



**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**Dissertação de Mestrado**

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA DO  
ÓLEO DE BABAÇU COM ÁLCOOIS DE CADEIA CURTA**

**DANIELE URIOSTE**

**Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro**

**Lorena**

**Dezembro - 2004**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA DO  
ÓLEO DE BABAÇU COM ÁLCOOIS DE CADEIA CURTA**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Heizir Ferreira de Castro  
Presidente da Banca Examinadora

Lorena – SP

2004

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR CATÁLISE ENZIMÁTICA DO  
ÓLEO DE BABAÇU COM ÁLCOOIS DE CADEIA CURTA**

Dissertação de Mestrado apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

**Banca examinadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Heizir Ferreira de Castro (Presidente)  
Prof. Dr. Everson Alves Miranda  
Prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira

**Estudante:**

Daniele Urioste

Lorena – SP

2004

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Biblioteca Universitária - FAENQUIL

Ur3p Urioste, Daniele  
Produção de biodiesel por catálise enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta/Daniele Urioste. – Lorena, 2004.  
107f.: il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Departamento de Engenharia Química.  
Orientadora: Heizir Ferreira de Castro

1. Hidrolases 2. Lipase 3. Óleo de babaçu 4. Biodiesel 5.  
Interesterificação I. Castro, Heizir Ferreira de., Orient. II. Título.

CDU 577.152.3

## AGRADECIMENTOS

A Profª. Heizir Ferreira de Castro pela oportunidade, dedicação, paciência, ensinamentos e excelente orientação que me servirá como alicerce para meu futuro profissional.

A minha mãe Romana e às minhas irmãs, Christianne, Luciane e Marcia, pela compreensão, apoio e carinho.

Ao Claudio pelo amor, carinho, incentivo, e principalmente pela paciência nas horas mais difíceis.

Ao Prof. Paulo A. Suzuki pela amizade, estímulo e paciência.

Ao Prof. Francisco C. Biaggio (DEQUI) por permitir o uso do Laboratório de Química Orgânica nas sínteses dos padrões cromatográficos.

A Profª Jayne C. de Souza Barbosa (DEQUI) pela paciência, dedicação e presteza na realização das análises no RMN <sup>1</sup>H.

A Profª Maria Eleonora de Carvalho (DEBIQ) pela participação no meu Exame de Qualificação e sugestões contribuídas para o melhoramento da minha Dissertação de Mestrado.

Aos colegas Adriano, Michele, Fabrício, Bruno, Tânia, Larissa, Grazi, Camila e Flávia pela amizade e pela ótima convivência no Laboratório de Biocatálise.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

Produção de Biodiesel por Catálise Enzimática do Óleo de Babaçu com Álcoois de Cadeia Curta. Daniele Urioste. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Departamento de Engenharia Química. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Orientadora: Dra. Heizir Ferreira de Castro (Departamento de Engenharia Química, FAENQUIL, CP 116, 12.600-970, Lorena, SP, Brasil). Banca examinadora: Dr. Everson Alves Miranda e Dr. Pedro Carlos de Oliveira, Dezembro 2004.

O presente trabalho visou o desenvolvimento de um processo para modificação do óleo de babaçu por catálise enzimática. O produto a ser obtido, biodiesel, apresenta um potencial promissor como combustível, pela sua enorme contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental e como fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel e outros derivados do petróleo. A enzima indicada para esse tipo de processo – lipase (EC 3.1.1.3) foi usada na forma imobilizada e os ensaios foram realizados utilizando óleo de babaçu e álcoois de cadeia curta (C 2 a C4) em meio isento de solventes.

O trabalho experimental foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira, foram sintetizados os padrões cromatográficos (ésteres de ácidos graxos) por via química para estabelecimento de métodos cromatográficos permitindo a quantificação dos ésteres obtidos com precisão e rapidez. Os monoésteres foram purificados por destilação a pressão reduzida e caracterizados por análise de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN <sup>1</sup>H), a fim de se comprovar suas estruturas químicas. Para verificar a eficiência dos métodos para monitoramento da reação, foram efetuadas interesterificação por via química do óleo de babaçu com diferentes álcoois (C2 a C4) empregando NaOH como catalisador. Os dados obtidos foram também usados como parâmetro de comparação da reação efetuada por via enzimática.

Numa segunda etapa foram realizados testes comparativos empregando cinco preparações de lipase na forma imobilizada como catalisadores na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta (C2 a C4) em meio isento de solventes, com o objetivo de determinar o perfil do comportamento de cada sistema reacional, bem como selecionar o derivado imobilizado que fornecesse maior conversão em monoésteres de ácidos graxos (biodiesel).

Entre essas preparações, Lipozyme IM<sup>20</sup> e Novozym 435 foram utilizadas como parâmetro referencial para os outros sistemas imobilizados testados, por se tratar de preparações amplamente descritas na literatura, incluindo comportamento e desempenho em diversas modificações de óleos e gorduras, principalmente no que se refere a modificações visando à obtenção de biodiesel. As outras preparações testadas foram obtidas experimentalmente de acordo com metodologias anteriormente estabelecidas no Laboratório de Biocatálise da Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Duas matrizes não comerciais com propriedades distintas (polisiloxano-álcool polivinílico e óxido de nióbio) foram selecionadas para imobilizar a lipase de pâncreas de porco (LPP) e a lipase microbiana de *Candida rugosa* (LCR). A literatura não apresenta nenhum estudo sobre o comportamento desses derivados imobilizados sendo de grande interesse o desenvolvimento de novos sistemas imobilizados para aplicação na produção de biodiesel.

Com exceção da lipase de *Candida rugosa*, todas as preparações de lipase imobilizadas mostraram-se eficazes na interesterificação enzimática do óleo de babaçu

com diferentes álcoois, alcançando concentrações satisfatórias de monoésteres de ácidos graxos (biodiesel).

O melhor desempenho foi obtido pela Novozym 435 com rendimentos superiores a 50% e tempo de reação de 24h, para todos álcoois testados.

A Lipozyme IM<sup>20</sup> e lipase pancreática imobilizada em polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) tiveram desempenhos similares com rendimentos globais na faixa de 30-48,5%, dependendo do sistema óleo: álcool. Os rendimentos mais elevados foram obtidos para o sistema contendo óleo: butanol.

A lipase de *Candida rugosa* não foi eficiente na interesterificação do óleo de babaçu para os sistemas óleo: etanol e óleo: propanol, alcançando rendimentos globais de 2 e 18%, respectivamente. Rendimentos superiores foram obtidos para o sistema óleo: butanol (38-39%).

Apesar da rota enzimática ter fornecido um desempenho menor que a rota química, rendimentos globais superiores poderão ser alcançados pela otimização dos parâmetros que afetam a reação de interesterificação do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta. Para alcançar esse propósito é recomendado que os estudos posteriores sejam realizados com a preparação de lipase pancreática imobilizada em polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA), por ter apresentado um desempenho similar ao alcançado pela Lipozyme e menor custo, o que é essencial para esse tipo de processo.

## ABSTRACT

The present work aims to study the process for the modification of babassu oil through enzymatic catalysis. The obtained product (biodiesel) shows a great potential as fuel, for its huge contribution to the environment due to the qualitative and quantitative reduction of the emissions levels and for its usage as strategic renewable energy source in substitution of the diesel itself and others petrol like fuels. The designated enzyme for this kind of process – lipase (EC 3.1.1.3) was used in immobilized form and the experiments were carried out using babassu oil and short chain alcohols (C2 to C4) in a free solvent medium.

The experimental work was developed in two steps. In the first, several alkyl esters were synthesized by chemical route, purified, characterized through Resonance Magnetic Proton (RMN  $^1\text{H}$ ) and used as standards for setting up chromatographic methods to monitor the reaction products. The established methods allowed easier and faster quantification of the alkyl esters formed. The efficiency of the chromatographic methods was checked through chemical interesterification of the babassu oil with different alcohol (C2 to C4) using NaOH as catalyst. The data obtained was also used to compare the enzymatic reaction performance.

In the second step, enzymatic interesterification reactions of the babassu oil with short chain alcohols (C2 to C4) in a free solvent medium were carried out using five preparations of immobilized lipase. The main goal was to determine the behavior of each reaction system as well as to select the most efficient immobilized preparation to yield high conversion of oil into fatty acid esters (biodiesel).

Among the immobilized lipase preparations Lipozyme IM<sup>20</sup> and Novozym 435 were used as comparative parameter for the other immobilized systems since the performance of these preparations are well documented, including their behavior and performance in many oil and fat modification, particularly for the biodiesel production.

The others preparations tested were obtained experimentally according to the procedure previously established at the Laboratory of Biocatalysis – Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Two non-commercially available matrices with different properties (polysiloxane-polyvinyl alcohol particles and niobium oxide) were selected for immobilizing porcine pancreas lipase (PPL) and the microbial lipase from *Candida rugosa* (LCR). Besides having low cost, no studies work has been reported before regarding the use of such preparations for biodiesel production.

With the exception to the lipase from *Candida rugosa*, all others immobilized lipase preparations have shown to be efficient in the enzymatic interesterification of the babassu oil with different alcohol, attaining satisfactory concentrations of alkyl fatty acid esters (biodiesel).

The best performance was obtained by the Novozym 435 and yields higher than 50% after 24h reaction were attained for all tested alcohols. The Lipozyme IM<sup>20</sup> and porcine pancreas lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol particles had similar performance with global yield of 30-48.5%, depending on the oil-alcohol system. For both preparations the reaction system consisting of oil and propanol or butanol was found not to suitable for maintaining the enzyme activity.

On the other hand, the reaction system consisting of oil and ethanol or propanol strong affected the activity of the *Candida rugosa* lipase immobilized either on polysiloxane-polyvinyl alcohol particles or niobium oxide, and consequently low product yields in the range of 2 to 18% were attained. For this lipase, independent on the support used the only feasible reaction system was found to be oil and butanol, but still overall reaction yields were lower than 40%.

Although the enzymatic route showed lower performance in comparison to the chemical route, better overall reaction yields should be achieved by optimizing the parameters that affects the interesterification reaction of babassu oil with short chain alcohols. To achieve this it is recommended that further study should be carried out with the preparation of porcine pancreas lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol that besides showing similar performance as Lipozyme has lower cost, which is essential for this kind of process.

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>NOMENCLATURA .....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1. Fontes Renováveis de Energia .....	4
2.2. Biodiesel.....	6
2.3. Características Básicas de um Combustível para Motores Diesel.....	9
2.3.1. Propriedades Físicas do Biodiesel.....	10
2.3.2. Propriedades Químicas do Biodiesel.....	11
2.4. Matérias-Primas para a Produção de Biodiesel.....	12
2.5. Produção de Biodiesel.....	15
2.5.1. Pirólise.....	16
2.5.2. Microemulsificação .....	16
2.5.3. Interesterificação .....	17
2.6. Cinética das Reações de Interesterificação.....	19
2.6.1. Efeito da Relação Molar entre os Reagentes na Cinética das Reações de Interesterificação .....	19
2.6.2. Efeito do Catalisador na Cinética das Reações de Interesterificação...	20
2.7. Outros Processos de Interesterificação .....	21
2.7.1. Processo de Interesterificação Catalisada por Ácidos <i>in situ</i> .....	21
2.7.2. Interesterificação utilizando Fluidos Supercríticos.....	22
2.8. Comparação da Interesterificação Alcalina e Enzimática .....	22
2.9. Processos de Obtenção de Biodiesel por via Enzimática .....	24
2.10. Etapas do Processo de Obtenção de Biodiesel por Interesterificação .....	30
2.10.1. Métodos de Detecção da Reação .....	33
2.11. Enzimas .....	33
2.11.1. Lipases.....	34
2.11.2. Mecanismo de Ação das Lipases .....	35
2.11.3. Reações Catalisadas por Lipases.....	38
2.11.4. Especificidade .....	39
2.11.5. Uso de Lipases Imobilizadas em Meio não Aquoso .....	39
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
3.1. Materiais .....	43
3.1.1. Enzimas .....	43
3.1.2. Óleo Vegetal.....	44
3.1.3. Reagentes Analíticos.....	45
3.1.4. Equipamentos.....	45
3.2. Metodologia Experimental.....	45
3.2.1. Síntese Química dos Monoésteres de Alquila (Padrões Cromatográficos) empregando Cloreto de Acila de Ácido Carboxílico e SOCl <sub>2</sub> .....	45

3.2.2. Estabelecimento do Método Cromatográfico para Dosagem do Biodiesel.....	47
3.2.3. Reações de Interesterificação por Via Química .....	48
3.2.4. Reações de Interesterificação por Via Enzimática .....	48
3.3. Métodos Analíticos.....	49
3.3.1. Caracterização do Óleo de Babaçu.....	49
3.3.1.1. Índice de Acidez.....	49
3.3.1.2. Índice de Saponificação .....	49
3.3.1.3. Porcentagem de Ácidos Graxos Livres .....	50
3.3.1.4. Concentração de Glicerol Livre .....	50
3.3.1.5. Massa Específica.....	51
3.3.2. Caracterização dos Monoésteres de Ácidos Graxos por RMN <sup>1</sup> H.....	51
3.3.3. Determinação dos Produtos Formados e Álcool Consumido.....	51
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
4.1. Caracterização do Óleo de Babaçu.....	54
4.2. Padrões Cromatográficos de Monoésteres de Ácidos Graxos.....	54
4.2.1. Síntese Química dos Padrões Cromatográficos .....	54
4.2.2. Caracterização dos Monoésteres por RMN <sup>1</sup> H (CDC <sub>3</sub> , δ, 300Hz) .....	55
4.2.3. Eficiência dos Métodos Cromatográficos Estabelecidos para Monitoramento da Reação de Interesterificação do Óleo de Babaçu com Álcoois de Curta.....	58
4.3. Interesterificação Enzimática do Óleo de Babaçu com Álcoois empregando Diferentes Preparações de Lipase .....	63
4.3.1. Atuação da Lipozyme IM <sup>20</sup> na Obtenção de Biodiesel.....	63
4.3.2. Atuação da Novozym 435 na Obtenção de Biodiesel.....	66
4.3.3. Atuação da Lipase Pancreática Imobilizada em POS-PVA na Obtenção de Biodiesel .....	68
4.3.4. Atuação da Lipase Microbiana de <i>Candida rugosa</i> (LCR) Imobilizada em POS-PVA e em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .nH <sub>2</sub> O na Obtenção de Biodiesel.....	70
4.4. Comparação do Desempenho dos Sistemas Imobilizados na Reação de Interesterificação Enzimática .....	75
4.5. Comparação do Rendimento na Interesterificação Enzimática e Química ....	76
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>81</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>
<b>8. APÊNDICES.. .....</b>	<b>91</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b>	Características de alguns óleos vegetais e do óleo diesel.....	8
<b>Tabela 2.2.</b>	Composição em porcentual de ácidos graxos em diferentes óleos vegetais e estrutura química dos ácidos graxos mais comuns.....	12
<b>Tabela 2.3.</b>	Constituintes do coco de babaçu, características e aplicações.....	13
<b>Tabela 2.4.</b>	Comparação entre catálise alcalina e catálise enzimática para a produção de biodiesel.....	23
<b>Tabela 2.5.</b>	Produção de biodiesel por biocatálise.....	25
<b>Tabela 2.6.</b>	Cotação de preparações de lipase imobilizada em diferentes suportes.....	39
<b>Tabela 2.7.</b>	Avaliação econômica do procedimento de imobilização da lipase de <i>Candida rugosa</i> em óxido de nióbio.....	41
<b>Tabela 2.8.</b>	Avaliação econômica do procedimento de imobilização da lipase pancreática e <i>Candida rugosa</i> em polisiloxano-álcool polivinílico.....	41
<b>Tabela 3.1.</b>	Atividade enzimática (U/mg de suporte) das preparações de lipase imobilizadas utilizadas no desenvolvimento do trabalho experimental.....	43
<b>Tabela 3.2.</b>	Condições de operação do cromatógrafo para os métodos de dosagem dos monoésteres.....	47
<b>Tabela 3.3.</b>	Determinação dos tempos de retenção para cada composto contido nas amostras padrões de mistura de monoésteres.....	47
<b>Tabela 3.4.</b>	Condições de operação do método de dosagem dos álcoois etanol, propanol e butanol por cromatografia fase gasosa.....	51
<b>Tabela 4.1.</b>	Disposição geral dos ensaios realizados.....	52
<b>Tabela 4.2.</b>	Caracterização do óleo de babaçu.....	53
<b>Tabela 4.3.</b>	Relação dos monoésteres sintetizados por via química.....	54
<b>Tabela 4.4.</b>	Análise dos espectros obtidos para os monoésteres de etila.....	55
<b>Tabela 4.5.</b>	Análise dos espectros obtidos para os monoésteres de propila.....	56
<b>Tabela 4.6.</b>	Análise dos espectros obtidos para os monoésteres de butila.....	56
<b>Tabela 4.7.</b>	Rendimento da interesterificação química do óleo de babaçu com diferentes álcoois.....	62

<b>Tabela 4.8.</b>	Rendimento da interesterificação enzimática do óleo de babaçu com diferentes álcoois empregando Lipozyme IM <sup>20</sup> .....	65
<b>Tabela 4.9.</b>	Rendimento da interesterificação enzimática do óleo de babaçu com diferentes álcoois empregando Novozym 435.....	67
<b>Tabela 4.10.</b>	Rendimento da interesterificação enzimática do óleo de babaçu com diferentes álcoois empregando lipase pancreática imobilizada em POS-PVA.....	69
<b>Tabela 4.11.</b>	Rendimento da reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com diferentes álcoois empregando LCR imobilizada em POS-PVA.....	72
<b>Tabela 4.12.</b>	Rendimento da reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com diferentes álcoois empregando LCR imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .nH <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .....	72
<b>Tabela 4.13.</b>	Comparação do desempenho das preparações de lipase imobilizada na formação de monoésteres de etila.....	74
<b>Tabela 4.14.</b>	Comparação do desempenho das preparações de lipase imobilizada na formação de monoésteres de propila.....	74
<b>Tabela 4.15.</b>	Comparação do desempenho das preparações de lipase imobilizada na formação de monoésteres de butila.....	75
<b>Tabela 4.16.</b>	Rendimento global da reação para formação de monoésteres de butila.....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b>	Produtos da indústria oleoquímica.....	5
<b>Figura 2.2.</b>	Estrutura de uma molécula de triglicerídeo.....	12
<b>Figura 2.3.</b>	Efeito da interesterificação nos óleos vegetais.....	18
<b>Figura 2.4.</b>	Interesterificação de triglicerídeos com álcool. (a) Equação geral; (b) Três reações consecutivas e reversíveis. R1, R2, R3 e R', representam os grupos alquila.....	20
<b>Figura 2.5.</b>	Fluxograma do processo de produção de biodiesel.....	32
<b>Figura 2.6.</b>	Mecanismo catalítico de lipases baseado na “tríade catalítica” de serina (nucleófilo), histidina e apartato ou glutamato.....	37
<b>Figura 2.7.</b>	Reações catalisadas por lipases.....	38
<b>Figura 3.1.</b>	Ilustração dos sistemas imobilizados: (a) Lipozyme IM <sup>20</sup> ; (b) Novozym 453; (c) LPP imobilizada em POS-PVA; (d) LCR imobilizada em POS-PVA; (e) LCR imobilizada em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .....	44
<b>Figura 3.2.</b>	Fluxograma do procedimento experimental adotado nas sínteses dos ésteres etílicos, propílicos e butílicos.....	46
<b>Figura 4.1.</b>	Espectro de RMN H <sup>1</sup> (4,50 – 0,50 ppm) do éster octanoato de etila obtido a 300 Hz com CDCl <sub>3</sub> .....	56
<b>Figura 4.2.</b>	Espectro de RMN H <sup>1</sup> (4,50 – 0,50 ppm) do éster octanoato de propila obtido a 300 Hz com CDCl <sub>3</sub> .....	57
<b>Figura 4.3.</b>	Espectro de RMN H <sup>1</sup> (4,50 – 0,50 ppm) do éster octanoato de butila obtido a 300 Hz com CDCl <sub>3</sub> .....	57
<b>Figura 4.4.</b>	Monitoramento da formação de monoésteres de etila na interesterificação química do óleo de babaçu com etanol (78°C, 0,16 g NaOH).....	59
<b>Figura 4.5.</b>	Monitoramento da formação de monoésteres de propila na interesterificação química do óleo de babaçu com propanol (97°C, 0,22 g de NaOH).....	60
<b>Figura 4.6.</b>	Monitoramento da formação de monoésteres de butila na interesterificação química do óleo de babaçu com butanol (117°C, 0,30 g de Na OH).....	61

- Figura 4.7.** Formação dos ésteres de etila (A), propila (B) e butila (C) na interesterificação química do óleo de babaçu com etanol (0,16 g de NaOH, 78°C), propanol (0,22 g de NaOH, 97°C) e butanol (0,30 g de NaOH, 117°C). Símbolos: □ (C8), ○ (C10), ▼(C12), ▲ (C14), ◇ (C16), ■ (C18), ● (C18:1).....62
- Figura 4.8.** Formação dos monoésteres de etila na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol (Lipozyme, 40°C).....64
- Figura 4.9.** Formação dos monoésteres de propila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol (Lipozyme, 40°C).....64
- Figura 4.10.** Formação dos monoésteres de butila na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol (Lipozyme, 50°C).....64
- Figura 4.11.** Consumo dos álcoois na interesterificação enzimática do óleo de babaçu empregando Lipozyme IM<sup>20</sup> (40-50°C).....64
- Figura 4.12.** Formação dos monoésteres de etila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol (Novozym 435, 40°C).....67
- Figura 4.13.** Formação dos monoésteres de propila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol (Novozym 435, 40°C)...67
- Figura 4.14.** Formação dos monoésteres de butila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol (Novozym 435, 50°C).....67
- Figura 4.15.** Consumo dos álcoois na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu empregando Novozym 435 (40-50°C).....67
- Figura 4.16.** Formação dos monoésteres de etila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol (LPP-POS.PVA, 40°C).....69
- Figura 4.17.** Formação dos monoésteres de propila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol (LPP-POS.PVA, 40°C).....69
- Figura 4.18.** Formação dos monoésteres de butila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol (LPP-POS.PVA, 50°C).....69
- Figura 4.19.** Consumo dos álcoois na interesterificação enzimática do óleo de babaçu empregando LPP imobilizada em POS-PVA (40-50°C).....69
- Figura 4.20.** Formação dos ésteres de etila (A), propila (B) e butila (C) na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol (40 °C), propanol (40°C) e butanol (50°C) empregando LCR-POS.PVA. Símbolos: □ (C8), ○ (C10), ▼(C12), ▲ (C14), ◇ (C16), ■ (C18), ● (C18:1).....71

- Figura 4.21.** Formação dos monoésteres de propila na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol (LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O a 40°C).....72
- Figura 4.22.** Formação dos monoésteres de butila na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol (LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O, 50°C).....72
- Figura 4.23.** Consumo do álcool na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol empregando LCR-POS.PVA (40-50°C).....72
- Figura 4.24.** Consumo de álcool na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol empregando LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O (40-50°C).....72
- Figura 4.25.** Comparação do desempenho das lipases imobilizadas na formação dos monoésteres de etila, propila e butila, a partir do óleo de babaçu..... 76
- Figura 4.26.** Comparação do rendimento global da reação de interesterificação enzimática e química.....78

**NOMENCLATURA**

<b>EtOH:</b>	Etanol
<b>PrOH:</b>	Propanol
<b>ButOH:</b>	Butanol
<b>BB:</b>	Butirato de Butila
<b>Y (%):</b>	Rendimento global da reação de interesterificação
<b>LPP-POS-PVA:</b>	Lipase Pancreática imobilizada em polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA)
<b>LCR-POS-PVA:</b>	Lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA)
<b>LCR- Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. nH<sub>2</sub>O:</b>	Lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em óxido de nióbio hidratado
<b>RMN <sup>1</sup>H:</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
<b>PI:</b>	Padrão interno

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de óleos vegetais em motores de combustão interna remonta ao início da operação satisfatória do próprio motor diesel, em fins do século XIX. Rudolf Diesel projetou em 1896 seu primeiro motor, com eficiência da ordem de 26%; testou-o com petróleo, álcool e, em 1900, com óleos vegetais. Razões de natureza econômica, principalmente o maior custo e menor disponibilidade frente aos derivados de petróleo, levaram ao completo abandono dos óleos vegetais como combustíveis (SCHUCHARDT *et al.*, 1998; COSTA NETO, 2002).

Embora os custos de obtenção dos óleos vegetais tenham desaconselhado o emprego desses combustíveis em motores de combustão interna no Brasil em 1980 (PETROBRÁS/ CENPES, 1980), alguns trabalhos demonstraram a viabilidade de se explorar a utilização desses óleos para produção de eletricidade em regiões distantes dos grandes centros populacionais (MOLION, 1994; DI LASCIO *et al.*, 1994).

A diferença de propriedades entre o diesel e os óleos vegetais resulta principalmente da diversidade química entre essas duas substâncias. O diesel é constituído de hidrocarbonetos com número médio de carbonos em torno de 14. Os óleos vegetais são triésteres de glicerina, ou seja, produtos naturais da condensação da glicerina com ácidos graxos, cujas cadeias laterais têm números de carbonos variando entre 10 e 18, com valor médio de 14, para os tipos de óleos mais abundantes. Além da presença do grupamento funcional do tipo éster, os óleos vegetais possuem massa molecular cerca de três vezes maior que o diesel, dependendo da espécie de oleaginosa (COSTA NETO, 2002).

Para reduzir a elevada viscosidade dos óleos vegetais, diferentes alternativas têm sido consideradas, tais como: pirólise, micro-emulsificação e a interesterificação. Entre essas, a interesterificação é considerada como a melhor escolha, particularmente com monoálcoois (alcoólise), especificamente metanol ou etanol, promovendo a quebra das moléculas de triglicérides e gerando uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos correspondentes. A glicerina é obtida como subproduto. A massa molecular desses monoésteres é próxima a do diesel. Os ésteres de ácidos graxos obtidos são conhecidos como biodiesel e apresentam características físico-químicas semelhantes às do óleo diesel, podendo ser utilizados em motores do ciclo diesel sem nenhuma modificação (SCHUCHARDT *et al.*, 1998; COSTA NETO, 2002).

A interesterificação de óleos e gorduras pelo processo químico, embora seja

simples, rápida e com alto rendimento, apresenta algumas desvantagens. A primeira refere-se ao catalisador (ácido ou base), que, ao final do processo, permanece misturado com o principal subproduto da reação, a glicerina, dificultando sua separação e purificação. Essas dificuldades podem ser minimizadas por meio da adoção de um processo enzimático, possibilitando a obtenção tanto do biodiesel como glicerina, com maior grau de pureza e ainda permitindo a reutilização do biocatalisador imobilizado. Uma segunda desvantagem do processo químico está relacionada com o tipo de álcool utilizado, o metanol. Neste caso, a alcoólise enzimática com o etanol apresenta diversas vantagens em relação ao metanol, tais como custo e toxicidade. Além disso, o etanol é um produto obtido a partir de biomassas e, dessa maneira, o processo se torna totalmente independente do petróleo.

Embora, atualmente, a interesterificação enzimática não possa competir com a rota química, poderia, gradativamente, substituí-la devido ao crescente interesse pela utilização desse biocombustível, no contexto atual. Desta forma, diversos resultados têm sido reportados em artigos e patentes. O aspecto comum desses estudos consiste na otimização das condições de reação (solvente, temperatura, pH, enzima, entre outros), visando estabelecer as características operacionais para aplicações industriais.

Para que a interesterificação enzimática possa competir com a produção química de biodiesel, alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados. A imobilização da lipase, por exemplo, é um fator limitante na economicidade do processo. As lipases, devido à sua natureza protéica, podem sofrer ao longo de uma reação um processo de desnaturação com perda progressiva da atividade funcional. Por meio da imobilização em suportes sólidos, entretanto, pode ocorrer um aumento na estabilidade do catalisador, prolongando sua vida útil. A imobilização facilita a recuperação da enzima do meio reacional, possibilitando sua posterior reutilização (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Considerando o crescimento da utilização do biodiesel em âmbito mundial, não somente pelo aspecto de meio ambiente, mas, principalmente, por se tratar de uma fonte de energia renovável, a investigação do uso de lipases imobilizadas para produção de biodiesel é de relevante importância.

O desenvolvimento de sistemas imobilizados, particularmente da enzima lipase, em diferentes suportes orgânicos e inorgânicos para posterior utilização em reações de biocatálise em meios não convencionais, tem sido realizado no Laboratório de Biocatálise da Faculdade de Engenharia Química de Lorena (CASTRO *et al.*, 1999;

OLIVEIRA *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2002; BRUNO *et al.*, 2004; MIRANDA, 2004). As características satisfatórias desses biocatalisadores, principalmente em termos de estabilidade operacional, tornam atraentes, em termos econômicos a avaliação desses derivados para produção de energia alternativa.

O presente trabalho teve por objetivo estudar a reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta visando sua utilização como combustível alternativo ao diesel convencional, avaliando o desempenho de cinco preparações de lipase imobilizada em diferentes suportes. Entre essas preparações, Lipozyme IM<sup>20</sup> e Novozym 435 serviram de base para comparação com os outros sistemas imobilizados testados, por se tratar de preparações amplamente descritas na literatura, incluindo comportamento e desempenho em diversas modificações de óleos e gorduras, principalmente no que se refere a modificações visando à obtenção de biodiesel. As outras preparações testadas foram obtidas experimentalmente de acordo com metodologias anteriormente estabelecidas no Laboratório de Biocatálise da FAENQUIL. Duas matrizes não comerciais com propriedades distintas (polisiloxano-álcool polivinílico e óxido de nióbio) foram selecionadas para imobilizar a lipase de pâncreas de porco (LPP) e a lipase microbiana de *Candida rugosa* (LCR). A literatura não apresenta nenhum estudo sobre o comportamento desses derivados imobilizados, sendo de grande interesse o desenvolvimento de novos sistemas imobilizados para aplicação na produção de biodiesel.

O suporte polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) combina os atributos físico-químicos de materiais inorgânicos e orgânicos, permitindo a manipulação da hidrofiliabilidade e hidrofobicidade, carga iônica, capacidade tamponante, condutividade elétrica, porosidade, molhabilidade e propriedades mecânicas em geral, tornando essa matriz adequada tanto a lipase como para aplicação em meio orgânico.

A seleção do outro suporte de imobilização, óxido de nióbio hidratado, foi baseada nos resultados promissores obtidos por MIRANDA (2004), nos quais foi demonstrado que o derivado de lipase imobilizada nesse suporte apresenta características semelhantes ou melhores que aqueles obtidos com sílica de porosidade controlada. Este fato é bastante interessante sob o ponto de vista industrial, pois representa uma redução no custo de obtenção do biocatalisador, tendo em vista o elevado custo da sílica e seus derivados.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Nesta revisão bibliográfica será dado um enfoque nos principais temas relacionados com o trabalho desenvolvido, iniciando-se pela importância das fontes renováveis de energia para o meio ambiente, seguido de biodiesel, óleos vegetais usados como matéria-prima na produção de biodiesel, interesterificação química e enzimática, a utilização de lipases imobilizadas em meios não convencionais.

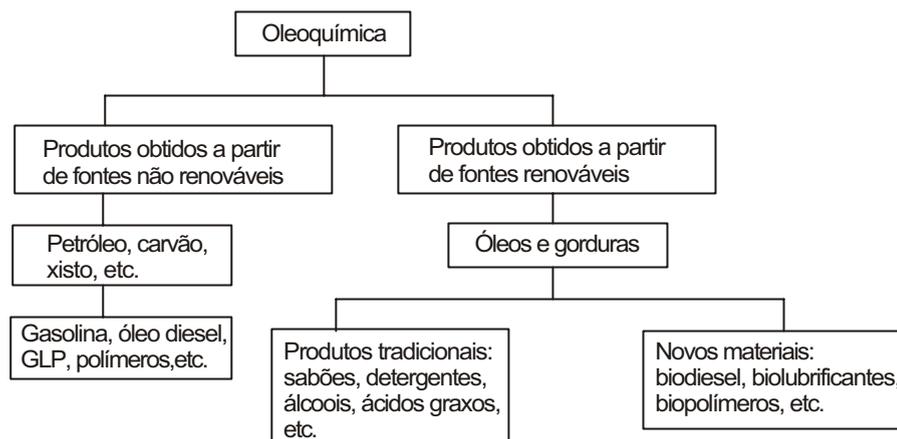
### **2.1. Fontes Renováveis de Energia**

O futuro do mundo depende das fontes renováveis de insumos energéticos e químicos, face às prioridades dadas atualmente ao petróleo, carvão e gás. Biomassa, gás natural, bagaço de cana-de-açúcar, álcool, eólica, radiação e o biodiesel são algumas das fontes de energia e produtos químicos mais limpos, que precisam ser mais bem utilizados para desenvolvimento com sustentabilidade (METZGER, 2001). O Brasil é um país rico em oleaginosas, porém restringe as suas culturas para fins alimentícios. Existe um grande potencial a ser explorado, tanto em relação ao aproveitamento das culturas temporárias e perenes como também a utilização de produtos residuais, tais como o óleo residual usado na fritura de alimentos.

A maior aplicação dos oleoquímicos sintéticos, provenientes de matérias-primas fósseis, é na obtenção de combustíveis (gasolina, óleo diesel, etc), entretanto, cerca de 10% são utilizados como matéria-prima para inúmeros processos industriais. A Figura 2.1 apresenta alguns dos diversos produtos da indústria oleoquímica. Observa-se que produtos obtidos tradicionalmente a partir de fontes não renováveis também podem ser obtidos a partir de fontes renováveis.

Do ponto de vista químico os óleos e gorduras, triglicerídeos de ácidos graxos ou triésteres do glicerol, podem ser convertidos em produtos de elevado valor agregado tais como combustíveis (biodiesel), lubrificantes, solventes, adesivos, surfactantes, agroquímicos, entre outros produtos (METZGER, 2001).

Por se tratar de fonte de energia renovável, os óleos vegetais têm sido largamente investigados como candidatos a programas de energia renovável, pois proporcionam uma geração descentralizada de energia e um apoio à agricultura familiar, criando melhores condições de vida (infra-estrutura) em regiões carentes, valorizando potencialidades regionais e oferecendo alternativas a problemas econômicos e sócio-ambientais de difícil solução.



**Figura 2.1.** Produtos da indústria oleoquímica (METZER, 2001).

A utilização de óleos vegetais *in natura* como combustível alternativo tem sido alvo de diversos estudos na última década (NAG *et al.*, 1995; PIYAPORN *et al.*, 1996). No Brasil, já foram realizadas pesquisas empregando óleos virgens de macaúba, pinhão-manso, dendê, indaiá, buriti, pequi, mamona, babaçu, cotieira, tungue e pupunha (BARRETO, 1982; MIC, 1985; SERRUYA, 1991) e nos testes realizados com esses óleos em caminhões e máquinas agrícolas, foi ultrapassada a meta de um milhão de quilômetros rodados (MIC, 1985). No entanto, esses estudos demonstraram a existência de algumas desvantagens no uso direto de óleos virgens: i) ocorrência de excessivos depósitos de carbono no motor; ii) obstrução nos filtros de óleo e bicos injetores; iii) diluição parcial do combustível no lubrificante; iv) durabilidade do motor e v) aumento considerável dos custos de manutenção.

Outros autores GOERING e FRY (1981), KOBMEHL e HEINRICH (1998) e GHASSAN *et al.* (2003) demonstraram que a alta viscosidade e a baixa volatilidade dos óleos vegetais *in natura* podem provocar sérios problemas ao bom funcionamento do motor. Dentre os problemas que aparecem após longos períodos de utilização, destacam-se a formação de depósito de carbono por combustão incompleta, a diminuição da eficiência de lubrificação do óleo pela ocorrência de polimerização (no caso de óleos poli-insaturados) e a atomização ineficiente e/ou entupimento dos sistemas de injeção (PRYDE, 1983; MA e HANNA, 1999).

Para resolver esses problemas, houve um considerável investimento na adaptação dos motores para que o uso de óleos vegetais *in natura* pudesse ser

viabilizado, particularmente na produção de energia elétrica em geradores movidos por motores estacionários de grande porte. Nesse caso, o regime de operação do motor é constante e isso facilita o ajuste dos parâmetros para garantir uma combustão eficiente do óleo vegetal, podendo ser utilizada, inclusive, uma etapa de pré-aquecimento (pré-câmaras) para diminuir a sua viscosidade e facilitar a injeção na câmara de combustão. No entanto, para motores em que o regime de funcionamento é variável (por exemplo, setor de transportes), foi necessário desenvolver uma metodologia de transformação química do óleo para que suas propriedades se tornassem mais adequadas ao seu uso como combustível. Assim, em meados da década de 70, surgiram as primeiras propostas de modificação de óleos vegetais por meio da reação de transesterificação, cujos objetivos eram os de melhorar a sua qualidade de ignição, reduzir o seu ponto de fluidez, e ajustar os seus índices de viscosidade e densidade específica (SHAY, 1993; STOURNAS *et al.*, 1995; MA e HANNA, 1999).

## 2.2. Biodiesel

O biodiesel é definido pela “National Biodiesel Board” (EUA) como o derivado mono-álquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão (motores de ciclo diesel) (NATIONAL BIODIESEL BOARD, 1998). É produzido por meio da alcoólise de óleos vegetais, mediante a utilização de um catalisador, que pode ser ácido, básico ou enzimático. Este biocombustível possui grande adaptabilidade aos motores de ciclo-diesel, e enquanto o uso de outros combustíveis limpos, como o gás natural ou biogás, requer adaptação dos motores, a combustão do biodiesel pode dispensá-la, configurando-se em uma alternativa técnica capaz de atender toda a frota já existente movida a petrodiesel (OLIVEIRA e COSTA, 2002).

O biodiesel apresenta as seguintes características: (i) é virtualmente livre de enxofre e compostos aromáticos; (ii) tem número de cetano maior que o diesel; (iii) possui teor médio de oxigênio em torno de 11%; (iv) possui maior viscosidade e maior ponto de fulgor que o diesel convencional; (v) possui um nicho de mercado específico, diretamente associado a atividades agrícolas; (vi) tem preço de mercado relativamente superior ao diesel comercial (RAMOS *et al.*, 2003). Entretanto, se a etapa de recuperação e aproveitamento do subproduto (glicerina) for otimizada, o biodiesel poderá ser obtido a um custo seguramente competitivo com o preço do óleo diesel.

Do ponto de vista econômico, a viabilidade do biodiesel está relacionada com o estabelecimento de um equilíbrio favorável na balança comercial brasileira, visto que o diesel é o derivado de petróleo mais consumido no Brasil, e que uma fração crescente desse produto vem sendo importada anualmente (NOGUEIRA e PIKMAN, 2002).

Em termos ambientais, a adoção do biodiesel, mesmo que de forma progressiva, ou seja, em adições de 2% a 5% ao diesel de petróleo (RAMOS *et al.*, 2003), resultará em uma redução significativa no padrão de emissões de materiais particulados, óxidos de enxofre e gases que contribuem para o efeito estufa e chuvas ácidas (MITTELBAACH *et al.*, 1985). Sendo assim, sua difusão, em longo prazo, poderá proporcionar uma maior expectativa de vida à população e, como consequência, um declínio nos gastos com saúde pública, possibilitando o redirecionamento de verbas para outros setores, como educação e previdência. Cabe ainda ressaltar que a adição de biodiesel ao petrodiesel, em termos gerais, melhora as características do combustível fóssil, pois possibilita a redução dos níveis de ruídos e melhora a eficiência da combustão pelo aumento do número de cetano (GALLO, 2003).

Estudos mercadológicos indicam os seguintes cenários para os produtos oleoquímicos e petroquímicos (COSTA NETO *et al.*, 2000).

- O biodiesel constitui um excelente combustível alternativo e sucedâneo do óleo diesel, cujo ingresso no mercado é considerado um fato irreversível na Europa, nos Estados Unidos e Austrália.
- Os incentivos propiciados pela taxa de emissão de gás carbônico, prática já considerada como definitiva, deverão favorecer a implementação de programas de produção de energias limpas, como o biodiesel.
- A tendência de alta nos preços do petróleo é uma preocupação permanente, especialmente quando se leva em conta a escassez, fato que deverá favorecer o crescimento da produção mundial de biodiesel e de outras modalidades energéticas alternativas.
- A questão do efeito estufa, provocado pelas emissões atmosféricas de gás carbono, deverá moderar o uso dos combustíveis de petróleo, favorecendo o uso dos combustíveis e biomassa, onde se contempla, em condições de excelência, o biodiesel.

Em diversos países, o biodiesel já é uma realidade. Usado na Europa há cinco anos, o biodiesel serve tanto como aditivo ao óleo diesel, como acontece na França e na Suécia, quanto para colocar um motor em marcha como na Alemanha, Áustria e Itália. Só a Alemanha consome 300 mil toneladas anuais de biodiesel. Misturado numa proporção de 5% ao óleo diesel, o combustível vegetal ajuda a reduzir a emissão de partículas de enxofre e o efeito lubrificante ameniza o desgaste do motor (RAMOS *et al.*, 2003).

As pesquisas no Brasil também estão avançando gradativamente. O Programa Nacional de Óleos Vegetais (OVEG) realizou testes com óleos vegetais de composições químicas e graus de insaturação variados (MIC, 1985). Outros Programas Nacionais intitulados, PROBIODIESEL (Portaria nº 702 do MCT, de 30 de outubro de 2002) e CERBIO (Centro Nacional de Referência em Biodiesel) surgiram nos últimos anos, com o objetivo de promover o desenvolvimento das tecnologias de produção e avaliar a viabilidade e a competitividade técnica, sócio-ambiental e econômica do biodiesel para os mercados interno e externo, bem como sua produção e distribuição nas diferentes regiões do país (ANDRADE, 2003; MCT, 2002).

As características físico-químicas de alguns óleos vegetais e do óleo diesel são listadas na Tabela 2.1. Os óleos combustíveis derivados do petróleo são estáveis à temperatura de destilação, mesmo na presença de excesso de oxigênio. Ao contrário, nos óleos vegetais que contêm triacilgliceróis de estrutura predominantemente insaturada, reações de oxidação podem ser observadas até à temperatura ambiente e o aquecimento a temperaturas próximas a 250°C ocasiona reações complementares de decomposição térmica, cujos resultados podem inclusive levar à formação de compostos poliméricos mediante reações de condensação. A presença de compostos poliméricos aumenta a temperatura de destilação e o nível de fumaça do motor, diminui a viscosidade do óleo lubrificante e acarreta diminuição da potência pela queima incompleta de produtos secundários. Esse comportamento não é observado com derivados metanolisados ou etanolisados (biodiesel), cuja mistura é destilada integralmente a temperaturas inferiores a 350 °C.

**Tabela 2.1.** Características de alguns óleos vegetais e do óleo diesel

Características	Óleos vegetais					Óleo diesel
	mamona	babaçu	dendê	soja	piqui	
Poder calorífico (kcal/kg)	8913	9049	8946	9421	9330	10950
Ponto de névoa ( °C)	10	26	31	13	26	0
Índice de cetano	nd	38	38-40	36-39	38	40
Densidade a 25°C	0,9578	0,9153	0,9118	nd	0,910	0,8497
Viscosidade a 37,8 °C (cSt)	285	30,3	36,8	36,8	2	2,0-4,3
Destilação a 90% (°C)	nd	349	359	370	47,0	338
Teor de cinzas (%)	nd	0,03	0,01	nd	nd	0,014
Cor (ASTM)	1,0	0,5	1,0	nd	0,01	2,0
Resíduos de carbono Conradson sobre 10% do resíduo seco (%)	nd	0,28	0,54	0,54	2,0	0,35
					nd	

Fonte: COSTA NETO *et al* (2000).

### 2.3. Características Básicas de um Combustível para Motores Diesel

A viabilidade técnica de um combustível para motores diesel deve ser considerada levando em conta os seguintes fatores: combustibilidade, impactos ambientais das emissões, compatibilidade ao uso e compatibilidade ao manuseio (PARENTE, 2003).

A *combustibilidade* de uma substância, diz respeito ao seu grau de facilidade em realizar a combustão no equipamento na forma desejada, com produção de energia mecânica mais adequada. Em motores a diesel, a combustibilidade relaciona-se com as seguintes propriedades essenciais do combustível: poder calorífico e o índice de cetano. A viscosidade cinemática e a tensão superficial, pelo fato de definirem a qualidade de pulverização na injeção do combustível, participam também como fatores de qualidade na combustão.

Os *impactos ambientais das emissões* constituem uma característica básica importante, pois a fauna e a flora precisam ser preservadas. Os teores de enxofre e de hidrocarbonetos aromáticos, além da combustibilidade, são características importantes inerentes aos impactos das emissões.

A *compatibilidade* ao uso diz respeito à longevidade, não somente do motor como também dos seus entornos, representada pela lubrificidade e pela corrosividade, sendo esta última, definida principalmente pelo teor de enxofre e acidez do combustível.

A *compatibilidade ao manuseio*, diz respeito ao transporte, armazenamento e à distribuição do combustível, sendo a corrosividade, toxidez e o ponto de fulgor as propriedades mais importantes. No inverno dos países mais frios, o ponto de fluidez torna-se também uma importante propriedade, sinalizando para a adição de aditivos

anticongelantes. As características físico-químicas do biodiesel são semelhantes entre si, independentemente de sua origem, isto é, tais características são quase idênticas, independentes da natureza da matéria-prima e do agente de interesterificação (etanol, propanol ou butanol) (PARENTE, 2003).

### **2.3.1. Propriedades Físicas do Biodiesel**

#### ***Viscosidade e densidade***

As propriedades fluidodinâmicas de um combustível, no que diz respeito ao funcionamento de motores de injeção por compressão (motores diesel) são a viscosidade e a densidade, as quais exercem grande influência na circulação e injeção do combustível. As propriedades fluidodinâmicas do biodiesel, independentemente de sua origem, assemelham-se ao do óleo diesel mineral, não sendo necessária qualquer adaptação ou regulagem no sistema de injeção dos motores (PARENTE, 2003).

#### ***Lubricidade***

A lubricidade é uma medida do poder de lubrificação de uma substância, em função de várias de suas propriedades físicas, destacando a viscosidade e tensão superficial. Diferentemente dos motores movidos à gasolina, os motores a óleo diesel exigem que o combustível tenha propriedades de lubrificação, especialmente, em razão do funcionamento da bomba, exigindo que o líquido que escoar lubrifique adequadamente as suas peças em movimento (PARENTE, 2003).

#### ***Ponto de névoa e de fluidez***

O ponto de névoa é a temperatura na qual o líquido, por refrigeração, começa a ficar turvo, e o ponto de fluidez é a temperatura na qual o líquido não mais escoar livremente. Tanto o ponto de fluidez como o de névoa varia com a fonte de matéria-prima, bem como o álcool empregado na reação de interesterificação. Essas propriedades são consideradas importantes no que diz respeito às condições nas quais o combustível deve ser armazenado e utilizado (PARENTE, 2003).

#### ***Ponto de fulgor***

É a temperatura na qual um líquido torna-se inflamável em presença de uma chama ou faísca. Esta propriedade é importante no que diz respeito à segurança no transporte, manuseio e armazenamento. O ponto de fulgor do biodiesel, se completamente isento de álcool, for superior à temperatura ambiente, significa que o

combustível não é inflamável nas condições normais que é transportado e armazenado (PARENTE, 2003).

### ***Poder calorífico***

O poder calorífico de um combustível indica a quantidade de energia desenvolvida pelo combustível por unidade de massa, quando ele é queimado. No caso de um combustível de motores, a queima significa a combustão para o funcionamento do motor. O poder calorífico do biodiesel é muito próximo do poder calorífico do óleo diesel mineral. A diferença média em favor do óleo diesel do petróleo situa-se na ordem de somente 5%. Entretanto, com uma combustão mais completa, o biodiesel possui um consumo específico equivalente ao diesel mineral (PARENTE, 2003).

### ***Índice de cetano***

O índice de octano ou octanagem dos combustíveis está para motores do ciclo Otto, da mesma forma que o índice de cetano ou cetanagem está para os motores do ciclo Diesel. Portanto quanto maior for o índice de cetano de um combustível, melhor será sua combustão no motor diesel. O índice de cetano médio do biodiesel é 60, enquanto para o óleo diesel é entre 48 a 52 (PARENTE, 2003).

## **2.3.2. Propriedades Químicas do Biodiesel**

### ***Teor de enxofre***

Como os óleos vegetais e as gorduras de animais não possuem enxofre, o biodiesel é completamente isento desse elemento. Os produtos derivados do enxofre são bastante danosos ao meio ambiente e ao motor e seus componentes. Entende-se que o biodiesel é um combustível limpo, enquanto o diesel possui enxofre, prejudica a flora, a fauna, o homem e o motor (PARENTE, 2003).

### ***Poder de solvência***

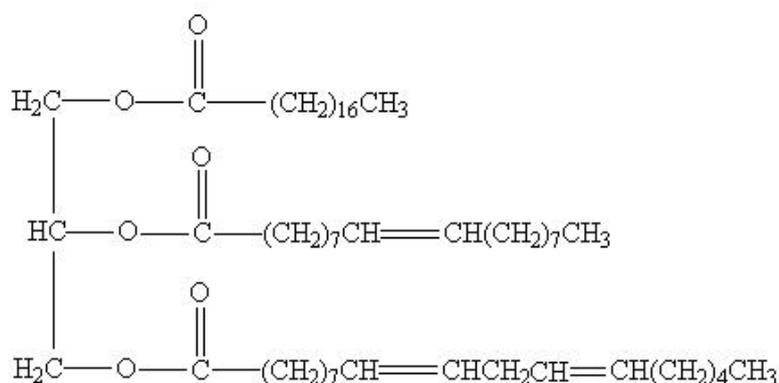
O biodiesel, constituído por uma mistura de monoésteres de ácidos carboxílicos, solubiliza um grupo muito grande de substâncias orgânicas, incluindo as resinas que compõem as tintas. Dessa forma, cuidados especiais com o manuseio do biodiesel devem ser tomados para evitar danos à pintura dos veículos, nas proximidades do ponto ou bocal de abastecimento (PARENTE, 2003).

## 2.4. Matérias-Primas para a Produção de Biodiesel

As matérias primas para a produção de biodiesel podem ser de diferentes origens: óleos vegetais, gorduras de animais e óleos e gorduras residuais. Porém, nem todo óleo vegetal deve ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel. Isso porque alguns óleos vegetais apresentam propriedades não ideais, como elevados viscosidade e número de iodo, que são transferidas para o biocombustível e que o tornam inadequado para uso direto em motores do ciclo diesel. Portanto, a viabilidade de cada matéria-prima dependerá de suas respectivas competitividades técnica, econômica e sócio-ambiental, e passam; inclusive, por importantes aspectos agronômicos, tais como: i) o teor em óleos vegetais; ii) a produtividade por unidade de área e iii) o equilíbrio agronômico e demais aspectos relacionados com o ciclo de vida da planta (RAMOS *et al.*, 2003).

Podem se transformados em biodiesel, todos os óleos vegetais enquadrados na categoria de óleos fixos ou triglicerídeos, como os obtidos de grão de amendoim, polpa do dendê, amêndoa do côco de dendê, amêndoa do côco da praia, caroço de algodão, amêndoa do côco de babaçu, semente de girassol, baga de mamona, semente de colza, semente de maracujá, polpa de abacate, caroço de oiticica, semente de linhaça e semente de tomate, entre muitos outros vegetais em forma de sementes, amêndoas ou polpas (CAMPOS, 2003; PARENTE, 2003; PERES e JUNIOR, 2003).

Os óleos vegetais são produtos naturais constituídos por uma mistura de ésteres resultantes da condensação de uma molécula de glicerol com três moléculas de ácidos graxos (triacilgliceróis ou triglicerídeos) (Figura 2.2)



**Figura 2.2.** Estrutura de uma molécula de triglicerídeo (SRIVASTAVA e PRASAD, 2000).

Óleos vegetais são constituídos de cadeias curtas ou longas de ácidos graxos, cujo grau de saturação, ou insaturação, é função da origem do tipo da semente. Os ácidos graxos mais comumente encontrados nos óleos apresentam cadeias de 16 e 18 átomos de carbono. Essas cadeias podem ser saturadas (sem duplas ligações) ou insaturadas (com duplas ligações) (COSTA NETO, 2002). Óleos que possuem maior número de ácidos graxos saturados, como por exemplo, o óleo de babaçu (rico em ácido láurico), apresenta-se em estado sólido à temperatura entre 20-25°C; aqueles cujo teor de polinsaturados é mais elevado, por exemplo, soja, algodão, amendoim (ricos em ácidos linoleico e oleico) apresentam-se em estado líquido à temperatura ambiente ou abaixo desta. (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2003).

Conforme a espécie de oleaginosa, variações na composição química do óleo vegetal são expressas por variações na relação molar entre os diferentes ácidos graxos presentes na estrutura. Portanto, a análise da composição de ácidos graxos constitui o primeiro procedimento para uma avaliação preliminar da qualidade do óleo bruto e/ou de seus produtos de transformação e isto pode ser obtido por meio de vários métodos analíticos, tais como: cromatografia líquida de alta eficiência (PLANK e LORBEER, 1995), cromatografia em fase gasosa (MITTELBAACH, 1990) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (COSTA NETO, 2002). A Tabela 2.2 apresenta a composição de alguns óleos vegetais, com potencial de utilização na produção de biodiesel no Brasil.

**Tabela 2.2.** Composição em porcentual de ácidos graxos em diferentes óleos vegetais e estrutura química dos ácidos graxos mais comuns.

Ácido Graxo	Estrutura	Fórmula	Babaçu	Mamona	Palma	Soja	Girassol
Caprílico	8:0	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	3,5	0	0	0	0
Cáprico	10:0	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	4,5	0	0	0	0
Láurico	12:0	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	44,7	0	0,1	0	0
Mirístico	14:0	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	17,5	0	1,2	0,1	0
Palmítico	16:0	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	9,7	1,2	46,8	10,5	7,0
Estearico	18:0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	3,1	1,0	3,8	3,2	3,3
Oléico	18:1	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	15,2	3,3	37,6	22,3	14,3
Linoleico	18:2	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1,8	3,6	10,0	54,5	75,4
Linolênico	18:3	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	0	0,2	0	8,3	0
Ricinoleico	18:1	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	0	89,2	0	0	0
Eicosanóico	20:0	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	0	0	0	0,2	0
Eicosenóico	20:1	C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> O <sub>2</sub>	0	0,3	0,5	0,9	0

Fonte: SONNTAG, 1979.

Como o presente trabalho trata da conversão do óleo de babaçu em biocombustível, ressalta-se que o mesmo é extraído do côco de babaçu conhecido como baguaçu ou côco-de-macaco (*Orrbignya speciosa*), pertence à família botânica da Palma originária do Brasil - Região Amazônica e Mata Atlântica na Bahia. Os frutos são ovais alongados de coloração castanha, a polpa é amilácea e oleosa, envolvendo de 3 a 4 sementes oleaginosas (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2003).

Considerando os 17 milhões de hectares de florestas onde predominam a palmeira do babaçu e as possibilidades de aproveitamento integral do coco (Tabela 2.3), o babaçu constitui, potencialmente, uma extraordinária matéria-prima para a obtenção de produtos com altos teores de matérias graxas, ou seja, gorduras de aplicação alimentícia ou industrial.

**Tabela 2.3.** Constituintes do coco de babaçu, características e aplicações.

Constituintes	%	Características e Aplicações
Amêndoas	5 – 9	Material oleaginoso contendo até 62% de óleo do tipo laurídico. Na extração resulta uma torta utilizável para ração de animais
Endocarpo	50 – 65	Lignito vegetal, de elevada dureza, com aplicação na produção de carvões especiais, sendo recomendável o aproveitamento dos gases condensáveis resultando diversos produtos de interesse para a indústria química.  Alternativamente, o lignito pode ser utilizado na produção de peças aglomeradas, possíveis de serem empregadas como substituto de madeiras, na indústria de móveis e nas construções civis.  Possíveis excedentes podem ser direcionados como combustível industrial, na co-geração de eletricidade.
Mesocarpo	15 – 22	Porção amilácea do coco, prestando-se como energético na produção de rações ou etanol, entre outras possibilidades.
Epicarpo	11 – 16	Material fibroso, ligno-celulósico, podendo ser utilizado como combustível industrial, e até mesmo, na co-geração de eletricidade.

Os principais destinatários das amêndoas do coco de babaçu são as indústrias de esmagamento, produtoras de óleo cru. Constituindo cerca de 65% do peso da amêndoa, esse óleo é subproduto para a fabricação de sabão, glicerina e óleo comestível. O óleo de coco babaçu refinado é um produto largamente utilizado na produção de cosméticos,

tais como, emulsões limpantes, cremes faciais, cremes para o corpo, cremes para os lábios, preparados para cabelos secos ou quebradiços entre outros.

Apesar dessa potencialidade, medida pela dimensão de ocorrência e valor econômico das várias aplicações já testadas, a exploração do coco de babaçu é ainda realizada, em grande parte do nordeste, de forma muito artesanal (PARENTE, 2003), tendo em vista que essas pequenas comunidades não têm acesso aos equipamentos existentes para a quebra automática do coco de babaçu, com a separação de seus constituintes, bem como as tecnologias de aplicações das matérias primas resultantes.

Estudos realizados demonstram que eliminando as palmeiras improdutivas nos babaçuais de elevadas densidades, a produção chega a dobrar, passando da média de 3 para 6 toneladas anuais. É sabido também que o consórcio do babaçu com culturas temporárias rasteiras como o feijão, o amendoim, a soja, e até mesmo o girassol, são possíveis em lavouras familiares, proporcionando ocupações e rendas complementares.

Desta forma a prática do aproveitamento integral do coco, partindo da quebra mecanizada, poderia ser uma excelente oportunidade de geração de renda na coleta do coco, bem como na industrialização dos constituintes, produzindo riquezas oportunas para os Estados detentores de babaçu, quais sejam: Maranhão, Piauí, Tocantins, parte de Goiás, além de várias micro-regiões isoladas no Ceará, em Mato Grosso, em Rondônia e outras. Neste cenário, o óleo de babaçu poderia ingressar no mercado energético, com quantidades substantivas e preços competitivos (PARENTE, 2003).

## **2.5. Produção de Biodiesel**

Combustíveis alternativos para motores a diesel são cada vez mais importantes devido à escassez das reservas de petróleo e aos problemas de poluição ambiental. Um grande número de estudos tem mostrado que os triglicerídeos são uma alternativa promissora ao diesel (BARTHOLOMEW, 1981; ZIEJEWSKI e KAUFMAN, 1983). Contudo, o uso direto de óleos vegetais ou misturas de óleos é considerado insatisfatório e não prático tanto para motores de injeção direta como indireta, movidos a diesel. Dentre os principais problemas apresentados estão: a composição em ácidos graxos dos óleos vegetais, a elevada viscosidade, a acidez, a presença de gomas formadas por oxidação e polimerização durante a estocagem e a decomposição de carbonos, entre outros (MA e HANNA, 1999). Conseqüentemente, vários estudos têm sido conduzidos para desenvolver derivados de óleos vegetais, cujas propriedades e desempenho se aproximem do óleo diesel.

São três os processos mais investigados para superar os problemas encontrados na substituição do diesel por óleos vegetais: a pirólise, a micro-emulsificação e a interesterificação.

### 2.5.1. Pirólise

Pirólise é a conversão química causada pela aplicação de energia térmica, na presença de nitrogênio. Muitos estudos foram realizados com a pirólise de triglicerídeos com o objetivo de obter produtos adequados aos motores a diesel (CROSSLEY *et al.*, 1962; BILLAUND *et al.*, 1995). A decomposição térmica dos triglicerídeos produz diferentes tipos de compostos, incluindo alcanos, alcenos, alcadienos, ácidos carbonílicos e aromáticos, dependendo da fonte do óleo vegetal decomposto. A pirólise do óleo de soja, por exemplo, contém 79% de carbono e 12% de hidrogênio (SCHWAB *et al.*, 1988), apresentando baixa viscosidade e alto número de cetano quando comparado ao óleo puro. Contudo, apesar dos óleos vegetais pirolisados possuírem concentrações satisfatórias de enxofre, água, sedimentos e cobre, são inaceitáveis os níveis de cinzas, resíduos de carbono e o ponto de ignição alcançado. Embora o produto da pirólise seja quimicamente similar ao diesel proveniente do petróleo, a remoção do oxigênio durante o processo térmico elimina qualquer benefício ambiental do produto (SRIVASTAVA e PRASAD, 2000; MA e HANNA, 1999).

### 2.5.2. Microemulsificação

O uso de microemulsões com solventes como metanol, etanol e butanol é outro processo que vem sendo estudado com o objetivo de resolver o problema da viscosidade dos óleos vegetais (SCHWAB *et al.*, 1987; ZIEJEUSKI *et al.*, 1984).

Microemulsões são dispersões isotrópicas, termodinamicamente estáveis, de óleo, água, surfactante e geralmente uma molécula pequena anfifílica, denominada cosurfactante (SCHWAB *et al.*, 1987). ZIEJEUSKI *et al.* (1984) prepararam uma emulsão de 53,3% (v/v) de óleo de girassol, 13,3% (v/v) de etanol e 33,4% (v/v) de butanol. Esta emulsão não-iônica apresentou viscosidade de  $6,31 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s a 40°C, número de cetano de 25, 0,01% de enxofre, 0,01% de ácidos graxos livres e cinzas inferior a 0,01%. A viscosidade obtida foi ainda menor quando se aumentou a concentração de butanol.

SCHWAB *et al* (1987) mostraram que o 2-octanol foi efetivo na solubilização

micelar de metanol em trioleína e óleo de soja. Contudo, foram observados, em escala laboratorial, depósitos de carbono e aumento da viscosidade.

Apesar das microemulsões apresentarem boas características, verificou-se que em longo prazo provocam a decomposição de carbono no motor, combustão incompleta e aumento da viscosidade dos óleos lubrificantes (FELIZARDO, 2003).

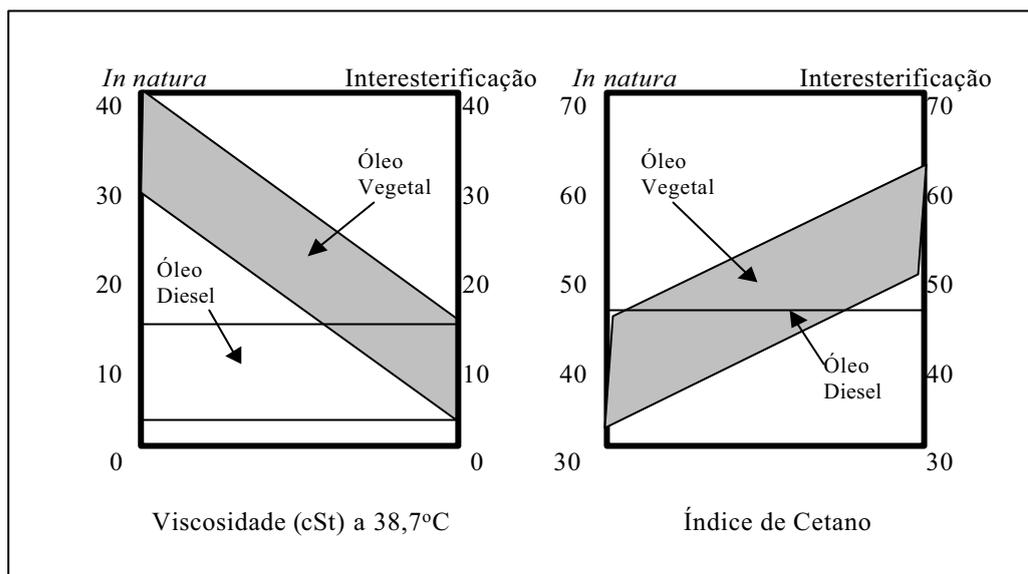
### 2.5.3. Interesterificação

A interesterificação (também denominada alcoólise) é a reação de formação de ésteres a partir de óleos e álcoois, resultando em glicerol. A reação de interesterificação pode ser catalisada por álcalis, ácidos ou enzimas, particularmente as lipases. A interesterificação é o processo usado para produção de biodiesel nos Estados Unidos e na Europa. Essa reação também é usada na produção de ésteres metílicos para outras aplicações como detergentes e cosméticos.

Os álcoois que podem ser usados são o metanol, etanol, propanol, butanol ou álcool amílico. Os álcoois mais utilizados são o metanol e etanol, principalmente pelo seu baixo custo, suas propriedades físico-químicas (menor cadeia carbônica) e grande disponibilidade na Europa, Japão e EUA. Como no Brasil existe grande disponibilidade de etanol, provavelmente será este o substrato para o biodiesel brasileiro.

NYE *et al.* (1983) investigaram a reação de interesterificação de óleos de frituras com metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol e 2-etoxietanol em meios ácido e básico. Nesse estudo alguns ésteres de menor viscosidade foram selecionados para a realização de testes preliminares em motores do ciclo diesel. Os ésteres metílicos obtidos em meio básico e os ésteres etílicos e butíricos obtidos em meio ácido, não mostraram problemas de ignição e desempenho, apresentando pouca ou nenhuma fumaça na exaustão. Os demais ésteres não foram testados por critérios de viscosidade e o rendimento da reação não serviu como parâmetro para a seleção dos ésteres a serem utilizados nos testes.

A interesterificação tem sido largamente utilizada para redução da viscosidade dos triglicerídeos, melhorando as propriedades físicas dos combustíveis para o motor a diesel (CLARK *et al.*, 1984). A Figura 2.3 mostra a comparação entre viscosidade e índice de cetano do óleo diesel e do biodiesel interesterificado (CORMA, 1995).



**Figura 2.3.** Efeito da interesterificação nos óleos vegetais.

Para completa interesterificação estequiométrica é necessário ter uma relação molar de 3:1, no mínimo, entre o álcool e triglicerídeos. Os principais fatores que interferem na reação de interesterificação são:

- A concentração de ácidos graxos livres nos óleos é um fator importante na reação catalisada por NaOH. O conteúdo de água nos reagentes deve ser baixo, pois podem ser formados sabões no processo, o que aumenta a viscosidade final do produto e dificulta a separação do glicerol (FREEDMAN *et al.*, 1986; FEUGE e GROSE, 1949).
- O efeito da relação molar entre os reagentes está associado ao tipo de catalisador utilizado, por exemplo; a catálise ácida necessita de 30 moles de butanol para 1 mol de óleo de soja, enquanto na alcalina só são requeridos 6 moles de álcool para 1 de óleo para atingir a mesma velocidade de reação (FREEDMAN *et al.*, 1986).
- Os tipos de catalisadores possíveis são os ácidos ( $H_2SO_4$ , HCl,  $H_3PO_4$ ), álcalis (KOH, NaOH) ou as enzimas (lipases). A catálise alcalina é muito mais rápida do que a ácida, contudo, quando se utilizam óleos residuais com elevado teor de água e de ácidos graxos livres, a catálise ácida é a mais indicada (FREEDMAN *et al.*, 1986). Os estudos iniciais referentes ao emprego das lipases como biocatalisadores foram publicados no início da década de 90.
- O efeito da temperatura varia em função dos tipos de óleos e do catalisador. A metanólise alcalina do óleo de mamona, por exemplo, ocorre entre 20-35°C.

## 2.6. Cinética das Reações de Interesterificação

Existem muitos estudos relatados na literatura sobre a cinética de catálise ácida (FREEDMAN *et al.*, 1986; DUFEK *et al.*, 1972) e básica (FREEDMAN *et al.*, 1986; NOUREDDINI e ZHU, 1997) das reações de interesterificação. DUFEK *et al.* (1972) estudaram a esterificação e interesterificação por catálise ácida do ácido 9 (10)-carboniesterático e seus mono e di ésteres metílicos. FREEDMAN *et al.* (1986) relataram a reação de interesterificação do óleo de soja e de outros óleos vegetais com álcoois, examinando o efeito do tipo de álcool, a relação molar entre os reagentes, tipo e concentração do catalisador e temperatura de reação na ordem e curso da reação. Na presença de catalisadores ácidos ou básicos, a reação apresentou-se como sendo de pseudo-primeira ordem para o butanol e óleo de soja na proporção de 30:1. Na proporção de 6:1 de butanol e óleo de soja com catalisador alcalino, a reação apresentou cinética de segunda ordem. Para metanol e óleo de soja (6:1) com 0,5% de metóxido de sódio, a cinética foi combinada de segunda e quarta ordens.

### 2.6.1. Efeito da Relação Molar entre os Reagentes na Cinética das Reações de Interesterificação

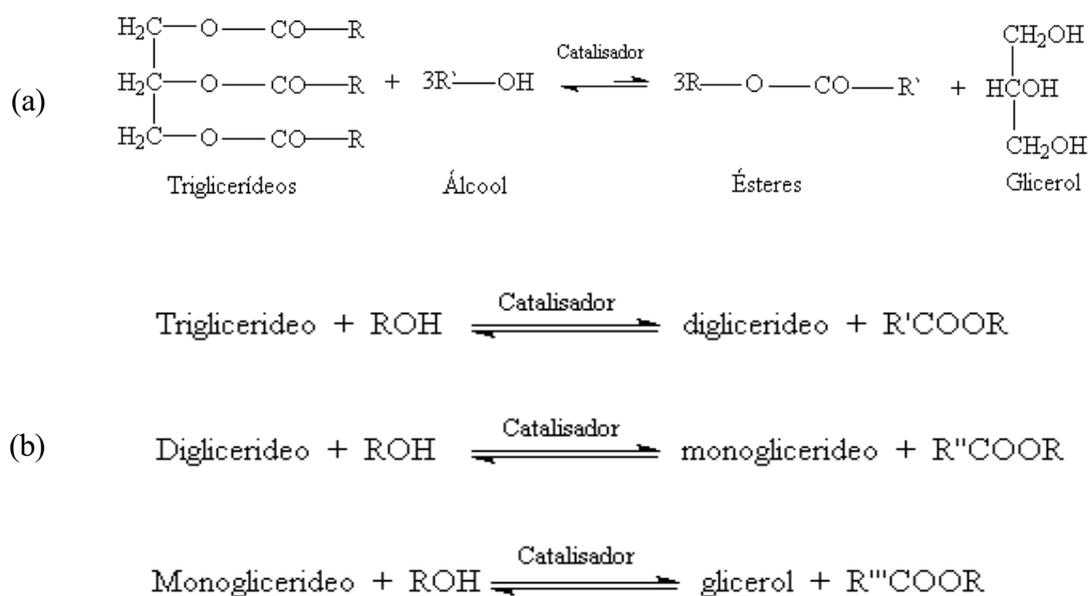
Uma variável importante na velocidade de interesterificação é a relação molar entre o álcool e o óleo. A estequiometria da reação requer 3 moles de álcool por mol de triglicerídeos, para render 3 moles de monoéster e um mol de glicerol.

Elevada relação molar resulta em maior concentração de monoésteres em menor tempo de reação. Na reação de alcóolise do óleo de amendoim com etanol, na proporção de 6:1, foi liberada maior quantidade de glicerol do que na proporção de 3:1. FREEDMAN *et al.* (1984) estudaram, o efeito da relação molar (de 1:1 para 6:1) na conversão de óleos vegetais em monoésteres metílicos. Os óleos de soja, girassol, amendoim e algodão apresentaram comportamento similar, com maior conversão atingida na proporção 6:1.

Estudos efetuados por KRISNANGKURA e SIMAMAHARUNOP (1992) referentes a interesterificação do óleo de palma a 70°C em presença de solvente orgânico com metóxido de sódio como catalisador, verificou que a conversão aumentou com o aumento da relação molar entre o metanol e o óleo de palma. Assim, a relação molar de 6:1 é geralmente a mais empregada em processos industriais para obter monoésteres metílicos com 98% de conversão (FILLIERES *et al.*, 2000).

### 2.6.2. Efeito do Catalisador na Cinética das Reações de Interesterificação

A reação de interesterificação de triglicérides com álcool pode ser representada pela equação geral ilustrada na Figura 2.4a. A Figura 2.4b contém as reações consecutivas e reversíveis que sofrem os triglicérides na interesterificação. Para que ocorra a reação é importante monitorar as três etapas consecutivas e a reversibilidade da reação. Na primeira etapa ocorre a conversão do triglicérideo para diglicérideos, seguido pela conversão do diglicérideo para monoglicérideo, e do monoglicérideo para glicerol, fornecendo uma molécula de éster de cada glicérideo a cada etapa (FREEDMAN *et al.*, 1986; NOUREDDINI e ZHU, 1997).



**Figura 2.4.** Interesterificação de triglicérides com álcool. (a) Equação geral; (b) Três reações consecutivas e reversíveis. R1, R2, R3 e R', representam os grupos alquila. (COSTA NETO, 2002)

Os catalisadores químicos mais usados são os alquilatos metálicos (metóxido ou etóxido de sódio), seguidos dos metais sódio, liga sódio-potássio e dos hidróxidos de sódio ou potássio (ROZENAAL, 1992; GIOIELLI, 1998).

O metóxido de sódio tem se mostrado mais efetivo do que o hidróxido de sódio, provavelmente por produzir menor concentração de água durante a reação (FREEDMAN *et al.*, 1984). ALCÂNTARA *et al.* (2000) reagiram três óleos (óleo de soja, óleo de fritura e gordura de porco) com metóxido de sódio em dois tipos diferentes de reação: a interesterificação e a amidação, com metanol e dietilamina, respectivamente. As amidas

melhoraram as propriedades de ignição do óleo diesel. Como tanto o hidróxido de sódio quanto o de potássio são capazes de catalisar a interesterificação, e sendo ambos muito baratos, são extensivamente aplicados industrialmente na produção de biodiesel.

A cinética de interesterificação enzimática de triglicerídeos com metanol (metanólise) catalisada pela lipase de *Rhizopus oryzae* parece estar de acordo com o modelo teórico proposto (KAIEDA *et al.*, 2001), ou seja, inicialmente os triglicerídeos são hidrolisados pela lipase em glicerídeos parciais e ácidos graxos livres, e depois são sintetizados os monoésteres metílicos com metanol e os ácidos graxos livres sugerindo que, diferentemente da catálise alcalina, os ácidos graxos livres contidos em óleos usados podem ser convertidos facilmente em monoésteres na catálise enzimática.

## **2.7. Outros Processos de Interesterificação**

### **2.7.1. Processo de Interesterificação Catalisada por Ácidos *in situ***

Os ácidos utilizados na interesterificação química incluem os ácidos: sulfúrico, fosfórico, hidrolórico e sulfônicos orgânicos. Embora a interesterificação por catálise ácida seja mais lenta que a alcalina (MA e HANNA, 1999; SRIVASTAVA e PRASAD, 2000), a interesterificação ácida é a melhor alternativa quando o óleo usado tem alta concentração de ácidos graxos livres e água, como é no caso de óleos já utilizados em frituras (FREEDMAN *et al.*, 1984; AKSOY *et al.*, 1988). AKSOY *et al.* (1988) relataram a necessidade de realizar a reação de interesterificação do óleo de oliva com muitos compostos de enxofre por catálise ácida. Em geral, os ésteres etílicos de ácidos graxos monossaturados ou de cadeia curta, com 2% de ácido sulfúrico podem ser considerados ótimos combustíveis alternativos (KLOPFENSTEIN e WALKER, 1983).

Interesterificação *in situ* difere do processo convencional porque utiliza óleo cru e álcool acidificado, em vez de óleo e álcool purificados, ou seja, a extração e interesterificação ocorrem no mesmo reator com o álcool atuando em dois papéis: como solvente extrator e como agente de esterificação.

KILDIRAN *et al.* (1996) propuseram a interesterificação *in situ* do óleo de soja, enquanto ÖZGUL e TÜRKAY (1993) estudaram a interesterificação *in situ* do óleo de arroz com diferentes álcoois monohidratados, explorando a vantagem da extração simultânea dos lipídeos neutros das sementes, quando a interesterificação *in situ* foi empregada.

### **2.7.2. Interesterificação utilizando Fluidos Supercríticos**

Com o objetivo de desenvolver um novo processo de metanólise de óleos sem qualquer catalisador, KUSDIANA e SAKA (2001) realizaram um estudo fundamental para produção de biodiesel em metanol supercrítico. Demonstraram que o pré-aquecimento a 350°C por 240s em metanol supercrítico foi suficiente para converter o óleo de semente de colza em ésteres metílicos. Os ésteres metílicos produzidos em metanol supercrítico foram os mesmos obtidos por catálise alcalina, mas com maior taxa de conversão. As análises cinéticas das reações demonstraram que a conversão em ésteres metílicos foi mais rápida em condições supercríticas. As condições mais favoráveis foram a 350°C e relação molar de 42:1 entre metanol e óleo (KUSDIANA e SAKA, 2001).

Uma hipótese que pode justificar a maior velocidade de reação é que metanol supercrítico tem natureza hidrofílica com baixa constante dielétrica, dessa forma, os triglicerídeos não polares podem ser bem solvatados pelo metanol supercrítico, formando um sistema unifásico de metanol/ óleo. Além disso, o metanol líquido é um solvente polar e apresenta pontes de hidrogênio entre o OH-oxigênio e OH-hidrogênio formando clusters de metanol, dificultando o acesso do triglicerídeo.

Assim como na interestificação enzimática, e ao contrário da alcalina, os ácidos graxos livres contidos no óleo também podem ser esterificados em metanol supercrítico. Além deste aspecto positivo, adiciona-se o fato de não utilizar catalisadores químicos, o que torna mais fácil a separação dos produtos dessa reação em relação à catálise alcalina. Deve-se observar que neste novo processo são requeridas altas temperaturas (350°C) e pressões (45 MPa), além de grandes quantidades de metanol, sendo ainda necessário investigações do processo para viabilizar sua aplicação industrial.

### **2.8. Comparação da Interesterificação Alcalina e Enzimática**

As bases empregadas na catálise do processo de interesterificação incluem NaOH, KOH, carbonatos e alcóxidos como metóxido de sódio e butóxido de sódio. A interesterificação alcalina ocorre, aproximadamente, 4000 vezes mais rápida do que a ácida (FORMO, 1954) e é a mais empregada comercialmente.

No caso da interesterificação alcalina, os glicerídeos e o álcool devem ser anidros, pois a presença de água favorece a reação de saponificação dos ácidos com álcalis, formando sabões (MACEDO e MACEDO, 2004). O sabão consome o

catalisador reduzindo a eficiência catalítica e aumentando a viscosidade. As conseqüências são a formação de gel e a dificuldade de separação do glicerol.

MA e HANNA (1999) sugeriram que a concentração de ácidos graxos livres no óleo refinado deve ser a menor possível, abaixo de 0,5%. FEUGE e GROSE (1949) também reforçaram a importância dos óleos estarem livres de água e de ácidos graxos. FREEDMAN *et al.* (1984) reportam que as velocidades de interesterificação são significativamente reduzidas se os reagentes não seguirem essas especificações.

A interesterificação enzimática é o processo de modificação lipídica realizado por lipases (triacilglicerol-acilhidrolases) que são enzimas obtidas predominantemente de microrganismos (JAEGER *et al.*, 1994; FABER, 1997; CASTRO *et al.*, 2004).

A interesterificação enzimática tem a vantagem de permitir maior controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases. A tecnologia da interesterificação enzimática é uma realidade comercial, sendo utilizada na Holanda para valorização de óleos de baixo custo (CASTRO *et al.*, 2004). As aplicações atuais são reservadas a produtos de alto valor agregado, mas o desenvolvimento de processos mais econômicos tornará possível o emprego em produtos de maior consumo. Além disso, vem sendo muito utilizada em pesquisas científicas, para explorar as relações entre estrutura e função de triacilgliceróis, levando ao desenvolvimento de novos produtos (CASTRO *et al.*, 2004).

Entretanto, as dificuldades associadas ao controle do processo e ao aumento de escala, bem como ao elevado custo das lipases, têm reduzido a aplicação industrial desses catalisadores para modificação de óleos e gorduras (WILLIS e MARANGONI, 1999). Todavia o procedimento de imobilização da lipase, possibilitando uma posterior reutilização do biocatalisador pode tornar o processo viável sob os pontos de vista comercial e econômico (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Embora a interesterificação química por catálise alcalina, resulte em altas taxas de conversão de triglicerídeos em seus respectivos ésteres, existem alguns inconvenientes que devem ser considerados: elevados gastos energéticos; recuperação do glicerol difícil e demorada; necessidade de remoção do catalisador; requer o tratamento da água alcalina residual; requer o emprego de substratos e reagentes com baixa concentração de água e ácidos graxos livres.

Uma comparação das características do substrato e dos produtos obtidos na catálise alcalina e enzimática é apresentada na Tabela 2.4. Em particular, deve ser observado que o subproduto glicerol pode ser facilmente recuperado, sem processos

complexos, e os ácidos graxos livres nos óleos também são convertidos em seus ésteres correspondentes. Por outro lado, o custo das lipases é significativamente maior que dos catalisadores químicos.

**Tabela 2.4.** Comparação entre catálise alcalina e catálise enzimática para a produção de biodiesel.

	<b>Catálise Alcalina</b>	<b>Catálise Enzimática</b>
Temperatura de reação (°C)	60-70	30-40
Ácidos graxos livres no óleo não refinado	Produtos saponificados	Ésteres
Água na matéria-prima	Interferência na reação	Sem influência
Rendimento em metil ésteres	Alto	Alto
Recuperação do glicerol	Difícil	Fácil
Purificação de ésteres	Lavagens consecutivas	Nenhuma
Reutilização do catalisador	Nenhuma	Fácil (quando imobilizado)

Fonte: MACEDO e MACEDO (2004)

## 2.9. Processos de Obtenção de Biodiesel por via Enzimática

A Tabela 2.5 relaciona alguns processos de obtenção de biodiesel por biocatálise, na qual pode ser verificado que o processo é dependente de diversas variáveis, incluindo: sistema reacional (tipo de óleo e álcool), origem da preparação enzimática, tipo de suporte de imobilização, entre outras.

Entre os trabalhos pesquisados, verifica-se uma tendência no uso dos óleos de soja ou palma, de preparações de lipases imobilizadas disponíveis comercialmente (Lipozyme e Novozym 435) e o metanol como doador do grupo acila. Devido à elevada hidrofilicidade desse álcool (ISO *et al.*, 2001) as reações são efetuadas em meio à solvente orgânico, como clorofórmio, 1-4-dioxano e benzeno em proporções geralmente elevadas, da ordem de 50 a 90% em relação à massa total de reagentes envolvidos. Para emprego dos outros álcoois (etanol, propanol e butanol) não é necessária a adição de solventes orgânicos no meio reacional, o que viabiliza o processo de obtenção de biodiesel com redução de custos com solventes (normalmente tóxicos, de alta inflamabilidade e caros) e com consumo de energia (etapas de destilação) (ISO *et al.*, 2001). Nos trabalhos desenvolvidos no Brasil, preferencialmente tem sido usado etanol como doador do grupo acila, por ser proveniente de biomassa tornando o processo totalmente independente do petróleo.

A alcoólise de óleo de girassol, na presença ou ausência de solvente (éter de

petróleo) foi investigada por MITTELBACH (1990), utilizando três lipases obtidas de diferentes fontes. Os rendimentos mais elevados foram obtidos com a lipase de *Pseudomonas* sp e etanol hidratado. Por outro lado, na ausência de solvente, o rendimento foi menor e o tempo de reação maior.

NELSON *et al.* (1996) investigaram a habilidade das lipases na interesterificação de triglicerídeos com álcoois de cadeia curta. A lipase de *Mucor miehei* foi a mais eficiente na conversão de triglicerídeos em seus alquil ésteres com álcoois primários, enquanto a lipase de *Candida antarctica* foi mais eficiente na interesterificação de triglicerídeos com álcoois secundários na produção de ésteres ramificados. As taxas máximas de conversão para os álcoois primários metanol, etanol, propanol, butanol e isobutanol, foram de 94,8 a 98,5% e para os álcoois secundários isopropanol e sec-butanol de 61,2 a 83,8%, sempre na presença de hexano. Nas reações isentas de hexano, contudo, as taxas de conversão para etanol e metanol decresceram até 19,4%.

A interesterificação dos óleos de peixe, girassol e gordura vegetal com etanol (etanólise) foi também estudada por diversos pesquisadores. Em todos os casos, foram observadas taxas de conversão superiores a 80%, empregando lipases de *Mucor miehei* (SELMI e THOMAS, 1998), *Candida antarctica* (BREIVK *et al.*, 1997) e *Pseudomonas cepacia* (WU *et al.*, 1999).

A otimização da reação de interesterificação de óleo de soja e mamona com metanol, utilizando lipase de *Candida antarctica* imobilizada em cerâmica, foi estudada por SHIMADA *et al.* (1999). Nessa reação, foram utilizados três equivalentes de metanol para um de óleo, sendo observado que o equivalente molar de metanol superior a 1,5 provocou a inativação da enzima. Portanto, a reação foi conduzida com a adição do álcool em etapas. Nas primeiras 10 h, a reação foi conduzida com um equivalente de MeOH. Após a conversão de 95% do metanol inicialmente adicionado, foi acrescentado mais um equivalente de MeOH e a reação prosseguiu por mais 14 h. Finalmente, o terceiro equivalente foi adicionado e a reação continuou por mais 24 h, sendo obtido um rendimento global em ésteres metílicos de 98,4%.

WATANABE *et al.* (2000) também demonstraram um processo de metanólise efetivo utilizando um sistema em regime de batelada, com 2 e 3 etapas, catalisado pela Novozym 435. A taxa de conversão molar no final do último estágio foi de 90-93% e a preparação de lipase pode ser reutilizada por 100 ciclos, sem perder atividade.

**Tabela 2.5.** Produção de biodiesel por biocatálise

<b>Lipases</b>	<b>Óleo</b>	<b>Doador do grupo acila</b>	<b>Meio</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Mucor miehei</i>	girassol	MeOH, EtOH PrOH	éter de petróleo	MITTELBACH (1990)
Novozym 435 <i>Mucor miehei</i>	Sebo, soja, colza	álcoois primários e secundários	isento de solvente hexano	NELSON <i>et al.</i> (1996)
<i>Mucor miehei</i>	girassol	EtOH	isento de solvente	SELMA e TOMAS (1998)
<i>Mucor miehei</i>	manga palma	álcoois (C4-C8)	isento de solvente	DE <i>et al.</i> (1999)
<i>Rhizopus delemar</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium heterosporum</i> Novozym 435, Lipozyme IM	mistura de óleo de soja e colza	MeOH	isento de solvente	SHIMADA <i>et al.</i> (1999)
<i>Pseudomonas cepacia</i> Novozym 435	gordura reciclada de restaurante	EtOH	isento de solvente	WU <i>et al.</i> (1999)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	palma	MeOH, EtOH	isento de solvente	ABIGOR <i>et al.</i> (2000)

**Tabela 2.5.** Cont. Produção de biodiesel por biocatálise.

<b>Lipases</b>	<b>Óleo</b>	<b>Doador do grupo acila</b>	<b>Meio</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
Novozym 435	soja	MeOH	isento de solvente	WATANABE <i>et al.</i> (2000)
Novozym 435	soja	MeOH	isento de solvente	SAMUKAWA <i>et al.</i> (2000)
Lipozyme IM	palma	EtOH	hexano	OLIVEIRA e ALVES (2000)
<i>Candida rugosa</i> <i>Penicillium camemberti</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	soja	MeOH	isento de solvente	KAIEDA <i>et al.</i> (2001)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Mucor javanicus</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Rhizopus niveus</i>	girassol	MeOH EtOH PrOH ButOH	isento de solventes	ISO <i>et al.</i> (2001)

**Tabela 2.5.** Cont. Produção de biodiesel por biocatálise

<b>Lípases</b>	<b>Óleo</b>	<b>Doador do grupo acila</b>	<b>Meio</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
<i>Candida rugosa</i> imobilizada em suportes alternativos (casca de coco)	soja	EtOH	hexano	NASCIMENTO <i>et al.</i> (2001)
<i>Candida rugosa</i> imobilizada Lipozyme RM IM Lipolase	soja soja degomado óleos residuais	MeOH EtOH	hexano	COSTA NETO (2002)
Novozyme 435	algodão	MeOH	isento de solvente	KOSE <i>et al.</i> (2002)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (AK) <i>Rhizomucor miehei</i> (RM)	Algodão, girassol, palma, coco	MeOH EtOH, PrOH ButOH iso-ButOH	isento de solvente hexano	SOUMANOU e BORNSCHEUER (2003)
Lipase pancreática <i>Candida rugosa</i> <i>Candida cylindracea</i>	resíduo do refino do óleo de palma	MeOH ButOH	hexano	LARA e PARK (2004)
Novozym 435	soja	MeOH acetato de metila	isento de solvente	DU <i>et al.</i> (2004)

O efeito do pré-tratamento da lipase Novozym 435 em metanol para metanólise de óleos foi investigada por SAMUKAWA *et al.* (2000). A metanólise progrediu muito mais rápido quando a Novozym 435 foi pré-incubada em metiloleato por 0,5 h e subsequentemente em óleo de soja por 12h. Como resultado, a taxa de conversão atingiu 97% em 3,5h de reação, com adição contínua de 0,33 moles de metanol após cada 0,25-0,4 h de reação.

KAIEDA *et al.* (2001) estudaram a metanólise do óleo de soja com lipases não-regiosseletiva e 1(3)-regioespecífica em sistema aquoso. As lipases não regioespecíficas de *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia* e *Pseudomonas fluorescens* mostraram elevada atividade catalítica na presença de 4-30% de água no sistema. A lipase de *Rhizopus oryzae*, que exhibe 1(3)-regiosseletividade (OKUMURA *et al.*, 1976; SCHEIB *et al.*, 1998) também foi efetiva na metanólise do óleo de soja atingindo 80% de conversão.

Na interesterificação do óleo de colza com 2-etil-1-hexanol, foi obtida uma taxa de 97% de conversão com lipase de *Candida rugosa*. DE *et al.* (1999), estudaram a conversão de álcoois graxos em ésteres (C4-C18:1) empregando lipase imobilizada de *Mucor miehei* (Lipozyme IM<sup>20</sup>) em sistema livre de solventes orgânicos. A conversão molar foi entre 86,8-99,2%.

ABIGOR *et al.* (2000) também observaram que na conversão do óleo de palma pela lipase *Pseudomonas cepacia*, o etanol atingiu melhores taxas de conversão (72%) que o metanol (15%).

Recentemente um novo enfoque para reduzir o efeito negativo do metanol na atividade da enzima foi estudado por DU *et al.* (2004). Esses autores avaliaram a substituição do metanol por acetato de metila como doador do grupo acila e obtiveram rendimentos superiores a 92% em ésteres metílicos, numa razão molar de acetato: óleo de 12:1. A principal vantagem desse processo foi a eliminação da formação do glicerol como subproduto.

A utilização de preparações da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em diferentes suportes em reações de transesterificação do óleo de soja com etanol na presença de solvente (hexano) foi descrita por NASCIMENTO *et al.* (2001). Foram avaliados suportes granulados (carvão ativo de casca de coco, carvão de pinus e bauxita ativada) com áreas superficiais de 854, 1038 e 100 m<sup>2</sup>/g, respectivamente. Com a mesma finalidade, outro suporte, o gel de agar, foi também estudado. Os derivados imobilizados da lipase de *Candida rugosa* foram usados na etanólise do óleo de soja e

rendimentos quantitativos, após 36h de reação a 35°C, só foram obtidos para o derivado de lipase imobilizada em gel de ágar. Utilizando-se a lipase livre nas mesmas condições experimentais, o rendimento foi inferior a 50% e para a lipase imobilizada em carvão de coco não foi verificada formação do produto.

LARA e PARK (2004) verificaram a viabilidade de utilizar o resíduo da refinação do óleo bruto (terra diatomácea) para produção de biodiesel por alcoólise usando metanol e butanol como doadores do grupo acila. Entre as seis preparações de lipases testadas, a *Candida cylindracea* fornecida pela empresa Meito Sanyo (Japão) foi a que apresentou melhor eficiência no processo.

As lipases são conhecidas por terem a propensão a agir mais efetivamente em moléculas de cadeia carbônica longa do que em cadeias carbônicas curtas (FABER, 1997). Assim, de modo geral, a eficiência da interesterificação dos triglicerídeos com metanol parece ser menos favorecida do que com etanol, tanto em sistemas com ou sem solventes orgânicos. Os principais resultados dos estudos mencionados podem ser sintetizados da seguinte forma:

- as lipases catalisam a interesterificação de triglicerídeos em reações que ocorrem mais eficientemente se a cadeia carbônica for maior do que dos álcoois etanol e metanol;
- a alcoólise do metanol e etanol ocorre mais eficientemente na presença de solvente orgânico do que em meio isento de solventes
- a não ser que a lipase seja imobilizada e permita a reutilização, o processo enzimático pode ser muito dispendioso;
- as vantagens ambientais do processo enzimático são evidentes: menor gasto energético com temperatura e pressão elevadas, mais fácil a recuperação dos produtos e menor quantidade de glicerol como subproduto.

## **2.10. Etapas do Processo de Obtenção de Biodiesel por Interesterificação**

O processo de produção de biodiesel, partindo de uma matéria-prima graxa qualquer, envolve as etapas operacionais mostradas na Figura 2.5 e comentadas a seguir de forma resumida (PARENTE, 2003).

**Preparação da matéria prima:** É necessário que a matéria prima tenha o mínimo de umidade e de acidez, o que é possível submetendo-a a um processo de neutralização, por meio de uma lavagem com uma solução alcalina de hidróxido de

sódio ou de potássio, seguida de uma operação de secagem ou desumidificação. A especificidade do tratamento depende da natureza e das condições da matéria graxa empregada como matéria-prima.

**Reação de interesterificação:** É a etapa da conversão, propriamente dita, do óleo ou gordura na presença de catalisador (químico ou bioquímico) em ésteres etílicos, propílicos ou butílicos de ácidos graxos, que constitui o biodiesel.

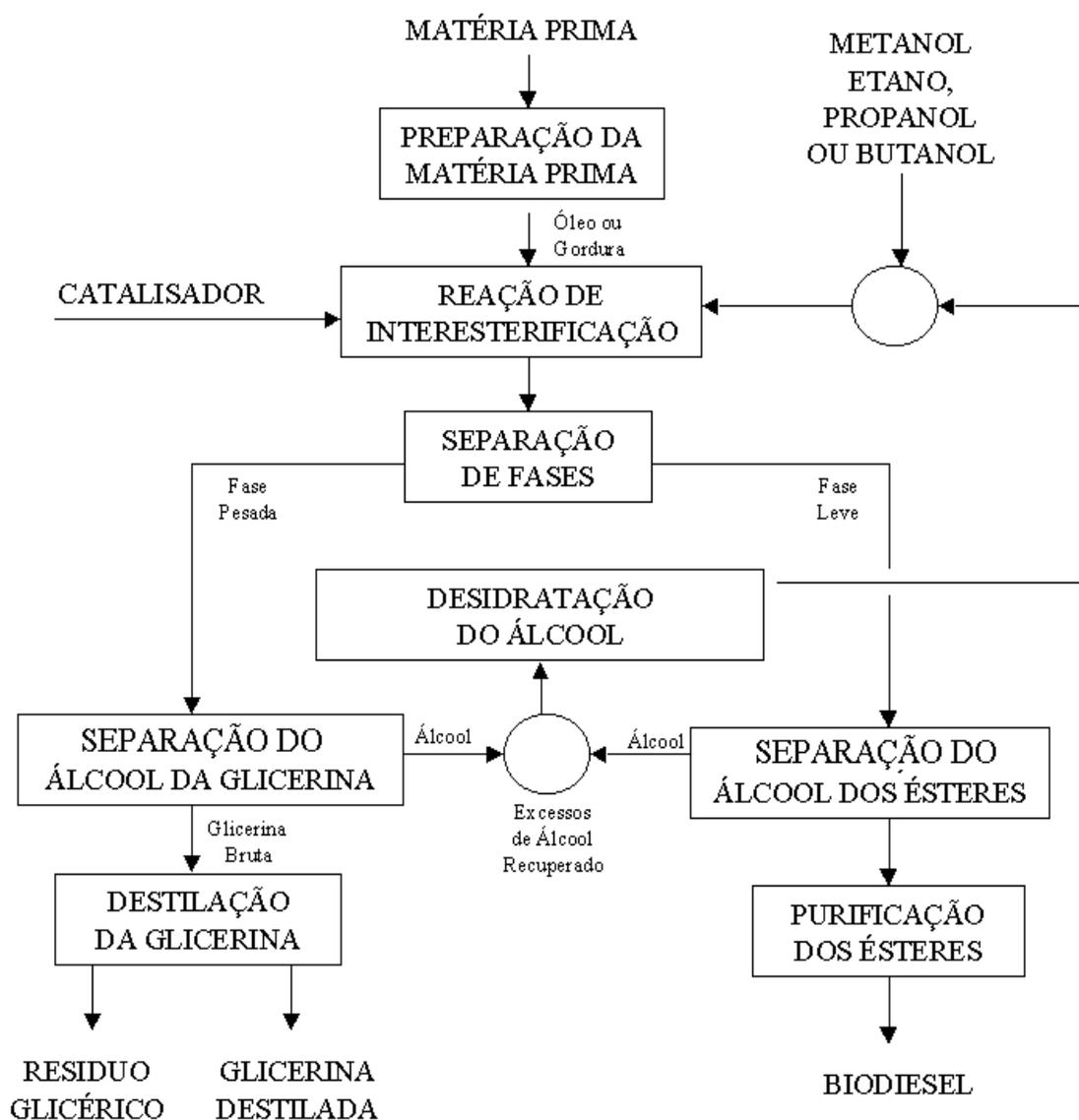
**Separação de fases:** Após a reação de interesterificação que converte a matéria graxa em ésteres (biodiesel), a massa reacional final é constituída de duas fases, separáveis por decantação ou por centrifugação. A fase mais pesada é composta de glicerina bruta, impregnada dos excessos utilizados de álcool, de água, e de impurezas inerentes à matéria-prima. A fase menos densa é constituída de uma mistura de ésteres, conforme a natureza do álcool originalmente adotado, também impregnado de excessos reacionais de álcool e de impurezas.

**Recuperação do álcool, glicerina e dos ésteres:** A fase pesada, contendo água e álcool, é submetida a um processo de evaporação, eliminando-se da glicerina bruta esses constituintes voláteis, cujos vapores são liquefeitos num condensador apropriado. Da mesma forma, mas separadamente, o álcool residual é recuperado da fase mais leve contendo, liberando para as etapas seguintes, os ésteres.

**Desidratação do álcool:** O excesso residual de álcool, após os processos de recuperação, contém quantidades significativas de água, necessitando de uma separação. A desidratação do álcool é feita normalmente por destilação.

**Purificação dos ésteres:** Os ésteres deverão ser lavados por centrifugação e desumidificados posteriormente, resultando finalmente o biodiesel, o qual deverá ter suas características enquadradas nas especificações das normas técnicas estabelecidas para o biodiesel como combustível para uso em motores do ciclo diesel.

**Destilação da glicerina:** A glicerina bruta, mesmo com suas impurezas convencionais, constitui um subproduto que pode ser comercializado. No entanto, o mercado é muito mais favorável à comercialização da glicerina purificada. Essa purificação pode ser feita por destilação a vácuo, resultando um produto límpido e transparente, denominado comercialmente de glicerina destilada. O produto da calda da destilação, ajustável na faixa de 10-15% da massa da glicerina bruta, é denominada “glicerina residual”, ainda encontra possíveis aplicações importantes.



**Figura 2.5.** Fluxograma do processo de produção de biodiesel.

### 2.10.1. Métodos de Detecção da Reação

Os métodos utilizados para comprovar a ocorrência da reação e detectar o ponto final são descritos a seguir:

- *Alteração na cor:* a mudança visual que ocorre é o desenvolvimento de coloração marrom que se intensifica com o progresso da reação catalisada química, não ocorrendo o mesmo nas reações catalisadas enzimaticamente. Normalmente a reação é processada por período de tempo fixo (0,5-1 h) após o aparecimento da cor escura.
- *Conteúdo de gordura sólida:* este parâmetro expressa a relação entre sólido-líquido da gordura em diversas temperaturas. As mudanças nos triacilgliceróis dos tipos trisaturados, disaturados e monoinsaturados provocadas pela interesterificação são refletidas nas curvas de sólidos antes e após a reação.
- *Concentração de glicerol:* o glicerol formado como subproduto pode ser determinado por diversos métodos analíticos e o cálculo da conversão é efetuado considerando que a concentração máxima de glicerol obtido na reação é da ordem de 10% em massa do óleo utilizado.
- *Análise da composição em acilgliceróis:* são utilizadas as técnicas de cromatografia em camada delgada, cromatografia em fase gasosa e ressonância magnética nuclear de próton (RMN  $^1\text{H}$ ) para quantificar os monoésteres de ácidos graxos formados durante o processo (MARANGONI e ROUSSEAU, 1995; GIOIELLI, 1998).

### 2.11. Enzimas

Enzimas são catalisadores de reações químicas em sistemas biológicos *in vivo*, envolvendo reações com substratos naturais e não naturais *in vitro* (STRYER, 1992; FABER, 1997). As enzimas são proteínas de alta massa molecular formadas por subunidades conhecidas como aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas de natureza protéica. São altamente específicas, apresentam elevados poder catalítico e possuem em suas estruturas grupos polares, tais como COOH, OH, NH<sub>2</sub>, SH e CONH<sub>2</sub>, que atuam como catalisadores.

O interesse em utilizar enzimas como catalisadores vem aumentando

gradativamente devido a sua alta versatilidade e às condições suaves de temperatura e pH em que se realizam as reações, apresentando grande importância na pesquisa científica, nos diagnósticos clínicos e na indústria. Entre as muitas vantagens da utilização de enzimas, três características são consideradas as mais importantes: quimiosseletividade, regioseletividade e enantioseletividade (FABER, 1997).

Entre todos os tipos de reações catalisadas por enzimas, as transformações hidrolíticas, envolvendo a formação de ligações imídicas e ésteres podem ocorrer facilmente usando-se proteases, esterases ou lipases. Quando a enzima está operando em um ambiente que tenha baixa concentração de água, qualquer outro nucleófilo pode competir com a água e formar o produto a partir de um intermediário acil-enzima, levando assim a várias transformações sinteticamente úteis. Durante o curso da reação catalisada enzimaticamente, qualquer tipo de quiralidade do substrato é reconhecida pela enzima, e isso causa uma preferência para as duas direções possíveis com relação a estereoquímica da reação. As enzimas hidrolíticas são os biocatalisadores mais usados em biotransformações (CASTRO *et al.*, 2004; FABER, 1997) sendo de particular e grande interesse para o desenvolvimento deste trabalho, as lipases.

### 2.11.1. Lipases

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases (FABER, 1997). A diferenciação entre uma lipase e uma esterase (EC. 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis (ALVAREZ-MACARIE *et al.*, 1999).

Entretanto, a diferenciação entre lipases e esterases ainda não está completamente definida. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética, que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/ água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água (SARDA e DESNUELLE, 1958).

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais com os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, por leveduras de

*Tulopsis* sp e *Candida* sp e bactérias como *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp e *Staphylococcus* sp. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases de fontes microbianas são preferíveis as lipases de fontes animais e plantas, devido ao alto custo do seu isolamento (CASTRO e ANDERSON, 1995; CASTRO *et al.*, 2004).

Entre as lipases, as de *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar* (DEREWENDA *et al.*, 1994), *Geotrichum candidum* (SCHRAG *et al.*, 1991), *Mucor miehei* (BRADY *et al.*, 1990), *Pseudomonas glumae* (CLEASBY *et al.*, 1992), *Candida rugosa* (anteriormente denominada *Candida cylindracea*) (GROCHULSKI *et al.*, 1994), *Candida antarctica* (UPPENBERG *et al.*, 1994), *Chromobacterium viscosum* (LANG *et al.*, 1996), lipase pancreática de cavalo (BOURNE *et al.*, 1994), lipase pancreática humana (WINKLER e GUBERNATOR, 1994) têm sua estrutura determinada. A massa molecular destas enzimas varia de 20-75 kDa. Seu ponto isoelétrico varia em uma faixa de 3,6 e 7,6, sendo majoritariamente ácidas, com pI entre 4 e 5 (FABER, 1997; FERRER *et al.*, 2000). 2000).

### 2.11.2. Mecanismo de Ação das Lipases

As estruturas tridimensionais da lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática humana foram determinadas em 1990 (JAEGER e REETZ, 1998). Até 1998, entre 12 estruturas de lipases elucidadas, todas eram membros da família “entrelace  $\alpha/\beta$  hidrolase”, com uma arquitetura comum composta de uma seqüência de  $\alpha$  hélices e fitas  $\beta$  (SCHMID e VERGER, 1997).

O cerne da lipase é composto de uma lâmina  $\beta$  central, consistindo de oito diferentes fitas  $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 8) conectadas por seis  $\alpha$  hélices (A-F). O sítio catalítico é formado por uma tríade catalítica (três aminoácidos), consistindo dos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina; o resíduo nucleofílico de serina é localizado no C-terminal da fita  $\beta$ 5, num pentapeptídico altamente conservado, GX SXG, o qual forma um “motivo” característico  $\beta$ -giro- $\alpha$ , chamado de “cotovelo nucleofílico” (JAEGER e REETZ, 1998).

As lipases atuam na interface óleo/ água de emulsões e são ativas inclusive em solventes orgânicos. A hidrólise do substrato inicia com um ataque nucleofílico ao átomo carboxílico da ligação éster pelo oxigênio da serina do sítio catalítico. Ocorre a formação de um intermediário tetraédrico, que é estabilizado pelos hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio dos resíduos da cadeia principal da enzima, que pertencem a

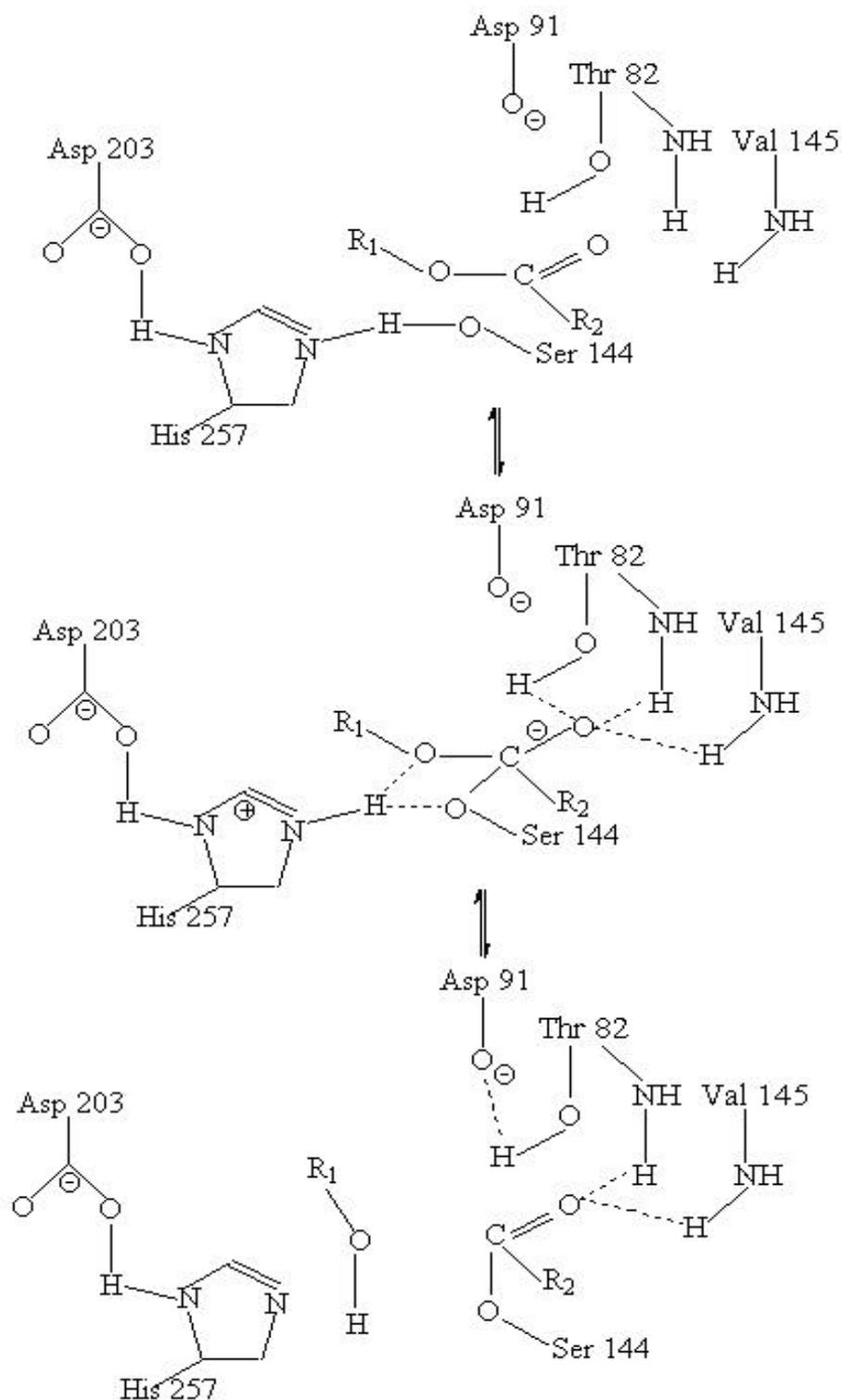
“cavidade oxianion” (JAEGER e REETZ, 1998). A cavidade oxianion é uma região eletrofílica em torno do resíduo de serina, criada pela reestruturação conformacional da lipase (PAIVA *et al.*, 2000). Um álcool é liberado após a formação do complexo acil-lipase, o qual é finalmente hidrolisado, liberando o ácido graxo e regenerando a enzima (Figura 2.6) (JAEGER e REETZ, 1998).

Um aspecto estrutural comum à maioria das lipases é a presença de uma tampa ou válvula, composta de uma seqüência peptídica em  $\alpha$  hélice, que cobre o sítio ativo e, na conformação fechada, isto é, na ausência de uma interface ou solvente, previne o acesso do substrato à tríade catalítica (VERGER, 1997; SCHMID e VERGER, 1997). O lado da tampa voltado para o sítio ativo é composto principalmente de cadeias laterais hidrofóbicas alifáticas, enquanto que a face oposta é hidrofílica e estabilizada pelas interações na superfície da proteína (YAHYA *et al.*, 1998).

A ativação de lipases na presença de superfícies hidrofóbicas (miscelas de substrato, solventes orgânicos imiscíveis, entre outras), fenômeno conhecido como ativação interfacial, é uma característica importante destas enzimas (YAHYA *et al.*, 1998).

O fenômeno de ativação interfacial é geralmente associado com a reorientação da estrutura  $\alpha$  helical da tampa, aumentando a hidrofobicidade da superfície nas vizinhanças do sítio ativo (YAHYA *et al.*, 1998). Na presença da interface lipídio/água, é postulado que a tampa sofre uma mudança conformacional (VERGER, 1997), produzindo a chamada “estrutura aberta” de lipases, a qual na exposição de superfícies hidrofóbicas da enzima, interagem com a interface hidrofóbica, conferindo funcionalidade à enzima (YAHYA *et al.*, 1998).

Atualmente é sabido que nem todas as lipases são ativadas por interfaces, como é o caso das lipases de *Pseudomonas glumae* e *Pseudomonas aeruginosa*, e, também, que tanto a qualidade como a quantidade da interface desempenha papel importante na ativação dessas enzimas (PAIVA *et al.*, 2000). A qualidade da interface, em termos de tensão interfacial, é um dos parâmetros mais decisivos quando se trabalha com enzimas lipolíticas, o que significa que comparações válidas somente podem ser feitas entre dados obtidos sob condições estritamente idênticas, preferencialmente no mesmo laboratório (VERGER, 1997).

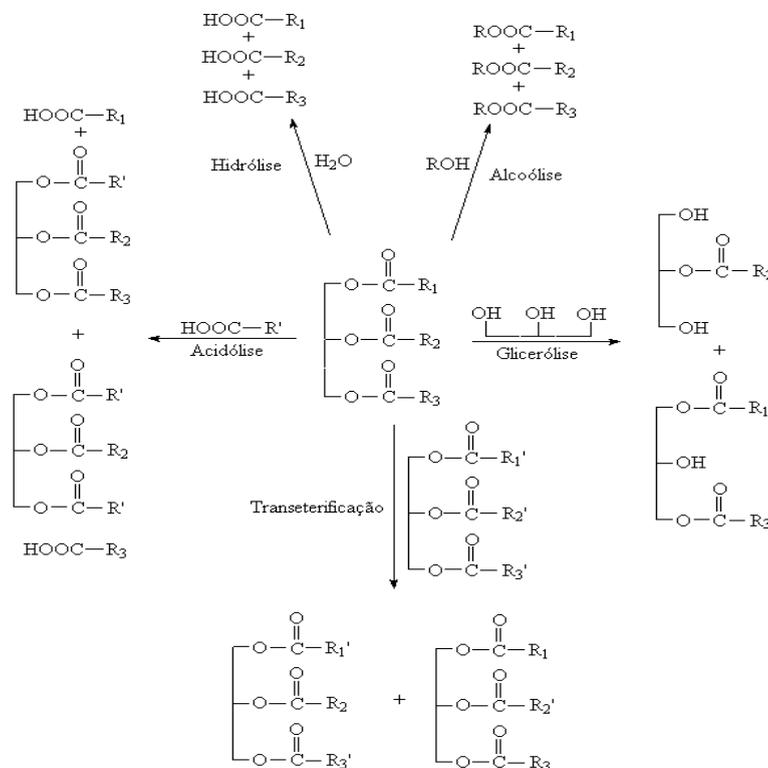


**Figura 2.6.** Mecanismo catalítico de lipases baseado na “tríade catalítica” de serina (nucleófilo), histidina e apartato ou glutamato (SCHMID e VERGER, 1997).

### 2.11.3. Reações Catalisadas por Lipases

Lipases catalisam a clivagem de ligações éster via reação de hidrólise (com concomitante consumo de moléculas de água) (PAIVA *et al.*, 2000). Também podem catalisar a reação reversa, isto é, a formação de ésteres a partir de um álcool, como glicerol, e um ácido carboxílico de cadeia longa, como um ácido graxo, com liberação de moléculas de água, num processo denominado esterificação (YAHYA *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 2004). O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional (Figura 2.7).

Esses dois processos básicos podem ser combinados num padrão seqüencial para dar origem a um grupo de reações usualmente denominadas de interesterificações, que, dependendo do substrato de partida, podem ser acidólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um ácido carboxílico), alcoólise (quando o grupo acila é deslocado entre um éster e um álcool) e transesterificação (quando dois grupos acilas são deslocados entre dois ésteres), sem ocorrer nem consumo nem formação de água (Figura 2.7) (CASTRO *et al.*, 2004).



**Figura 2.7.** Reações catalisadas por lipases (CASTRO *et al.*, 2004).

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis em meio orgânico, apresentam especificidade, regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. As lipases têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, mais recentemente, em diversas aplicações industriais (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998; CASTRO *et al.*, 2004).

#### 2.11.4. Especificidade

A especificidade de lipases é um fator decisivo para a sua aplicação analítica ou industrial (CASTRO e ANDERSON, 1995). Em geral, as lipases podem ser classificadas em dois grupos: não regiosseletivas e regiosseletivas (CASTRO e ANDERSON, 1995; TOMBS, 1995).

Lipases não regiosseletivas não apresentam especificidade em relação a posição da ligação éster na molécula de glicerol, catalisando a clivagem completa de triacilglicerídeos a glicerol e ácidos graxos, embora diacilgliceróis e monoacilgliceróis sejam intermediários na reação (CASTRO e ANDERSON, 1995). Nesse grupo estão incluídas lipases produzidas por *Candida* sp. e *Staphylococcus* sp. (TOMBS, 1995).

Lipases regiosseletivas apresentam especificidade do tipo *sn*-1,3, com a liberação preferencial de ácidos graxos das posições terminais do glicerol, como as lipases pancreáticas e de várias espécies de *Mucor* e *Rhizopus* (FABER, 1997). Com essas lipases, triacilgliceróis são hidrolisados produzindo ácidos graxos livres, 1,2 (2,3)-diacilgliceróis e 2-monoacilgliceróis. Porém, como os grupos acilas migram espontaneamente de uma posição a outra na molécula de glicerol, as lipases do tipo *sn*-1,3 também são capazes de catalisar a hidrólise completa com o prolongamento da reação, uma vez, que a taxa de hidrólise de triglicerídeos é normalmente mais rápida que a de di- e monoglicerídeos (CASTRO e ANDERSON, 1995; TOMBS, 1995).

#### 2.11.5. Uso de Lipases Imobilizadas em Meio não Aquoso

Quando a água é substituída por um solvente orgânico, alterações na conformação nativa da enzima podem ocorrer tanto na estrutura terciária como nas mais proeminentes estruturas secundárias ( $\alpha$ -hélice e a conformação  $\beta$ ) acarretando, desta maneira, a sua desestabilização. Com o objetivo de assegurar uma conformação

enzimática cataliticamente ativa em meio orgânico, a molécula de enzima deve ter uma camada de hidratação definida (CASTRO e ANDERSON, 1995), separando o solvente do contato com a superfície da proteína e contribuindo para o aumento da sua flexibilidade interna. Uma outra maneira de proteger a configuração nativa da enzima é por meio de sua insolubilização em suportes sólidos. A imobilização da enzima tem um efeito benéfico na sua estabilidade, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima. A imobilização, também auxilia na dispersão homogênea da enzima no meio orgânico, o que é essencial, para a condução de reações enzimáticas (CASTRO e ANDERSON, 1995; BALCÃO *et al.*, 1996; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Diversas preparações de lipase imobilizada podem ser adquiridas de diversos fornecedores, como: Sigma-Aldrich, Fluka, Novozyme, Amano, entre outros, conforme mostrado na Tabela 2.6, que também apresenta os preços divulgados nos catálogos desses fornecedores.

Devido ao custo elevado dessas preparações imobilizadas, inúmeros trabalhos são encontrados na literatura que tratam das diferentes técnicas de imobilização de lipases, caracterização dos complexos ativados e aplicações em reações que se processam em meio aquoso ou não-aquoso (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

**Tabela 2.6.** Cotação de preparações de lipase imobilizada em diferentes suportes.

Fonte de Lipase	Descrição do suporte	Preço (US\$/g)
<i>Candida antarctica</i>	Sol-gel-AK ou vidro sinterizado	32,12
	Resina acrílica (Novozym 435)	5,00
<i>Candida cylindracea</i>	sol-gel-AK	56,80
	Resina acrílica	30,00
<i>Candida rugosa</i>	POS-PVA	0,87
	Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .nH <sub>2</sub> O	0,38
<i>Mucor miehei</i>	sol-gel-AK	50,50
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sol-gel-AK ou vidro sinterizado	31,76
<i>Rhizomucor miehei</i>	Resina de troca iônica macroporosa (Lipozyme)	2,00
Lipase pancreática	POS-PVA	0,63*

\*custos calculados por MIRANDA (2004), BRUNO (2003) e PAULA (2003), conforme detalhado nas Tabelas 2.7 e 2.8.

Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, tem sido estudada para a imobilização de lipases (CASTRO *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2000; PEREIRA *et*

*al.*, 2001; SOARES *et al.*, 2002; BRUNO, 2003, MIRANDA, 2004). Estudos comparativos mostram diferenças acentuadas no desempenho de lipases imobilizadas nos vários suportes, e evidenciam que apesar das várias experiências reportadas na literatura, a imobilização de lipases ainda é um desafio complexo, uma vez que a extensão da imobilização depende da estrutura da enzima, método de imobilização e do tipo de suporte. Em muitos casos, suportes que proporcionam uma elevada atividade e estabilidade da enzima, apresentam sérias limitações de resistência mecânica e de queda de pressão, o que os tornam inviáveis para a utilização em alguns tipos de reatores.

Os métodos e suportes disponíveis atualmente são inúmeros e a escolha é uma estratégia baseada em processos específicos de catálise, incluindo parâmetros como atividade enzimática, utilização efetiva da lipase, desativação e características de regeneração, custo, toxicidade dos reagentes de imobilização, propriedades finais da lipase imobilizada (VILLENEUVE *et al.*, 2000; YAHYA *et al.*, 1998).

Recentemente no Laboratório de Biocatálise da Faculdade de Engenharia Química de Lorena duas novas matrizes foram avaliadas para imobilização da enzima lipase, a saber: óxido de nióbio hidratado ( $\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) e polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA). Considerando os resultados promissores alcançados nos trabalhos desenvolvidos por BRUNO *et al.* (2004); PAULA (2003) e MIRANDA (2004) e para dar continuidade à linha de pesquisa, o presente trabalho verificou o desempenho das lipases pancreática e *Candida rugosa* imobilizada nesses suportes na interesterificação do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta.

As Tabelas 2.7 e 2.8 apresentam o custo do processo de obtenção da lipase imobilizada em óxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) e em polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA), a partir do preparo do suporte e dos métodos utilizados para sua modificação química. Considerou-se, para efeito de base de cálculo, o processamento de uma partida de 100 g de suporte para a produção do biocatalisador imobilizado e custos declarados em catálogos de preços.

**Tabela 2.7.** Avaliação econômica do procedimento de imobilização da lipase de *Candida rugosa* em óxido de nióbio.

Material	Custo (US\$)
100 g de Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .nH <sub>2</sub> O	1,73
1,6 ML de aminopropiltrietoxisilano	0,20
60 mL de glutaraldeído a 25%	4,30
25 g de lipase <i>Candida rugosa</i>	31,82
<b>Custo Total:</b>	<b>38,05</b>

Fonte: MIRANDA (2004)

**Tabela 2.8.** Avaliação econômica do procedimento de imobilização da lipase pancreática<sup>a</sup> e *Candida rugosa*<sup>b</sup> em polisiloxano-álcool polivinílico.

Material	Custo (US\$)	
* 125 mL de tetraetilortosilicato (TEOS)	41,40	
* 125 mL de etanol	0,18	
* 150 mL de solução de álcool polivinílico 2%	7,96	
* 60 mL de glutaraldeído a 25%	4,30	
25 g de lipase	9,80 <sup>a</sup>	31,82 <sup>b</sup>
<b>Custo Total:</b>	<b>63,64<sup>a</sup></b>	<b>86,66<sup>b</sup></b>

\*Materiais para obter 100 g do suporte POS-PVA

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

##### 3.1.1. Enzimas

No desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizadas cinco preparações de lipase imobilizada em diferentes suportes. Duas adquiridas comercialmente da Novozymes (Dinamarca): Lipozyme IM<sup>20</sup> e Novozym 435. Uma preparação de lipase pancreática (LPP, pâncreas de porco, Tipo II, Sigma) imobilizada em polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA), e outras duas preparações de lipase de *Candida rugosa* (LCR, Tipo VII, Sigma) imobilizada em partículas de polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) e óxido de nióbio hidratado (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. nH<sub>2</sub>O).

Lipozyme IM<sup>20</sup> é uma lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada por adsorção em uma resina de troca aniônica macroporosa (tamanho de partícula de 0,2 a 0,6 mm). Essa preparação de lipase é classificada como 1,3-específica e termo-estável, podendo ser usada em temperaturas entre 30°C e 70°C. No entanto, para estender a estabilidade operacional é recomendado trabalhar em temperaturas na faixa de 40-60°C. Essa preparação de lipase pode ser usada em meio livre de solvente ou na presença de solventes biocompatíveis. A Novozym 435 é uma enzima microbiana de *Candida antarctica* imobilizada em resina polimérica que apresenta uma elevada estabilidade térmica, sendo recomendada pelo fabricante para uso em meio orgânico.

Amostra comercial de lipase de *Candida rugosa* (LCR) é classificada como regioinespecífica e tem habilidade de liberar todos os tipos de ácidos graxos (tanto de cadeias médias e longas) independente da sua posição no triglicerídeo (FABER, 1997). A técnica de eletroforese em gel mostra uma proteína única com uma massa de 63 kDa para LCR fornecida pela Sigma (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998).

Lipases pancreáticas têm uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa e são normalmente isoladas de pâncreas ou biles de animais. São preparações geralmente impuras, contendo diversas outras hidrolases, como esterases, proteases, entre outras. A lipase pancreática da Sigma (LPP) contém cerca de 8-20% de proteína e de acordo com informações de literatura (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998) apresenta como proteínas contaminantes  $\alpha$ -quimotripsina, carboxipeptidase B, proteases, fosfolipases e colesterol esterases.

A caracterização bioquímica e cinética dessas preparações pode ser encontrada nos catálogos informativos da Novozymes e nos trabalhos desenvolvidos por BRUNO

(2003), PAULA (2003) e MIRANDA (2004). As atividades dessas preparações bem como as fotografias ilustrativas dos sistemas imobilizados são apresentadas na Tabela 3.1 e Figuras 3.1, respectivamente.

**Tabela 3.1.** Atividade enzimática (U/mg de suporte) das preparações de lipase imobilizadas utilizadas no desenvolvimento do trabalho experimental.

	Lipozyme IM <sup>20</sup>	Novozym 435	<i>Candida rugosa</i>		
			Pancreática POS-PVA	POS-PVA	Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Atividade (U/mg)	234,30	1,10	465,52	280,28	125,32

Método de hidrólise do azeite de oliva (emulsão 50%; pH 7,0; temperatura 37 °C).



**Figura 3.1.** Ilustração dos sistemas imobilizados: (a) Lipozyme IM<sup>20</sup>; (b) Novozym 435; (c) LPP imobilizada em POS-PVA; (d) LCR imobilizada em POS-PVA; (e) LCR imobilizada em Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

### 3.1.2. Óleo Vegetal

Todos os experimentos foram realizados com óleo de babaçu, fornecido pela COGNIS (São Paulo, Brasil) tendo a seguinte composição em ácidos graxos (em m/v): 3,5% octanóico, 4,5% decanóico, 44,7% láurico, 17,5% mirístico, 9,7% palmítico, 3,1% esteárico, 15,2% oleico e 1,8% linoleico e massa molecular média de 709,90 g/mol.

### 3.1.3. Reagentes Analíticos

Na síntese dos padrões cromatográficos (monoésteres de ácidos graxos) foram utilizados os ácidos graxos presentes na composição do óleo de babaçu: octanóico (Vetec), decanóico (Riedel-de Haën), mirístico, palmítico, esteárico (Merk), e oleico (Reagen). Como álcoois foram utilizados: etanol (99,5%, Vetec), propanol (99,5%, Reagen) e butanol (99,5%, Merck). Foram também utilizados outros reagentes como: cloreto de tionila ( $\text{SOCl}_2$ ), toluol (Merck), heptano P.A. (Labsynth), hexano P.A. (Labsynth), etilenoglicol 50% (Merck), hidróxido de sódio (Merck), periodato de sódio (Nuclear) e ácido sulfúrico P.A. (Isifar).

### 3.1.4. Equipamentos

Foram utilizados: Potenciômetro modelo TEC2 (Tecnal, Brasil - aferido com soluções tampão de acetato de sódio e fosfato de sódio) para medida de pH, Cromatógrafo a gás modelo GC-3800 (Varian, Estados Unidos) para dosagens dos álcoois consumidos e monoésteres de ácidos graxos formados, RMN 300MHz modelo Mercury (Varian) para caracterização dos padrões cromatográficos. E outros equipamentos para procedimentos rotineiros, tais como: balança analítica modelo AY220 (Shimadzu, Estados Unidos), placa provida de agitação magnética e temperatura controladas modelo 752A (Fisatom, Brasil).

## 3.2. Metodologia Experimental

### 3.2.1. Síntese Química dos Monoésteres de Alquilas (Padrões Cromatográficos) empregando Cloreto de Acila de Ácido Carboxílico e $\text{SOCl}_2$

A Figura 3.2 apresenta o fluxograma referente ao procedimento experimental adotado nas sínteses dos ésteres etílicos, propílicos e butílicos, bem como as reações químicas envolvidas e montagens experimentais.

As sínteses foram conduzidas em reatores fechados de 100 mL contendo 10 g de ácido graxo e 2,0 equivalente-gramas de  $\text{SOCl}_2$  por 24 h sob agitação magnética de 200 rpm a 25°C (Figura 3.2 a). O  $\text{SOCl}_2$  residual foi removido por evaporação a vácuo (Figura 3.2 b) e em seguida, foram adicionados ao meio 5,0 equivalente-gramas de álcool (EtOH, PrOH ou ButOH). A esterificação foi efetuada sob agitação magnética de 200 rpm a 25°C por 24 h. O HCl formado durante a reação e o álcool residual foram removidos do meio reacional por evaporação a vácuo (Figura 3.2c).



### 3.2.2. Estabelecimento do Método Cromatográfico para Dosagem do Biodiesel

A cromatografia de fase gasosa é uma ferramenta muito eficaz na determinação de composições, mesmo para amostras contendo baixos teores. No presente trabalho, a aplicação dessa técnica permitiu separar quantitativamente os ésteres existentes no biodiesel produzido por interesterificação do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta (etanol, propanol e butanol).

As condições estabelecidas para cada método de análise são resumidas na Tabela 3.2, em termos de regulagem do aparelho quanto as temperaturas (coluna, ionizador de chama, vaporizador), vazões (gases de chama e gás de arraste), atenuação e zeragem da linha de base no integrador. O cromatógrafo foi operado com uma coluna empacotada de aço inoxidável (6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh, HP).

**Tabela 3.2.** Condições de operação do cromatógrafo para os métodos de dosagem dos monoésteres.

Método	Padrão Interno	Temperatura de aquecimento da coluna	Outras Condições
Monoésteres de etila	Heptanol (21,09 g/L)	120 °C por 10 min 170 °C por 26 min 25 °C/ min	Amostra+ padrão interno (1:1) injetar 1 µL  <b>Temperatura</b> Ionizador (190 °C) Vaporizador (190 °C) Dectetor (230° C)  <b>Vazão dos gases</b> Nitrogênio (25 - 30 mL/min) Hidrogênio (27 mL/min) Ar sintético (300 mL/min)
Monoésteres de propila	Hexanol (22,17g/L)	130 °C por 10 min 170 °C por 32 min 30 °C/ min	
Monoésteres de butila	Hexanol (22,17g/L)	150 °C por 15 min 180 °C por 24 min 30 °C/ min duração: 40 min	

Para determinar os tempos de retenção de cada éster e rampas de temperaturas, as amostras dos ésteres foram diluídas em heptano (30 g/L) e em seguida, 1µL de cada amostra foi injetada no cromatógrafo (Tabela 3.3). Os métodos foram estabelecidos e ativados segundo procedimento descrito no Manual de Operação da Workstation Varian Versão 4.5, gerando os cromatogramas apresentados no Apêndice 8.3. Em seguida, os métodos foram calibrados com uma injeção de 1µL da mistura dos ésteres diluídos em heptano (30 g/L) contendo o padrão interno previamente estabelecido.

**Tabela 3.3.** Determinação dos tempos de retenção para cada composto presente nas amostras padrões de mistura de monoésteres.

	Monoésteres de etila		Monoésteres de propila		Monoésteres de butila	
	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)
PI	0,68	21,09	0,95	22,17	0,91	22,17
C8	3,94	30,69	2,90	30,76	3,33	32,30
C10	6,46	31,05	6,22	32,36	4,70	30,50
C12	9,10	32,16	11,59	31,36	9,54	31,08
C14	12,14	32,76	15,00	30,32	17,01	34,26
C16/18	15,86	31,75	21,24	34,80	23,06	30,16
C18:1	20,86	31,73	34,95	30,74	35,74	31,00

PI: Padrão Interno

### 3.2.3. Reações de Interesterificação por Via Química

As reações foram conduzidas em reatores fechados com capacidade de 50 mL, acoplados com condensadores, contendo 6,4 gramas do óleo de babaçu, 6,00 g do álcool (EtOH, PrOH ou ButOH) e 0,16; 0,22 ou 0,30 g de NaOH, para os experimentos utilizando etanol, propanol ou butanol. O NaOH foi dissolvido no álcool durante um período de 24 h, para a formação do grupo etóxido, propóxido e butóxido de sódio (COSTA NETO, 2002). Os experimentos foram realizados nas temperaturas de 78, 97 e 117°C, respectivamente, sob agitação constante de 150 rpm, durante um período máximo de 8 h (Apêndice 8.4). Amostras foram retiradas em intervalos periódicos para quantificação dos ésteres formados por cromatografia de fase gasosa.

### 3.2.4. Reações de Interesterificação por Via Enzimática

As reações foram conduzidas em reatores fechados com capacidade de 50 mL, acoplados com condensadores, contendo 12,4 g de substrato composto por álcool e óleo de babaçu, sem adição de solventes, numa razão mássica de álcool: óleo igual a 1. As misturas foram incubadas com as diferentes preparações de lipase imobilizada nas proporções de 7-10% (m/m) em relação à massa total dos reagentes envolvidos no meio reacional. Os experimentos foram realizados na faixa de temperatura de 40 a 50°C, dependendo do sistema reacional, conforme anteriormente estabelecido (URIOSTE e CASTRO, 2004). As reações foram conduzidas por um período máximo de 168 h, sob agitação magnética constante de 150 rpm. Amostras foram retiradas em intervalos periódicos para quantificação do consumo de álcool e da formação dos monoésteres por cromatografia de fase gasosa. Os experimentos foram realizados em duplicata ou

triplicatas e os valores médios obtidos são apresentados nos Apêndices 8.4 a 8.8. O rendimento da reação de interesterificação foi calculado de acordo com a equação 3.1.

$$Y (\%) = \frac{P_m}{P_{AG}} \times 100 \quad (3.1)$$

Em que: Y = Rendimento da reação de interesterificação em porcentagem; P<sub>m</sub> = Porcentagem de monoéster formado (%); P<sub>AG</sub> = Porcentagem do ácido graxo presente no óleo de babaçu (%).

### 3.3. Métodos Analíticos

#### 3.3.1. Caracterização do Óleo de Babaçu

##### 3.3.1.1. Índice de Acidez

O índice de acidez foi determinado conforme metodologia descrita por MORETTO e FETT (1989). Em um frasco Erlenmeyer de 125 mL, foram colocados 2 g de óleo de babaçu e 25 mL de solução neutralizada de éter de petróleo e álcool etílico (2:1). Adicionou-se 2 gotas de fenolftaleína e a amostra foi titulada com solução 0,1 N de NaOH. O índice de acidez (IA %) foi calculado de acordo com a equação 3.2.

$$IA (\%) = \frac{V \cdot F}{M} \times 100 \quad (3.2)$$

Em que: V = Volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL); F = Fator de correção da solução de NaOH 0,1N; M = Massa da amostra (g).

##### 3.3.1.2. Índice de Saponificação

Índice de saponificação é definido como sendo o número de miligramas de KOH requerido para saponificar um grama de lipídeos. O índice de saponificação foi determinado conforme metodologia descrita por MORETTO e FETT (1989). Em um frasco Erlenmeyer foram adicionados 2 g do óleo e, com auxílio de uma bureta, 20 mL de solução alcoólica de KOH a 4%. Adaptou-se o Erlenmeyer a um condensador de refluxo e a amostra foi aquecida brandamente, por um período de 30 min. Resfriou-se e adicionou-se 3 gotas de fenolftaleína. Titulou-se a mistura com solução de HCl 0,5 N, até desaparecer a coloração rósea. Esse mesmo procedimento foi feito para o controle. A diferença entre os volumes de HCl gastos nas duas titulações é equivalente à quantidade de KOH gasto na saponificação. O índice de saponificação foi calculado de acordo com a equação 3.3.

$$IS = \frac{3.(V_a - V_b). F. 56,11}{M} \quad (3.3)$$

Em que:  $V_a$ = Volume gasto de HCl na titulação da amostra (mL);  $V_b$ = Volume gasto de HCl na titulação do controle (mL);  $F$ = Fator de correção da solução de HCl 0,5 N;  $M$ = Massa da amostra (g).

### 3.3.1.3. Porcentagem de ácidos graxos livres

A porcentagem de ácidos graxos livres foi determinada conforme metodologia descrita por MORETTO e FETT (1989). Em um Erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 8 g da amostra e 50 mL de álcool etílico a 95%, neutralizado com solução 0,1 N de NaOH e fenolftaleína, como indicador. O sistema foi aquecido até a ebulição e titulada, a quente, com a solução de NaOH, até coloração rósea por 15 segundos. A porcentagem de ácidos graxos livres foi calculada pela equação 3.4.

$$AGL (\%) = \frac{(V_2 - V_1). N. 28,2}{M} \times 100 \quad (3.4)$$

Em que:  $V_2$ = Volume gasto de NaOH na 1ª titulação (mL);  $V_1$ = Volume gasto de NaOH na 2ª titulação (mL);  $N$ = Concentração normal da solução de NaOH;  $M$ = Massa da amostra (g).

### 3.3.1.4. Concentração de glicerol livre

A determinação da concentração de glicerol consiste na reação do glicerol contido na amostra com periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) em solução aquosa ácida para produzir formaldeído e ácido fórmico: este último foi utilizado para deduzir a concentração de glicerol (COKS e VAN REDE, 1966). A amostra contendo entre 1 a 2 g de gordura foi previamente diluída em 50 mL de água destilada e acidificada com ácido sulfúrico 0,2 N, utilizando azul de bromotimol como indicador. A solução foi, então, neutralizada com NaOH 0,05N até coloração azul. Em seguida, 100 mL de solução de metaperiodato de sódio (60 g/L) foram adicionados às amostras e essas mantidas ao abrigo da luz por 30 min. Após este período, 10 mL de uma solução aquosa de etilenoglicol (1:1) foram adicionados à mistura que foi deixada à temperatura ambiente, no escuro, por mais 10 min. As amostras foram, então, diluídas para um volume de 300 mL com água destilada e tituladas com solução de NaOH 0,125 N, usando pHmetro para determinar o ponto final. A porcentagem de glicerol contida na amostra foi determinada pela equação 3.5.

$$\text{Glicerol (\% p/p)} = \frac{9,209 \cdot N \cdot (V_1 - V_2)}{M} \cdot 100 \quad (3.5)$$

Em que:  $N$  = Normalidade da solução de NaOH;  $V_1$  = Volume da solução de NaOH gasto para titular a amostra (mL),  $V_2$  = Volume da solução de NaOH gasto para titular o controle (mL),  $M$  = Massa de amostra utilizada (g).

### 3.3.1.5. Massa específica

A massa específica foi determinada pesando-se um balão volumétrico de 10 mL vazio. Em seguida, adicionou-se o óleo até a altura do menisco, e pesou-se o balão cheio de óleo. A massa específica do óleo foi determinada pela equação 3.6.

$$\text{Massa específica (g / cm}^3\text{)} = \frac{(m_1 - m_2)}{V} \quad (3.6)$$

Em que:  $V$  = Volume do balão utilizado (10 mL = 10 cm<sup>3</sup>),  $m_1$  = massa do balão contendo óleo (gramas),  $m_2$  = massa do balão vazio (gramas).

### 3.3.2. Caracterização dos Monoésteres de Ácidos Graxos por RMN <sup>1</sup>H

As estruturas dos ésteres obtidos por via química foram confirmadas pela análise de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN <sup>1</sup>H). Os espectros foram obtidos no aparelho Varian modelo Mercury 300 MHz. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referenciados pelo sinal do TMS (Tetra-metil-silano -  $\delta = 0$ ) em solvente CDCl<sub>3</sub>. Cada espectro foi analisado calculando-se a integração dos números relativos de hidrogênio presente na estrutura química do monoéster de ácido em 0,00-6,00 ppm.

### 3.3.3. Determinação dos Produtos Formados e Álcool Consumido

As concentrações dos ésteres formados na reação de alcoólise do óleo de babaçu com os álcoois (EtOH, PrOH e ButOH) foram determinadas por cromatografia de fase gasosa, utilizando-se uma coluna empacotada (6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh, HP), operando nas condições definidas no item 3.2.3. As concentrações de etanol, propanol e butanol foram também determinadas por cromatografia de fase gasosa, empregando a mesma coluna nas condições descritas nas Tabelas 3.4.

**Tabela 3.4.** Condições de operação do método de dosagem dos álcoois etanol, propanol e butanol por cromatografia fase gasosa.

<b>Método</b>	<b>Padrão Interno</b>	<b>Temperatura de aquecimento da coluna</b>	<b>Outras Condições</b>
Etanol	Butanol (15,02 g/L)	60° C	Amostra+ padrão interno (1:1) injetar 1 µL  <b>Temperatura</b> Ionizador (190 °C) Vaporizador (190 °C)  <b>Vazão dos gases</b> Nitrogênio (30 mL/min) Hidrogênio (27 mL/min) Ar sintético (300 mL/min)
Propanol	Butanol (15,02 g/L)	60° C	
Butanol	Hexanol (22,17 g/L)	75° C	

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e analisados os resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho. A Tabela 4.1 orienta o leitor sobre a seqüência de apresentação e discussão dos resultados obtidos, assim como o item da metodologia empregada para a coleta dos dados.

**Tabela 4.1.** Disposição geral dos ensaios realizados.

Ensaio realizado	Resultados e Discussão	Metodologia
Caracterização do óleo de babaçu	4.1	3.3.1
• Índice de acidez		3.3.1.1
• Índice de saponificação (mg KOH/g)		3.3.1.2
• Massa específica (g/cm <sup>3</sup> )		
• Ácidos graxos livres (%)		3.3.1.3
• Glicerol livre (%)		3.3.1.4
• pH		
Padrões cromatográficos de monoésteres de ácidos graxos	4.2	
• Síntese química dos padrões cromatográficos	4.2.1	3.2.1
• Caracterização dos monoésteres por RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, 300Hz)	4.2.2	3.3.2
Interesterificação química do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta para verificar a eficiência dos métodos de análise elaborados	4.3	3.2.3
Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com álcoois empregando diferentes preparações de lipase	4.4	3.2.4
• Atuação da Lipozyme IM <sup>20</sup> na obtenção de biodiesel	4.5.1	
• Atuação da Novozym 435 na obtenção de biodiesel	4.5.2	
• Atuação da lipase pancreática (LPP) imobilizada em POS-PVA na obtenção de biodiesel	4.5.3	
• Atuação da lipase de <i>Candida rugosa</i> (LCR) imobilizada em POS-PVA e em Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .nH <sub>2</sub> O na obtenção de biodiesel	4.5.4	
Comparação do desempenho dos sistemas imobilizados na reação de interesterificação enzimática.	4.6	
Comparação do rendimento da interesterificação enzimática e química	4.7	

#### 4.1. Caracterização do Óleo de Babaçu

Na Tabela 4.2 é apresentada a composição do óleo de babaçu em termos de ácidos graxos livres, índice de acidez, índice de saponificação, massa específica e glicerol utilizando a metodologia descrita na seção 3.3.1. Por se tratar de um óleo refinado, os valores encontrados, principalmente em relação ao índice de acidez (0,95%) e a concentração de ácidos graxos livre (0,06%) estão em faixas adequadas para utilização na reação de interesterificação. Óleos com elevado índice de acidez inibem a atuação de catalisadores químicos ou bioquímicos (ROSENAAL, 1992).

**Tabela 4.2.** Caracterização do óleo de babaçu

<b>Características</b>	<b>Óleo de babaçu</b>
Índice de acidez (%)	0,95
Índice de saponificação (mg KOH/g)	346,60
Massa específica (g/cm <sup>3</sup> )	0,21
Ácidos graxos livres (%)	0,06
Glicerol livre (%)	0,91
pH	5,00

#### 4.2. Padrões Cromatográficos de Monoésteres de Ácidos Graxos

##### 4.2.1. Síntese Química dos Padrões Cromatográficos

Uma das principais dificuldades no estudo ou aplicação industrial de processos de interesterificação de óleos vegetais é a caracterização dos monoésteres formados, tendo em vista o elevado custo desses padrões cromatográficos. Para quantificar com precisão os ésteres formados na interesterificação do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta, foi necessário, inicialmente, sintetizar os padrões cromatográficos (ésteres de ácidos graxos) por via química, tomando como referência a composição em ácidos graxos presentes no óleo de babaçu.

Desta forma, os ésteres de etila, propila e butila foram preparados de acordo com a metodologia descrita em 3.2.1. Os monoésteres foram purificados por destilação a pressão reduzida e caracterizados por análise de Ressonância Magnética Nuclear de Próton, a fim de se comprovar suas estruturas químicas. A Tabela 4.3 apresenta a relação de monoésteres sintetizados.

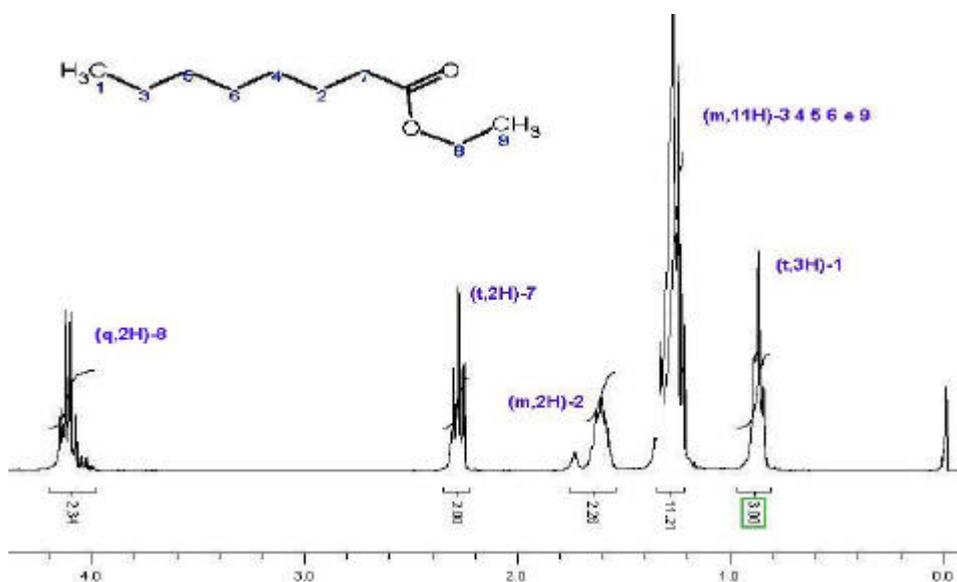
**Tabela 4.3.** Relação dos monoésteres sintetizados por via química.

Ácidos graxos	Número de carbonos	Porcentagem no óleo de babaçu (%)	Monoésteres		
			Etila	Propila	Butila
Octanóico	C8	3,5	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Decanóico	C10	4,5	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Láurico	C12	44,7	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Mirístico	C14	17,5	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
Palmítico	C16	9,7	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>
Estearíco	C18	3,1	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>
Oleico	C18:1	15,2	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>

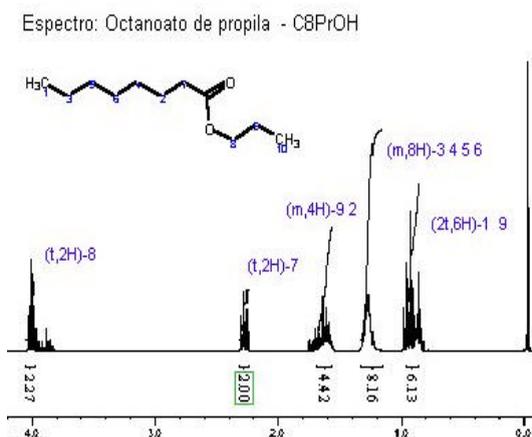
#### 4.2.2. Caracterização dos Monoésteres por RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ, 300Hz)

As estruturas dos monoésteres purificados foram confirmadas pela análise de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN <sup>1</sup>H), como descrito em 3.3.2.

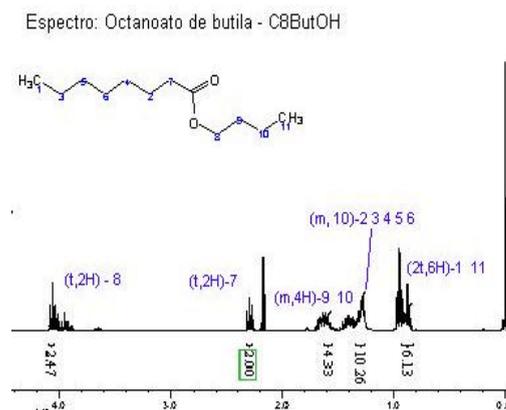
Como forma de ilustração, as Figuras 4.1 a 4.3 apresentam os espectros de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ, 300Hz) obtidos para os monoésteres octanoato de etila, propila e butila. Os espectros dos demais monoésteres são mostrados no Apêndice 8.2. Nas Tabelas 4.4 a 4.6 são identificados os sinais de deslocamento verificados para cada estrutura química.



**Figura 4.1.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (4,50 – 0,50 ppm) do éster octanoato de etila obtido a 300 Hz com CDCl<sub>3</sub>.



**Figura 4.2.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (4,50 – 0,50 ppm) do éster octanoato de propila obtido a 300 Hz com  $\text{CDCl}_3$ .



**Figura 4.3.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (4,50 – 0,50 ppm) do éster octanoato de butila obtido a 300 Hz com  $\text{CDCl}_3$ .

**Tabela 4.4.** Análise dos espectros obtidos para os monoésteres de etila.

Espectros	Análises das estruturas
Octanoato de etila	RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , ppm, 300Hz, $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$ ): 4.20-3.98(q, 2H); 2.34-2.22(t, 2H); 1.75-1.54(m, 2H); 1.35-1.21(m, 11H); 0.96-0.81(t, 3H)
Decanoato de etila	RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , ppm, 300Hz, $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$ ): 4.21-4.06(q, 2H); 2.35-2.24(t, 2H); 1.69-1.55(m, 2H); 1.40-1.20(m, 15H); 0.96-0.82(t, 3H)
Laurato de etila	RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , ppm, 300Hz, $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$ ): 4.18-4.05(q, 2H); 2.35-2.25(t, 2H); 1.69-1.54(m, 2H); 1.33-1.22(m, 19H); 0.96-0.84(t, 3H).
Miristato de etila	RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , ppm, 300Hz, $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ): 4.22-4.05(q, 2H); 2.35-2.17(t, 2H); 1.74-1.57(m, 2H); 1.38-1.22(m, 23H); 0.98-0.84(t, 3H)
Palmitato de etila	RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , ppm, 300Hz, $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ ): 4.24-4.04(q, 2H); 2.37-2.22(t, 2H); 1.91-1.39(m, 2H); 1.36-1.20(m, 27H); 0.95-0.83(t, 3H)
Estearato de etila	RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , ppm, 300Hz, $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$ ): 4.15-4.04(q, 2H); 2.30-2.20(t, 2H); 1.78-1.44(m, 2H); 1.41-0.93(m, 31H); 0.89-0.82(t, 3H)
Oleato de etila	RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ , ppm, 300Hz, $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$ ): 5.50-5.17(m, 2H); 4.20-4.01(q, 2H); 2.32-2.21(t, 2H); 2.17-1.75(m, 4H); 1.74-1.44(m, 2H); 1.42-1.04(m, 23H); 0.92-0.78(t, 3H)

**Tabela 4.5.** Análise dos espectros obtidos para os monoésteres de propila.

<b>Espectros</b>	<b>Análises das estruturas</b>
Octanoato de propila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> ): 4.05-3.97(t,2H); 2.31-2.23(t,2H); 1.68-1.56(m,4H); 1.32-1.15(m,8H); 0.96-0.85(2t, 6H)
Decanoato de propila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> ): 4.07-3.98(t,2H); 2.35-2.25(t,2H); 1.72-1.57(m,4H); 1.34-1.19(m,12H); 0.98-0.84(2t, 6H)
Laurato de propila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> ): 4.03-3.96(t,2H); 2.31-2.23(t,2H); 1.68-1.55(m,4H); 1.32-1.20(m,16H); 0.95-0.81(2t, 6H)
Miristato de propila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> ): 4.07-3.94(t,2H); 2.31-2.25(t,2H); 1.68-1.57(m,4H); 1.49-1.01(m,22H); 0.98-0.82(2t, 6H)
Palmitato de propila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> ): 4.05-3.97(t,2H); 2.32-2.25(t,2H); 1.68-1.54(m,4H); 1.31-1.23(m,12H); 0.96-0.82(2t, 6H)
Estearato de propila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> ): 4.05-3.97(t,2H); 2.32-2.24(t,2H); 1.78-1.51(m,6H); 1.30-1.20(m,26H); 0.97-0.87(2t, 6H)
Oleato de propila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> ): 5.42-5.51(m,2H); 4.05-3.97(t,2H); 2.32-2.24(t,2H); 2.06-1.89(m,4H); 1.68-1.55(m,4H); 1.38-1.17(m,20H); 0.97-0.83(2t, 6H)

**Tabela 4.6.** Análise dos espectros obtidos para os monoésteres de butila.

<b>Espectros</b>	<b>Análises das estruturas</b>
Octanoato de butila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> ): 4.10-4.05(t,2H); 2.33-2.27(t,2H); 1.62-1.55(m,4H); 1.34-1.26(m,10H); 0.92-0.83(2t, 6H)
Decanoato de butila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> ): 4.08-4.01(t,2H); 2.29-2.23(t,2H); 1.62-1.53(m,4H); 1.31-1.18(m,14H); 0.93-0.81(2t, 6H)
Laurato de butila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> ): 4.10-4.00(t,2H); 2.31-2.24(t,2H); 1.68-1.54(m,4H); 1.38-1.18(m,18H); 0.95-0.83(2t, 6H)
Miristato de butila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> ): 4.10-4.05(t,2H); 2.33-2.27(t,2H); 1.62-1.55(m,4H); 1.34-1.26(m,18H); 0.92-0.83(2t, 6H)
Palmitato de butila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> ): 4.08-4.02(t,2H); 2.31-2.25(t,2H); 1.65-1.57(m,4H); 1.33-1.15(m,26H); 0.96-0.83(2t, 6H)
Estearato de butila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub> ): 4.08-4.02(t,2H); 2.30-2.24(t,2H); 1.66-1.54(m,4H); 1.46-1.07(m,20H); 0.95-0.82(2t, 6H)
Oleato de butila	RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, ppm, 300Hz, C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> ): 5.40-5.28(m,2H); 4.09-4.02(t,2H); 2.31-2.25(t,2H); 2.17-1.81(m,4H); 1.66-1.58(m,4H); 1.38-1.19(m,22H); 0.96-0.84(2t, 6H)

#### **4.2.3. Eficiência dos Métodos Cromatográficos Estabelecidos para Monitoramento da Reação de Interesterificação do Óleo de Babaçu com Álcoois de Curta**

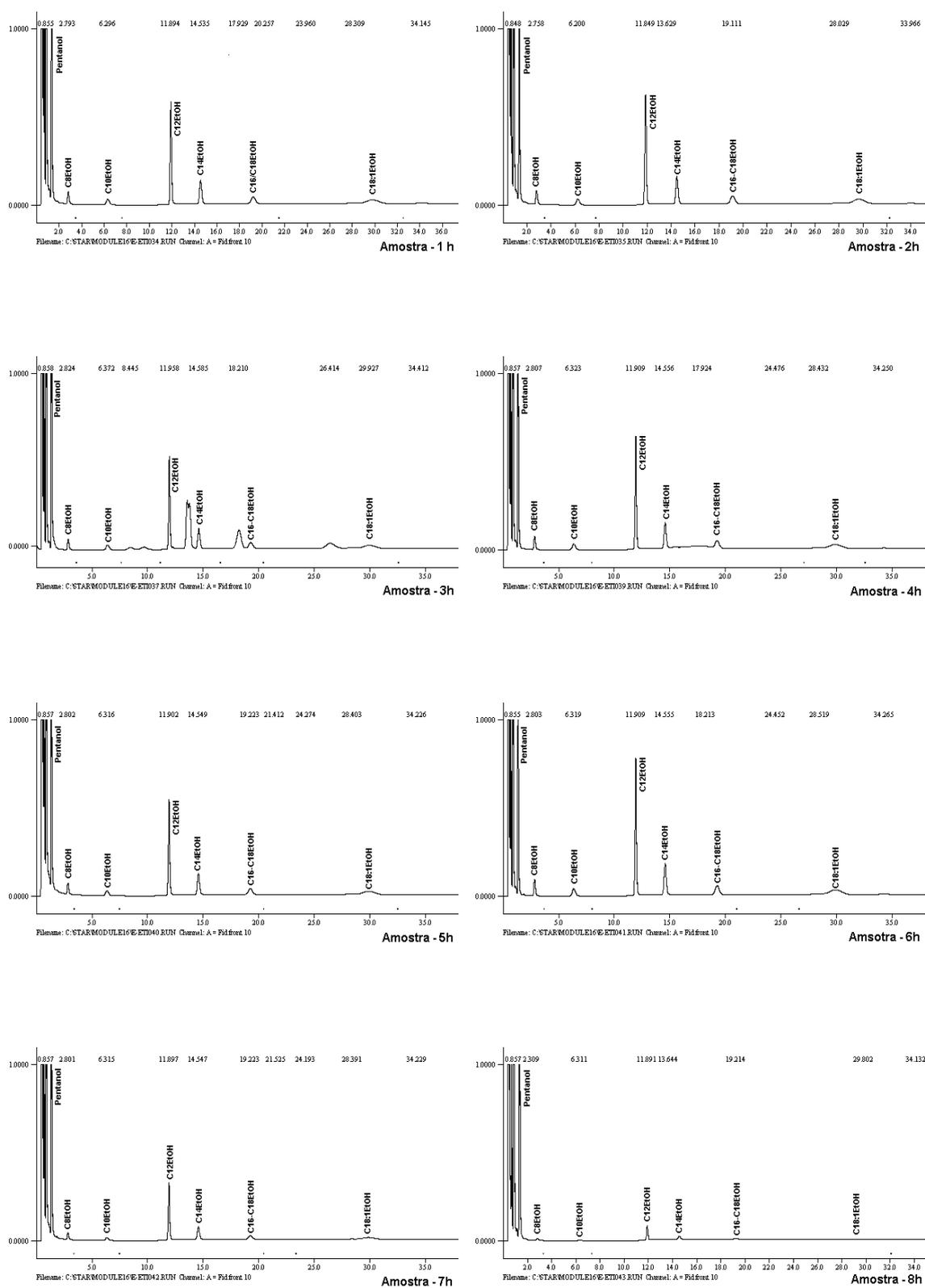
A aplicação direta da metodologia de análise cromatográfica dos monoésteres, desenvolvida neste trabalho como etapa preliminar, foi testada no monitoramento da reação de interesterificação por via química do óleo de babaçu com etanol, propanol ou butanol empregando hidróxido de sódio (NaOH) como catalisador (seção 3.2.3). A rota química foi selecionada, pois geralmente apresenta curta duração, permitindo retiradas de um maior número de amostras em períodos inferiores a 8 h. As amostras retiradas foram diluídas em heptano e submetidas a análise cromatográfica, conforme anteriormente descrito (seção 3.2.3). Os cromatogramas obtidos nessa série de testes são mostrados nas Figuras 4.4 a 4.6.

A elaboração desses métodos revelou ser uma ferramenta importante no acompanhamento da interesterificação do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta, permitindo o monitoramento da reação e facilitando possíveis correções operacionais (teor de água, complementação da quantidade de álcool entre outros), tendo em vista que o tempo global da análise variou numa faixa entre 38 a 43 min.

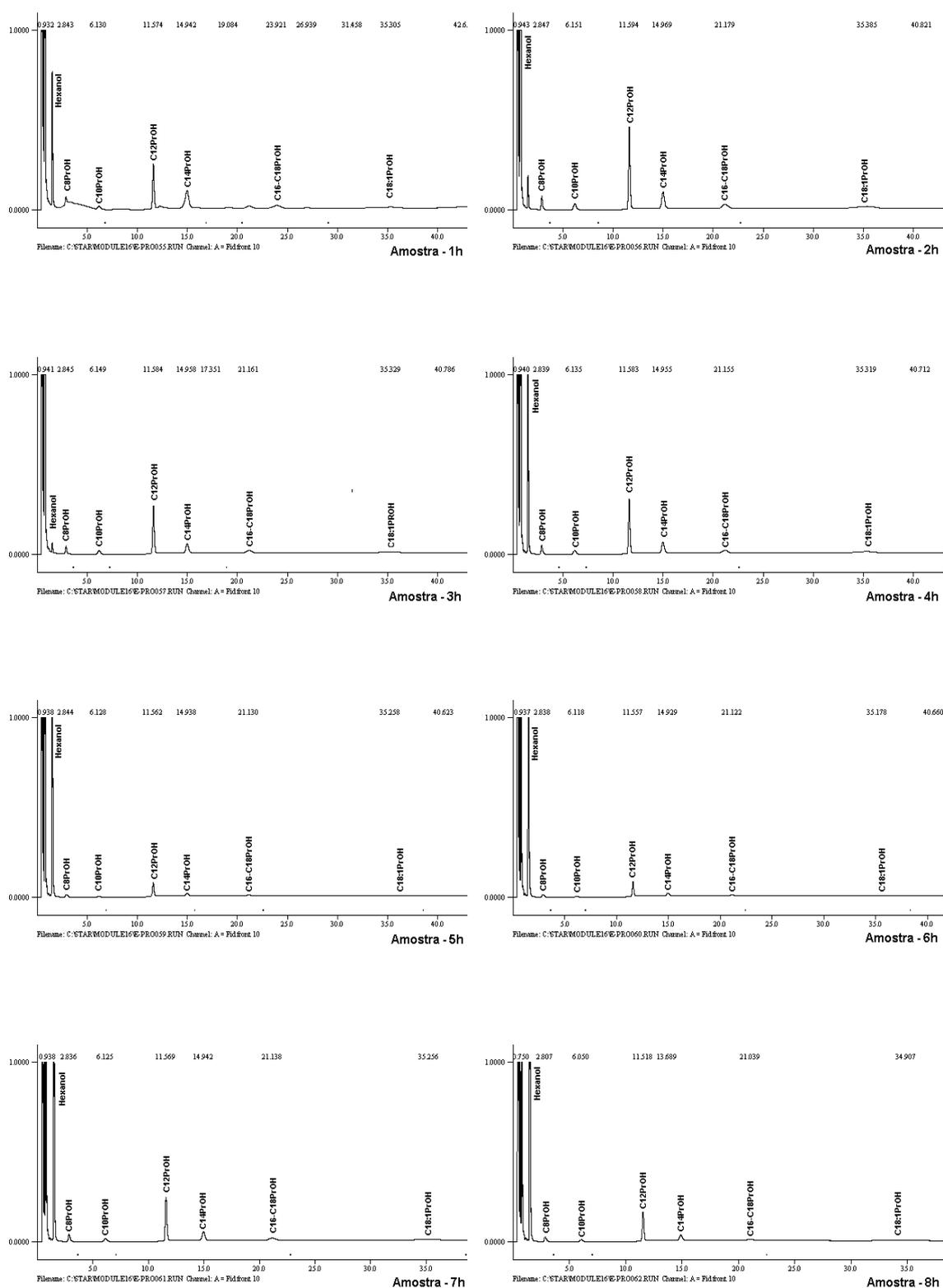
Apesar desses ensaios terem sido realizados com o intuito apenas de verificar a eficiência dos métodos cromatográficos para monitoramento da reação, os dados obtidos foram também usados como parâmetro de comparação da reação efetuada por via enzimática, tendo em vista que não há dados na literatura sobre a utilização do óleo de babaçu para obtenção do biodiesel por via enzimática.

O perfil de formação dos monoésteres para cada sistema reacional (óleo: álcool) em função do tempo de reação é mostrado nas Figuras 4.7 (a, b, c), tomando por base os dados gerados na execução dos respectivos métodos (Apêndice 8.4).

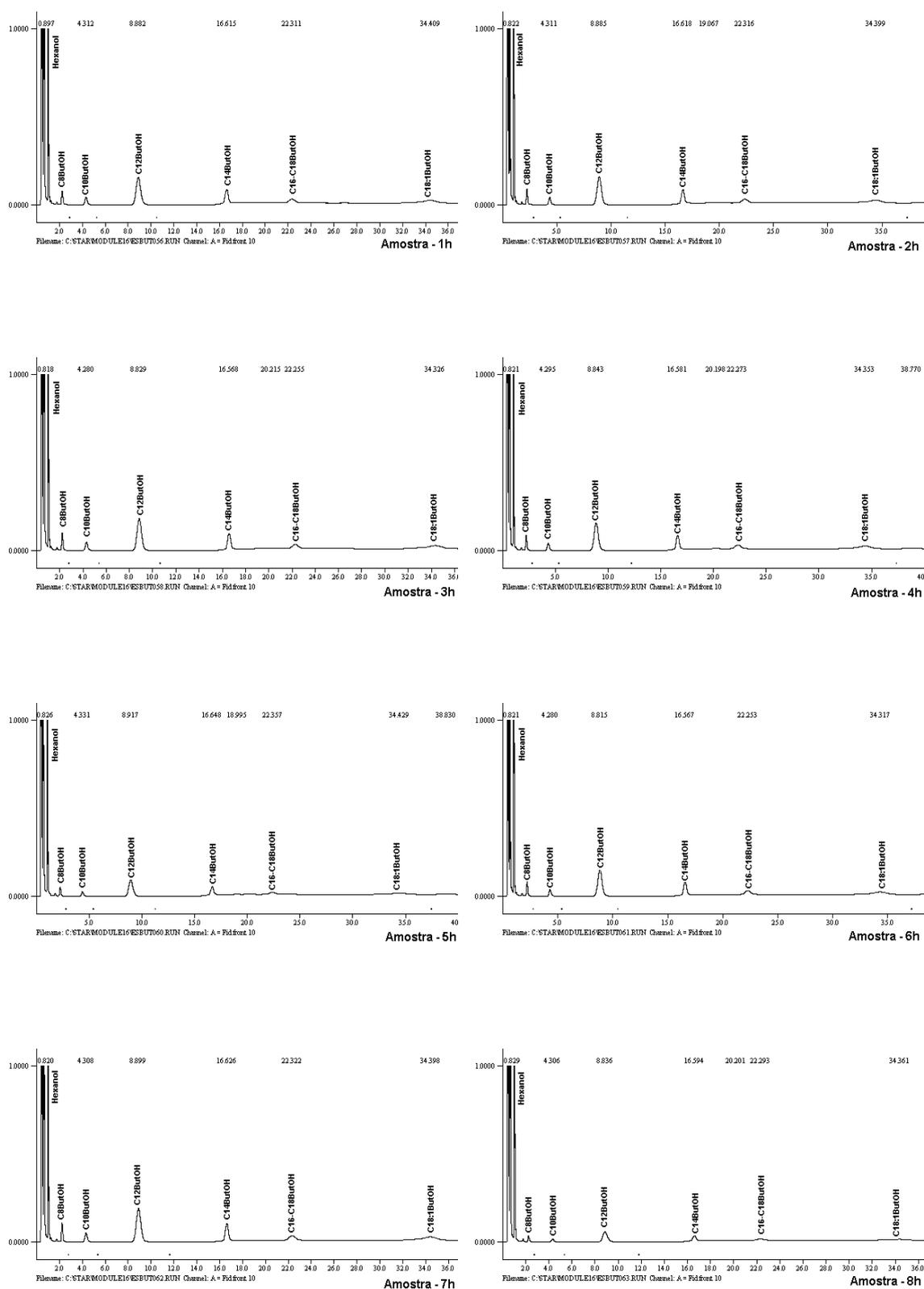
Os rendimentos foram calculados nos tempos de reação que forneceram a concentração mais elevada dos diversos monoésteres. Os resultados obtidos indicam uma influência do tamanho da cadeia do álcool tanto na velocidade como no rendimento de reação. Para o sistema óleo e etanol, a máxima concentração dos diferentes monoésteres foi alcançada após 6 h de reação, fornecendo um rendimento global de 66,9% em monoésteres de etila. Rendimentos superiores foram alcançados para o sistema óleo e propanol da ordem de 72,6%, em 3 h. O sistema óleo: butanol foi o que forneceu comparativamente o menor rendimento para todos os monoésteres, sendo obtido um rendimento global de 45,3%.



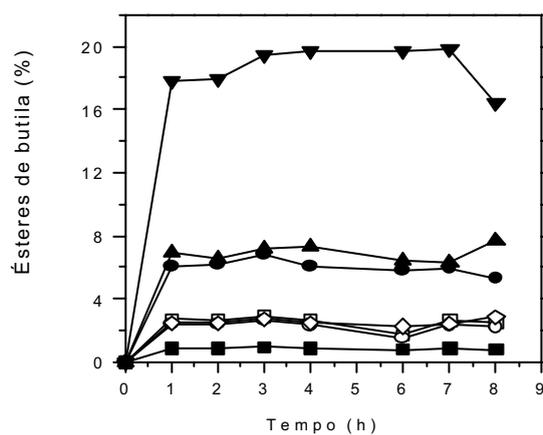
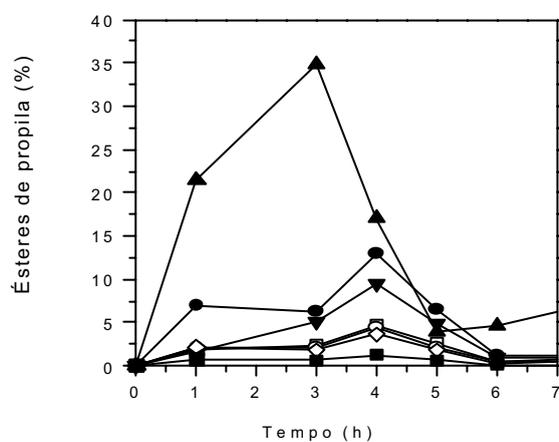
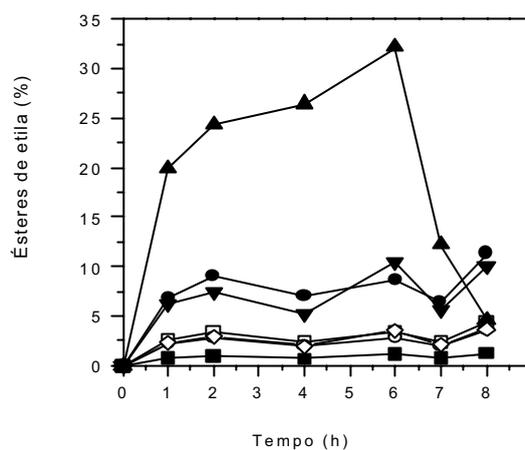
**Figura 4.4.** Monitoramento da formação de monoésteres de etila na interesterificação química do óleo de babaçu com etanol (78°C, 0,16 g de NaOH).



**Figura 4.5.** Monitoramento da formação de monoésteres de propila na interesterificação química do óleo de babaçu com propanol (97°C, 0,22 g de NaOH).



**Figura 4.6.** Monitoramento da formação de monoésteres de butila na interesterificação química do óleo de babaçu com butanol (117°C, 0,30 g de NaOH).



**Figura 4.7.** Formação dos ésteres de etila (A), propila (B) e butila (C) na interesterificação química do óleo de babaçu com etanol (0,16 g de NaOH, 78°C), propanol (0,22 g de NaOH, 97°C) e butanol (0,30 g de NaOH, 117°C). Símbolos: □ (C8), ○ (C10), ▼ (C12), ▲ (C14), ◇ (C16), ■ (C18), ● (C18:1).

**Tabela 4.7.** Rendimento da interesterificação química do óleo de babaçu com diferentes álcoois.

Ácido Graxo	Babaçu (%)	Monoésteres formados (%)			Rendimento (%)			
		etila	propila	butila	etila	propila	butila	
Caprílico	C8	3,5	4,4	4,7	3,1	100	100	88,2
Cáprico	C10	4,5	3,5	4,4	2,7	78,2	96,9	60,4
Láurico	C12	44,7	32,1	34,8	19,8	71,9	77,8	44,3
Mirístico	C14	17,5	10,0	9,6	7,9	57,4	54,6	45,1
Palmítico	C16	9,7	3,0	3,6	2,9	31,8	37,5	29,6
Esteárico	C18	3,1	1,2	1,3	1,0	40,3	40,6	31,9
Oleico	C18:1	15,2	11,4	12,9	7,1	74,7	84,9	47,0
<b>Total</b>		<b>98,2</b>	65,6	71,3	44,5	<b>66,9</b>	<b>72,6</b>	<b>45,3</b>
<b>Tempo (h)</b>			6	3	7			

Rendimento calculado conforme equação 3.1, empregando os valores correspondentes ao tempo de reação que forneceu a concentração mais elevada dos diversos monoésteres.

#### 4.4. Interesterificação Enzimática do Óleo de Babaçu com Álcoois empregando Diferentes Preparações de Lipase

Cinco preparações de lipase na forma imobilizada foram usadas como catalisadores na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta (C2 a C4) em meio isento de solventes, com o objetivo de determinar o perfil do comportamento de cada sistema reacional, bem como selecionar o derivado imobilizado que fornecesse maior conversão em monoésteres de ácidos graxos.

Todos os experimentos foram efetuados em meio isento de solvente e as condições operacionais adotadas foram baseadas nos dados descritos na literatura (DU *et al.*, 2004) e nos testes iniciais efetuados (URIESTE e CASTRO, 2004), tendo sido estabelecido os seguintes parâmetros: proporção equimolar entre óleo e álcool e temperaturas reacionais de 40°C para os sistemas constituídos de óleo: etanol e óleo: propanol e de 50°C para o sistema óleo: butanol (URIESTE e CASTRO, 2004). O detalhamento dos dados obtidos é apresentado nos Apêndices 8.4 a 8.8 e referem-se às médias de duplicatas ou triplicatas.

##### 4.4.1 Atuação da Lipozyme IM<sup>20</sup> na Obtenção de Biodiesel

As concentrações dos monoésteres formados e dos álcoois consumidos para cada sistema reacional na reação catalisada pela Lipozyme IM<sup>20</sup> em função do tempo são mostradas nas Figuras 4.8 a 4.11, tomando por base os dados apresentados no Apêndice 8.4.

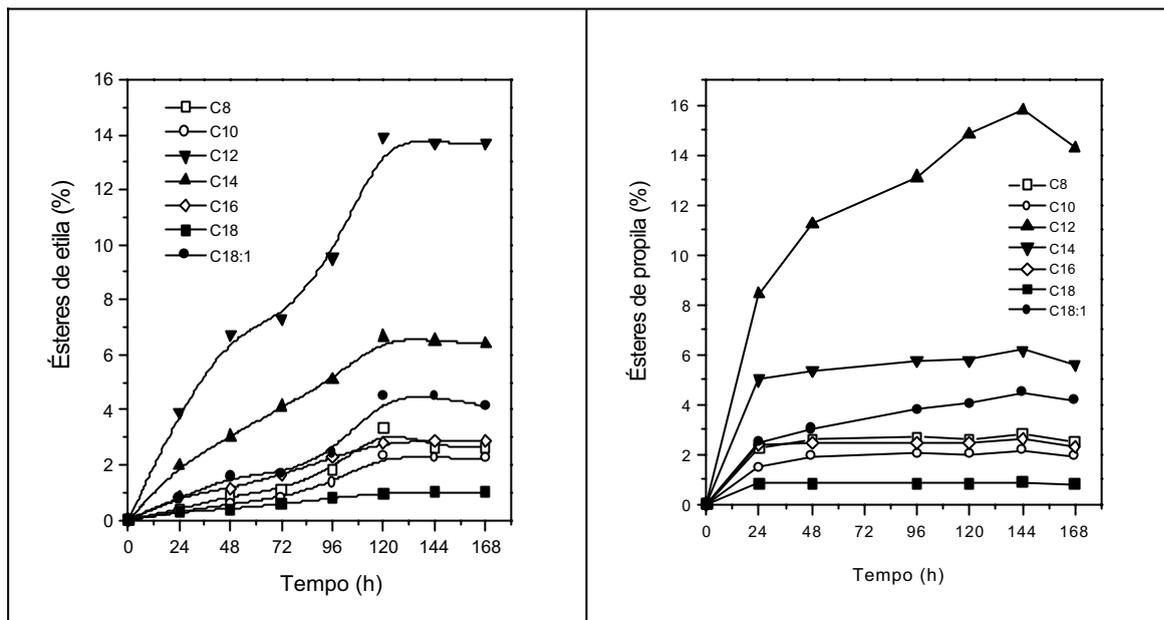


Figura 4.8. Formação dos monoésteres de etila na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol (Lipozyme, 40 °C).

Figura 4.9. Formação dos monoésteres de propila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol (Lipozyme, 40 °C).

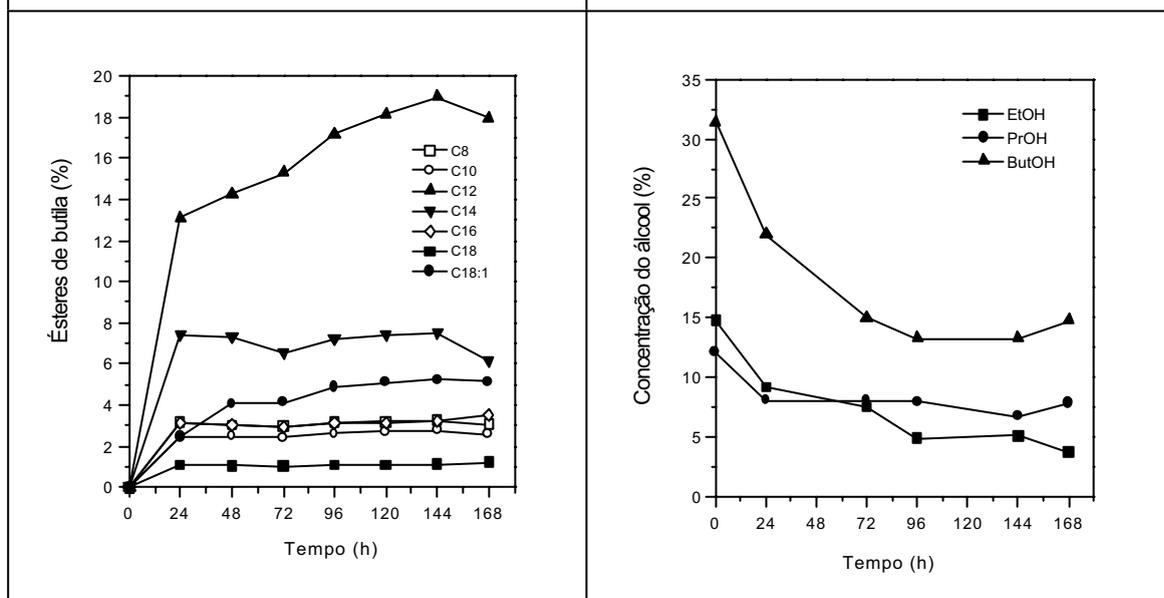


Figura 4.10. Formação dos monoésteres de butila na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol (Lipozyme, 50°C).

Figura 4.11. Consumo dos álcoois na interesterificação enzimática do óleo de babaçu empregando Lipozyme IM<sup>20</sup> (40-50°C).

De uma maneira geral, observa-se que para os três álcoois testados (Figuras 4.8 a 4.10) houve formação de todos os monoésteres de ácidos graxos presentes no óleo de babaçu em concentrações diretamente proporcionais ao tamanho da cadeia do álcool, ou seja, quanto maior o tamanho da cadeia do álcool maior a concentração dos diversos monoésteres. Por outro lado, a especificidade da enzima em relação ao ácido graxo (C8 a C18) foi indiretamente proporcional ao tamanho da cadeia dos ácidos graxos, sendo obtido uma conversão praticamente total para o ácido caprílico (C8) e de apenas 30% para o ácido oléico. O perfil da concentração dos álcoois como mostrado na Figura 4.11, indica que a correspondência entre álcool consumido e formação de produtos foi constatada apenas para o butanol (conversão = 50%). No caso dos outros álcoois, verifica-se um consumo praticamente total (conversões > 90%), sugerindo uma adsorção parcial do álcool presente no meio reacional pela preparação enzimática (suporte). Essa hipótese pode ser reforçada quando se leva em consideração que esta preparação de enzima (Lipozyme) tem caráter hidrofílico e os álcoois etanol e propanol apresentam graus de polaridade mais elevados que o butanol. Deve ser ainda destacado, que a Lipozyme apresenta elevada atividade enzimática para um grau de hidratação máximo de 10%, portanto, o aumento da polaridade do sistema imobilizado, por exemplo, por adsorção desses álcoois, pode ter reduzido a atividade enzimática nos sistemas óleo e etanol e óleo e propanol.

Para facilitar a análise dos resultados obtidos, na Tabela 4.8 apresenta-se o rendimento global da reação de interesterificação do óleo de babaçu para os diferentes álcoois, considerando os valores referentes ao tempo de reação, no qual foi obtida a conversão mais elevada do óleo em monoésteres. A concentração máxima em monoésteres foi alcançada após 120 h, com rendimento global variando entre 35 a 42,7%, dependendo do tamanho da cadeia do álcool.

Rendimentos similares da ordem de 35% em monoésteres, após 120 e 144 h de reação, foram obtidos para os sistemas contendo óleo: etanol e óleo: propanol, respectivamente. Rendimentos superiores foram alcançados para o sistema óleo e butanol (42,7%) após 144 h de reação, provavelmente devido à formação de uma mistura homogênea e de menor polaridade, favorecendo a conversão do óleo de babaçu em monoésteres de butila.

**Tabela 4.8.** Rendimento da interesterificação enzimática do óleo de babaçu com diferentes álcoois empregando Lipozyme IM<sup>20</sup>.

Ácido Graxo	Babaçu (%)	Monoésteres formados (%)			Rendimento (%)			
		etila	Propila	butila	etila	propila	butila	
Caprílico	C8	3,5	<b>3,3</b>	<b>2,8</b>	<b>3,2</b>	94,3	80,0	91,4
Cáprico	C10	4,5	<b>2,3</b>	<b>2,2</b>	<b>2,7</b>	51,1	48,9	60,0
Láurico	C12	44,7	<b>13,9</b>	<b>15,8</b>	<b>19,0</b>	31,1	35,3	42,5
Mirístico	C14	17,5	<b>6,6</b>	<b>6,2</b>	<b>7,5</b>	37,7	35,4	42,9
Palmítico	C16	9,7	<b>2,8</b>	<b>2,6</b>	<b>3,2</b>	28,9	26,8	33,0
Esteárico	C18	3,1	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	<b>1,1</b>	32,2	29,0	35,5
Oléico	C18:1	15,2	<b>4,5</b>	<b>4,5</b>	<b>5,2</b>	29,6	29,6	34,2
<b>Total</b>		<b>98,2</b>	34,4	35,0	41,9	<b>35,0</b>	<b>35,6</b>	<b>42,7</b>
<b>Tempo (h)</b>			120	144	144			

#### 4.4.2 Atuação da Novozym 435 na Obtenção de Biodiesel

No perfil de formação de monoésteres de ácidos graxos nas reações de interesterificação do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta catalisada pela Novozym 435 (Figuras 4.12 a 4.14), verifica-se um comportamento similar em todos os sistemas testados, não sendo constatada uma influência marcante do tamanho da cadeia do álcool tanto na velocidade como no rendimento global da reação. Na Figura 4.15 observa-se que o consumo dos álcoois foi proporcional à formação de monoésteres.

Analisando os rendimentos globais da reação de interesterificação catalisada pela Novozym 435 (Tabela 4.9), verifica-se que todos os sistemas testados apresentaram máxima conversão do óleo em monoésteres após 24 h de reação, com rendimentos globais variando entre 50% a 54%. O rendimento mais elevado foi constatado para o sistema reacional constituído de óleo: propanol. Verifica-se ainda que o desempenho da Novozym 435 foi superior ao alcançado pela Lipozyme IM<sup>20</sup>.

Os elevados rendimentos obtidos para os sistemas reacionais empregando Novozym 435 como catalisador em relação aos anteriores obtidos com a enzima Lipozyme IM<sup>20</sup> pode ser em parte explicado pela diferença de polaridade dos suportes de imobilização. A Novozym 435 é imobilizada em suporte hidrofóbico, o que provavelmente evitou a adsorção desses álcoois na parte sólida do meio reacional e favoreceu, conseqüentemente o alcance de conversões superiores em monoésteres dos álcoois testados.

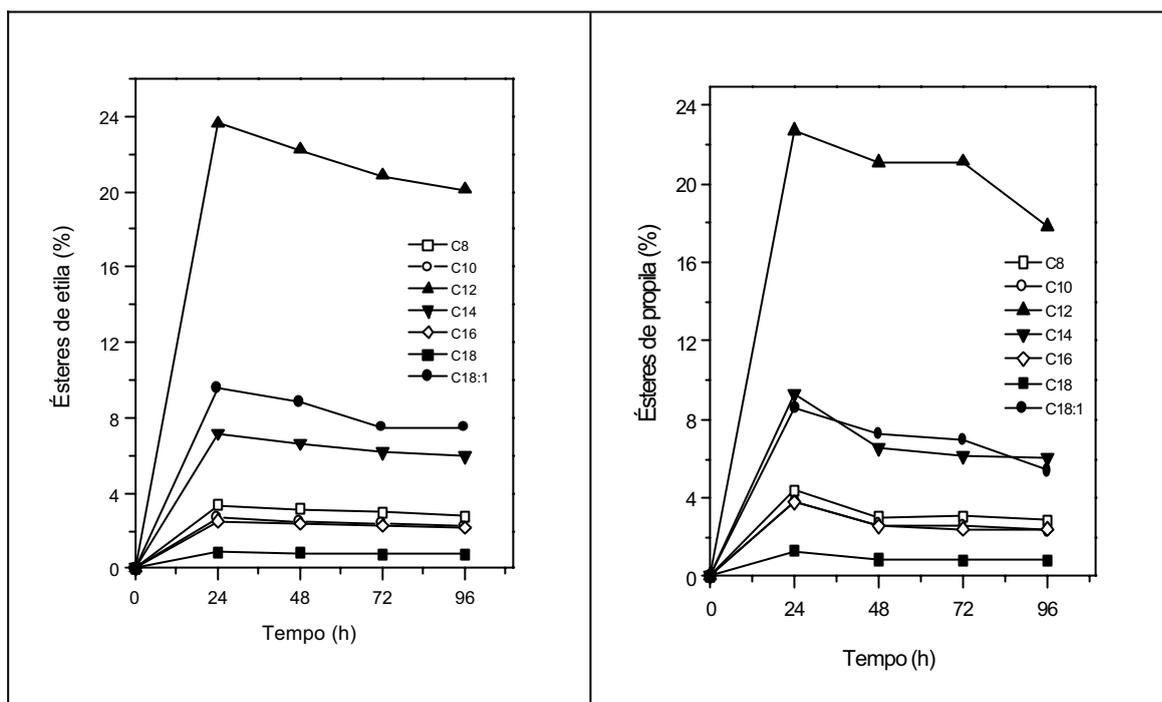


Figura 4.12. Formação dos monoésteres de etila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol empregando Novozym 435 a 40°C.

Figura 4.13. Formação dos monoésteres de propila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol empregando Novozym 435 a 40°C.

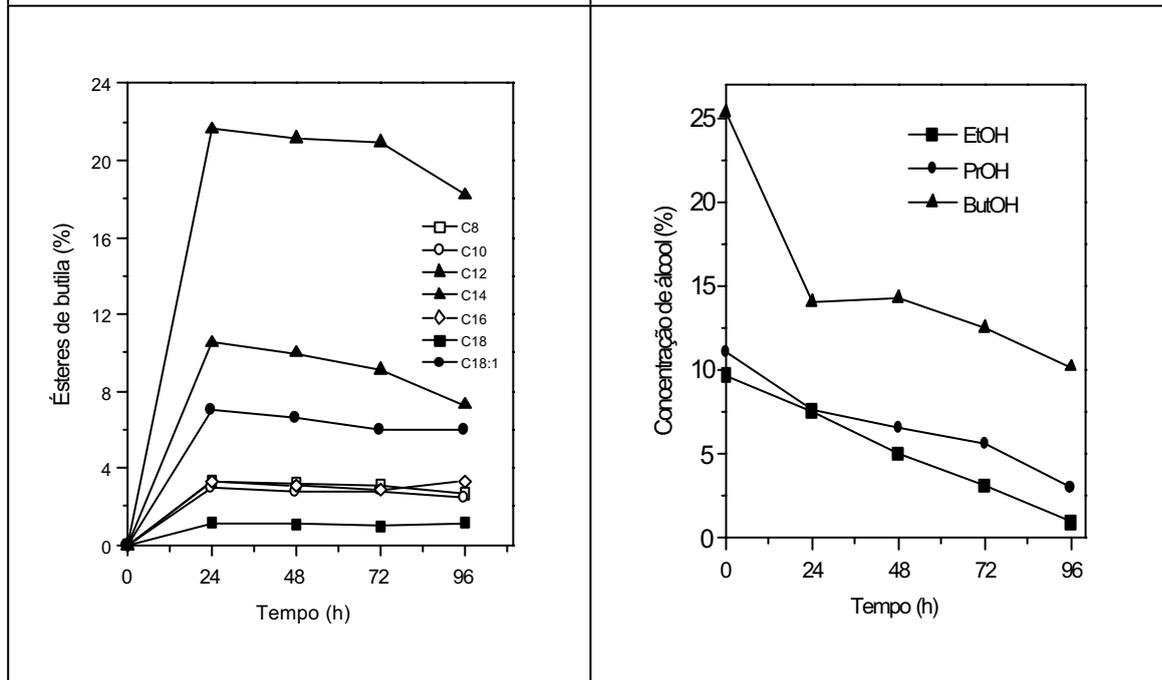


Figura 4.14. Formação dos monoésteres de butila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol empregando Novozym 435 a 50°C.

Figura 4.15. Consumo dos álcoois na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu empregando Novozym 435 (40-50°C).

**Tabela 4.9.** Rendimento da interesterificação enzimática do óleo de babaçu com diferentes álcoois empregando Novozym 435.

Ácido Graxo	Babaçu (%)	Monoésteres formados (%)			Rendimento (%)			
		etila	propila	butila	Etila	propila	butila	
Caprílico	C8	3,5	<b>3,3</b>	<b>3,5</b>	<b>3,3</b>	94,3	100	94,3
Cáprico	C10	4,5	<b>2,7</b>	<b>3,8</b>	<b>3,0</b>	60,0	84,4	66,7
Láurico	C12	44,7	<b>23,6</b>	<b>22,7</b>	<b>21,6</b>	52,8	50,8	48,3
Mirístico	C14	17,5	<b>7,2</b>	<b>9,3</b>	<b>10,5</b>	41,1	53,1	60,0
Palmítico	C16	9,7	<b>2,5</b>	<b>3,8</b>	<b>3,3</b>	25,8	39,2	34,0
Estearíco	C18	3,1	<b>0,9</b>	<b>1,3</b>	<b>1,1</b>	29,0	41,9	35,5
Oléico	C18:1	15,2	<b>9,5</b>	<b>8,6</b>	<b>7,0</b>	62,5	56,6	46,0
<b>Total</b>		<b>98,2</b>	49,7	53,0	49,8	<b>50,6</b>	<b>54,0</b>	<b>50,7</b>
<b>Tempo (h)</b>			24	24	24			

#### 4.4.3. Atuação da Lipase Pancreática Imobilizada em Polissiloxano-álcool Polivinílico na Obtenção de Biodiesel

A lipase pancreática (LPP) foi imobilizada em polissiloxano-álcool polivinílico de acordo com metodologia estabelecida no Laboratório de Biotatálise/ FAENQUIL (Apêndice 8.6) e testada na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta.

As Figuras 4.16 a 4.18 apresentam o progresso da reação de interesterificação enzimática em termos de concentração de monoésteres formados e consumo dos álcoois para cada sistema reacional.

Os resultados obtidos indicam que tanto a velocidade como o rendimento de reação foi dependente do tamanho da cadeia do álcool testado, sendo constatadas concentrações mais elevadas para o sistema óleo: butanol. O consumo de álcool foi proporcional à formação de monoésteres durante a reação, sendo verificado ainda que a baixa concentração de etanol no meio reacional apresentou-se como a etapa limitante na formação de monoésteres de etila (Figura 4.19).

Os rendimentos globais da reação são mostrados na Tabela 4.10. Para o sistema óleo: etanol, a máxima concentração dos diferentes monoésteres foi alcançada após 72 h de reação, fornecendo um rendimento de 29,9% em monoésteres de etila. Rendimentos superiores foram alcançados para o sistema óleo: propanol da ordem de 40,2% num tempo de 96 h. O sistema óleo: butanol foi o que forneceu comparativamente o rendimento mais elevado (45,3%) em 120 h.

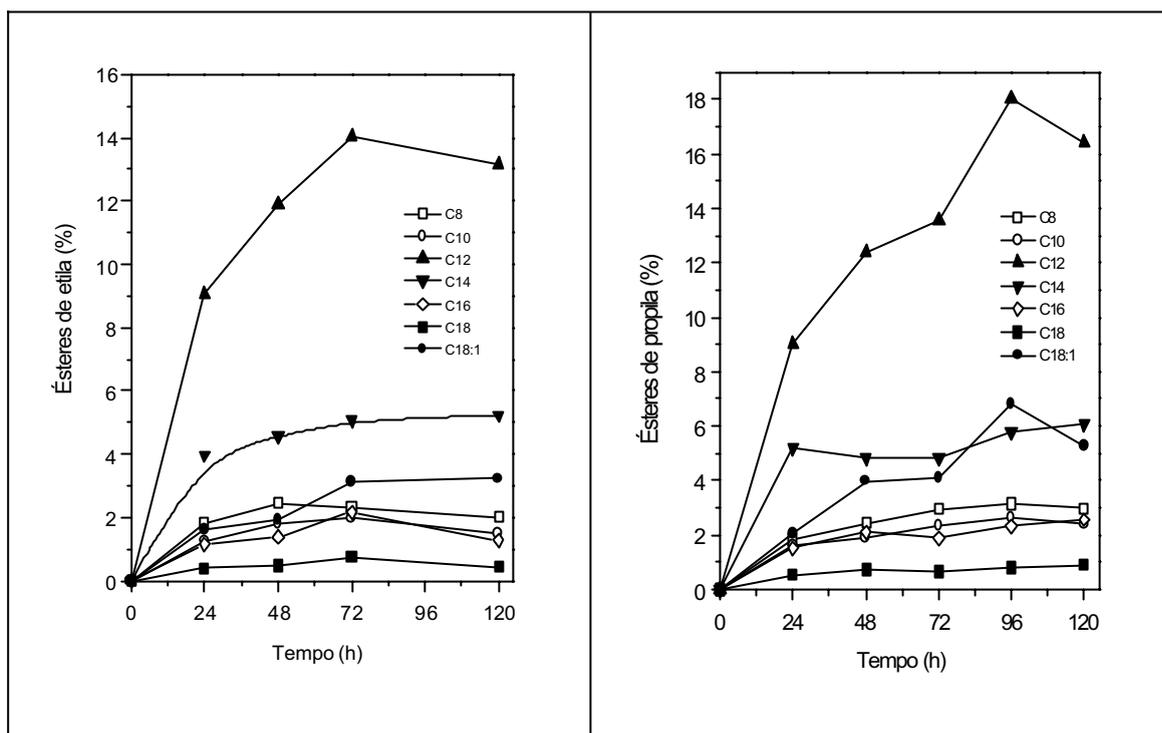


Figura 4.16. Formação dos monoésteres de etila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol (LPP-POS.PVA, 40°C).

Figura 4.17. Formação dos monoésteres de propila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol (LPP-POS.PVA, 40°C).

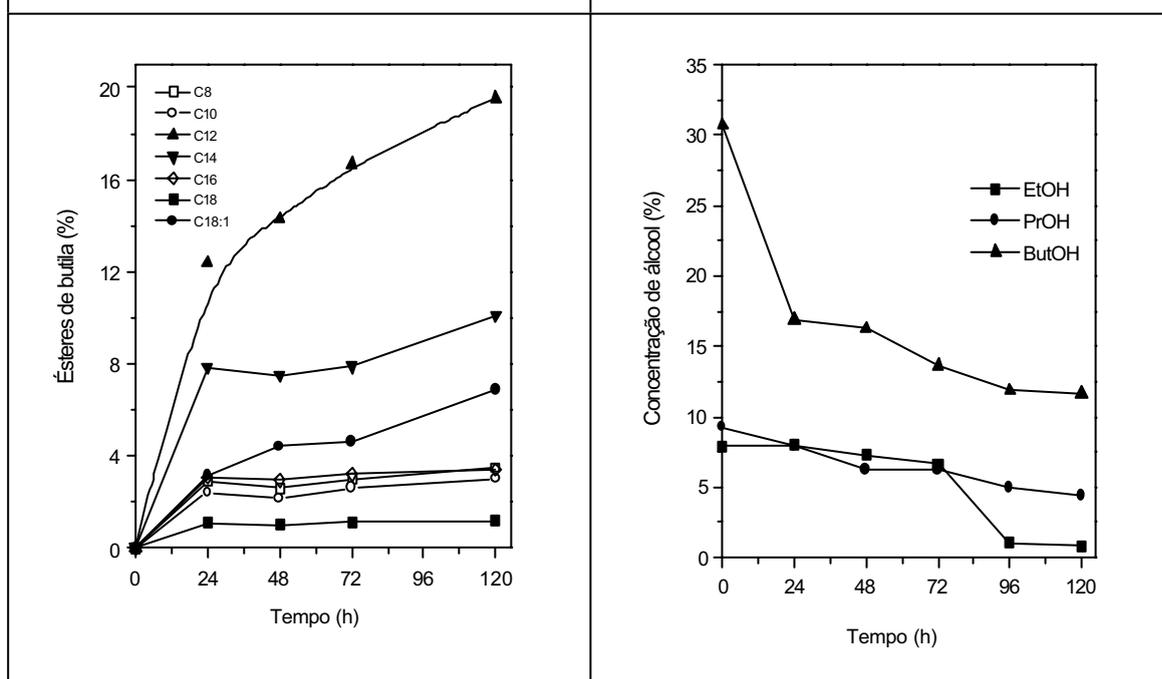


Figura 4.18. Formação dos monoésteres de butila na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol (LPP-POS.PVA, 50°C).

Figura 4.19. Consumo dos álcoois na interesterificação enzimática do óleo de babaçu empregando LPP imobilizada em POS-PVA (40-50°C).

**Tabela 4.10.** Rendimento da interesterificação enzimática do óleo de babaçu com diferentes álcoois empregando lipase pancreática imobilizada em POS-PVA.

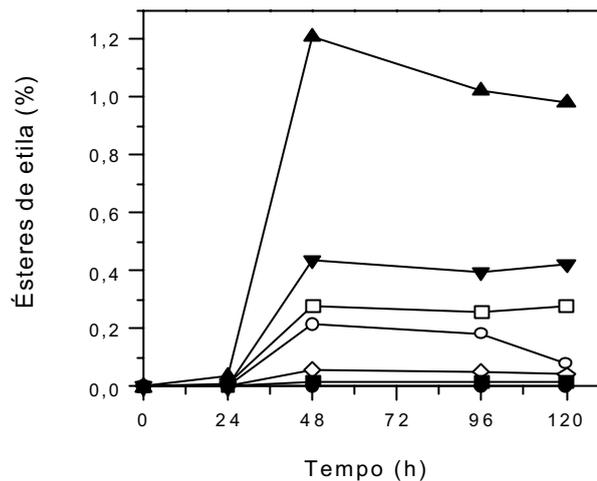
Ácido Graxo	Babaçu (%)	Monoésteres formados (%)			Rendimento (%)			
		etila	propila	Butila	etila	propila	butila	
Caprílico	C8	3,5	<b>2,3</b>	<b>3,1</b>	<b>3,5</b>	65,7	88,6	100
Cáprico	C10	4,5	<b>2,0</b>	<b>2,6</b>	<b>3,0</b>	44,4	57,8	66,7
Láurico	C12	44,7	<b>14,0</b>	<b>18,1</b>	<b>19,5</b>	31,3	40,5	43,6
Mirístico	C14	17,5	<b>5,1</b>	<b>5,8</b>	<b>10,1</b>	29,1	33,1	57,7
Palmítico	C16	9,7	<b>2,2</b>	<b>2,3</b>	<b>3,4</b>	22,7	23,7	38,1
Esteárico	C18	3,1	<b>0,7</b>	<b>0,8</b>	<b>1,2</b>	22,6	25,8	38,7
Oléico	C18:1	15,2	<b>3,1</b>	<b>6,8</b>	<b>6,9</b>	20,4	44,7	45,4
<b>Total</b>		<b>98,2</b>	29,4	39,5	47,6	<b>29,9</b>	<b>40,2</b>	<b>48,5</b>
<b>Tempo (h)</b>			72	96	120			

Os resultados obtidos pela utilização da lipase pancreática imobilizada em POS-PVA são bastante satisfatórios, quando comparados com aqueles anteriormente obtidos pela Lipozyme. Tais resultados podem ser creditados a especificidade da lipase pancreática e ao caráter hidrofóbico do suporte de imobilização. É importante destacar que a incidência do uso de lipases pancreáticas em síntese orgânica, não é tão elevada quando comparado à utilização das lipases microbianas para a mesma finalidade e particularmente na obtenção de biodiesel não foram encontradas publicações nos principais periódicos da área. Entretanto, estudos descritos na literatura recomendam o uso desta preparação enzimática em aplicações, nas quais a estereosseletividade seja um fator crítico (FABER, 1997).

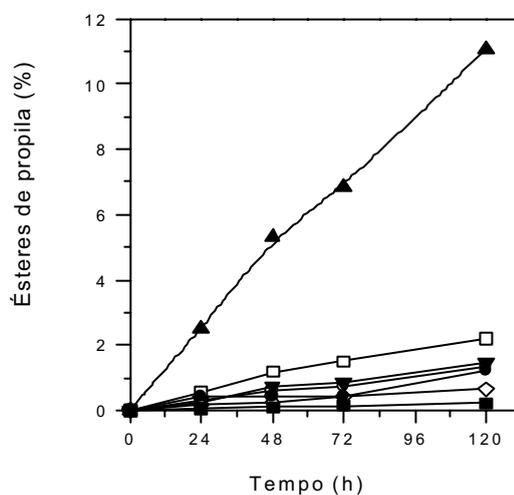
#### 4.4.4. Atuação da Lipase Microbiana de *Candida rugosa* (LCR) Imobilizada em POS-PVA e em $Nb_2O_5 \cdot nH_2O$ na Obtenção de Biodiesel

Para verificar se o suporte de imobilização poderia exercer algum tipo de influencia no progresso da reação de interesterificação, a lipase microbiana de *Candida rugosa* (LCR) foi imobilizada na matriz polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) e em óxido de nióbio hidratado ( $Nb_2O_5 \cdot nH_2O$ ) e testada na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta.

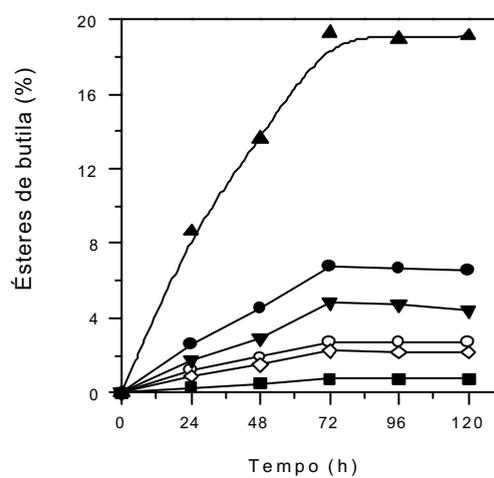
O perfil de formação dos monoésteres para cada sistema óleo: álcool: LCR imobilizada em função do tempo de reação é mostrado nas Figuras 4.20 a 4.22 e as concentrações dos álcoois durante o progresso da reação são apresentadas nas Figuras 4.23 e 4.24.



(A)



(B)



(C)

**Figura 4.20.** Formação dos ésteres de etila (A), propila (B) e butila (C) na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol (40°C), propanol (40°C) e butanol (50°C) empregando LCR-POS.PVA. Símbolos: □ (C8), ○ (C10), ▼ (C12), ▲ (C14), ◇ (C16), ■ (C18), ● (C18:1).

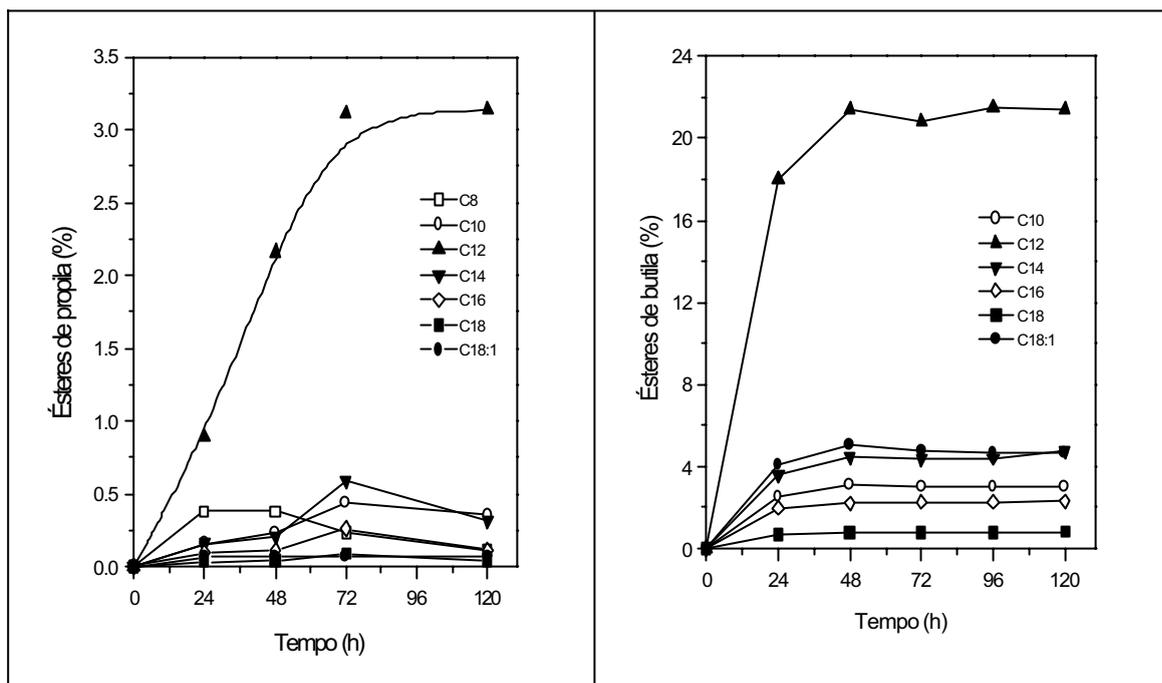


Figura 4.21. Formação dos monoésteres de butila na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol (LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O, 40°C).

Figura 4.22. Formação dos monoésteres de butila na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol (LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O, 50°C).

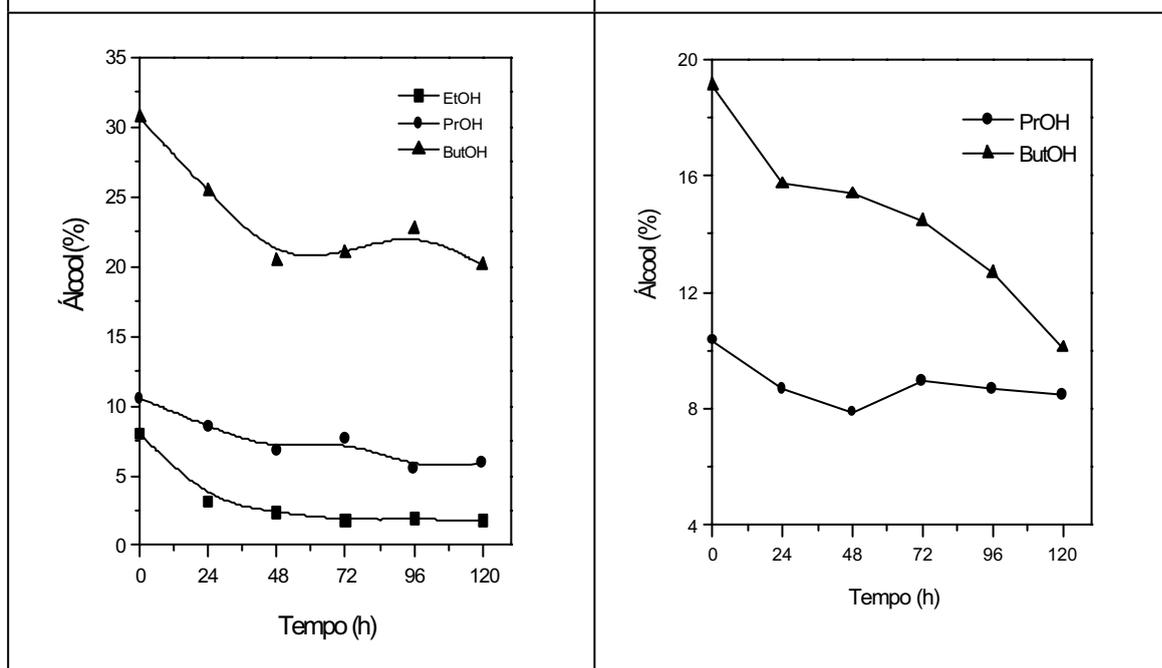


Figura 4.23. Consumo dos álcoois na interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol empregando LCR-POS.PVA (40-50°C).

Figura 4.24. Consumo dos álcoois na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol empregando LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O (40-50°C).

Verifica-se nas Figuras 4.20 a 4.22 uma influência marcante do tamanho da cadeia do álcool na formação dos monoésteres, sendo constatado conversões insatisfatórias para os sistemas reacionais constituídos de óleo: etanol e óleo: propanol, com rendimentos máximos de 2,2 e 18,5%, respectivamente para os sistemas reacionais utilizando LCR-POS.PVA (Tabela 4.14). Para o sistema contendo óleo e etanol e LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O não foi verificada formação de monoésteres de etila (Tabela 4.12), nos ensaios realizados, nas mesmas condições operacionais. Rendimento global de 5,7% foi alcançado para o sistema óleo: propanol em 72 h. A conversão mais elevada foi alcançada para o sistema óleo: butanol, correspondendo a um rendimento global em monoésteres de butila da ordem de 38,4% para os sistemas com LCR-POS.PVA e 39,1% LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O, respectivamente.

**Tabela 4.11.** Rendimento da reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com diferentes álcoois empregando LCR imobilizada em POS-PVA.

Ácido Graxo	Babaçu (%)	Monoésteres formados (%)			Rendimento (%)		
		etila	propila	butila	etila	propila	butila
Caprílico C8	3,5	0,3	2,2	0	8,6	62,9	0
Cáprico C10	4,5	0,2	1,3	2,7	4,4	28,9	60,0
Láurico C12	44,7	1,2	11,1	19,2	2,7	24,8	42,9
Mirístico C14	17,5	0,4	1,4	4,8	0,2	8,0	45,7
Palmítico C16	9,7	0,04	0,6	2,2	0,4	6,2	22,7
Esteárico C18	3,1	0,01	0,2	0,8	0,3	6,4	25,8
Oléico C18: 1	15,2	0	1,2	6,7	0,0	7,9	44,1
<b>Total</b>	<b>98,2</b>	2,15	18,0	36,4	<b>2,2</b>	<b>18,3</b>	<b>38,4</b>
<b>Tempo (h)</b>		48	120	72			

**Tabela 4.12.** Rendimento da reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com diferentes álcoois empregando LCR imobilizada em Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O.

Ácido Graxo	Babaçu (%)	Monoésteres formados (%)		Rendimento (%)	
		propila	butila	propila	butila
Caprílico C8	3,5	0,2	ND	5,7	0
Cáprico C10	4,5	0,4	3,0	8,9	66,7
Láurico C12	44,7	3,1	21,4	6,9	47,9
Mirístico C14	17,5	0,6	4,4	3,4	25,1
Palmítico C16	9,7	0,3	2,3	3,1	23,7
Esteárico C18	3,1	0,9	0,8	29,0	25,8
Oléico C18: 1	15,2	0,1	5,1	0,7	33,5
<b>Total</b>	<b>98,2</b>	5,6	37,0	<b>5,7</b>	<b>39,1</b>
<b>Tempo (h)</b>		72	48		

Os baixos rendimentos obtidos (desempenho insatisfatório) para os sistemas empregando etanol e propanol como doadores do grupo acila, pode ser explicado levando em conta a polaridade dos álcoois utilizados. Resultados similares foram reportados na literatura por PEREIRA *et al.* (2001) na reação de esterificação do ácido butírico e diferentes álcoois (C2 a C10) numa razão molar fixa (1,5: 1) com lipase microbiana *Candida rugosa* imobilizada em quitosana, numa temperatura de 37°C, sendo constatado que os diferentes álcoois promoveram conversões de ácidos butírico superiores a 40%, com exceção do etanol que apresentou uma conversão molar de apenas 26%. Segundo esse mesmo autor, a presença de etanol ou propanol como doadores do grupo acila, no meio reacional pode ocasionar danos na camada de hidratação da interação camada-protéica ou na estrutura da enzima, resultando numa inibição parcial ou total da preparação enzimática. Esse efeito negativo pode ser atribuído à alta polaridade desses álcoois ( $\log P < 0$ ), o que ocasiona uma partição (migração) do álcool para a fase sólida (enzima/suporte), resultando numa saturação do microambiente da enzima. Desta forma, a água contida na preparação enzimática pode ter sido parcialmente removida, ocorrendo redução da atividade da lipase. Além disso, pode ocorrer uma redução da disponibilidade do álcool na fase líquida interrompendo a reação de interesterificação. Assim os fenômenos de partição causam a modificação do estado original de hidratação enzimática e um aparente desequilíbrio entre a taxa de conversão e disponibilidade do álcool no meio reacional.

Portanto, é provável que o elevado poder desidratante do etanol tenha ocasionando efeitos similares, porém mais severos que os descritos por PEREIRA *et al.* (2001), tendo em vista que o rendimento global em ésteres de etila empregando lipase de *Candida rugosa* imobilizada em POS-PVA foi de apenas 2,2%.

Analisando os resultados, verifica-se um comportamento similar da atuação lipase de *Candida rugosa* imobilizada na reação de interesterificação, independente do tipo de suporte usado (polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) ou óxido de nióbio hidratado -  $N_2O_5 \cdot nH_2O$ ).

Esses dados sugerem que a lipase de *Candida rugosa* foi a preparação enzimática menos adequada para efetuar a reação de interesterificação do óleo de babaçu visando à obtenção de biodiesel. No entanto, resultados satisfatórios foram obtidos para a mesma reação, utilizando butanol como doador do grupo acila (38,7% de conversão média).

#### 4.5. Comparação do Desempenho dos Sistemas Imobilizados na Reação de Interesterificação Enzimática

O presente trabalho teve o interesse em verificar o comportamento dos sistemas imobilizados na reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu visando à obtenção de biodiesel.

Os resultados obtidos apontam a viabilidade do emprego de catalisadores bioquímicos (lipases) para obtenção de biodiesel a partir de óleos de baixo custo, especificamente o óleo de babaçu por interesterificação com álcoois de cadeia curta (etanol, propanol e butanol).

Uma comparação do desempenho dos sistemas imobilizados testados na reação de interesterificação, tomando por base o rendimento global máximo em monoésteres de etila, propila e butila são apresentados nas Tabelas 4.13 a 4.15 e Figura 4.25.

Entre todas as lipase imobilizadas testadas na produção de monoésteres a Novozym 435 apresentou o melhor desempenho com rendimento global superior a 50%. Nas mesmas condições operacionais a lipase pancreática (LPP) imobilizada em polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) apresentou um rendimento global de 48,5%, mostrando-se também eficaz na alcoólise do óleo de babaçu e butanol, alcançando concentrações satisfatórias de ésteres de butila. Estudos adicionais são ainda necessários para aumentar o rendimento global da reação, tornando a alternativa da via enzimática atrativa comercialmente.

**Tabela 4.13.** Comparação do desempenho das preparações de lipase imobilizada na formação de monoésteres de etila.

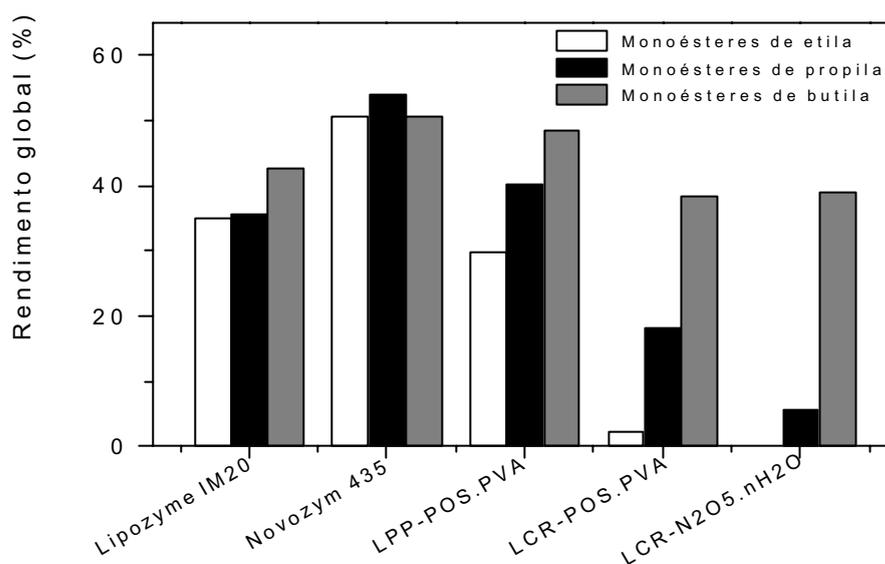
Sistema imobilizado	Monoésteres de etila (%)							
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	Total
Lipozyme IM <sup>20</sup>	3,3	2,3	13,9	6,6	2,8	1,0	4,5	34,4
Novozym 435	3,3	2,7	23,6	7,2	2,5	0,9	9,5	49,7
LPP-POS.PVA	2,3	2,0	14,0	5,1	2,2	0,7	3,1	29,4
LCR-POS-PVA	0,3	0,2	1,2	0,4	0,04	0,01	0	2,15
LCR-N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .nH <sub>2</sub> O	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabela 4.14.** Comparação do desempenho das preparações de lipase imobilizada na formação de monoésteres de propila.

Sistema imobilizado	Monoésteres de propila (%)							
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	Total
Lipozyme IM <sup>20</sup>	2,8	2,2	15,8	6,2	1,6	0,9	4,5	35,0
Novozym 435	3,5	3,8	22,7	9,3	3,8	1,3	8,6	53,0
LPP-POS.PVA	3,1	2,6	18,1	5,8	2,3	0,8	6,8	39,5
LCR-POS.PVA	2,2	1,3	11,1	1,4	0,6	0,2	1,2	18,0
LCR-N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .nH <sub>2</sub> O	0,2	0,4	3,1	0,6	0,3	0,9	0,1	5,6

**Tabela 4.15.** Comparação do desempenho das preparações de lipase imobilizada na formação de monoésteres de butila.

Sistema imobilizado	Monoésteres de butila (%)							
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	Total
Lipozyme IM <sup>20</sup>	3,2	2,7	19,0	7,5	3,2	1,1	5,2	41,9
Novozym 435	3,3	3,0	21,6	10,5	3,3	1,1	7,0	49,8
LPP-POS-PVA	3,5	3,0	19,5	10,1	3,4	1,2	6,9	47,6
LCR POS-PVA	0	2,7	19,2	4,8	2,2	0,8	6,7	36,4
LCR-N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .nH <sub>2</sub> O	0	3,0	21,4	4,4	2,3	0,8	5,1	37,0



**Figura 4.25.** Comparação do desempenho das lipases imobilizadas na formação de monoésteres de etila, propila e butila, a partir do óleo de babaçu.

#### 4.6. Comparação do Rendimento na Interesterificação Enzimática e Química

A partir dos resultados obtidos e mostrado na Tabelas 4.15 e Figura 4.26, comparou-se o desempenho das preparações de lipase imobilizada (Novozym 435 e a LPP-POS-PVA) com o hidróxido de sódio como catalisador na interesterificação por via química.

Os resultados obtidos mostram que a formação de biodiesel foi mais rápida pela via química com tempo de reação inferior a 7 h e alcançou maior porcentagem de conversão, se comparado com os sistemas imobilizados, para ambos tipos de álcoois. A formação de monoésteres de etila foi de 66,9% em 6 h e a 78°C empregando NaOH e 50,7% para a Novozym 435 e 48,5% para o sistema imobilizado LPP-POS-PVA a 40°C.

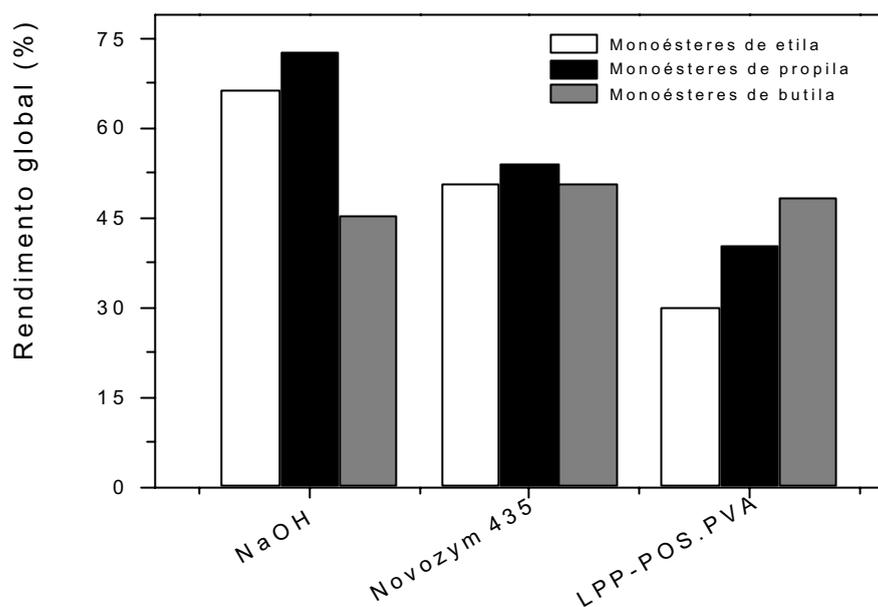
**Tabela 4.16.** Rendimento global da reação para formação de monoésteres de butila

Sistema reacional	Catalisador	Temperatura (°C)	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
Monoésteres de etila	NaOH	78	6	66,9
	Novozym 435	40	24	50,7
	LPP-POS.PVA	40	72	48,5
Monoésteres de propila	NaOH	97	3	72,6
	Novozym 435	40	24	50,6
	LPP-POS.PVA	40	96	29,9
Monoésteres de butila	NaOH	117	7	45,3
	Novozym 435	50	24	50,7
	LPP-POS.PVA	50	120	48,5

O rendimento global de formação de monoésteres de propila foi de 72,6% em 3 h e a 97°C empregando NaOH e 50,6% para a Novozym 435 e 29,9% para o sistema imobilizado LPP-POS.PVA a 40°C. A obtenção de monoésteres de propila empregando a Novozym 435 foi bastante similar à reação de interesterificação com etanol e para a LPP-POS.PVA a formação de biodiesel foi inferior a 40%.

O rendimento global de formação de monoésteres de butila foi de 45,3% em 7 h e a 117°C empregando NaOH e 50,7% para a Novozym 435 e 48,5% para o sistema imobilizado LPP-POS.PVA a 50 °C.

As reações de formação de biodiesel por via química são mais efetivas empregando os álcoois etanol e propanol, com resultados próximos a 70% e menor rendimento global da reação empregando o butanol. Para as reações de interesterificação catalisadas pela Novozym 435 foram alcançados rendimentos globais da ordem de 50,7%. Esses resultados mostram que esta enzima apresenta elevada atividade catalítica independente do tipo de álcool, o que não foi constatado para a LPP-POS.PVA com maior afinidade pelos álcoois etanol e butanol, alcançando rendimentos globais da ordem de 48,5%, enquanto para o propanol um rendimento global de 29,9% foi alcançado.



**Figura 4.26.** Comparação do rendimento global da reação de interesterificação enzimática e química.

Por meio desses resultados, foi selecionado o sistema imobilizado LPP-POS.PVA para estudos posteriores visando otimizar a reação de interesterificação de óleos vegetais com álcoois de cadeia curta para produção de biodiesel, tendo em vista o baixo custo desse sistema imobilizado. A enzima Novozym 435, comercializada pela empresa Novozymes é bastante estudada e relatada na literatura em reações em meio orgânico na obtenção de biodiesel. O seu custo é relativamente elevado se comparado com o sistema imobilizado LPP-POS.PVA (US\$ 0,63/g), o que torna atrativo o estudo de novos sistemas imobilizados com custo reduzido e elevada eficiência na síntese de produtos de interesse.

Estudos adicionais são ainda necessários para otimizar a reação de interesterificação enzimática do óleo de babaçu empregando a lipase pancreática imobilizada em POS.PVA, bem como será necessário efetuar estudos na etapa de recuperação e purificação quantificando os parâmetros pertinentes ao produto de interesse (biodiesel), tais como viscosidade, índice de cetano, entre outros.

## 5. CONCLUSÕES

O biodiesel (ésteres de ácidos graxos), derivado de triglicerídeos obtido por interesterificação com álcoois, tem atraído considerável atenção como combustível renovável, biodegradável e não-tóxico. Muitos processos têm sido desenvolvidos para produção de biodiesel, mas a interestrificação usando álcali como catalisador tem gerado altos níveis de conversões de triglicerídeos em monoésteres em curto tempo de reação. Por essa razão, este processo tem sido adotado para produção de biodiesel em muitos países da Europa e América do Norte.

Recentemente, a interesterificação enzimática, empregando a enzima lipase tornou-se mais atrativa para a produção de biodiesel, uma vez que o glicerol produzido como subproduto pode ser facilmente recuperado e a purificação dos monoésteres é completa. A maior dificuldade da comercialização deste processo ainda é o custo da produção de lipases. O custo de produção das lipases pode ser reduzido por aplicação de genética molecular produzindo lipases de alta produtividade, seletividade e estabilidade, bem como pela imobilização das mesmas viabilizando a reutilização seguida em reações.

A otimização da síntese de monoésteres de ácidos graxos (biodiesel) por meio de uma abordagem quantitativa de desempenho de um determinado sistema é uma etapa essencial para viabilizar a aplicação dessa tecnologia em escala industrial. Tomando como exemplo o que ocorreu com a indústria de óleos e gorduras na década de oitenta, com a substituição do processo de hidrólise química por via enzimática com aumento de qualidade e produtividade, a indústria do biodiesel deve conhecer e testar as tecnologias enzimáticas para este processo.

O presente trabalho teve com objetivo principal, estudar o processo de obtenção de biodiesel por interesterificação enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta empregando preparações de lipase imobilizada em diferentes suportes.

De acordo com os resultados obtidos, o sistema constituído de óleo de babaçu: álcool e lipase de pâncreas de porco imobilizada em partículas de polisiloxano-álcool polivinílico apresentou resultados bastante satisfatórios na obtenção dos monoésteres de ácidos graxos, sendo selecionado para um estudo mais detalhado. Essa preparação de lipase obtida experimentalmente forneceu um desempenho bastante similar ao alcançado para a lipase Lipozyme IM<sup>20</sup>, disponível comercialmente.

Adicionalmente o trabalho desenvolvido permitiu obter um conhecimento mais detalhado do processo enzimático de produção de biodiesel, incluindo:

1. Os métodos cromatográficos estabelecidos revelaram ser uma ferramenta eficiente no monitoramento da reação de interesterificação, permitindo a análise rápida e precisa da concentração dos monoésteres de ácidos graxos.
2. Dentre as preparações de lipases disponíveis comercialmente e inicialmente testadas na interesterificação do óleo de babaçu, a Novozym 435 foi a que apresentou melhor desempenho com rendimentos superiores a 50% e tempo de reação de 24h. Para essa específica preparação, o tamanho da cadeia do álcool não influenciou significativamente no processamento da reação, sendo obtidos rendimentos similares para os três álcoois testados.
3. A Lipozyme IM<sup>20</sup> e lipase pancreática imobilizada em polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) alcançaram desempenhos similares com rendimentos globais na faixa de 30-48,5%, dependendo do sistema óleo: álcool. Os rendimentos mais elevados foram obtidos para o sistema contendo óleo: butanol.
4. A lipase de *Candida rugosa* não foi eficiente na interesterificação do óleo de babaçu para os sistemas óleo: etanol e óleo: propanol, possivelmente devido aos seguintes fatores: tamanho da cadeia, polaridade destes álcoois e esterossletividade enzimática. Os sistemas óleo: álcoois apresentaram rendimentos máximos globais na seguinte ordem: óleo:etanol < óleo propanol < óleo butanol.
5. Os sistemas imobilizados que forneceram conversões mais elevadas foram a Novozym 435 e a LPP-POS.PVA. Os resultados mostram que a formação de biodiesel foi mais rápida pela via química com tempo de reação inferior a 7 h e alcançou maior porcentagem de conversão, quando comparado ao desempenho dos sistemas imobilizados para todos os álcoois testados. A formação de monoésteres de etila foi de 66,9% em 6 h e a 78°C empregando NaOH e 50,7% para a Novozyme 435 e 48,5% para o sistema imobilizado LPP-POS.PVA a 40°C.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para se dar continuidade e complementar os estudos de produção de biodiesel por interesterificação enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta empregando a preparação de lipase pancreática imobilizada, sugere-se:

1. Otimizar a reação de interesterificação enzimática por meio de um planejamento fatorial empregando a lipase pancreática imobilizada em partículas de polisiloxano-álcool polivinílico;
2. Testar outros procedimentos de imobilização de lipase pancreática para garantir maior estabilidade térmica da preparação resultante;
3. Testar outros óleos vegetais de baixo custo, como dendê e mamona, utilizando os mesmos álcoois estudados no presente trabalho com o emprego de lipase pancreática imobilizada em POS-PVA
4. Estudar a etapa de recuperação e purificação do óleo interesterificado e caracterizar os parâmetros pertinentes do produto de interesse (biodiesel).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIGOR, R.; UADIA, P.; FOGLIA, T.; HAAS, M.; JONES, K.; OKPEFA, E.; OBIBUZOR, J.; BAFOR, M. (2000). "Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from Nigerian lauric oils. *Biochemical Society Transactions*, v. 28, p. 979-981.
- ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS (2003). <http://www.aboissa.com.br>, acessado em 02 de outubro de 2003.
- AKSOY, H. A.; KAHRAMAN, I.; KARAOSMANOGLU, F.; CIVELEKOGLU, H. (1988). "Evaluation of Turkish sulphur olive oil as an alternative diesel fuel". *Journal of American Oil Chemists' Society* v. 65, p. 936-938.
- ALCÂNTARA, R.; AMORES, J.; CANOIRA I; FIDALGO, E; FRANCO, M. J.; NAVARRO, A. (2000). "Catalytic production of biodiesel from soybean oil, used frying oil to diesel and tallow". *Biomass Bioenergy*, v. 18, p. 515-527.
- ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; GUZZO, J. (1999). "Molecular characterisation of the gene encoding an esterase from *Bacillus licheniformis* sharing significant similarities with lipases". *Biotechnology Letters*, v.21, n. 4, p. 313-319.
- ANDRADE, E. B. (2003). "Programa brasileiro de desenvolvimento tecnológico de combustíveis alternativos". In: SEMINÁRIO PARANAENSE DE BIODIESEL, v. 1, Londrina. Anais eletrônicos disponível em: <http://www.tecpar.br/cerbio/Seminario-palestras.htm>, acesso em 23 de agosto de 2003.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. (1996). "Bioreactors with immobilized lipases: State of the art", *Enzyme and Microbial Technology*, v.18, n. 6, p.392-416.
- BARRETO, C. R. (1982). "Óleo de dendê substituo do petróleo como combustível e matéria-prima". *Petro & Química*, n. 50.
- BARTHOLOMEW, D. (1981). "Vegetable oil fuel". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 58, p. 288.
- BILLAUND, F.; DOMINGUEZ, V.; BROUTIN, P.; BUSSON, C. (1995). "Production of hydrocarbons by pyrolyses of methyl esters from rapessed oil". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 72, p. 1149-1154.
- BOURNE, Y.; MARTINEZ, C.; KERFELEC, B.; LOMBARDO, D.; CHAPUS, C.; CABBILLAU, C. (1994). "Horse pancreatic lipase – the crystal structure refined at 2.3 Å resolution". *Journal of Molecular Biology*, v. 238, p. 709-732.
- BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; TOLLEY, S. TURKENBURG, J. P.; CRISTIENSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSEKOV, L.; MENGE, U. (1990). "A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase". *Nature*, v. 343, p. 767-770.
- BREIVIK, H.; HARALDSSON, G. G.; KRISTINSSON, B. (1997). "Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 74, p. 1425-1429.

- BRUNO, L. M. (2003). "Desenvolvimento de sistemas enzimáticos (Lipases) para aplicação na hidrólise e síntese de ésteres". (Tese de Doutorado) Departamento de Bioquímica; LIKA-UFPE, 96 pp.
- BRUNO, L. M.; LIMA FILHO, J. L.; MELO, E. H. M.; CASTRO, H. F. (2004) "Ester synthesis catalyzed by *Mucor miehe* immobilized onto polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113, p. 189-199.
- CAMPOS, I. (2003). "Biodiesel e biomassa: Duas fontes para o Brasil". Revista de Ecologia do Século 21, v. 80. Disponível em: <http://www.eco21.com.br/textos> Acesso em: 26/08/2003.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. (2004). "Modificação de óleos e gorduras por biotransformação". *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156.
- CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F.; ZANIN, G. M. (1999). "Immobilization of lipase on Celite for application in the synthesis of butyl butyrate in nonaqueous system". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 76, n. 1, p. 147-152.
- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. (1995). "Fine chemicals by biotransformation using lipases". *Química Nova*, v.18. n.6, p.544-554.
- CLARK, S. J.; WANGNER, L.; SCHROCK, M. D.; PIENNAAR, P. G. (1984). "Methyl and ethyl soybean esters as renewable fuels for diesel engines". *Journal of American Oil Chemists' Society* v. 61, n. 10, p. 1632-1638.
- CLEASBY, A.; GARMAN, E.; EGMOND, M. R. (1992). "Crystallization and preliminary X- ray study of a lipase from *Pseudomonas glumae*". *Journal of Molecular Biology*, v. 224, n. 1, p. 281-282.
- COSTA NETO, P. R. (2002). "Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja". (Tese de Doutorado) Departamento de Química; Centro de Ciências Físicas e Matemáticas- UFSC.
- COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. (2000). "Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras". *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 531-537.
- CORMA, A. (1995). "Inorganic solid acids and their use in acid-catalyzed hydrocarbon reactions". *Chemical Reviews*, v. 95, n. 3, p. 559-614.
- COKS, L. V.; VAN REDE, C. (1966). "Laboratory handbook for oils and fats analysis". 1 st ed., Academy Press, London.
- CROSSLEY, A.; HEYES, T. D.; HUDSON, B. J. F. (1962). "Effect of heat on pure triglycerides". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 39, p. 9-14.
- DE, B. K.; BHATTACHARYYA, D. K.; BANDHU, C. (1999). "Enzymatic synthesis of fatty alcohol esters by alcoholysis". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 76, p. 451-453.
- DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; WEI, Y; GREEN, R.; KOBOS, P. M. (1994). "Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crytallographic studies of enzymes from fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*". *Journal of Lipids Research*, v. 35, p. 524-535.

- DI LASCIO, M. A.; PINGUELLI, L. R.; MOLION, L. C. B. (1994). "Projeto de atendimento energético para comunidades isoladas da Amazônia". COPPE/ UFRJ, UNB, UFAL.
- DUFEK, E. J.; BUTTERFIELD, R. O.; FRANKEL, E. N. (1972). "Esterification and transesterification of 9(10)-carboxystearic acid and its methyl esters: Kinetic studies". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 49, n.5, p. 302-319.
- DU, W.; XU, Y.; LIU, D.; ZENG, J. (2004). "Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, p. 125-129.
- FABER, K. (1997). "Biotransformations in organic chemistry: A Textbook". 3rd Edition, Springer Produktions-Gesellschaft, Berlin, Cap. 1, 2 e 3.
- FELIZARDO, P.M.G. (2003) "Produção de biodiesel a partir de óleos usados de frituras" (licenciatura) QUERCUS – Centro de Informação de Resíduos – Instituto Superior Técnico – Departamento de Engenharia Química – Lisboa – Portugal.
- FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. (2000). "Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 75, p. 569-576.
- FEUGE, R. O.; GROS, A. T. (1949). "Modification of vegetable oils. VII. Alkali catalyzed interesterification of peanut oil with ethanol". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 26, n.3, p. 97-102.
- FILLIERES, R.; BENJELLOUN-MLAYAH, B.; DELMAS, M. (1995). "Ethanolysis of rapessed oil: quantitation of ethyl esters, mono-, di-, and triglycerides and glycerol by high performance size-exclusion chromatography". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 72, p. 427-432.
- FORMO, M. W. (1954). "Ester reactions of fatty materials". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 31, n. 11, p. 548-559.
- FREEDMAN, B.; PRYDE, E. H.; MOUNTS, T. L. (1984). "Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 61, n. 10, p. 1638-1643.
- FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. (1986). "Transesterification kinetics of soybean oil". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 63, n. 10, p. 1375-1380.
- GALLO, W. L. R. (2003). "Especificações de novos combustíveis: Papel da ANP". In: Seminário Paranaense de Biodiesel, v 1, Disponível em: <http://www.tecpar.br/cerbio/Seminario-palestras.htm>, Acesso em: 23/08/2003.
- GIOIELLI, L. A. (1998). "Interesterificação de óleos e gorduras". *Engenharia de Alimentos*, v. 4, p. 22-24.
- GOERING, C. E.; FRY, B. (1981). "Engine durability screening test of a diesel oil/soy oil/alcohol microemulsion". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 59, n. 10, p. 1627-1631.
- GRASSAN, T. A.; MAHAMAD, I.; AL-WIDYAN, B.; ALI, O. A. (2003). "Combustion performance and emissions of ester of a waste vegetable oil in a water-cooled furnace". *Applied Thermal Engineering*, v. 23, p. 285-293.

- GROCHULSKI, P.; LI, Y.G.; SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. (1994). "Two conformational states of *Candida rugosa* lipase". *Protein*, v. 3, p. 82-91.
- GROCHULSKI, P.; LI, Y.G.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; SMITH, P.; HARRISON, D.; RUBIN, B.; CIGLER, M. (1993). "Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase". *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p. 12843-12847.
- ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. (2001). "Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 16, p. 53-58.
- JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON C.; VANHEUVEL, M.; MISSET, O. (1994). "Bacterial lipases" *FEMS Microbiology Reviews*, v.15, n. 1, p.29-63.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology". *Trends in Biotechnology*, v. 16, n.9, p. 396-403.
- KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. (2001). "Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, n. 1, p. 12-15.
- KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. (1998). *Biotransformation with lipases*, In: A Multi-Volume Comprehensive Treatise in Biotechnology, (ed.) Rehm, H.J., Pihler G., Stadler, A., Kelly, P. J. W. New York: Wiley VCH Verlag, v. 8, p. 37-192.
- KILDIRAN, G.; YUCEL, S.O.; TÜRKAY, S. (1996). "In-situ alcoholysis of soybean oil". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 73, n.2. p. 225-228.
- KLOPFENSTEIN, W. E.; WALKER, H. S. (1983). "Efficiencies of various esters of fatty acids as diesel fuels". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 60, n.8, p. 1595-1598.
- KOBMEHL, S. O.; HEINRICH, H. (1998). "Assesment of the use os biofuels in passenger vehicles". *Sustainable Agricultural for Food, Energy and Industry*, p. 867-875.
- KÖSE, Ö.; TÜTER, M.; AKSOY, H. A. (2002). "Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium". *Bioresource Technology*, v. 83, p. 125-129.
- KRISNANGKURA, K.; SIMAMAHARUNOP, R. (1992). "Continuous transesterification of palm oil in an organic solvent". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 69, p. 166-169.
- KUSDIANA, D.; SAKA, S. (2001). "Kinetics of transesterification in rapessed oil to biodiesel fuel treated in supercritical metanol". *Fuel*, v. 80, p. 693-698.
- LANG, D.; HOFMANN, B.; HAALCK, L.; HECHT, H. J.; SPENER, F.; SCHIMID, R.D.; SCHOMBURG, D. (1996). "Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATC 6918 refined at 1.6Å resolution". *Journal of Molecular Biology*, v. 259, n.4, p. 704-717.

- LARA, V. P.; PARK, E. Y. (2004). "Potencial application os waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system". *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, p. 270-277.
- MA, F.; CLEMENTS, L. D.; HANNA, M. A. (1999). "The effect of mixing on transesterification of beef tallow". *Bioresource Technology*, v. 69, p. 289-293.
- MA, F.; HANNA, M. A. (1999). "Biodiesel production: A review". *Bioresource Technology*, v. 70, p. 1-15.
- MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. (2004). Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais. *Biotechnology Ciência e Desenvolvimento*, n. 32, p. 38-46.
- MARANGONI, A. G.; ROUSSEAU, D. (1995). "Engineering triacylglycerols: The role of interesterification". *Trends in Food Science and Technology*, v. 6, p. 329-335.
- METZGER, O. J. (2001). "Organic reactions without organic and oils and fats as renewable raw materials for the chemists industry". *Chemosphere*, v. 43, p. 83-87.
- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA, MCT (2002). "Primeiro inventário brasileiro de emissões antrópicas de gases de efeito estufa". Brasília, DF.
- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA, MCT (2002). "Programa Brasileiro de Biocombustíveis: Rede brasileira de biodiesel – PROBIODIESEL. Brasília, DF.
- MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA E DO COMÉRCIO, MC (1985). "Óleos vegetais  $\frac{3}{4}$  experiência de uso automotivo desenvolvida pelo programa OVEG I". Secretaria de Tecnologia Industrial; Coordenadoria de Informações Tecnológicas; Brasília, DF.
- MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA E DO COMÉRCIO, MIC (1985). "Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais". Secretaria de Tecnologia Industrial; Coordenadoria de Informações Tecnológicas; Brasília, DF, p. 364.
- MIRANDA, M. (2004). "Aprimoramento do procedimento de imobilização da lipase microbiana em óxido de nióbio para modificação de óleos vegetais". (Dissertação de mestrado). Faculdade de Engenharia Química de Lorena – DEQUI, Lorena –SP.
- MITTELBAACH, M. (1990). "Lipase catalyzed alcoholyses of sunflower oil". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 67, n. 3, p. 168-170.
- MITTELBAACH, M.; TRITTHART, P.; JUNEK, H. (1985). "Diesel fuel derived from vegetable oils, II: emission tests using rape oil methyl ester". *Energy in Agriculture*, v. 4, p. 207-215.
- MOLION, L. C. B. (1994). "Projeto-piloto: Auto-suficiência energética para um núcleo populacional do município de Cruzeiro do Sul". Acre, Alagoas, Proplan – UFAL.
- MORETTO, E.; FETT, R. (1989). *Óleos e Gorduras Vegetais (Processamento e Análises)*. 2ªed, Editora da UFSC, Florianópolis.
- NAG, A.; BHATTACHARYA, S.; DE, K. B. (1995). "New utilization of vegetable oils". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 72, p. 1591-1593.
- NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P. R; MAZZUCO, L. M. (2001). "Biotransformação de óleos e gorduras". *Biotechnology Ciência e Desenvolvimento*, v. 17, p. 28-31.
- NATIONAL BIODIESEL BOARD (1998). In: Anais do Congresso Internacional de Biocombustíveis Líquidos; Instituto de Tecnologia do Paraná; Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior; Curitiba, PR, 19 a 22 de julho, p. 42.

- NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. (1996). "Lipase-catalyzed production of biodiesel". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 73, n. 9, p. 1191-1195.
- NYE, M. J.; WILLIAMSON, T. W.; DESHPANDE, S. (1983). "Conversion of used frying oil to diesel fuel by trans-esterification-preliminary tests". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 60, n. 8, p. 1598-1601.
- NOGUEIRA, L. A.; PIKMAN, B. (2002). "Biodiesel: Novas perspectivas de sustentabilidade. Conjuntura & Informação – Agência Nacional do Petróleo, n. 19, 2002. Disponível em: [http://www.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/doc/informe\\_ci](http://www.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/doc/informe_ci), Acesso em: 25/08/2003.
- NOUREDDINI, H.; ZHU, D. (1997). "Kinetics of transesterification of soybean oil". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 74, n. 11, p. 1457-1463.
- OLIVEIRA, L. B.; COSTA, A. O. (2002). "Biodiesel: Uma experiência de desenvolvimento sustentável". Universidade Federal do Rio de Janeiro. Acesso em 15/01/2003. [www.ivig.coppe.ufrj.br](http://www.ivig.coppe.ufrj.br).
- OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H.F. (2000). "Immobilization studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer". *Biochemical Engineering Journal*, v. 5, p. 63-71.
- OLIVEIRA, D.; ALVES, T. L. M. (2000). "A kinetics study of lipase-catalyzed alcoholysis of palm kernel oil". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84, n. 6, p. 59-68.
- OLIVEIRA, D.; ALVES, T. L. M. (1999). "Enzymatic alcoholysis of palm kernel oils - Optimization by statistical methods". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77, n. 9, p. 835-844.
- OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJIKAWA, T. (1976). "Positional specificities of four kinds of microbial lipases". *Agricultural Biology Chemistry*, v. 40, p. 655-660.
- ÖZGÜL, S. TÜRKAY, S. (1993). "In situ esterification of rice bran oil with methanol and ethanol". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 70, p. 145-147.
- PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. (2000). "Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases". *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 3-5, p. 187-204.
- PARENTE, E. J. S. (2003). "Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado". [expedito@tecbio.com.br](mailto:expedito@tecbio.com.br) – acessado em 30 de maio 2003.
- PAULA, A. V. (2003). "Estudo da influência do solvente, carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. Relatório de atividades de Iniciação Científica. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena (Relatório de Atividades de Projeto (FAPESP 03/00654-9)).
- PEREIRA, E. B; CASTRO, H. F; MORAES, F. F; ZANIN, G. M. (2001). "Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: A comparative study between free and enzyme immobilized onto porous chitosan beads". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91/93, p. 739-752.

- PERES, J. R. R.; JUNIOR, E. F. (2003). "Insumos oleaginosos para o biodiesel: Um diferencial entre a soja e o girassol". In: SEMINÁRIO PARANAENSE DE BIODIESEL, v.1, Londrina. Disponível em: <http://www.tecpar.br/cerbio/Seminario-palestras.htm>, Acesso em: 23/08/2003.
- PETROBRÁS/ CENPES (1980). "Estudo sobre o uso de óleos vegetais como combustível para motores diesel". Rio de Janeiro.
- PIYAPORN, K.; JEYASHOKE, N.; KANIT, K. (1996). "Survey of seed oils for use as diesel fuels". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 73, n. 4, p. 471-474.
- PLANK, C.; LORBEER, E. (1995). "Simultaneous determination of glycerol, and monodiglycerides, diglycerides and triglycerides in vegetable oil methyl-esters by capillary gas-chromatography". *Journal of Chromatography*, v. 697, n. 1-2, p. 461-468.
- PRYDE, E. H. (1983). "Vegetable oils as diesel fuels-overview". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 60, n. 8, p. 1557-1558.
- RAMOS, L. P.; KUČEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M. (2003). "Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil". *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 31, p. 28-37.
- ROZENAAL, A. (1992). "Interesterification of oils and fats". *Inform*, v. 3, n. 11, p. 1232-1237.
- SAMUKAWA, T.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; BAN, K.; KONDO, A.; SHIMADA, Y.; NODA, H.; FUKUDA, H. (2000). "Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel. Production from plant oil". *Biochemical Engineering Journal*, v. 90, n. 2, p. 180-183.
- SARDA, L.; DESNUELLE, P. (1958). "Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion". *Biochemistry Biophysical Acta*, v. 30, p. 513-521.
- SCHEIB, H.; PLEISS, J.; STADLER, P.; KOVAC, A.; POTTHOFF, A. P.; HAALCK, I.; SPENER, F.; PALTAUF, F.; SCHMID, R. D. (1998). "Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified steleoselectivity toward triacylglycerols". *Protein Engineering Journal*, v. 11, p. 675-682.
- SCHRAG, J. D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M. (1991). "Ser-His-Glu triad from the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*". *Nature*, v. 351, p. 761-764.
- SCHUCHARDT, U.; SERCHEL, R.; VARGAS, R. M. (1998). "Transesterification of vegetable oils: A review". *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 9, n. 3, p. 199-210.
- SCHWAB, A. W.; BAGBY, M. O.; FREEDMAN, B. (1987). "Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils". *Fuel*, v. 66, p. 1372-1378.
- SCHWAB, A. W.; DYKSTRA, G. J.; SELKE, E.; SORENSON, S.; PRYDE, E. H. (1988). "Diesel fuel from thermal decomposition of soybean oil". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 65, p. 1781-1786.
- SCHMID, R. D.; VERGER, R. (1998). "Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications". *Angewandte Chemie-International Edition*, v.37, n. 12, p. 1609-1633.
- SELMİ, B.; THOMAS, D. (1998). "Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in solvent-free medium". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 75, p. 691-695.

- SERRUYA, H. (1991). "Óleos Vegetais". In: Congresso Brasileiro de Química, v. 31. Recife: Universidade Federal de Pernambuco.
- SHAY, E. G. (1993). "Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities". *Biomass and Bioenergy*, v. 4, p. 227-242.
- SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. (1999). "Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 76, n. 7, p. 789-793.
- SOARES, C. M. F., CASTRO, H. F., SANTANA, M H A, ZANIN, G. M. (2002). "Intensification of lipase performance for long-term operation by immobilization on controlled pore silica in presence of polyethylene glycol". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98-100, p. 863-874.
- SONNTAG, N. O. V. (1979). "Structure and composition of fats and oils". Bailey's Industrial oil and fat products, 4th edition, ed. Swern, D. John Wiley and Sons, New York, v. 1, p. 1-343.
- SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. (2003). "Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esteres from sunflower oil". *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 97-103.
- SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. (2000). "Triglycerides-based diesel fuels". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 4, n. 2, p. 111-133.
- STOURNAS, S.; LOIS, E.; SERDARI, A. (1995). "Effects of fatty-acid derivatives on the ignition quality and cold flow of diesel fuel". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 72, n. 4, p. 433-437.
- STRYER, L. (1992). "Bioquímica". 3a edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A., p.186.
- TOMBS, M. P. (1995). "Enzymes in the processing of fat oils. In: TUCKER, G. A.; WOODS, L. F. J. (eds), Enzymes in Food Processing, 2nd. ed., London: Blackie Academic & Professional, p. 268-291.
- UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. (1994). "The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*". *Structure*, v. 2, p. 293-308.
- URIOSTE, D.; CASTRO, H. F. (2004). "Biotransformação de óleo de babaçu para produção de biodiesel". In: XV COBEQ 2004 - Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Curitiba (CD ROM 6p).
- VERGER, R. (1997). "Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts". *Trends in Biotechnology*, v. 15, n.1, p. 32-38.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. M.; HAAS, M. J. (2000). "Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, n. 46, p. 113-148.
- WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. (2000). "Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 77, n. 4, p. 355-360.

- WILLIS, W. M.; MARANGONI, A. G. (1999). "Biotechnological strategies for the modification of food lipids". *Biotechnology Genetic Engineering Review*, v. 16, p. 141-175.
- WINKLER, F. K.; GUBERNATOR, K. (1994). "Lipases – Their structure, biochemistry and application". Cambridge University Press: Cambridge.
- WU, W. H.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N.; PHILLIPS, J. G. (1999). "Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology". *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 76, n. 4, p. 517-521.
- YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. (1998). "Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions". *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, n. 7-8, p. 438-450.
- ZIEJEWSKI, M.; KAUFMAN, K. R.; SCHWAB, A. W.; PRYDE, E. H. (1984). "Diesel engine evaluation of a nonionic sunflower oil-aqueous ethanol microemulsion". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 61, n.10, p. 1620-1626.
- ZIEJEWSKI, M.; KAUFMAN, K. R. (1983). "Laboratory endurance test of a sunflower oil blend in a diesel engine". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 60, n.8, p. 1567-1573.

## 8. APÊNDICES

### 8.1. Experimentos de síntese química dos padrões cromatográficos

#### 8.1 A Proporção dos materiais usados na síntese dos monoésteres de etila

##### Ácido caprílico (C8) com etanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ácido caprílico	144,21	1,0	0,069	10,00	10,12
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,139	16,50	
EtOH	46,07	5,0	0,347	15,97	

##### Ácido cáprico (C10) com etanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ácido cáprico	172,26	1,0	0,058	10,00	8,47
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,116	13,82	
EtOH	46,07	5,0	0,290	13,37	

##### Ácido láurico (C12) com etanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ácido láurico	200,31	1,0	0,050	10,00	7,29
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,100	11,88	
EtOH	46,07	5,0	0,250	11,50	

##### Ácido mirístico (C14) com etanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ácido mirístico	228,37	1,0	0,044	10,00	6,39
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,088	10,42	
EtOH	46,07	5,0	0,219	10,09	

##### Ácido palmítico (C16) com etanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ácido palmítico	256,42	1,0	0,039	10,00	5,69
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,078	9,28	
EtOH	46,07	5,0	0,195	8,98	

##### Ácido esteárico (C18) com etanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ácido esteárico	284,47	1,0	0,035	10,00	5,13
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,070	8,37	
EtOH	46,07	5,0	0,176	8,10	

##### Ácido oleico (C18:1) com etanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ácido oleico	282,42	1,0	0,035	10,00	5,17
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,071	8,43	
EtOH	46,07	5,0	0,177	8,16	

### 8.1 B. Proporção dos materiais usados na síntese dos monoésteres de propila

#### Ácido caprílico (C8) com propanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Acido caprílico	144,21	1,0	0,069	10,00	10,12
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,139	16,51	
PropOH	60,10	5,0	0,347	20,84	

#### Ácido cáprico (C10) com propanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Acido cáprico	172,26	1,0	0,058	10,00	8,47
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,116	13,82	
PropOH	60,10	5,0	0,290	17,45	

#### Ácido laurico (C12) com propanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Acido laurico	200,31	1,0	0,050	10,000	7,29
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,100	11,882	
PropOH	60,10	5,0	0,250	15,002	

#### Ácido mirístico (C14) com propanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Acido mirístico	228,37	1,0	0,044	10,00	6,39
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,088	10,42	
PropOH	60,10	5,0	0,219	13,19	

#### Ácido palmítico (C16) com propanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Acido palmítico	256,42	1,0	0,039	10,00	5,69
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,078	9,28	
PropOH	60,10	5,0	0,195	11,72	

#### Ácido esteárico (C18) com propanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Acido esteárico	284,47	1,0	0,035	10,00	5,13
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,070	8,37	
PropOH	60,10	5,0	0,176	10,56	

#### Ácido oleico (C18:1) com propanol

Reagentes	PM	Eq	N <sup>0</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Acido oleico	282,42	1,0	0,035	10,00	5,17
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,071	8,43	
PropOH	60,10	5,0	0,177	10,64	

**Experimentos C: Síntese dos monoésteres de propila****Ácido caprílico (C8) com n-butanol**

Reagentes	PM	Eq	N <sup>o</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ac. caprílico	144,21	1,0	0,0861	10,00	12,56
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,1722	20,49	
ButOH	74,12	5,0	0,4305	31,91	

**Ácido cáprico (C10) com n-butanol**

Reagentes	PM	Eq	N <sup>o</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ac. cáprico	172,26	1,0	0,0580	10,00	8,46
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,1160	13,80	
ButOH	74,12	5,0	0,2900	21,49	

**Ácido mirístico (C14) com n-butanol**

Reagentes	PM	Eq	N <sup>o</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ác. mirístico	228,37	1,0	0,0438	10,00	6,39
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,0876	10,42	
ButOH	74,12	5,0	0,2185	16,23	

**Ácido palmítico (C16) com n-butanol**

Reagentes	PM	Eq	N <sup>o</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ác. Palmítico	256,42	1,0	0,0195	5,00	2,90
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,0384	4,64	
ButOH	74,12	5,0	0,0975	7,23	
	23,00	1,2	0,0234	0,54	

**Ácido esteárico (C18) com n-butanol**

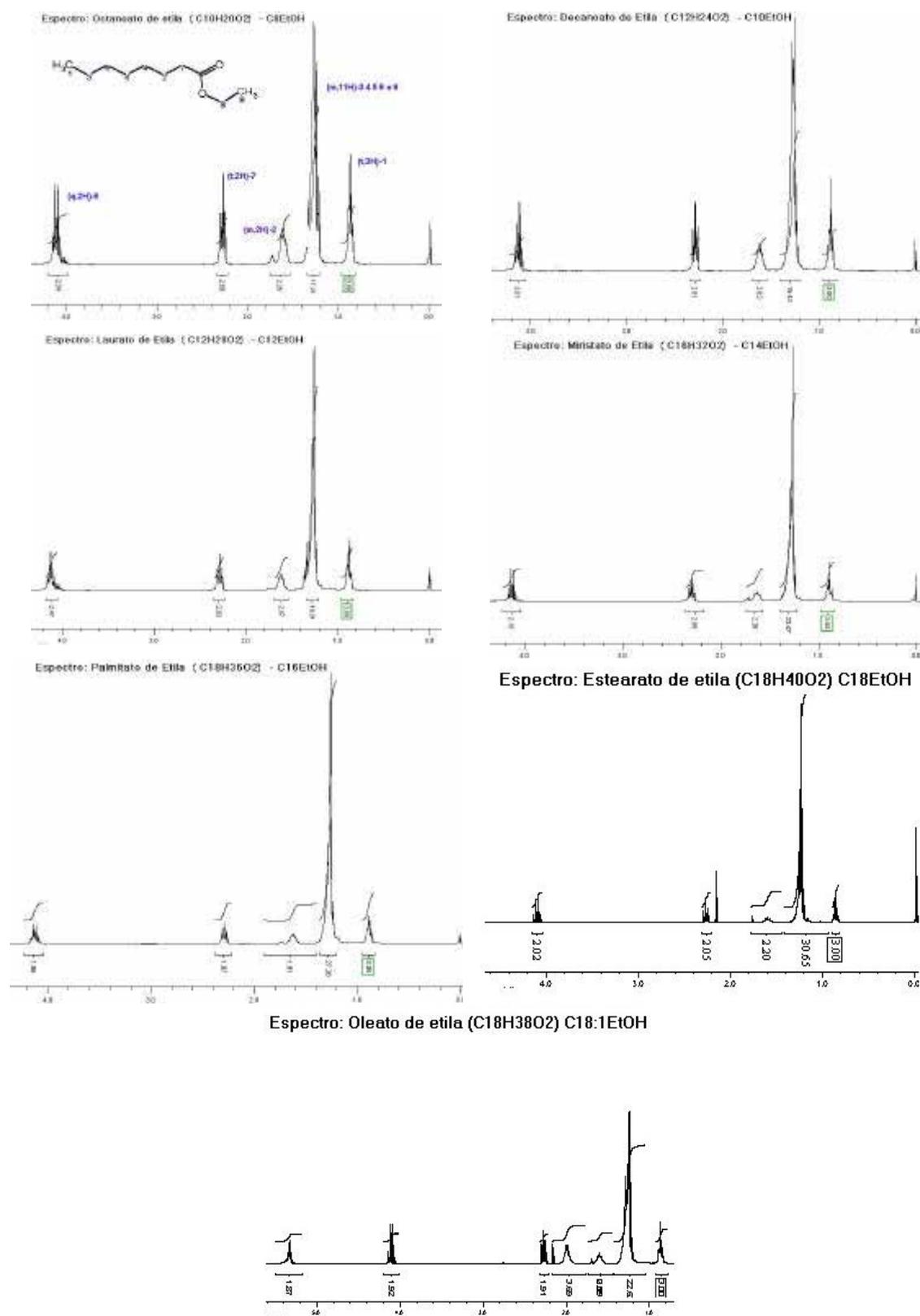
Reagentes	PM	Eq	N <sup>o</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ac. esteárico	284,47	1,0	0,0351	10,0	5,12
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,0702	8,354	
ButOH	74,12	5,0	0,1755	13,01	

**Ácido oleico (C18:1) com n-butanol**

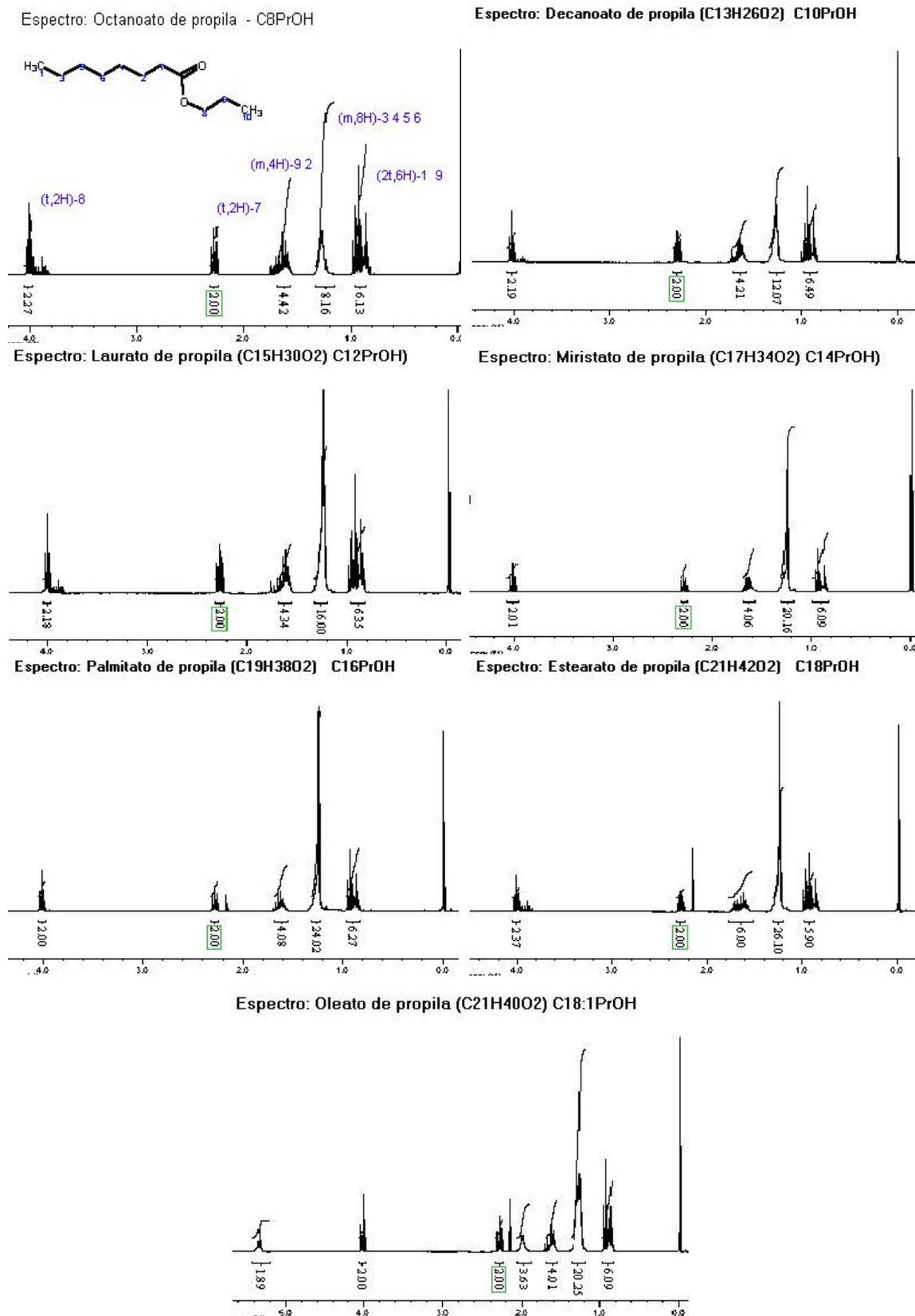
Reagentes	PM	Eq	N <sup>o</sup> moles	Massa (g)	V (mL)
Ac. oleico	282,42	1,0	0,0354	10,00	5,17
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,0708	4,64	
ButOH	74,12	5,0	0,1775	7,23	

## 8.2. Caracterização dos monoésteres de ácidos graxos por RMN $^1\text{H}$

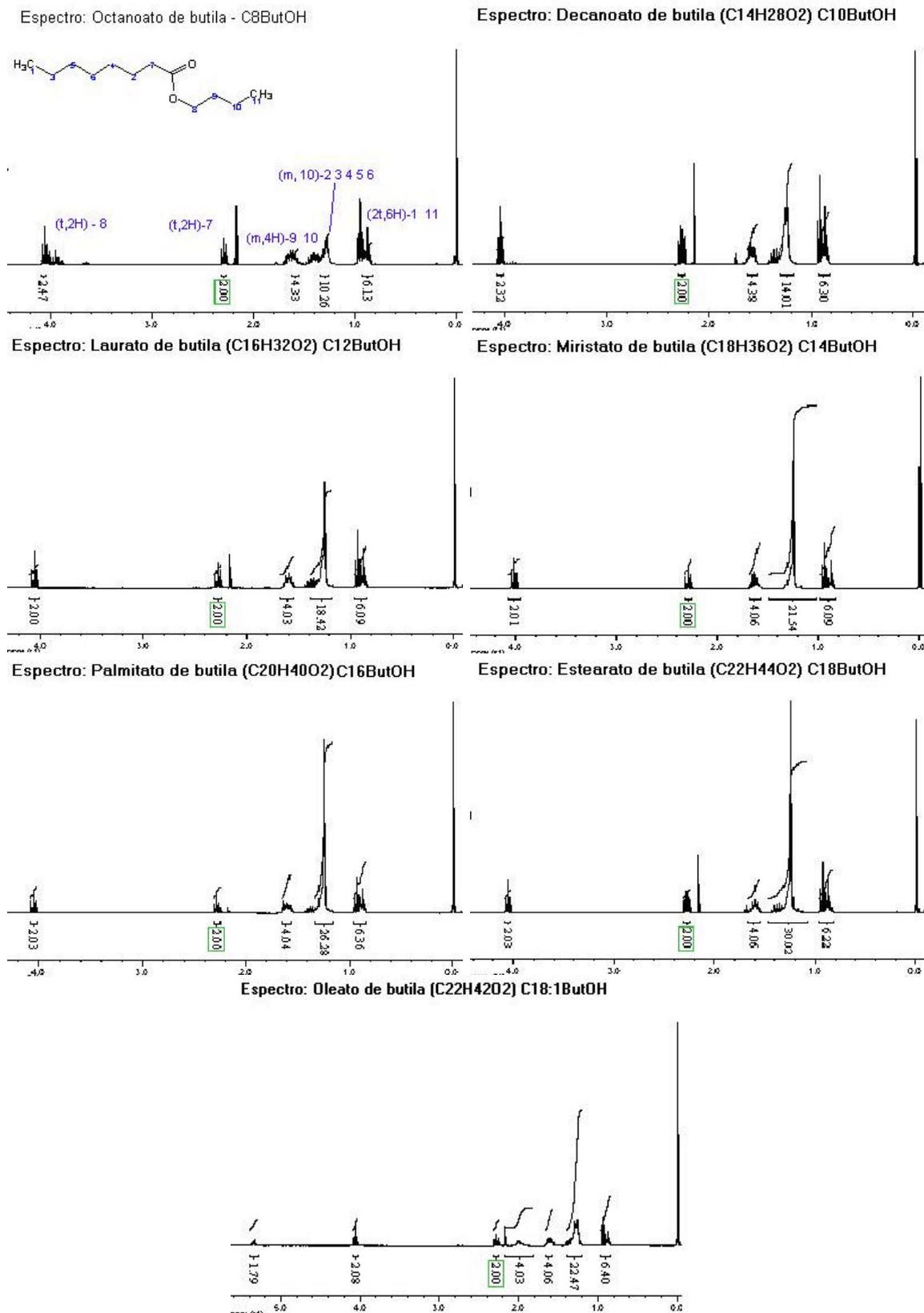
**Experimentos A:** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, 300Hz) dos monoésteres de etila



**Experimentos B:** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, 300Hz) dos monoésteres de propila

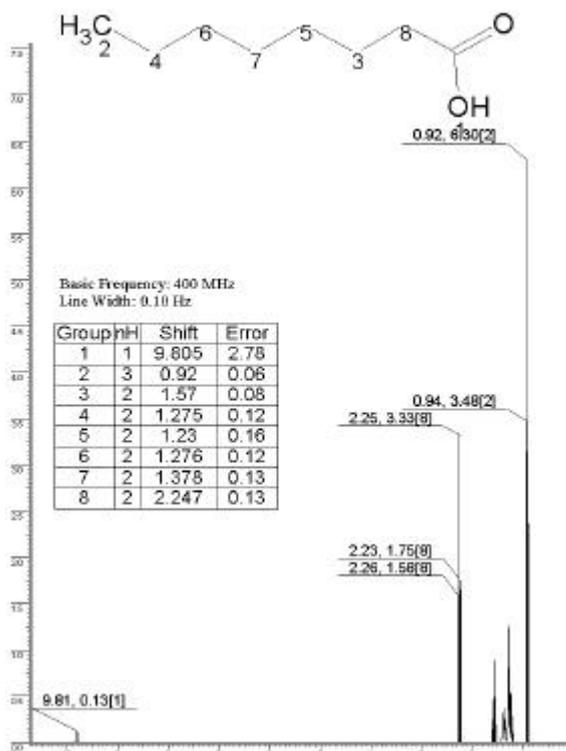


**Experimentos C:** Espectros de RMN 1H (CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, 300Hz) dos monoésteres de butila

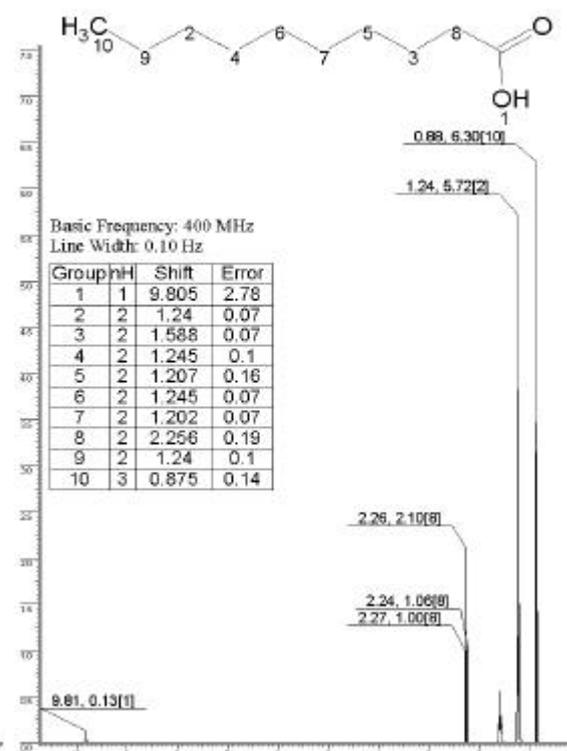


**Experimentos D:** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, 300Hz) simulados no programa Mestre C dos ácidos graxos utilizados na síntese dos monoésteres

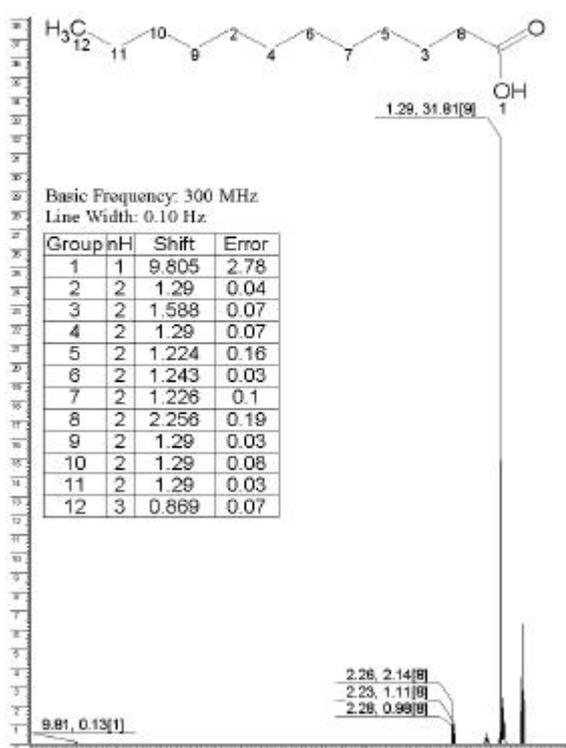
*Ácido octanoico (C8)*



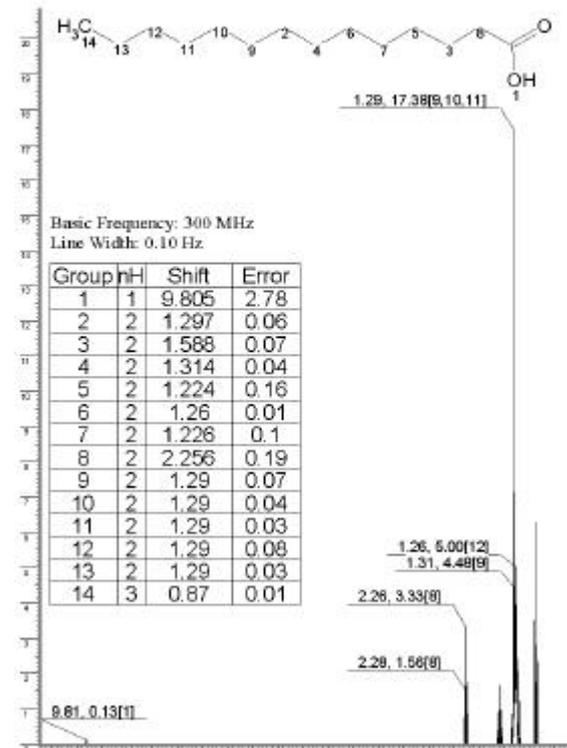
*Ácido decanoico (C10)*



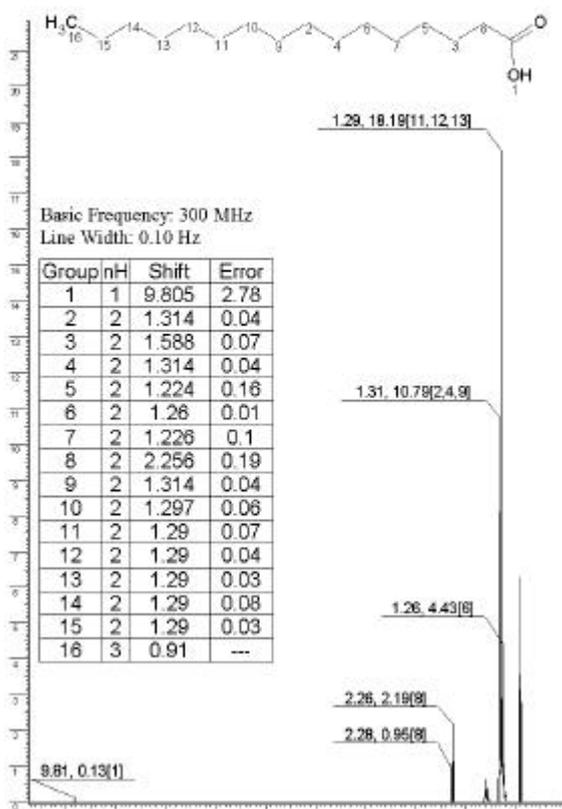
*Ácido laurico (C12)*



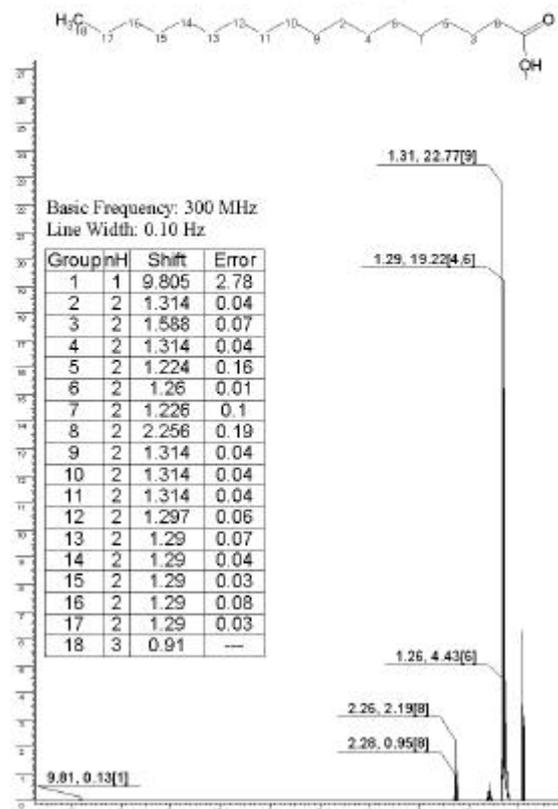
*Ácido mirístico (C14)*



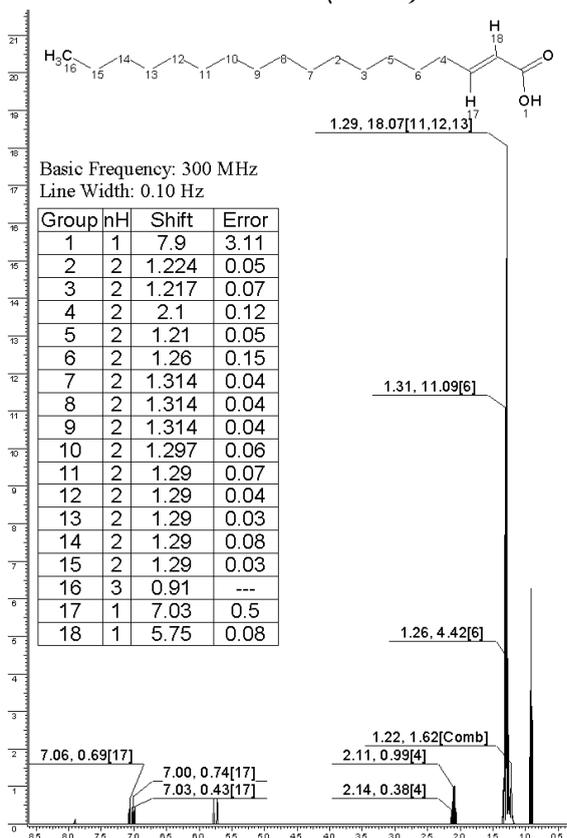
### Ácido palmítico (C16)



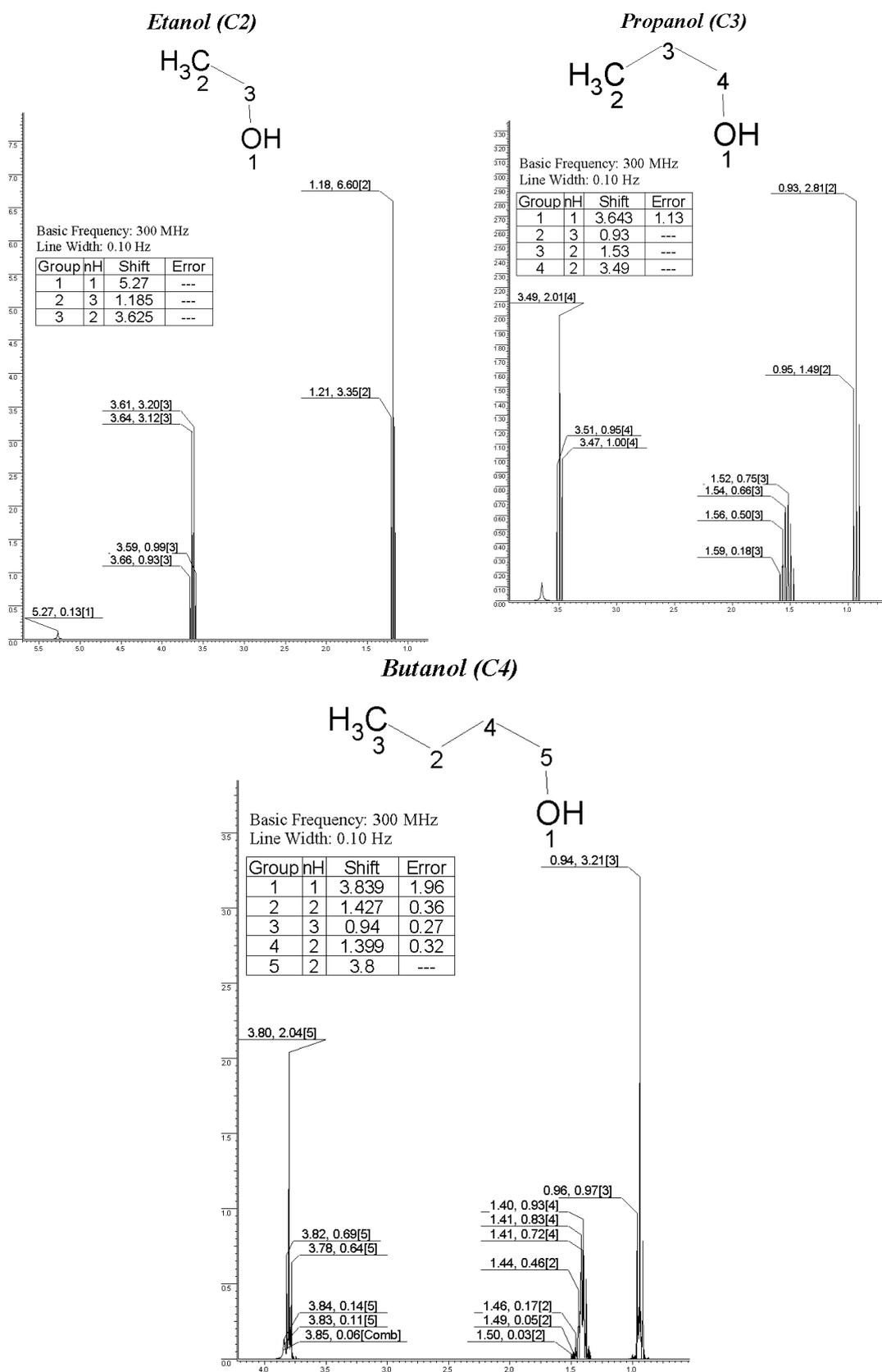
### Ácido estearico (C18)



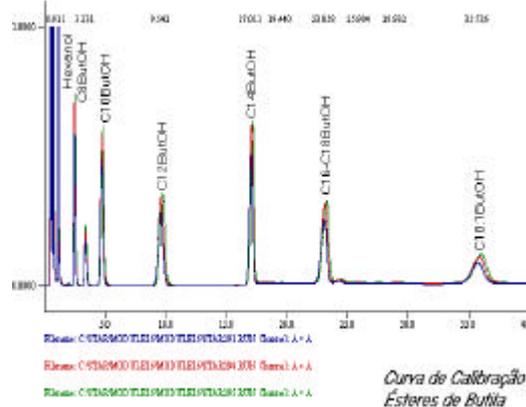
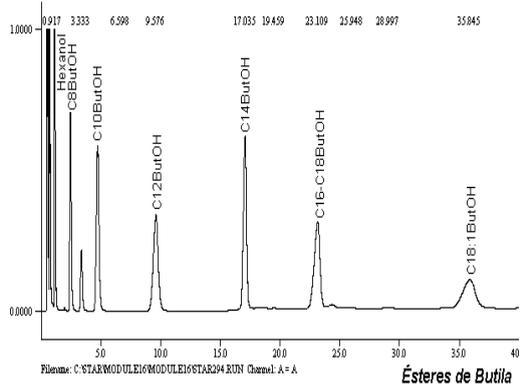
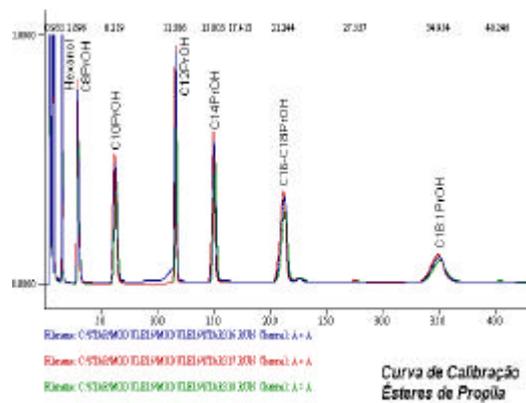
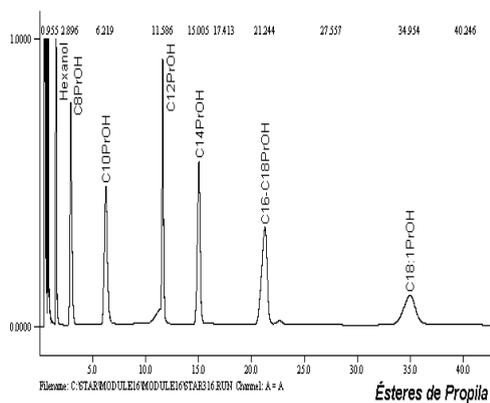
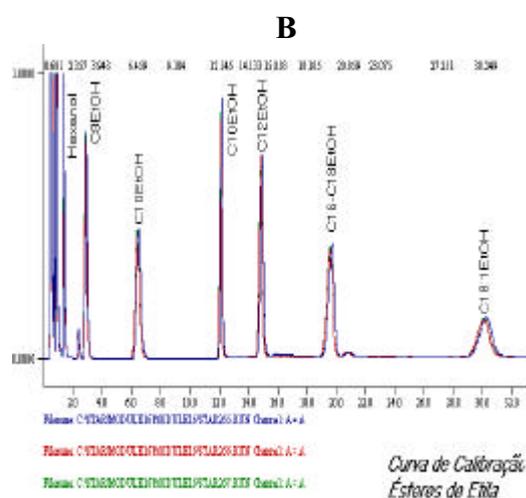
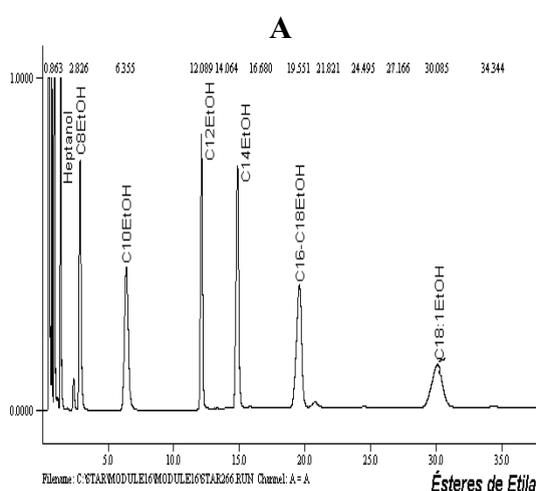
### Ácido oleico (C18:1)



**Experimentos E:** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, 300Hz) simulados no programa ACD dos álcoois (etanol, propanol e butanol) utilizados na síntese dos monoésteres.



### 8.3. Cromatogramas (A) e curvas de calibração (B) gerados nas análises dos monoésteres de etila, propila e butila nos métodos cromatográficos estabelecidos



#### 8.4. Experimentos de interesterificação química do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta empregando NaOH como catalisador

Materiais: 6,00 gramas de etanol  
 6,39 gramas de óleo de babaçu  
 0,16- 0,22-0,30 gramas de NaOH  
 Sistema fechado, 78-97-117°C, 8 h

##### Experimento A: Interesterificação do óleo de babaçu com etanol (0,16 g de NaOH, 78°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de etila (g/L)						
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	26,65	21,06	198,38	61,62	23,06	8,01	67,60
2	34,71	27,82	243,36	74,23	29,14	10,12	90,09
3	24,18	18,98	172,64	51,74	19,49	6,77	69,94
4	34,32	27,30	264,55	103,87	34,83	12,10	86,58
5	23,92	19,11	187,46	56,68	20,74	7,21	63,31
6	44,20	35,23	321,23	100,49	36,09	12,53	113,62
7	14,56	11,57	121,55	36,53	12,74	4,42	37,57
8	3,90	2,99	46,67	14,30	2,70	0,94	9,49

##### Experimento B: Interesterificação do óleo de babaçu com propanol (0,22 g de NaOH, 97°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de propila (g/L)						
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	17,81	21,84	215,41	16,33	21,42	7,44	68,90
2	23,09	21,42	160,33	50,06	17,93	6,23	62,65
3	47,33	43,58	347,88	95,65	36,41	12,65	129,12
4	25,87	21,45	169,78	47,84	18,14	6,30	64,61
5	4,16	4,29	40,04	9,62	3,86	1,34	11,57
6	8,71	4,81	45,76	10,79	4,25	1,47	13,00
7	19,24	14,43	113,49	31,98	12,35	4,29	41,47
8	13,78	8,84	80,47	22,75	9,26	3,22	22,23

##### Experimento C: Interesterificação do óleo de babaçu com butanol (0,30 g de NaOH, 117°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de butila (g/L)						
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	27,17	23,40	177,97	69,42	24,60	8,55	60,84
2	26,78	23,40	178,75	65,91	24,70	8,58	62,14
3	28,99	25,87	194,48	72,15	27,40	9,52	67,60
4	26,26	23,27	177,06	72,93	24,60	8,55	60,71
5	16,90	14,82	111,15	64,09	22,58	7,84	37,44
6	26,00	23,27	172,25	63,05	24,22	8,41	58,89
7	30,94	27,17	198,25	78,91	28,66	9,95	71,50
8	25,22	22,10	163,80	76,96	22,96	7,98	52,52

#### 8.4. Experimentos de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta empregando Lipozyme IM20

Materiais: 6,00 gramas de álcool (EtOH, PrOH ou ButOH)  
 6,39 gramas de óleo de babaçu  
 0,89 gramas de Lipozyme IM<sup>20</sup>  
 Sistema fechado, 40-50°C, 168 h

**Experimento A:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol empregando Lipozyme IM<sup>20</sup> (40°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de etila (g/L)							Concentração EtOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	147,81
24	3,77	2,86	39,13	19,89	8,39	2,92	7,80	91,78
48	8,71	5,72	67,21	30,16	11,48	3,99	15,60	75,27
72	11,05	8,06	73,32	40,95	16,31	5,66	16,90	49,27
96	18,33	13,52	95,29	50,83	22,67	7,88	24,18	50,96
120	33,54	23,27	139,10	66,43	28,08	9,75	44,85	37,05
144	26,39	22,49	137,15	65,13	28,75	9,99	37,18	22,10
168	26,26	23,01	137,15	63,96	28,66	9,95	41,34	10,01

**Experimento B:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol empregando Lipozyme IM<sup>20</sup> (40°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de propila (g/L)							Concentração de PrOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	120,90
24	22,62	14,69	84,11	50,05	23,74	8,24	24,83	80,86
48	26,13	19,37	112,58	53,43	24,31	8,45	30,16	80,47
72	26,52	19,89	144,69	59,93	24,60	8,55	35,36	80,08
96	27,04	20,28	131,04	57,72	24,70	8,58	38,09	67,08
120	26,26	20,15	148,46	57,85	24,60	8,55	40,30	78,39
144	27,95	21,58	157,95	61,88	25,95	9,02	44,85	44,98
168	25,09	19,24	142,74	56,03	23,35	8,11	41,60	58,24

**Experimento C:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol empregando Lipozyme IM<sup>20</sup> (50°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de butila (g/L)							Concentração de ButOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	313,43
24	31,46	24,83	131,17	73,71	30,97	10,76	24,00	219,70
48	30,16	24,57	142,48	72,93	30,01	10,42	40,69	200,46
72	29,51	24,18	152,75	65,39	28,95	10,05	41,34	149,63
96	31,46	26,00	171,86	72,02	31,26	10,86	48,62	132,73
120	31,98	26,91	181,61	73,97	31,45	10,93	50,96	125,32
144	32,37	27,56	189,80	75,27	31,94	11,09	52,26	132,73
168	30,55	25,61	179,53	61,29	35,02	12,17	51,35	147,68

### 8.5. Experimentos de interesterificação enzimática do óleo de babaçu com álcool empregando Novozym 435

Materiais: 6,00 gramas de álcool (EtOH, PrOH ou ButOH)  
 6,39 gramas de óleo de babaçu  
 0,60 gramas de Novozym 435  
 Sistema fechado, 40-50°C, 96 h

**Experimento A:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol empregando Novozym 435 (40°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de etila (g/L)							Concentração de EtOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	96,98
24	33,48	26,65	236,21	71,76	25,09	8,71	95,55	75,66
48	31,20	24,90	222,11	66,24	23,69	8,23	88,40	50,38
72	29,97	24,05	208,39	61,95	22,43	7,79	74,95	31,14
96	27,56	22,17	200,85	59,35	21,27	7,39	74,82	9,49

**Experimento B:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol empregando Novozym 435 (40°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de propila (g/L)							Concentração de PrOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	110,70
24	43,68	38,35	227,44	93,34	37,68	13,09	85,93	76,51
48	29,90	26,39	211,45	65,59	25,57	8,88	72,74	65,59
72	30,62	25,94	197,21	61,04	24,02	8,35	69,62	56,42
96	28,54	23,47	178,82	60,71	24,02	8,35	53,95	30,36

**Experimento C:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol empregando Novozym 435 (50°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de butila (g/L)							Concentração de ButOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	253,44
24	33,09	29,64	216,06	105,24	33,00	11,46	70,01	140,34
48	31,92	28,21	211,45	99,84	31,07	10,79	66,11	142,74
72	31,01	28,34	209,43	90,94	28,90	10,04	60,06	124,80
96	26,78	24,44	181,81	72,93	32,85	11,41	60,00	101,92

## 8.6. Experimentos de interesterificação enzimática de óleo de babaçu com álcool empregando lipase Pancreática (LPP) imobilizada em POS-PVA

### 8.6.1 Imobilização da lipase pancreática em suporte híbrido (POS-PVA)

O composto híbrido de polisiloxano-álcool polivinílico foi inicialmente sintetizado conforme metodologia descrita por BRUNO *et al.* (2004), pela mistura de 5mL de tetraetil ortosilicato (TEOS), 5mL de etanol e 6mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (p/v). Essa mistura foi aquecida a 60° C, sob agitação, com adição de duas a três gotas de HCl concentrado. Após um período de incubação de 40 min, a preparação foi mantida a 25 °C por 48 h até a completa solidificação (formação da rede de interpenetrada de polisiloxano e álcool polivinílico – POS-PVA). O composto foi então triturado até a obtenção de partículas com 60µm de diâmetro. Em seguida, o suporte foi embebido em solução de glutaraldeído 2,5% (v/v), na proporção de 1:10 sendo mantido sobre a placa de agitação por 1 h. Após este período, o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada e solução tampão de pH 8,0 sendo levado á estufa (60°C) por 24 h. O suporte ativado foi embebido em hexano (1:10), sendo mantido sob agitação durante duas horas. Após este período adicionou-se a lipase numa razão mássica enzima: suporte de 1:4. Polietilenoglicol (PEG-1500) foi adicionado com estabilizante da enzima. O sistema foi mantido sob agitação até a completa evaporação do hexano. A recuperação de atividade lipolítica no suporte foi praticamente total da ordem 96,71  $\pm$ 2,68 % e o sistema imobilizado apresentou as seguintes características bioquímicas e cinéticas:

<b>Propriedades catalíticas</b>	
pH ótimo	8,0
Temperatura ótima (°C)	45
k <sub>d</sub> (45°C)	0,79
Tempo de meia-vida 45°C (h)	0,88
K <sub>m</sub> (mM)	391,25
V <sub>max</sub> (U/mg)	684,20

### 8.6.2. Condições reacionais

Materiais: 6,00 gramas de álcool (EtOH, PrOH ou ButOH)  
 6,39 gramas de óleo de babaçu  
 2,50 gramas de LPP-POS.PVA com 6% H<sub>2</sub>O  
 Sistema fechado, 40-50°C, 120 h

**Experimento A:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol empregando LPP-POS-PVA (40°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de etila (g/L)							Concentração de EtOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	79,04
24	18,20	12,61	90,48	39,65	11,58	4,02	16,12	79,56
48	24,44	17,81	118,82	45,63	13,80	4,79	19,24	93,73
72	23,01	19,63	140,14	50,70	21,61	7,51	31,07	66,17
96	20,02	14,95	110,11	52,39	12,83	4,46	32,24	10,66
120	26,91	20,15	131,30	45,63	16,79	5,83	45,50	8,19

**Experimento B:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol empregando LPP-POS-PVA (40°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de propila (g/L)							Concentração de PrOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	92,82
24	18,20	15,86	90,22	52,13	15,15	5,26	20,41	79,17
48	24,31	19,11	124,02	48,88	20,94	7,27	39,91	62,53
72	29,64	23,14	135,85	48,10	18,72	6,50	41,08	62,01
96	31,46	26,26	180,70	57,72	23,06	8,01	68,38	50,18
120	29,90	23,79	164,45	60,58	25,47	8,85	52,91	44,33

**Experimento C:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol empregando LPP-POS-PVA (50°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de butila (g/L)							Concentração de ButOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	307,19
24	25,81	21,52	142,87	74,95	29,43	10,22	44,14	168,42
48	30,10	23,79	145,80	79,04	45,49	15,80	46,28	162,63
72	30,68	26,20	166,79	101,21	31,98	11,11	46,28	135,85
96	29,25	24,31	123,89	78,39	30,92	10,74	31,27	118,63
120	34,91	30,10	195,46	79,95	33,72	11,71	68,64	116,42

### 8.7. Experimentos de interesterificação enzimática de óleo de babaçu com álcool empregando lipase de *Candida rugosa* (LCR) imobilizada em POS-PVA

Materiais: 6,00 gramas de álcool (EtOH, PrOH ou ButOH)  
 6,39 gramas de óleo de babaçu  
 2,94 gramas de LCR-POS-PVA com 21,31% $H_2O$   
 Sistema fechado, 40-50°C, 120 h

**Experimento A:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol empregando LCR-POS.PVA (40°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de etila (g/L)							Concentração de EtOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	80,21
24	0,13	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	31,46
48	2,80	2,15	12,09	4,36	0,58	0,20	0,00	23,79
72	1,95	1,43	6,11	2,28	0,43	0,15	0,00	17,81
96	2,60	1,82	10,21	3,97	0,53	0,18	0,00	18,98
120	0,98	0,78	9,82	4,23	0,43	0,15	0,00	17,68

**Experimento B:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol empregando LCR-POS-PVA (40°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de propila (g/L)							Concentração de PrOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	105,56
24	5,46	2,93	24,90	2,67	1,54	0,54	4,10	85,15
48	11,83	5,92	52,85	7,22	2,65	0,92	4,10	67,54
72	15,02	7,61	68,45	8,39	4,15	1,44	4,03	76,31
96	18,72	40,50	78,52	10,99	5,50	1,91	14,76	54,86
120	22,04	13,20	110,70	14,50	6,51	2,26	12,16	58,76

**Experimento C:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol empregando LCR-POS-PVA (50°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de butila (g/L)							Concentração de ButOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	306,41
24		12,29	86,32	17,55	9,07	3,15	26,33	253,63
48		19,24	135,79	29,25	15,10	5,25	45,18	203,71
72		27,04	192,66	48,36	22,43	7,79	67,67	209,17
96		26,78	189,02	47,06	22,09	7,68	66,43	226,46
120		26,98	191,10	43,94	21,81	7,57	65,72	201,24

### 8.8. Experimentos de interesterificação enzimática de óleo de babaçu com álcool empregando lipase *Candida rugosa* (LCR) imobilizada em LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O

Materiais: 6,00 gramas de álcool (EtOH, PrOH ou ButOH)  
 6,39 gramas de óleo de babaçu  
 1,50 gramas de LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O com 10% H<sub>2</sub>O  
 Sistema fechado, 40-50°C, 120 h

**Experimento A:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol empregando LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O (40°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de etila (g/L)							Concentração de EtOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	80,60
24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	73,58
48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	46,15
72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	42,25
96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	41,08
120	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	38,22

**Experimento B:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com propanol empregando LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O (40°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de propila (g/L)							Concentração de PrOH (g/L)
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	103,61
24	3,77	1,56	8,84	1,56	0,96	0,34	0,65	86,84
48	3,77	2,34	21,58	2,08	1,16	0,40	0,65	78,91
72	2,301	4,42	31,07	5,85	2,61	0,90	0,65	89,57
96	1,040	3,90	24,57	2,86	1,54	0,54	0,65	86,71
120	1,066	3,51	31,33	3,12	1,16	0,40	0,65	84,63

**Experimento C:** Interesterificação enzimática do óleo de babaçu com butanol empregando LCR-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.nH<sub>2</sub>O (50°C)

Tempo (h)	Formação dos monoésteres de butila (g/L)						Concentração de ButOH (g/L)
	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	190,94
24	25,07	180,16	36,16	19,48	6,77	40,80	157,01
48	31,27	213,64	44,92	23,29	7,69	50,94	153,66
72	30,49	208,23	43,91	22,54	7,83	47,68	144,11
96	30,44	214,71	44,22	22,44	7,80	46,65	126,52
120	30,40	213,95	47,42	22,13	8,09	46,26	100,75