resultado de uma combustão incompleta e vaporização incorreta, ocorre polimerização, formação de depósitos de carbono no motor, entupimento de filtros e bicos injetores (**FIGURA 10**), além do aumento de emissões de gases poluentes e diminuição da vida útil do motor.

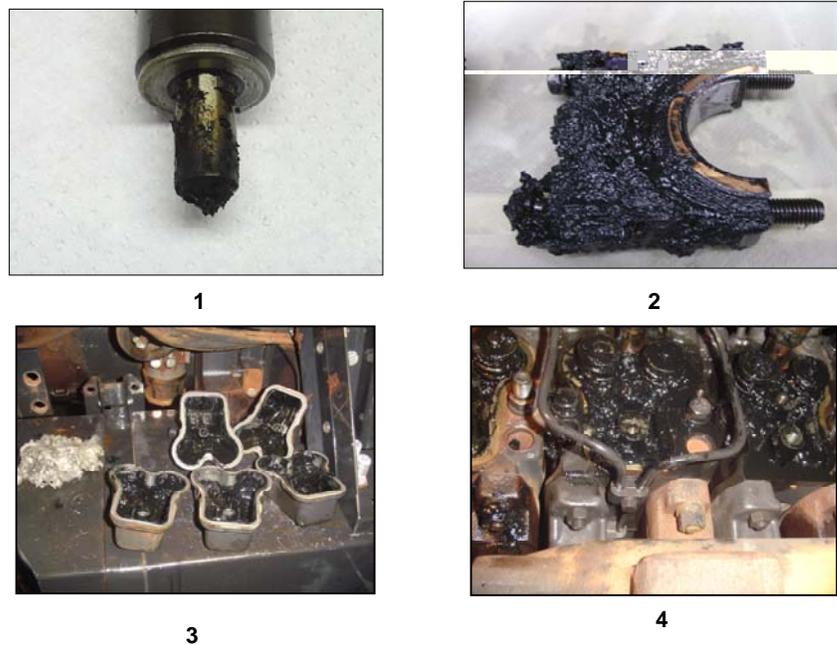


FIGURA 10 - Depósitos de carbono em motores diesel formados a partir de combustão incompleta de óleo de girassol puro e polimerização do óleo lubrificante por contaminação com óleo vegetal. (1) Bico injetor; (2) Parte da biela; (3) Tampa do cabeçote; (4) cabeçote.

Dentre as opções existentes para que se pudesse aproveitar o potencial gerador de energia de óleos vegetais em motores tem-se (a) utilização direta dos óleos em motores diesel modificados; (b) conversão dos óleos vegetais através de processos físicos ou químicos de modo a permitir sua utilização sem nenhuma modificação dos motores (MA, HANNA, 1999).

A opção (b) tornou-se a mais viável devido a dificuldades inerentes ao ajuste de motores para a combustão completa dos óleos vegetais e assim, iniciaram-se as pesquisas para a conversão dos mesmos de modo a se obterem biocombustíveis derivados.

Dentre os possíveis processos de conversão de triglicerídeos podem ser observados os processos de transformação físicos como a *pirólise* e as *microemulsões*, além de processos químicos como a *transesterificação* e a *esterificação*.

TABELA V – Especificações de alguns óleos vegetais *in natura*[§] e do óleo diesel

Características	Tipo de óleo		óleo diesel*
	mamona	soja	
Poder calorífico (Kcal/Kg)	8913	9421	10950
Ponto de névoa (°C)	10	13	0
Índice de cetano	nd	36-39	40
Densidade a 25°C	0,9578	0,872	0,8497
Viscosidade a 37,8°C (cSt)	285	36,8	2,0-4,3
Destilação a 90% (°C)	nd	370	338
Teor de cinzas (%)	nd	nd	0,014
Cor (ASTM)	1,0	nd	2,0
Resíduo de carbono Conradson sobre 10% do resíduo seco (%)	nd	0,54	0,35

[§] (COSTA NETO *et al*, 2000). *Especificações de óleo diesel descritos por PIYAPORN *et al* (1996).

2.3.3.2.2.1. Pirólise

A pirólise provoca mudanças químicas na estrutura de uma substância devido a aplicação de energia térmica podendo ocorrer em presença ou em ausência de um catalisador. A pirólise geralmente ocorre em ausência de oxigênio e as moléculas do reagente são clivadas de modo a se obter moléculas menores que as moléculas originais.

O material pirolisado pode ser óleos vegetais, gorduras animais, ácidos graxos ou ésteres metílicos de ácidos graxos. Dessa forma, a pirólise de gorduras foi investigada por mais de 100 anos. Desde a primeira Guerra Mundial esta é utilizada com o objetivo transformar óleo vegetal em derivados combustíveis (MA, HANNA, 1999).

O problema enfrentado na pirólise decorre do grande número de compostos que podem ser formados a partir da aplicação de energia térmica a diferentes tipos de óleo e por diferentes tipos de processo pirolítico (CROSSLEY *et al*, 1962; BILLAUND *et al*, 1995).

Alcanos, alcenos, compostos aromáticos, ésteres, CO, CO₂, água e H₂ são obtidos em variadas proporções. Muitos estudos foram realizados no sentido de controlar a obtenção de produtos obtidos a partir da pirólise, dentre estes, o estudo da temperatura como um dos parâmetros de influencia foi verificado.

Entretanto, os equipamentos necessários para a pirólise são caros e a conversão obtida é modesta. Adicionalmente, apesar de os produtos obtidos serem similares aos derivados de petróleo, a remoção de oxigênio durante o processo também remove os benefícios ambientais de um combustível oxigenado, tornando-o menos atrativo que o próprio diesel de petróleo. Resíduos sólidos e cinzas de carbono são gerados durante a pirólise, tornando necessária a inclusão de etapas de remoção dos mesmos.

Por último, obtem-se mais gasolina do que diesel combustível, o que torna o processo caro e inviável (MA, HANNA, 1999).

2.3.3.2.2.2. Microemulsões

A utilização de microemulsões foi estudada com o objetivo de diminuir a viscosidade de óleos vegetais e de modo que estes pudessem ser utilizados em motores diesel. Geralmente para a obtenção destas microemulsões são empregados solventes como etanol ou 1-butanol em mistura com o óleo. A microemulsão é definida como sendo um equilíbrio coloidal de dispersões isotrópicas formada espontaneamente entre dois líquidos imiscíveis e uma ou mais molécula pequena de característica anfifílica. O objetivo da microemulsão é fornecer um spray característico com fácil vaporização dos constituintes da micela para a injeção no motor. Entretanto, em alguns estudos foram detectados formação de depósito de carbono e combustão incompleta (SRIVASTAVA, PRASAD, 2000; MA, HANNA, 1999).

2.3.3.2.2.3. Esterificação

Na esterificação, ácidos graxos livres obtidos a partir dos óleos vegetais são transformados através de reação com um álcool de cadeia curta, preferencialmente metanol ou etanol (além de propanol e butanol), em presença de um catalisador que pode ser ácido, para a obtenção mais comum de monoésteres metílicos ou etílicos (biodiesel) Neste caso, a catálise ácida com ácido sulfúrico é a mais utilizada por propiciar condições mais suaves de reação. (MA, HANNA, 1999).

2.3.3.2.2.4. Transesterificação

A transesterificação tem sido o método mais simples para a transformação de óleos vegetais em combustíveis. Na transesterificação, o óleo é transformado através de reação com um álcool de cadeia curta, preferencialmente metanol ou etanol (além de propanol ou butanol), em presença de um catalisador que pode ser ácido ou básico com característica homogênea ou heterogênea em meio reacional, para a obtenção de monoésteres metílicos ou etílicos (além de propílico ou butílico) e como co-produto, a glicerina.

Nesta reação típica, três moléculas de álcool reagem sequencialmente na presença do catalisador, com uma molécula de triglicerídeo, fornecendo inicialmente o diglicerídeo, posteriormente o monoglicerídeo e por último o glicerol, bem como, três moléculas de monoéster (biodiesel). Todas as etapas reacionais são reversíveis sendo que o equilíbrio total favorece a formação dos produtos. A catálise básica é preferível, pois propicia uma alta taxa de conversão em condições suaves de reação (FREEDMAN *et al*, 1986; NYE *et al*, 1983).

2.3.3.3. Catalisadores na reação de transesterificação para produção do biodiesel

É importante ressaltar que deve-se conhecer as características da matéria prima e do sistema a serem utilizados no processo antes de se optar por um ou outro tipo de catalisador.

Questões como presença de água e ácidos graxos livres na matéria prima original, e características do sistema a ser utilizado, tais como capacidade de implementação de temperatura, pressão, agitação dentre outros fatores são cruciais ao rendimento reacional e a escolha adequada do catalisador e do processo como um todo (MEHER *et al*, 2006).

No que diz respeito a reação propriamente, é conhecido que a transesterificação homogênea tem aumento no rendimento com o aumento da concentração de álcool, temperatura e pressão.

A catálise homogênea é mais comumente utilizada do que a catálise heterogênea, devido principalmente a fatores econômicos, o que resultou em número maior de estudos relacionados a necessidade de aplicação. Existem dois tipos de catálise homogênea aplicadas ao processo de produção do biodiesel, a catálise ácida e a catálise básica.

A catálise básica é usualmente preferível em relação à ácida devido às condições mais suaves e velocidade de reação, entretanto, se houver presença de ácidos graxos livres em grandes concentrações, estes podem formar sabão, portanto uma etapa de pré-esterificação pode ser utilizada integrando a catálise ácida numa etapa inicial de reação com a catálise básica numa etapa final.

No caso da catálise ácida a presença de ácidos graxos livres não acarreta maiores prejuízos, entretanto, são imprescindíveis pequenas quantidades de água (menos que 0,5% em massa) (SHUCHARDT *et al*, 1997).

A catálise homogênea permite a conversão de triglicerídeos a temperaturas relativamente baixas, através do uso de catalisadores relativamente baratos.

Entretanto, a etapa de isolamento dos produtos é dispendiosa e portanto são necessárias etapas adicionais de lavagem para que se consiga a remoção de catalisador residual do meio reacional, além disso, a reutilização do catalisador é complicada por fatores diversos. Estes inconvenientes não são observados quando a catálise heterogênea é utilizada (LOTERO *et al*, 2006).

O catalisador heterogêneo é facilmente removido do meio reacional sem necessidade de etapas mais complexas, o que permite sua reutilização por longos períodos de tempo. Seu uso é, portanto extremamente desejável em processos de produção contínua de biodiesel.

Apesar disto, na maioria dos trabalhos descritos que usam catalisadores heterogêneos são necessárias, altas temperaturas e altas pressões para que reação ocorra em intervalo de tempo considerável (LOTERO *et al*, 2006).

Muitos tipos de catalisadores sólidos têm sido utilizados tanto na esterificação de ácidos graxos livres quanto na transesterificação de triglicerídeos para a obtenção de biodiesel. Alguns catalisadores heterogêneos são capazes de promover tanto uma quanto outra reação, entretanto são necessários estudos adicionais para que se conheça a total capacidade de atuação destes catalisadores, principalmente no que diz respeito aos catalisadores ácidos sólidos.

2.3.3.3.1. Catálise básica homogênea

O processo de transesterificação por catálise básica, apresenta uma velocidade reacional de magnitude três vezes maior em relação ao processo ácido homogêneo, utilizando quantidades comparáveis de catalisador.

Assim, o processo utilizando um catalisador básico na conversão de triglicerídeos é preferível em relação ao catalisador ácido em processos industriais, pelo simples fato dos compostos alcalinos serem menos corrosivos do que compostos ácidos (LOTERO *et al*, 2006).

As principais bases utilizadas são alcoóxidos de sódio ou potássio, hidróxidos de sódio ou potássio, carbonatos de sódio ou potássio (KOMERS *et al*, 2001).

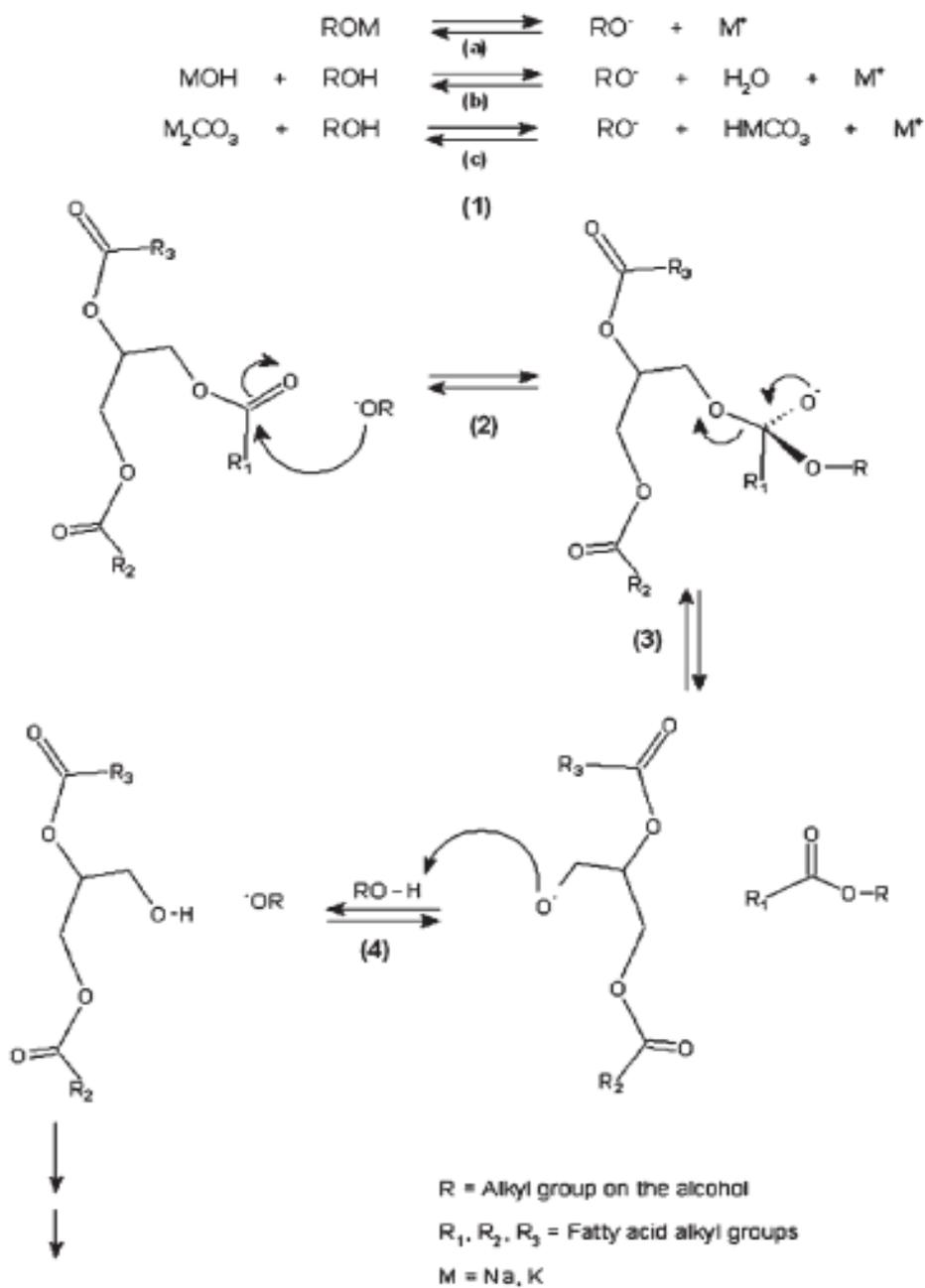
Os hidróxidos são preferíveis aos alcóxidos devido ao fato de serem mais baratos e mais fáceis de manusear em relação aos alcóxidos.

Entretanto, a utilização de hidróxidos gera uma pequena quantidade de água no meio que pode ser responsável pela formação de sabões. Apesar disso, alguns estudos tem mostrado melhores conversões quando os hidróxidos são utilizados (MA, HANNA, 1998).

A presença de ácidos graxos livres também pode ser um inconveniente para reações de transesterificação em meio de catalisador básico homogêneo. Sua presença pode resultar na formação de sabões e emulsões de difícil separação, prejudicando o processo, incrementado etapas de lavagem e diminuindo o rendimento.

O mecanismo de transesterificação por processo básico pode ser observado abaixo (**ESQUEMA 1**), onde a primeira etapa (Eq. 1) é a reação da base com o álcool, produzindo a espécie ativa RO^- .

O nucleófilo RO^- ataca o carbono da carbonila no triglicerídeo gerando um intermediário tetraédrico (Eq. 2). O intermediário tetraédrico é quebrado na migração de pares de elétrons, formando o alquil éster e o ânion correspondente do diglicerídeo (Eq.3). O catalisador protonado transfere um próton a molécula de diglicerídeo desprotonada regenerando a espécie ativa RO^- (Eq.4). Esta seqüência reacional é então repetida mais duas vezes gerando na seqüência o monoglicerídeo e posteriormente o glicerol e biodiesel (LOTERO *et al*, 2006).



ESQUEMA 1 - Mecanismo de transesterificação de óleos vegetais por catálise básica (LOTERO *et al*, 2006).

O estudo da catálise básica homogênea levou a caracterização de três etapas características diferenciadas na velocidade da reação.

A primeira etapa trata-se de uma etapa lenta onde a velocidade da reação é limitada pelo transporte de massa entre os reagentes de baixa miscibilidade, o óleo não polar e o catalisador dissolvido no álcool. Uma segunda etapa mais rápida é observada pela formação de uma emulsão no meio reacional resultante da produção dos ésteres.

Finalmente, em um último estágio, observa-se uma diminuição na velocidade da reação não bem estabelecido.

Alguns autores estudaram a transesterificação utilizando metanol e butanol nas proporções molares 6:1 e 30:1 foi observado que o aumento na proporção molar do álcool em relação ao óleo ocasiona aumento velocidade da reação deste tipo de transesterificação (FREEDMAN, 1998).

Entretanto, foi verificado que o uso de agitação eficiente (600 rpm aproximadamente) e alta temperatura (70°C) são suficientes para eliminar completamente o problema da transferência de massa no primeiro estágio reacional, fornecendo velocidades de reação satisfatórias (NOUREDINI, 1997).

Também, o aumento da temperatura ocasiona aumento no valor das constantes de velocidade reacional nas etapas de conversão entre TG, DG e MG. Entretanto, na etapa de conversão entre MG e Glicerol, a constante de velocidade reacional apresenta-se inversamente proporcional ao aumento da temperatura.

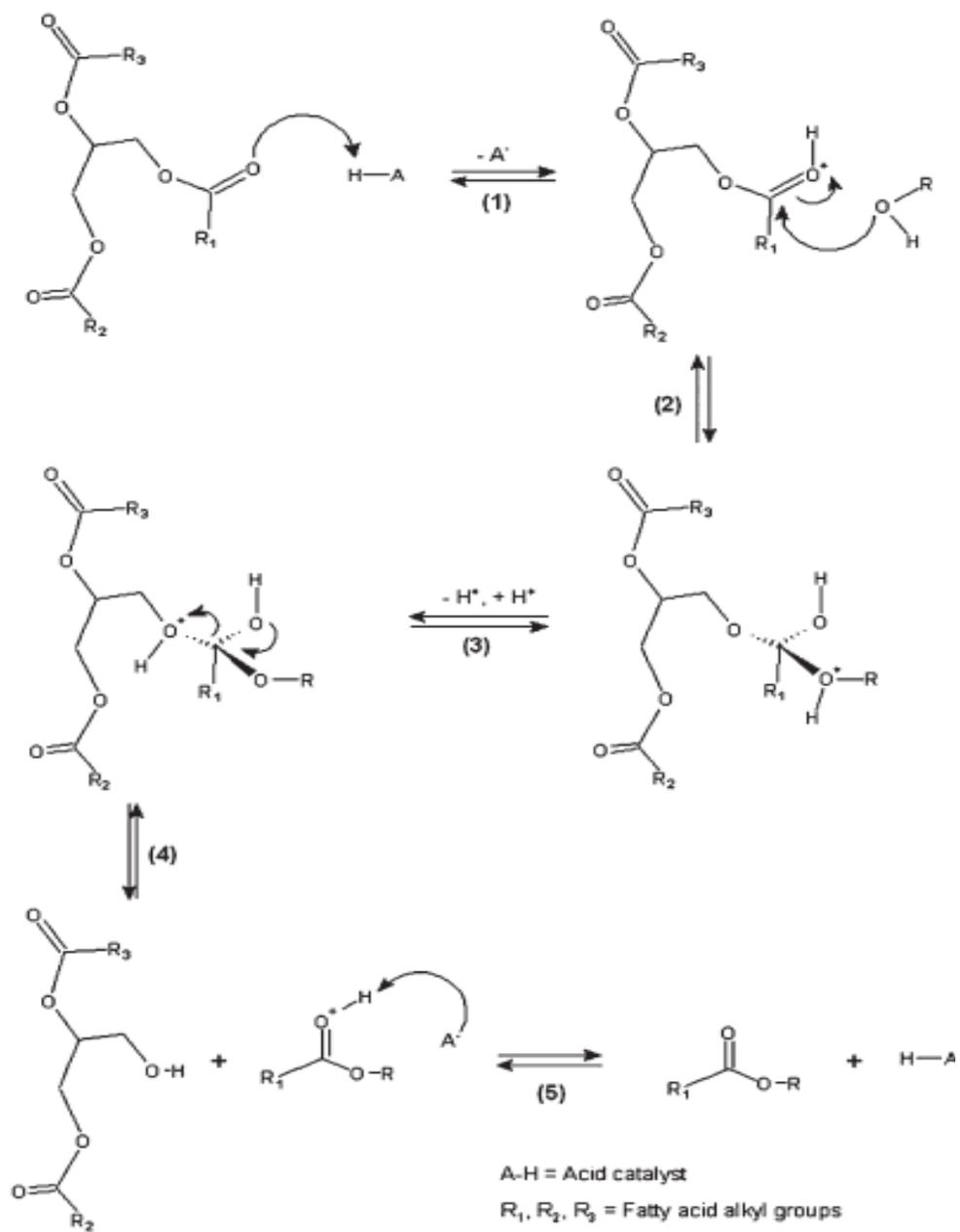
Algumas reações utilizando co-solventes como THF, tolueno e MTBE também foram testados para este tipo de reação, mostrando serem eficientes tanto no que diz respeito à velocidade da reação, quanto no rendimento (KRISNAGKURA, 1992).

2.3.3.3.2. Catálise ácida homogênea

A catálise ácida homogênea, além de ser mais lenta em relação à catálise básica, oferece maiores riscos ambientais e necessita de materiais especiais devido à alta corrosividade dos ácidos empregados.

O processo de transesterificação por catálise ácida utiliza os ácidos sulfônico, sulfúrico, fosfórico, hidrocloreídrico e outros na conversão de ácidos graxos livres a biodiesel. Esses catalisadores proporcionam um alto rendimento reacional, mas requerem altas temperaturas, geralmente acima de 100°C e um tempo de reação superior a 3 horas para a completa conversão.

O mecanismo para a reação de transesterificação utilizando catalisadores ácidos está demonstrado abaixo (**ESQUEMA 2**).



ESQUEMA 2 - Mecanismo de transesterificação de óleos vegetais por catálise ácida (LOTERO *et al*, 2006).

Inicialmente, o grupo carbonila do triacilglicerídeo é protonado pelo catalisador ácido. Numa segunda etapa, o grupamento carbonílico ativado sofre o ataque nucleofílico do álcool, formando um intermediário tetraédrico.

Na terceira etapa, o solvente dá assistência à migração do próton no intermediário tetraédrico, de modo a propiciar um bom grupo de saída. Na quarta etapa ocorre à clivagem do intermediário tetraédrico hemiacetal, fornecendo um mono-éster protonado e uma molécula de diglicerídeo. Na quinta etapa, o próton é transferido do mono-éster, regenerando o catalisador ácido. Esta seqüência se repete por mais duas vezes resultando em três moléculas de biodiesel e uma de glicerina (LOTERO *et al*, 2006).

Para que a catálise ácida ocorra, é necessária a protonação do grupamento carbonílico no triacilglicerídeo e tal interação será responsável pela eletrofilicidade do carbono do grupamento carbonílico fazendo com que este seja susceptível ao ataque eletrofílico. No mecanismo da catálise básica homogênea, a espécie ativa RO^- é um nucleófilo suficientemente forte, portanto, pode-se dizer que o ataque por esta espécie ocorre de forma mais direta.

Assim, a diferença de reatividade entre os mecanismos de catálise homogênea ácida e básica encontra-se na diferença entre a geração das espécies eletrofílicas e nucleofílicas respectivamente (LOTERO *et al*, 2006).

Aqui também pode-se observar três diferentes regimes na velocidade reacional, igual ao que foi descrito para a catalise básica, com uma velocidade inicial lenta limitada pelo transporte de massa, posteriormente tem-se um aumento na velocidade ocasionado pela formação de moléculas de ésteres que passam atuar como agente emulsificante no meio reacional e finalmente uma etapa lenta observada por limitações na atuação do catalisador (LOTERO *et al*, 2006).

A catálise ácida requer o uso de altas concentrações molares álcool: óleo, entretanto, o aumento da concentração de álcool ocasiona apenas moderados aumentos no rendimento reacional.

Além disso, alguns autores têm demonstrado que a presença de água no meio reacional pode diminuir o rendimento e inclusive inibir a reação de maneira significativa e de forma mais drástica do que quando se utiliza a catálise básica.

Em geral, a catálise ácida requer altas razões molares de álcool, altas concentrações de ácido, em temperaturas consideradas entre baixa a moderada, o mesmo pode ser dito para no que diz respeito à pressão.

2.3.3.3.3. Catálise heterogênea

Em estudos sobre a reação de transesterificação foi observado que o material metálico de reatores estaria influenciando na catálise da reação. Verificou-se a partir daí, uma atividade catalítica neste tipo de reação, promovida por metais como níquel paládio. Iniciaram-se então as pesquisas em reações de transesterificação utilizando catalisadores metálicos de vários tipos. Muitos destes catalisadores não utilizam o metal em sua forma pura reduzida, mas na forma de complexos organometálicos ancorados, bem como catalisadores análogos aos homogêneos, entretanto fixados a um suporte sólido.

Foi proposto que tanto em solução quanto na forma suportada o titânio, por exemplo, é capaz de atuar na reação de transesterificação como ácido de Lewis, formando um complexo ativado nucleofílico com o grupamento carbonila capaz de sofrer ataque pelo álcool reagente.

O intermediário tetraédrico formado é então quebrado produzindo o complexo de Lewis éster-metálico. O éster é desorvido do complexo e o ciclo se repete. Em geral estes complexos são sensíveis à presença da água.

Dentre os metais utilizados, o titânio como catalisador mostrou a melhor atividade catalítica, entretanto, outros complexos metálicos podem ser ancorados como estanho, zinco e paládio. Geralmente estes processos necessitam de altas temperaturas e o álcool deve estar seco e óleo seco e degomado.

O processo deve ser realizado de modo a garantir que o catalisador permanecerá ancorado ao suporte, caso contrário, além de perda de atividade, resíduos em solução podem se tornar difíceis de ser removidos, o que geralmente acarreta alta toxicidade ao produto.

A catálise heterogênea básica clássica, onde uma base de Lewis ou Brønsted está ligada a um suporte sólido, é a catalise heterogênea que concentra maior número de estudos.

Dentre estes estudos, podemos citar o uso de zeólitas e outras estruturas como titanossilicatos microporosos ligadas a espécies trocadoras de íons como Na^+ , K^+ ou Cs^+ tiveram seu efeito catalítico estudado e comparado na metanólise do óleo de soja. Os titanossilicatos utilizando Na^+ e K^+ apresentaram melhores resultados que as zeólitas em geral (SUPPES *et al*, 2004).

Outra série de reações para testar a atividade catalítica do CaO foram realizadas utilizando metanol e óleo de canola na proporção 6:1. Os melhores resultados (95%) foram observados quando utilizados CaO (9,2% em massa) em MgO após 12 horas reacionais.

A catálise heterogênea empregando CaO tem sido questionada em termos da solubilidade do CaO no meio reacional, pois apesar deste ser insolúvel em álcoois a temperatura ambiente, o aumento da temperatura ou presença de glicerina, tornam este catalisador solúvel. Assim, este processo inicia-se a partir de uma catálise heterogênea e torna-se homogêneo (GRYGLEWICS,1999).

No caso de reações empregando apenas MgO, verificou-se que a temperatura de calcinação deste sólido tem grande influencia no emprego do mesmo para reações de transesterificação. Dessa forma, quando calcinado a altas temperaturas, a absorção de CO₂ faz com que ocorra perda da atividade catalítica (PETERSON E SACARRAH, 1984; HATTORI, 2001).

Sais de carbonato também foram utilizados com sucesso em várias reações empregando catálise básica heterogênea para a transesterificação de óleo de soja. Estes catalisadores mostraram ser eficientes na produção de biodiesel mesmo a partir de triglicerídeos com alto conteúdo de ácidos graxos livres (SUPPES, G.J., 2003).

Já os catalisadores ácidos heterogêneos são capazes de realizar dois tipos de reação com os glicerídeos, uma delas trata-se da transesterificação que apresenta poucos resultados na literatura, a outra trata-se da esterificação de ácidos graxos livres, que permitem a conversão do que podemos classificar como matéria prima barata.

Entretanto, estes catalisadores têm despertado grande interesse devido ao fato de permitirem em muitos casos, tanto a transesterificação de triglicerídeos quanto a esterificação de ácidos graxos livres.

A transesterificação em particular, tem sido uma opção focalizada na síntese de , - cetoesteres. Assim, a transesterificação tem fornecido uma rota alternativa direta para a síntese destes tipos de ésteres pela utilização de suportes como as zeólitas.

As zeólitas são largamente utilizadas em reações heterogêneas, uma vez que admitem diferentes tipos de materiais suportados além de flexibilidade na escolha do diâmetro de seus poros, em concordância com o tamanho das moléculas com as quais irá reagir. Além disso, são estáveis a altas pressões e temperaturas.

As reações de esterificação por catalisadores ácidos mantêm o mesmo princípio reacional que a transesterificação na produção de biodiesel.

As zeólitas também são utilizadas nas reações de esterificação por catalisadores ácidos heterogêneos. Estas foram testadas em reações para produção de monoglicerídeos a partir de ácidos graxos.

Uma variedade de suportes mesopóricos como peneiras moleculares tem sido testadas como suporte para o ácido sulfônico na esterificação de ácidos graxos livres como o ácido palmítico em mistura com óleo de soja.

De modo geral foi observado que quanto maior o diâmetro dos poros, melhor é a reação, pois poros de tamanhos muito pequenos acabam por inibir o progresso da reação devido a limitações difusionais. A presença de água no meio pode agravar estes efeitos, através da formação de complexos ao redor do sítio ácido pela formação de ligações de hidrogênio.

Observaram-se reações com conversão eficientemente pronunciada quando se usam suportes com tamanho médio para o diâmetro dos poros entre 22 a 35 \AA .

Assim, características como hidrofobicidade, tamanho dos poros e comprimento da ligação com o ácido estão diretamente relacionados com a atividade catalítica que um catalisador ácido heterogêneo pode oferecer.

Pode-se concluir, entretanto, que o maior problema decorrente da utilização de catalisadores ácidos trata-se da menor velocidade de reação tanto em relação a catálise básica homogênea, quanto em relação a catálise ácida homogênea uma vez que observa-se um número pequeno de sítios ácidos nos suportes sólidos quando comparados a catalise homogênea.

O processo de produção de biodiesel por catálise heterogênea, pode ocorrer ainda, por conversão completa de triglicerídeos de qualquer origem, podendo ser eles, neutros, ácidos, brutos, degomados, semi-refinados ou refinados, em uma ou duas reações de transesterificação, em um tempo reacional entre 1 e 9 horas empregando novos catalisadores em fase sólida como CuCl e CuCl_2 , que podem ser associados ou não a SiO_2 e Al_2O_3 (agentes adsorventes), que são removidos facilmente por filtração após o final da reação química, assim como o catalisador heterogêneo empregado. Este tipo de processo é considerado muito versátil pela capacidade de conversão de diferentes tipos de matéria – prima graxa inclusive de ácidos graxos livres, obtendo-se uma taxa de conversão superior de 97 a 99 % (DABBOUB et al, P.I. 0.702.149-6).

Outro processo eficiente trata-se da reação de transesterificação, novamente em uma ou duas etapas reacionais, em um tempo reacional entre 5 e 30 horas, empregando o pentóxido de vanádio, que pode ser associado a SiO_2 (óxido de silício) ou Al_2O_3 (óxido de alumínio), sendo removido facilmente por filtração após o final da reação química. Este processo permite obter-se taxa de conversão superior a 98 % (DABBOUB et al P.I. 0.702.448-7).

O controle do teor de umidade em ambos os processos pode ser feito da forma usual permitindo obter-se melhores resultados e a remoção do catalisador é comodamente realizada por filtração. Ainda, nestes processos o excesso do álcool (de 5 carbonos ou

menos) é recuperado e sucedem etapas de reutilização do mesmo resultando em grande economia no processo produtivo.

O biodiesel obtido através destes processos apresenta elevado grau de pureza, certificado por padrões de qualidade especificados em normas europeias (EN 14214) americanas (ASTM 6751D) e brasileiras (ANP 42).

Dentre as opções ainda existentes, a produção do biodiesel por catalise enzimática tem sido muito estudada devido à comodidade que este processo oferece, tais como obtenção específica do produto de interesse, condições brandas, facilidade na remoção do catalisador do meio onde se encontra o produto, bem como ocorre para os outros catalisadores heterogêneos e possibilidade de reutilização do catalisador em vários ciclos reacionais. Assim, catalisadores enzimáticos, especialmente os catalisadores enzimáticos imobilizados em suporte, permitem aliar as vantagens dos catalisadores químicos homogêneos e heterogêneos, incluindo-se a especificidade reacional.

2.3.3.3.4. Enzimas como catalisadores biológicos

A maior parte da história da bioquímica coincide com história sobre enzimas. A catálise biológica foi inicialmente reconhecida e descrita no final de 1700, em estudos da digestão da carne por secreções do estômago. Em 1800, Louis Paster concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura era catalisada por “fermentos” e postulou que estes fermentos eram inseparáveis da estrutura da levedura, dando origem a hipótese do *Vitalismo*.

Em 1897, Eduard Buchner descobriu que o extrato da levedura era capaz de realizar por si próprio a fermentação e deu início a caminhada ao isolamento de novas enzimas.

James Sumner isolou e cristalizou a urease em 1926 e postulou que todas as enzimas são proteínas.

No final do século XX, a pesquisa com enzimas que catalisam o metabolismo celular foi intensa, fato que levou a purificação, elucidação da estrutura molecular e do mecanismo de várias enzimas, bem como uma compreensão geral sobre a atuação das mesmas (LEHNINGER, 1991).

As enzimas são proteínas de alta massa molecular formadas por subunidades conhecidas como aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas de natureza protéica.

As ligações peptídicas são formadas quando um grupamento amino de uma aminoácido desloca um grupamento hidroxila de outro aminoácido com formação de uma estrutura rígida e plana, com liberação de uma molécula de água (LEHNINGER, 1991).

As enzimas são altamente específicas, apresentam alto poder catalítico e possuem em suas estruturas grupos polares tais como COOH, OH, NH₂, SH e CONH₂ responsáveis pela catálise (LEHNINGER, 1991).

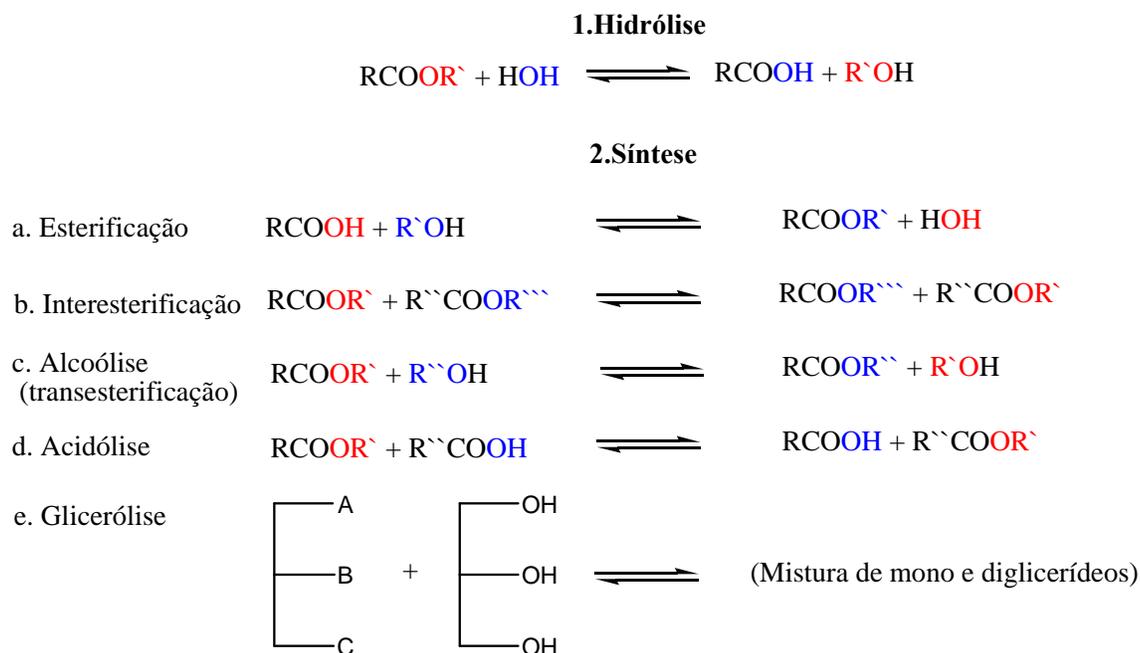
Dentre as muitas vantagens da utilização de enzimas, as mais importantes são a quimiosseletividade, regioseletividade e enantioseletividade (LEHNINGER, 1991).

As aplicações de enzimas podem ser divididas em aplicações industriais, aplicação em uso médico e em uso analítico. Estas aplicações estão dentro do que se chama de *biotecnologia*, que apesar de ser um termo difícil de precisar, abrange as áreas da microbiologia, bioquímica, genética, engenharia química e engenharia bioquímica, com o objetivo de melhorar processos já existentes ou possibilitar o uso de novas matérias primas (LIMA *et al*, 2001).

2.3.3.3.4.1. Lipases

As enzimas são classificadas de acordo com as reações que catalisam. Dessa forma as lipases, são um grupo específico de enzimas, classificadas internacionalmente pela *Comissão de Enzimas* como glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3), pois, são um grupo de enzimas que catalizam a hidrólise reversível de triacilglicerídeos de origem animal ou vegetal na ligação éster, fornecendo ácidos graxos e glicerol.

Dentre os processos de maior interesses em tecnologia enzimática, podemos citar as reações catalisadas por lípases (**ESQUEMA 3**).



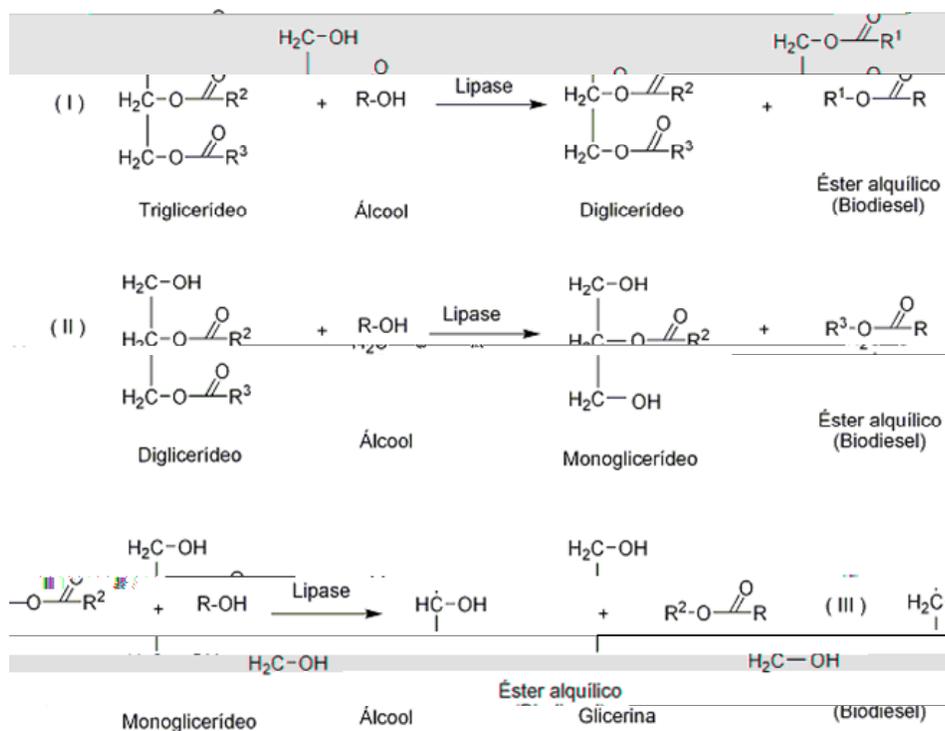
ESQUEMA 3 - Reações catalisadas por lípases (HAYES, 2004).

As lípases catalisam a quebra de ligações éster via reação de hidrólise, mas também podem atuar sobre a reação inversa, ou seja, através da reação de esterificação a partir de um álcool e ácidos graxos para fornecer ésteres e uma molécula de água. O deslocamento do equilíbrio no sentido da hidrólise ou da esterificação pode ser controlado pela quantidade de água presente no meio.

Este tipo de reação pode resultar em diferentes produtos dependendo da molécula utilizada como fornecedora do grupamento acila, quando esta molécula é um álcool tem-se uma reação de alcólise, quando trata-se de um ácido, tem-se a acidólise, no caso do glicerol, tem-se a glicerólise e no caso de um éster, tem-se a interesesterificação.

Quando a enzima catalisa reações em quantidades controladas de água, um nucleófilo como uma molécula de álcool pode formar um éster a partir de um intermediário enzima-acilada, permitindo a obtenção do produto de interesse.

Esta reação ocorre através da formação dos intermediários mono e diglicerídeos e pode ser utilizada na produção dos ésteres alquílicos em questão **(ESQUEMA 4)**.



ESQUEMA 4 - Etapas da reação de transesterificação de triglicerídeos por lípases com formação dos intermediários monoglicerídeo e diglicerídeo (TURKAN, KALAY, 2006).

Dentre os vários processos industriais que utilizam estas reações podemos citar a reação de hidrólise de triglicerídeos sendo utilizada no processo de obtenção de ácidos graxos em larga escala, na introdução de aromas em produtos lácteos e na formulação de sabões com ação enzimática.

Já a interesterificação é utilizada na indústria para modificação da estrutura de grupamentos acila em azeites como o de dendê para produção de óleos com estruturas diferenciadas e também na produção de margarinas que tenham ponto de fusão mais alto ou que sejam mais facilmente hidrolisados pela lípase pancreática humana.

A esterificação é utilizada para ácidos graxos na síntese de ésteres com propriedades organolépticas (SÁNCHEZ, 1995).

2.3.3.3.4.2. Mecanismo da catálise enzimática

No caso de uma reação catalisada enzimaticamente, ocorre a formação de um intermediário reacional dito complexo enzima-substrato.

O complexo enzima-substrato foi deduzido a partir da alta especificidade das enzimas em catalisar as reações. Este alto grau de especificidade levou Emil Fischer em 1894 a sugerir a hipótese do modelo chave-fechadura, em que uma certa região da enzima chamada *sítio ativo* seria complementar em tamanho, forma e natureza química ao substrato (SEGEL, 1975).

Posteriormente, descobriu-se que existe um arranjo espacial preciso e específico dos grupamentos R dos aminoácidos do sítio ativo, induzido pelo contato com o substrato. Apenas dois ou três aminoácidos do sítio ativo podem participar da reação com o substrato (tríade catalítica), entretanto, um grande número de resíduos não catalíticos tem o papel importante de manter a estrutura terciária da enzima, através de interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, pontes de enxofre e interações hidrofóbicas, para que a catálise possa ocorrer efetivamente.

No sítio ativo, vários aminoácidos através de interações fracas, entretanto múltiplas, fazem com que haja o encaixe preciso do substrato, restringindo a liberdade rotacional do substrato e immobilizando-o em uma conformação única.

Dessa forma, uma parte da energia de ativação é fornecida diretamente pelas forças de ligação entre enzima e substrato (dito complexo intermediário **ES**). E os estados de transição dos substratos estão ligados mais fortemente à enzima que os substratos não ativados.

Pode-se dizer, portanto, que o sítio ativo da enzima é complementar ao estado de transição do substrato (**FIGURA 11**) (LEHNINGER, 1991). Posteriormente ao estado de transição ocorre um rearranjo dos grupos funcionais participantes da catálise no sentido da obtenção (liberação) produtos.

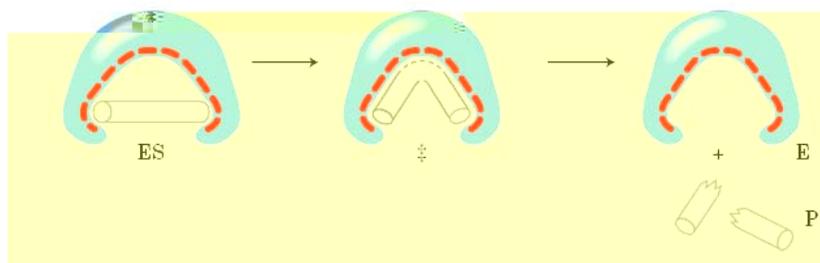


FIGURA 11 - Catálise enzimática por intermediário reativo complexo enzima-substrato (**ES**) com sítio ativo da enzima complementar ao estado de transição do substrato (LEHNINGER, 1991).

Desde 1990, tem-se descrito a estrutura tridimensional de lipases. Estas enzimas encontram-se amplamente distribuídas na natureza em animais, plantas e microorganismos incluindo fungos, leveduras e bactérias (LIMA *et al*, 2001).

Estudos revelaram que apesar de estas possuírem diferentes sequências de aminoácidos na estrutura primária, seu centro ativo possui uma estrutura física (terciária) semelhante, com um núcleo de β -folhas dispostas paralelamente, rodeadas por α -hélices.

O núcleo inclui a “tríade catalítica” típica das lipases, com a presença dos resíduos de aminoácidos serina, histidina, aspartato ou glutamina, inseridos na cavidade catalítica onde o substrato encaixa-se durante a catálise (JAEGER, REETZ, 1999).

A atividade catalítica da maioria das lípases e que permite diferenciar as lípases de outro grupo de enzimas, as esterases, divide-se em geral em duas etapas principais (DALLA-VECHIA, 2004).

(a) Ativação interfacial: processo pelo qual ocorre a mudança conformacional do sítio ativo da enzima do estado inativo para o estado ativado, através da interação do núcleo da enzima com moléculas de solvente, geralmente água, presentes no meio;

(b) Hidrólise da ligação éster do substrato: compreende a sequência de etapas responsáveis pela formação do produto de hidrólise propriamente dito, até a recuperação da estrutura original da enzima.

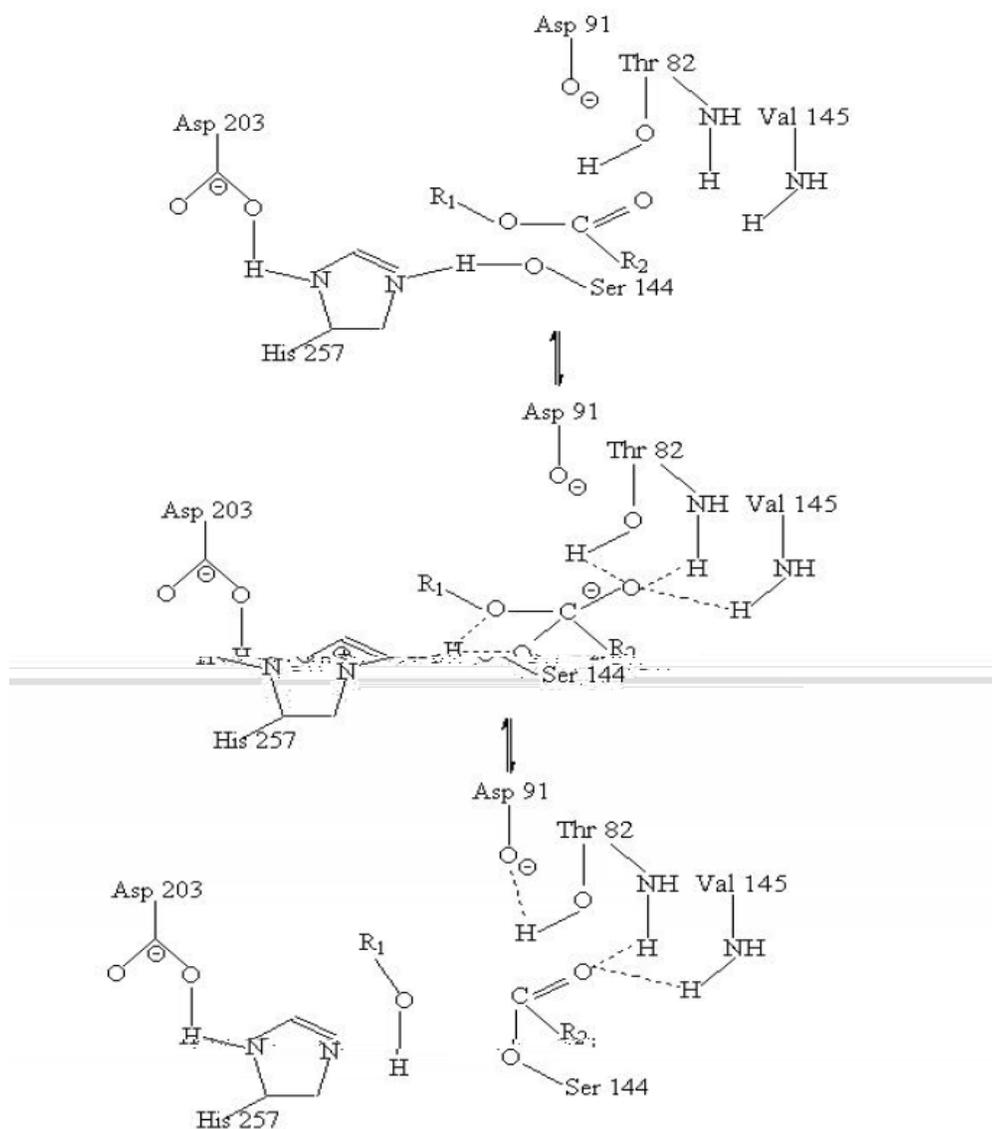
As lípases possuem uma tampa, composta por uma sequência peptídica em α -hélice que dá acesso ao sítio catalítico da enzima. Esta tampa é composta de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, sendo que os hidrofílicos ficam na parte da tampa voltada para o lado de fora do sítio catalítico fazendo com que esta estrutura seja estabilizada por interações na superfície da proteína.

Na presença de superfícies hidrofóbicas como solventes orgânicos, ocorre o fenômeno da ativação interfacial, com reorientação da estrutura em α -hélice da tampa característico das lípases.

Assim, é postulado que na presença de interface lipídeo/água a tampa sofre uma mudança conformacional produzindo o que pode ser chamado de “estrutura aberta” da lipase, a qual expõe o sítio ativo a interação com a interface hidrofóbica do meio conferindo a atividade catalítica, conforme ilustrado no próximo item.

O processo de hidrólise das lípases é caracterizado por etapas de ataque nucleofílico ao átomo carboxílico da ligação éster pelo oxigênio da serina do sítio catalítico, com formação de um intermediário tetraédrico, que é estabilizado pelos hidrogênios ligados aos

átomos de nitrogênio dos resíduos da cadeia principal da enzima. Um álcool é liberado após a formação do complexo enzima-acilada, o qual é finalmente hidrolisado liberando o ácido graxo e regenerando a enzima (**ESQUEMA 5**).



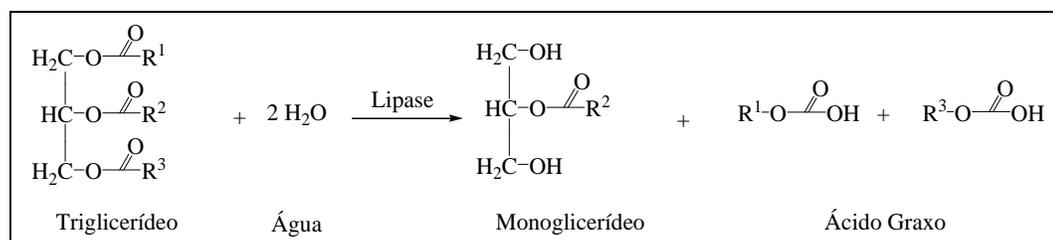
ESQUEMA 5 - Mecanismo da atuação catalítica de lípases, com base nos resíduos de serina, histidina e aspartato da tríade catalítica (SHIMID, VERGER, 1997).

2.3.3.4.3. Especificidade enzimática

As lípases podem apresentar especificidades na hidrólise do substrato quanto a, um determinado lipídeo, certa região do triacilglicerídeo ou um determinado tipo de ácido graxo do triacilglicerídeo.

No que diz respeito a sua atuação sobre determinada região do triacilglicerídeo, as lípases podem ser divididas em dois grupos, o das lípases inespecíficas (não específicas) e o das lípases 1,3-específicas. Lípases não específicas hidrolisam moléculas de triacilglicerol em posição randômica, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Exemplo deste tipo de lípase é a *Candida antártica A*.

Lípases 1,3 específicas liberam ácidos graxos pela hidrólise preferencial das posições 1 e 3 do triacilglicerídeo, formando por esta razão produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lípases não regioseletivas, ou mesmo pelo catalisador químico.



ESQUEMA 6 - Reação regioseletiva de hidrólise em óleos vegetais por catalisador enzimático, lipase 1,3-específica.

Algumas lipases com especificidade pelo substrato, por exemplo, atuam preferencialmente na hidrólise de triglicerídeos com ácidos graxos específicos.

A lipase *Cândida antarctica* é capaz de atuar na alcóólise de triglicerídeos com ácidos graxos insaturados fornecendo ésteres alquílicos correspondentes, enquanto a lipase *Pseudomas* atua preferencialmente sobre outros ácidos que não os insaturados.

Ésteres com ácidos graxos insaturados ou sem insaturação no carbono 9, são em geral, lentamente hidrolisados (LIMA *et al*, 2001).

2.3.3.3.4.4. Lipozyme TL IM

A lipase de nome comercial Lipozyme TL IM foi cedida pela NOVOZYMES para o presente trabalho e trata-se de uma triacilglicerol lipase 1,3-específica (isto é, hidrolisa ligações em TG preferencialmente nas posições 1 e 3). Ela é extraída do microorganismo *Thermomyces lanuginosus* produzida por fermentação submersa do microorganismo geneticamente modificado *Aspergillus oryzae*.

A *Thermomyces lanuginosus* foi inicialmente denominada Humícola *lanuginosa*, fato elucidado em publicação sobre a disponibilidade comercial de lipases obtidas a partir de fungos e bactérias (CASTRO *et al*, 2003).

Esta lipase possui diferente atuação catalítica comparando-se à lipase *Cândida antártica A*, devido ao fenômeno de “ativação interfacial” estar presente em seu mecanismo de atuação catalítica, enquanto que, para a *Cândida antártica A*, o mecanismo de catálise ainda não está bem definido.

No caso da *Thermomyces lanuginosus*, a tríade catalítica, constituída pelos resíduos de aminoácidos Ser (146)-Asp (201)- His (258) presentes no sítio ativo da enzima, é coberta por um loop de superfície em α -hélice (resíduos 86-93) resultando em uma tampa, que fecha a enzima quando esta apresenta-se em sua conformação inativa.

Esta conformação pode então, ser alterada para a conformação aberta em que a enzima é ativa e tem-se como resultado o acesso ao centro catalítico, quando na presença de algumas substâncias específicas como solventes orgânicos .

A LIPOZYME TL IM é imobilizada em sílica porosa granulada com o tamanho de suas partículas variando de 300 μm a 1000 μm . É normalmente utilizada na faixa de 55 °C – 70 °C. Estudos sobre a *Thermomyces lanuginosus* apontaram estrutura globular de 30 kDa. A LIPOZYME TL IM foi desenvolvida inicialmente para reação de interesterificação de óleos vegetais na produção de margarinas (NOVOZYMES, 2006).

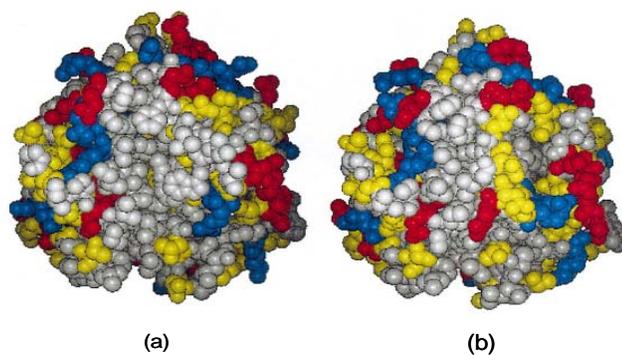


FIGURA 12 - Estrutura globular da *Thermomyces Lanuginosus* nas formas (a) aberta, em que a enzima encontra-se em sua conformação (a) ativa e (b) fechada, inativa (SVEDEN, 2000).

Outra de suas características é o fato da enzima, na forma comercial, apresentar água e ar em seus poros devido ao processo de imobilização, tornando-se necessário um pré-tratamento para a utilização da mesma em reações que exijam condições microaquosas, como a reação de transesterificação, alvo deste projeto.

Conseqüentemente, de acordo com a ficha técnica da NOVOZYMES com relação a LIPOZYME TL IM, o óleo a ser utilizado deve possuir menos que 0,055% em peso de água, não conter ácidos graxos livres além de ser preferivelmente refinado.

Entretanto, alguns autores têm obtido bons resultados sem lançar mão deste artifício em reações com álcool metílico. Acreditam que a água, bem como a sílica presente no meio reacional, auxiliam no processo de migração dos grupamentos acilas dos intermediários 1,2- DGs convertendo-os a 1,3- DGs que são substratos mais susceptíveis a catálise por parte desta enzima . *Türkan e Kalay* descreveram o seguinte mecanismo de catálise para a LIPOZYME TL IM (TURKAN, KALAY, 2006):



ESQUEMA 7 - Etapas reacionais da catálise da reação de transesterificação pela lípases de *Thermomices lanuginosus*, descritas por Turkan e colaboradores (TURKAN, KALAY, 2006).

2.3.3.3.4.5. Imobilização de enzimas

Na natureza, as enzimas geralmente funcionam em soluções aquosas. Por isso a maioria dos estudos realizados em enzimologia tem sido realizados em meio aquoso. De fato, a água participa direta e indiretamente em todas as interações não-covalentes que mantêm a estrutura nativa da enzima cataliticamente ativa.

Uma vez removida a água, pode ocorrer uma distorção drástica da conformação e como conseqüência a inativação da enzima.

Entretanto, mantendo-se um número mínimo de moléculas de água, suficientes para manter sua conformação, é possível garantir a atividade catalítica em meios não usuais como, por exemplo, em solventes orgânicos. Assim, perde-se grande parte da flexibilidade conformacional, porém mantém-se a estrutura nativa.

As enzimas em seu meio natural agem como típicos catalisadores heterogêneos, isto é, encontram-se insolubilizadas. Em 1916, Nelson e Griffin demonstraram a viabilidade de se absorver a invertase em carvão ativo sem perda considerável da atividade enzimática (LIMA *et al*, 2001).

Entretanto, apenas a partir dos anos 60 que as pesquisas se intensificaram no sentido de estabelecer métodos eficientes para imobilizar enzimas por meios físicos e químicos a suportes insolúveis (LIMA *et al*, 2001).

A escolha das condições de imobilização dependem da estabilidade da enzima e do pH na formação das ligações com o suporte e da estabilidade da enzima e do pH nas condições de uso.

Os suportes onde são imobilizadas as enzimas podem diferir em tamanho, porosidade, densidade, forma, podendo ainda ter estrutura orgânica ou inorgânica. A escolha do método de imobilização e do suporte depende principalmente das características da enzima e das condições de uso da enzima imobilizada (LIMA *et al*, 2001).

Dada a grande variedade destes fatores, não existe um método universal de imobilização. Geralmente as condições ideais de imobilização para uma dada enzima só poderão ser determinadas empiricamente.

Deve ser levado em consideração ainda, o fato de que a mudança no tipo de suporte enzimático pode inferir na atividade, bem como no preço da enzima. Assim, busca-se a otimização destes parâmetros.

No que diz respeito à atividade da enzima, por mais suave que seja a imobilização há sempre uma mudança na atividade (LIMA *et al*, 2001). Essa mudança deve-se principalmente a efeitos do tipo:

(a) Estéricos e conformacionais - a mudança na conformação da enzima ligada ao suporte pode abalar sua eficiência catalítica e a interação enzima suporte pode se tornar menos acessível o acesso de substratos ao sítio catalítico;

(b) Efeitos do microambiente - quando ligada a um suporte sólido inerte, a enzima encontra-se em condições diferentes do que quando se encontrava livre. Isso pode interferir na cinética de reação da mesma. Assim, podem ocorrer inclusive, distribuição desigual do substrato nas vizinhanças da enzima devido a interações eletrostáticas hidrofóbicas, o que causa maior dependência entre velocidade reacional e concentração da mesma;

(c) Efeitos difusionais - quando imobilizada sobre ou dentro de um suporte, o substrato deve se difundir até o sítio ativo da enzima.

Se a velocidade de difusão do substrato até o sítio ativo da enzima é menor que a velocidade de conversão pela mesma, não há saturação e a reação não é eficiente.

Assim, a aleatoriedade das interações suporte-enzima, a inexistência de um método de imobilização universal e a redução de atividade devido aos efeitos conformacionais/estéricos; microambiente e difusionais são questões a serem consideradas em um processo de imobilização específico.

Entretanto, o processo de imobilização viabilizou grande parte dos processos industriais utilizando enzimas. Dentre as vantagens da utilização de enzimas em sua forma imobilizada tem-se, a possibilidade de reutilização da mesma, uso em processos contínuos, aumento da estabilidade frente a fatores como necessidade de altas temperaturas, além de possibilidade de utilização em estudos bioquímicos em sistemas “*in vivo*”.

Estas enzimas possibilitam que se atinja o produto de interesse em via direta, além de tornar o processo de obtenção mais “limpo”, ou seja, não há necessidade da eliminação de produtos laterais de reação ou ajuste de pH através de tratamento químico, nem necessidade de etapas exaustivas de lavagem ou extração do produto com auxílio de solventes orgânicos, sendo estas responsáveis por grande parte da geração de resíduos e (ou) encarecimento do processo.

Assim, muitos autores têm estudado a imobilização e concomitante variação da atividade de enzimas imobilizadas em suporte de interesse para aplicação industrial, inclusive na produção de biodiesel. Mohamed M. Soumanou e colaboradores compararam a eficiência de lípases imobilizadas comercialmente disponíveis, com a de lípases imobilizadas em celite ou polipropileno para aplicação na metanólise do óleo de girassol, mostrando que é possível obter bons resultados através da imobilização de enzimas nestes suportes (SOUMANOU, 2003).

2.3.3.3.4.6. Produção Enzimática do biodiesel

Dentre as opções existentes, a produção do biodiesel por alcoolise enzimática tem sido muito estudada devido comodidades que este processo oferece, tais como obtenção específica do produto de interesse, condições brandas, facilidade na remoção do catalisador do meio onde se encontra o produto e possibilidade de reutilização do mesmo em vários ciclos reacionais. Assim, catalisadores enzimáticos, especialmente os catalisadores enzimáticos imobilizados em suportes, permitem aliar as vantagens dos catalisadores químicos homogêneos e heterogêneos, bem como a especificidade reacional.

Os estudos para produção de biodiesel por via enzimática têm focado principalmente a otimização dos processos de produção no sentido de se obter bons rendimentos reacionais em um curto intervalo de tempo de reação.

Para esta otimização, estes estudos têm buscado detalhar a influencia dos parâmetros reacionais na atividade catalítica de determinadas lípases, uma vez que os catalisadores biológicos são extremamente sensíveis às condições reacionais.

Parâmetros como tipo de álcool empregado (cadeia curta, cadeia longa ou ramificada), tipo da enzima (inespecífica ou 1,3 específica), concentração da enzima e do substrato no meio, tipo do substrato quanto à cadeia carbônica dos ácidos graxos, temperatura, agitação, tipo de suporte de imobilização da enzima, pré-condicionamento da enzima, presença ou ausência de solvente orgânico, água ou ácidos graxos livres no meio reacional, são os fatores mais estudados e tem-se observado que estes afetam de maneira significativa a catálise.

Os principais resultados sintetizados até o presente momento podem ser descritos por:

- as observações experimentais devem ser descritas para o sistema em questão, de acordo com a lipase utilizada, lípases diferentes sob mesmas condições podem apresentar resultados muito diferentes;
- as lípases catalizam a transesterificação de triglicérides em reações com maior eficiência quanto maior for a cadeia carbônica dos álcoois;
- a alcólise de álcoois de cadeia curta ocorre mais eficientemente na presença de solventes orgânicos no meio reacional;

- os solventes orgânicos podem atuar como agentes protetores da blindagem do centro ativo da enzima devido a interação com grupamentos polares influenciando na velocidade da reação;

- a presença de água no meio reacional influencia a velocidade de alcóolise de triglicerídeos, mas não altera o equilíbrio final da reação, entretanto a intensidade com que este parâmetro influencia a velocidade da reação depende da enzima em questão;

- a não ser que a lipase seja imobilizada e permita reutilização, o processo reacional pode ser muito dispendioso;

- a utilização de lipases implica em vantagens ambientais, energéticas e quanto a recuperação de produto, sub-produto em relação aos processos químicos convencionais;

- as reações enzimáticas apresentam uma velocidade reacional para a reação de transesterificação consideravelmente baixa em comparação com a reação química, levando em média 24 a 72 horas para a conversão acima de 90% do triglicerídeo ao éster correspondente.

Verifica-se a tendência do uso das enzimas imobilizadas Novozym 435 e Lipozyme disponíveis comercialmente na maioria dos trabalhos de transesterificação enzimática, uma vez que estas apresentam maior número de dados na literatura. O metanol é o álcool utilizado na maioria destes trabalhos, entretanto devido a sua elevada hidrofiliabilidade, são usados outros solventes orgânicos no meio de modo a evitar a inativação da enzima.

Além das implicações gerais citadas acima para as reações enzimáticas, estudos específicos apresentam outras informações adicionais detalhadas para os sistemas utilizados em questão.

Dessa forma, alguns trabalhos, mostram que na reação de transesterificação pelo método enzimático para cada equivalente molar de triglicerídeo são necessários 3 equivalentes molares de álcool metílico adicionados de tempos em tempos para que não haja inativação da enzima (WATANABE *et al*, 2002; KAIEDA *et al*, 2001; MAMORU *et al*, 2001 ; SHIMADA *et al*, 2002 ; SAMUKAWA *et al*, 2000 ; COSTA NETO, 2001; CHEN, 2003).

Segundo Kamori e colaboradores, a enzima pode ser inativada quando a quantidade de álcool adicionado exceder 1,5 equivalentes molares de álcool em relação a quantidade de óleo (KAMORI *et al*, 2000).

Quando o álcool é adsorvido pela enzima a entrada do triglicerídeo é bloqueada causando, portanto a interrupção da reação de transesterificação por inativação da enzima (SHIMADA *et al*, 2002).

Trabalhos desenvolvidos por Chen e Wu, mostram que um álcool com três ou mais átomos de carbono, mais preferencialmente o 2-butanol ou *terc*-butanol, conseguem regenerar a atividade enzimática entre 56% e 75% da atividade original, respectivamente (CHEN, 2003).

De acordo com trabalhos recentes, a imobilização da enzima garante uma reprodução experimental de até 25 ciclos (WATANABE, 2002). Dessa forma, experimentos com lipase imobilizada têm sido viável economicamente em processos industriais, devido a sua reutilização com reprodutibilidade experimental sem perda significativa da atividade enzimática.

Soumanou e Bornescheur estudaram o efeito da presença de solventes orgânicos no meio reacional na tentativa de achar o melhor sistema reacional para a alcóolise do óleo de girassol. Neste trabalho foram testadas enzimas imobilizadas e não imobilizadas, sendo as primeiras comprovadamente mais versáteis.

Hexano e éter de petróleo apresentaram-se como solventes mais convenientes para a conversão das lípases de *Pseudomas fluorescens* e *Rhizomucor miehei* respectivamente. A lípase de *Pseudomas fluorescens* apresentou mais de 90% de conversão para o óleo de girassol em meio livre de solvente com 1:4,5 equivalentes molares de óleo:metanol, enquanto a lípase de *Rhizomucor miehei* foi capaz de atingir 80% de conversão apenas quando o metanol foi adicionado em etapas de 1 equivalente molar em intervalo de tempo de 5 horas entre cada adição.

De acordo com experimentos recentes, o tempo da reação enzimática com lípase de *Candida antártica* pode ser reduzido significativamente de 50 para 3,5 horas se a lipase imobilizada passar por um pré-tratamento com oleato de metila sob 0,5 hora de incubação com posterior lavagem com óleo de soja por 12 horas. O rendimento da reação foi de 97% e a enzima foi reutilizada por até 25 ciclos sem perda significativa da atividade enzimática (SAMUKAWA et al, 2000).

As lípases de *Cândida antartica B* e *Candida antártica A* apresentam características extremamente peculiares em relação às outras lípases utilizadas em reações de alcóolise.

Esta enzima é capaz de manter sua conformação ativa mesmo em condições restritas de água (menos que 1%). O aumento desta concentração pode tornar a reação muito lenta, ao contrário do que é observado para lipases com mecanismo de catálise via ativação interfacial comprovada, como é o caso da *Thermomyces lanuginosus*. (PIYATHERERAWONG et al, 2004; MARTINELLE et al, 1995).

Wei Du e colaboradores demonstraram que a reação de alcóolise utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em sílica ocorre com migração de grupamentos acila da posição 2 para a posição 1(3) do monoglicérideo por interferência do suporte de imobilização. Assim, foi possível obter resultados acima de 90% de conversão utilizando-se 4% de enzima imobilizada e 6% de sílica extra no meio, resultado observado apenas quando foram utilizados 10% de enzima no meio (DU *et al*, 2005).

Jansen e colaboradores utilizaram a lipase 1,3-específica de *Rizophus delemar* imobilizada em polipropileno microporoso, na hidr

otimizadas cresce na ordem MGs < Ésteres metílicos < DGs < TGs, de acordo com o observado em trabalho prévio por Holcapek e colaboradores (HOLCAPEK *et al*, 1999).

Neste trabalho foi descrita a conversão em equilíbrio reversível de TGs para DGs e destes para MGs, que por sua vez são convertidos a ésteres metílicos na última etapa reacional. Foi possível observar, também, a migração de grupamentos acila da posição sn-2 para sn-1 (sn-3) tanto no caso de MGs quanto no de DGs (TURKAN, KALAY, 2006).

Liu e colaboradores, têm descrito a utilização de t-butanol como solvente em transesterificações enzimáticas utilizando as lípases Novozym 435 e Lipozyme TL IM. Em trabalho recente estes autores descreveram o t-butanol como solvente capaz de atuar sobre dois dos efeitos negativos inerentes a transesterificação enzimática que são a inativação da enzima pelo metanol e o acúmulo de glicerina formada durante o progresso reacional no suporte de imobilização das enzimas Novozym 435 e Lipozyme TL IM impedindo o progresso reacional. Além disso, os autores descrevem um rendimento ótimo para a reação de 95% quando utilizadas as lípases Novozym 435 e Lipozyme TL IM combinadas no meio reacional, nas proporções 1:3 respectivamente (LIU, 2006).

Em um outro trabalho estes autores utilizaram o mesmo solvente na produção de biodiesel a partir do óleo de soja destilado e desodorizado e metanol, com a adição de adsorventes capazes de capturar e controlar a quantidade de água presente no meio, tais com sílica gel e peneira molecular. Assim, foi possível obter 97% de conversão utilizando as lípases Novozym 435 e Lipozyme TL IM (LI, 2006).

Em trabalho desenvolvido em nosso grupo de pesquisa utilizando a lipase imobilizada de *Cândida antártica*, disponível comercialmente como Novozym 435, foram estudados os parâmetros de influencia na etanólise dos óleos de soja e mamona.

Dessa forma, foi possível obter-se 91,22% de conversão em ésteres totais após 24 horas de reação e a temperatura ambiente, quando utilizou-se o óleo de soja em 1:9 equivalentes molares em relação ao álcool etílico, na presença de 4% de enzima na forma macerada e pré –incubada segundo tratamento descrito na literatura. No caso das reações empregando óleo de mamona, obteve-se 93% de conversão após 8 horas de reação, nas mesmas condições, entretanto, utilizando-se 3 equivalentes de etanol (HURTADO, 2006).

A otimização dos processos enzimáticos vem sendo estudados por nosso grupo de pesquisa com base nos resultados já obtidos. Estes resultados tem sido analisados em termos de eficiência catalítica de reações enzimáticas bem como em comparação com outros catalisadores do tipo heterogêneos para a obtenção ésteres etílicos utilizando tipos diversificados de matérias-primas.

Diante dos métodos de obtenção de Biodiesel apresentados, podemos comparar algumas vantagens e desvantagens entre os processos químico e enzimático, listados na **TABELA VI.**

TABELA VI - Vantagens e desvantagens dos processos químico (catálise alcalina) e enzimático na produção do biodiesel.

Processos	Vantagens	Desvantagens
Químico (catálise alcalina)	<ul style="list-style-type: none"> - Curto tempo de reação; - Alto rendimento; - Simplicidade do processo; 	<ul style="list-style-type: none"> - Obtenção de produtos com menor grau de pureza; - Necessidade do uso de água no processo de lavagem; - Relativa geração de resíduos; - Impossibilidade de reutilização do catalisador; - Necessidade do ajuste de pH do biodiesel e glicerina; - Maior exposição ao operador.
Enzimático	<ul style="list-style-type: none"> - Facilidade de separação do catalisador do meio reacional; - Reutilização do catalisador; - Condições brandas; - Obtenção de produtos com maior grau de pureza; - Não é necessário ajuste de pH do biodiesel ou glicerina; - Menor exposição ao operador; - Processo limpo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Longo tempo de reação; - Alto custo das enzimas.

A catálise enzimática tem sido estudada com sucesso em nosso grupo de pesquisa. Estes estudos mostraram que a enzima de *Cândida antarctica A*, trata-se de um bom catalisador para reações empregando álcool etílico, óleos de soja e mamona em meio reacional livre de solventes orgânicos e a temperatura ambiente (HURTADO, 2006).

Entretanto, além das condições reacionais, nosso grupo tem estudado a utilização de enzimas com preço reduzido, uma vez que este trata-se de uma das principais desvantagem em processos enzimáticos, podendo ser perfeitamente superado quando número de reutilizações permitidos pela enzima for alto.

3. Objetivos

Determinar uma metodologia adequada e eficiente para a obtenção de ésteres etílicos (Biodiesel) empregando como matéria prima o álcool etílico em reação de transesterificação dos óleos de mamona e soja, utilizando para tanto, um catalisador enzimático, mais especificamente, a lipase extraída do microorganismo *Thermomyces lanuginosus*, comercializada pela NOVOZYMES na forma LIPOZYME TL IM.

Comparar os resultados anteriormente obtidos em nosso grupo de pesquisa utilizando outro catalisador enzimático, a lipase de nome comercial NOVOZYM 435 (*Candida antarctica A*), também gentilmente cedida pela NOVOZYMES, através do ajuste de parâmetros reacionais (HURTADO, 2006).

Viabilizar economicamente a produção enzimática do biodiesel através de menor custo da lípase aqui empregada, uma vez que a LIPOZYME é uma enzima com um custo aproximadamente três vezes menor em relação ao da NOVOZYM 435, fato devido principalmente à diferença no suporte de imobilização destas enzimas. A NOVOZYM 435 é uma lípase de *Candida antarctica A* imobilizada em resina macroporosa, enquanto a LIPOZYME TL IM é imobilizada em sílica (NOVOZYMES, 2006).

Tratar, purificar e quantificar os produtos formados: Biodiesel e Glicerina.

Determinar os parâmetros físico-químicos dos produtos obtidos, tais como: viscosidade, índice de iodo, índice de acidez, teor de água, com a finalidade de que seja atestada sua qualidade e de modo que os mesmos se adequem às normas de certificação nacionais e (ou) internacionais para combustíveis tanto em sua forma pura, quanto na forma de misturas de diferentes proporções entre o biodiesel de soja e o de mamona.

4. Materiais e Métodos

4.1. Matérias Primas utilizadas na produção do biodiesel

4.1.1. Oleaginosas

O triacilglicerídeo utilizado na síntese dos ésteres etílicos na etapa inicial do trabalho foi o óleo de mamona. O óleo de mamona foi doado pela **Bom Brasil Óleos Vegetais S.A.** (Salvador, Bahia- Brasil). Posteriormente, foram testados outros óleos vegetais como o de soja, também gentilmente cedido pela **Brejeiro** (Orlândia, SP- Brasil).

4.1.2. Álcoois

O etanol anidro utilizado nas reações de transesterificação foi recebido como doação da **Crystalsev**, apresentando um teor de água restrito de 0,7 % determinado pelo método coulométrico de Karl Fischer, segundo metodologia descrita em **4.3.11.2.**

4.1.3. Lipases

A lipase de nome comercial Lipozyme TL IM foi cedida pela NOVOZYMES para a realização deste trabalho e trata-se de uma triacilglicerol lípase (E.C.3.1.1.3) 1,3-específica, isto é, hidrolisa ligações em TG preferencialmente nas posições 1 e 3. É extraída do microorganismo *Thermomyces lanuginosus* e produzida por fermentação submersa do microorganismo geneticamente modificado *Aspergillus oryzae* e imobilizada em sílica (NOVOZYMES, 2006).

A Novozym 435, também foi gentilmente cedida pela NOVOZYMES e trata-se de uma triacilglicerol lípase inespecífica. Foi extraída da *Cândida antarctica* produzida também por modificação genética do *Aspergillus oryzae* e imobilizada em resina acrílica macroporosa (NOVOZYMES, 2006).

4.2. Equipamentos

4.2.1. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência - CLAE

O equipamento utilizado para as análises cromatográficas foi um LC-10ATvp da Shimadzu, equipado com um sistema de gradiente para 4 solventes do tipo FCV-10ALvp, com detector de UV do tipo SPD-10Avp e 1 bomba peristáltica. A coluna utilizada foi uma Shim-pack CLC-ODS (M) – C18, em fase reversa, apresentando 4,6 mm de diâmetro interno, 25 cm de comprimento, tamanho de partícula de 5 μ m com diâmetro do poro de 100 . Também foi utilizada uma pré-coluna analítica do tipo Shim-pack G-ODS (4) – C18, apresentando 4 mm de diâmetro interno e 1cm de comprimento.



FIGURA 13 - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) utilizado na quantificação dos ésteres etílicos obtidos através de reação de transesterificação enzimática dos óleos de soja e mamona utilizando a Lipozyme TL IM.

4.2.2. Cromatógrafo Gasoso acoplado a detector de espectrometria de massas – CG-MS

Para identificação e quantificação das frações de ésteres etílicos presentes no biodiesel de soja e no biodiesel de mamona, foi utilizado cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas da marca Shimadzu, modelo QP 2010, com coluna capilar DB-17MS, com 30m x 0,25 μ m de espessura de filme, detector FTD.

FIGURA 14 – Cromatógrafo gasoso utilizado em análises de identificação das espécies presentes em biodiesel etílico de soja e mamona. Propriedade da FFCLRP-USP.

4.2.3. Ressonância Magnética nuclear de prótons e de carbonos - RMN ^1H e RMN ^{13}C

O espectrômetro de RMN utilizado é da marca Bruker equipado com sonda dual para ^1H e ^{13}C . O equipamento foi operado nas frequências 100,61 MHz e 400,13 MHz nas análises de ^{13}C e ^1H , respectivamente. Foram utilizados tubos simples para análise RMN de 5 mm de espessura no acondicionamento das amostras e CDCl_3 como padrão de eluição.



FIGURA 15 - Espectrômetro Bruker DRX 400 utilizado para as análises de RMN ^1H e ^{13}C do presente trabalho. Propriedade da FFCLRP-USP.

4.2.4. Karl Fischer

Para determinação da percentagem de água no óleo empregado nas reações bem como no álcool etílico, foi utilizado um Karl Fischer coulométrico modelo AF7 da marca Orion.



FIGURA 16 - Equipamento Karl Fischer coulométrico Orion AF7 utilizado na determinação de água do álcool etílico e dos óleos utilizados como materiais de partida bem como dos ésteres etílicos obtidos após etapas de purificação obtido em reação de transesterificação enzimática utilizando a Lipozyme TL IM.

4.2.5. Viscosímetro Cinemático

O viscosímetro cinemático da marca Petrodidática foi utilizado nas medidas de viscosidade dos ésteres etílicos obtidos em reações enzimáticas utilizando a enzima Lipozyme TL IM. O equipamento possui capilares com diferentes diâmetros aferidos segundo normas ASTM e banho termostaticado controlado por termômetro aferido ASTM 120C.

A determinação da viscosidade foi realizada a 40°C em viscosímetro cinemático, de acordo com as normas ASTM D446-00 (Standard Specifications and Operating Instructions for Glass Capillary Kinematic Viscosimeters) e ASTM D446-03 (Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids).



FIGURA 17 – Viscosímetro cinemático utilizado na análise dos ésteres etílicos obtidos através de reações de transesterificação enzimática utilizando a Lipozyme TL IM.

4.2.6. Ponto de Fulgor

O equipamento de ponto de fulgor do tipo Perkin Martens com vaso fechado foi utilizado para determinação do ponto de fulgor dos ésteres etílicos obtidos por reação enzimática utilizando enzima imobilizada Lipozyme TL IM. O equipamento utiliza termômetro calibrado segundo norma ASTM 120C para determinação do ponto de fulgor segundo norma ASTM D 93.



FIGURA 18 - Ponto de fulgor do tipo Perkin Martens com vaso fechado utilizado na análise dos ésteres etílicos obtidos através de reações de transesterificação enzimática utilizando a Lipozyme TL IM.

4.2.7. Reatores de vidro para reação com temperatura em enzimática em escala laboratorial

O sistema ilustrado pela **FIGURA 19.a** foi utilizado nas reações a 70° C, com óleo de mamona e foi gentilmente cedido por um intervalo de 2 meses pela Novozymes. A reação a 70°C foi realizada no compartimento interno do funil de placa sinterizada, sob agitação mecânica.

Este sistema foi idealizado para permitir a filtração da enzima, bem como pré-tratamento da mesma e a ainda, a reação no vaso provido de um banho e funil de placa sinterizada.

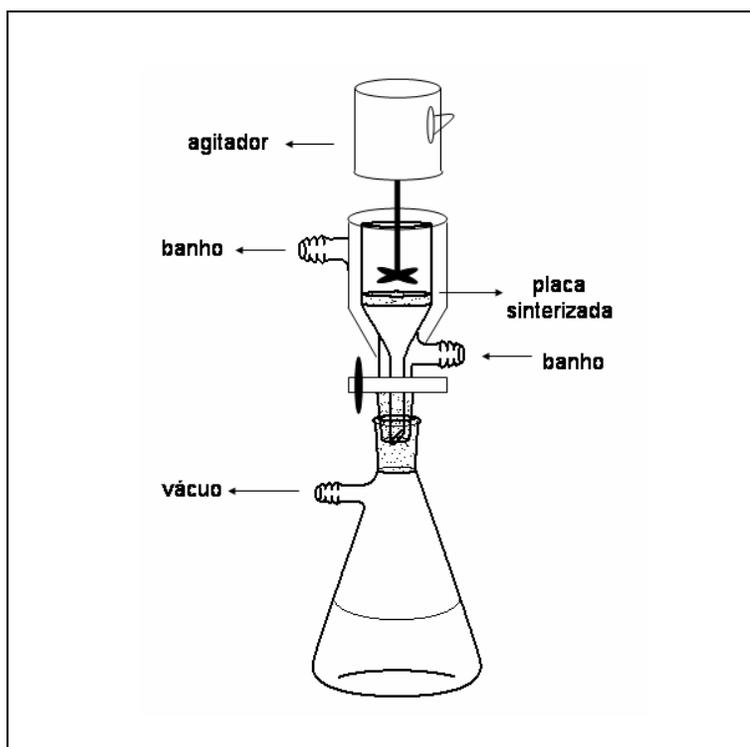


FIGURA 19.a - Reator utilizado nas reações enzimáticas nas condições prescritas pelo fabricante da enzima Lipozyme TL IM. O sistema pode ser utilizado tanto para o pré- tratamento da enzima, para retirada de ar e excesso de água dos poros da enzima, bem como para realizar reações a temperatura constante. A NOVOZYMES descreve como temperatura ótima da enzima, 55 - 70° C.

No caso das reações de transesterificação etílica com os óleos de soja e mamona a 40°C utilizou-se o sistema ilustrado na **FIGURA 19.b**. Este sistema possui jaqueta externa ao vaso reacional ligada a um banho de circulação de água com controle de temperatura. Além disso, conectou-se ao sistema um condensador de refluxo em uma das saídas, de modo a garantir a não ocorrência de perda do etanol utilizado na reação. O sistema foi mantido fechado durante o intervalo reacional.



FIGURA 19.b - Reator utilizado nas reações de transesterificação dos óleos de soja e mamona a 40°C utilizando etanol e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático.

4.3. Metodologias

4.3.1. Determinação da atividade enzimática da Lipozyme TL IM

A determinação da atividade da lipase foi realizada baseando-se no método descrito por HURTADO (2006).

Preparou-se uma solução estoque do substrato p-nitrofenilpalmitato 0,4mM adquirido da Sigma, em Triton X-100 que foi anteriormente preparado em tampão Tris 50mM pH 7,2. Esta solução foi mantida sob agitação para garantir a dissolução completa do substrato. É válido ressaltar que o substrato preparado nestas condições é estável por até 8horas, sendo preferencialmente preparado no momento da análise.

Em pH 7,2 o p-nitrofenol, que é um dos produtos da reação com a lipase, está parcialmente na forma do ânion p-nitrofenolato ($pK = 7,15$) que absorve luz em 400nm com um coeficiente de extinção de $1,15 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ em 10^{-3}M de Triton X-100, 0.05M de tampão Tris e pH 7,2.

Com base nestes dados foi preparado um meio reacional de 4mL contendo 0,2g de lipase na forma de grãos que foi mantido por 4 horas a temperatura ambiente sob agitação.

Apesar da realização de experimentos com a enzima macerada e pré-incubada com éster seguido de óleo, para estas reações a atividade da lipase foi determinada antes da maceração e antes da pré-incubação, conforme será descrito na discussão dos resultados, uma vez que quando a enzima é triturada a solução torna-se turva, impedindo a absorção dos íons p-nitrofenolato no espectrofotômetro.

A absorbância foi determinada a 400nm em espectrofotômetro Genesys 2.

4.3.2. Reação de transesterificação etílica utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

As reações realizadas para o estudo dos parâmetros de influencia sobre as reações enzimáticas utilizando a lípase aqui descrita e a temperatura ambiente, foram realizadas em frasco de 100 mL com tampa, onde 50 mL de óleo foram adicionados. Posteriormente, adicionou-se a enzima e o meio foi homogeneizado com ajuda de agitador magnético. A seguir adicionou-se o etanol.

Tanto nas reações em que foram utilizados 3 equivalentes molares de etanol quanto nas que foram utilizados 9 equivalentes molares de etanol em relação ao óleo, as adições foram realizadas com 1 equivalente molar cada em intervalo de 15 minutos entre as adições com o intuito de evitar a inativação da enzima em meio de excesso de álcool (SHIMADA, 2002).

Durante o progresso das reações, foram coletadas alíquotas de 0,5 mL em intervalos de tempo referentes a 0,5h, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h reacionais. Estas alíquotas foram centrifugadas e o sobrenadante teve o etanol (excesso) evaporado do meio com auxílio de bomba de alto-vácuo, para que pudessem ser submetidas a análises por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Ao final de 72 horas, o meio reacional foi filtrado em funil de placa sinterizada da marca Kontes (porosidade tipo M) para retirada da enzima. A enzima foi lavada no mesmo funil com 2 alíquotas de 20 ml de hexano, deixou-se-a secar ao ar livre e então

aconditionou-se em frascos com tampa, para ensaios posteriores sobre reutilização da mesma.

4.3.2.1. Efeito do teor de etanol em reação de transesterificação etílica utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

Sabendo que uma grande quantidade de solvente orgânico no meio reacional pode inativar a enzima, foram realizados testes adicionando diferentes proporções de etanol em etapas de 1 equivalente molar de etanol cada em intervalos de 15 minutos (HURTADO, 2006). A temperatura de reação, nesta etapa, foi fixada em 25°C e a concentração da enzima foi fixada inicialmente em 4% devido aos bons resultados previamente observados em nosso grupo de pesquisa utilizando-se esta porcentagem de enzima em massa, em relação à massa de óleo presente e temperatura ambiente.

4.3.2.2. Efeito da temperatura em reação de transesterificação etílica utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

Foram realizados ensaios a 25°C, a 40 °C e a 70°C. O intuito de realizar ensaios a 25°C em estudos realizados em nosso grupo de pesquisa, deve-se a tentativa de adaptação do processo à temperatura ambiente, por ser esta uma opção extremamente favorável do ponto de vista energético. Entretanto, de acordo com a ficha técnica do fabricante com relação à LIPOZYME TL IM, esta apresenta atividade ótima nas temperaturas entre 55-70°C.

Tornou-se necessário realizar reações de modo a verificar a diferença entre os resultados obtidos quando utilizada a temperatura indicada pelo fabricante, e a temperatura ambiente. Utilizou-se, portanto o sistema ilustrado na **FIGURA 19.a**.

Também foram realizados experimentos em temperatura ótima descrita por resultados da literatura (40°C). Utilizou-se, portanto o sistema ilustrado na **FIGURA 19.b** (DU, 2005; LI, 2006; TURKAN,KALAY, 2006).

4.3.2.3. Efeito da concentração de enzima em reação de transesterificação etílica utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

Foram realizados testes usando diferentes quantidades de enzima imobilizada no meio reacional, de forma a determinar a concentração ideal de enzima necessária para a transesterificação total dos óleos vegetais nos ésteres etílicos correspondentes em intervalo de tempo razoável. Os resultados observados para cada uma das concentrações foram comparados em termos de conversão no tempo.

Para isso, foram utilizados as mesmas porcentagens em massa de enzima em relação ao óleo empregado em reações com a NOVOZYM 435 anteriormente realizados em nosso grupo de pesquisa, visando também a comparação de resultados.

Dessa forma, as concentrações de 4 ou 10% em massa de enzima imobilizada, foram transferidas para um sistema com 50 ml de óleo de mamona (48,5 gramas). O mesmo procedimento foi realizado em reações utilizando o óleo de soja (47,5 gramas). O álcool etílico foi adicionado em etapas, em proporção pré-estabelecida.

Foram utilizados inicialmente 4% de enzima, devido aos bons resultados (99,8%) obtidos com a Novozym 435, onde as melhores condições reacionais relatadas foram

temperatura ambiente, 1:9 equivalentes molares de óleo em relação ao álcool etílico, enzima macerada e tempo reacional de 24 horas (HURTADO, 2006). Também foram realizadas reações com 10%, para comparação com resultados descritos na literatura.

4.3.2.4. Efeito do pré-tratamento da enzima em reação de transesterificação etílica utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

Testes foram realizados através da pré-incubação da enzima imobilizada antes do início da transesterificação com o objetivo de diminuir o tempo reacional, baseando-se no método de Samukawa e colaboradores (SAMUKAWA, 2000).

Para tanto, procedeu-se da seguinte maneira, em uma primeira etapa adicionou-se um volume de aproximadamente 20 mL de éster etílico de óleo de soja à enzima imobilizada e deixou-se descansar por um período de 0,5 h para a penetração do líquido nos poros do suporte de imobilização, posteriormente foi realizada a filtração seguida de lavagem com óleo de soja.

Posteriormente foi realizada uma nova pré-incubação por um período de 12 h com óleo de soja. Foi então realizada a filtração deste óleo de soja e iniciou-se a transesterificação com novo óleo. Estes ensaios foram realizados com 4% de enzima, para comparação com os outros ensaios onde esta metodologia não foi empregada.

4.3.2.5. Efeito da maceração da enzima em reações de transesterificação etílica utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

Foram realizados ensaios variando a granulometria da enzima imobilizada com o objetivo de verificar-se a ocorrência de aumento na velocidade da reação de acordo com o aumento na superfície de contato. A trituração (maceração) da enzima imobilizada foi realizada com o auxílio de um pistilo e um almofariz.

Estes ensaios foram realizados com 1:9 equivalentes molares de óleo: etanol e uma quantidade de 4% em peso da lípase, a exemplo de outros trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa utilizando esta metodologia, porém uma lípase diferente (HURTADO, 2006).

4.3.2.6. Reação de transesterificação etílica em condições otimizadas utilizando óleo de mamona e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

Uma vez tendo sido estudados os parâmetros de influencia sobre as reações de transesterificação (temperatura, teor de álcool, granulometria da enzima imobilizada, concentração da enzima imobilizada no meio reacional e pré-tratamento da enzima imobilizada) utilizando como matéria-prima o óleo de mamona e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático, foram realizadas novas reações através da utilização destes parâmetros de forma conjugada.

Os melhores parâmetros estabelecidos, segundo resultados obtidos na primeira etapa deste trabalho para o óleo de mamona, foram 9 equivalentes molares de etanol em relação ao óleo, 10% de enzima em massa em relação a massa de óleo utilizada, macerada, sem pré-tratamento em meio reacional a 40°C. Para isso foi utilizado o sistema reacional descrito em **4.2.7 (FIGURA 19b)**.

4.3.2.7. Reação de transesterificação etílica em condições otimizadas utilizando óleo de soja e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

Uma vez tendo sido determinados os melhores parâmetros de influencia sobre as reações de transesterificação utilizando como matéria-prima o óleo de soja e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático, foram realizadas novas reações através da utilização destes parâmetros de forma conjugada.

Os parâmetros estabelecidos segundo resultados obtidos na primeira etapa deste trabalho para o óleo de mamona, foram 3 equivalentes molares de etanol em relação ao óleo, 10% de enzima em massa em relação a massa de óleo utilizada, macerada, sem pré-tratamento em meio reacional a 25°C. Outros detalhes sobre as condições reacionais estão descritos em **4.3.2**.

4.3.2.8. Reação de transesterificação etílica em duas etapas utilizando a Lipozyme TL IM e Novozym 435 como catalisadores enzimáticos

A *Thermomyces lanuginosus* é uma lipase do tipo 1,3-específica quanto à posição de hidrólise de ácidos graxos na cadeia dos triglicerídeos (DU,2005). Esta estereoseletividade quanto à posição de quebra de ligações por parte desta enzima é responsável por um maior número de intermediários mono e diglicerídeos formados na reação de transesterificação de óleos vegetais quando comparada a utilização de enzimas do tipo inespecífica.

Um exemplo de lipase do tipo inespecífica é a lipase de *Cândida antártica*, utilizada em estudos prévios sobre transesterificação enzimática por nosso grupo de pesquisa. Esta enzima foi gentilmente cedida pela Novozymes para estudos de aplicação da mesma na síntese do biodiesel (HURTADO, 2006).

Por tratar-se de uma enzima de alto custo, sua utilização em escala industrial tem sido questionada. Entretanto, por ser uma enzima com alta capacidade de conversão alguns especialistas têm sugerido sua utilização em porcentagens pequenas misturadas a outros catalisadores enzimáticos em reações de transesterificação (TURKAN, KALAY, 2006). Neste sentido temos focado a nossa atenção no uso da Lipozyme TL IM que tem custo muito inferior em relação à Novozym 435.

Com base no fato de a *Thermomyces lanuginosus* (comercializada pela Novozymes como Lipozyme TL IM) descrita neste trabalho ser uma lipase do tipo 1,3-específica, enquanto a *Cândida antártica* (comercializada pela Novozymes como Novozym 435),

utilizada em trabalhos prévios desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, foram realizadas reações de transesterificação enzimática dos óleos de soja e mamona em duas etapas.

Numa primeira etapa de conversão foi utilizada a Lipozyme TL IM, de custo menor, e em proporção maior. Numa segunda etapa reacional, foi utilizada a Novozym 435, de maior preço e em menores proporções.

Para tanto, foi utilizada a seguinte metodologia. A primeira etapa da reação foi realizada segundo metodologia descrita em **4.3.2.6** para as reações com óleo de mamona ou segundo metodologia descrita em **4.3.2.7** para reações onde foi utilizado o óleo de soja. O meio reacional foi então filtrado em funil de placa sinterizada da marca Kontes e com porosidade M para retirada da enzima do meio e submetido a evaporação do excesso de álcool, lavagem e filtragem segundo metodologia descrita em **4.3.10.1**.

O meio reacional foi então coletado em um balão de fundo redondo de 250 ml e submetido a alto vácuo e 70°C por 20 minutos para retirada do resíduo de solventes. A massa do meio reacional foi devidamente pesada e submetida posteriormente à reação com a enzima Novozym 435.

Esta reação foi realizada utilizando-se 1% em massa da enzima Novozym 435 imobilizada em relação à massa pesada relativa ao meio reacional, a enzima foi macerada com ajuda de cadinho e pistilo e submetida a reação pela adição em 9 etapas ao meio reacional de 9 equivalentes molares de etanol em relação a massa do meio (HURTADO, 2006). A reação foi realizada a 40°C.

Foram retiradas alíquotas do meio reacional em intervalos de tempo pré-definidos até 24 horas de reação. Estas alíquotas foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de acordo com metodologias descritas em **4.3.3** e **4.3.8**, respectivamente.

4.3.3. Detecção rápida dos produtos obtidos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A detecção rápida dos produtos formados durante a reação foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) sílica gel 60 F254 suportada em laminas de alumínio (Merck, Darmstadt, Germany).

Os solventes utilizados para correr as amostras de mistura reacional de óleo de mamona foram hexano, acetato de etila e ácido acético, nas proporções de 80: 20:1 (v/v). No caso das amostras provenientes de reação com óleo de soja, foram utilizados apenas hexano e acetato de etila nas proporções 90: 10: 1 (v/v). As placas foram reveladas em iodo. As frações indicadas como ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE), ácidos graxos livres (FFA), monoglicerídeos (MG), diglicerídeos (DG), e triglicerídeos (TG) foram descritas de acordo com dados comparativos da literatura e foram identificadas por cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas (CG-MS) (4.3.5).

As **FIGURAS 20 e 21** são exemplos de análises cromatográficas obtidas durante o progresso das reações com óleo de mamona e soja, respectivamente. Nestas figuras estão indicadas as frações dos compostos intermediários formados em cada uma das reações. Estes perfis cromatográficos também foram observados na interpretação dos resultados obtidos através de cromatografia em camada delgada em todas as reações realizadas neste trabalho.

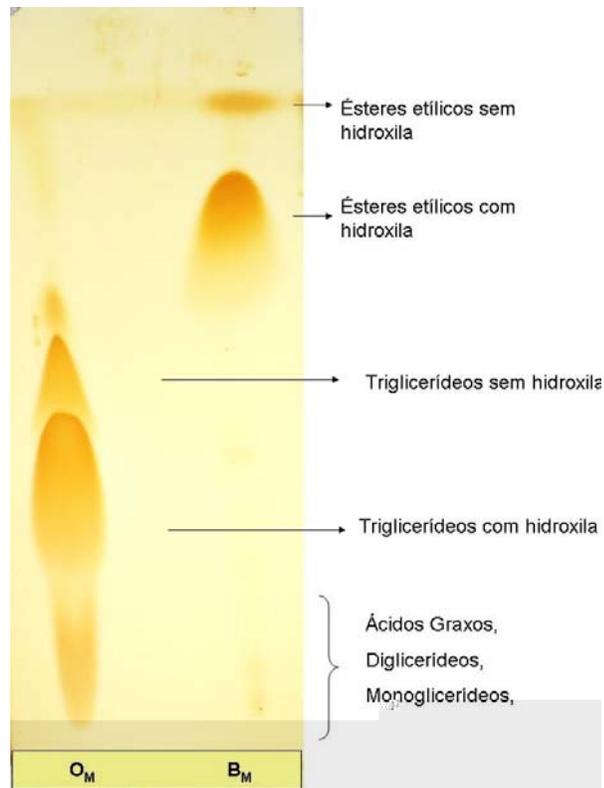


FIGURA 20 - Perfil cromatográfico das análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de fração obtida na reação que utilizou como materiais de partida o óleo de mamona. O_M corresponde ao perfil cromatográfico do material de partida: o óleo de mamona, B_M corresponde ao perfil cromatográfico do biodiesel de mamona obtido por transesterificação do óleo.

Pode-se verificar que as frações correspondentes as estruturas que possuem o ácido ricinoleico (com $-OH$) em sua composição, apresentam R_f diferentes dos demais compostos que não o possuem.

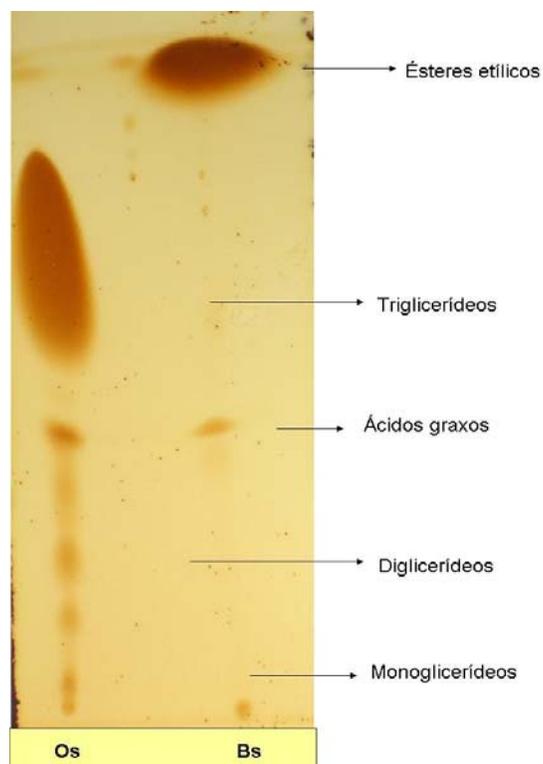


FIGURA 21 - Perfil cromatográfico das análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de fração obtida na reação que utilizou como materiais de partida o óleo de soja. **O_S** corresponde ao perfil cromatográfico do material de partida: o óleo de soja, **B_S** corresponde ao perfil cromatográfico do biodiesel de soja obtido por transesterificação do óleo.

Pode-se verificar que não há presença de ácidos graxos de características incomum na estrutura dos triglicerídeos, e por consequência dos ésteres, capazes de ocasionar diferença nos R_f dos compostos, tal ocorre com o biodiesel de mamona.

4.3.4. Identificação e quantificação das espécies presentes em biodiesel de soja e mamona por Cromatografia Gasosa acoplada a detector de Espectrometria de Massas (CG-MS)

Análises de biodiesel de soja e de mamona por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG-MS) foram realizadas para estes compostos isolados em sua forma pura e de modo a quantificar as frações presentes correspondentes aos ésteres do ácido linoléico.

As quantificações destas frações foram necessárias para a correção do cálculo da transformação das reações em que o óleo de soja foi utilizado, uma vez que estas foram monitoradas em termos da formação dos ésteres etílicos do ácido linoléico em específico.

Dessa forma, uma alíquota de biodiesel etílico de soja obtido em nosso laboratório por conversão total em reação de transesterificação por catálise química em que foi empregado o mesmo óleo utilizado no estudo das reações de transesterificação por calisador enzimático Lipozyme TL IM, foi submetida à análise por CG-MS.

Esta análise permitiu concluir que o biodiesel etílico de soja é constituído de **48, 17%** em ésteres etílicos do ácido linoléico (**ANEXO I**).

Assim, a correção para a transformação observada através de CLAE para os ésteres etílicos do ácido linoléico, foi feita de forma simples, onde resultado em porcentagem de transformação obtido na quantificação por CLAE foi corrigido pelo percentual em ésteres etílicos do ácido linoléico quantificados em uma amostra de biodiesel de soja obtido por conversão total e em sua forma pura.

As condições cromatográficas utilizadas nesta análise podem ser descritas por análise utilizando cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas da marca

Shimadzu, modelo QP 2010, com coluna capilar DB-17MS, com 30m x 0,25 µm de espessura, detector FTD, utilizando as condições seguintes.

Temperatura do injetor 240°C; pressão 88,2 kPa, fluxo total de 154,3 ml/min, temperatura inicial do forno de 250°C em intervalo de tempo de 5 minutos com incremento do gradiente de temperatura a velocidade de 5°C/minuto até atingir-se 230°C.

Hélio foi utilizado como gás de arraste. Utilizou-se detector por impacto de elétrons a 70 eV. Os fragmentos obtidos foram identificados por comparação com biblioteca eletrônica.

4.3.5. Identificação do perfil cromatográfico do biodiesel de soja e do biodiesel de mamona por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise do perfil cromatográfico em cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada para os biodiesel de soja e de mamona. A interpretação dos cromatogramas obtidos, bem como a observação do tempo de retenção dos compostos de interesse, os ésteres etílicos e intermediários, de acordo com os dados de tempo de retenção de compostos fornecidos pela literatura específica, a qual foi utilizada na reprodução do gradiente de eluição utilizado nas análises realizadas neste trabalho, foram utilizadas na interpretação dos resultados cromatográficos.

Dessa forma, uma amostra de biodiesel de soja e outra de biodiesel de mamona foram analisadas seguindo a mesma metodologia (descrita em **4.3.8**) empregada na eluição das amostras reacionais cuja transformação foi acompanhada. Os resultados obtidos para estes perfis cromatográficos estão ilustrados nos **ANEXO II e III**.

4.3.6. Identificação dos ésteres etílicos dos ácidos ricinoleico e linoléico por Ressonância Magnética Nuclear de prótons e de carbonos - RMN ^1H e RMN ^{13}C utilizados como padrão de calibração

Para a quantificação das frações de ésteres etílicos dos ácidos linoléico e ricinoleico obtidos através de transesterificação empregando óleos de soja e mamona respectivamente, foram realizadas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Esta quantificação foi realizada através de curvas de calibração realizadas para os compostos ricinoleato de etila e linoleato de etila.

Estes compostos, utilizados na construção de curvas de calibração, foram devidamente identificados por RMN ^1H e RMN ^{13}C e DEPT. O espectrômetro de RMN utilizado na análise é da marca Bruker equipado com sonda dual para ^1H e ^{13}C . O equipamento foi operado nas frequências 100,61 MHz e 400,13 MHz nas análises de ^{13}C e ^1H , respectivamente. Foram utilizados tubos simples para análise RMN de 5 mm de espessura no acondicionamento das amostras e CDCl_3 como padrão de eluição.

Nos ANEXO IV e V podem ser observados os RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT obtidos para o ricinoleato de etila e RMN ^1H obtido para o linoleato de etila respectivamente, utilizados como padrões de calibração em CLAE para análise da transformação dos óleos de soja e mamona nos ésteres etílicos correspondentes.

4.3.7. Construção de curvas de calibração para quantificação de Ricinoleato de etila e Linoleato de etila por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

Para que as reações fossem quantificadas, construiu-se uma curva de calibração no CLAE com a ajuda do próprio software ClassVP 6.0 da **Shimadzu**. Devido ao fato de o óleo de mamona apresentar de 84 a 91% de ácido ricinoleico em sua composição, julgou-se mais apropriado quantificar as reações através do éster do ácido ricinoleico (ricinoleato de etila) (Gerald, 2003). Nas reações que foi empregado o óleo de soja como matéria-prima, utilizou-se o padrão cromatográfico linoleato de etila adquirido da Supelco.

As curvas de calibração obtidas para o ricinoleato de etila e para o linoleato de etila podem ser observadas nas **FIGURAS 23 e 24**, respectivamente.

4.3.7.1. Produção e purificação do padrão cromatográfico de Ricinoleato de etila

Uma alíquota de um biodiesel etílico de mamona obtido em nosso laboratório através da transesterificação química do óleo correspondente foi submetido a separação cromatográfica em coluna clássica preparativa com fase estacionária de sílica gel “flash” (230- 400 mesh) e usando uma mistura de solventes hexano: acetato de etila (8: 2, v/v).

Foram coletadas alíquotas da coluna cromatográfica juntamente com o eluente, e realizadas análises de cromatografia em camada delgada para detecção da fração correspondente aos ésteres com hidroxila.

A partir daí foi possível isolar a fração de ésteres etílicos com hidroxila presentes neste biodiesel. Posteriormente, esta fração foi injetada no cromatógrafo líquido e o pico

referente ao ricinoleato de etila, devidamente identificado por RMN ^1H foi coletado com auxílio do coletor de frações do equipamento CLAE.

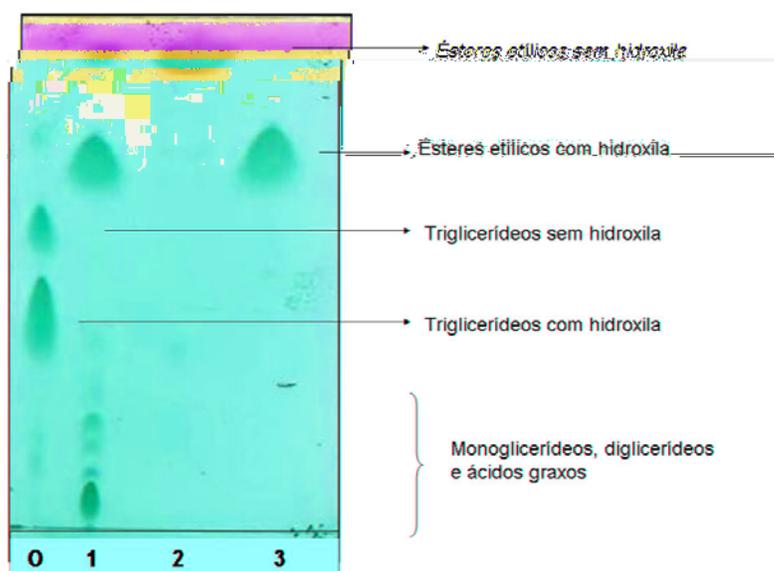


FIGURA 22 – Cromatografia em camada delgada das frações obtidas a partir de cromatografia em coluna clássica para isolamento dos ésteres etílicos com hidroxila presentes no biodiesel de mamona. As frações depositas na placa cromatográfica correspondem a **0**- óleo de mamona; **1**- biodiesel de mamona; **2**- fração isolada correspondente aos ésteres etílicos sem hidroxila do biodiesel de mamona; **3**- fração isolada correspondente aos ésteres etílicos com hidroxila do biodiesel de mamona.

A fração isolada correspondente aos ésteres etílicos com hidroxila do biodiesel de mamona foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência onde o pico correspondente ao ricinoleato de etila foi coletado com ajuda do coletor de frações do equipamento. Este pico foi submetido a análises para elucidação estrutural (**ANEXO III**) e em confirmando-se ser correspondente ao ricinoleato de etila, foi empregado em diluições para construção da curva de calibração.

4.3.7.2. Preparo de amostras para construção das curvas de calibração por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

O preparo das amostras constitui-se inicialmente de uma solução estoque de concentração 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (ou 1% em volume) de ricinoleato de etila em isopropanol/ hexano (5:4, v/v). A partir da solução estoque foram preparadas diluições de concentração 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para a construção da curva de calibração em balão volumétrico de 1000 μL onde foram adicionados também 400 μL de uma solução estoque de tricaprilina de concentração 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (estoque) utilizada como padrão interno em todas as diluições e o volume foi completado com solução isopropanol/ hexano (5:4, v/v). Estas diluições foram injetadas em triplicata, permitindo a construção da curva de calibração. O método de eluição de destas diluições trata-se do mesmo método utilizado na análise por CLAE das amostras coletadas das reações e está descrito em **4.3.8**.

A curva de calibração obtida para o ricinoleato de etila pode ser observada na **FIGURA 23**.

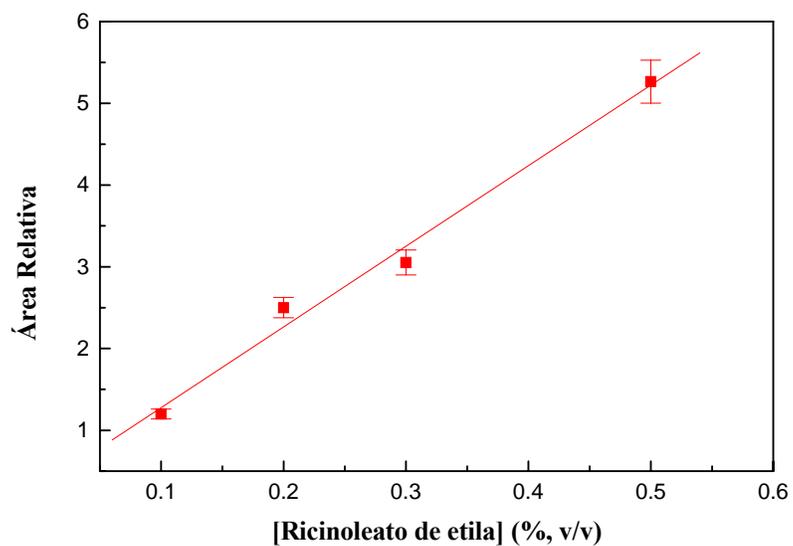


FIGURA 23 - Curva padrão de calibração para o ricinoleato de etila. Resultados obtidos por análise em CLAE, utilizando-se método descrito por Holckapek e colaboradores (HOLCAPEK et al, 1999). $y = 9.86323x + 0.2917$; $R^2 = 0,99402$ ($n = 3$).

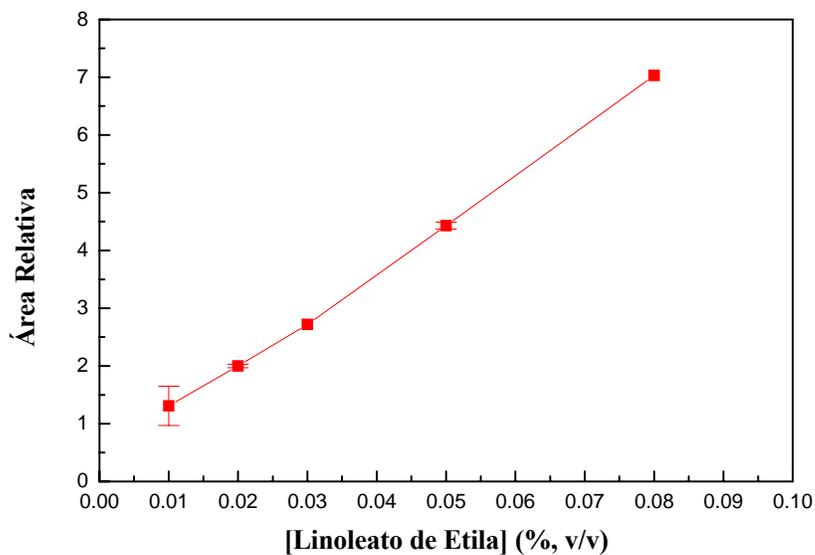


FIGURA 24 - Curva padrão de calibração para o linoleato de etila. Resultados obtidos por análise em CLAE, utilizando-se método descrito por Holckapek e colaboradores (HOLCAPEK et al, 1999). $y = 82,461x + 0,36448$; $R^2 = 0,99912$ ($n = 3$).

4.3.8. Condições cromatográficas utilizadas para análise de amostras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

O equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência está descrito no item 4.2.1. A coluna utilizada foi uma Shim-pack CLC-ODS (M) – C18, em fase reversa, apresentando 4,6 mm de diâmetro interno, 25 cm de comprimento, tamanho de partícula de 5µm com diâmetro do poro de 100 . Também foi utilizada uma pré-coluna analítica do tipo Shim-pack G-ODS (4) – C18, apresentando 4 mm de diâmetro interno e 1cm de comprimento. Todas as análises foram realizadas com temperatura da coluna a 40°C.

O método de eluição, bem como os outros parâmetros cromatográficos descritos nesta sessão para quantificação em cromatógrafo líquido, do éster etílico dos ácidos rinoleico e linoléico para posterior construção da curva de calibração foi validado e descrito na literatura por Holcapek e colaboradores para o óleo de colza, transesterificado por catálise química e trata-se de um método de cromatografia líquida em fase reversa aquosa e não aquosa para quantificação de ésteres metílicos de modo geral (HOLCAPEK et al, 1999).

Neste trabalho foi utilizado o método de eluição de gradiente aquoso. Este método consiste de um gradiente linear com incrementos de fase móvel aquosa –orgânica que vai de 70% de acetonitrila + 30% de água em 10 minutos, para 100% de acetonitrila em 10 minutos, e então para 50% de acetonitrila + 50% de 2-propanol-hexano (5:4, v/v) em 20 minutos, permitindo a separação dos compostos presentes durante a produção de biodiesel. Seguidos de 5 minutos para reestabilização da coluna para uma nova análise.

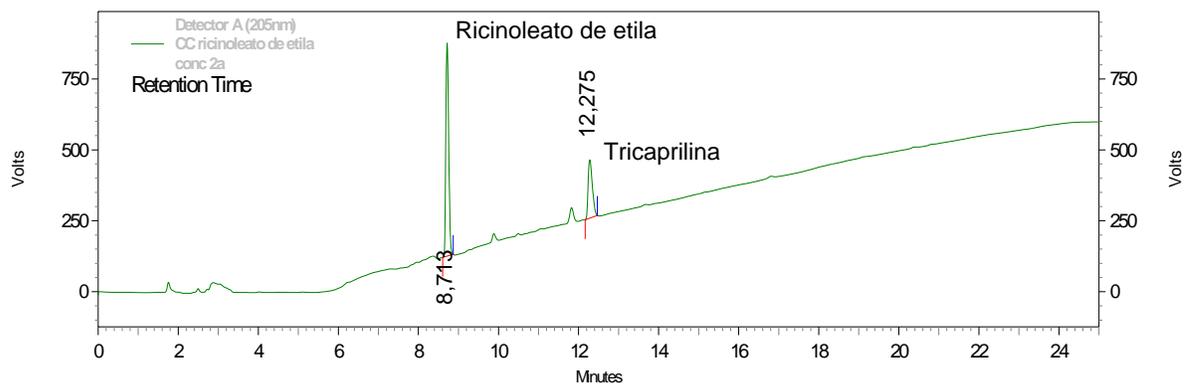


FIGURA 25 - Cromatograma do padrão de calibração Ricinoleato de etila utilizando a solução estoque de 0,2 $\mu\text{l}/\text{mL}$. Os pico $t_r = 8,713$ min e $t_r = 12,275$ min corresponde ao padrão ricinoleato de etila e padrão interno de tricaprilina. Preparo das amostras descrito em 4.3.7.2.

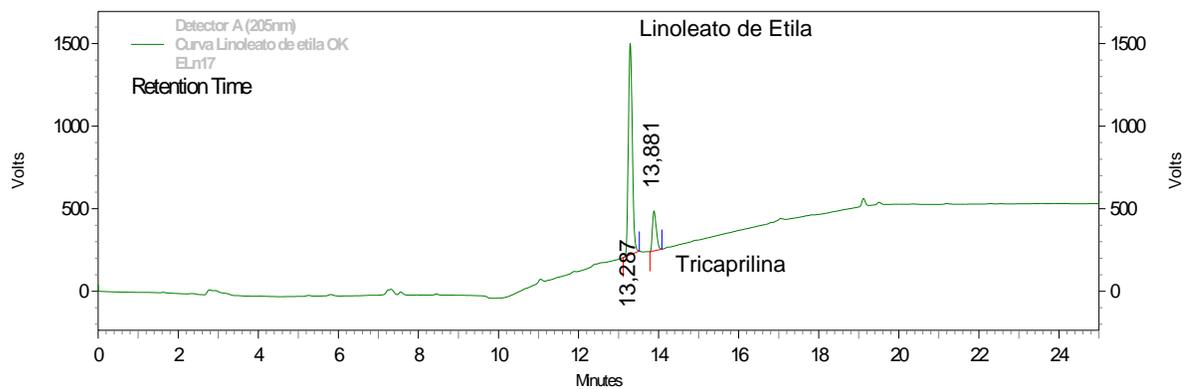


FIGURA 26 - Cromatograma do padrão de calibração Linoleato de etila utilizando a solução estoque de 0,2 $\mu\text{l}/\text{mL}$. Os pico $t_r = 13,287$ min e $t_r = 13,881$ min corresponde ao padrão linoleato de etila e padrão interno de tricaprilina. Preparo das amostras descrito em 4.3.7.2.

4.3.9. Preparo de amostras para medidas de viscosidade e índice de iodo em misturas dos ésteres etílicos de soja e mamona

Para determinação das medidas de viscosidade e índice de iodo de misturas entre ésteres etílicos de soja e mamona foram preparadas misturas de 25 ml com auxílio de duas provetas de 50 ml. Dessa forma, foram realizadas misturas de 98%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%, 20%, 10% e 2% em volume de éster etílico de soja diluído em éster etílico de mamona. Então, foram medidos os volumes de 24,5; 23,75; 22,5; 20; 17,5; 12,5; 7,5; 5; 2,5 e 0,5 ml de éster etílico de soja com auxílio de uma proveta, sendo cada um destes volumes completados até 25 ml de éster etílico de mamona e utilizados imediatamente em análises para determinação do índice de iodo e da viscosidade, de acordo com metodologias descritas em 4.3.11.3 e 4.3.11.4.

4.3.10. Tratamento e purificação dos produtos obtidos em reação de transesterificação etílica utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

Esta etapa torna-se especialmente importante num segundo estágio

A certificação da qualidade do biodiesel envolve vários aspectos, dentre eles, a ausência de glicerina, ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos que acarretariam problemas em sua utilização ou mesmo em sua composição durante um provável período de estocagem.

4.3.10.1. Purificação dos ésteres etílicos

As mesmas metodologias para purificação do biodiesel, do seu sub-produto e da glicerina foram empregadas tanto no caso do biodiesel de mamona quanto para o biodiesel de soja. A separação inicial das fases de biodiesel e glicerina deu-se por através de duas diferentes etapas, a primeira consiste destilação de álcool em excesso no meio reacional, após a conversão, o que favoreceu a decantação da glicerina (polar) solvatada pelas moléculas de álcool.

A segunda etapa consistiu na lavagem do meio reacional com água, seguida de decantação da água contendo glicerina e outras impurezas.

O primeiro procedimento teve sua eficiência comprovada em experimentos onde se obteve uma maior conversão dos óleos a biodiesel.

Em casos onde foi verificada a presença significativa de intermediários mono e diglicerídeos acredita-se não ter sido possível obter-se a separação da glicerina por decantação devido ao fato de que estes intermediários atuarem como solvente para a glicerina no meio. Dessa forma, foi necessária a utilização de processo de lavagem do meio reacional direto com água.

Neste caso, o meio reacional foi lavado com 10% do volume em água em relação ao volume de óleo empregado na reação, por três vezes em funil de separação. Após cada lavagem esperou-se o volume de água adicionado decantar, retirou-se a água e procedeu-se nova lavagem.

Após a terceira lavagem o biodiesel foi submetido à filtração em funil de placa sinterizada contendo 25 gramas de sílica da marca Zeozil Plus, para retenção do excesso de água.

Após filtração o biodiesel foi submetido à destilação, onde inicialmente foi retirada a cabeça de destilação que poderia conter algum vestígio de água.

Assim, o biodiesel foi destilado a temperatura e pressão controladas com o objetivo de se isolar o produto formado de qualquer vestígio de catalisador e subprodutos como monoglicérides, sais ou ainda de material de partida não reagido. Esta purificação tem como objetivo, portanto, o refino do biodiesel com aumento no grau de pureza e diminuição da viscosidade do produto final. O que trata-se de uma vantagem especialmente ao biodiesel obtido a partir do óleo de mamona.

4.3.10.2. Purificação da Glicerina

Uma vez que a glicerina obtida pela separação de fases do biodiesel em processo de produção enzimático foi obtida em pH 7, são necessários procedimentos simples para sua purificação.

A glicerina obtida pela separação de fases do biodiesel apenas por processo de destilação do etanol em excesso no meio reacional, seguido de decantação foi lavada para remoção do resíduo de biodiesel da reação.

A água glicerínica foi coletada, concentrada e destilada no mesmo sistema de destilação. Os parâmetros observados para a destilação como temperatura e pressão foram anotados.

4.3.11. Determinação das características físico-químicas das matérias – primas e dos produtos obtidos em reação de transesterificação etílica utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

4.3.11.1. Determinação do índice de acidez dos óleos vegetais de soja e mamona

O índice de acidez é definido como o número de miligramas de KOH necessários para neutralizar os ácidos livres de 1g da amostra. Este parâmetro tem como objetivo a identificação do estado de conservação (oxidação) do óleo e neste trabalho com base na ASTM D 644.

Em decorrência dos valores de índices de acidez elevados encontrados para o óleo de mamona, houve necessidade da padronização de uma metodologia conveniente para a remoção dos ácidos graxos livres neste óleo.

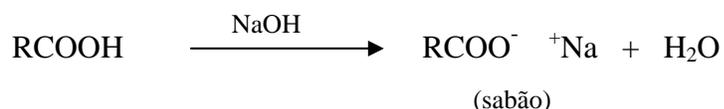
Esta metodologia foi utilizada na primeira etapa de desenvolvimento deste trabalho, de modo a proporcionar um ambiente propício à atuação enzimática e foi mantida para as reações empregando o óleo de mamona durante todo o desenvolvimento do trabalho.

O óleo de mamona utilizado nas reações enzimáticas apresentou um alto índice de acidez. O valor fornecido como referência no “Laudo de análise” original do óleo fornecido pela “**Bom Brasil**”, constava de 0,80 mg NaOH/g de óleo .

Entretanto, devido ao processo de oxidação com o tempo de estocagem a que foram sujeitos os óleos vegetais, esses valores apresentaram-se dentro da faixa de 1,0 a 1,5 mg NaOH/g de óleo, no momento que seriam processadas as reações, sendo, portanto inadequado à atuação da lipase por reação de transesterificação.

Em decorrência, houve necessidade da padronização de uma metodologia conveniente para a remoção dos ácidos graxos livres neste óleo, de modo a proporcionar de um ambiente propício à atuação enzimática.

Este método tem como fundamento a reação de saponificação de ácidos-graxos em meio básico:



EQUAÇÃO 2 – Reação de saponificação (neutralização) empregada na metodologia para neutralização de ácidos graxos livres presentes no óleo vegetal de mamona.

Os ácidos graxos livres são convertidos a sabão em meio reacional onde um solvente orgânico anfifílico, como o THF (tetraidrofurano), propicie a miscibilidade tanto das cadeias longas e hidrofóbicas dos ácidos graxos quanto a das moléculas de hidróxido de sódio (ou potássio) altamente polares e por consequência a reação entre ambos.

Neste sentido, 1 litro de óleo de mamona foi medido com o auxílio de uma proveta e foi transferido para um funil de separação de 2 litros, então foram adicionados 300 mL de THF (tetraidrofurano). Seguido de 5 adições sucessivas de 5 mL de uma solução aquosa de NaOH (1M) ao mesmo funil.

Em cada adição esperou-se que a solução de NaOH decantasse no funil e retirou-se a fase inferior. Após quatro adições de solução de NaOH e retiradas sucessivas sem agitação, fez-se uma última adição agitando-se vigorosamente o funil para posterior decantação e separação, subseqüentemente o óleo foi lavado repetidas vezes com 30% do volume em água, agitando-se e esperando-se decantar. As fases aquosas tiveram o pH determinado e as lavagens foram realizadas até atingir-se pH entre 6 e 7 da fase aquosa.

O solvente foi removido em um rota-evaporador, logo em seguida, o óleo foi filtrado em funil de placa sinterizada com sílica gel para retirada do excesso de água, então aquecido a 150°C sob vácuo em trompa d'água e em bomba de alto vácuo, para retirada de qualquer traço de água. Determinou-se o índice de acidez, segundo o procedimento a seguir.

Procedimento: Em um erlenmeyer de 125 mL de capacidade dissolveu-se 2g de amostra de óleo com 25 mL de solução neutra de éter etílico-álcool etílico (2:1) em volume.

Após adição de 2 gotas de solução 1% de fenolftaleína, titulou-se a amostra com solução padrão de hidróxido de potássio 0,1N até coloração rósea persistente. A determinação do índice de acidez é calculada em função do volume de solução básica gasta na titulação. O procedimento foi acompanhado por medições potenciométricas com eletrodo mergulhado na amostra titulada. Os resultados numéricos obtidos foram determinados utilizando-se a fórmula descrita na equação **3**.

$$i = N.V.E.f/m \quad (3)$$

Onde:

i = índice de acidez em mg KOH / g_{óleo}

N = volume de solução de base (KOH ou NaOH) gasto na titulação em ml

V = volume de base gasta na titulação em ml

E = equivalente-grama da base (NaOH ou KOH) em gramas

f = fator de correção da normalidade da solução da base

m = massa da amostra em gramas

O fator de correção da solução alcalina utilizada na titulação pode ser determinada por titulação de solução de biftalato de potássio.

Para a determinação do fator de correção **f** mediu-se uma massa de 0,4g de biftalato de potássio (P.A.) previamente seco em estufa a 120°C por 2h. Em um erlenmeyer de 250 ml dissolveu-se este sal com 75 ml de água e adicionou-se 4 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1% titulando-se o sistema com solução de base 0,1N (NaOH ou KOH) até coloração levemente rosa.

Os valores resultantes da desta titulação foram utilizados para a determinação do fator de correção **f** conforme as equações 4 e 5.

$$\mathbf{NR = m/V.E} \quad \mathbf{(4)}$$

$$\mathbf{f = NR/NE} \quad \mathbf{(5)}$$

Onde:

m = Massa de biftalato de potássio em gramas

V = Volume de base (NaOH ou KOH) em ml

E = Equivalente-grama do biftalato de potássio em MG

f = Fator de correção da solução de base

NR = Normalidade real

NE = Normalidade esperada em N

4.3.11.2. Determinação de teor de água contida nos óleos vegetais de soja e mamona

A determinação do teor de água foi feita de acordo com o método coulométrico de Karl Fischer com base na norma ASTM D 2709, utilizando para tanto, solução de coulométrica Karl Fischer isenta de piridina, adquirida da Merck e equipamento descrito na sessão **4.2.4**.

Para tanto, foram pesados 7,5 a 10g de amostra para a análise, obedecendo o intervalo em gramas de amostra necessária para o valor esperado de até 1000 ppm de água. Essa massa foi inserida no compartimento de análise segundo protocolo de utilização do equipamento cujo a análise foi realizada automaticamente.

4.3.11.3. Determinação do índice de iodo dos ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona

A determinação do índice de iodo foi realizada com base na norma EN 14111.

Procedimento: Foram utilizadas as soluções seguintes. Iodeto de Potássio 15% em massa; solução de Tiosulfato de Sódio 0,1N; solução de Amido 0,5% em massa; Solução de Wijs comercial (Solução Iodo-cloro); Tetracloreto de Carbono ou Clorofórmio.

Preparou-se uma determinação em branco simultaneamente (utilizando exatamente o mesmo procedimento, entretanto sem adição da amostra). A solução titulante de tiosulfato de sódio 0,1N foi padronizada com solução de permanganato de potássio 0,1N, que por sua vez foi padronizada inicialmente com solução de oxalato de sódio 0,1N.

Pesou-se a massa necessária de amostra (**TABELA VII**) de acordo com o índice de iodo esperado em um erlenmeyer de 500 ml, adicionou-se 20 ml de tetracloreto de carbono. Adicionou-se com auxílio de uma pipeta, 25 ml da solução de Wijs ao erlenmeyer. Deixou-se em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz e a temperatura ambiente.

TABELA VII - Determinação do índice de iodo através da massa em gramas referente ao valor de índice de iodo esperado.

Índice de iodo esperado (gI ₂ /g óleo)	Peso da amostra (g)
0- 30	1,0
30- 50	0,6
50- 100	0,3
100- 150	0,2
150- 200	0,15

Adicionou-se posteriormente, 20ml da solução de iodeto de potássio (15% em massa) e 100 ml de água previamente fervida e resfriada. Titulou-se com a solução de tiosulfato de sódio 0,1N, adicionando-o lentamente até obter uma coloração amarela. Adicionou-se, então 1 a 2 ml da solução de amido e continuou-se titulando até desaparecimento da coloração azul. O valor obtido para o índice de iodo é calculado através da equação 6.

$$\text{Cálculo: } (B - A) \cdot (f) \cdot (1,27) / P \quad (6)$$

B= ml de tiosulfato gastos na titulação do branco;

A= ml de tiosulfato gastos na titulação da amostra;

f= fator da solução de tiosulfato de sódio;

P= massa da amostra em gramas.

4.3.11.4. Determinação da viscosidade dos ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona

As viscosidades foram determinadas a 40° C em um banho termostatzado com o auxílio de um viscosímetro cinemático descrito na sessão 4.2.5. Para determinação da viscosidade dos ésteres de mamona foi utilizado capilar modelo 0B, com constante de calibração aferida de 0, 006 cSt/s. Na determinação da viscosidade dos ésteres de soja foi utilizado capilar modelo 1B, com constante de calibração aferida de 0,057 cSt/s. Estas determinações foram realizadas tomando-se como base a ASTM D 445.

Procedimento: Após o acionamento e estabilização da temperatura do aparelho viscosimétrico a 40 °C utilizou-se uma seringa adaptada a uma mangueira de látex (funcionando como um sugador) conectada na parte superior do viscosímetro, colocou-se o óleo com nível superior ao último traço de aferição. Retirou-se a seringa e cronometrou-se o tempo gasto pelo líquido entre o primeiro e o segundo traço de aferição. Os resultados obtidos foram determinados através da equação 7.

$$\eta_{rel} = k.t \quad (7)$$

η_{rel} : Viscosidade cinemática a 40 °C em cSt/s

k: constante do viscosímetro 0, 005094 cSt/s

t: tempo gasto pelo óleo para percorrer a distância entre os dois traços de aferição

4.3.11.5. Determinação do ponto de fulgor dos ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona

Para a determinação do ponto de fulgor utilizou-se o aparelho da **FIGURA 18** de vaso fechado Pensky-Martens (manual) - aparelho que consiste em uma cuba de ensaio, tampa, obturador, agitador, fonte de aquecimento, dispositivo de ignição, banho de ar e placa superior. O aparelho possui um adaptador ao qual foi cuidadosamente afixado um dispositivo de medição de temperatura – termômetro (ASTM número 88C) possuindo uma faixa indicada de + 90 °C a 370 °C e atendendo aos pré-requisitos da ASTM D 93. Para o dispositivo de ignição utilizou-se chama de gás (GLP) adaptado a registro controlador.

Procedimento: Adicionou-se 80 ml de óleo na cuba de ensaio do aparelho previamente padronizado, conforme norma NBR 14598, após o qual se ligou o agitador e posteriormente o aquecedor. Registrou-se o ponto de fulgor após a leitura no dispositivo de medição de temperatura no momento em que aplicação do dispositivo de ignição causou um primeiro relampejo no interior da cuba. O aparelho foi desligado e repetiu-se o processo com uma alíquota da mesma amostra considerando-se o primeiro relampejo (desde que a temperatura lida não seja inferior a 18 °C ou superior a 28 °C da temperatura lida no primeiro relampejo da primeira amostra).

4.3.11.6. Determinação da densidade relativa dos ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona

Para determinação da densidade relativa dos ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona bem como das misturas entre estes, de modo a verificar o comportamento desta característica físico-química frente às normas de qualidade exigidas, foi realizado o procedimento seguinte.

Procedimento: lavou-se cuidadosamente um picnômetro de 50 ml de capacidade com solução de ácido crômico enxaguando-o várias vezes com água destilada. Após a limpeza, o picnômetro foi colocado imerso (totalmente preenchido) em banho com água destilada a 25° C de temperatura durante 30 minutos. Após este período o picnômetro foi enxugado com tecido limpo e submetido à medição de massa. Depois de medir a massa total do picnômetro com água, retirou-se a água e lavou-se o picnômetro com álcool etílico, seguido de éter etílico deixando-o secar completamente para a retirada dos vapores. Após ser novamente submetido à medição de sua massa, o picnômetro padronizado foi imerso em banho de óleo (a ser analisado) a 25° C, repetindo-se o procedimento descrito, de forma análoga, a partir deste banho. Todo o procedimento foi repetido duas vezes para cada amostra. A média aritmética dos dois resultados de cada amostra de óleo foram aplicados na fórmula apresentada na equação 8.

$$d_{\text{óleo/água}} = m_{\text{óleo}}/m_{\text{água}} \quad (8)$$

Sendo:

$d_{\text{óleo/água}}$: a densidade relativa do óleo a 25 °C em g/cm³

$m_{\text{óleo}}$: a massa experimental do óleo a 25 °C em gramas

$m_{\text{água}}$: a massa experimental da água a 25 °C em gramas

O método experimental para a determinação da densidade foi baseada em metodologia 920.212 - AOCS .

5. Resultados e Discussão

Nesta sessão, os resultados obtidos utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador enzimático na transesterificação dos óleos de soja e mamona serão apresentados e discutidos. Estes resultados foram apreciados sob forma de comparação entre estes e outros resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa utilizando outro tipo de catalisador enzimático, a saber, a lípase de *Cândida antarctica* disponível comercialmente como Novozym 435 (HURTADO, 2006).

Neste trabalho também foi realizada a determinação das características físico-químicas dos ésteres obtidos tanto em sua forma pura, quanto na forma de misturas entre os ésteres etílicos de soja e de mamona para que fosse possível uma avaliação da qualidade destes produtos segundo normas de qualidade exigidas internacionalmente (ASTM D 6571 e EN 14214).

5.1. Determinação da atividade da lipase Lipozyme TL IM

No presente trabalho de mestrado, sempre antes do início de cada experimento, realizamos a determinação da atividade da lipase, utilizando o procedimento descrito em **4.3.1.**

Esta determinação foi realizada com o objetivo de certificar que a enzima utilizada em todos os processos apresenta alta atividade, podendo garantir que a obtenção de bons rendimentos reacionais, não dependeram da atividade da enzima, mas sim das condições reacionais.

Foi observado que a enzima utilizada no início de cada experimento apresentava atividade de 8,18 nmols/min/g de lipase imobilizada.

É válido lembrar que o método utilizado foi desenvolvido para enzimas na forma de solução. A enzima aqui utilizada é imobilizada em um suporte sólido, portanto os valores obtidos são apenas referência, para se verificar a estabilidade da enzima ao longo do tempo.

5.2. Óleo de mamona em reações de transesterificação etílica utilizando a LIPOZYME TL IM como catalisador enzimático

5.2.2. Determinação do índice de acidez do óleo vegetal de mamona

O método de neutralização para remoção de ácidos graxos foi utilizado nos óleos de mamona de modo a permitir que o mesmo pudesse ser submetido à reação de transesterificação enzimática. O método mostrou-se eficiente, sendo que o índice de acidez dos óleos neutralizados foram observados na faixa de $0,510 \pm 0,02$ mg NaOH/g, adequados a reação de transesterificação por enzimas.

A metodologia empregada na neutralização, bem como para determinação do índice de acidez dos óleos podem ser encontrados em **4.3.11.1**.

5.2.3. Determinação de teor de água contida no óleo vegetal de mamona e no álcool etílico

Quando o teor de água é restrito, as lipases são capazes de catalisar a formação de ligações éster, a partir de etanol, dando portanto, como produto principal os ésteres etílicos dos ácidos graxos correspondentes (JAEGER et al,1999).

Assim sendo, para todos os experimentos, foram realizadas determinações do teor de água contida tanto no óleo de mamona quanto no etanol, a fim de se evitar reações laterais.

O teor de água contido no óleo de mamona após tratamento para remoção de ácidos graxos livres, segundo metodologia previamente descrita, foi de $0,5 \pm 0,2\%$. Este valor foi determinado pelo método coulométrico de Karl Fischer. Equipamentos e metodologia estão descritos em 4.2.4 e 4.3.11.2, respectivamente. O teor de água presente no etanol utilizado nas reações realizadas com o óleo de mamona foi de 700 ppm (0,7%), portanto tratou-se de etanol 99,3%.

5.2.4. Identificação do ricinoleato de etila utilizado como padrão de quantificação em reação de transesterificação utilizando a LIPOZYME TL IM como catalisador

Os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT podem ser observados nos ANEXO IV. Verificou-se a presença de alguns sinais importantes que apontam o sucesso no isolamento do composto de interesse de acordo com a metodologia empregada.

No RMN ^{13}C verificou-se a presença do grupamento carbonila através do sinal em $\delta = 173,93$, bem como a presença do carbono ligado à hidroxila do éster do ácido ricinoleico em $\delta = 71,53$ ppm. No DEPT este último carbono apresentou sinal em $\delta = 71,14$ ppm. Além disso, no RMN H^1 podemos observar a presença de H do carbono terciário ligado a hidroxila em $\delta = 3,63$ ppm.

O composto puro, isolado e identificado, foi utilizado como padrão na construção de curva de calibração para quantificação do ricinoleato de etila em reações onde foi utilizado o óleo de mamona como matéria-prima.

5.2.5. Efeito do teor de etanol na reação de transesterificação etílica utilizando a LIPOZYME TL IM como catalisador

O excesso de álcool no meio faz-se geralmente necessário em reações de transesterificação, uma vez que os álcoois são insolúveis no óleo, entretanto este fato traduz-se em condições muito drásticas a atuação enzimática (SHIMADA, 2002). Para minimizar este efeito sob a atuação enzimática o álcool pode ser adicionado em etapas (HURTADO, 2006).

Com base nestas afirmações fornecidas pela literatura, a influencia do teor de álcool etílico nas reações de transesterificação utilizando a Lipozyme TL IM foi avaliado.

Julgou-se necessária a avaliação deste parâmetro de influencia reacional, no início dos experimentos de modo a mensurar a quantidade de etanol a ser adotada nas reações posteriores e para que não houvesse perdas de rendimento por inativação da enzima.

Uma vez tendo sido observados os resultados e a metodologia empregada quando utilizada a enzima Novozym 435 em trabalhos em trabalhos anteriormente desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa (Hurtado, 2006), as nossas reações com Lipozyme TL IM também foram realizadas à temperatura ambiente empregando 4% de enzima em relação à massa de óleo de mamona e proporções estequiométricas de 3 equivalentes molares de etanol para um equivalente molar de óleo de mamona. Concomitantemente, reações à temperatura ambiente empregando 4% de enzima em relação à massa de óleo de mamona e proporções estequiométricas de 9 equivalentes molares de etanol também foram avaliadas de forma a traçar um paralelo com os resultados obtidos por HURTADO (2006).

A influência da concentração de etanol no meio reacional foi, portanto, observada em termos do rendimento do éster ricinoleato de etila (éster etílico do ácido ricinoleico).

A avaliação dos resultados foi realizada por combinação das análises por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para que isso fosse possível, foram retiradas alíquotas do meio reacional em intervalos de tempos regulares e pré-definidos (definidos em função da frequência de amostragem) nos 23.8-081-0.0

Efeito do teor de etanol

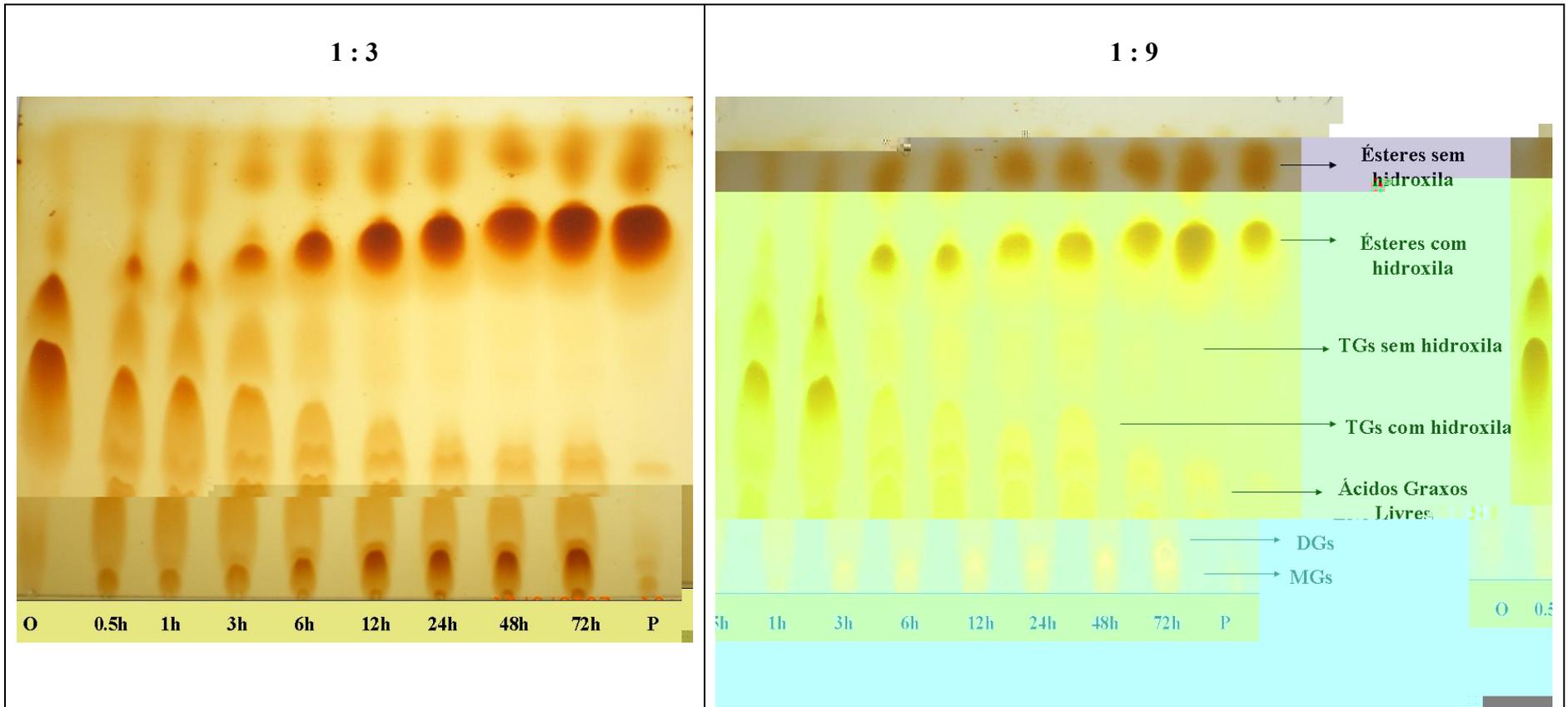


FIGURA 27 - A análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para as reações com empregando 3 e 9 equivalentes de etanol. Condições de reação descritas em 4.3.2.1. Nas figuras estão depositadas as alíquotas referentes a diferentes tempos de reação (xh); **O** : óleo; **P** : Padrão biodiesel de mamona.

Após este período, ao observar-se as alíquotas depositadas referentes a 24, 48 e 72 horas reacionais, percebe-se o desaparecimento, que considera-se ser total dos triglicerídeos do óleo de mamona, no sentido da formação dos outros compostos intermediários reativos, os mono e diglicerídeos, além da formação dos produtos de interesse, os ésteres etílicos, que no caso específico das reações com óleo de mamona convencionou-se dividir entre ésteres com hidroxila e sem hidroxila apenas para efeito de análise por cromatografia em camada delgada.

Em ambas as reações observa-se um ligeiro decréscimo nos diglicerídeos, nas frações 24, 48 e 72 horas de onde se pode inferir um acréscimo na conversão aos ésteres etílicos correspondentes. Este efeito é mais pronunciado na reação onde foram empregados 9 equivalentes de etanol, o que pode ser traduzido em termos de maior conversão nestas condições reacionais.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência realizada com as mesmas frações depositadas na placa cromatográfica, permitiu uma avaliação conjunta na interpretação destes resultados observados.

Ao analisarmos o gráfico de rendimento em ricinoleato de etila (**FIGURA 29**) em função do tempo (análise das alíquotas coletadas), verificou-se um rendimento em ricinoleato de etila semelhante para as duas reações durante a primeira hora de reação. Este resultado está de acordo com o fato de que até duas horas de reação a quantidade de etanol adicionada em etapas, foi a mesma em ambas as reações e só após duas horas reacionais (intervalo necessário a adição complementar dos 9 equivalentes reacionais) a reação com 9 recebeu novas alíquotas de etanol, em intervalo de 15 minutos cada uma.

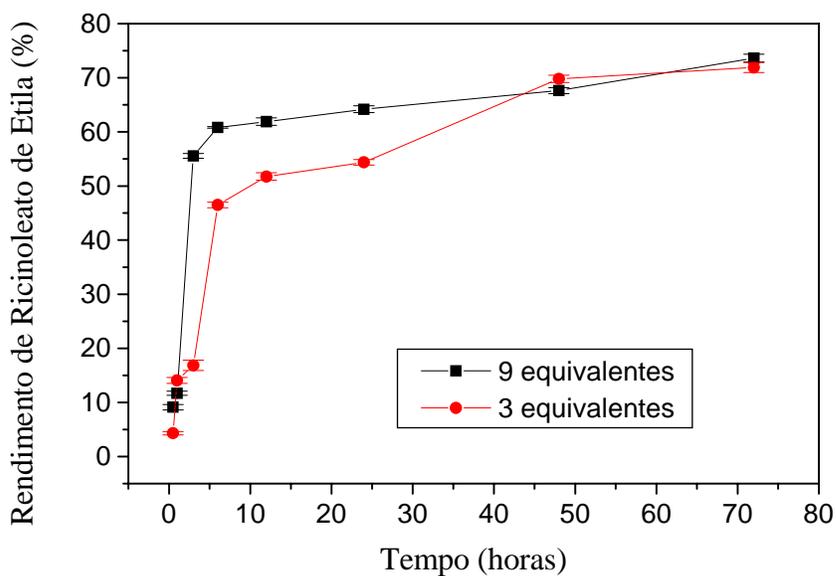


FIGURA 29 - Gráfico de rendimento em ricinoleato de etila no tempo em reações enzimáticas utilizando TL IM e variando a concentração de etanol. Condições de reação descritas em 4.3.2.1.

Após três horas, foi possível verificar por análise em CLAE, um acréscimo no rendimento da reação onde 9 equivalentes de etanol foram utilizados, em relação aquela onde foram utilizados apenas 3 equivalentes de etanol.

Após 12 horas reacionais, observou-se uma tendência dos rendimentos reacionais a se convergirem, o que deve ocorrer próximo a 48 horas de reação. Esta conversão dá-se no sentido de se alcançar o equilíbrio reacional em ambas as reações, fato que também foi identificado na análise por cromatografia em camada delgada das frações coletadas.

Os rendimentos em ricinoleato de etila quantificados através da análise por cromatografia líquida de alta eficiência estão sumarizados na **TABELA VIII**.

TABELA VIII - Rendimentos em ricinoleato de etila em reações enzimáticas utilizando TL IM e variando a concentração de etanol. Condições reacionais descritas em 4.3.2.1. Condições de análise cromatográficas descritas em 4.3.8.

Condições reacionais		Concentração em % de ricinoleato de etila obtida variando a concentração de etanol	
Tempo de reação	Reação com 3 equivalentes	Reação com 9 equivalentes	
	molares de etanol	molares de etanol	
0,5 horas	7,51 ± 0,82	9,12 ± 0,50	
1 hora	12,63 ± 0,74	11,69 ± 0,38	
3 horas	19,34 ± 0,56	55,56 ± 0,43	
6 horas	34,48 ± 0,30	60,83 ± 0,15	
12 horas	51,84 ± 0,69	61,90 ± 0,70	
24 horas	59,52 ± 0,21	64,19 ± 0,63	
48 horas	61,59 ± 0,88	67,63 ± 0,57	
72 horas	78,37 ± 0,97	73,63 ± 0,72	

Foi possível verificar que apenas após 24 horas de reação, obtiveram-se resultados expressivos em termos de conversão a ricinoleato de etila. Estes rendimentos em ricinoleato apontaram para uma melhor conversão quando utilizados 9 equivalentes ao invés de 3 equivalentes de etanol. Acredita-se que parte do etanol utilizado dentre estes nove equivalentes, atue como solvente viabilizando a reação, uma vez que o óleo de mamona trata-se de um óleo muito viscoso.

Isso explica o fato de o rendimento na reação onde foram utilizados 3 equivalentes de etanol ter sido menor em função do tempo. Neste caso, apesar do óleo de mamona ser considerado um óleo com características polares (possui uma hidroxila na cadeia do ácido graxo mais representativo), a relação entre hidrofobicidade e hidrofiliabilidade foi melhor compensada no caso em que foram utilizados 9 equivalentes de etanol, pela alta viscosidade do óleo em questão. Quando apenas três equivalentes são utilizados, esta relação só deve ser compensada após uma quantidade razoável de ésteres terem sido formados a partir do óleo.

Tendo em vista estes resultados, as reações subseqüentes para estudo de outros fatores de influencia em reações enzimáticas, utilizando o óleo de mamona como matéria prima e Lipozyme TL IM como catalisador foram realizadas pela adição de 9 equivalentes molares de etanol no meio reacional para cada equivalente de óleo.

Esta reação, bem como os resultados obtidos nas análises cromatográficas em camada delgada e por cromatografia líquida de alta eficiência, foram utilizados como modelo comparativo no estudo da evolução das próximas reações onde outros parâmetros de influencia tiveram sua contribuição avaliada.

5.2.6. Efeito da temperatura na reação de transesterificação etílica utilizando a LIPOZYME TL IM como catalisador

Para estudos sobre a influencia da temperatura em reações de transesterificação utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador, foram realizados testes com o meio reacional a 70°C, utilizando o reator cedido pela Novozymes (fabricante e doador da enzima utilizada neste trabalho) descrito em **4.2.7**.

Foi possível observar através de CCD obtida nestes ensaios a 70°C, que não houve progresso da reação no sentido de conversão do material de partida (óleo de mamona) aos ésteres correspondentes.

E ao contrário das reações realizadas a temperatura ambiente já observadas, não houve perceptível conversão dos diglicerídeos a monoglicerídeos com posterior transformação destes últimos a ésteres etílicos segundo o esperado (TURKAN, KALAY 2006). Ao invés disto, verificou-se um equilíbrio entre os compostos mono e diglicerídeos intermediários, no sentido de não permitir avanço significativo na obtenção dos ésteres, mesmo após 72h de reação (**FIGURA 30**). Este fato permitiu concluir que a enzima deve ter sofrido inativação pelas condições de temperatura (70°C).

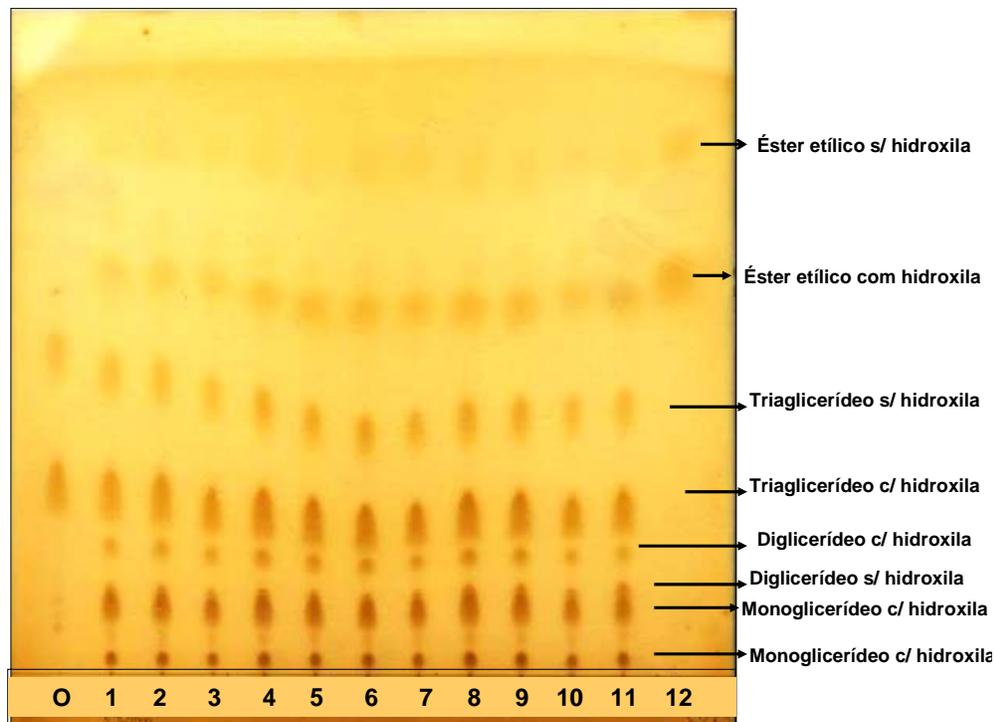


FIGURA 30 - Análise por CCD da mistura reacional durante a reação de transesterificação etílica 70°C, utilizando a LIPOZYME TLIM 4% de enzima em massa como catalisador e adição do álcool em 9 etapas em uma proporção de 1:9 equivalentes molares (óleo de mamona: etanol). Amostra **0**: óleo de mamona; **1**: 30 min.de reação; **2**: 1h de reação; **3**: 2h de reação; **4**: 3h de reação; **5**: 6h de reação; **6**: 8h de reação; **7**: 10h de reação; **8**: 12 h de reação; **9**: 24 h de reação; **10**: 48 h de reação; **11**: 72 h de reação; **12**: padrão de reação.

Para a obtenção de melhores resultados foram realizadas reações a 40°C de acordo com o observado na literatura para a Lipozyme TL IM (TURKAN, KALAY 2006; LI *et al*, 2006 DU *et al*, 2005).

Quando realizadas reações a 40°C, verificou-se um restabelecimento das condições de atuação da enzima observadas a temperatura ambiente e que não foi observado a 70°C.

Foi possível verificar um aumento no rendimento reacional quando utilizados 40°C em relação à reação anterior em que foram utilizados 70°C. Não foram realizados outros experimentos a 70°C, uma vez concluído o fato de esta ser uma temperatura muito drástica a atuação enzimática no meio reacional.

Os resultados obtidos com o meio mantido a 40°C, foram ainda comparados com os resultados obtidos em reações sob mesmas condições, porém a temperatura ambiente (**FIGURA 31**). Para as reações a 40°C foi utilizado o sistema descrito em **4.3.2.2 (FIGURA 19.b)**.

As análises por cromatografia em camada delgada das reações submetidas a 25°C e 40°C apontam um avanço da reação a 40°C em relação à reação a 25°C.

Na primeira hora de reação (alíquotas 0.5h e 1h) foi possível observar um avanço na transformação dos triglicerídeos em diglicerídeos. Este equilíbrio não tem a mesma velocidade na reação a 25°C. Esta observação está de acordo com a análise das alíquotas após 12 horas em ambas as reações.

Foi possível verificar através desta análise que em 12 horas de reação não havia mais a presença dos triglicerídeos na reação a 40°C, enquanto que, este resultado apenas pode ser alcançado com 24 horas na reação a 25°C (**FIGURA 31**).

Além disso, na reação a 40°C, observou-se uma diminuição maior em relação a quantidade total de mono e diglicerídeos no sentido de conversão a ésteres, após 12 horas de reação em relação ao que foi observado para a mesma reação a 25°C.

Por CLAE observou-se também uma tendência dos rendimentos reacionais a se igualarem em tempo próximo a 72 horas nas reações a 25 e 70°C no sentido de se alcançar o equilíbrio reacional.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência permitiram um maior embasamento destes resultados.

Efeito da Temperatura

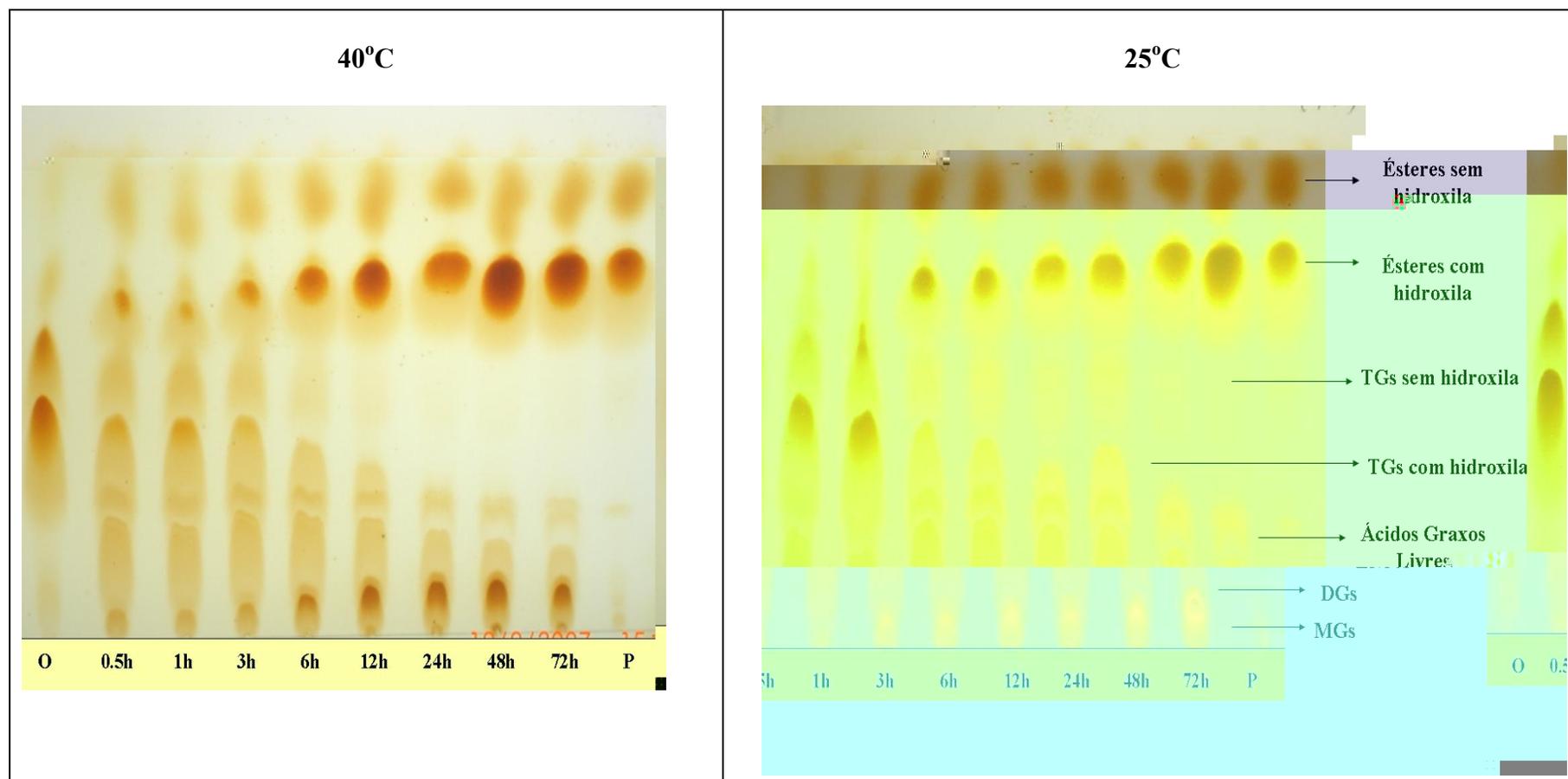


FIGURA 30 - Análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para as reações empregando 25°C e 40°C. Condições de reação descritas em 4.3.2.2. Nas figuras estão depositadas as alíquotas referentes a diferentes tempos de reação (xh); **O** : óleo; **P** : Padrão biodiesel de mamona.

TABELA IX - Rendimentos em ricinoleato de etila em reações enzimáticas utilizando Lipozyme TL IM e variando a temperatura do meio reacional. Condições reacionais descritas em 4.3.2.2. Condições de análise cromatográficas descritas em 4.3.8.

Concentração em % de ricinoleato de etila		
variando a temperatura da reação		
Tempo de reação (h)	Reação a 25°C	Reação a 40°C
0,5	9,12 ± 0,50	17,0 ± 0,31
1,0	11,69 ± 0,38	20,18 ± 0,24
3,0	55,56 ± 0,43	58,12 ± 0,61
6,0	60,83 ± 0,15	63,11 ± 0,75
12	61,90 ± 0,70	65,11 ± 0,13
24	64,19 ± 0,63	68,77 ± 0,80
48	67,63 ± 0,57	72,30 ± 0,56
72	73,63 ± 0,72	77,31 ± 0,34

Foi possível verificar que nestas condições de temperatura não há desativação da enzima e que, além disso, obteve-se um incremento na conversão dos materiais de partida á ésteres, conforme o esperado.

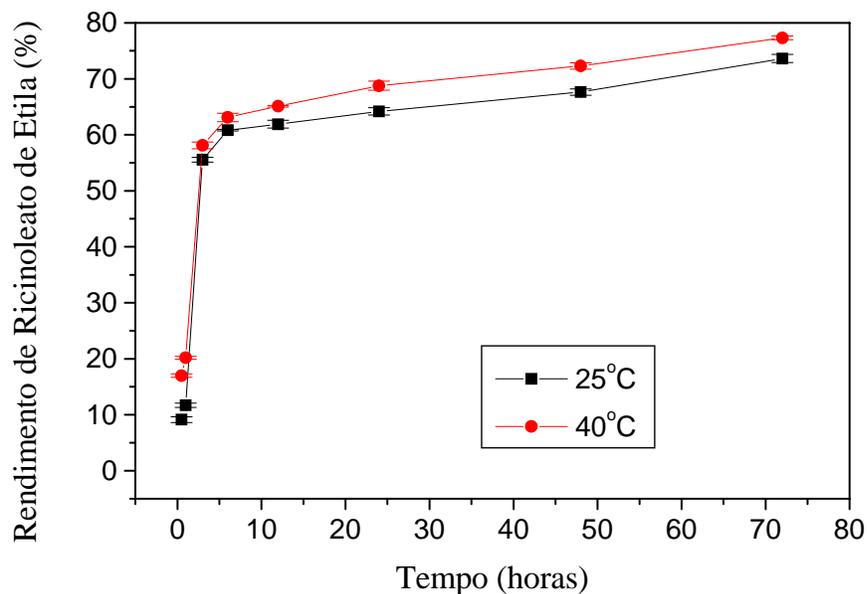


FIGURA 32 - Gráfico de rendimento em ricinoleato de etila no tempo em reações enzimáticas utilizando TL IM e variando a temperatura do meio reacional. Condições de reação descritas em 4.3.2.2.

A **FIGURA 32** permite visualizar a extensão do acréscimo no rendimento em relação a reação a temperatura ambiente. O rendimento inicial da reação é superior quando utilizados 40°C. Após 6 horas de reação este acréscimo torna-se mais evidente. E novamente, percebe-se uma tendência de os rendimentos se equilibrarem em tempo de reação próximo a 72 horas.

Dessa forma, observou-se ser mais conveniente o processamento da reação a 40°C do que a 25°C, sendo o incremento da temperatura uma ferramenta útil no processo de transesterificação enzimática utilizando a Lipozyme TL IM.

5.2.7. Efeito da concentração da enzima imobilizada na reação de transesterificação etílica utilizando a LIPOZYME TL IM como catalisador

Nesta etapa, foram realizadas reações de transesterificação etílica do óleo de mamona, variando a concentração de enzima presente no meio reacional. Estas reações foram realizadas a temperatura ambiente, utilizando nove equivalentes molares de etanol adicionados em nove etapas. As concentrações de enzima avaliadas e comparadas foram de 4% e 10% em massa de enzima granulada e imobilizada em relação à massa de óleo de mamona.

Foi possível observar-se, características comuns às reações, sendo que as mesmas tiveram seu progresso, no sentido de formação inicial dos diglicerídeos, que por sua vez se transformam em monoglicerídeos, que por fim são convertidos a ésteres, da mesma forma observada em reações anteriormente descritas.

Entretanto, foi verificado que, com o aumento da concentração de enzima no meio, a reação processou-se forma mais eficiente.

As análises por CLAE revelaram que logo no início da reação onde foram adicionados 10% de enzima imobilizada ao meio, as alíquotas analisadas 0,5h e 1h apresentaram uma transformação dos triglicerídeos a mono e diglicerídeos superior ao que ocorre na reação onde foram adicionados 4% em massa de enzima imobilizada (**FIGURA 33**).

Efeito da concentração da enzima

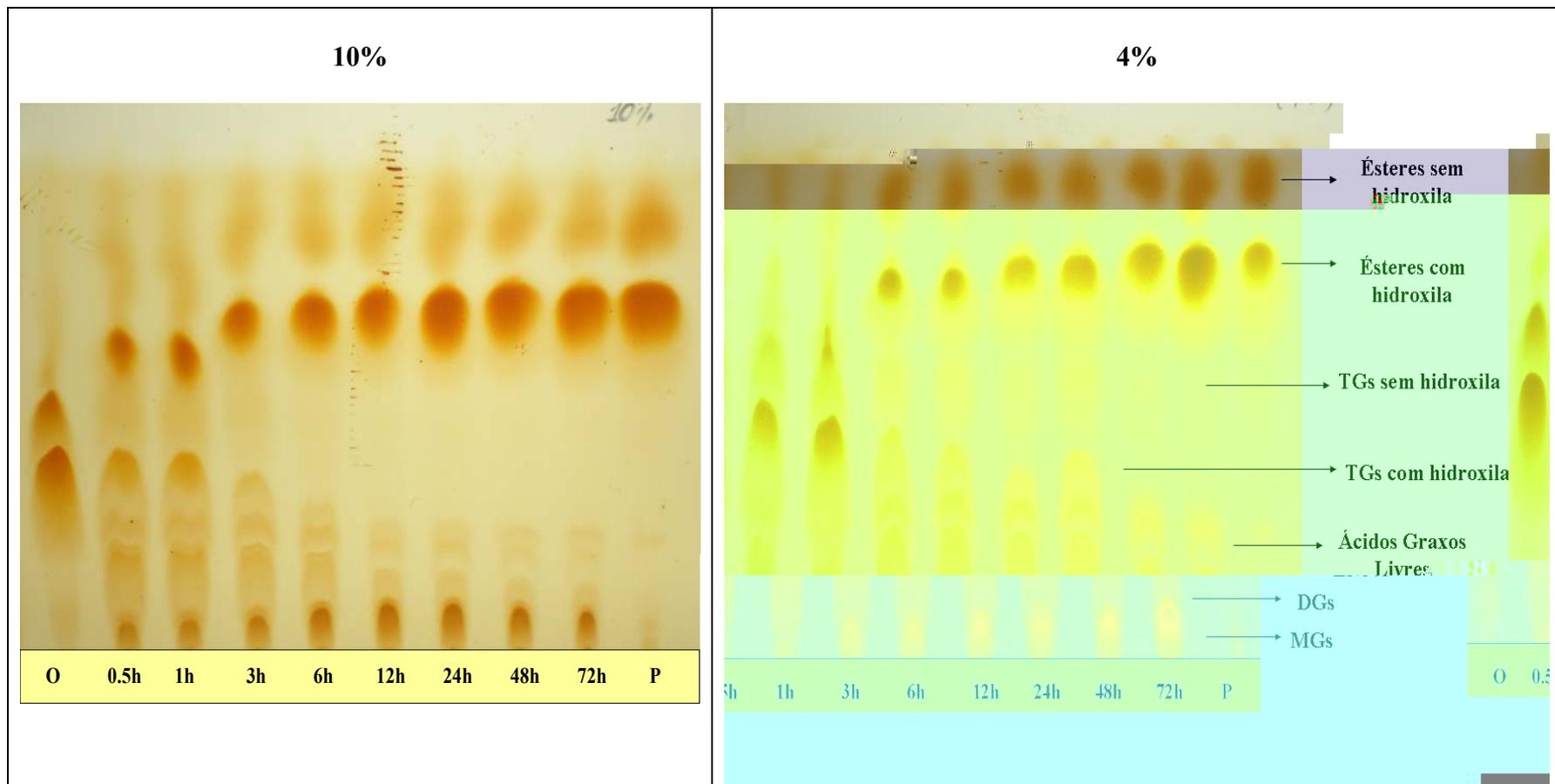


FIGURA 32 - Análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para as reações empregando 4% e 10% de enzima imobilizada em relação a massa de óleo utilizada na reação. Condições de reação descritas em 4.3.2.3. Nas figuras estão depositadas as alíquotas referentes a diferentes tempos de reação (xh); **O** : óleo; **P** : Padrão biodiesel de mamona.

Na reação onde foi utilizada a menor quantidade de enzima, quase não há monoglicerídeo formado durante a primeira hora de reação, enquanto que na outra reação estes intermediários estão presentes de forma significativa.

Esta conversão foi ainda considerada superior a que foi observada na reação onde houve o incremento da temperatura de 25 para 40°C.

Foi possível observar o desaparecimento dos triglicerídeos quase que por completo com apenas 6 horas de reação.

Além disso, até 48 horas reacionais foi possível observar a evolução da reação no sentido da formação dos monoglicerídeos a partir dos diglicerídeos. Entretanto, no intervalo entre 48 e 72 horas é possível observar que a reação atingiu uma etapa de consumo de monoglicerídeos no sentido de formação dos ésteres, fato que não havia sido observado nas reações realizadas nas condições estudadas até aqui.

Em 72 horas de reação, a fração de diglicerídeos no meio pode ser considerada inexistente. E o rendimento reacional pode ser considerado de maneira geral muito superior a reação onde foram utilizados 4% de enzima imobilizada em massa.

A **TABELA X** apresenta os resultados obtidos pela quantificação em ricinoleato de etila nas alíquotas coletas durante o progresso da reação.

Pela análise dos resultados obtidos por cromatografia líquida, pode-se dizer que a reação atingiu rendimentos considerados satisfatórios em apenas 6 horas de reação, tanto no caso da reação onde foram utilizados 4%, quanto no caso onde foram utilizados 10% em massa de enzima na forma imobilizada.

Entretanto, na reação onde foram utilizados 10% de enzima, a velocidade de conversão inicial é aproximadamente 3 vezes maior.

TABELA X - Rendimentos em ricinoleato de etila em reações enzimáticas utilizando Lipozyme TL IM e variando a concentração de enzima imobilizada no meio. Condições reacionais descritas na 4.3.2.3. Condições de análise cromatográficas descritas na 4.3.8.

Condições reacionais	Concentração em % de ricinoleato de etila obtida variando a concentração da enzima	
	Reação com 4% de enzima em relação a massa de óleo	Reação com 10% de enzima em relação a massa de óleo
Tempo de reação		
0,5 horas	9,12 ± 0,50	30,49 ± 0,44
1 hora	11,69 ± 0,38	30,69 ± 0,87
3 horas	55,56 ± 0,43	57,67 ± 0,09
6 horas	60,83 ± 0,15	63,28 ± 0,76
12 horas	61,90 ± 0,70	64,51 ± 0,91
24 horas	64,19 ± 0,63	76,91 ± 0,53
48 horas	67,63 ± 0,57	83,36 ± 0,55
72 horas	73,63 ± 0,72	89,70 ± 0,29

Apesar da velocidade de conversão inicial rápida e dos altos valores de conversão após 24 horas, especialmente quando foram utilizados 10% de enzima, pode-se dizer, entretanto, a reação tende a atingir o equilíbrio de forma lenta. Assim, mesmo sendo possível atingir conversão de 30,49% em apenas meia hora, só é possível atingir 64,5% após 12 horas de reação e 89,70% após 72 horas de reação.

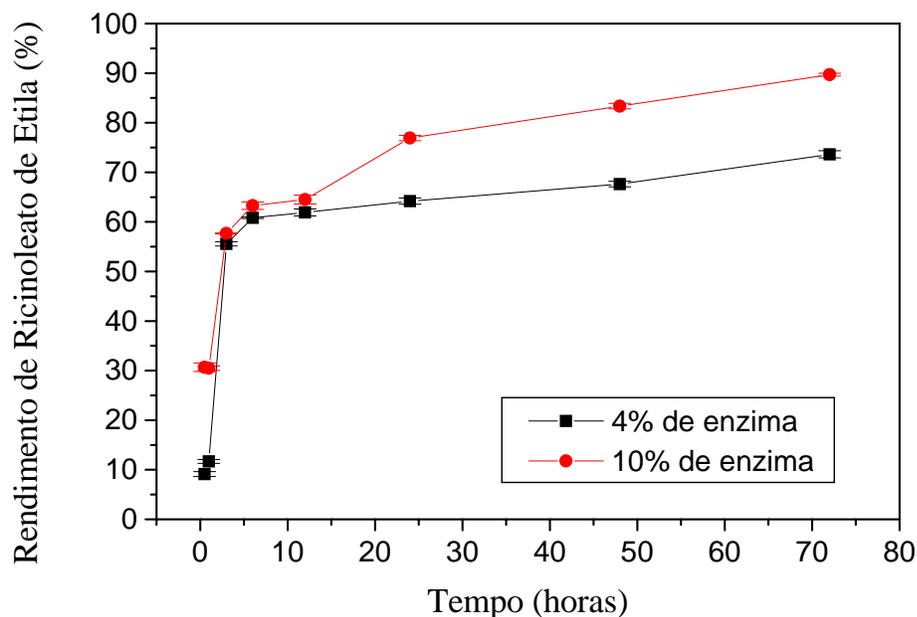


FIGURA 34 - Gráfico de rendimento em ricinoleato de etila no tempo em reações enzimáticas utilizando Lipozyme TL IM e variando a concentração de enzima imobilizada no meio reacional. Condições de reação descritas em 4.3.2.3.

A **FIGURA 34** permite ilustrar esta característica para a lipase de *Thermomices lanuginosus*. Verificou-se uma alta velocidade inicial para reação até aproximadamente 10 horas e uma posterior queda na velocidade da reação com tendência a um equilíbrio em ambos os casos. As reações realizadas para estudo de outros parâmetros de influencia reacional também apresentaram este comportamento durante o progresso da reação.

Entretanto, embora o equilíbrio para as reações utilizando esta lipase seja lentamente atingido, a utilização de uma maior concentração em massa deste catalizador, resultou em maior rendimento em menor intervalo de tempo.

5.2.8. Efeito da maceração da enzima imobilizada na reação de transesterificação utilizando a LIPOZYME TL IM como catalisador

A trituração (maceração) da enzima foi realizada também com base em estudos previamente desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa. A importância de se realizar reações com a enzima na forma triturada (macerada) reside no fato de que a enzima tem a superfície de contato expandida (maximizada) e conseqüentemente, um aumento na velocidade de reação.

Para tanto, 4% da enzima Lipozyme TL IM em massa em relação à massa de óleo de mamona, foram pesados e transferidos para um cadinho onde foi realizada a trituração. Posteriormente a enzima foi transferida para o frasco reacional contendo o óleo, onde 9 equivalentes de etanol foram adicionados em alíquotas, segundo metodologia descrita em **4.3.2.5.**

Os resultados obtidos podem ser observados na **FIGURA 35** podendo ser comparados com outra reação em condições semelhantes, porém com a enzima em sua forma original (não macerada).

A análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas retiradas das reações com óleo de mamona e a enzima Lipozyme TL IM nas formas macerada e não macerada permitem observar uma melhor velocidade de conversão inicial, nas primeiras horas 6 horas de reação, em relação à reação não macerada. Este fato pode ser ilustrado, inclusive, pela maior formação dos intermediários monoglicérides, resultantes por sua vez, da quebra dos diglicérides. Entretanto, após 6 horas reacionais a evolução da reação macerada apresenta-se de forma lenta até atingir 72 horas.

Efeito da maceração da enzima

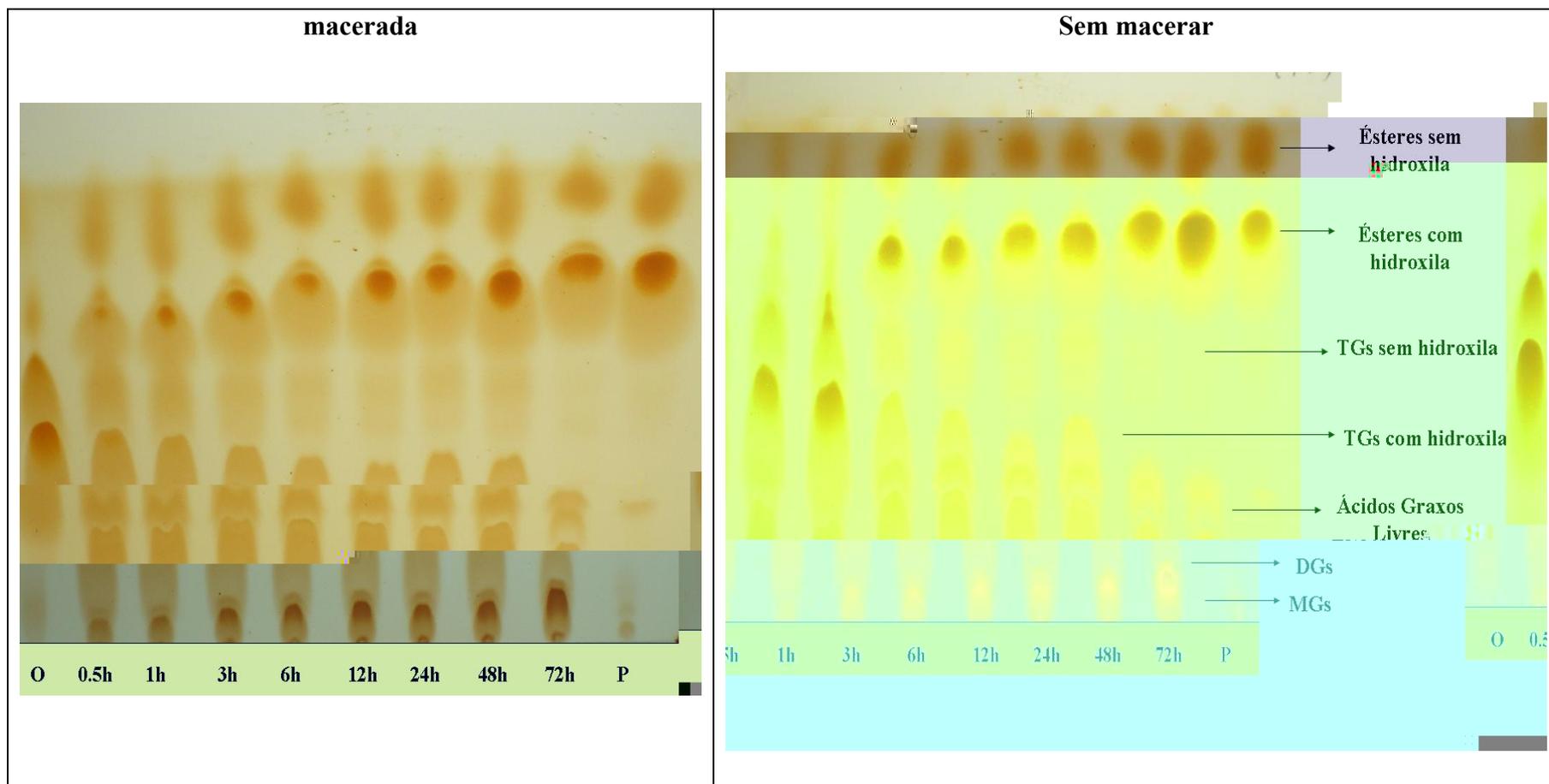


FIGURA 34 - Análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para as reações empregando 4% de enzima imobilizada nas formas macerada e sem macerar. Condições de reação descritas em 4.3.2.4. Nas figuras estão depositadas as alíquotas referentes a diferentes tempos de reação (xh); **O** : óleo; **P** : Padrão biodiesel de mamona.

TABELA XI - Rendimentos em ricinoleato de etila em reações enzimáticas utilizando TL IM e variando a granulometria de enzima imobilizada no meio. Condições reacionais descritas na 4.3.2.4. Condições de análise cromatográficas descritas na 4.3.8.

Condições reacionais	Concentração em % de ricinoleato de etila obtida variando a granulometria da enzima imobilizada	
	Reação com enzima imobilizada	Reação com enzima imobilizada e macerada
0,5 horas	9,12 ± 0,50	26,4 ± 0,90
1 hora	11,69 ± 0,38	27,50 ± 0,78
3 horas	55,56 ± 0,43	57,95 ± 0,57
6 horas	60,83 ± 0,15	62,64 ± 0,84
12 horas	61,90 ± 0,70	63,49 ± 0,91
24 horas	64,19 ± 0,63	57,98 ± 0,67
48 horas	67,63 ± 0,57	57,12 ± 0,41
72 horas	73,63 ± 0,72	69,64 ± 0,84

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou melhores rendimentos para a reação macerada até aproximadamente 6 horas de reação, apesar disto foi possível identificar uma estabilização no rendimento da reação em intervalo entre 6 e 48 horas (**TABELA XI**).

Apesar disto foi possível obter rendimento de 69,64 ± % em ricinoleato de etila em 72 horas de reação.

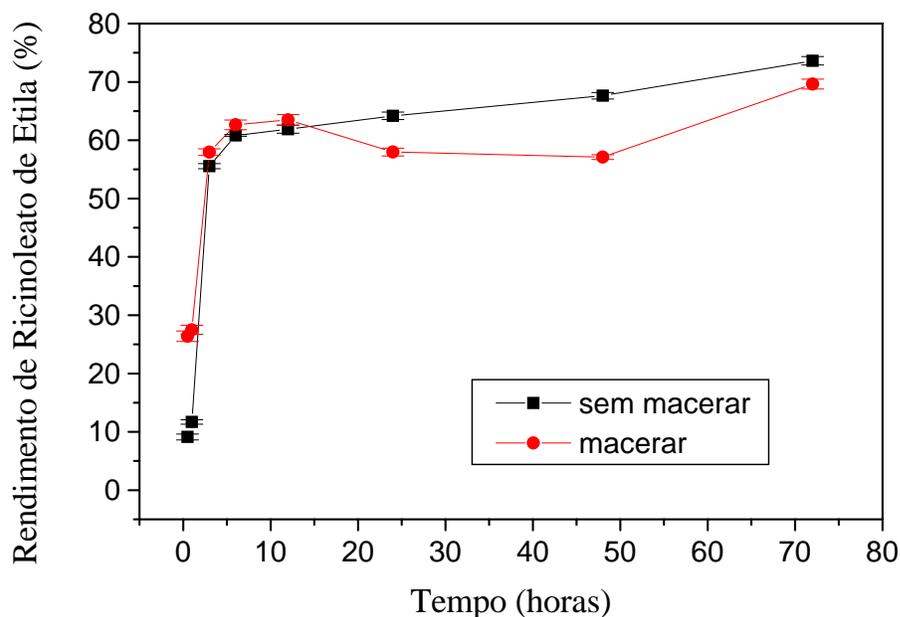


FIGURA 36 – Gráfico de rendimento em ricinoleato de etila no tempo em reações enzimáticas utilizando Lipozyme TL IM e variando a granulometria da enzima imobilizada no meio reacional. Condições de reação descritas em 4.3.2.5.

Algumas hipóteses são discutíveis nesta etapa, apesar da rápida velocidade de conversão inicial da enzima imobilizada e macerada na primeira etapa, a maceração da enzima faz com que esta esteja dispersa em partículas com maior superfície de contato do que na sua forma imobilizada original.

Assim, a enzima estaria mais susceptível ao meio e é capaz de responder mais facilmente a presença do substrato. Entretanto, a enzima encontra-se mais susceptível a presença das moléculas de álcool, além disso, é conhecido da literatura que o excesso de álcool ocasiona inativação da enzima (SHIMADA, 2002). Dessa forma, 9 equivalentes de etanol em reação com a enzima na forma macerada podem ser uma condição drástica

demais a atuação da mesma, fazendo com que a mesma, após certo tempo de reação apresente menor rendimento.

Além do aumento na superfície de contato, a presença de sílica suspensa no meio reacional usada como suporte de imobilização, pode estar viabilizando a migração de grupamentos acila fazendo com que 1,2-DGs convertam-se a 1,3-DGs e conseqüentemente tornando a reação mais rápida (DU, 2005).

Conclui-se, portanto, que a enzima na forma macerada contribui para uma alta velocidade no início da reação uma vez que esta encontra-se mais finamente distribuída no meio reacional, o que favorece a sua atuação catalítica.

Esta alta velocidade inicial verificada para a reação onde foram utilizados 4% de enzima imobilizada em massa, na forma macerada, pode ser comparada à velocidade inicial obtida quando foram utilizados 10% de enzima no meio, entretanto na forma original (sem macerar).

5.2.9. Efeito da pré-incubação da enzima imobilizada na reação de transesterificação utilizando a LIPOZYME TL IM como catalisador

A pré-incubação da enzima imobilizada foi realizada com o intuito de pré-condicionar o sistema enzima-suporte a reação de transesterificação. Este procedimento foi aplicado com base em estudos apresentados na literatura e aplicados anteriormente em nosso grupo de pesquisa (HURTADO, 2006). Este pré-tratamento baseou-se na idéia de que, sendo a Lipozyme TL IM suportada em sílica e sabendo que o processo de imobilização aplicado pelo fabricante resulta em uma quantidade considerável de ar e água nos poros do suporte, inerentes ao processo da imobilização, acreditou-se que um pré-tratamento com utilização de compostos com características similares as da matéria-prima a ser utilizada na reação, trataria-se de um método eficiente para a remoção da água nos interstícios do suporte, bem como para a ativação da enzima suportada.

Portanto a enzima a ser utilizada em reação pós pré-tratamento, foi submetida a imersão em óleo de mamona, filtrada e submetida a imersão em ésteres etílicos obtidos a partir de transesterificação do óleo de mamona por processo químico (4.3.2.4).

Posteriormente a enzima foi filtrada, para remoção dos ésteres, filtrada novamente com a presença de óleo de mamona em funil de placa sinterizada e submetida a reação. Os resultados referentes ao progresso da reação foram ilustrados em análise por cromatografia em camada delgada (FIGURA 37).

Esta análise nos permite dizer que, apesar de os resultados não apresentarem grandes diferenças em relação a placa comparativa (FIGURA 37) para a reação com a enzima sem pré-incubar, a fração em 72 horas reacionais apresentou uma pequena vantagem em conversão em relação a outra.

Efeito da Pré-incubação da enzima

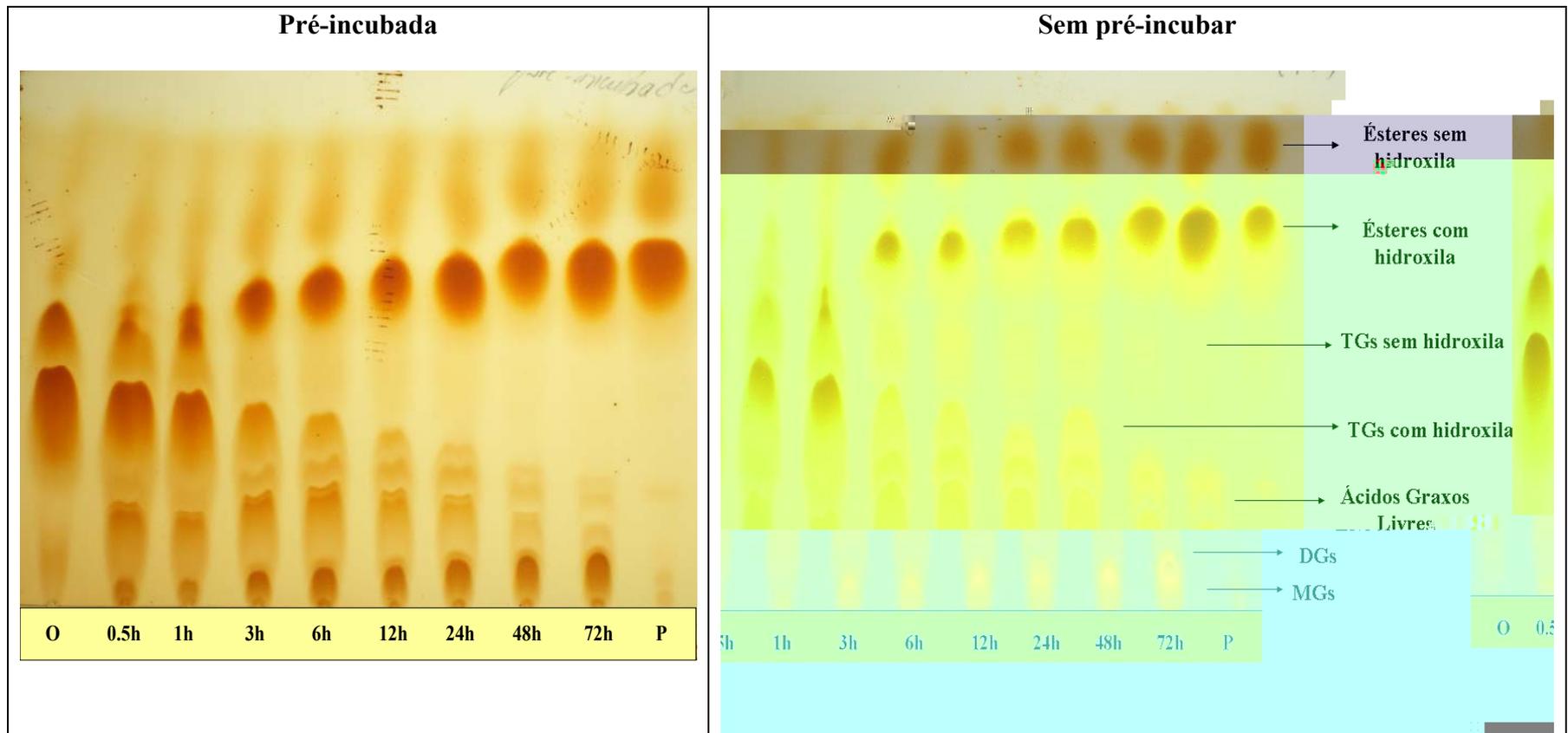


FIGURA 36 - Análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para as reações empregando 4% de enzima imobilizada nas formas pré-tratada e sem pré-tratamento. Condições de reação descritas em 4.3.2.5. Nas figuras estão depositadas as alíquotas referentes a diferentes tempos de reação (xh); **O** : óleo; **P** : Padrão biodiesel de mamona.

Observando as análises obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência, verificou-se que a reação onde foi utilizado o pré-tratamento da enzima não apresentou resultados significativos em relação à reação onde tratamento não foi aplicado.

TABELA XII - Rendimentos em ricinoleto de etila em reações enzimáticas utilizando TL IM e variando o pré-tratamento da enzima imobilizada no meio reacional. Condições reacionais descritas em 4.3.2.4. Condições de análise cromatográficas descritas em 4.3.8.

Concentração em % de ricinoleato de etila		
Condições reacionais	variando condições iniciais de tratamento da enzima imobilizada	
Tempo de reação (h)	Reação com enzima imobilizada e sem pré-tratamento	Reação com enzima imobilizada e pré-tratada
0,5	9,12 ± 0,50	4,32 ± 0,31
1	11,69 ± 0,38	14,06 ± 0,54
3	55,56 ± 0,43	16,86 ± 0,97
6	60,83 ± 0,15	46,49 ± 0,52
12	61,90 ± 0,70	51,75 ± 0,70
24	64,19 ± 0,63	54,38 ± 0,50
48	67,63 ± 0,57	69,80 ± 0,68
72	73,63 ± 0,72	71,90 ± 0,93

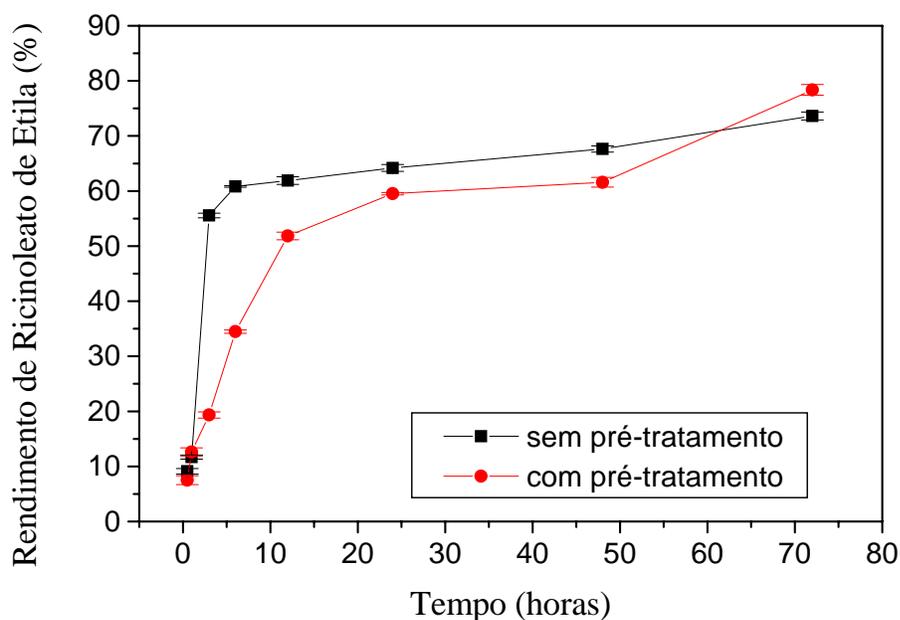


FIGURA 38 – Gráfico de rendimento em ricinoleato de etila em relação no tempo em reações enzimáticas utilizando Lipozyme TL IM e variando o pré-tratamento da enzima imobilizada no meio reacional. Condições de reação descritas em 4.3.2.4.

A **FIGURA 38**, permite visualizar os resultados obtidos nas reações onde foi realizada a pré-incubação versus resultados obtidos em reações sem pré-incubar a enzima.

A reação onde o tratamento não foi empregado apresentou melhor conversão e os rendimentos podem ser considerados significativos, portanto a pré-incubação em reações empregando óleo de mamona, etanol e Lipozyme TL IM em condições descritas, não pode ser considerada uma opção eficiente.

Além disso, há de se considerar o fato de que este pré-tratamento agrega um gasto complementar com matéria prima, no caso o óleo utilizado para a pré-incubação e na lavagem da enzima antes da reação, fato que somado aos rendimentos observados, inviabiliza esta prática.

5.2.10. Reação enzimática utilizando óleo de mamona e Lipozyme TL IM em condições reacionais otimizadas

Uma vez tendo sido estudados alguns parâmetros de influencia sobre a transesterificação do óleo de mamona utilizando Lipozyme TL IM como catalisador enzimático, foram realizadas reações através da utilização destes parâmetros de forma conjugada.

Dessa forma, foi avaliado o rendimento de reações onde foram adicionados 50 ml de óleo de mamona, 10% da enzima Lipozyme TL IM imobilizada em massa em relação à massa de óleo empregado sem pré-tratamento e sem maceração, 9 equivalentes molares de etanol e temperatura de 40°C.

A reação foi processada durante 72 horas e alíquotas foram retiradas em intervalos de tempos regulares e pré-definidos de acordo com as reações anteriormente estudadas. Estas alíquotas foram novamente analisadas por cromatografia em camada delgada e por cromatografia líquida de alta eficiência, segundo metodologia já descrita (4.3.3 e 4.3.8).

Os resultados obtidos por cromatografia em camada delgada podem ser observados na **FIGURA 39**.

Condições ideais

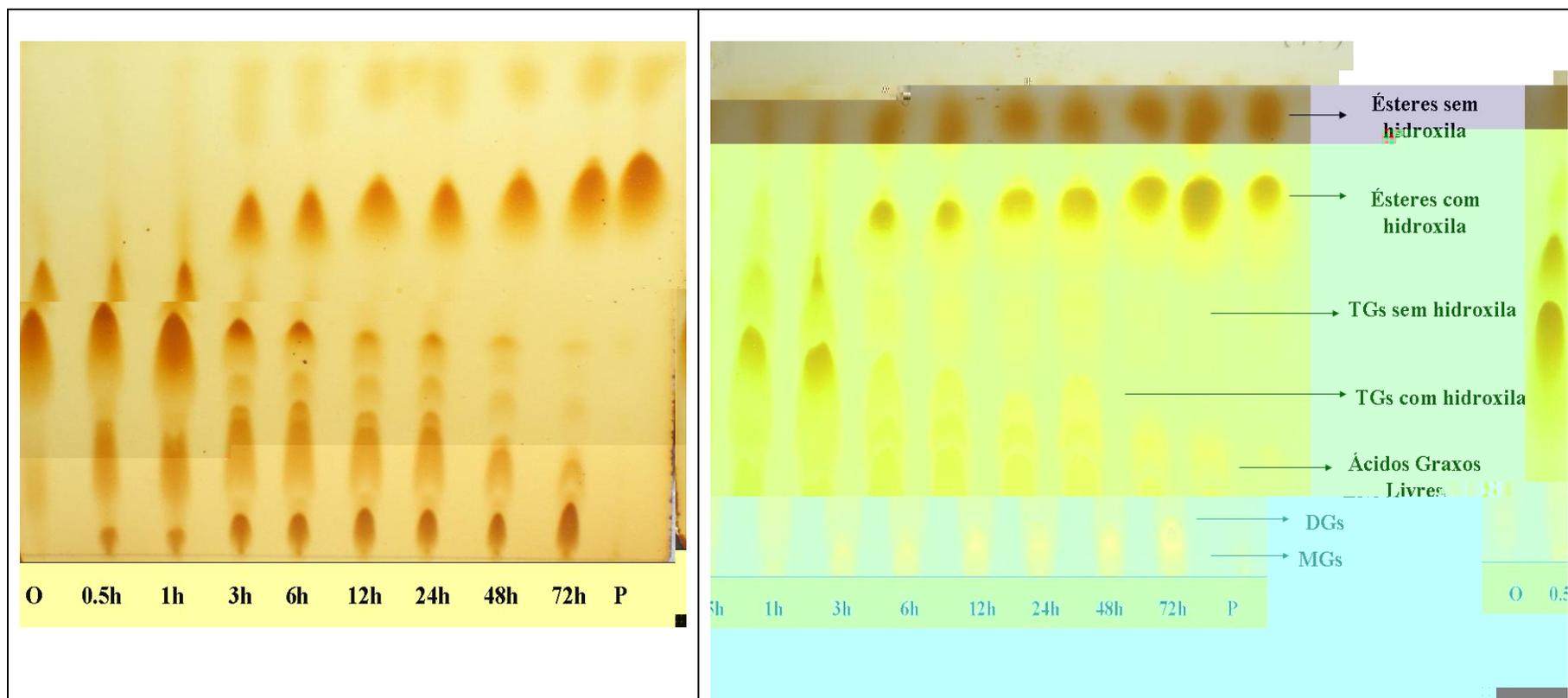


FIGURA 38 - Análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para a reação de transesterificação etílica em condições otimizadas utilizando óleo de mamona e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático. Condições de reação descritas em 4.3.2.6. Nas figuras estão depositadas as alíquotas referentes a diferentes tempos de reação (xh); **O** : óleo; **P** : Padrão biodiesel de mamona.

A análise por cromatografia em camada delgada, indicou um avanço da reação onde foi utilizada a otimização dos parâmetros, entretanto, não nos permite dizer muito em termos quantitativos. Entretanto, a CCD permitiu a observação de espécies intermediárias mono e diglicerídeos residuais mesmo após 72 horas de reação.

Para informações quantitativas, foram realizadas análises das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados obtidos por esta análise em termos de rendimento em ricinoleato de etila, estão resumidos na **TABELA XIII**.

TABELA XIII - Rendimentos em ricinoleato de etila em reação de transesterificação etílica em condições otimizadas utilizando óleo de mamona e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático. Condições de reação descritas em 4.3.2.6. Condições de análise cromatográficas descritas em 4.3.8.

Tempo de reação (h)	Concentração em % de ricinoleato de etila
0,5	13,11 ± 5,27
1	23,74 ± 2,75
3	26,34 ± 1,46
6	53,07 ± 4,65
12	60,15 ± 4,49
24	61,31 ± 1,49
48	70,17 ± 3,89
72	77,95 ± 0,83

Os resultados obtidos indicam que as condições utilizadas para otimização da reação foram eficientes, sendo possível atingir um rendimento de aproximadamente 41,82% de conversão em apenas 1 hora de reação, que não foi possível através da utilização de nenhum dos parâmetros de influencia aplicados anteriormente.

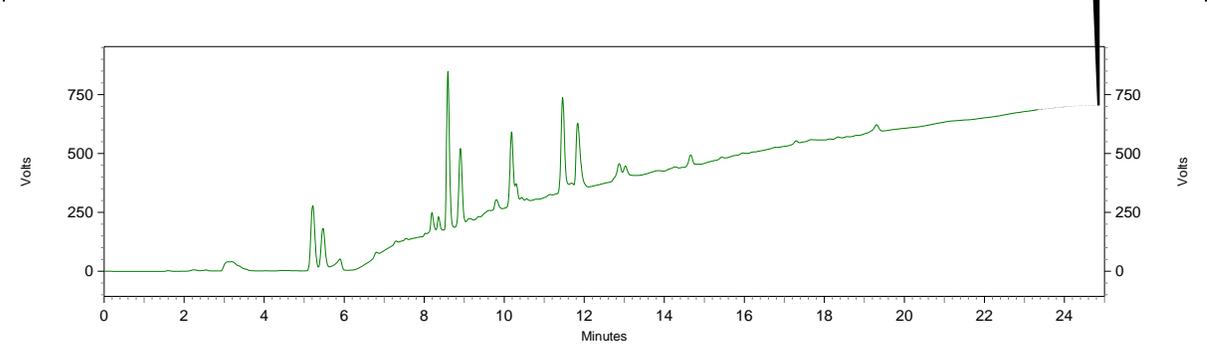
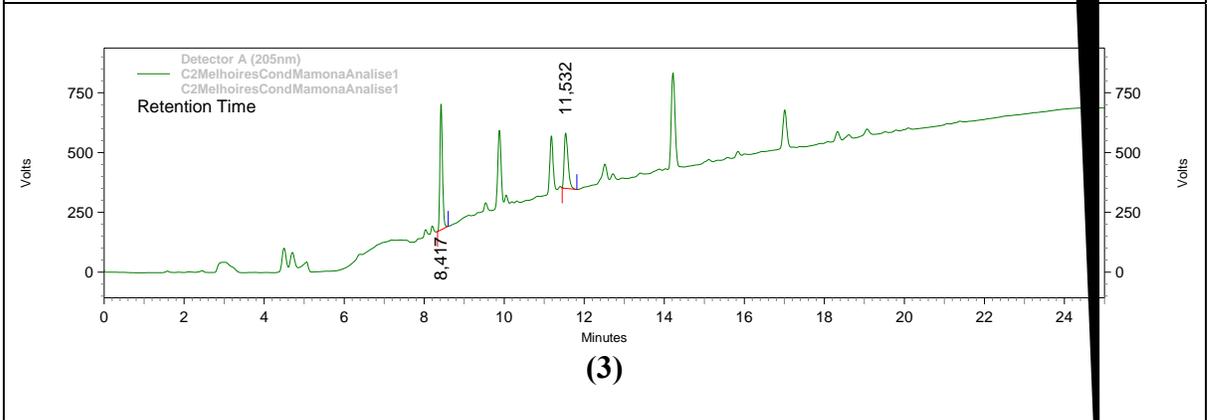
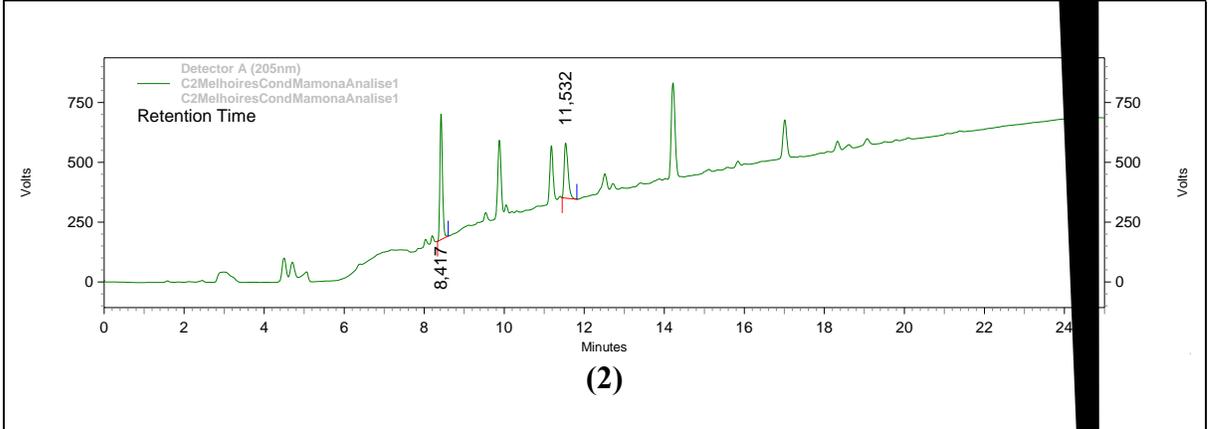
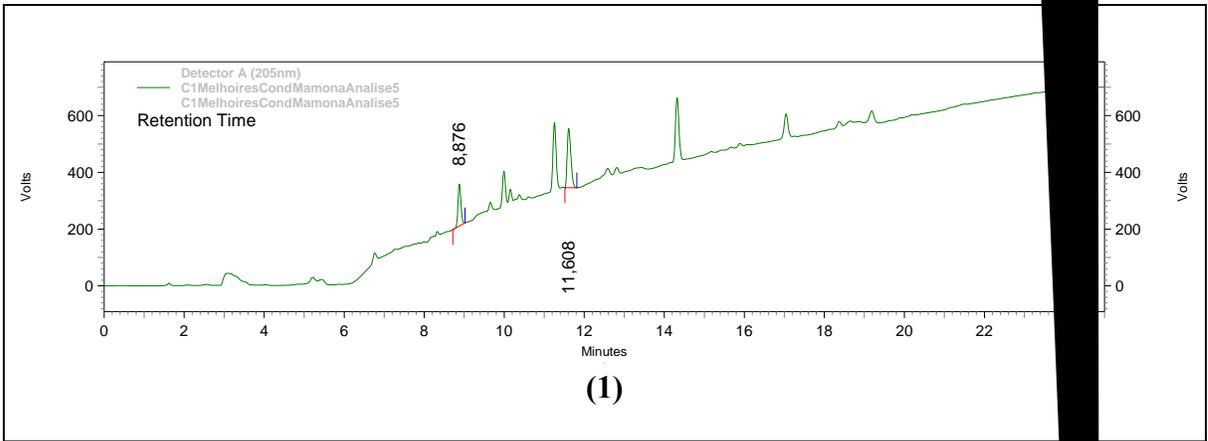
Além disso, foi possível verificar o progresso da reação, através dos cromatogramas obtidos nas análises das alíquotas sob as quais foram feitas as quantificações do ricinoleato de etila para esta reação. Estes resultados foram interpretados de acordo com os dados cromatográficos, como o tempo de retenção relativo esperado para ésteres, monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos, fornecidos pela literatura e cuja metodologia foi utilizada na realização deste trabalho (HOLCAPEK *et al*, 1999).

Dessa forma, a **FIGURA 40** refere-se aos cromatogramas da reação, onde **(1)**, **(2)**, **(3)**, **(4)**, **(5)**, **(6)**, **(7)** e **(8)** correspondem a 0,5; 1; 3; 6; 12; 24; 48 e 72 horas de reação, respectivamente.

Pode-se observar em **(1)** os picos referentes à tricaprilina ($t_r = 11,608$ min) e ao ricinoleato de etila ($t_r = 8,876$ min.), bem como o linoleato de etila ($t_r = 11,2$) inicialmente em formação. Além disso, pode-se verificar no mesmo cromatograma, a presença dos triglicerídeos em $t_r = 14,3$ min. e $t_r = 16,6$ min, bem como a presença dos diglicerídeos em $t_r = 10,1$ min.

Em **(2)** pode-se verificar que estes diglicerídeos vão sendo formados a partir triglicerídeos ao mesmo tempo em que os monoglicerídeos ($t_r = 4-5$ min) vão sendo formados no progresso da reação, a partir dos diglicerídeos correspondentes.

Em **(3)** a formação do ricinoleato incrementa-se e em **(4)** pode-se verificar o desaparecimento quase que total do triglicerídeos no sentido de formação dos intermediários reativos mono e diglicerídeos bem como dos ésteres correspondentes.



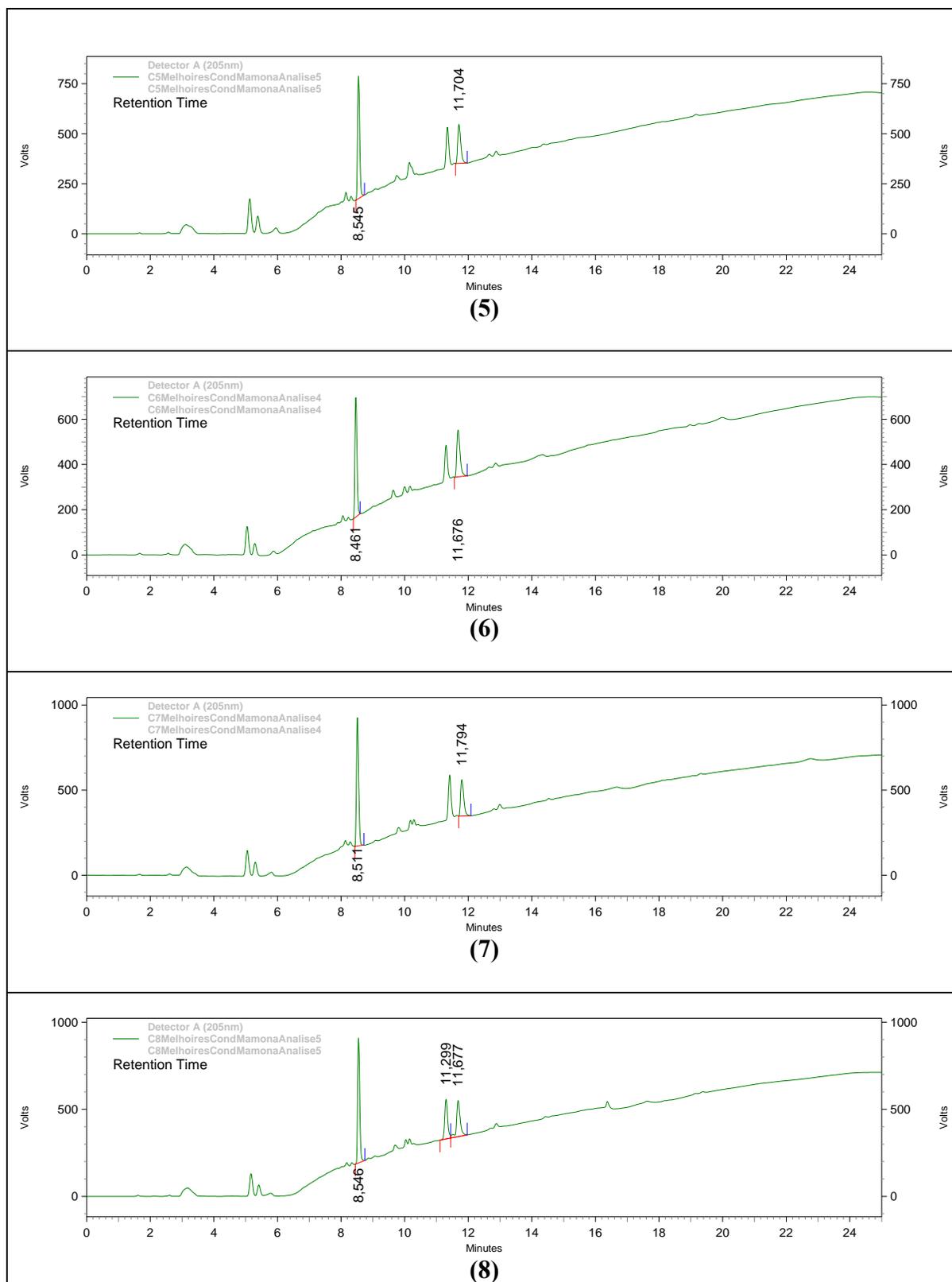


FIGURA 40 – Cromatogramas obtidos por análise em CLAE das alíquotas coletadas em reação otimizada utilizando óleo de mamona e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático. Condições de reação descritas em 5.2.10.

Em (5) pode-se verificar, por sua vez, o desaparecimento quase que total dos diglicerídeos e incremento do mono glicerídeos que em última instancia dão origem aos ésteres correspondentes.

Pode-se verificar que a evolução dos monoglicerídeos a ésteres continua em (6) e (7), até que em (8) observa-se apenas a presença do ricinoleato de etila ($t_r= 8,546$), do linoleato de etila ($t_r=11,299$) e do padrão interno de tricaprilina ($t_r= 11,677$), além de monoglicerídeos e diglicerídeos de forma residual.

É válido lembrar que para os compostos triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos, com mesmo ECN (Número de carbonos equivalentes), que é calculado através do número total de carbonos da molécula e subtraindo-se o número de duplas ligações multiplicadas por dois ($ECN= CN-2DB$), não há distinção no tempo de retenção, ou seja, estes compostos coeluem. O mesmo ocorre para isômeros posicionais como por exemplo 1,2-RR-3L e 1,3-RR-2L.

Estes fatos aliados à composição relativamente complexa dos óleos vegetais fazem com que o monitoramento da composição do biodiesel, principalmente em termos de qualidade comercial, necessite de metodologias sensíveis e reprodutivas.

Neste trabalho, a metodologia descrita na literatura por Holcapek e colaboradores para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) contribuiu para monitoramento das reações. Entretanto, a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) trata-se de uma metodologia mais simples, rápida, barata e eficiente no acompanhamento da conversão da conversão dos triglicerídeos aos ésteres correspondentes de uma forma geral, conforme ilustrado na **FIGURA 39**.

Além disso, o rendimento calculado em termos de ésteres totais correspondente foi de $78,95\% \pm 1,19$. Este rendimento foi obtido a partir da fração referente a 72 horas de reação, onde estão presentes os ésteres etílicos do ácido ricinoleico (ricinoleato de etila) e linoléico (linoleato de etila).

Comparando estes resultados com os obtidos para a transesterificação enzimática do óleo de mamona utilizando a enzima Novozym 435 nas condições previamente estabelecidas em nosso grupo de pesquisa (4% de enzima imobilizada macerada e pré-incubada, além de 3 equivalentes de etanol e obteve-se 94,51% de rendimento em ésteres totais para a reação em 24 horas), conclui-se que a utilização da metodologia proposta pelo presente trabalho trata-se de uma boa metodologia, capaz de atuar na transformação do óleo de mamona a biodiesel, entretanto, não supera em rendimento da reação de transesterificação enzimática usando a lipase inespecífica de *Cândida Antarctica* (Novozym 435).

5.2.11. Reação enzimática em duas etapas utilizando óleo de mamona, Lipozyme TL IM e Novozym 435 como catalisadores enzimáticos

Foram realizadas transesterificações em duas etapas utilizando numa primeira etapa de conversão a Lipozyme TL IM, de menor preço e em maior proporção, segundo metodologia descrita na 4.3.3.7. Numa segunda etapa reacional, foi utilizada a Novozym 435, de maior preço e em menores proporções, utilizando metodologia descrita em 4.3.2.8.

Pórem, como sempre se observa a presença de diglicerídeos e monoglicerídeos remanescentes, a Novozym 435 foi utilizada na conversão em um segundo estágio reacional visando se obter uma conversão completa, uma vez que esta trata-se de uma lípase inespecífica.

Dessa forma, tomou-se o meio reacional obtido após transesterificação em condições otimizadas com a Lipozyme TL IM, filtrou-se para remoção da enzima, lavou-se e secou-se segundo metodologia descrita em **4.3.10.1**.

Posteriormente o meio foi submetido a nova reação utilizando nova enzima a Novozym 435, sendo os resultados obtidos na análise por cromatografia em camada delgada realizada para as alíquotas coletadas na reação, ilustrados na **FIGURA 41**.

Nesta figura podemos comparar os resultados obtidos na primeira etapa de reação em que foi utilizada a Lipozyme TL IM como catalisador, com os resultados obtidos na segunda etapa de reação em que foi utilizada a Novozym 435.

As alíquotas **72h** e a **0h** depositadas em placas diferentes tratam-se da fração coleta após 72 horas de reação com a Lipozyme TL IM. Entretanto, a alíquota **0h** é referente ao meio reacional submetido à retirada da glicerina e que foi novamente reagido, utilizando a Novozym 435 como catalisador enzimático.

A análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas da primeira e da segunda etapa de reação permitiram observar uma evolução total da reação.

Na segunda etapa de reação podemos observar que na primeira meia hora de reação, o consumo dos intermediários mono e diglicerídeos pela atuação da enzima inespecífica (Novozym 435) no meio ocorre de forma significativa.

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência nos permite observar um avanço expressivo da reação, de forma não observada anteriormente em uma única etapa.

Reação Mamona em duas etapas

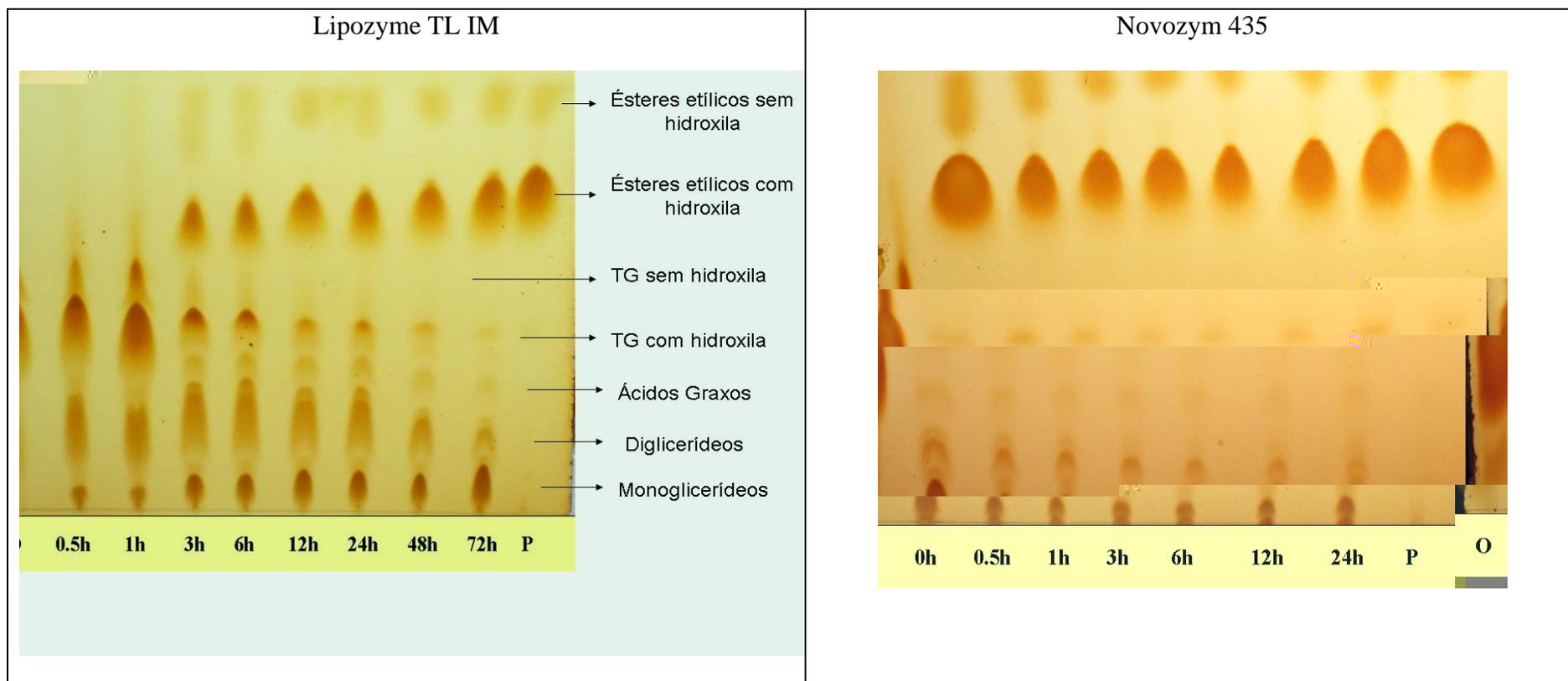


FIGURA 40 - Análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para a reação de transesterificação etílica em duas etapas, utilizando óleo de mamona, Lipozyme TL IM e Novozym 435 como catalisadores enzimáticos. Condições de reação descritas em 5.2.11. Nas figuras estão depositadas as alíquotas referentes a diferentes tempos de reação (xh); **O** : óleo; **P** : Padrão biodiesel de mamona.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência, mostrou que o rendimento em ésteres totais passou de $78,95 \pm 1,19$ para $84,91 \pm 2,05$ horas reacionais, evidenciando ser esta uma estratégia eficiente na conversão dos monoglicerídeos residuais, o que também pode ser confirmado pela análise dos cromatogramas obtidos (**FIGURA 42**).

Nesta figura, pode-se verificar em **(1)** e **(2)** referentes a 0 e 24 horas de reação respectivamente, utilizando a Novozym 435 na segunda etapa reacional, que o desaparecimento dos intermediários em 24 horas de reação é efetivo.

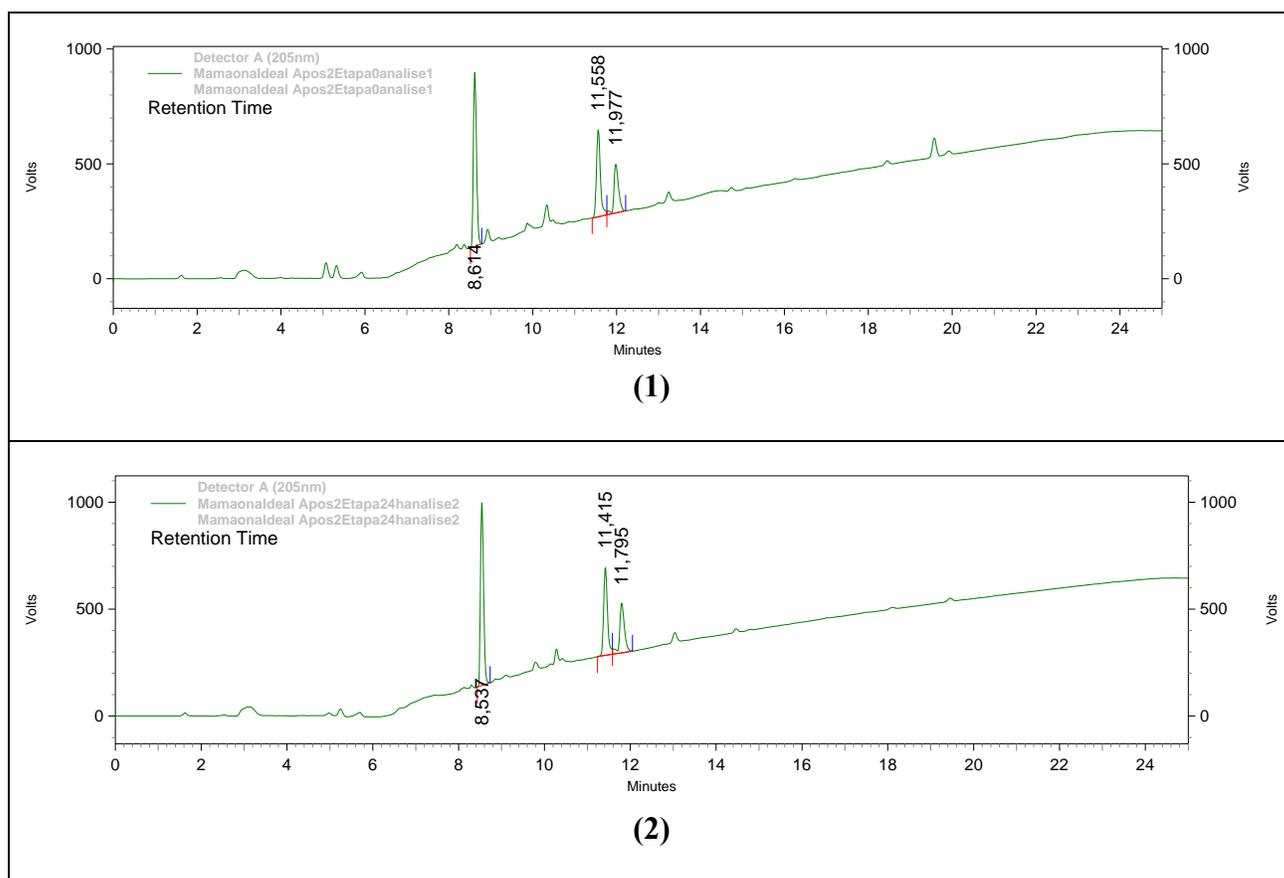


FIGURA 42 - Cromatogramas obtidos por análise em CLAE das alíquotas coletadas em reação de transesterificação etílica em duas etapas, utilizando óleo de mamona, Lipozyme TL IM e Novozym 435 como catalisadores enzimáticos. Condições de reação descritas em 5.2.11.

A re-transesterificação, ou segunda etapa reacional utilizando uma quantidade inferior de catalisador em relação à quantidade utilizada na primeira etapa reacional, em processos de conversão de óleos vegetais, trata-se de uma prática recorrente utilizada em nosso grupo de pesquisa de modo que se possa garantir a conversão de todo o material de partida, bem como de intermediários mono e diglicerídeos nos produtos de interesse (DABDOUB et al, P.I. 0.702.149-6; DABDOUB et al, P.I. 0.702.448-7)

Entretanto, a adição extra de catalisador ao meio pode acarretar complicações ao processo, principalmente quando utilizados catalisadores comuns como hidróxidos, alcoolatos ou ácidos, pois esta metodologia requer atenção especial e deve ser aplicada de modo a não interferir no processo de isolamento e recuperação dos produtos finais.

Buscou-se aqui, aplicar esta metodologia também ao processo enzimático pois, neste caso a metodologia pode ser utilizada de forma mais cômoda por tratar-se de processo por catálise heterogênea o que implica em vantagens como a não necessidade de lavagens exaustivas do meio, ou ajuste de pH, bem como outras características citadas na **TABELA VI**. Todos esses fatores tornaram possível obter-se um aumento no rendimento em ésteres totais de 5% de conversão para o processo enzimático em questão.

Estes resultados ainda não são considerados ideais, ainda mais quando comparados aos obtidos com a Novozym 435. Porém, deve-se ainda levar em conta o fato de que novos estudos deverão ser realizados para analisar o número de etapas possíveis de reutilização destas enzimas, que não foi descrito aqui, bem como um estudo comparativo de custo de produção para uma melhor avaliação e escolha de processo.

5.3. Reações com óleo de soja

5.3.1. Determinação do índice de acidez do óleo vegetal de soja

O índice de acidez obtido para o óleo de soja utilizado em reações enzimáticas desenvolvidas neste trabalho foi de $0,386 \pm 0,05$ mg KOH/ g óleo, valor satisfatório para a realização de reações enzimáticas. O índice de acidez foi determinado segundo metodologia descrita em **4.3.11.1**.

5.3.2. Determinação de teor de água contida no óleo vegetal de soja e no álcool etílico

O teor de água presente no óleo de soja utilizado nas reações enzimáticas foi de $0,048\% \pm 0,05$ (480 ppm) e no etanol anidro utilizado foi de $0,07\% \pm 0,03$ (700 ppm). Estes valores foram determinados segundo metodologia descrita em **4.3.11.2**.

5.3.3. Identificação do linoleato de etila utilizado como padrão de quantificação em reação de transesterificação enzimática utilizando a LIPOZYME TL IM como catalisador enzimático

Para comprovação da estrutura do linoleato de etila, comercial, adquirido SUPELCO e utilizado como padrão de calibração para acompanhamento da transformação do óleo de soja, foi realizada análise por RMN ^1H . Os resultados estão ilustrados no **ANEXO II**. A estrutura do linoleato de etila foi confirmada.

secundários da metila, já o multipeto em $\delta = 5,3$ corresponde aos hidrogênios ligados aos carbonos insaturados do linoleato de etila.

5.3.4. Efeito do teor de etanol na reação de transesterificação etílica utilizando óleo de soja e LIPOZYME TL IM como catalisador enzimático

A influencia do teor de álcool etílico nas reações de transesterificação utilizando a Lipozyme TL IM e óleo de soja foi avaliado.

Julgou-se novamente necessária a avaliação deste parâmetro de influencia reacional no início dos experimentos com óleo de soja, de modo a mensurar a quantidade de etanol necessária para que se possa ser adotada nas reações subsequentes e para que não houvesse perdas de rendimento por inativação da enzima em função da presença de excesso de etanol.

Novamente estes estudos foram realizados com base em outros estudos de desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa, onde as melhores condições reacionais foram estabelecidas para a alcóolise dos óleos de soja e mamona utilizando a Novozym 435, uma lípase de *Cândida antarctica* imobilizada em resina macroporosa, gentilmente cedida pelo fabricante Novozymes (Hurtado, 2005).

Os resultados aqui obtidos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Estas duas técnicas de análise permitiram de forma conjunta avaliar a conversão obtida na reação em termos de influencia do parâmetro analisado.

O rendimento reacional foi acompanhado pela observação da conversão do óleo de soja em ésteres etílicos do ácido linoléico, presente em maior quantidade neste óleo **(TABELA IV)**.

A cromatografia em camada delgada permitiu uma análise global e qualitativa do avanço da reação, sendo, portanto, indicativa do resultado conjuntamente analisado por cromatografia líquida de alta eficiência.

A presença de excesso de etanol no meio poderia tornar-se uma condição drástica a atuação enzimática, portanto, a quantidade de etanol utilizada em reações enzimáticas deve ser analisada para cada sistema em questão.

No caso da reação utilizando óleo de soja, 3 e 9 equivalentes de etanol e Lipozyme TL IM como catalisador, os resultados obtidos apontaram 3 equivalentes como sendo a melhor proporção para a atuação da enzima na conversão do óleo de soja a ésteres etílicos do ácido linoléico.

Esse resultado foi considerado, tendo por base o fato de que na análise por cromatografia em camada delgada **(FIGURA 43)** verificou-se maior consumo dos intermediários reativos e conseqüentemente maior formação dos produtos correspondentes após 12 horas na reação onde foram utilizados 3 equivalentes de etanol em relação a reação onde foram utilizados 9 equivalentes molares de etanol.

De fato, a análise por CLAE do rendimento da reação em linoleato de etila, indicou pouca diferença entre os resultados obtidos nas reações com 3 e 9 equivalentes de etanol de forma geral, entretanto, a reação com 3 equivalentes apresentou uma vantagem discreta nos rendimentos **(TABELA XIV)**, provavelmente devido as condições de atuação da enzima, uma vez que o excesso de etanol no meio pode acarretar efeitos que vão desde a sua ligação

com os grupos funcionais do centro ativo da enzima, bloqueando o sítio ativo e impedindo o progresso da reação, até a inativação completa da mesma (SHIMADA, 2002).

Efeito concentração de etanol

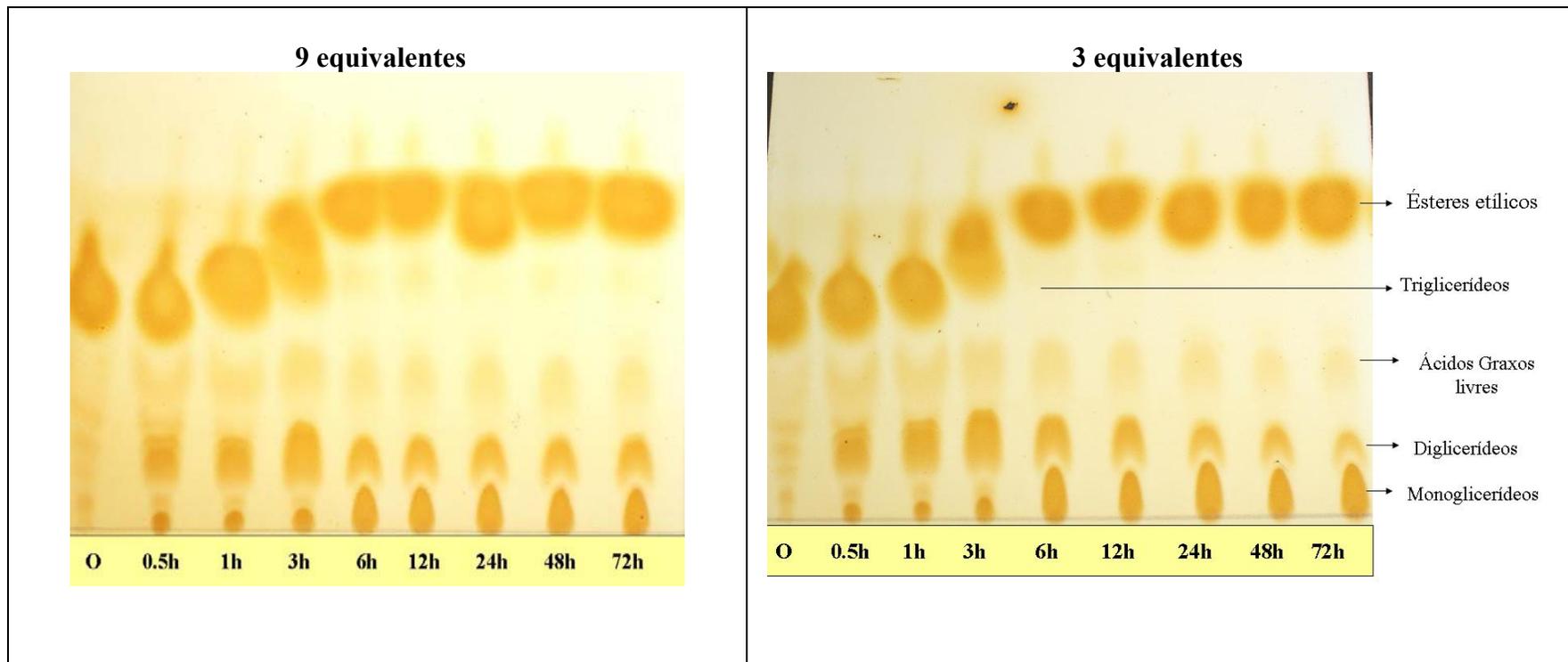


FIGURA 42 - A análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para as reações empregando 3 e 9 equivalentes de etanol e óleo de soja em reação de transesterificação enzimática utilizando Lipozyme TL IM como catalizador. Condições de reação descritas em 4.3.2.1.

Os resultados obtidos por cromatografia líquida para as alíquotas coletadas durante o intervalo de 3 a 6 horas de reação, onde o aumento na quantidade de etanol passa a ser efetivo no meio para a reação com 9 equivalentes, mostram um maior rendimento em linoleato de etila para a reação com 9 equivalentes, entretanto, a partir de 12 horas, a reação onde foram utilizados 3 equivalentes de etanol apresentou rendimentos maiores. Este fato provavelmente está relacionado a condições de excessiva concentração de etanol no meio para a reação enzimática.

TABELA XIV - Rendimentos em linoleto de etila em reações enzimáticas utilizando TL IM e variando a concentração de etanol. Condições reacionais descritas na 4.3.2.1. Condições de análise cromatográficas descritas na 4.3.8.

Condições reacionais	Concentração em % de linoleato de etila obtida variando a concentração de etanol	
	Reação com 3 equivalentes molares de etanol	Reação com 9 equivalentes molares de etanol
0,5 horas	0,98 ± 0,03	8,27 ± 0,84
1 hora	3,62 ± 1,98	10,41 ± 1,34
3 horas	9,27 ± 0,10	14,45 ± 0,46
6 horas	14,88 ± 0,10	22,52 ± 0,11
12 horas	30,40 ± 1,02	26,20 ± 0,95
24 horas	30,32 ± 0,37	27,73 ± 0,05
48 horas	34,30 ± 0,35	34,25 ± 1,70
72 horas	37,34 ± 0,61	35,45 ± 0,05

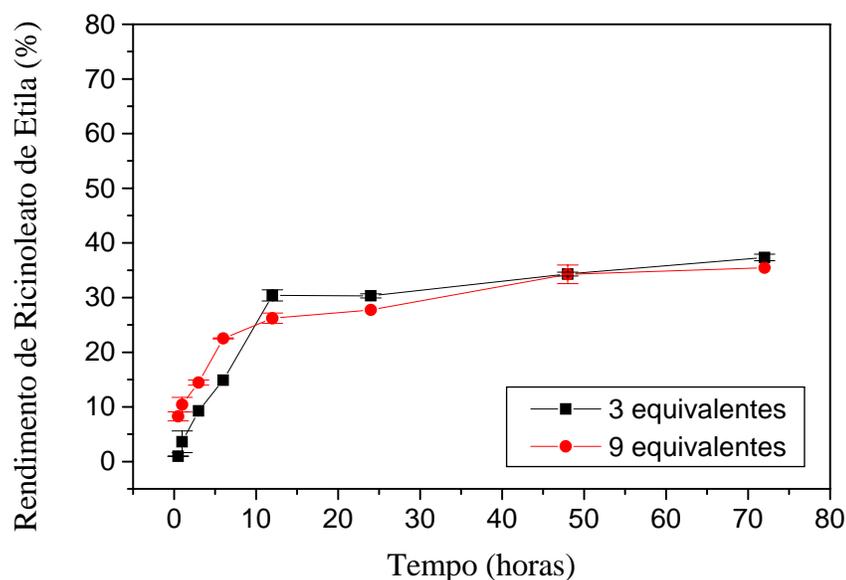


FIGURA 44 - Gráfico de rendimento em linoleto de etila em função do tempo em reações enzimáticas, utilizando TL IM e variando a concentração de etanol. Condições de reação descritas em 4.3.2.1.

Assim, considerando-se o fato de que não houve aumento significativo no rendimento reacional com o aumento de 3 para 9 equivalentes de etanol no meio reacional, bem como o fato de que possivelmente houve intolerância por parte da enzima em meio com excesso de etanol (9 equivalentes molares), concluiu-se que as reações utilizando óleo de soja para estudo de novos parâmetros, devem ser realizadas com 3 equivalentes molares de etanol em relação ao equivalente molar de óleo de soja.

Além disso, a diminuição do volume de álcool utilizado em reações de transesterificação de forma geral, independentemente do tipo de catalisador utilizado, acarreta uma grande redução de custos no processo como um todo. Por isso, a maioria dos processos existentes para a produção de biodiesel buscam a recuperação do álcool em excesso utilizado, de modo a viabilizar a produção.

5.3.5. Efeito da temperatura na reação de transesterificação etílica utilizando óleo de soja e LIPOZYME TL IM como catalisador enzimático

Em virtude aos resultados observados para as reações realizadas com óleo de mamona como material de partida (substrato), para estudos sobre a influencia da temperatura em reações de transesterificação do óleo de soja utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador, foram realizados testes com o meio reacional a 25°C e a 40°C. Nas reações a 40°C utilizou-se o sistema descrito em **4.2.7 (FIGURA 19.B)**

As alíquotas obtidas da reação onde realizada a 40°C, segundo metodologia descrita em **4.3.2.2**, foram analisadas por cromatografia em camada delgada (**FIGURA 45**) e mostraram uma significativa presença de mono e diglicerídeos em relação a reação a 25°C, mesmo após 72 horas de reação. Este resultado indica que o aumento da temperatura do meio reacional de 25°C para 40°C não ocasiona incremento na transformação reacional, como esperado e observado em reações anteriores onde que foi utilizado óleo de mamona como material de partida.

Efeito da Temperatura

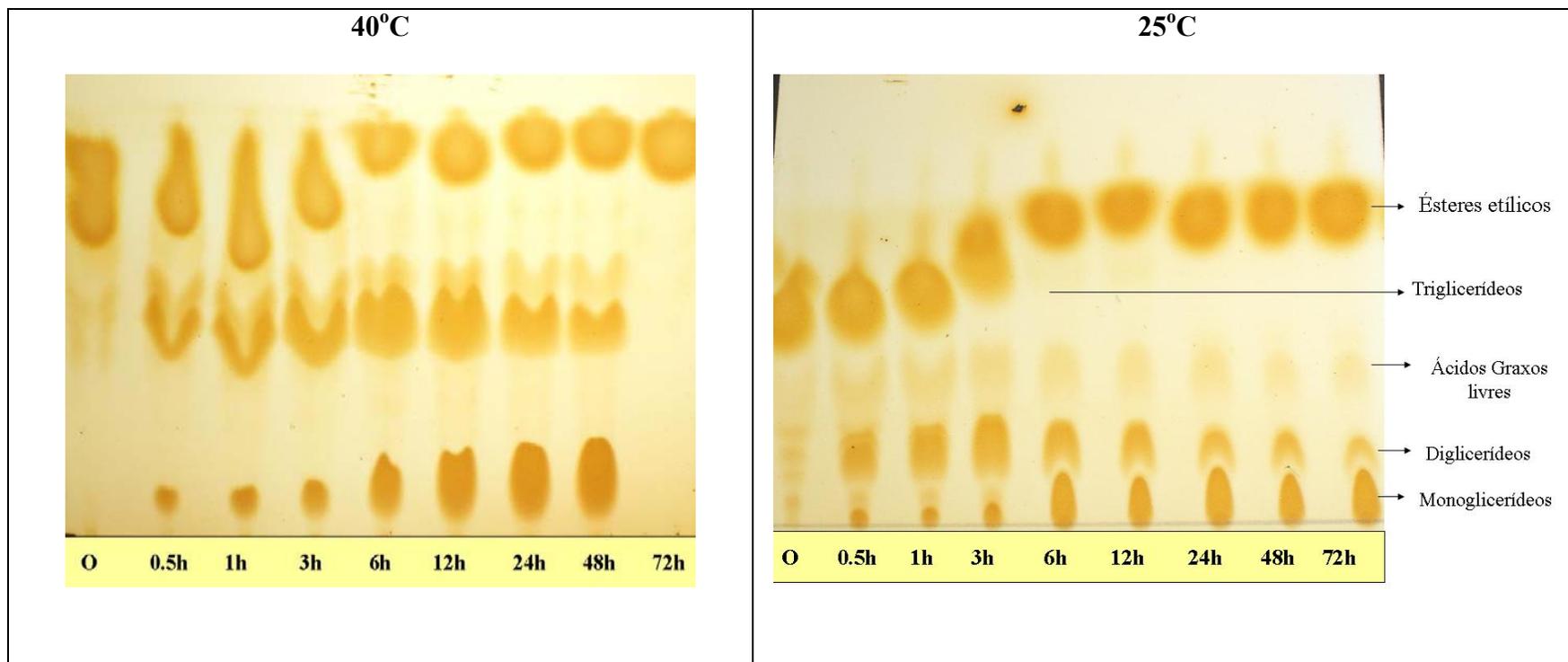


FIGURA 44 - A análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para as reações empregando 25°C e 40°C e óleo de soja em reação de transesterificação enzimática utilizando Lipozyme TL IM como catalizador. Condições de reação descritas em 4.3.2.1.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência mostraram inclusive uma diminuição no rendimento reacional em linoleato de etila quando utilizados 40°C (TABELA XV).

TABELA XV - Rendimentos em linoleato de etila em reações enzimáticas utilizando Lipozyme TL IM e variando a temperatura da reação. Condições reacionais descritas na 4.3.2.2. Condições de análise cromatográficas descritas na 4.3.8.

Concentração em % de linoleato de etila		
variando a temperatura da reação		
Tempo de reação	Reação a 25°C	Reação a 40°C
0,5 horas	0,98 ± 0,03	6,42 ± 0,26
1 hora	3,62 ± 1,98	6,44 ± 0,14
3 horas	9,27 ± 0,10	7,91 ± 0,47
6 horas	14,88 ± 0,10	15,1 ± 0,05
12 horas	30,40 ± 1,02	21,34 ± 2,89
24 horas	30,32 ± 0,37	25,12 ± 0,47
48 horas	34,30 ± 0,35	26,87 ± 1,00
72 horas	37,34 ± 0,61	32,91 ± 2,61

Dentre as possíveis causas imaginadas para este fato relaciona-se a perda de etanol do meio reacional nas condições em foram realizadas as reações. Entretanto, esta hipótese pode ser considerada descartada, uma vez que o sistema utilizado permaneceu fechado durante a reação e à temperatura controlada.

Além disso, acredita-se que esta temperatura não seja suficiente para provocar a perda por evaporação do etanol do meio.

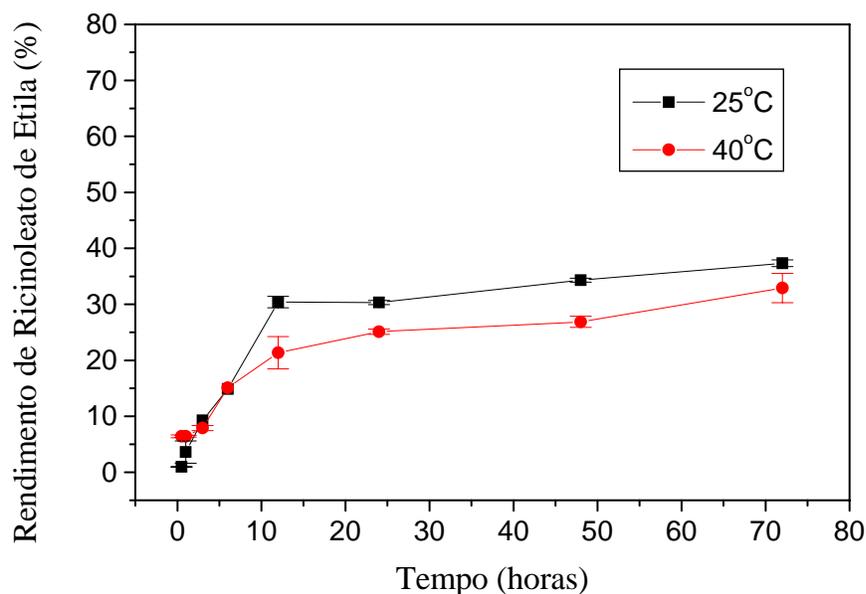


FIGURA 46 - Gráfico de rendimento em linoleato de etila no tempo em reações enzimáticas utilizando Lipozyme TL IM e variando a temperatura. Condições de reação descritas em 4.3.2.2.

Acredita-se que o efeito negativo da temperatura em reações envolvendo a Lipozyme TL IM esteja relacionado à atividade da enzima no sistema em questão. Dessa forma, para as reações onde será analisado o comportamento da reação utilizando óleo de soja e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático, optou-se pela temperatura de 25°C como sendo melhor que 40°C.

5.3.6. Efeito da concentração da enzima na reação de transesterificação etílica utilizando óleo de soja e LIPOZYME TL IM como catalisador enzimático

Nesta etapa, foram realizadas reações de transesterificação etílica do óleo de soja, variando a concentração de enzima presente no meio reacional. Estas reações foram realizadas a temperatura ambiente, utilizando 3 equivalentes molares de etanol adicionados em nove etapas, de acordo com o estabelecido em **5.3.4**. As concentrações de enzima avaliadas e comparadas foram de 4% e 10% em massa de enzima granulada e imobilizada em relação à massa de óleo de soja.

A **FIGURA 47** mostra a análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas nas reações onde foram utilizados 4 e 10% de enzima imobilizada em massa. Foi possível perceber que com meia hora de reação a quantidade dos intermediários mono e diglicerídeos formados para a reação em que foram utilizados 10% de enzima era superior ao observado para a reação onde foram utilizados apenas 4% de enzima em massa. Isso significa um maior avanço desta reação em relação à outra, desde as primeiras horas de reação.

Este resultado está de acordo com o esperado onde o aumento da concentração da enzima no meio ocasiona aumento no rendimento dos produtos de transesterificação enzimática, da mesma forma que foi observado para reações que utilizaram como substrato o óleo de mamona.

Efeito da concentração da enzima

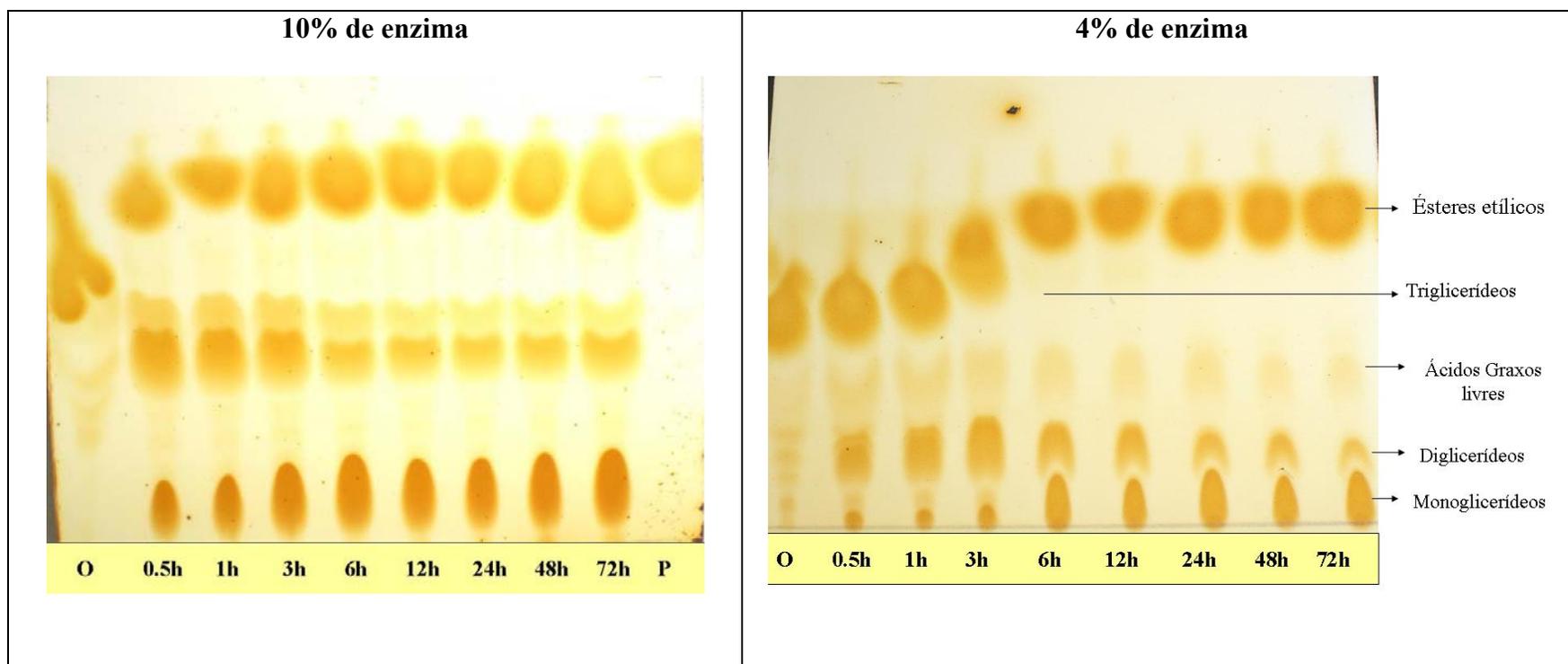


FIGURA 46 - A análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para as reações empregando 4% e 10% de enzima imobilizada e óleo de soja em reação de transesterificação enzimática utilizando Lipozyme TL IM como catalizador. Condições de reação descritas em 4.3.2.1.

Há de se considerar, no entanto, que a avaliação dos parâmetros reacionais para a transesterificação óleo de soja foram monitorados nas reações, através da formação, ou rendimento em linoleato de etila, obtido a partir do ácido linoléico presente no óleo de soja em menor proporção do que o ácido ricinoleico está presente no óleo de mamona. Como há uma maior distribuição na composição do óleo de soja em termos do tipo de ácidos graxos que compõem os triglicerídeos (**TABELA XVI**) e não é conhecido se a enzima apresenta maior afinidade por um ou outro tipo de ácido graxo presente no triglicerídeo, acredita-se que a quebra dos mesmos para a transformação em ésteres a princípio é randômica.

Por isso, observa-se um menor rendimento em linoleato de etila do que em ricinoleato de etila, como pode ser observado nas reações anteriores para estudo do comportamento da transesterificação do óleo de mamona e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático.

Na **TABELA XVI** estão resumidos os rendimentos em linoleato de etila obtidos através de análise por cromatografia líquida de alta eficiência. A análise das alíquotas permite-nos afirmar que a reação ocorre de forma mais rápida e com maior rendimento quando utilizada uma maior proporção de catalisador.

TABELA XVI - Rendimentos em linoleto de etila em reações enzimáticas do óleo de soja, utilizando Lipozyme TL IM e variando a concentração da enzima imobilizada. Condições reacionais descritas na 4.3.2.3. Condições de análise cromatográficas descritas na 4.3.8.

Condições reacionais	Concentração em % de linoleato de etila obtida variando a concentração da enzima	
	Reação com 4% de enzima imobilizada	Reação com 10% de enzima imobilizada
Tempo de reação		
0,5 horas	0,98 ± 0,03	11,95 ± 2,22
1 hora	3,62 ± 1,98	16,44 ± 0,88
3 horas	9,27 ± 0,10	20,21 ± 2,78
6 horas	14,88 ± 0,10	30,65 ± 1,51
12 horas	30,40 ± 1,02	32,93 ± 0,55
24 horas	30,32 ± 0,37	33,60 ± 0,57
48 horas	34,30 ± 0,35	36,53 ± 0,50
72 horas	37,34 ± 0,61	42,00 ± 0,10

Estes resultados concordam com o fato de que estando as duas reações sob mesmas condições, aquela onde existe uma maior proporção de catalisador ocorre mais rapidamente e com maior formação dos produtos do que aquela com menos catalisador.

A **FIGURA 48** permite-nos ainda, ilustrar o fato de que as reações com este catalisador em específico ocorrem com maior velocidade no início, ou seja, até 12 horas. Passado este intervalo a reação demora a atingir o equilíbrio.

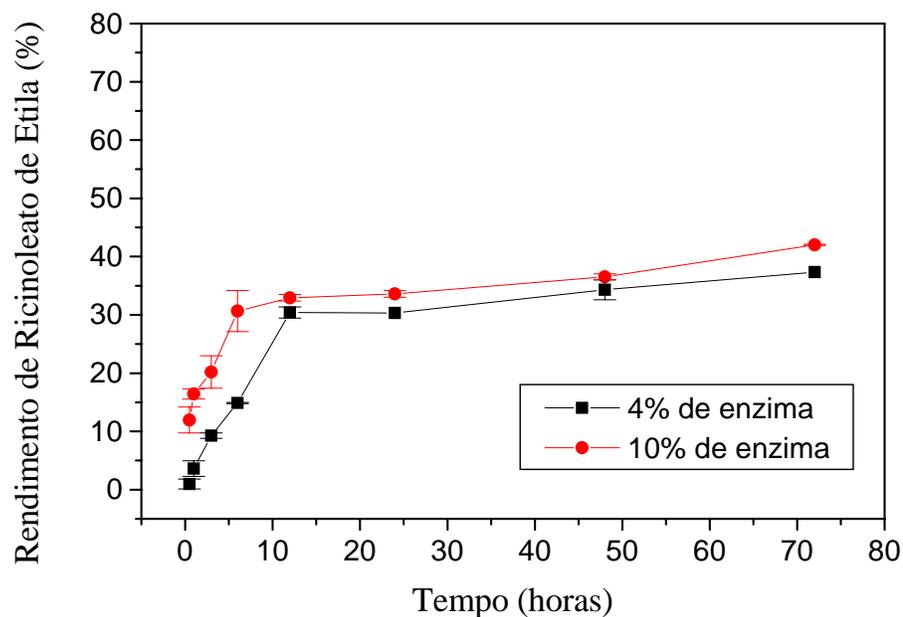


FIGURA 48 - Gráfico de rendimento em linoleato de etila em função do tempo em reações enzimáticas do óleo de soja, utilizando Lipozyme TL IM e variando a concentração de enzima imobilizada na reação. Condições de reação descritas em 4.3.2.3.

Apesar disto, na reação onde se utilizou maior proporção de catalisador o rendimento é sempre superior. Dessa forma, preferiu-se optar pela condição em que uma maior quantidade de catalisador é utilizada, como sendo a mais adequada na conversão dos triglicerídeos do óleo de soja aos ésteres etílicos correspondentes.

5.3.7. Efeito da maceração da enzima imobilizada em reação de transesterificação etílica utilizando óleo de soja e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

A trituração (maceração) da enzima foi novamente realizada para verificar seu efeito frente às reações em que onde foi empregado o óleo de soja como matéria-prima. A importância de se realizar reações com a enzima na forma triturada (macerada) reside no fato de que a enzima tem a superfície de contato expandida (maximizada) e conseqüentemente, espera-se como resposta um aumento na velocidade e na eficiência da reação (HURTADO, 2006).

O procedimento utilizado tratou-se do mesmo anteriormente descrito para as reações empregando o óleo de mamona e está descrito em **4.3.2.5**.

A análise por cromatografia em camada delgada para as alíquotas obtidas nas reações com a enzima imobilizada, triturada e sem triturar, pode ser observada na **FIGURA 49**, onde pode-se verificar que em meia hora de reação, a quantidade de intermediários monoglicérides formados é significativa. Tão ou mais significativa do que quando foram utilizados 10% de enzima imobilizada e sem macerar em reação descrita na sessão anterior em comparação com esta, onde foram utilizados 4% de enzima imobilizada na forma triturada (macerada).

A alíquota referente a 72 horas de reação na **FIGURA 49**, apresenta uma fração muito pequena de diglicérides em relação à fração dos monoglicérides.

Porém, no caso da reação onde a enzima não foi macerada, as frações mono e diglicérides parecem apresentar uma relação quantitativa não muito diferente.

Este fato pode ser verificado pela semelhança nos rendimentos reacionais a 72 horas de reação segundo a análise das alíquotas por cromatografia líquida de alta eficiência (TABELA XVII).

TABELA XVII - Rendimentos em linoleto de etila em reações enzimáticas do óleo de soja utilizando Lipozyme TL IM e variando a granulometria da enzima imobilizada. Condições reacionais descritas na 4.3.2.5. Condições de análise cromatográficas descritas na 4.3.8.

Condições reacionais	Concentração em % de linoleato de etila obtida variando a granulometria da enzima imobilizada	
	Reação com enzima imobilizada e sem macerar	Reação com enzima imobilizada e macerada
0,5 horas	0,98 ± 0,03	16,26 ± 0,56
1 hora	3,62 ± 1,98	16,67 ± 0,67
3 horas	9,27 ± 0,10	16,66 ± 0,03
6 horas	14,88 ± 0,10	20,06 ± 1,17
12 horas	30,40 ± 1,02	25,27 ± 0,78
24 horas	30,32 ± 0,37	27,82 ± 0,12
48 horas	34,30 ± 0,35	32,39 ± 1,96
72 horas	37,34 ± 0,61	34,54 ± 0,15

Estas análises indicam que há pouca diferença no rendimento a partir de 6 horas de reação. A diferença na velocidade entre as reações encontra-se no início da reação, uma vez que a enzima na forma macerada teve sua superfície expandida e, portanto reage mais rapidamente ao ser colocada em contato com o substrato, no caso, o óleo de soja.

Efeito da Granulometria

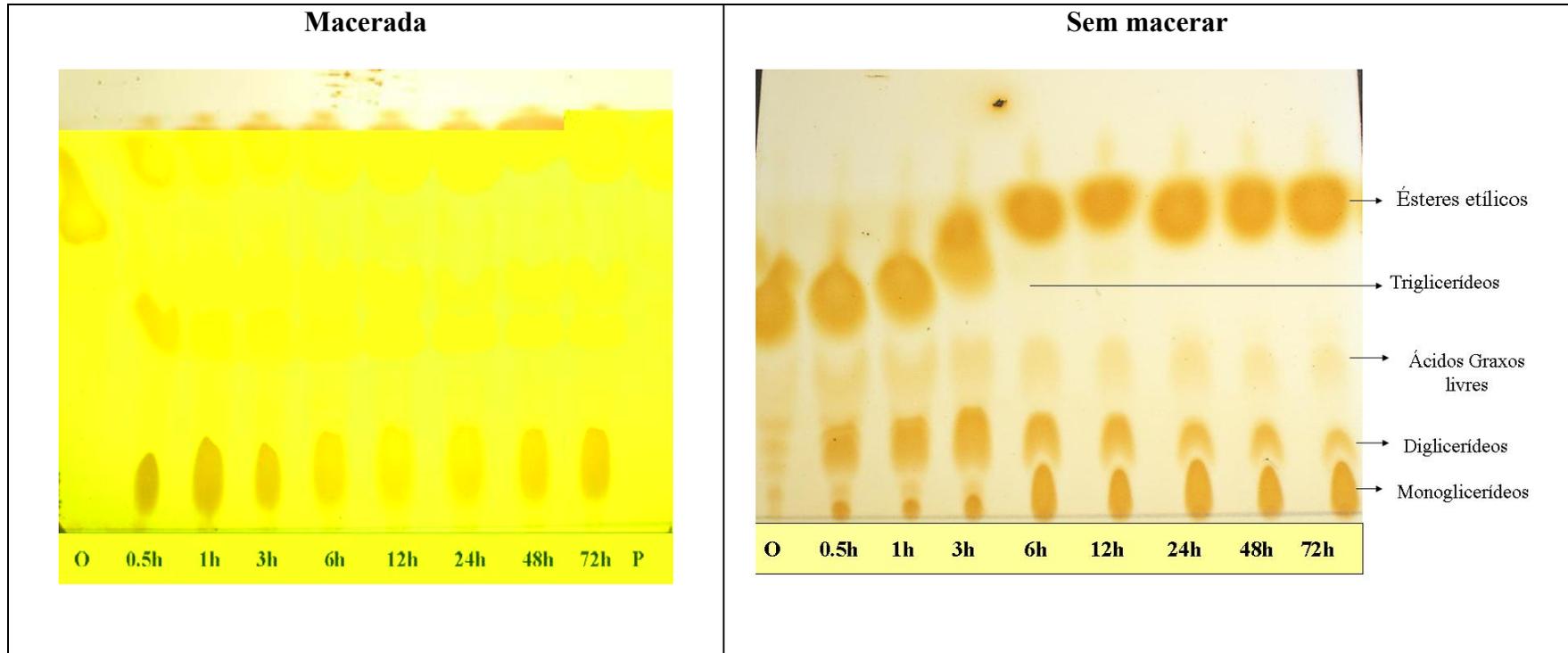


FIGURA 48 - A análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para as reações empregando granulometria da enzima imobilizada e óleo de soja em reação de transesterificação enzimática utilizando Lipozyme TL IM como catalizador. Condições de reação descritas em 4.3.2.1.

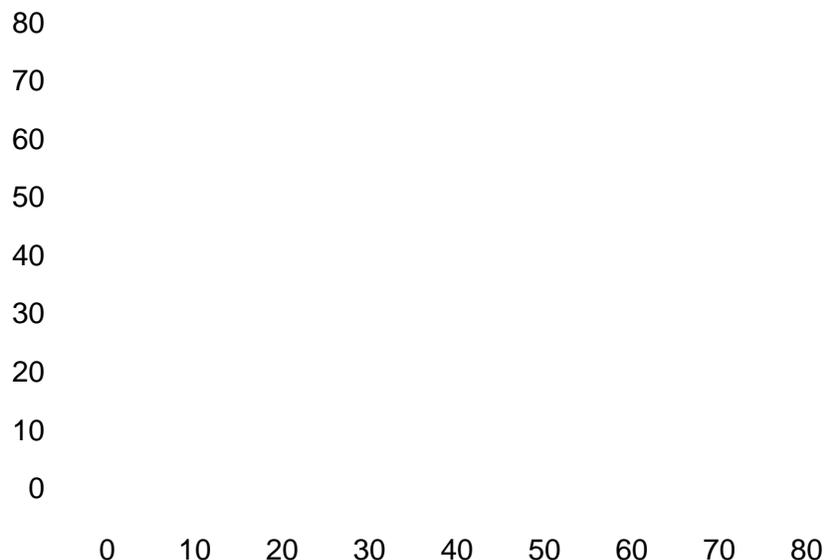


FIGURA 50 - Gráfico de rendimento em linoleato de etila no tempo em reações enzimáticas do óleo de soja, utilizando Lipozyme TL IM e variando a granulometria da enzima imobilizada na reação. Condições de reação descritas em 4.3.2.5.

Entretanto, como a lipase utilizada tem como característica a demora em atingir o equilíbrio final da reação, ambas as reações, tanto a que foi realizada com a enzima na forma triturada, quanto aquela na qual foi utilizada a enzima na forma original, alcançam um ponto onde, o rendimento da reação quantificada através do linoleato de etila formado, é praticamente igual. Entretanto, na reação onde a enzima não foi macerada, o rendimento no final da reação é ligeiramente superior, podendo ser explicado pelo fato de que na reação em que enzima foi macerada, esta foi submetida a condições mais drásticas, em termos de exposição ao meio reacional, que pode ocasionar uma perda de atividade e capacidade de conversão do substrato com o tempo de exposição.

5.3.8. Efeito do pré-tratamento da enzima em reação de transesterificação etílica utilizando óleo de soja e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

Novamente, o procedimento de pré-incubação da enzima imobilizada foi aplicado com base em estudos apresentados na literatura e aplicados anteriormente em nosso grupo de pesquisa (Hurtado, 2005). Este pré-tratamento baseou-se na idéia de que, sendo a Lipozyme TL IM suportada em sílica e sabendo que o processo de imobilização aplicado pelo fabricante resulta em uma quantidade considerável de ar e água nos poros do suporte, inerentes ao processo da imobilização, acreditou-se que um pré-tratamento com utilização de compostos com características similares as da matéria –prima a ser utilizada na reação, trataria-se de um método eficiente para a remoção da água nos interstícios do suporte, bem como para a ativação da enzima suportada.

Portanto, utilizou-se metodologia descrita em **4.3.2.4** em reação para análise do efeito da pré-incubação da enzima imobilizada em reações de alcóolise do óleo de soja.

Após reações com a enzima na forma pré-incubada foram realizadas análises por cromatografia em camada delgada para acompanhamento do progresso da reação **(FIGURA 51)**. Foi possível verificar que, ao realizar-se o pré-tratamento da enzima, a velocidade inicial da reação tornou-se maior, fato ilustrado pela maior quantidade de intermediários monoglicérides presentes nas alíquotas depositadas na placa cromatográfica para esta reação, em relação à reação onde nenhum tipo de pré-tratamento foi realizado. Apesar deste progresso inicial, não foi observado um contínuo avanço significativo da reação no sentido de conversão total daqueles intermediários e formação dos ésteres etílicos, mesmo após 72 horas de reação.

Efeito do Pré-tratamento da enzima imobilizada

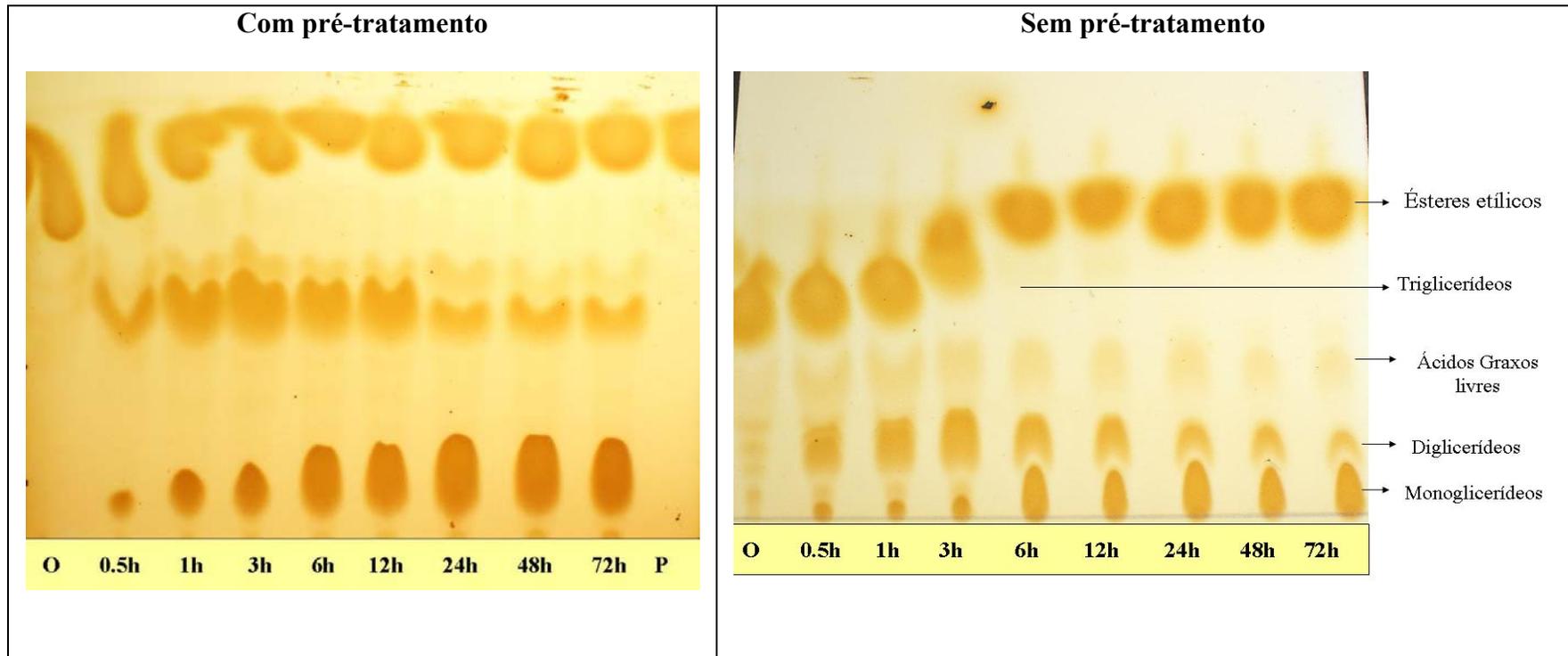


FIGURA 50 - A análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para as reações variando o pré-tratamento da enzima imobilizada e óleo de soja em reação de transesterificação enzimática utilizando Lipozyme TL IM como catalizador. Condições de reação descritas em 4.3.2.1.

A quantificação do linoleato de etila por análise CLAE, confirmou o fato de a reação com pré-tratamento da enzima ocorrer de forma a obter-se um maior rendimento no início da reação (**TABELA XVIII**). Entretanto, pode-se verificar que não há ganho em rendimento em tempos mais avançados da reação entre 12 a 72 horas, período total até o qual a reação foi acompanhada.

TABELA XVIII - Rendimentos em linoleto de etila em reações enzimáticas com óleo de soja utilizando Lipozyme TL IM e variando o pré-tratamento da enzima imobilizada. Condições reacionais descritas na 4.3.2.4. Condições de análise cromatográficas descritas na 4.3.8.

Condições reacionais	Concentração em % de linoleato de etila obtida variando o pré-tratamento da enzima imobilizada	
	Reação com enzima imobilizada e sem pré-tratamento	Reação com enzima imobilizada e pré-tratada
0,5 horas	0,98 ± 0,03	6,42 ± 0,05
1 hora	3,62 ± 1,98	9,30 ± 0,05
3 horas	9,27 ± 0,10	11,28 ± 0,05
6 horas	14,88 ± 0,10	22,48 ± 0,05
12 horas	30,40 ± 1,02	29,68 ± 0,16
24 horas	30,32 ± 0,37	30,19 ± 0,05
48 horas	34,30 ± 0,35	29,64 ± 1,75
72 horas	37,34 ± 0,61	32,42 ± 0,59

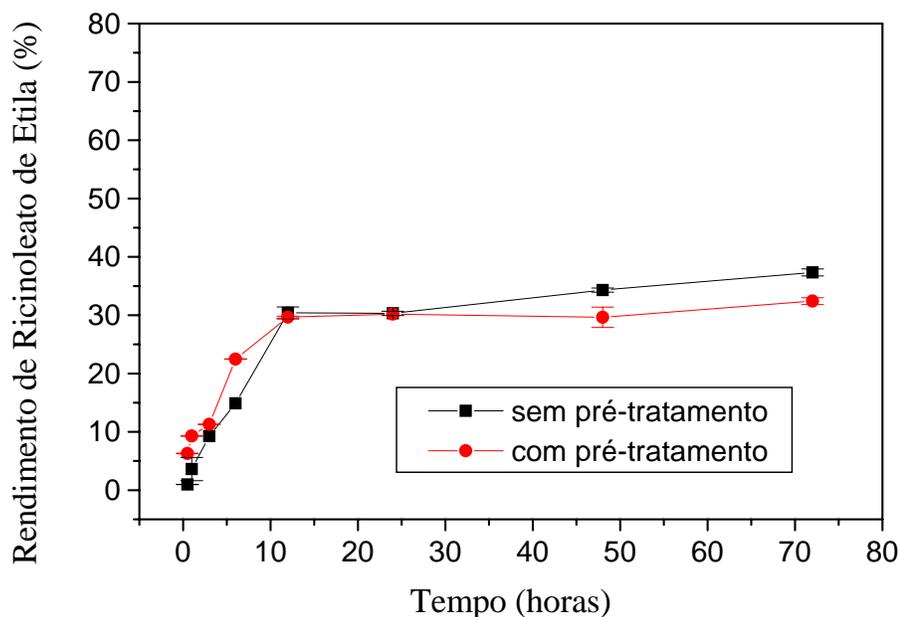


FIGURA 52 - Gráfico de rendimento em linoleato de etila em função do tempo em reações enzimáticas com óleo de soja utilizando Lipozyme TL IM e variando o pré-tratamento da enzima imobilizada na reação. Condições de reação descritas em 4.3.2.4.

A **FIGURA 52** permite visualizar melhor os resultados obtidos. Considerou-se explicável o fato de a enzima imobilizada apresentar uma maior velocidade no início da reação, fato que acarreta ganho de velocidade em relação a enzima onde o substrato necessitará de tempo extra para penetrar nos poros da enzima imobilizada não pré-incubada. Entretanto, após 12 horas, esta diferença de velocidade é compensada e praticamente não há diferença nos rendimentos das duas reações.

A **TABELA XVIII** mostra que na reação onde foi realizado o pré-tratamento, o equilíbrio da reação é alcançado mais rapidamente e ao final de 72 horas o rendimento é menor para esta reação do que para a outra onde o mesmo tratamento não foi aplicado.

Esta diferença de rendimento pode estar sendo ocasionada pela diferença nas condições micro-aquosas em que se encontram os dois sistemas. Uma vez que a enzima pré-tratada teve água removida do suporte no pré-tratamento, as condições em termos de quantidade de água no meio tornaram-se restritas, podendo ser sensíveis à enzima após algum tempo de reação.

5.3.9. Reação enzimática utilizando óleo de soja e Lipozyme TL IM em condições reacionais otimizadas

A partir dos resultados obtidos para o estudo dos parâmetros de influencia sobre as reações de transesterificação utilizando óleo de soja como matéria-prima e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático, novas reações foram realizadas pela utilização destes parâmetros de forma conjugada.

Dessa forma, julgou-se mais conveniente realizar reações com o óleo de soja e o catalisador enzimático em questão, em meio com 3 equivalentes de etanol adicionados em etapas de um equivalente a cada adição, bem como 10% em massa de enzima imobilizada em relação a massa de óleo, na forma macerada (triturada), sem pré-incubar e a 25°C.

Os resultados obtidos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em camada delgada (CCD).

A **FIGURA 53** permite a observação dos resultados obtidos pela análise cromatográfica em camada delgada.

Condições otimizadas

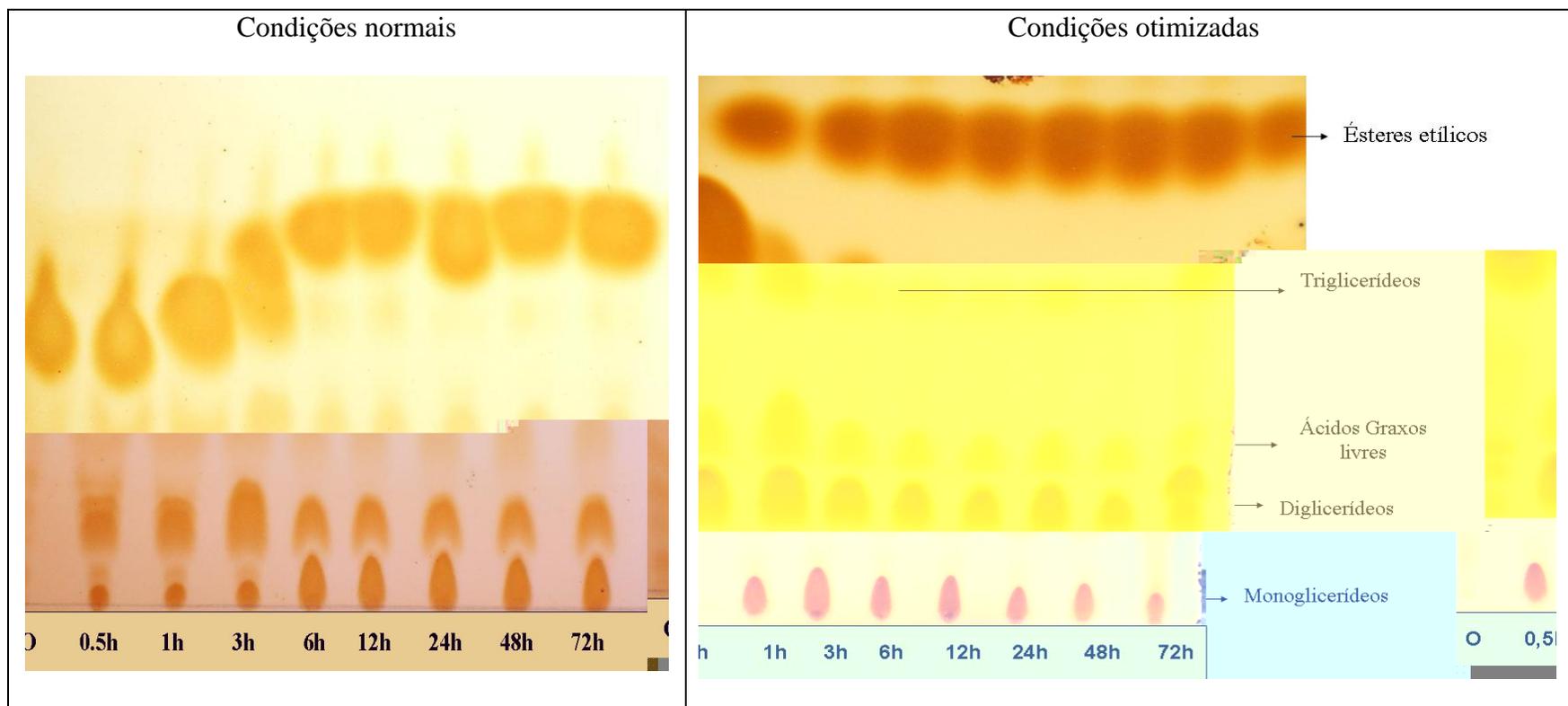


FIGURA 53 - Análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para a reação de transesterificação etílica em condições otimizadas utilizando óleo de soja e Lipozyme TL IM como catalisador enzimático. Condições de reação descritas em 5.3.9.

A análise por CCD permite dizer que, na reação onde foram empregadas as condições otimizadas, com apenas 3 horas de reação já não é possível detectar a presença de triglicerídeos, uma vez que os mesmos foram totalmente convertidos em diglicerídeos e monoglicerídeos.

Além disso, com três horas de reação, observa-se um incremento na fração monoglicerídeo a partir dos diglicerídeos. Posteriormente, observa-se que, nas alíquotas referentes ao intervalo entre 3 e 72 horas os diglicerídeos vão sendo convertidos a monoglicerídeos que por sua vez são convertidos a ésteres em velocidade contínua.

Entretanto, mesmo na fração referente a 72 horas verifica-se a presença de mono e diglicerídeos não convertidos, porém em pequena quantidade.

A análise por cromatografia líquida das mesmas alíquotas analisadas por CCD, mostrou-nos um melhor rendimento reacional em relação aqueles anteriormente obtidos. A utilização desta metodologia, onde os parâmetros ótimos de reação foram utilizados de forma conjunta permitiu-nos um avanço significativo em que foi possível observar $23,25 \pm 0,05$ % de linoleato de etila na primeira hora de reação e ainda $44,18 \pm 0,05\%$ em 72 horas de reação, não obtidos anteriormente em nenhuma das reações onde os parâmetros de reação foram avaliados separadamente.

Entretanto, levando-se em consideração a correção deste rendimento pelo porcentual em ésteres etílicos do ácido linoléico no biodiesel de soja puro, segundo metodologia descrita em 4.3.4, o porcentual de transformação é de 91,72%, que apesar de tratar-se de um bom resultado, não supera os resultados obtidos quando utilizada a Novozym 435 em etapa única onde foram obtidos 96,22- 98,38%, em estudos anteriormente realizados em nosso grupo de pesquisa.

TABELA XIX - Rendimentos em linoleto de etila em reações enzimáticas com soja utilizando Lipozyme TL IM e variando o pré-tratamento da enzima imobilizada. Condições reacionais descritas na 4.3.2.7. Condições de análise cromatográficas descritas na 4.3.8.

Tempo de reação (h)	Concentração em % de linoleato de etila
0,5	23,25 ± 0,05
1	25,6 ± 0,05
3	32,26 ± 0,32
6	33,76 ± 1,46
12	35,84 ± 1,00
24	37,81 ± 1,63
48	40,15 ± 0,05
72	44,18 ± 0,05

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência, permitiu-nos ainda, a observação do progresso geral da reação por interpretação dos cromatogramas obtidos para as referidas alíquotas em que foram realizadas as quantificações do linoleato de etila.

Os cromatogramas **(1)**, **(2)**, **(3)**, **(4)**, **(5)**, **(6)**, **(7)** e **(8)** na **FIGURA 54**, são referentes as alíquotas com 0,5; 1; 3; 6; 12; 24; 48 e 72 horas de reação, respectivamente.

Pode-se verificar que em **(1)**, **(2)** e **(3)**, praticamente não existem mais triglicerídeos, na região acerca de $t_r=19,5$ min. Acredita-se que este fato deve-se principalmente a contribuição utilização da enzima na forma macerada, que atua ocasionando uma alta velocidade de conversão no início da reação.

Apesar disto, é possível observar a conversão dos triglicerídeos residuais ($t_r= 19,5$ min) para diglicerídeos ($t_r= 8,1$ min) no intervalo de reação entre os cromatogramas **(2)** e **(3)**.

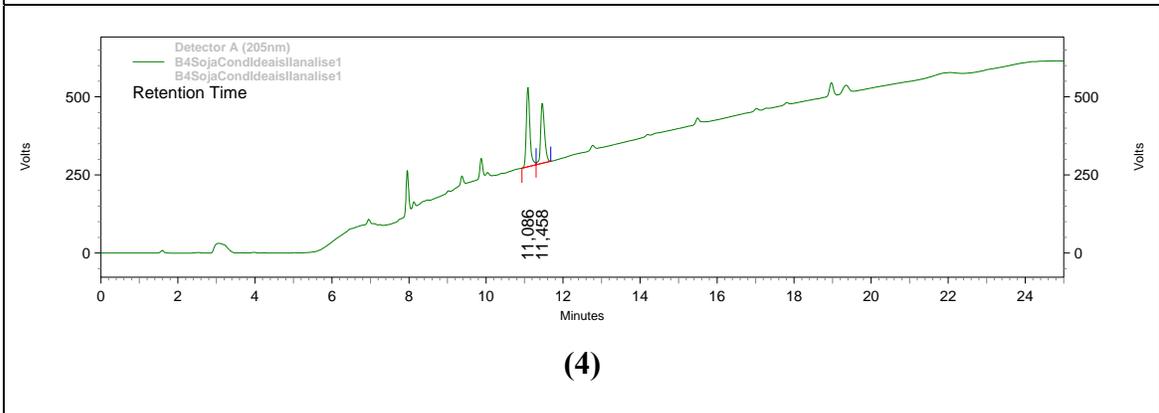
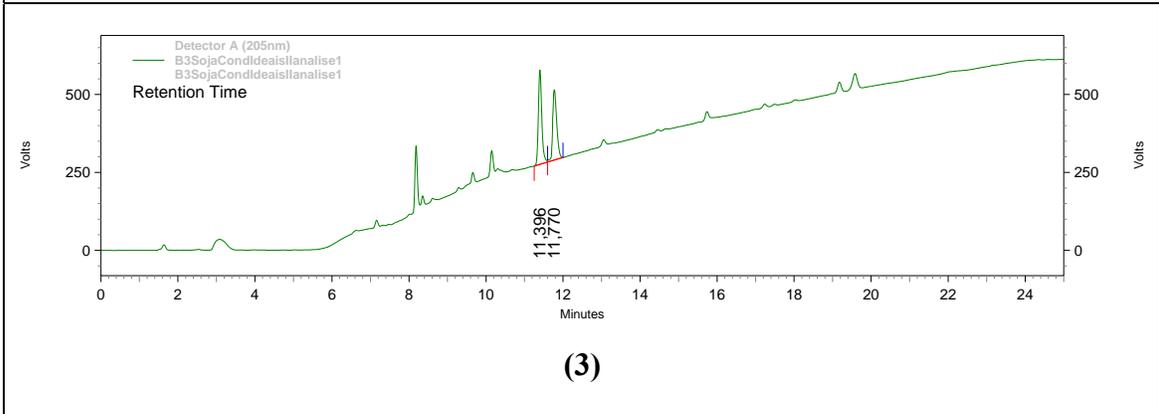
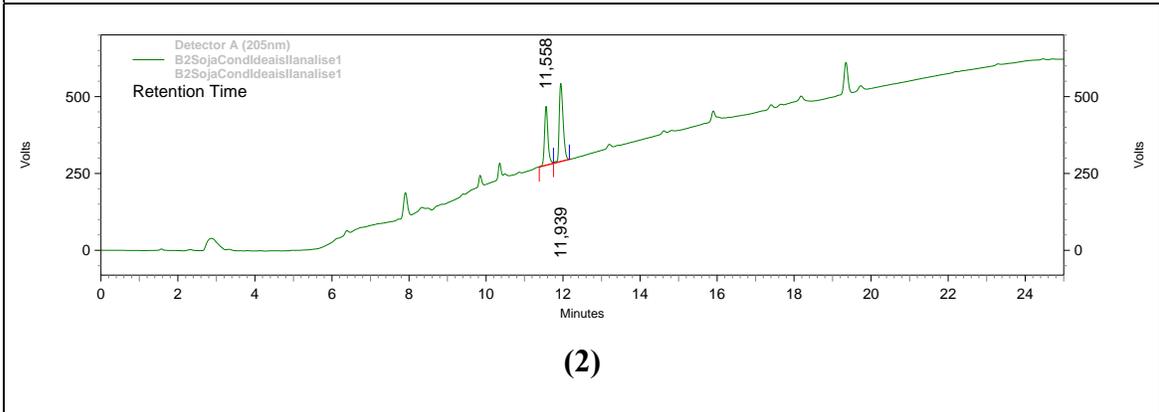
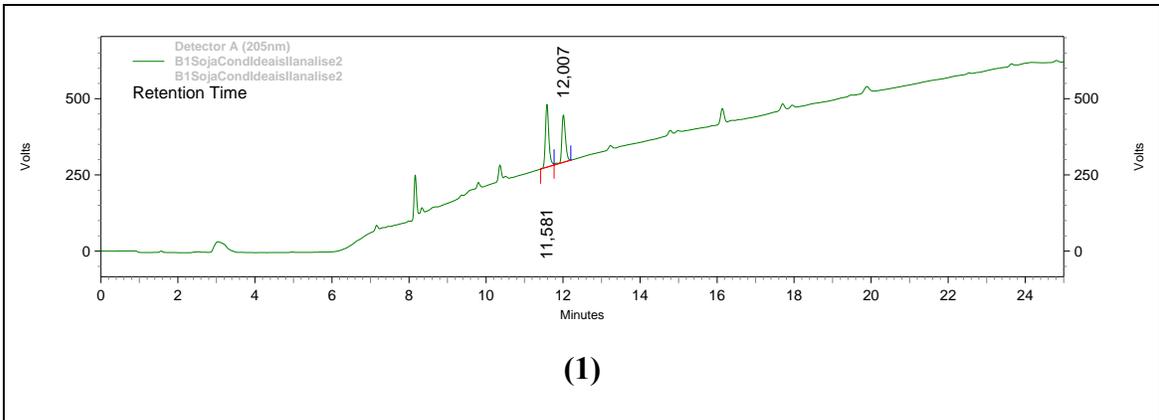
A partir desta etapa os diglicerídeos formados ($t_r= 8,1$ min) são convertidos a monoglicerídeos ($t_r= 9- 11$ min), fato que pode ser observado nos cromatogramas **(3)** a **(7)**.

Concomitantemente a formação de diglicerídeos e monoglicerídeos a partir dos triglicerídeos, ocorre a formação dos ésteres. Estes resultados estão de acordo com o observado na análise por cromatografia em camada delgada.

Assim, no cromatograma **(8)**, referente a 72 horas de reação, observa-se apenas a presença de linoleato de etila ($t_r= 11,086$ min), do padrão interno de tricaprilina ($t_r= 11,574$ min) e dos intermediários mono ($t_r= 9 - 11$ min) e diglicerídeos ($t_r= 8,1$ min) em estágio residual.

Assim, esta metodologia de conversão enzimática utilizando Lipozyme TL IM foi considerada eficiente para a conversão dos triglicerídeos do óleo de soja nos ésteres etílicos correspondentes.

Entretanto, vale a pena lembrar que apesar da boa conversão observada, os intermediários residuais observados ao final da reação são ocasionados pelo fato de a enzima em questão ser do tipo 1,3- específica.



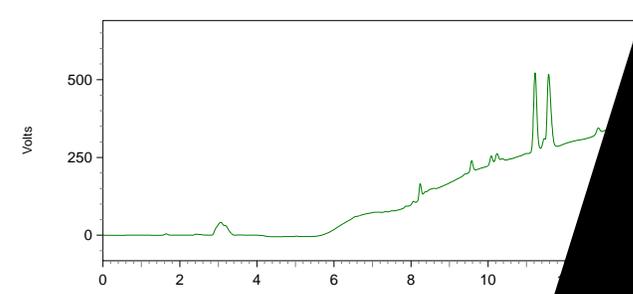
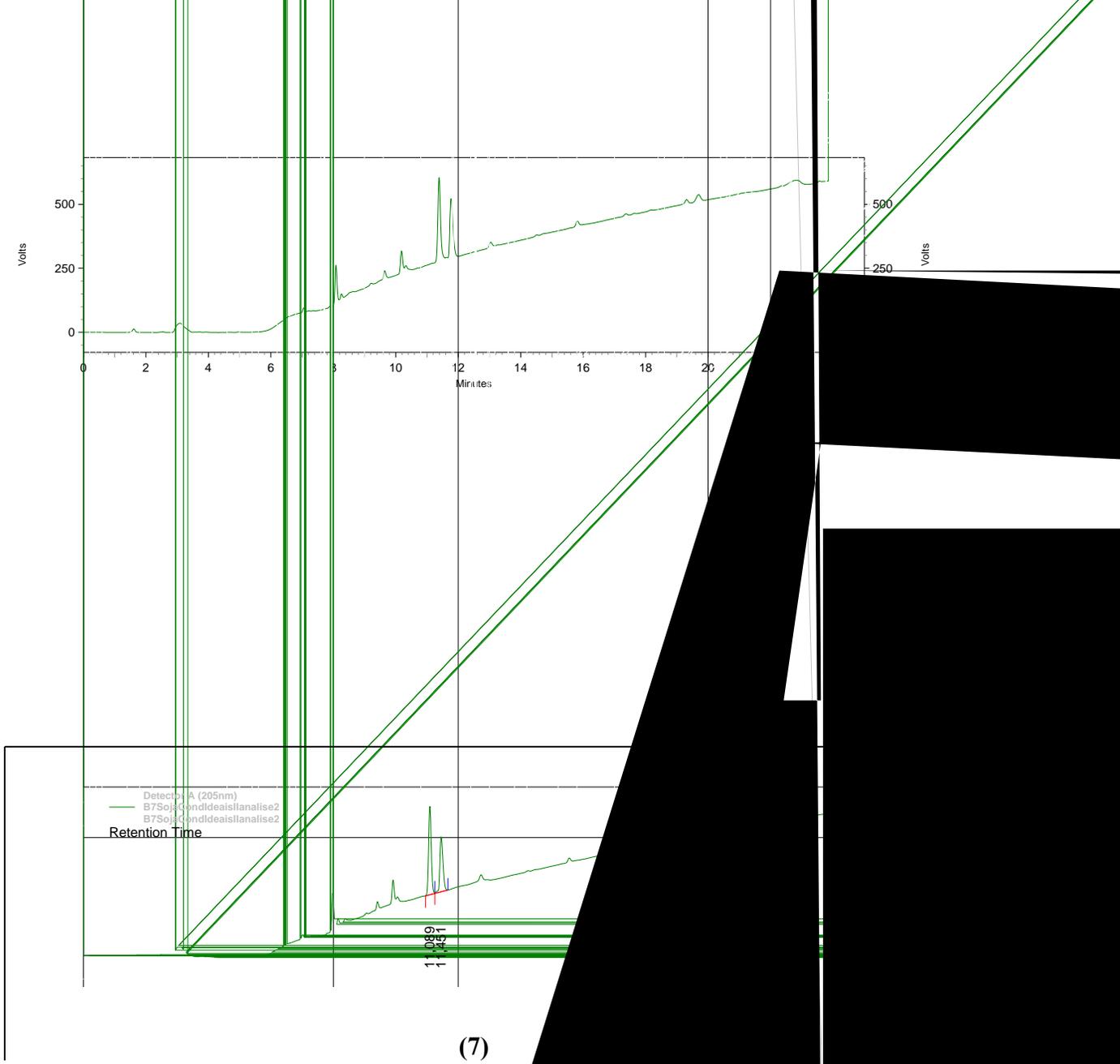


FIGURA 54 – Cromatogramas obtidos por análise em fase reversa de amostras de óleo de soja utilizando óleo de soja e Lipozyme TL IM com o detector a 205 nm. **5.3.9.**

5.3.10. Reação enzimática em duas etapas utilizando óleo de soja, Lipozyme TL IM e Novozym 435 como catalisador enzimático

Novamente, devido ao fato de ter sido observada a presença de diglicerídeos e monoglicerídeos residuais em reação com óleo de soja e Lipozyme TL IM em condições otimizadas, optou-se por utilizar a Novozym 435 na conversão em um segundo estágio reacional objetivando-se obter uma conversão completa, uma vez que esta trata-se de uma lipase inespecífica.

Dessa forma, tomou-se o meio reacional obtido após transesterificação em condições otimizadas com a Lipozyme TL IM, filtrou-se o meio reacional para remoção da enzima, lavou-se e secou-se o biodiesel bruto segundo metodologia descrita em **4.3.10.1**.

Posteriormente o meio foi submetido a nova reação, utilizando a nova enzima Novozym 435, sendo que os resultados obtidos na análise por cromatografia em camada delgada, realizada para as alíquotas coletadas na reação, estão ilustrados na **FIGURA 55**.

Nesta figura, a amostra **0h** na placa onde foram depositas as alíquotas coletadas da reação com a enzima Novozym 435, refere-se a amostra coletada após 72 horas de reação utilizando a enzima imobilizada Lipozyme TL IM e que foi resubmetida a reação com a Novozym 435.

Apesar da presença de ácidos graxos livres, estes não interferem no processo de conversão pela Novozym 435, uma vez que esta enzima também é capaz de realizar a esterificação destes ácidos graxos resultando em última instancia nos produtos de interesse que são os ésteres etílicos.

Reação em duas etapas

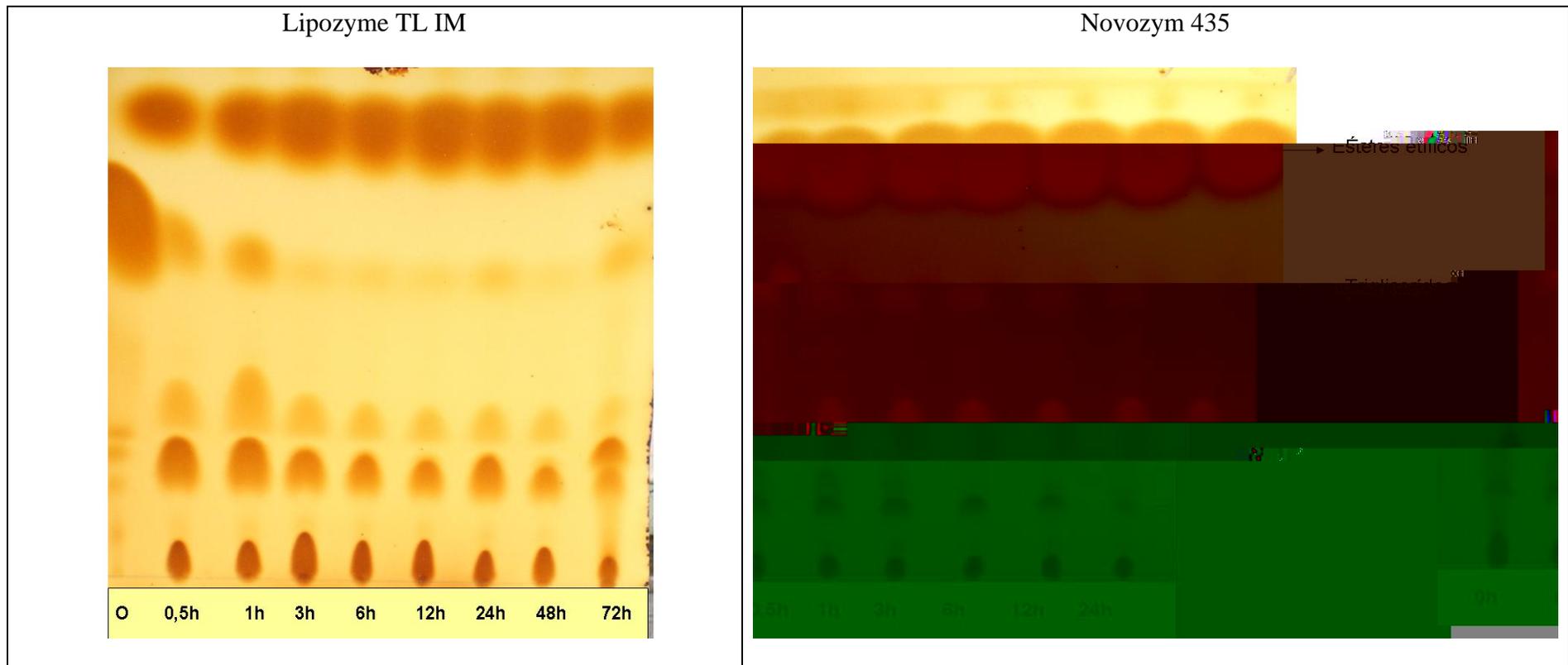


FIGURA 55 - Análise por cromatografia em camada delgada das alíquotas obtidas para a reação de transesterificação etílica em duas etapas, utilizando óleo de mamona, Lipozyme TL IM e Novozym 435 como catalisadores enzimáticos. Condições de reação descritas em **5.3.10**.

Dessa forma, verificou-se que após 3 horas de reação os ácidos graxos livres já haviam sido convertidos, enquanto que ainda restaram mono e diglicerídeos residuais. Entretanto, com 24 horas de reação verificou-se que a fração referente aos diglicerídeos era quase inexistente e a fração referente aos monoglicerídeos tornou-se muito reduzida.

Na **FIGURA 56** estão os cromatogramas **(1)** obtido para a fração referente a 72 horas de reação utilizando a enzima imobilizada Lipozyme TL IM e o cromatograma **(2)** obtido após reação de 24 horas da fração anterior utilizando a enzima imobilizada Novozym 435.

Percebe-se um incremento relativo entre os picos referentes ao padrão interno de tricaprilina ($t_r= 13,828$ min) e o do linoleato de etila ($t_r= 13,265$ min). Também pode-se observar a diminuição do pico referente aos ácidos graxos livres em ($t_r= 2,5$ min).

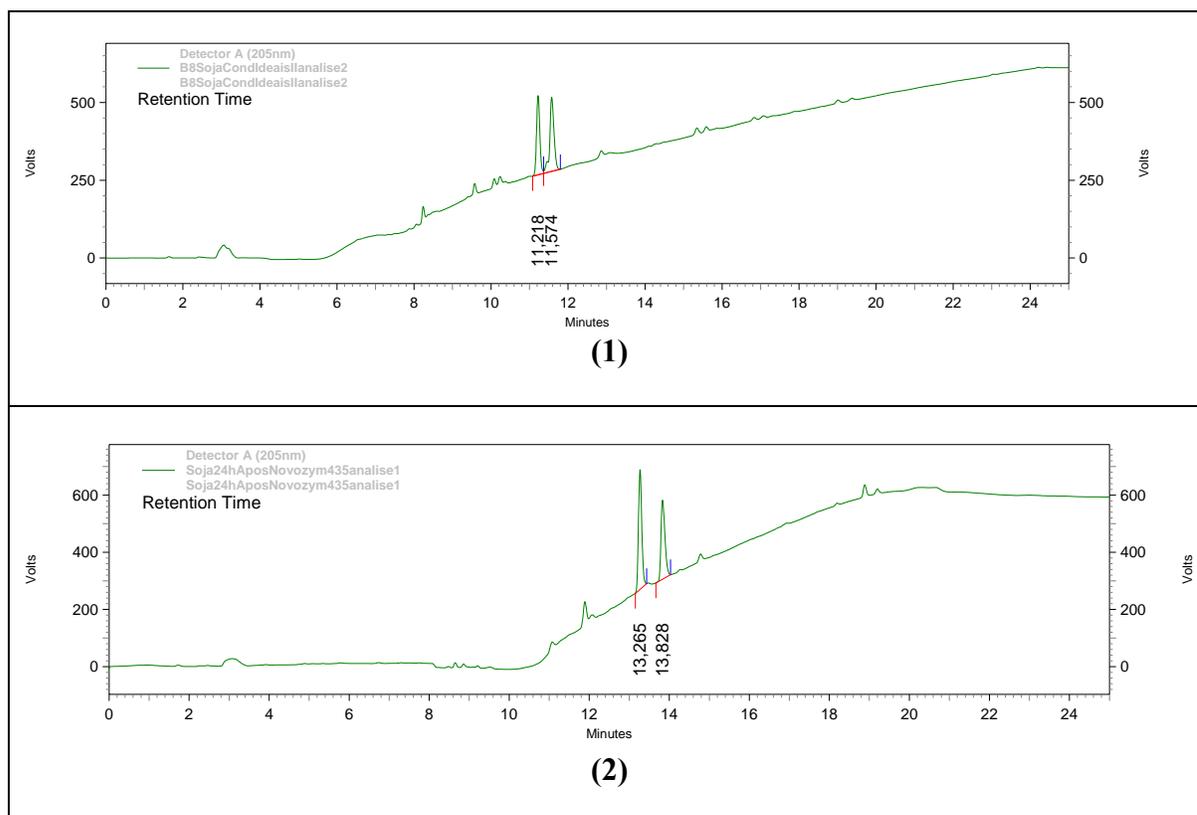


FIGURA 56 - Cromatogramas obtidos por análise em CLAE das alíquotas coletadas em reação de transesterificação etílica em duas etapas, utilizando óleo de soja, Lipozyme TL IM e Novozym 435 como catalisadores enzimáticos. Condições de reação descritas em 5.3.10.

A aplicação desta metodologia permitiu uma transformação em linoleato de etila de $45,18 \pm 0,05\%$.

Novamente, levando-se em consideração a correção deste rendimento pelo percentual em ésteres etílicos do ácido linoléico no biodiesel de soja puro, segundo metodologia descrita em **4.3.4**, o percentual de transformação é de 93,80% que apesar de tratar-se de um bom resultado, ainda não supera os resultados obtidos quando utilizada a Novozym 435 em estudos anteriormente realizados em nosso grupo de pesquisa.

6. Tratamento e purificação dos produtos obtidos em reação de transesterificação etílica utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador enzimático

6.1. Purificação dos ésteres etílicos obtidos a partir do óleo de mamona

Após a quantificação dos ésteres obtidos (rendimento da reação), realizaram-se as etapas de purificação dos mesmos de acordo com **4.3.10.1**.

Dessa forma, uma alíquota de 25 ml de biodiesel de mamona obtido através de reação enzimática com Lipozyme TL IM foi colocada em um balão de fundo redondo e submetida à destilação sob pressão reduzida (2,8 mmHg).

Foram observados os seguintes pontos de ebulição na destilação dos ésteres obtidos a partir do óleo de mamona **TABELA XX**. Os maiores valores de temperatura para os ésteres que contém hidroxila se deve ao fato de fazerem ligações de hidrogênio que são interações intermoleculares fortes.

TABELA XX. Parâmetros observados na destilação dos ésteres etílicos obtidos a partir do óleo de mamona.

	Temperatura de Ebulição (°C)	Pressão (mmHg)
Ésteres sem Hidroxila	145,0 ± 5,0	2,8
Ésteres com Hidroxila	217,0 ± 2,0	2,8

6.2. Purificação dos ésteres etílicos obtidos a partir do óleo de soja

O mesmo procedimento utilizado previamente na purificação dos ésteres etílicos obtidos a partir do óleo de mamona foi empregado na purificação dos ésteres (biodiesel) obtidos a partir do óleo de soja (4.3.10.1).

Dessa forma, uma alíquota de 25 ml de biodiesel de mamona obtido através de reação enzimática com Lipozyme TL IM foi colocada em um balão de fundo redondo e submetida à destilação sob pressão reduzida.

Os resultados da análise estão elucidados na **TABELA XXI**. Os ésteres etílicos obtidos a partir do óleo de soja apresentam ponto de ebulição característico, entretanto, ao contrário dos ésteres etílicos obtidos a partir do óleo de mamona, foram destilados em fração única, pois não houve a necessidade de separar compostos específicos como no caso do biodiesel de mamona onde separamos ésteres derivados dos os ácidos graxos com hidroxila (ácido ricinoleico).

TABELA XXI - Parâmetros observados na destilação dos ésteres etílicos obtidos a partir do óleo de soja.

	Temperatura de Ebulição (°C)	Pressão (mmHg)
Ésteres etílicos do óleo de soja	167,5 ± 2,5	0,7

6.3. Purificação da glicerina

As frações contendo a glicerina obtida, tanto em reações empregando óleo de mamona quanto óleo de soja como matéria prima, foram concentradas e destiladas a temperatura e pressão controladas.

Após alcançar um volume de 30mL de glicerina, foi então colocada em um balão de fundo redondo e o excesso de solvente foi evaporado em um evaporador rotativo. Logo em seguida o balão contendo a glicerina concentrada foi colocado em uma manta com agitação magnética e destilado sob alto vácuo (**TABELA XXII**).

TABELA XXII - Parâmetros físicos da destilação da glicerina.

	Temperatura de Ebulição (°C)	Pressão (mmHg)
Glicerina	154,0 ± 1,0	1,9

7. Análise das características físico-químicas das matérias-primas e dos produtos obtidos em reação de transesterificação etílica utilizando Lipozyme TL IM

Determinações de alguns parâmetros analíticos, como viscosidade, densidade, índice de iodo e ponto de fulgor foram realizadas segundo as normas da ANP (Agência Nacional do Petróleo) para os ésteres etílicos obtidos a partir de reação de transesterificação utilizando a Lipozyme TL IM como catalisador enzimático. Para estas análises os ésteres foram previamente purificados segundo metodologia descrita em **4.3.10.1**.

7.1. Viscosidade

A viscosidade é um dos principais fatores responsáveis pela necessidade de transesterificação dos óleos vegetais de forma que estes possam ser utilizados como combustíveis líquidos. A viscosidade do biodiesel produzido a partir do óleo de soja obtido por reação de transesterificação empregando Lipozyme TL IM como catalisador enzimático foi de $4,084 \pm 0,028$ cSt e para o óleo de mamona foi de $11,736 \pm 0,024$ cSt. A metodologia utilizada está descrita em **4.3.11.4**. A viscosidade dos óleos vegetais utilizados como material de partida é uma característica parcialmente transferida aos produtos de transesterificação.

A viscosidade dos ésteres obtidos por transesterificação empregando óleos vegetais e álcoois, traduz-se pela somatória das características físico-químicas de ambos os compostos, ou seja, tanto a cadeia carbônica do álcool utilizado, quanto a do ácido graxo que compõem os ésteres obtidos irão influenciar a viscosidade.

Dessa forma, já era esperado que os ésteres obtidos a partir do óleo de soja apresentassem valores de viscosidade inferiores aos dos ésteres obtidos a partir do óleo de mamona uma vez que o óleo de mamona é constituído principalmente do ácido ricinoleico, cuja estrutura apresenta dezoito átomos de carbono e um grupamento hidroxila responsável por interações do tipo ponte de hidrogênio entre moléculas. Além disso, o álcool utilizado em ambas as reações foi o álcool etílico, portanto para efeitos comparativos, a diferença na viscosidade destes dois tipos de biodiesel deve-se exclusivamente a diferenças nas cadeias carbônicas dos seus ácidos graxos.

Para os ésteres obtidos a partir do óleo de mamona, foi observada uma viscosidade de $200,08 \pm 3,95$ cSt a 40°C respectivamente (**TABELA XXIII**).

Enquanto que para os ésteres obtidos a partir do óleo de soja a viscosidade observada foi de $32,71 \pm 0,40$ cSt a 40°C .

TABELA XXIII - Dados de viscosidade de óleos vegetais e ésteres obtidos a partir dos mesmos óleos em reação de transesterificação utilizando a lipase Lipozyme TL IM como catalisador.

Amostra	$\eta_{40^{\circ}\text{C}}$ (cSt)
Óleo de soja	$32,71 \pm 0,40$
Óleo de mamona	$200,08 \pm 3,95$
Ésteres etílicos de soja	$4,08 \pm 0,03$
Ésteres etílicos de mamona	$11,73 \pm 0,02$

7.2. Densidade

A metodologia empregada nesta determinação está descrita em **4.3.11.6**.

Para os ésteres etílicos obtidos a partir do óleo de mamona foi observado um valor de densidade de $0,918 \pm 0,01 \text{ g/cm}^3$, superior ao observado para os ésteres etílicos de soja de $0,888 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$.

Novamente podemos explicar a diferença encontrada nestes valores como referente à presença do ácido ricinoleico na constituição dos ésteres etílicos obtidos a partir do óleo de mamona. Este ácido é responsável pela forte interação entre moléculas ocasionada pela presença de seu grupamento hidroxila, resultando em uma menor ocupação no espaço por parte destas moléculas.

Além disso, considerando o fato de os ácidos graxos tanto do óleo de soja quanto os de mamona apresentam dezoito átomos de carbono na cadeia dos seus ácidos graxos mais representativos (presentes em maior proporção), e que os ácidos graxos do óleo de soja apresentam apenas duplas ligações na cadeia de seus ácidos graxos e estas duplas ligações são de configuração cis, devido ao processo de biosíntese de lipídeos apresentado pelos

vegetais, o que resulta em um menor empacotamento entre as moléculas no espaço influenciando, portanto, de forma negativa no aumento da viscosidade, já era esperada uma maior densidade para os ésteres etílicos de mamona do que para os ésteres etílicos de soja.

Além disso, as viscosidades das misturas entre os ésteres etílicos de soja e mamona, encontraram-se dentro da faixa esperada entre os valores encontrados para os ésteres em sua forma pura.

Assim, mistura de 95% de soja e 5% de mamona apresenta densidade $0.874 \pm 0,002$ g/cm³, enquanto a mistura de 70% do biodiesel de soja com 30% de biodiesel de mamona apresenta valor de densidade de $0.881 \pm 0,01$ g/cm³ acompanhando a tendência no aumento da densidade com o aumento da porcentagem de biodiesel de mamona na mistura.

TABELA XXIV - Dados de densidade dos ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona.

Amostra	d_{15°C} (g/cm³)
Ésteres etílicos de soja	0,888 ± 0,02
Ésteres etílicos de mamona	0,918 ± 0,01
70% ésteres etílicos de soja em mistura	
com ésteres etílicos de mamona	0.881 ± 0,01
95% ésteres etílicos de soja em mistura	
com ésteres etílicos de mamona	0.874 ± 0,002

7.3. Índice de iodo

As determinações de índice de iodo dos ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona foram realizadas segundo metodologia descrita em 4.3.11.3.

Foram observados os valores de $120,0 \pm 0,82$ mgKOH/g e $72,03 \pm 2,28$ mgKOH/g para os ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona respectivamente (TABELA XXV).

O valor de índice de iodo observado para os ésteres etílicos de mamona foi menor do que o valor observado para os ésteres de soja.

No óleo de soja os ácidos graxos presentes em maior proporção são o oléico (com uma instauração) e o ácido linoléico (com duas instaurações), já no óleo de mamona o ácido presente em maior proporção trata-se do ácido ricinoléico (com 1 insaturação), estes ácidos são os mesmos que encontrados na estrutura dos ésteres etílicos obtidos a partir da reação de transesterificação. Devido ao fato de o índice de iodo ser uma medida que representa o número de gramas de iodo absorvido por 100g de éster através de reação onde há adição do iodo às duplas ligações da estrutura dos ácidos graxos presentes nos ésteres em questão, já era esperado que o índice de iodo dos ésteres de soja fosse maior que o índice de iodo observado para os ésteres de mamona.

TABELA XXV - Dados de índice de iodo observados para os ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona.

Amostra	Índice de iodo (mg KOH/g de éster)
Ésteres etílicos de soja	$120,0 \pm 0,82$
Ésteres etílicos de mamona	$72,03 \pm 2,28$

7.4. Ponto de Fulgor

As determinações de ponto de fulgor dos ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona foram realizadas segundo metodologia descrita em **4.3.11.5**.

Foram obtidos os valores de $171 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$ e $258 \pm 1,4^{\circ}\text{C}$ em análises de ponto de fulgor para os ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona respectivamente. Estes resultados estão ilustrados na **TABELA XVI**.

Como o ponto de fulgor é a menor temperatura na qual um líquido libera vapor/gás em quantidade suficiente para formar uma mistura inflamável.

E por mistura inflamável, para fins de apuração do ponto de fulgor, entende-se a quantidade de gás/vapor misturada ao ar atmosférico suficiente para iniciar uma inflamação em contato com uma chama (isto é, a queima abrupta do gás/vapor), sem que haja a combustão do líquido emitente. Devido ao fato de os ésteres etílicos de mamona apresentarem o éster do ácido ricinoleico em sua composição, este deve apresentar uma temperatura maior necessária para que a fase vapor entre em equilíbrio com a fase líquida.

Este fato é por sua vez, decorrente das interações intramoleculares fortes presentes em sua composição e responsáveis por uma maior temperatura de ebulição destes ésteres, bem como uma menor pressão de vapor em relação aos ésteres de soja analisados.

TABELA XXVI - Dados de ponto de fulgor observados para os ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona.

Amostra	Ponto de Fulgor ($^{\circ}\text{C}$)
Ésteres etílicos de soja	$171,0 \pm 1,4$
Ésteres etílicos de mamona	$258,0 \pm 1,4$

7.5. Correções da viscosidade do biodiesel de mamona através de misturas com o biodiesel de soja e correção do índice de iodo do biodiesel de soja através de misturas com o biodiesel de mamona

Uma das maiores preocupações na utilização do biodiesel de mamona em veículos com motores ciclo diesel, trata-se da alta viscosidade deste composto. A reação de transesterificação dos óleos vegetais em geral tem como objetivo além de outros fatores, a diminuição na viscosidade destes óleos de modo que os mesmos possam ser utilizados como fonte de energia renovável na produção de combustíveis líquidos substituintes ao diesel de petróleo (Sivaprakasam, 2007).

Entretanto, no caso do biodiesel de mamona, obtido a partir deste óleo atípico, (com um grupamento hidroxila em sua cadeia carbônica) a transesterificação embora consiga reduzir a viscosidade de 200,08 cSt do óleo de mamona para $11,73 \pm 0,024$ cSt (no biodiesel de mamona), não permite que este biocombustível derivado da mamona possa ser enquadrado nos parâmetros de qualidade internacionais.

Dessa forma o biodiesel de mamona, mesmo tendo boa qualidade, não consegue atender as normas de especificação exigidas internacionalmente para sua comercialização e utilização na forma pura em motores.

A mesma preocupação, apesar de secundária em relação á viscosidade, tem com o biodiesel de soja em sua forma pura devido ao fato de o seu valor de índice de iodo estar no limite das normas exigidas para sua utilização (ASTM D 6571; EN 14214).

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo (ANP) os valores permitidos para índice de iodo, viscosidade e densidade estão listados na **TABELA XXVII**.

As normas brasileiras foram estabelecidas a partir das normas americanas e européias e estão em estágio de adaptação.

Além disso, as normas Européias (EN14214) e Americanas (ASTM D 6571) são ainda mais exigentes quanto os parâmetros de qualidade exigidos para este biocombustível (TABELA I), de forma que o biocombustível produzido nestes países ou adquirido através de importação deve ser cuidadosamente processado.

TABELA XXVII - Especificações internacionais para densidade, viscosidade e densidade do biodiesel.

Características (Unidade)	Limite (Norma)	Ésteres etílicos de soja	Ésteres etílicos de mamona
Densidade a 15°C (g/cm ³)	0,86-0,90 (EN 14214)	0,888 ± 0,02	0,918 ± 0,01
Viscosidade Cinemática a 40°C (mm ² /s)	3,5-5,0 (EN 14214) 1,9- 6,0 (ASTM D 6571)	4,084 ± 0,028	11,736 ± 0,024
Índice de Iodo (g I ₂ / 100 g)	115 (EN 14214)	120,0 ± 0,82	72,03 ± 2,28

Tomando os resultados obtidos e comparando-os com da tabela acima podemos inferir que os ésteres etílicos de mamona (B100 - 100% de biodiesel de mamona), obtidos através de transesterificação enzimática aqui proposta, não atendem as normas da ASTM D 6571 e EN 14214 no que diz respeito à viscosidade (11,736 ± 0,024 cst) tão pouco no que diz respeito a densidade (0,918 ± 0,01g/cm³).

Entretanto estes ésteres encontram-se dentro da norma EN 14214 quanto ao índice de iodo (72,03 ± 2,28 mgKOH/g de éster).

Analisando por sua vez, os ésteres etílicos de soja (B100 - 100% de biodiesel de soja), obtidos através de transesterificação enzimática aqui proposta, pode-se inferir que estes atendem as normas ASTM D 6571 e EN 14214 no que diz respeito à viscosidade ($4,084 \pm 0,028$ cst) e atende a norma EN 14214 quanto a densidade ($0,888 \pm 0,02\text{g/cm}^3$), entretanto, encontrar-se no limite, ou muito próxima ao limite da norma EN 14214 quanto ao índice de iodo ($120,0 \pm 0,82$ mgKOH/g de éster).

Sumarizando, os ésteres etílicos de mamona em sua forma pura não atendem as normas de viscosidade e densidade, entretanto atendem a norma de índice de iodo. Exatamente o contrário ao observado com os ésteres de soja também em sua forma pura.

Tendo em vista estes resultados, foram realizadas misturas entre estes dois tipos de ésteres obtidos, de modo a verificar quais proporções destas misturas em volume seriam adequadas de modo que todos os parâmetros citados estejam dentro das normas de especificação de qualidade.

As misturas foram preparadas segundo metodologia descrita em **4.3.9**. Posteriormente, estas misturas foram submetidas a análise de índice de iodo e viscosidade.

Os resultados obtidos para as viscosidades e índices de iodo das misturas entre os biodiesel de soja e mamona podem ser observados nas **TABELAS XXVIII e XXIX**, respectivamente.

Observando os resultados da **TABELA XXVIII**, com as medidas de viscosidade das misturas dos ésteres de soja e mamona, pode-se afirmar que as misturas com ésteres de soja na faixa entre 100 - 70% (30% de mamona) estão dentro do exigido pelas normas EN 14214 e ASTM D 6571.

TABELA XXVIII – Correção da viscosidade do biodiesel de mamona através de misturas com biodiesel de soja.

% de ésteres etílicos de soja em mistura com ésteres etílicos de mamona	Viscosidade (g/cm³)
100 % Soja	4,084 ± 0,028
95% Soja	4,377 ± 0,106
90% Soja	4,448 ± 0,012
80% Soja	4,761 ± 0,030
70% Soja	5,144 ± 0,06
50% Soja	6,403 ± 0,052
30% Soja	8,048 ± 0,025
10% Soja	10,534 ± 0,013
2% Soja	11,627 ± 0,078
100% Mamona	11,736 ± 0,024

No que diz respeito ao índice de iodo, foi possível observar que as misturas abaixo de 95% de ésteres de soja (10% de mamona) estão dentro dos valores de índice de iodo exigido pela norma EN 14214.

TABELA XXIX – Correção do índice de iodo do biodiesel de soja através de misturas com biodiesel de mamona.

% de ésteres etílicos de soja em mistura com ésteres etílicos de mamona	Índice de iodo (mgKOH/g de éster)
100 % Soja	120,08 ± 0,82
98% Soja	117,75 ± 1,07
95% Soja	114,13 ± 0,17
90% Soja	111,56 ± 4,66
70% Soja	95,33 ± 1,85
50% Soja	90,24 ± 3,08
20% Soja	84,45 ± 2,34
100% Mamona	72,03 ± 2,28

Levando-se em consideração os dois parâmetros observados e ressaltando-se o fato de a viscosidade ser uma característica físico-química crítica, conclui-se que as misturas entre 5-30% de mamona (70-95% em ésteres de soja), encontram-se na faixa mais adequada para a utilização destes ésteres na forma de mistura com os ésteres etílicos de soja.

Além disso, os valores de densidade encontrados para as misturas de 70% de ésteres etílicos de soja em 30% de ésteres etílicos de mamona e a mistura de 95% de ésteres de soja em 5% de ésteres de mamona apresentam os valores de $0,881 \pm 0,001$ e $0,874 \pm 0,002$ respectivamente e estão dentro das normas ASTM D 6571 e EN 14214 para biocombustíveis.

8. Conclusões

As análises de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) mostraram-se eficientes no acompanhamento de reações de transesterificação utilizando os óleos de soja e mamona.

A primeira permitiu uma análise qualitativa das reações, sendo capaz de ilustrar a presença inclusive dos intermediários reativos obtidos durante a evolução da reação.

O segundo tipo de cromatografia citado, por sua vez, permitiu uma análise quantitativa dos ésteres etílicos dos ácidos ricinoleico e linoléico presentes em maior quantidade nos óleos de mamona e soja, respectivamente.

Juntas, estas duas técnicas permitem uma análise global dos produtos formados durante as reações e, portanto permitiram a avaliação dos melhores parâmetros a serem utilizados em reações de etanolise dos óleos de soja e mamona utilizando Lipozyme TL IM uma lipase 1,3-específica de *Thermomyces lanuginosus*.

Através dos estudos dos parâmetros em reação com óleo de mamona conclui-se que os melhores resultados foram obtidos quando utilizados 10% de enzima macerada, sem pré-incubar, com 9,0 equivalentes de etanol, adicionados em etapas de 1,0 equivalente a cada 15 minutos, com temperatura do meio a 40°C.

No caso das reações onde o óleo de soja foi utilizado como matéria-prima, obteve-se melhores resultados quando utilizou-se 10% de enzima macerada, sem pré-incubar, em 3,0 equivalentes de etanol, adicionados em etapas de 1,0 equivalente a cada 15 minutos e temperatura ambiente.

Nas reações com óleo de mamona foram utilizados 9,0 equivalentes de etanol e 40°C para que fosse possível obter-se os melhores resultados, enquanto que nas reações com soja foram utilizados somente 3,0 equivalentes de etanol e temperatura ambiente.

A principal diferença entre estas reações reside no fato de o óleo de mamona apresentar características atípicas em relação aos outros tipos de óleos vegetais. O óleo de mamona apresenta uma hidroxila na estrutura do principal ácido graxo presente em sua composição, o que faz com que sua viscosidade seja muito superior que a do óleo de soja e da maioria dos óleos vegetais. Isto resulta em diferente interação deste substrato com o sítio ativo da enzima. Além disso, este óleo pode enfrentar dificuldades de interação com o suporte onde a enzima encontra-se imobilizada, portanto, acredita-se que um maior excesso de etanol deva ser utilizado na reação de modo a atuar como solvente, facilitando o progresso da reação.

No que diz respeito aos parâmetros do pré-tratamento da enzima imobilizada, bem como maceração (trituração) da mesma, estes mostraram-se eficientes nos estágios iniciais de conversão, mas não no processo como um todo.

Devido ao fato de o pré-tratamento da enzima implicar em gasto extra de matéria-prima, optou-se por não utilizar este recurso nas reações em condições otimizadas tanto com o óleo de soja, quanto com o óleo de mamona.

A trituração da enzima imobilizada foi utilizada nas reações descritas como em condições otimizadas, pois permite uma rápida obtenção dos intermediários reativos no início da reação, o que pode ser entendido como um fator responsável por propiciar uma maior velocidade de conversão inicial da reação, que aliada a outros parâmetros mostrou bons resultados. Embora estudos de reutilização da enzima macerada devam ser ainda

realizados de modo a garantir que não há perda de atividade por exposição da enzima devido ao processo de maceração.

A utilização do catalisador enzimático Lipozyme TL IM mostrou ser efetivo na conversão dos materiais de partida (óleos vegetais) aos produtos de interesse (ésteres etílicos), entretanto, por se tratar de uma lipase 1,3-específica, resulta nos monoésteres desejados, porém contaminados monoglicerídeos e diglicerídeos residuais ao final das reações. Em combinação com esse processo, emprego de uma lipase inespecífica como a lipase de *Cândida antarctica A*, e mais especificamente a Novozym 435, utilizada na segunda etapa reacional neste trabalho, mostrou-se uma opção eficiente para a conversão dos acilglicerídeos residuais, bem como de ácidos graxos livres. Além disso, o emprego destas enzimas em reação de duas etapas utilizando numa primeira etapa de conversão a Lipozyme TL IM, de menor preço e em maior proporção, e em uma segunda etapa reacional, a Novozym 435, de maior preço e em menores proporções, traz economia ao processo de produção de biodiesel por catálise enzimática.

Os produtos obtidos através desta metodologia aplicada tanto em reações com óleo de soja quanto em reações com óleo de mamona, seguidas de etapas de purificação, resultaram em ésteres etílicos de alta qualidade podendo ser considerados dentro das especificações internacionais de qualidade para biocombustíveis.

Os ésteres etílicos obtidos a partir dos óleos de soja e mamona apresentaram características peculiares, como esperado, entretanto, estas são inerentes a própria constituição da matéria prima. Assim, o biodiesel de mamona obtido, apresentou viscosidade muito elevada, impróprias a sua utilização como biocombustível na forma pura (100%). Já o biodiesel de soja obtido apresentou índice de iodo próximo ao limite tolerável para sua utilização como biocombustível (segundo as normas EN 14214 e ASTM D6751).

Uma vez que o biodiesel de mamona apresenta baixo índice de iodo e o biodiesel de soja apresenta baixa viscosidade, a correção do índice de iodo e da viscosidade pelo estudo destas características físico-químicas em misturas em diferentes proporções entre estes, apontou como faixa segura de utilização destes produtos entre 5-30% de biodiesel de mamona misturado no biodiesel de soja (70-95% em ésteres de soja).

Dessa forma, os produtos de transesterificação obtidos através de metodologia desenvolvida, utilizando Lipozyme TL IM em uma primeira etapa seguida de Novozymes 435 em uma segunda etapa reacional como catalisador enzimático, mostraram sua versatilidade no sentido de proporcionar a realização eficiente da transesterificação por utilização de uma combinação catalítica mais barata do que a utilização exclusiva da Novozym 435 anteriormente utilizada em nosso grupo de pesquisa.

9. Referencias Bibliográficas

ANVISA, 1999. Resolução – RDC n° 482 de 23 de setembro de 1999.

AOCS, Official Methods and Recommended Practices of the AOCS, 5th edn.; AOCS Press, Champaign, Illinois, 1997.

ASTM D130 – Determinação da Corrosividade ao Cobre

ASTM D2500 – Determinação do Ponto de Névoa

ASTM D2709 – Determinação de Água e Sedimentos

ASTM D445 – Determinação da Viscosidade

ASTM D4530 – Determinação de Resíduo de Carbono

ASTM D5453 – Determinação de Enxofre Total

ASTM D613 – Determinação do N° de Cetano

ASTM D6584 – Determinação de Glicerina Livre e Glicerina Total

ASTM D664 – Determinação do Índice de Acidez

ASTM D93 – Determinação do Ponto de Fulgor

Billaund, F.; Dominguez, V.; Broutin, P.; Busson, C. Production of hydrocarbons by pyrolyses of methyl esters from rapeseed oil. *Journal of American Oil Chemist's Society*, v. 72, p. 1149- 1154.1995.

Câmara dos Deputados, Centro de Documentação e Informação, Coordenação Publicações, Brasília, 2004.

Castro, F. H.; MENDES A.A.; SANTOS.J.C.. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v.27, n.1, 2003.

Chao, P.; Chao, C.; Lin, F.; Huang, C. Oxidized Frying Oil Up-Regulates Hepatic Acyl-CoA Oxidase and Cytochrome P450 4 A1 Genes in Rats and Activates PPAR₁. *American Society for Nutritional Sciences*.2001.

Chavanne, G. Sur um mode d' utilisation possible de l'huile de palme `a la fabrication d'un carburant lourd. *Mémoires Presentes a la Société Chimique*. BE422,877A, 1937.

Chen, J.W., Wu W.T., *J. of Bioscience and Bioeng.*, 95 (5): 466-469, May, 2003.

Costa Neto, P.R.; Rossi, L. F.S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v. 23, n° 4, p.531-537, 2000.

- Dabdoub, M. J. Biodiesel Refining, Storage and Transportation in Brazil. The Official Brazilian Biodiesel Test Program. American Chemical Society Workshop, Águas de Lindóia. 2007.
- Dalla-Vechia, R. Aplicações Sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. Química Nova, v. 27, n° 4, p.623- 630, 2004
- Dmytryshyn, S. L.; Dalai, A.K., Chadhari, S.T., Mishra, H.K., Reaney, M.J., Synthesis and Characterization of vegetable oil derived esters: evaluation for their diesel additive properties. Bioresource Technology, 92: 55-64, 2004.
- Du, W. et al. Study in acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. Journal of Molecular Catalysis , v.37, p.68-71, 2005.
- Elroad, M. J. Greenhouse Warming Potentials from the Infrared Spectroscopy of Atmospheric Gases. Journal of Chemical Education , v.76, n.12, p.1702-05, 1999
- EN 14103 – Determinação do Teor de Ésteres Totais
- EN 14111 – Determinação do Índice de Iodo
- Freedman, B.; Pryde, E. H.; Mounts, T. L. Variables Affecting the Yield of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oil. Journal American Oil Society , v.63, p.1638-43, 1984.
- Freitas, S, M; Fredo, C, E, Biodiesel a base de óleo de mamona: algumas considerações.
- Glyglewics, S. Rapeseed oil methyl esters preparation using heterogeneous catalysts. Bioresource Technology, v.70, p.249, 1999.
- Goldemberg, J. Ethanol for a Sustainable Energy Future. Science, 315: 808-819, 2007.
- Grimoni, J. A. B.; Luiz Cláudio Ribeiro Galvão, Miguel Edgar Morales Udaeta,

- Hattori, H. Rapeseed oil by heterogeneous catalysis. *Applied Catalysis A-General*, v. 222, p. 247, 2001.
- Hayes, D.G. Review: Enzyme-Catalyzed Modification of Oilseed Materials to produce Eco-Friendly Products. *JAOCS*, v. 81, n°12, p.1077- 1103, 2004.
- Holanda, A. Biodiesel e inclusão social. *Caderno de Altos Estudos*, vol 1: Biodiesel e Inclusão Social, Brasília: Câmara dos Deputados, 2004
- Holcapek, M. et al. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *Journal of Chromatography A*, v.858, p.13-31, 1999.
- <http://www.biodieselbrasil.com.br>. Acessado em julho de 2007.
- <http://www.scholar.google.com>. Acessado em junho de 2007.
- <http://www.anp.gov.br>. Acessado em junho de 2007.
- <http://www.embrapa.com.br>. Acessado em junho de 2007.
- <http://www2.camara.gov.br>. Acessado em julho de 2007.
- Hurtado, C. R. Obtenção de ésteres etílicos (biodiesel) a partir de diferentes óleos vegetais utilizando lipase imobilizada de *Candida antarctica* (NOVOZYM 435). Masters Degree -, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2006.
- Informações Econômicas*, SP, v. 35, n°1, 2005.
- Jaeger, K. E.; Reetz, M. T. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n°9, p. 396- 403. 1998.
- Jansen, H.; Hrcirik, K; Szórádi, A; Leitjten, M. An improved method for sn-2 analysis of triacylglycerols in edible oils and fats based on immobilized lipase D, *Journal of Chromatography*, 2005.

- Kaieda M., Samukawa T., Kondo A., Fukuda H., *J. of Bioscience and Bioeng.*, 91 (1): 12-15 Jan., 2001.
- Kamori M., Hori T., Yamashita Y., Hirose Y., Naoshima Y., *J. Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 9 (4-6): 269-274, Apr. 21, 2000.
- Knothe, G. *Analyzing Biodiesel: Standards and Other Methods. Journal of American Oil Chemists Society*, 83: 823-833 no. 10, 2006.
- Komers, K. et al. Biodiesel from rapeseed oil, methanol and KOH. Analysis of composition of actual reaction mixture. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.103, p.363-71, 2001.
- Krisnangkura, K.; Simamaharnnop, R. Continuous transesterification of palm oil in organic solvent. *Journal of American Oil Chemical Society*, v. 69, p. 1666, 1992.
- Lenihnger, A. L., *Princípios de bioquímica. 7ª edição. Savier Editora de Livros Médicos LTDA. São Paulo, 1991.*
- Lotero E., Goodwin, J.G., Bruce, D.A., Suannakarn, K.; Liu, Y., Lopez, E., *The Catalysis of biodiesel Synthesis. Catalysis*,19, 2006.
- MA, F.; Hanna, M.A. Biodiesel Production: A review. *Bioresource Technology*, 70: 1-15.
- Mamoru Iso, Baoxue Chen, Masashi Eguchi, Takashi Kudo, Surekha Shetha, *J. Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 16, 53-58, 2001.
- Meher, L.C.; Sagar, D.V.; Naik, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification- a review. *Renewable & Sustainable Energy*, 10:248-268, 2006.
- Metzger, J. O. Organic Reactions without organic solvents and oils and fats as renewable raw materials for the chemical industry. *Chemosphere*, 43: 83-87, 2001.

- Mittelbach, M.; Tritthard, P.; Junkey, H.; Diesel fuel derived from vegetable oils II: Emission tests using rape oil methyl esters. *Energy in Agriculture*, 4: 207-215 (1985).
- Moretto, E.; FETT, R. *Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos*. São Paulo: Varela Editora e Livraria LTDA, 1998
- Nacional Biodiesel Board: *Anais do Congresso Internacional de Biocombustíveis Líquidos*. Curitiba - PR: 1998. 1-42.
- Nascimento M.G., Costa Neto P.R., Mazzuco L.M., *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 28-31, 2001.
- Neyo, J. A.; Vitolo, M. *Purificação de Enzimas - Imobilização de Enzimas - Algumas Aplicações de Enzimas*. In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SHMIDELL, W. 1 .ed. São Paulo - SP: Editora Edgard Blücher LTDA, 2001. v.3, cap.17-19,p. 377-412.
- Nouredinni, H.; Zhu, D. Kinetics of transesterification of soybean oil. *Journal of American oil Chemical Society*, v. 74, p.1457, 1997.
- Novozymes Product Sheet for Lipozyme TLIM. Novozymes , 2006.
- Nye, M. J.;Willianson, T. W.; Deshpande, S. Conversion of used frying oil to diesel fuel by trans-esterification-preliminary tests. *Journal of the American Chemist's Society*, v. 60, n° 8, p. 1598-1601.
- Parente, E. S. et al, 2003. *Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado*. Tecbio, Fortaleza, CE.
- Peterson, G.R.; Sacarrah, W. P. Solid base catalysts generation of basic sites and application to organic synthesis. *Journal of American Oil Chemical Society*, v. 61, p.1593, 1984.

- Piyaporn, K.; Jeyashoke, N.; Kanit, K. Survey of seed oils for use as diesel fuels. *Journal of American Oil Chemists Society*, 73, no 4: 471-474.
- Piyatheerawong, W. et al. Dependency of water concentration on ethanolysis of trioleoyglycerol by lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.28, p.19-24, 2004.
- Plano Nacional de Agroenergia, Brasília, 2005
- R. Morrison, R. Boyd, *Química Orgânica*, 9ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1990.
- Resolução ANP nº 42, de 24 de novembro de 2004, Brasil.
- Samukawa T., Kaieda M., Matsumoto T., Ban K., Kondo A., Shimada Y., Noda H., Fukuda H., *J. of Bioscience and Bioeng.*, 90 (2), 180-183, Aug. 2000.
- Schuchardt, U.; Sercheli, R.; Vargas, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v.9, n.1, p.199-210, 1998.
- Segel. I. H. *Bioquímica Teorias e Problemas, Livros Técnicos e Científicos*, Rio de Janeiro, 1975.
- Shay, E.G. Diesel fuel from vegetables and oils: status and opportunities. *Biomass Bioenergy*, 4(4): 227-242, 1993.
- Shimada Y., Watanabe Y., Sugihara A., Tominaga Y., *J. Molecular Catalysis B-Enzymatic.*, 17 (3-5): 133-142, Jun., 7, 2002.
- Shimid, R.D.; Verger, R. Lipases: Interfacialenzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie – Internacional Edition*, v. 37, nº 12, p.1609- 1633. 1997.
- Sivaprakasam, S.; Saravanam, C. G. Optimization of Transesterification Process for Biodiesel Production and Use of Biodiesel in a Compression Ignition Engine.

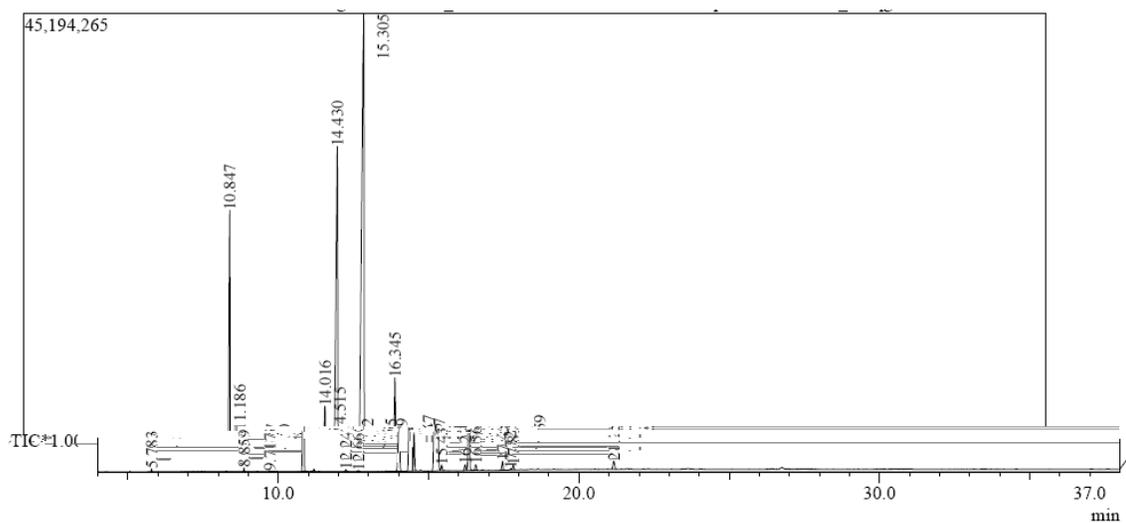
- Smith, D. M.; Bryan, W. M. D. M. Specific quantitative determination of water by Karl Fischer. *J. Am. Chem. Soc.* v.61, p.2407-12, 1939.
- Soumanou, M.M.; Bornscheur, U. T. ; Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 97-103, 2003.
- Srivastava, A.; Prasad, R. Triglycerides- based diesel fuels. *Renewable & Sustainable Energy Rev.*, 4: 111-333, 2000.
- Stubiger, G.; Pittenauer, E.; Allmaier, G. Characterisation of Castor Oil by On-line and Off-line Non-aqueous Reverse-phase High-performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (APCI and UV/MALDI). *Phytochemical Analysis* , v.14, p.337-46, 2003.
- Suppes, G.J.; Dasari, E. J.; Doskocil; Mankidy, P.J. Transesterification of soybean oil with zeolite and metal catalysts. *Applied Catalysis A-General*, v.257, p.213, 2004.
- Sveden, A. Review: Lipase protein engineering. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1543, p.223, 2000.
- Turkan, A.; Kalay, S. Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases. *Journal of Chromatography A* , v.In Press, 2006.
- Lima, U. A., Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. *Biotecnologia Industrial*, vol.3, *Processos Enzimáticos e Fermentativos*, Editora Edgar Blucher, LTDA, São Paulo, 2001, 1ª edição.
- Urioste, D. Produção de biodiesel por catálise enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Engenharia Química. 2004.

- Watanabe, Y.; Shimada, Y.; Sugihara, A.; Fukuda, H.; Tominaga, Y.; Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of American Oil Chemist's Society*, v. 77, n^o4, p.355-360.
- Zang, Y. et al. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. *Bioresource Technology*, v.89, p.1-16, 2003.

ANEXO I

Composição em ésteres do biodiesel de soja etílico por análise CG- MS

Cromatograma da amostra de biodiesel etílico de soja

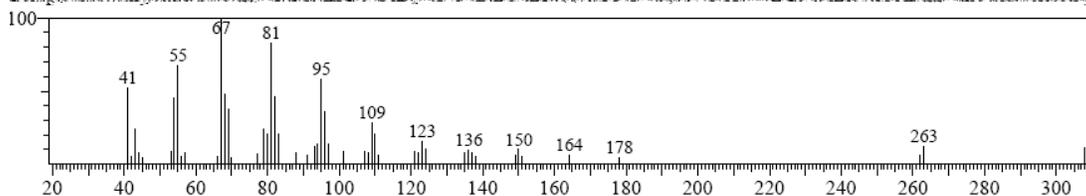


Peak Report TIC

Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	5.783	271067	0.05	
2	8.859	453383	0.09	
3	9.717	10814	0.00	
4	10.847	64879869	12.25	
5	11.186	487731	0.09	
6	12.247	460016	0.09	
7	12.660	201092	0.04	
8	14.016	23207574	4.38	
9	14.430	134803313	25.45	
10	14.515	9457971	1.79	
11	15.305	255139567	48.17	
12	15.432	1608725	0.30	
13	16.215	1819273	0.34	
14	16.345	27778763	5.24	
15	16.569	1744365	0.33	
16	17.457	2529896	0.48	
17	17.725	396736	0.07	
18	17.917	1215787	0.23	
19	19.159	3101769	0.59	
20	21.159	529667711	100.00	

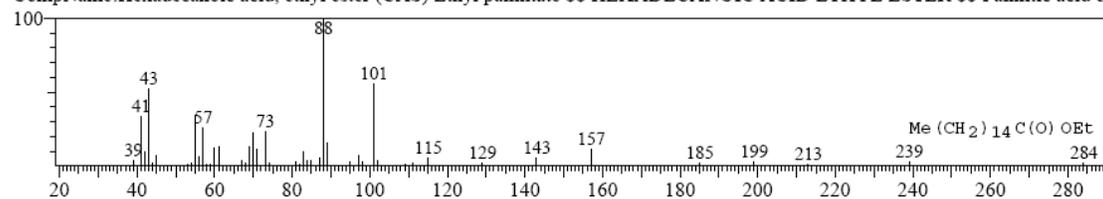
(1) Linoleato de etila – espectro de massas pico # 11

Hit#:1 Entry:219480 Library:WILEY7.LIB
SI:94 Formula:C20 H36 O2 CAS:544-35-4 MolWeight:308 RetIndex:0
CompName:Ethyl linoleate \$\$ LINOLEIC ACID, ETHYL ESTER \$\$ ETHYL 9,12-OCTADIENOATE



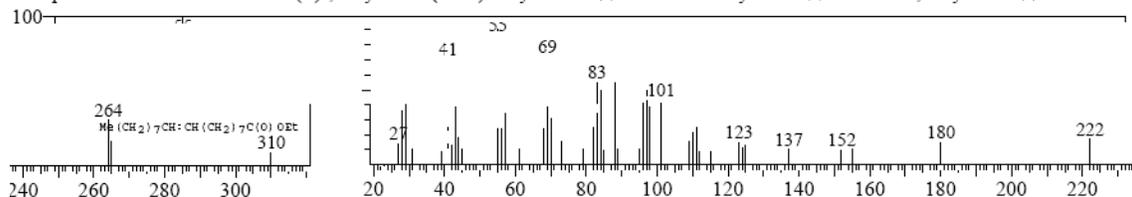
(2) Palmitato de etila – espectro de massas pico # 4

Hit#:4 Entry:195615 Library:WILEY7.LIB
SI:93 Formula:C18 H36 O2 CAS:628-97-7 MolWeight:284 RetIndex:0
CompName:Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS) Ethyl palmitate \$\$ HEXADECANOIC ACID ETHYL ESTER \$\$ Palmitic acid et



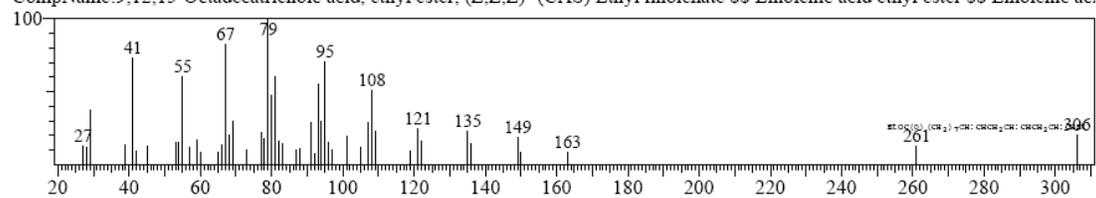
(3) Oleato de etila - espectro de massas pico # 8 e 9

Hit#:1 Entry:221399 Library:WILEY7.LIB
SI:95 Formula:C20 H38 O2 CAS:111-62-6 MolWeight:310 RetIndex:0
CompName:9-Octadecenoic acid (Z)-, ethyl ester (CAS) Ethyl oleate \$\$ Oleic acid ethyl ester \$\$ Oleic acid, ethyl ester \$\$



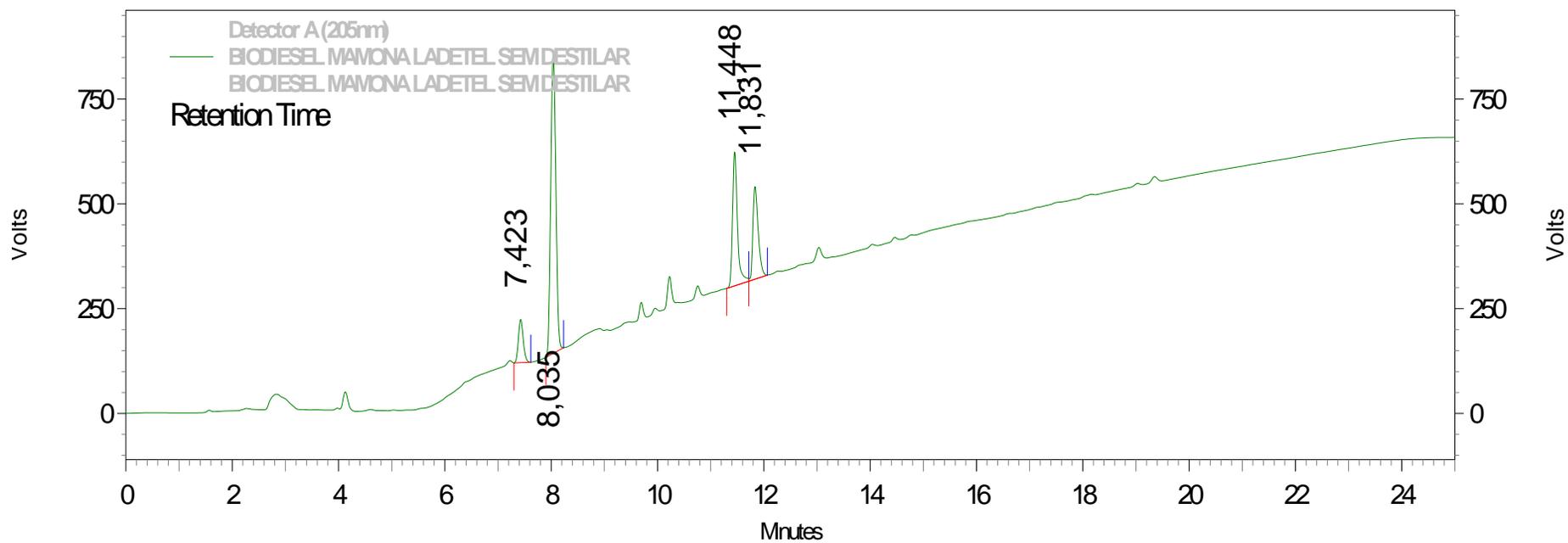
(4) Linolenato de etila – espectro de massas pico # 8 e 9

Hit#:2 Entry:217299 Library:WILEY7.LIB
SI:91 Formula:C20 H34 O2 CAS:1191-41-9 MolWeight:306 RetIndex:0
CompName:9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)- (CAS) Ethyl linolenate \$\$ Linolenic acid ethyl ester \$\$ Linolenic aci



ANEXO II

Perfil Cromatográfico de biodiesel de mamona- CLAE



Pico #1- Oleato de etila- $t_r=7,423$ minutos

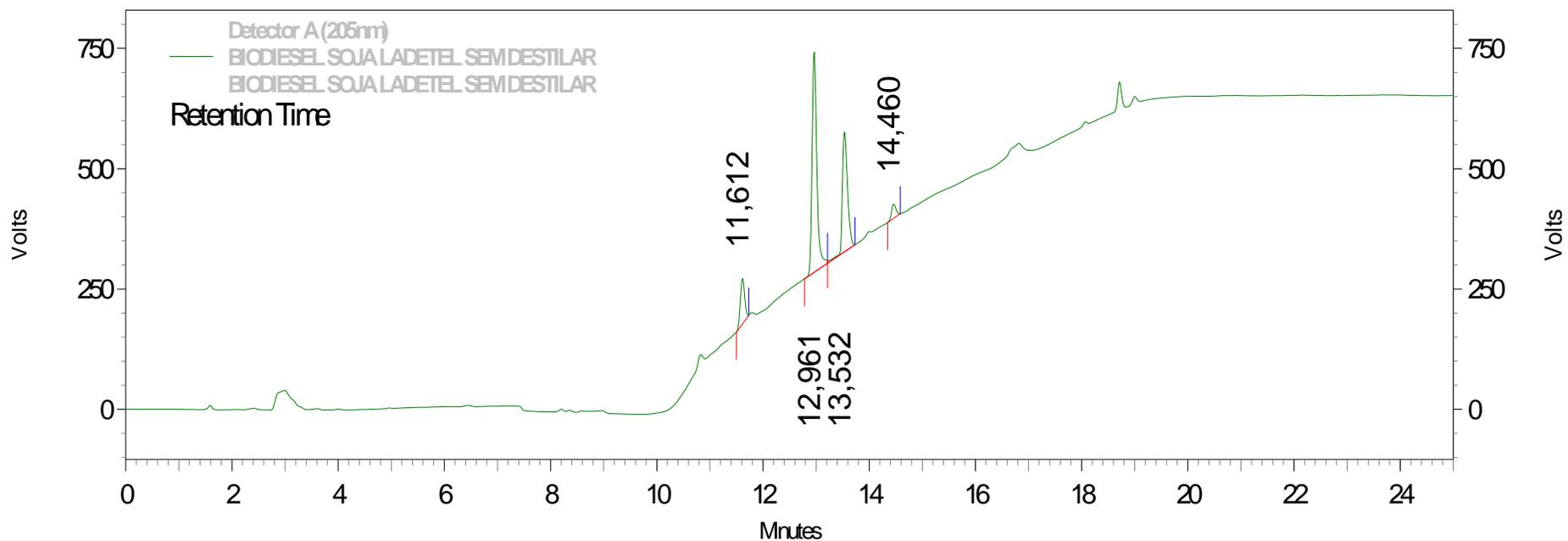
Pico # 2- Ricinoleato de etila - $t_r=8,035$ minutos

Pico # 3- Linoleato de etila - $t_r=11,448$ minutos

Pico # 4- Tricaprilina (padrão interno) - $t_r=11,831$ minutos

ANEXO III

Perfil Cromatográfico biodiesel de soja - CLAE



Pico #1- Oleato de etila- $t_r= 11,612$ minutos

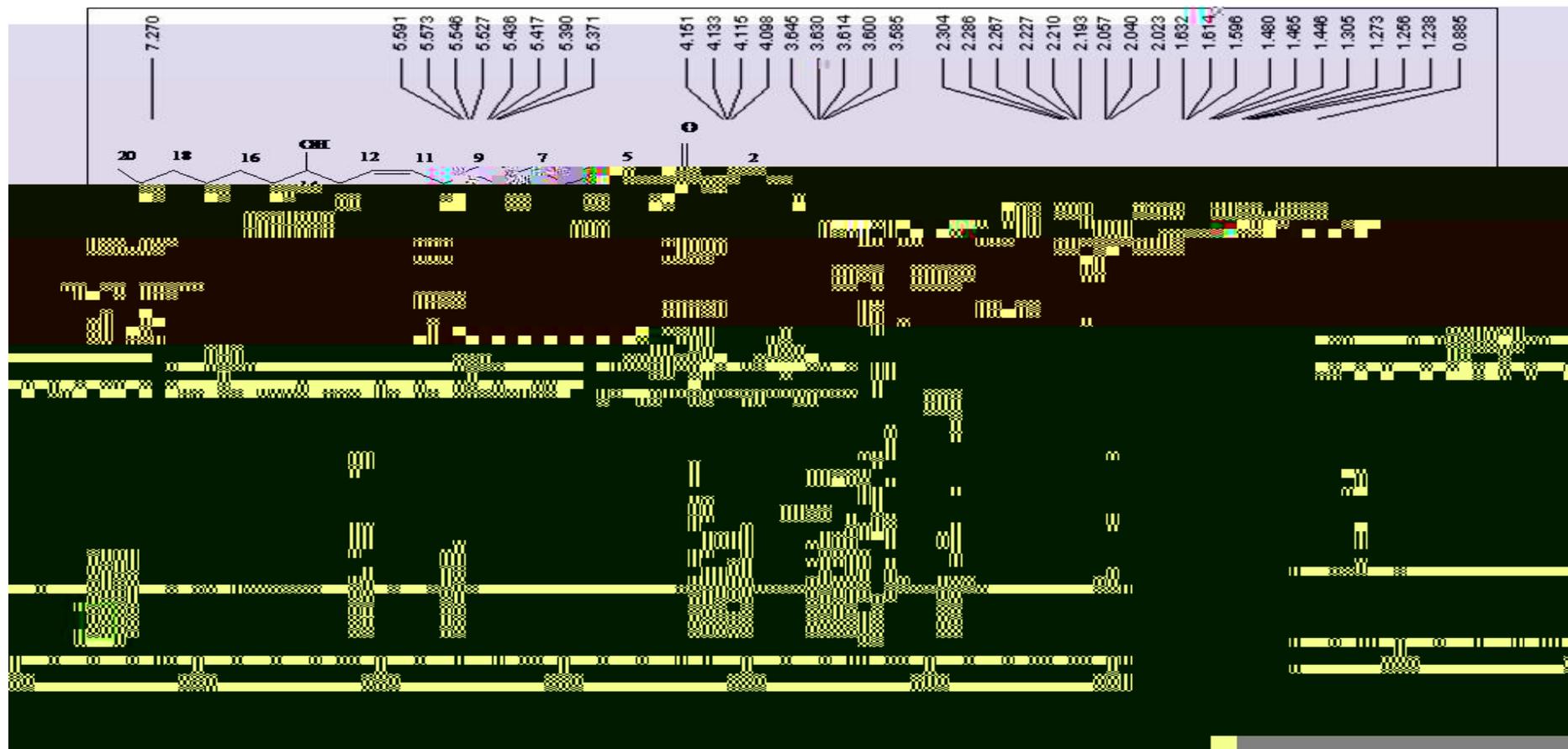
Pico # 2- Linoleato de etila - $t_r= 12,961$ minutos

Pico # 3- Tricaprilina (padrão interno) - $t_r= 13,532$ minutos

Pico # 4- Palmitato de etila - $t_r= 14, 460$ minutos

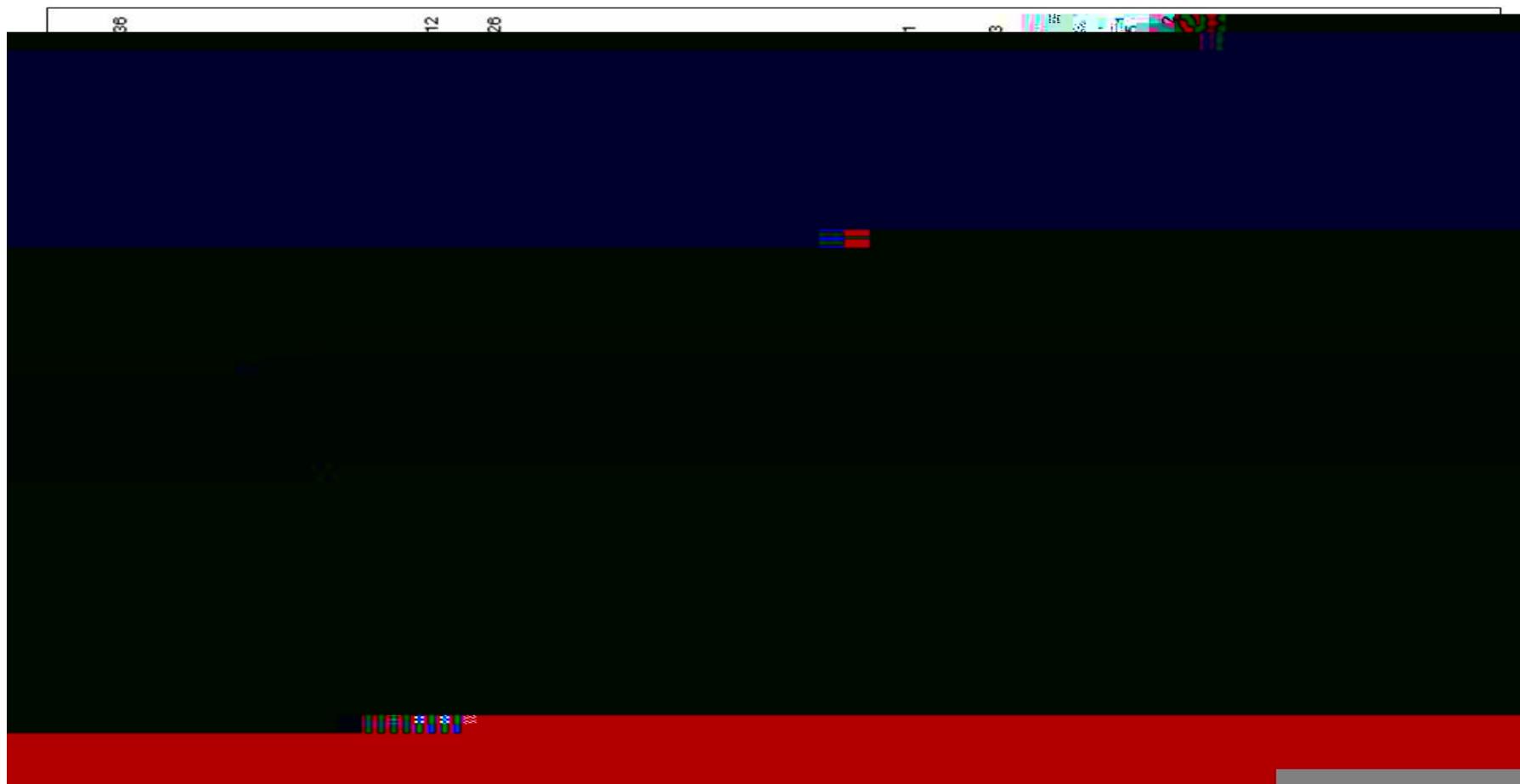
ANEXO IV-a

RMN ^1H – Ricinoleato de etila



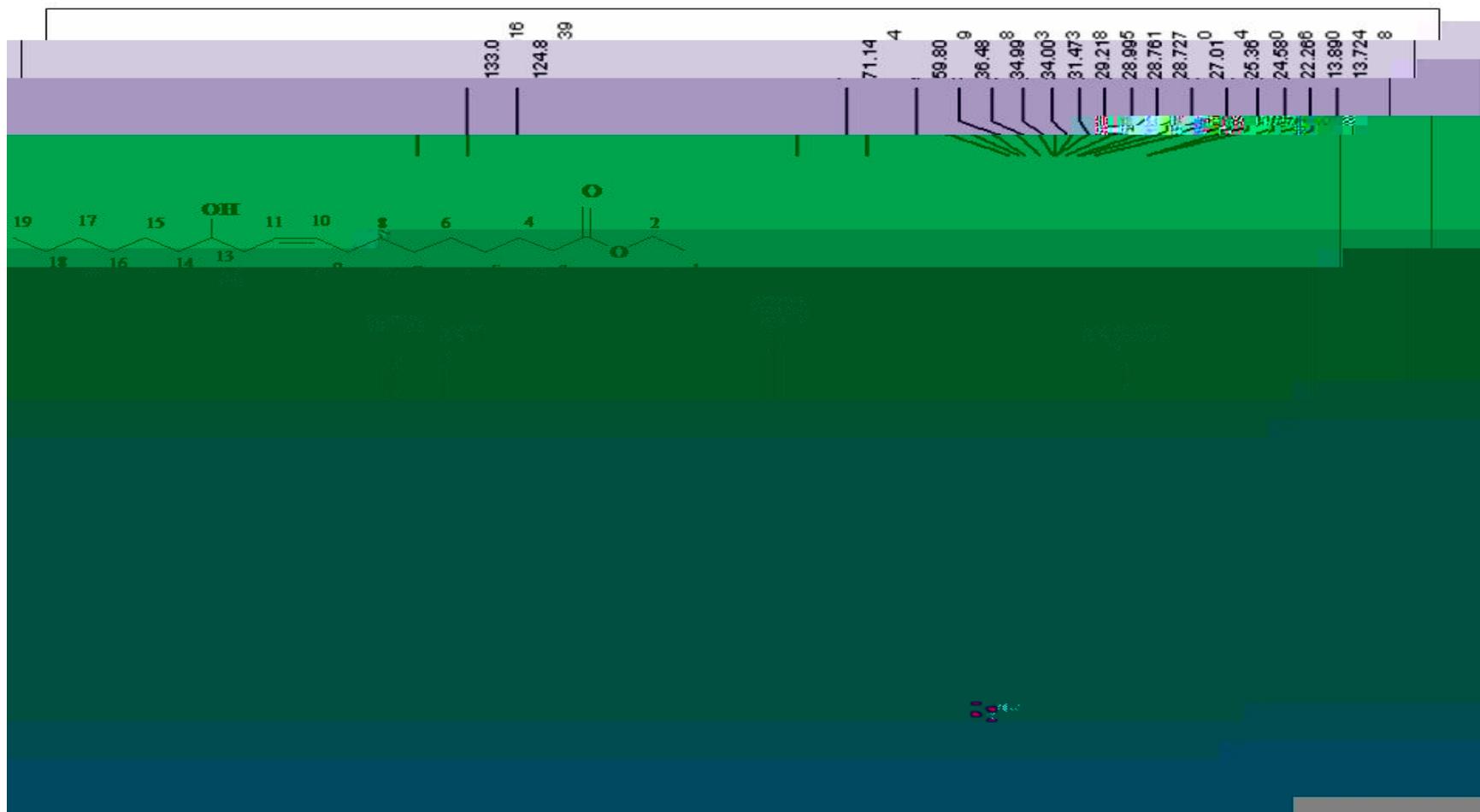
ANEXO IV-b

RMN ^{13}C – Ricinoleato de etila



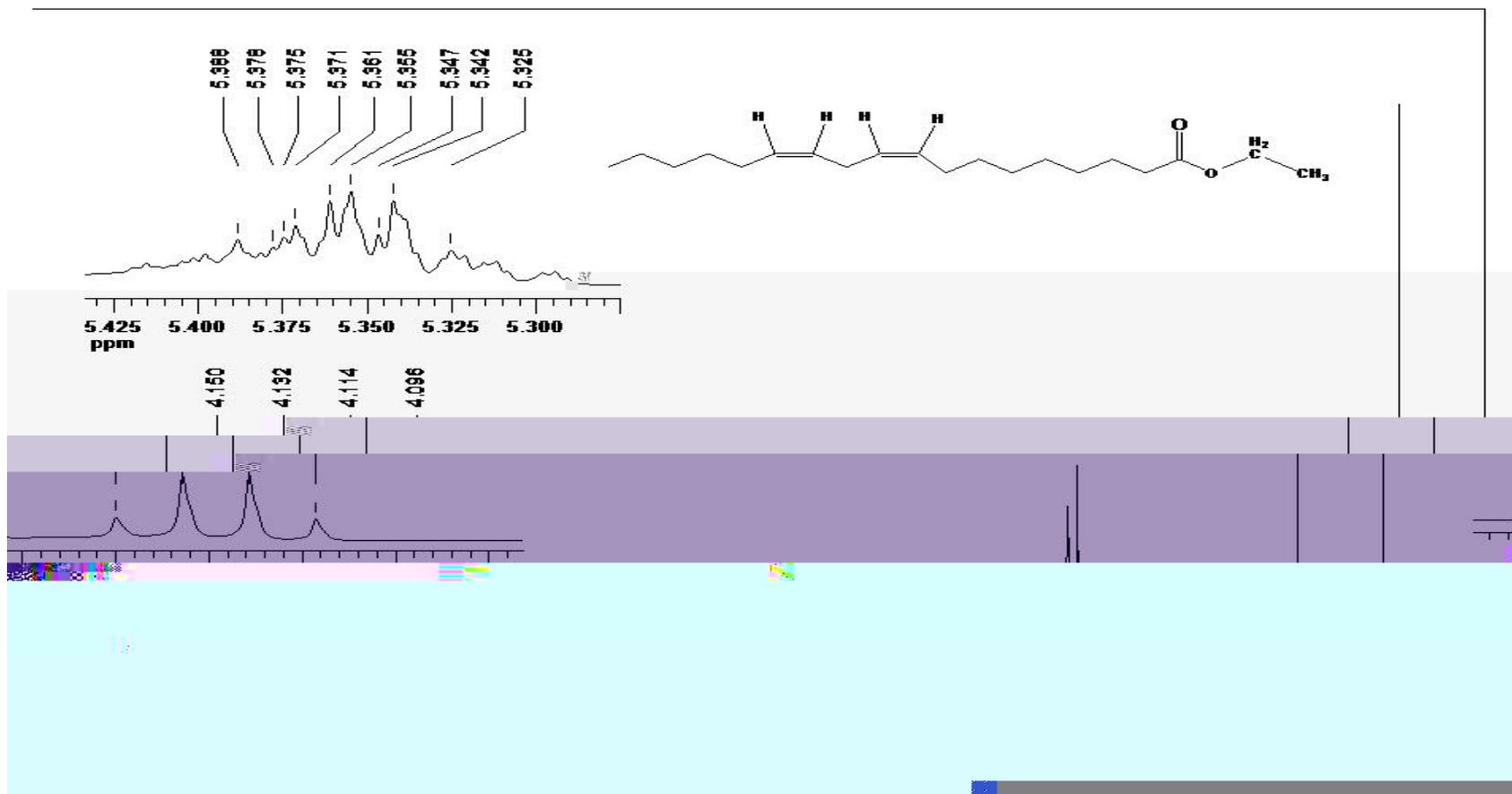
ANEXO IV- c

RMN ¹³C- Ricinoleato de etila



ANEXO V

RMN ^1H – Linoleato de etila



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)