



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS A PARTIR DE ÓLEO
DE MACAÚBA BRUTO (*Acrocomia aculeata*) EMPREGANDO
ENZIMA LIVRE**

JAIME MARCOS BOHN DOS SANTOS

**FLORIANÓPOLIS
2016**

Jaime Marcos Bohn dos Santos

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÁLICOS A PARTIR DE ÓLEO
DE MACAÚBA BRUTO (*Acrocomia aculeata*) EMPREGANDO
ENZIMA LIVRE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lanza.

Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Jaime Marcos Bohn dos
Produção de ésteres metílicos a partir de óleo de macaúba
bruto (*Acrocomia aculeata*) empregando enzima livre / Jaime
Marcos Bohn dos Santos ; orientador, Marcelo Lanza ;
coorientador, José Vladimir de Oliveira. - Florianópolis,
SC, 2016.
111 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Biodiesel. 3. Macaúba.
4. Enzima. 5. Biocombustíveis. I. Lanza, Marcelo. II.
Oliveira, José Vladimir de. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos. IV. Título.

Jaime Marcos Bohn dos Santos

**PRODUÇÃO DE ÉSTERES METÁLICOS A PARTIR DE ÓLEO
DE MACAÚBA BRUTO (*Acrocomia aculeata*) EMPREGANDO
ENZIMA LIVRE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia de Alimentos” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 14 de março de 2016.

Prof. Dr. Marco Di Luccio
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Marcelo Lanza
Orientador (UFSC)

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira
Coorientador (UFSC)

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Membro (UFSC)

Dra. Mara Cristina Picoli Zenevicz
Membro (UFSC)

Dr. Josamaique Gilson Veneral
Membro (UFSC)

Este trabalho é dedicado à minha família: meus pais **Leonir** e **Arnélia**, minhas irmãs **Julinha** e **Jociane**, meu cunhado **Dilso** e minha sobrinha **Camila**. Pois sem eles com certeza eu não estaria dando mais este passo tão importante em minha vida profissional.

E ao **MUR Floripa**, através dos GOUs da UFSC, por ter sido a minha segunda família nesse período.

AGRADECIMENTOS

A Deus, simplesmente por tudo!

À minha família: especialmente meus pais Leonir e Arnélia, minhas irmãs Julinha e Jociane, meu cunhado Dilso, minha sobrinha Camila e todos os demais parentes que sempre me apoiaram e me deram todo o suporte afetivo necessário em todas as situações encontradas. Vocês são a minha inspiração e o motivo de eu nunca desanimar, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos amigos recentes e também os de longa data por todo o carinho, companheirismo, compreensão e expectativa que sempre depositaram em mim.

Aos professores (e amigos) Marcelo e Vladimir pelo tempo, dedicação e confiança que sempre tiveram durante a orientação. Tive o prazer de ganhar, além de ótimos orientadores, bons exemplos a serem seguidos em minha vida profissional.

Aos colegas do LATESC, ENGEBIO, Central de Análises do EQA e do Laboratório de Óleos e Gorduras do CCA. Pois foi com o apoio e a participação de todos vocês que realizei cada uma das etapas deste trabalho.

Aos demais professores e servidores do EQA e de toda a UFSC pela ajuda recebida sempre que necessário.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos os Luquinhas do Ministério Universidades Renovadas (MUR), especialmente os participantes dos GOUs da UFSC (GOU Sal e Luz e GOU Água Viva), à Pastoral Universitária da UFSC, à Paróquia da Santíssima Trindade e ao GOJ São Francisco de Assis. Vocês todos foram, sem dúvida, a minha segunda família e o meu porto seguro durante estes dois anos em Florianópolis, longe de minha família e de minha zona de conforto.

A todos que, de alguma forma, estiveram ao meu lado durante este período e em todos os outros de minha vida.

E a você, que dedicou um pouquinho do seu tempo para ler o meu trabalho, juntos construiremos um mundo melhor!

A fé e a razão (*fides et ratio*) constituem como que as duas asas pelas quais o espírito humano se eleva para a contemplação da verdade.

São João Paulo II.

RESUMO

A energia consumida no mundo é obtida principalmente de combustíveis fósseis: petróleo, gás natural e carvão mineral. Estas fontes são grandes poluidoras do meio-ambiente além de causarem danos à saúde humana e serem não renováveis, ocorrendo riscos de escassez. Os biocombustíveis surgem como uma alternativa para a produção de energia limpa e renovável. Neste trabalho estudou-se a produção de biodiesel enzimático a partir de óleo de polpa de macaúba bruto, utilizando a enzima livre Novozymes[®] NS-40116, como catalisador. Dois planejamentos experimentais foram realizados na forma de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e, após a determinação de quais variáveis influenciam significativamente na produção dos ésteres metílicos, duas cinéticas foram realizadas para avaliar o andamento da reação. As variáveis analisadas inicialmente foram temperatura (35 a 55 °C), razão molar óleo:álcool (1:3 a 1:9), concentração de enzima (0,05 a 0,85% m/m) e teor de água adicionada (0 a 4% m/m). As reações de produção dos ésteres metílicos ocorreram em batelada sob agitação constante de 250 rpm e o melhor resultado foi obtido quando se trabalhou com temperatura de 40 °C, razão molar óleo:álcool de 1:4,5, concentração de catalisador de 0,65% m/m e teor de água de 1% m/m, nessas condições o teor de ésteres produzidos foi de 84,78% no produto final. Observou-se que é possível produzir biodiesel na presença de água, via hidroesterificação, com custo reduzido através do óleo de macaúba bruto, utilizando catalisador enzimático. As cinéticas foram realizadas na temperatura de 45 °C, razão molar óleo:álcool de 1:4,5 e teor de água de 1,3% m/m. Valores finais similares foram obtidos mesmo com grandes diferenças na concentração da enzima (0,25 e 1% m/m). Observou-se que ocorre uma grande redução na acidez inicial, o que significa que a enzima utilizada é capaz de esterificar os ácidos graxos livres presentes na matéria-prima. Sugere-se a realização de reações utilizando baixas concentrações de enzima, aproximadamente 0,25% m/m, durante intervalos de tempo de até 16 h, para tornar o processo viável economicamente. Conclui-se que a produção enzimática de ésteres metílicos com óleo de macaúba bruto traz bons resultados e representa uma alternativa promissora para produção de biodiesel utilizando matérias-primas menos nobres e mais baratas do que as utilizadas atualmente pela indústria.

Palavras-chave: Biodiesel enzimático. Óleo de macaúba. Ésteres metílicos. Lipase NS-40116. Acidez. Hidroesterificação.

ABSTRACT

The energy consumed in the world is obtained mainly from fossil fuels: oil, natural gas and coal. These sources are major polluters of the environment as well as cause harm to human health and are non-renewable, occurring shortage risks. Biofuels emerge as an alternative to the production of clean and renewable energy. In this work we studied the enzymatic production of biodiesel from raw macauba pulp oil using the free enzyme Novozymes[®] NS-40116, as a catalyst. Two experimental designs were conducted in the form of Rotational Central Composite Design (RCCD) and, after determining which variables influence significantly the production of methyl esters two kinetics were performed to assess the progress of the reaction. The variables analyzed were initially temperature (35 to 55 °C) molar ratio of oil:ethanol (1:3 to 1:9), enzyme concentration (0.05 to 0.85% w/w) and the water content (0 to 4% w/w). The production of methyl esters reactions occurred in batch under constant agitation of 250 rpm and the best result was obtained when working with a temperature of 40 °C, molar ratio oil:alcohol of 1:4.5, catalyst concentration 0.65% w/w and water content of 1% w/w, these conditions produced the ester content was 84.78% in the final product. It was observed that it is possible to produce biodiesel in the presence of water via hydroesterification with reduced cost through macauba crude oil using enzymatic catalyst. The kinetics were performed at 45 °C temperature, molar ratio of oil:alcohol of 1:4.5 and water content of 1.3% w/w. Similar final values were obtained even with large differences in the enzyme concentration (0.25 to 1% w/w). It was observed that there is a great reduction in the initial acidity, which means that the enzyme used is able to esterify the free fatty acids present in the feedstock. It is suggested carrying out reactions using low enzyme concentrations, approximately 0.25% w/w during time intervals up to 16 h, to make the process economically viable. It was concluded that the enzymatic production of methyl esters with crude oil macauba brings good results and is a promising alternative for biodiesel production using raw materials less noble and cheaper than currently used by the industry.

Keywords: Enzymatic biodiesel. Macauba oil. Methyl esters. Lipase NS-40116. Acidity. Hydroesterification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Selo Combustível Social.....	32
Figura 2 - Evolução da produção brasileira de biodiesel de 2005 a 2014.	33
Figura 3 - Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel no Brasil entre 2005 e 2014, em milhões de m ³	34
Figura 4 - Palmeira macaúba.....	38
Figura 5 - Distribuição da palmeira macaúba na América Latina.	38
Figura 6 - Principais locais de incidência da macaúba no Brasil.	39
Figura 7 - Composição do fruto (coco) da macaúba.	40
Figura 8 - Representação da produção de biodiesel através da transesterificação.....	43
Figura 9 - Reações intermediárias da transesterificação para produção de biodiesel.	44
Figura 10 - Comparativo simplificado entre o processo químico (a) e o processo enzimático (b) para síntese de biodiesel utilizando metanol. .	47
Figura 11 - Reação de esterificação do ácido graxo livre.....	49
Figura 12 - Erlenmeyer aletado utilizado para a produção dos ésteres metílicos.	56
Figura 13 - Incubadora com agitação orbital (Shaker) utilizada para a produção dos ésteres metílicos.	57
Figura 14 - Resíduos sólidos retirados do óleo de polpa de macaúba bruto.	69
Figura 15 - Óleo de polpa de macaúba bruto antes e depois da centrifugação.	70
Figura 16 - Cromatograma representando o perfil de ácidos graxos presentes no óleo de polpa de macaúba utilizado.....	72
Figura 17 - Separação de fases após a centrifugação dos produtos gerados na reação de síntese enzimática dos ésteres metílicos.	74
Figura 18 - Diagrama de Pareto, a 90% de confiança, para a produção dos ésteres metílicos utilizando-se as variáveis temperatura (35, 40, 45, 50 e 55 °C), razão molar óleo:água (1:3, 1:4,5, 1:6, 1:7,5 e 1:9), concentração do composto enzimático (0,05; 0,25; 0,45; 0,65 e 0,85% m/m) e teor de água adicionada (0, 1, 2, 3 e 4% m/m).....	78
Figura 19 - Superfície de resposta em 2D para a produção de ésteres metílicos no 1º DCCR em função da adição do composto enzimático e da água.	79

Figura 20 - Superfície de resposta em 3D para a produção de ésteres metílicos no 1º DCCR em função da adição do composto enzimático e da água.	80
Figura 21 - Diagrama de Pareto, a 95% de confiança, para a produção dos ésteres metílicos utilizando-se as variáveis concentração do composto enzimático (0,225; 0,35; 0,65; 0,95 e 1,075% m/m) e teor de água adicionada (1,29; 1,7; 2,7; 3,7 e 4,11% m/m).....	86
Figura 22 - Superfície de resposta em 2D para a produção de ésteres metílicos no 2º DCCR em função da adição do composto enzimático e da água.	87
Figura 23 - Superfície de resposta em 3D para a produção de ésteres metílicos no 2º DCCR em função da adição do composto enzimático e da água.	87
Figura 24 - Comparação entre as cinéticas realizadas com 0,25 e 1% do composto enzimático em relação ao teor de ésteres metílicos produzidos. As demais variáveis foram temperatura de 45 °C, razão molar óleo:álcool de 1:4,5 (1,5 eqv.) e teor de água de 1,3% m/m.	91
Figura 25 - Comparação entre as cinéticas realizadas com 0,25 e 1% do composto enzimático em relação ao índice de acidez. As demais variáveis foram temperatura de 45 °C, razão molar óleo:álcool de 1:4,5 (1,5 eqv.) e teor de água de 1,3% m/m.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento potencial de biodiesel baseado nas características agrônômicas de cada espécie.....	41
Tabela 2 - Comparação entre as diferentes tecnologias utilizadas na produção de biodiesel.....	46
Tabela 3 - Síntese de alguns trabalhos realizados com produção de biodiesel através de catálise enzimática.	54
Tabela 4 - Valores das variáveis independentes utilizadas no 1º DCCR.	65
Tabela 5 - Resultados das análises físico-químicas do óleo de polpa de macaúba bruto utilizado na produção dos ésteres metílicos.....	71
Tabela 6 - Composição dos ácidos graxos presentes no óleo de polpa de macaúba utilizado.....	72
Tabela 7 - Valores reais e codificados das variáveis independentes utilizadas no primeiro planejamento DCCR e o resultado final em relação ao teor de ésteres metílicos produzidos.	75
Tabela 8 - Relação entre o teor de ésteres e o índice de acidez do biodiesel produzido no primeiro planejamento experimental.	81
Tabela 9 - Valores reais e codificados das variáveis independentes utilizadas no segundo planejamento DCCR e o resultado final em relação ao teor de ésteres metílicos produzidos e ao índice de acidez no produto final.	84
Tabela 10 - Teor de ésteres e índice de acidez das cinéticas realizadas com 0,25 e 1% m/m do composto enzimático, em relação à massa de óleo. Mantendo-se constante a temperatura em 45 °C, razão molar óleo:álcool em 1:4,5 (1,5 eqv.) e teor de água em 1,3% m/m.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres.
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.
CCA	Centro de Ciências Agrárias.
CEIB	Comissão Executiva Interministerial do Biodiesel.
CG	Cromatografia gasosa.
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética.
CTA	Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.
CTC	Centro Tecnológico.
DAG	Diacilgliceróis.
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional.
ENGEBIO	Laboratório de Engenharia Bioquímica.
EQA	Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos.
Eqv	Equivalente estequiométrico.
FAEEs	Ésteres etílicos de ácidos graxos.
FAMES	Ésteres metílicos de ácidos graxos.
ha	Hectares.
KOH	Hidróxido de potássio.
IA	Índice de acidez.
IP	Índice de peróxidos.
LATESC	Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica.
MAG	Monoacilgliceróis.
MeOH	Metanol.
mg	Miligramas.
M	Massa molar.
MME	Ministério de Minas e Energia.
NaOH	Hidróxido de sódio.
nm	Nanômetros.
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel.
p-NPP	p-nitrofenil palmitato.
rpm	Rotações por minuto.
TAG	Triacilgliceróis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVOS	27
1.1.1 Objetivo geral	27
1.1.2 Objetivos específicos	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 BIODIESEL	29
2.1.1 Biodiesel brasileiro	31
2.2 FONTES DE MATÉRIAS-PRIMAS	35
2.2.1 Fontes vegetais	36
2.2.1.1 Macaúba	37
2.3 MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL	42
2.3.1 Produção com catálise enzimática	45
2.4 ENZIMAS	50
2.4.1 Lipases	52
3 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 MATERIAL	55
3.1.1 Obtenção e preparo da matéria-prima (substrato)	55
3.1.2 Enzima	55
3.1.3 Reagentes	56
3.1.4 Equipamentos utilizados nas reações	56
3.2 MÉTODOS	57
3.2.1 Caracterização físico-química do óleo de polpa de macaúba .	57
3.2.1.1 Índice de acidez	57
3.2.1.2 Índice de peróxidos	58
3.2.1.3 Índice de saponificação	59
3.2.1.4 Índice de refração	60
3.2.1.5 Densidade	60
3.2.1.6 Umidade	60

3.2.1.7 Viscosidade	61
3.2.2 Determinação do perfil de ácidos graxos	62
3.2.2.1 Cálculo da massa molar do óleo de polpa de macaúba	63
3.2.3 Determinação da atividade enzimática da NS-40116.....	63
3.2.4 Produção dos ésteres metílicos	64
3.2.4.1 Planejamento e ordem dos experimentos	65
3.2.4.2 Purificação dos ésteres produzidos	66
3.2.5 Análise dos produtos gerados.....	67
3.2.5.1 Determinação do teor de ésteres	67
3.2.5.2 Determinação do índice de acidez.....	68
3.2.6 Avaliação dos resultados	68
3.2.6.1 Análise estatística.....	68
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	69
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	69
4.1.1 Análises físico-químicas	70
4.1.2 Perfil de ácidos graxos	71
4.1.3 Massa molar do óleo de polpa de macaúba.....	73
4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE LIVRE NS-40116.....	73
4.3 PRODUÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS	73
4.3.1 Planejamento experimental	74
4.3.1.1 Teor de ésteres	74
4.3.1.2 Índice de acidez.....	81
4.3.2 Segundo planejamento experimental	82
4.3.3 Cinéticas de produção dos ésteres metílicos	88
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	95
5.1 CONCLUSÕES	95
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	98
REFERÊNCIAS	99

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a maior parte da energia consumida no mundo é oriunda de materiais fósseis, em especial o petróleo, o gás natural e o carvão mineral. Porém, estas fontes energéticas, além de ocasionarem uma série de problemas ambientais e de trazerem riscos à saúde humana, são matrizes não renováveis (DEMIRBAS, 2005; CREMONEZ et al., 2015).

É indispensável que se desenvolvam ações no sentido de migrar a nossa matriz energética para fontes renováveis, que apresentam menores impactos ambientais. Uma das alternativas mais promissoras nesse sentido é a substituição total ou parcial dos combustíveis fósseis pelos biocombustíveis. O biodiesel surge como uma opção extremamente relevante de energia renovável com total potencial para substituir um dos combustíveis mais utilizados mundialmente e um dos grandes vilões na emissão dos gases de efeito estufa, que é o diesel de petróleo (VASUDEVAN; BRIGGS, 2008; DATTA; MANDAL, 2016).

O biodiesel é um combustível de origem renovável e de queima limpa, tendo grande relevância sob os aspectos ambiental, social e econômico. Tecnicamente é definido como uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, oriundos da reação entre ácidos graxos, presentes na composição das estruturas de óleos e gorduras, e um álcool de cadeia curta, ocorrendo geralmente com auxílio de um catalisador (NAVARRO-DÍAZ et al., 2014).

Há uma grande variedade de materiais com potencial para aplicação como matérias-primas na produção do biodiesel, como os óleos vegetais, as gorduras animais e as microalgas. O destaque maior fica por conta dos óleos vegetais, no Brasil, por exemplo, existe uma grande diversidade de plantas oleaginosas com potencial para a produção de biodiesel: como a soja, o dendê, o girassol, o pinhão-manso, a mamona, o algodão, o amendoim, o babaçu, a canola, a macaúba, dentre outras. É possível também realizar a produção do biodiesel a partir de óleos residuais já utilizados em outros processos. O biodiesel obtido a partir de óleos vegetais apresenta as seguintes vantagens: disponibilidade imediata, isento de enxofre, menor conteúdo de compostos aromáticos, não tóxico, não inflamável, biodegradável, além de ser uma fonte renovável e seu uso fomentar diversas cadeias produtivas como a agricultura familiar e o extrativismo, promovendo distribuição de emprego e renda (PARENTE, 2003; EMBRAPA, 2008; GONZALEZ, 2012; BERGMANN et al., 2013; FLORIN et al., 2013; TORRES et al., 2013).

Uma das matérias-primas de origem vegetal que tem ganhado bastante destaque nos últimos anos é a macaúba (*Acrocomia aculeata*), devido principalmente à sua alta produtividade de óleo por hectare, cerca de dez vezes maior do que a soja, principal oleaginosa utilizada no Brasil atualmente. Além de sua alta produtividade, a macaúba apresenta outras características agrônômicas que fazem com que a mesma seja vista com bons olhos pelo setor do biodiesel, como por exemplo, sua presença em praticamente todos os Estados do Brasil e também em outros Países da América Latina, possibilidade de se utilizar todo o seu fruto gerando poucos resíduos, ser uma cultura perene produzindo frutos por cerca de 100 anos e capacidade de consorciar a mesma com lavoura ou pecuária numa mesma área de terra. A macaúba também tem a grande vantagem de não ser amplamente utilizada na alimentação humana (AMARAL, 2007; CESAR et al., 2015; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2015).

Em relação ao catalisador utilizado, o biodiesel é produzido de diferentes maneiras, existem os catalisadores homogêneos (ácidos ou alcalinos), catalisadores heterogêneos (zeólitas ou argilas), catalisadores enzimáticos (lipases) ou ainda pode-se produzir com ausência de catalisador ao operar em condições supercríticas. Os catalisadores alcalinos são os mais utilizados atualmente pelo setor industrial, porém apesar de seu baixo custo e sua rápida conversão, eles apresentam algumas limitações como, por exemplo, quando se utiliza matérias-primas com elevada acidez ou presença de água (LEUNG et al., 2010; SAJID et al., 2016; XU et al., 2016).

Uma alternativa à catálise química é a utilização de enzimas, as quais toleram a presença de ácidos graxos livres e de água na matéria-prima, além disso, os biocatalisadores enzimáticos permitem operar em condições mais brandas de temperatura, pH e pressão e tornam mais fáceis os processos de recuperação e purificação dos produtos gerados, por serem de origem biológica (HAMA; KONDO, 2013; AARTHY et al., 2014; CHRISTOPHER et al., 2014; ZENEVICZ et al., 2016).

No cenário atual, não basta apenas migrar nossa matriz energética para as fontes renováveis, mas é preciso revolucionar o próprio segmento, desenvolvendo processos alternativos de produção capazes de, além de aumentar a competitividade destes produtos frente aos de origem fóssil, viabilizar a inclusão de novas fontes de matéria-prima, visando uma autossuficiência energética baseada nas fontes renováveis, a inclusão de mais pessoas no processo produtivo e a diminuição no uso de matérias-primas alimentícias.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi realizar a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel) a partir do óleo bruto extraído da polpa do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata*), empregando uma formulação de enzima livre como catalisador.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química do óleo de polpa de macaúba bruto;
- Determinar o perfil de ácidos graxos presentes no óleo extraído da polpa do fruto da macaúba;
- Analisar a atividade enzimática da formulação utilizada como catalisador;
- Avaliar quais variáveis interferem positiva ou negativamente na produção de ésteres metílicos a partir da matéria-prima utilizada;
- Realizar cinéticas de produção dos ésteres metílicos nas condições de maior conversão;
- Determinar qual o máximo valor possível de ser obtido para o teor de ésteres no produto final;
- Avaliar a acidez da matéria-prima e dos produtos gerados, em todas as condições analisadas para a produção de ésteres metílicos, inclusive durante as cinéticas;
- Correlacionar os valores de acidez com os de produção de ésteres, a fim de implementar uma ferramenta simples, rápida e barata para o controle de processo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIESEL

A ideia de se utilizar óleos vegetais como combustível para queima em motores de combustão interna não é algo recente, há relatos de que desde o ano de 1900, Rudolph Diesel, o inventor dos motores ciclo diesel, fez testes em motores de compressão utilizando óleo de amendoim. Porém, devido ao baixo preço do diesel de petróleo na época, este conceito não prosperou. Já os primeiros estudos sobre o biodiesel especificamente são datados de 1937, quando foi depositada, na Bélgica, a primeira patente descrevendo o processo de obtenção do biodiesel por catálise básica. A partir de então, as pesquisas com este biocombustível ganharam destaque em várias partes do mundo, com períodos de maior ou menor interesse da comunidade científica, bem como do setor industrial, motivados principalmente pelas condições de mercado do diesel de petróleo em cada época (HANNA; FANGRUI, 1999; SILVA, 2010).

O biodiesel é definido quimicamente como uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia longa, oriundos de matérias-primas diversas, como óleos vegetais, algas ou gorduras animais. É um combustível de queima limpa e, dependendo do processo empregado em sua síntese, pode ser produzido exclusivamente a partir de fontes renováveis (NAVARRO-DÍAZ et al., 2014).

Para a produção dos ésteres ocorre uma reação entre os componentes do óleo ou gordura, geralmente os triacilgliceróis (TAG), podendo também conter diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG) ou ainda ácidos graxos livres (AGL), dependendo do aspecto e das condições da matéria-prima; com um álcool de cadeia curta, na presença de um catalisador ou de alguma condição físico-química que substitua o mesmo. Os álcoois utilizados são do tipo mono-hídricos alifáticos primários ou secundários tendo de um a quatro átomos de carbono. Os mais utilizados são o metanol e o etanol, resultando assim na produção de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) e ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEEs), respectivamente (DEMIRBAS, 2008).

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

À medida que o mundo passou a se preocupar mais com questões como a escassez do petróleo e com a preservação ambiental, o uso de fontes alternativas de energia, como a partir de óleos vegetais, passou a ganhar cada vez mais importância no cenário mundial (DEMIRBAS, 2003).

Nos últimos anos, inúmeros estudos vêm sendo realizados no mundo todo para se descobrir novas técnicas e mecanismos de obtenção do biodiesel, bem como com o intuito de aprimorar as técnicas já existentes e difundidas. Estes estudos utilizam uma variedade enorme de diferentes óleos ou gorduras como matéria-prima, além de combinações dos mesmos, cruzando com os diferentes álcoois (metanol, etanol e butanol, principalmente). Os catalisadores empregados também podem variar: podendo ser homogêneos, como os catalisadores químicos (ácidos ou alcalinos); heterogêneos, como zeólitas ou argilas; enzimáticos (lipases); ou ainda, o biodiesel pode ser produzido na ausência de catalisador, em condições supercríticas (MARCHETTI et al., 2007; DEMIRBAS, 2008; GONZALEZ, 2012).

Diferente de outros biocombustíveis, como o etanol ou o gás metano (biogás), o biodiesel pode ser utilizado diretamente em motores e equipamentos projetados para combustíveis fósseis, no caso, o diesel de petróleo. Esta é uma grande vantagem técnica para o aumento gradual da utilização do biodiesel no mundo todo e para a substituição dos combustíveis fósseis de uma maneira mais direta e abrangente (SANTIN, 2013).

Hoje em dia, diversos países ao redor do mundo investem na produção de biodiesel em escala industrial. Com grande destaque para a União Européia, em especial a Alemanha, os Estados Unidos e o Brasil, que tem se consolidado como um dos maiores produtores mundiais. Na América Latina, a Argentina também tem se destacado devido principalmente à sua elevada produção de oleaginosas (KNOTHE et al., 2006; KHIARI et al., 2016).

O biodiesel apresenta inúmeras vantagens aos envolvidos de alguma forma em sua ampla cadeia produtiva, mas seus benefícios não se restringem a estes, atingindo também toda a população e o meio ambiente. Embora os principais apelos e justificativas de sua produção e utilização sejam as questões ambientais, o biodiesel consegue envolver todo o tripé da sustentabilidade, englobando também as áreas social e econômica (DEMIRBAS, 2007).

No que se refere às questões ambientais, o biodiesel se destaca na redução da emissão de gases de efeito estufa se comparado com os combustíveis fósseis, por ser um combustível de queima limpa. Sabe-se

que, não só a utilização do biodiesel puro, mas também a sua substituição parcial ao derivado do petróleo, traz ganhos significativos na redução de emissões de gases de efeito estufa e também de substâncias nocivas à saúde humana. O biodiesel produz um ciclo fechado do carbono na natureza (BONDIOLI, 2004; VIANNA, 2006).

O biodiesel tem representado, a cada ano, um importante ganho econômico, principalmente para os setores envolvidos em sua cadeia produtiva, seja no segmento da agricultura, da indústria ou do comércio, contribuindo também para a melhora da balança comercial brasileira. Muitos países também veem nos biocombustíveis, como o biodiesel, uma saída para a dependência às importações de petróleo (KNOTHE et al., 2006; MARCHETTI et al., 2007; SKORONSKI et al., 2016).

E, como já mencionado anteriormente, o biodiesel tem um importante papel no aspecto social. Pode-se dizer inclusive que em algumas regiões é o fator mais importante, antes mesmo do ambiental. Em regiões mais isoladas, representa uma importante fonte de renda e sustento para inúmeras famílias, principalmente da agricultura familiar, as quais trabalham na produção ou coleta das matérias-primas destinadas à produção do biodiesel. Hoje, a cadeia produtiva do biodiesel representa, para muitas famílias, uma alternativa de geração de emprego e renda no campo e também na cidade, provendo a inclusão social em muitas regiões que sempre sofreram com a escassez de recursos. Com a intenção de fomentar ainda mais este processo, o governo brasileiro lançou, em 2005, o Selo Combustível Social através de um conjunto de medidas para apoiar a inclusão social da agricultura familiar nesta importante cadeia produtiva para o nosso País (CESAR et al., 2013; SANTIN, 2013).

2.1.1 Biodiesel brasileiro

O biodiesel tem sido alvo de estudos em nosso País há várias décadas, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas no Brasil desde o final dos anos 1970 e início dos anos 1980 e de lá para cá o Brasil tem se demonstrado, cada vez mais, um dos destaques em produção e testes desse biocombustível no cenário mundial. Entretanto, apenas nos últimos anos sua produção realmente se destacou e ganhou o segmento industrial, chamando atenção de investidores e proporcionando o desenvolvimento de uma nova cadeia produtiva, hoje muito relevante para nossa economia (PARENTE, 2003).

O Decreto de 23 de dezembro 2003 instituiu uma comissão executiva interministerial, a qual ficou encarregada da implantação das

ações direcionadas à produção e ao uso de óleo vegetal, na forma de biodiesel, como fonte alternativa de energia no Brasil, esta equipe conhecida como Comissão Executiva Interministerial do Biodiesel (CEIB) foi responsável por toda viabilização da produção de biodiesel no Brasil a partir de então, bem como da implantação de programas para a regularização e fomento de sua produção em todo o País (BERGMANN et al., 2003; BRASIL, 2003).

No ano de 2004, através do Decreto Nº 5.297/2004, foi criado o selo “Combustível Social”, Figura 1, com a finalidade de fornecer incentivos financeiros e fiscais aos produtores de biodiesel que envolvessem, a partir de determinadas regras, os agricultores familiares na produção e comercialização de sua matéria-prima. Esta iniciativa foi bastante positiva no sentido de garantir a aquisição de produtos agrícolas e regionais de comunidades isoladas, proporcionando uma importante distribuição de renda no campo e valorização da agricultura familiar, além de possibilitar outras vantagens a esses agricultores, como o acesso à linhas de crédito (BRASIL, 2004).

Figura 1 - Selo Combustível Social.



Fonte: Site do Ministério de Minas e Energia (MME).

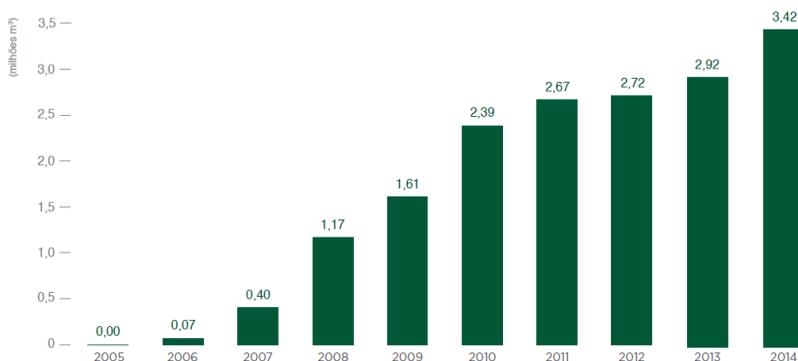
Através da criação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) em dezembro de 2004, com suas bases legais estabelecidas pela CEIB, foi a partir do ano de 2005 que o Brasil iniciou efetivamente sua produção industrial de biodiesel, com a licença de operação das primeiras plantas industriais. Neste mesmo ano, a Lei Nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira, definindo a obrigatoriedade da adição de 2% de biodiesel em todo o diesel de origem fóssil comercializado no Brasil num período de três anos após a publicação desta lei e da adição de 5% no período de oito anos. O programa também já previa um aumento gradativo dessa porcentagem nos anos seguintes, conforme o País

desenvolvesse as condições necessárias (BERGMANN et al., 2003; BRASIL, 2005; SILVA, 2014).

Após a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, em 2005, o percentual com que o mesmo é misturado ao diesel fóssil comercializado no Brasil foi aumentado gradativamente. Sendo que a proporção de biodiesel adicionada ao óleo diesel, neste momento, já é de 7%, em volume, de acordo com a Lei Nº 13.033/2014, a qual estabeleceu a adição obrigatória de 6% a partir de 1º de julho de 2014 e de 7% a partir de 1º de novembro de 2014, ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, em todo o território nacional. Esta lei, através do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), reafirma novamente a necessidade de o biodiesel ser produzido preferencialmente a partir de matérias-primas oriundas da agricultura familiar (BRASIL, 2014).

De acordo com a ANP, no ano de 2014, a capacidade nominal brasileira para produção de biodiesel era de cerca de 7,7 milhões de m³. Porém, a produção no período foi de apenas 3,4 milhões de m³, o que corresponde a 44,3% da capacidade nominal instalada no País. Isso representa um aumento de 17,2% na produção, em relação ao ano anterior, aumento este justificado em grande parte pelo acréscimo no percentual obrigatório de adição ao diesel fóssil comercializado. Observa-se na Figura 2 que desde 2005, quando a produção ainda era praticamente nula, os valores referentes à produção brasileira de biodiesel vêm crescendo ano após ano (ANP, 2015). Conforme o último boletim mensal divulgado pelo MME em 2015, até o final do mês de novembro, já foram produzidos 3,62 milhões de m³ (MME, 2015).

Figura 2 - Evolução da produção brasileira de biodiesel de 2005 a 2014.

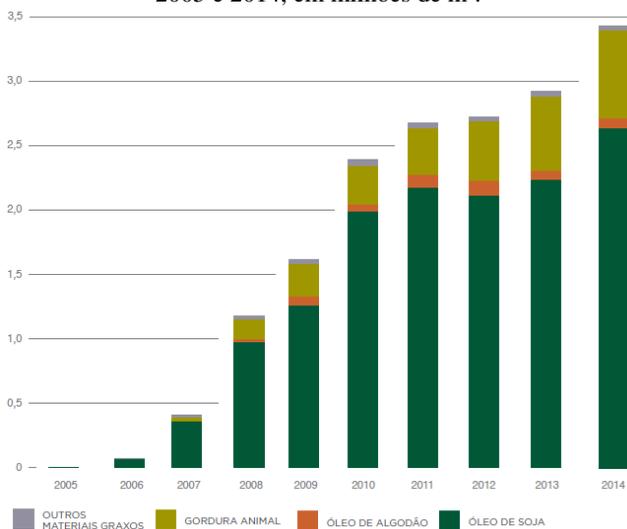


Fonte: ANP, 2015.

No ano de 2014, a Região Centro-Oeste se destacou como a maior produtora de biodiesel no Brasil, com 1,5 milhão de m³ produzidos, representando 43,1% da produção total, seguida pela Região Sul, com produção de 1,4 milhão de m³ e representando 39,7% do total nacional. Já em relação aos Estados, o Rio Grande do Sul foi o maior produtor, com 971,3 mil m³ (28,4% do total), seguido pelo Estado de Goiás, com 643,8 mil m³ (18,8%). Sobre o Estado de Santa Catarina, os dados de 2014 correspondem a uma produção de aproximadamente 68,5 mil m³, em sua única planta autorizada pela ANP, localizada na cidade de Joaçaba, no Oeste do Estado (ANP, 2015).

Em relação às matérias-primas utilizadas no Brasil, a soja se destaca como a mais consumida, sendo que no ano de 2014 representou 76,9% do total. Em segundo lugar está a gordura animal, que em 2014 representou 19,8% do total nacional. Seguida pelo óleo de algodão (2,2%). Os demais 1,1% da matéria-prima utilizada no Brasil em 2014 se referem à todos os outros materiais graxos utilizados, demonstrando uma grande necessidade de se investir em alternativas para viabilizar a produção industrial de biodiesel a partir de fontes inovadoras, tendo em vista a grande diversidade de materiais existente em nosso País. A Figura 3 explana as matérias-primas mais utilizadas no Brasil para a produção de biodiesel no período de 2005 a 2014 (ANP, 2015).

Figura 3 - Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel no Brasil entre 2005 e 2014, em milhões de m³.



Fonte: ANP, 2015.

2.2 FONTES DE MATÉRIAS-PRIMAS

Devido principalmente a fatores como o esgotamento dos recursos convencionais utilizados como matéria-prima para a produção de combustíveis, às variações de mercado e às crescentes preocupações com questões ambientais, novas fontes de energia vêm ganhando destaque, como é o caso do biodiesel. Aliado ao interesse de se expandir a produção e a utilização deste biocombustível, está também um grande interesse em ampliar o leque de opções de matérias-primas disponíveis para a sua síntese. Pesquisas apontam que no setor de transporte o uso de óleo corresponde a cerca de 85% das fontes de energia utilizadas e embora atualmente a grande maioria da energia consumida no mundo advém de fontes fósseis e não renováveis, principalmente o petróleo, estima-se que até o ano de 2035 será necessário uma redução de cerca de 30% no consumo do mesmo. Todas essas necessidades globais e urgentes nos fazem aprofundar nossas ações na busca de novas alternativas para a produção de energia de maneira limpa e sustentável (ATABANI et al., 2012; BASKAR; AISWARYA, 2016).

A produção de biodiesel tem se tornado cada vez mais um grande desafio aos pesquisadores e empresários, visto que uma das questões mais importantes para o crescimento de sua produção e consequente utilização é justamente torná-lo mais competitivo e viável economicamente. Um dos fatores principais nesse quesito está relacionado à sua matéria-prima. A seleção das matérias-primas e do catalisador utilizado no processo pode representar mais de 80% dos custos totais de produção. Portanto, este tem se tornado o grande gargalo tecnológico envolvido na produção do biodiesel (BASKAR; AISWARYA, 2016).

A maneira pela qual o biodiesel é produzido atualmente utiliza, na grande maioria das vezes, matérias-primas “nobres” e que também são utilizadas como fonte de alimentação humana, como é o caso do óleo de soja, o mais utilizado no Brasil para a produção de biodiesel. Esse fator, além de onerar o processo e o produto final, acaba aumentando também o custo da produção de alimentos para a população, já que a procura pelos mesmos aumenta consideravelmente no mercado internacional de *commodities* (AHMAD et al., 2011).

Surge assim uma grande necessidade de ampliar o campo de opções de matérias-primas para a produção de biodiesel, tanto para baratear seu custo, como para tentar fugir das fontes alimentícias e, além disso, expandir sua produção para novas regiões. É essencial que se desenvolvam tecnologias capazes de viabilizar a produção do biodiesel

utilizando as matérias-primas disponíveis naturalmente em cada região, com os resíduos de outros processos ou ainda com aquelas fontes que sejam possíveis de serem produzidas em cada condição climática. Um fator muito interessante, principalmente quando se fala em energias renováveis, é descentralizar a produção de energia, gerando a mesma nas proximidades dos locais de consumo, para dessa forma, além de reduzir despesas com logística, também distribuir a renda gerada em sua produção. Tendo como base todas essas constatações e necessidades em se produzir um combustível renovável de forma viável, pluralizada e acessível; diferentes matérias-primas para o biodiesel vêm sendo utilizadas em testes, pesquisas e mesmo em produções em grande escala em diferentes partes do mundo, podemos listar as gorduras animais, microalgas, resíduos industriais e os óleos vegetais, este último como grande destaque (WAN GHAZALI et al., 2015; MOSER, 2016).

2.2.1 Fontes vegetais

Devido às suas boas características, como o fato de ser de origem renovável e ter um menor potencial poluidor em relação ao diesel de petróleo, os óleos vegetais passaram inicialmente a serem cogitados como uma fonte alternativa de energia para utilização em motores ciclo diesel mesmo em sua forma natural. Porém, apesar de existirem algumas vantagens na utilização de óleos vegetais em substituição ao diesel de petróleo, como sua alta disponibilidade e renovabilidade, seu elevado calor, baixo teor de enxofre e de compostos aromáticos e, ainda, sua maior biodegradabilidade; os óleos vegetais *in natura* apresentam também grandes problemas em sua utilização na forma de combustível, como a sua elevada viscosidade, baixa volatilidade e a reatividades das cadeias de hidrocarbonetos aromáticos presentes. Devido à sua alta viscosidade e baixa volatilidade, a utilização de óleos vegetais pode gerar queima incompleta, acúmulo de material no motor e entupimentos, a partir destas constatações surge a necessidade de uma modificação na estrutura do óleo vegetal para só então ser utilizado como combustível, uma das alternativas é a transesterificação do mesmo com álcoois de cadeia curta gerando ésteres alquílicos de ácidos graxos, o que quimicamente corresponde ao biodiesel (DEMIRBAS, 2005).

Atualmente, os óleos vegetais têm representado a fonte mais atrativa para produção de biodiesel. Existem cerca de 350 espécies de plantas oleaginosas, utilizadas ou não na alimentação humana, que podem ser destinadas à produção do biocombustível. No Brasil, por

exemplo, há uma grande diversidade de fontes comestíveis e não comestíveis que já são utilizadas ou que têm grande potencial para a produção de biodiesel, como é o caso da soja, girassol, palma, amendoim, colza, mamona, dendê, pinhão-manso, canola, algodão, nabo forrageiro, gergelim, babaçu, macaúba, dentre outros (GUI; LEE; BHATIA, 2008; BASHA; GOPAL; JEBARAJ, 2009; GONZALEZ, 2012).

Ao analisarmos essa grande biodiversidade em relação às potenciais matérias-primas de origem vegetal, para a produção de biodiesel, presentes em nosso País, bem como de fatores como o fato de a grande maioria do biodiesel ser atualmente produzida de fontes alimentícias e com preços elevados, surge a necessidade de aprofundarmos as pesquisas com foco em matérias-primas alternativas. Como é o caso de novas fontes de óleos vegetais, mesmo que estes apresentem características tecnológicas desfavoráveis para utilização nas rotas tradicionais de produção, haja vista que não basta apenas diversificar a matriz das matérias-primas utilizadas, mas também desenvolver processos alternativos, eficazes e competitivos que possibilitem o emprego das mesmas de forma eficiente. Com a finalidade de fomentar as pesquisas e os investimentos industriais em fontes de matérias-primas alternativas e não alimentícias, o produto gerado a partir destas vêm ganhando, por muitos profissionais e entidades do setor, o título de “Biodiesel de Segunda Geração” (BHUIYA et al., 2015; ANUAR; ABDULLAH, 2016).

2.2.1.1 Macaúba

A macaúba é uma palmeira nativa das florestas tropicais, encontrada desde o sul do México e das Antilhas até o Brasil, além de Países como o Paraguai, Argentina, Equador e Peru. Ela atinge de 10 a 15 m de altura e de 20 a 30 cm de diâmetro e seu tronco possui espinhos escuros e pontiagudos. É pertencente à família *Arecaceae*, a qual constitui um grupo de espécies conhecidas como palmeiras, dentre elas está a *Acrocomia aculeata* (macaúba). Seus frutos são de coloração marrom amarelado, esféricos e com diâmetro de 2,5 a 5 cm (LORENZI, 2006; GONZALEZ, 2012).

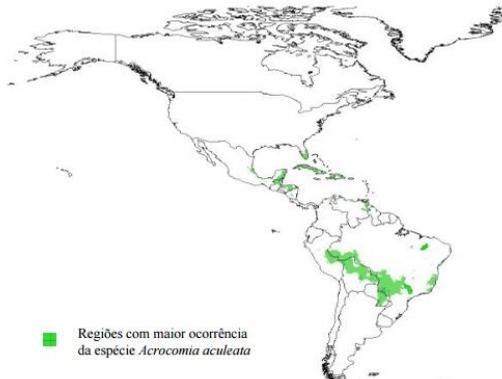
Figura 4 - Palmeira macaúba.



Fonte: MELO, 2012.

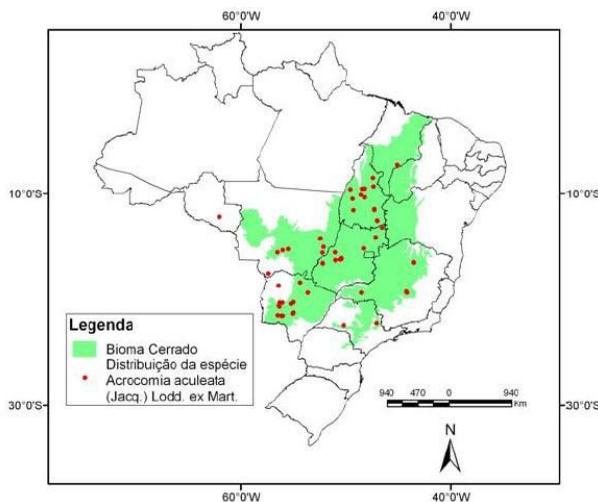
As Figuras 5 e 6 mostram a distribuição da macaúba na América Latina e no Brasil. Sendo que no Brasil é a palmeira com maior dispersão, ocorrendo em praticamente todo o seu território, mas com destaque para os Estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, São Paulo, Minas Gerais e Tocantins, a mesma é amplamente disseminada pelas áreas do Cerrado e Pantanal (NUCCI, 2007).

Figura 5 - Distribuição da palmeira macaúba na América Latina.



Fonte: New World Fruits (2006) citado por Nucci (2007).

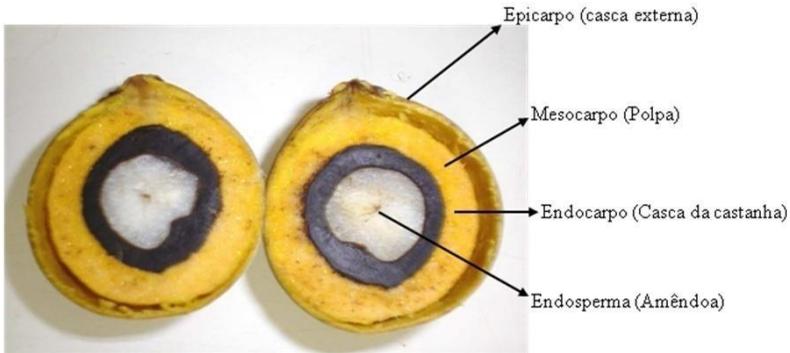
Figura 6 - Principais locais de incidência da macaúba no Brasil.



Fonte: RATTER et al., 2003.

O coco da macaúba é composto basicamente por quatro partes, como pode-se observar na Figura 7. O mesocarpo (polpa) é a região de onde é extraído o óleo com maior potencial para a produção de biodiesel, devido às características do mesmo. Além do óleo, o mesocarpo também fornece uma torta que é utilizada na alimentação animal, sendo que a casca (epicarpo) pode também ser adicionada à esta torta após extração ou não de seu conteúdo de óleo, muitas vezes o óleo da casca é misturado ao da polpa devido à similaridade dos mesmos em relação ao teor de ácidos graxos, aumentando ainda mais o potencial de óleo do fruto. Já o endocarpo é utilizado como carvão, para queima ou mesmo como filtro. E a parte mais interna do fruto, o endosperma ou amêndoa, é responsável pela produção de um óleo com qualidade superior ao óleo da polpa utilizado em processos de maior valor agregado como, por exemplo, em cosméticos. Após a extração do óleo, a amêndoa também fornece uma torta que pode ser utilizada na alimentação animal. Pode-se observar, portanto, que os frutos da macaúba, os quais são produzidos em praticamente todo o ano, são utilizados em sua totalidade, praticamente sem haver desperdícios ou resíduos decorrentes dos mesmos (SILVEIRA, 2014).

Figura 7 - Composição do fruto (coco) da macaúba.



Fonte: CASTRO, 2008.

De acordo com Melo (2012), o teor de óleo na polpa da macaúba é de aproximadamente 70%, enquanto na amêndoa e na casca são de 58 e 9,8%, respectivamente. Correspondendo a grandes níveis de óleo no fruto, o que acarreta também em volumes altos de produção de óleo por hectare se comparado com outras culturas. Como se pode observar na Tabela 1, quando comparada com outras oleaginosas presentes no Brasil, a macaúba é uma das campeãs em litros de biodiesel por hectare por ano, perdendo apenas para o dendê, mas com a vantagem de poder ser cultivada em praticamente todo o País, enquanto os dendezeiros são mais adaptáveis em algumas regiões. Em relação à soja, matéria-prima mais consumida no Brasil e de fonte alimentícia, a macaúba possui níveis de produtividade anuais cerca de dez vezes maiores. Um fato interessante é que a soja, mesmo sendo uma potencial fonte alimentícia, destina atualmente cerca de um terço de sua produção nacional para o biodiesel, dessa forma a substituição da mesma por outras culturas traria vantagens econômicas à toda a população, com uma provável redução nos preços de um dos alimentos mais consumidos. Tendo-se em vista os dados de produção da macaúba, pode-se afirmar que a mesma tem um enorme potencial agrônomo para substituir, ao menos em parte, a utilização do óleo de soja na produção de biodiesel, porém, restando ainda maiores avanços tecnológicos no setor industrial para tornar viável o processo produtivo do biodiesel de óleo macaúba, tendo-se em vista a menor qualidade desse óleo, se comparado com a soja, por exemplo (AMARAL, 2004; NAVARRO-DÍAZ et al, 2014; MICHELIN et al., 2015).

Tabela 1 - Rendimento potencial de biodiesel baseado nas características agrônômicas de cada espécie.

Espécie	Litros/ha/ano
Soja (<i>Glicine max</i>)	420
Arroz (<i>Oriza sativa</i>)	770
Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	890
Amendoim (<i>Arachis hipogaea</i>)	990
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	1320
Pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i>)	1590
Abacate (<i>Persea americana</i>)	2460
Coco (<i>Cocos nucifera</i>)	2510
Macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>)	4200
Dendê (<i>Elaeis guineensis</i>)	5550

Fonte: Astúrias (2004) citado por Amaral (2007).

A macaúba é uma cultura perene, inicia a produção de seus frutos a partir do quarto ano e segue produzindo-os por cerca de 100 anos, sem praticamente nenhum investimento extra, isto faz com que ela tenha pouco ou quase nenhum custo de produção, a não ser a mão de obra disponibilizada no momento da coleta dos frutos. Outra grande vantagem desta cultivar é que a mesma pode ser consorciada com lavoura e/ou pecuária. Geralmente até o quarto ano, enquanto a palmeira ainda está em fase de desenvolvimento, as áreas de terra são utilizadas também para a agricultura e, a partir do momento em que se inicia a produção dos frutos, utiliza-se a pecuária. Dessa forma, além de a macaúba proporcionar uma altíssima produtividade de óleo por hectare com baixo custo, as áreas onde a mesma está implantada podem ser utilizadas para outras atividades, o que possibilita, além de uma maior renda ao produtor, a diminuição da expansão das áreas de cultivo e, conseqüentemente, do desmatamento de novas áreas (LOPES et al., 2013., NAVARRO-DÍAZ et al, 2014).

Embora atualmente a grande maioria dos maciços de macaúba brasileiros serem nativos e com coleta dos frutos realizada na forma do extrativismo, têm-se observado as potencialidades futuras do óleo de macaúba para a produção de biodiesel e já existem inúmeras pesquisas sendo desenvolvidas para a criação e melhoria de cultivares da palmeira, viabilizando assim o plantio organizado da mesma em todas as regiões do País. Além disso, os pesquisadores buscam o desenvolvimento de plantas “domesticadas”, com características que facilitem seu manuseio e cultivo, como a ausência de espinhos e menor altitude das palmeiras. Acredita-se que em poucos anos teremos no Brasil novas e extensas

áreas de cultivo de macaúba (FERRARI; FILHO, 2012; LOPES et al, 2013; EMBRAPA, 2015).

Todos estes aspectos positivos em relação à macaúba, como, por exemplo, sua alta produtividade de óleo, o fato de ela não ser utilizada largamente como fonte alimentícia, ser uma cultura perene e com poucas despesas de cultivo, poder ser consorciada com lavoura e pecuária, envolver a agricultura familiar no processo, dentre outros fatores, tem colocado a macaúba como uma das grandes promessas brasileiras na produção sustentável do biodiesel. Porém, sua utilização contínua e em larga escala ainda esbarra em alguns entraves tecnológicos, como por exemplo, a sua elevada acidez, que torna muito difícil e, dependendo do estado da matéria-prima, torna impossível sua aplicação nos processos convencionais de produção de biodiesel. Dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento de pesquisas a fim de encontrar soluções alternativas e eficazes para a produção do biodiesel com estes materiais menos nobres, porém com um grande apelo social, ambiental e econômico para o Brasil (AGUIEIRAS et al., 2014; CESAR et al., 2015; KEIFF et al., 2016; SILVA; CARDOSO; PASA, 2016).

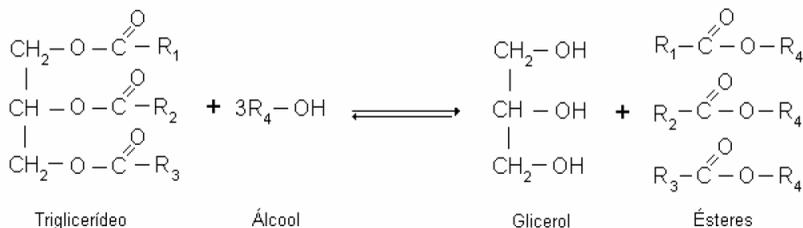
2.3 MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Ao se constatar que o uso de óleos vegetais *in natura* não apresentava as características necessárias para utilização como combustível, devido principalmente a fatores como sua alta viscosidade e baixa volatilidade, o que causava problemas como uma queima incompleta, entupimentos e acúmulos de óleo no motor, novas alternativas para modificação tecnológica dos mesmos começaram a ser pesquisadas. Em relação à redução da viscosidade, diferentes métodos são considerados atualmente, como por exemplo: sua diluição com o óleo diesel, microemulsões com alcoóis de cadeia curta, craqueamento térmico ou pirólise e a transesterificação com metanol ou etanol, esta última, a técnica mais difundida e amplamente utilizada em todo o mundo, a qual será detalhada a seguir (LEUNG et al., 2010; GONZALEZ, 2012).

A transesterificação, também conhecida como alcoólise, é a técnica mais viável de modificação dos óleos vegetais para produção de biodiesel. Ela consiste basicamente na transesterificação dos triacilgliceróis presentes no óleo ou gordura, na presença de um álcool de cadeia curta, como metanol, etanol ou ainda o butanol, com auxílio de um catalisador ou alguma condição físico-química que o substitua. O resultado principal dessa reação é a produção de ésteres alquílicos de

ácidos graxos, que é o próprio biodiesel, e glicerol, ou glicerina quando purificada e em sua forma comercial. A Figura 8 representa esquematicamente a reação global de produção dos ésteres (biodiesel) a partir da molécula do triacilglicerol (DEMIRBAS, 2003; VASUDEVAN; BRIGGS, 2008).

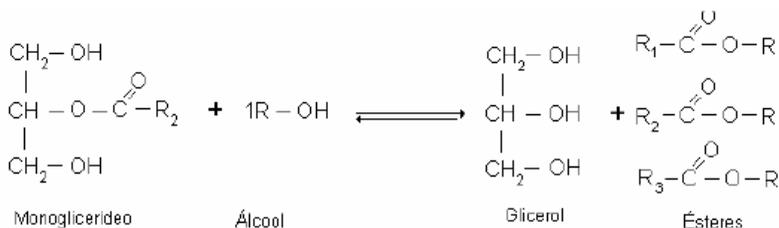
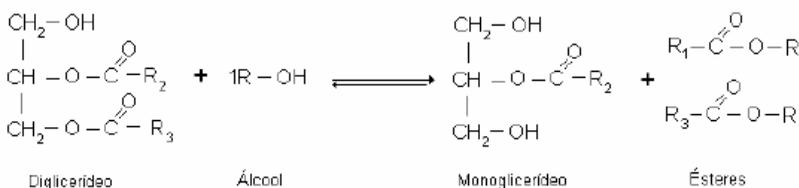
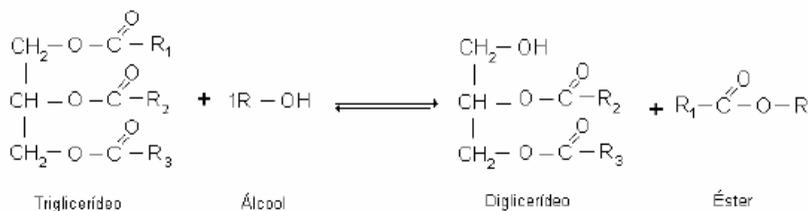
Figura 8 - Representação da produção de biodiesel através da transesterificação.



Fonte: SILVA, 2009.

A reação representada na Figura 8 não ocorre diretamente, ela é dividida em três reações intermediárias e reversíveis, sendo que em cada uma delas é produzido um dos três ésteres resultantes, representados na reação global acima. Isso ocorre pois, como o próprio nome diz, o triacilglicerol é uma molécula com estrutura tripla formada por três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol. Estes ácidos graxos são liberados um a um em cada uma das três reações e, ao se ligarem a uma molécula de álcool, formam os ésteres. Na primeira reação, o triacilglicerol é convertido a diacilglicerol e é produzido o primeiro éster. Na segunda reação, o diacilglicerol é convertido a monoacilglicerol e é produzido o segundo éster. Já na terceira reação, o monoacilglicerol é reduzido finalmente ao glicerol e a terceira molécula de éster é produzida. Como em cada uma das três etapas é consumida uma molécula de álcool, se faz necessário o uso de no mínimo uma razão molar óleo:álcool de 1:3, porém, como as reações são reversíveis, é necessário adicionar uma quantidade maior de álcool para que ocorra o deslocamento no equilíbrio da reação, além disso, uma quantidade maior de álcool no meio reacional evita o impedimento estérico que pode ocorrer e dificultar o desenvolvimento completo das reações. Essas três reações reversíveis, que constituem o processo de transesterificação ou alcoólise são representadas na Figura 9 a seguir (ENWEREMADU; MBARAWA, 2009; LEUNG et al., 2010; GONZALEZ, 2012).

Figura 9 - Reações intermediárias da transesterificação para produção de biodiesel.



Fonte: SILVA, 2009.

As reações apresentadas são desenvolvidas com auxílio de catalisadores e é justamente a escolha destes que caracteriza qual o tipo de reação de transesterificação será desenvolvida na obtenção do biodiesel. As reações podem ser realizadas com catálise homogênea, com emprego de catalisadores químicos (ácidos ou alcalinos), sendo que esta é a principal reação utilizada atualmente em nível industrial, com grande destaque para os catalisadores básicos, já que a grande maioria das indústrias de biodiesel os utilizam devido ao fato de os mesmos apresentarem ótimos resultados de conversão em um curto intervalo de tempo, porém quando a qualidade do óleo diminui, o emprego desta técnica se torna mais complicada e até mesmo inadequada, por exemplo em óleos de acidez elevada ocorre a saponificação do mesmo ao utilizar os catalisadores alcalinos; as reações também podem ser de catálise

heterogênea, com o emprego de zeólitas ou argilas, por exemplo; enzimáticas, utilizando lipases como catalisadores, podendo ser imobilizadas ou livres; ou ainda, o biodiesel pode ser produzido na ausência de catalisadores, quando se trabalha em condições supercríticas, tendo em vista que o álcool nestas condições já exerce o papel de catalisador para a reação de transesterificação. Neste trabalho será discutida mais detalhadamente a reação com catálise enzimática, por ser a condição utilizada para o desenvolvimento da pesquisa (LEUNG et al., 2010; SAJID et al., 2016; XU et al., 2016).

2.3.1 Produção com catálise enzimática

Atualmente, a grande maioria do biodiesel produzido no mundo é obtida por reações com catálise química, especialmente a catálise básica, a qual já é amplamente conhecida e difundida nas empresas do setor, apresenta um custo competitivo e possui reações rápidas de conversão. Porém, existem diversas condições em que estes processos convencionais não se aplicam de maneira adequada, como quando se trabalha com óleos de elevada acidez, visto que, com este tipo de matéria-prima, as reações em meio alcalino acabam saponificando o óleo, produzindo sais de ácidos graxos (sabão) ao invés de ésteres de ácidos graxos (biodiesel). Além disso, os processos convencionais, por usarem um número elevado de produtos químicos, requerem esforços e gastos elevados nas etapas de purificação dos produtos e efluentes gerados, existindo ainda um grande risco de contaminações ambientais por estes produtos, caso ocorra algum incidente durante o processo. As reações convencionais, com os catalisadores homogêneos de composição química, também demandam um elevado gasto energético, devido às condições em que as reações ocorrem, como elevadas temperaturas, por exemplo. Dessa forma, a produção de biodiesel pelo processo de transesterificação com catálise enzimática, surge como uma alternativa ao processo convencional de catálise alcalina, principalmente quando se trabalha com matérias-primas de menor qualidade, com elevada acidez e teor de água em sua composição (HAMA; KONDO, 2013; AARTHY et al., 2014; CHRISTOPHER et al., 2014; ZENEVICZ et al., 2016).

A catálise enzimática tem a vantagem de também converter os ácidos graxos livres (AGL) presentes no óleo em ésteres, num processo paralelo à transesterificação denominado de esterificação. Ou seja, mesmo óleos com elevada acidez são convertidos a biodiesel de maneira eficaz. As reações catalisadas por enzimas, que são compostos

biológicos, também apresentam outras vantagens, como por exemplo, toleram teores maiores de água na matéria-prima; tornam mais fáceis os processos de purificação, tanto do biodiesel como da glicerina (outro produto muito importante economicamente para as empresas do setor); demandam menor gasto energético e exigem condições mais brandas de temperatura, pH e pressão se comparado a outros processos; necessitam de baixas quantidades de álcool; podem ser reutilizadas diversas vezes no processo, quando se trabalha com mecanismos eficientes de recuperação das enzimas utilizadas; possuem um alto rendimento; e a grande vantagem de ser uma tecnologia limpa. Porém, os processos com catálise enzimática também apresentam algumas desvantagens, como elevados tempos de reação quando comparado a outros métodos; o risco da inativação do catalisador por condições reacionais, como alto teor de álcool; e o grande gargalo desse processo, que ainda é o elevado custo das enzimas, fato este que faz muitas empresas desistirem de sua aplicação, apesar das inúmeras e notáveis vantagens tecnológicas dos processos enzimáticos. A Tabela 2 apresenta um comparativo entre as principais tecnologias disponíveis para produção de biodiesel por transesterificação (SILVA, 2014; RICO; SAUER, 20015; WANG et al., 2015).

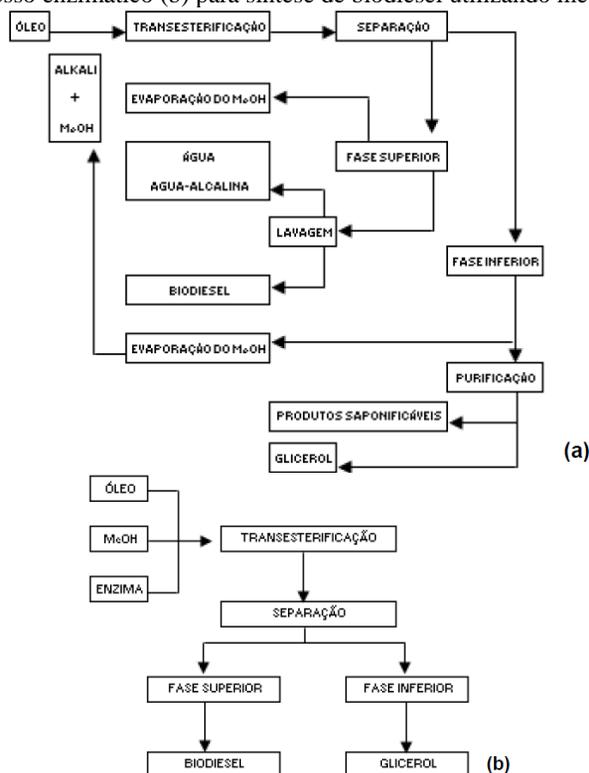
Tabela 2 - Comparação entre as diferentes tecnologias utilizadas na produção de biodiesel.

Variável	Catálise alcalina	Catálise ácida	Álcool supercrítico
Temperatura de reação (°C)	60-70	55-80	239-385
Ácidos graxos livres no material	Produto saponificável	Ésteres	Ésteres
Rendimento de ésteres	Normal	Normal	Bom
Recuperação do glicerol	Difícil	Difícil	
Purificação dos ésteres	Repetidas lavagens	Repetidas lavagens	
Custo de produção do catalisador	Barato	Barato	Médio
Variável	Catálise enzimática	Catálise Heterogênea	
Temperatura de reação (°C)	30-40	180-220	
Ácidos graxos livres no material	Ésteres		
Rendimento de ésteres	Alto	Normal	
Recuperação do glicerol	Fácil	Fácil	
Purificação dos ésteres	Fácil	Fácil	
Custo de produção do catalisador	Relativamente caro	Potencialmente barato	

Fonte: Helwani et al. (2009) citado por Dors (2011).

Outra grande vantagem dos processos enzimáticos é o fato de os mesmos apresentarem um *layout* mais simples e com menos etapas do que os processos convencionais. Fato este que se torna um grande atrativo para os investimentos pelo segmento industrial, tendo-se em vista que se faz necessário uma quantidade significativamente menor de gastos energéticos e operacionais, incluindo um simplificado processo de purificação do biodiesel e do glicerol, etapa denominada de *downstream process* no setor industrial, que é uma das mais onerosas e complexas fases da produção de biodiesel em larga escala. Abaixo, na Figura 10, é possível comparar o processo de produção de biodiesel por catálise enzimática com o processo de catálise alcalina (principal método utilizado atualmente pelas usinas de biodiesel), em ambos os casos o álcool utilizado é o metanol (RANGANATHAN et al., 2008; YU et al., 2015).

Figura 10 - Comparativo simplificado entre o processo químico (a) e o processo enzimático (b) para síntese de biodiesel utilizando metanol.



Fonte: Ranganathan et al. (2008) citado por Dors (2011).

Devido às suas características reacionais e de operação, os catalisadores enzimáticos apresentam a grande vantagem de serem adequados para reações com uma infinidade de matérias-primas, muitas vezes tolerando alterações de composição derivadas do estado de conservação em que estas se encontram, ao contrário dos processos convencionais com catálise química, que exigem matérias-primas de boa qualidade, o que eleva consideravelmente os custos com aquisição ou refino deste material pelas indústrias. Sabe-se que hoje, em média, os custos com a matéria-prima chegam a aproximadamente 80% dos custos totais de produção do biodiesel. Dessa forma, tecnologias como a utilização de enzimas em substituição aos catalisadores químicos representam uma importante alternativa para o setor (HAMA; KONDO, 2013; D'AGOSTO et al., 2015).

Ao utilizar os processos enzimáticos é possível ampliar o leque de fontes de matérias-primas para produção do biodiesel. Até mesmo óleos e gorduras residuais podem ser aplicados sem muitas etapas de pré-tratamento, fato muito interessante já que além de produzir um biocombustível com enorme importância nos cenários econômico, social e ambiental, acaba sendo um destino adequado aos resíduos de outros processos produtivos e que até então eram vistos como problemas. Também novas oleaginosas começam a despertar interesse para aplicações industriais em larga escala, na medida em que os processos biotecnológicos avançam, visto que muitos dos óleos produzidos por estas espécies apresentam acidez elevada, inviabilizando sua aplicação nos processos convencionais. Abre-se até mesmo a possibilidade de direcionar a produção para óleos que não são utilizados na alimentação humana, diferente do que ocorre atualmente em que as principais matérias-primas são de fonte alimentícia, ocorrendo uma competição entre ambos os setores por estes materiais e causando, em muitos casos, elevação dos preços de alguns alimentos (HAMA; KONDO, 2013; NORAINI et al., 2014; YU et al., 2015).

Quando se fala em catálise enzimática, a elevada acidez, que é decorrente da grande quantidade de ácidos graxos livres presentes no óleo, não representa um fator negativo mas, pelo contrário, acaba acelerando o processo de síntese dos ésteres alquílicos, já que os AGL são diretamente esterificados em FAMEs ou FAEEs, além da transesterificação dos triacilgliceróis. O fato de ter grande concentração de AGL acaba, inclusive, diminuindo a quantidade de catalisador necessária para a reação, já que uma das etapas já está realizada, que é a hidrólise do ácido graxo da estrutura do triacilglicerol, necessitando apenas realizar a ligação deste ácido graxo já em solução à molécula de

álcool (GOG et al., 2012; CHRISTOPHER et al., 2014; WANG et al., 2015).

Além das reações de transesterificação descritas anteriormente, nas reações com catálise enzimática onde o óleo utilizado como matéria-prima apresenta altos teores de ácidos graxos livres (AGL), como é o caso do óleo de macaúba, ocorrem também simultaneamente as reações de esterificação, onde esses AGL são convertidos diretamente aos ésteres. Um esquema da reação de esterificação está representado na Figura 11 (GOG et al., 2012; CHRISTOPHER et al., 2014).

Sendo possível também a ocorrência da reação em duas etapas, onde primeiramente se realiza a hidrólise enzimática, em presença de água, da estrutura do triacilglicerol em diacilglicerol, o diacilglicerol resultante em monoacilglicerol e este em glicerol, resultando na produção de uma molécula de ácido graxo livre em cada uma das três reações intermediárias de hidrólise, a segunda etapa é a esterificação destes ácidos graxos livres:

Figura 11 - Reação de esterificação do ácido graxo livre.



Fonte: Minami e Saka (2006) citado por Gonzalez (2012).

Em relação à presença de água na matéria-prima, o processo enzimático também apresenta uma vantagem enorme em relação ao processo químico, o qual exige ausência ou baixos teores de água. Já com relação às reações catalisadas com enzimas, a água, pelo contrário, é um dos reagentes que devem ser inclusive adicionados, visto que ela é necessária para realizar algumas etapas da reação, como a hidrólise do ácido graxo da estrutura do triacilglicerol para que em seguida o mesmo seja esterificado com o álcool. No processo enzimático, a ausência de água não permite a hidrólise do triacilglicerol, não liberando os ácidos graxos e, portanto, impedindo a ocorrência já da primeira etapa do processo. Além disso, a água é necessária para hidratar a própria enzima, permitindo que o seu sítio ativo encontre o substrato, principalmente quando se utiliza enzimas livres (não imobilizadas em suportes). Ou seja, matérias-primas com altos teores de água, como os óleos residuais, gorduras resultantes de processos industriais e alguns

óleos vegetais “menos nobres” são facilmente aplicados aos processos enzimáticos (HAMA; KONDO, 2013; POPPE et al., 2015).

A partir de todas estas constatações pode-se dizer que a produção de biodiesel por catálise enzimática é um processo promissor e com grande capacidade de aplicação industrial, podendo representar inclusive uma transformação no setor, principalmente no que se refere à aplicação de novas matérias-primas, deixando o biodiesel com um aspecto ainda mais sustentável. Porém, alguns gargalos ainda precisam ser resolvidos para sua consolidação definitiva, como a redução no custo das enzimas, o que felizmente tem se tornado mais próximo de acontecer à medida que novas formulações estão sendo desenvolvidas por empresas de biotecnologia e centros de pesquisas de todo o mundo. Um dos aspectos que pode contribuir na redução de custo é a utilização de enzimas livres (não imobilizadas), já que o processo de imobilização é bastante oneroso e eleva seu preço, esta etapa visa principalmente a posterior reutilização das enzimas, porém em muitos trabalhos recentes as enzimas livres também estão sendo reutilizadas com sucesso. Outro fator a ser aprimorado é a redução dos tempos de reação, que ainda são elevados. Ou seja, a expansão e consolidação do biodiesel enzimático têm perspectivas futuras bastante otimistas, necessitando apenas do desenvolvimento de novas pesquisas para o aprimoramento dos produtos e processos aplicados em sua síntese (GOG et al., 2012; HAMA; KONDO, 2013; CHRISTOPHER et al., 2014; POPPE et al., 2015; YU et al., 2015; SUBHEDAR; GOGATE, 2016).

2.4 ENZIMAS

As enzimas são substâncias orgânicas, macromoléculas biologicamente ativas, de natureza proteica ou, em alguns casos, glicoproteica. O grande papel deste grupo importante de substâncias é a sua função como catalisadores de reações bioquímicas, acelerando ou até mesmo promovendo reações de transformação de substratos em produtos que provavelmente não aconteceriam ou seriam demasiadamente lentas sem a presença das mesmas. As enzimas atuam diminuindo a energia de ativação para que as reações bioquímicas possam acontecer, sem alterações em seu equilíbrio, já que não são consumidas na reação (LEHNINGER et al., 2002; ZENEVICZ, 2015).

As enzimas, substâncias presentes em praticamente todos os organismos vivos e indispensáveis para o funcionamento da própria vida podem ser extraídas ou produzidas de diferentes formas, com destaque para a obtenção das mesmas a partir de culturas de micro-organismos.

Estas enzimas produzidas comercialmente vêm ganhando cada vez mais espaço para aplicações em bioprocessos, tanto nos desenvolvidos exclusivamente para sua utilização, como em substituição a produtos químicos e/ou sintéticos em processos já existentes. A utilização de catalisadores biológicos permite a aplicação de condições mais brandas se comparado aos catalisadores sintéticos, representando menor gasto energético e maior segurança. Além disso, é possível regular a atividade enzimática ao variar as condições operacionais e, conseqüentemente, realizar o controle dos processos (GOG et al., 2012; CHRISTOPHER et al., 2014; VENERAL, 2014).

A utilização das enzimas em diferentes tipos de bioprocessos vem crescendo consideravelmente e um dos setores responsáveis por sua consolidação é o de síntese de bioprodutos, seja nas áreas alimentícia, farmacêutica, química, agricultura, têxtil, ambiental, biocombustíveis e bioenergia, dentre inúmeras outras. Fazendo com que muitas empresas aprimorem suas pesquisas no desenvolvimento, tanto de processos e produtos gerados a partir das mesmas, como em pesquisas para novas soluções enzimáticas que visam o atendimento de novos setores e indústrias ou ainda tenham a capacidade de solucionar problemas existentes nas formulações disponíveis atualmente (LEHNINGER et al., 2002; SIENIAWSKA, 2015).

Um dos grandes empecilhos que historicamente dificultaram a expansão dos processos enzimáticos é o alto custo de muitas enzimas que, mesmo com seus aspectos tecnológicos conhecidos e aprovados, não são viáveis economicamente ou não tem condições de competir com os produtos sintéticos. Porém, graças aos esforços que pesquisadores de muitas empresas de biotecnologia, centros de pesquisa e universidades vêm realizando, significativos avanços neste sentido foram conquistados nos últimos anos ou estão sendo previstos para os próximos. Essa redução de custo está relacionada a inúmeros fatores, como por exemplo, desenvolvimento de novas formulações mais baratas ou com maior rendimento, possibilidade de desenvolver processos que utilizam matérias-primas mais acessíveis, desenvolvimento de alternativas que permitam a reutilização das enzimas, dentre outros. Dessa forma, a utilização de biocatalisadores enzimáticos tem perspectivas de crescimento bastante otimistas para os próximos anos (GOG et al., 2012; CHRISTOPHER et al., 2014).

2.4.1 Lipases

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3) são produzidas a partir de animais, plantas ou micro-organismos, principalmente fungos e bactérias. As formulações comerciais são, em sua grande maioria, obtidas de fonte microbiana, devido principalmente aos menores custos de produção, facilidades operacionais, maior estabilidade térmica e fácil modificação de suas estruturas. Elas podem ser produzidas de forma intracelular ou extracelular, ambas podem ser utilizadas na produção de biodiesel, porém a maioria das pesquisas e aplicações são realizadas utilizando formulações comerciais de lipases extracelulares (HASAN et al., 2006; ANTCZAK et al., 2009).

As lipases constituem uma das classes mais conhecidas de enzimas e são classificadas como hidrolases. Elas atuam hidrolisando total ou parcialmente as estruturas do triacilglicerol, reduzindo-o a ácidos graxos livres e glicerol, ou ainda nos intermediários diacilglicerol e monoacilglicerol. Possuem a capacidade de agir na interface óleo/água, o que viabiliza as reações de hidrólise, onde moléculas de água são necessárias (BROCKMAN et al., 1988; VILLENEUVE et al., 2000).

Além da hidrólise, as enzimas podem catalisar uma série de reações bioquímicas, como por exemplo alcoólise, acidólise, aminólise, esterificação e transesterificação (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Em relação à sua especificidade ao substrato, as lipases são divididas em quatro grupos, sendo o primeiro o das não específicas onde ocorre a quebra do triacilglicerol em qualquer posição, formando os ácidos graxos e o glicerol de maneira aleatória; o segundo grupo é formado pelas lipases regioespecíficas, as quais liberam os ácidos graxos de algumas posições únicas da molécula de triacilglicerol; o terceiro grupo é formado pelas lipases estereoespecíficas liberando apenas tipos exclusivos de estereoisômeros; já o quarto grupo, mais seletivo, realiza apenas a liberação de um determinado tipo de ácido graxo (MACRAE, 1983; FREITAS et al., 2008).

Algumas características das lipases fazem com que as mesmas apresentem vantagens significativas para aplicações em processos industriais em diferentes setores. As lipases são enzimas estáveis e atuam em uma ampla faixa de pH, possuem elevada especificidade, não requerem cofatores, exigem condições menos brandas e requerem, dessa forma, menor gasto energético nos processos industriais, apesar de também serem estáveis a altas temperaturas quando se faz necessário e são aplicáveis a uma diversificada gama de materiais, devido à sua

capacidade de reagir e tolerar condições diversas (FAN; QIAN, 2010; HASAN et al., 2006; HORCHANI, 2012).

Devido às suas muitas aplicações, as lipases se destacam entre as hidrolases, são usadas em indústrias de produtos de higiene e limpeza, medicamentos, alimentos (panificação, lácteos, carnes, bebidas, por exemplo), têxteis, papel e celulose, curtumes, cosméticos, biossensores, tratamento de resíduos, além de inúmeras outras aplicações e ultimamente tem ganhado espaço no campo dos biocombustíveis, em especial o biodiesel (MESSIAS et al., 2011; MENDES et al., 2012).

A Tabela 3 a seguir apresenta alguns trabalhos realizados empregando-se enzimas na produção de biodiesel, em diferentes condições operacionais. Observa-se que, em todos eles, os valores de produtividade para o teor de ésteres são elevados. Em geral a utilização de enzima na produção de biodiesel, mesmo com substratos de menor qualidade, apresenta historicamente bons resultados, porém um dos grandes entraves para sua aplicação em escala industrial sempre foi seu elevado custo. As novas formulações de lipase livre prometem solucionar esse problema, por terem valor reduzido e altos índices de produtividade, mesmo em pequenas quantidades.

Tabela 3 - Síntese de alguns trabalhos realizados com produção de biodiesel através de catálise enzimática.

Substrato	Álcool	Enzima	Temp. (°C)	Tempo (h)	Ésteres (%)	Autor
Óleo de palma	Etanol	PS 30 lipase	40	8	72	ABIGOR et al., 2000
Óleo de soja degomado	Metanol	Novozym 435	30	6	93,8	WANTANABE et al., 2002
Óleo de soja	Metanol	Novozym 435	40	14	92	DU et al., 2004
Mistura de óleos vegetais	Etanol	Lipozyme TL IM	25	7	84	HERNANDEZ-MARTIN, OTERO, 2008
Pinhão-manso	Metanol	<i>E. aerogeneses</i>	55	48	94	KUMARI et al., 2009
Óleo de cozinha usado	Metanol	Novozym 435	44,5	12	100	AZOCAR et al., 2010
Bagaço de azeitona	Metanol	Lipase de <i>Termomyces lanuginosus</i>	25	24	93	YUCEL, 2011
Óleo de babaçu	Metanol	Lipozyme TL IM	45	30	98,1	YUCEL, 2012
Óleo de soja bruto	Metanol	Callera Trans L	35	24	96,3	CESARINI et al., 2013
Óleo de macaúba	Etanol	Novozym 435	50	48	96	NASCIMENTO, 2013
Óleo de macaúba	Etanol	Novozym 435 (ultrassom)	65	0,5	75	MICHELIN et al., 2015

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e análises realizados neste trabalho foram efetuados nos seguintes locais: Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC), Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) e Central de Análises do EQA, pertencentes ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) do Centro Tecnológico (CTC), além do Laboratório de Óleos e Gorduras, pertencente ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CTA) do Centro de Ciências Agrárias (CCA). Todos pertencentes à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e localizados na cidade de Florianópolis/SC.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Obtenção e preparo da matéria-prima (substrato)

O óleo bruto de polpa do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata*), utilizado como matéria-prima principal na realização deste trabalho, foi adquirido da empresa COCAL Óleos Especiais Ltda., localizada na cidade de Abaeté/MG.

Após o recebimento do óleo em recipientes adequados, o mesmo foi triplamente filtrado para a retirada de alguns contaminantes sólidos que estavam presentes, em geral pequenos fragmentos de polpa que haviam se misturado ao óleo durante o processo de extração que, segundo a empresa, é feito mecanicamente por prensagem e sem a utilização de solventes.

Após a filtragem observou-se que o óleo continha ainda uma espécie de *borra* em solução, fruto também do processo de extração pelo qual o mesmo foi submetido. A fim de melhorar o aspecto e as condições do óleo e impedir que a transferência de massa no reator fosse comprometida por esses contaminantes, realizou-se uma centrifugação da matéria-prima a 10.000 rpm durante 10 min, em uma centrífuga de tubos marca Quimis, modelo Q222T. Após este procedimento, o óleo de polpa de macaúba bruto foi direcionado para as análises de caracterização do mesmo.

3.1.2 Enzima

O catalisador utilizado foi uma formulação líquida de enzima livre (não imobilizada) termoestável desenvolvida recentemente pela

empresa Novozymes® com sede em Bagsvaerd na Dinamarca, denominada NS-40116, produzida e modificada a partir do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, a qual foi cedida gentilmente pelo fabricante para a realização de testes e validação de suas condições operacionais.

3.1.3 Reagentes

Para as reações de síntese dos ésteres metílicos foi utilizado ainda metanol com 99,8% de pureza em massa, fabricado pela Vetec® e água destilada. Nas reações de caracterização do óleo de macaúba bruto empregado como matéria-prima foram utilizados reagentes de grau analítico, seguindo as exigências de todas as metodologias consultadas. Para a caracterização dos produtos gerados nas reações como, por exemplo, nas análises cromatográficas, também se utilizou apenas reagentes de grau analítico, seguindo as metodologias aplicadas.

3.1.4 Equipamentos utilizados nas reações

O aparato utilizado como reator na produção enzimática dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) a partir do óleo de polpa de macaúba bruto consiste na utilização de erlenmeyers aletados de 250 mL, onde as aletas internas são utilizadas com a finalidade de melhorar a agitação do meio reacional. Representado na Figura 12 a seguir.

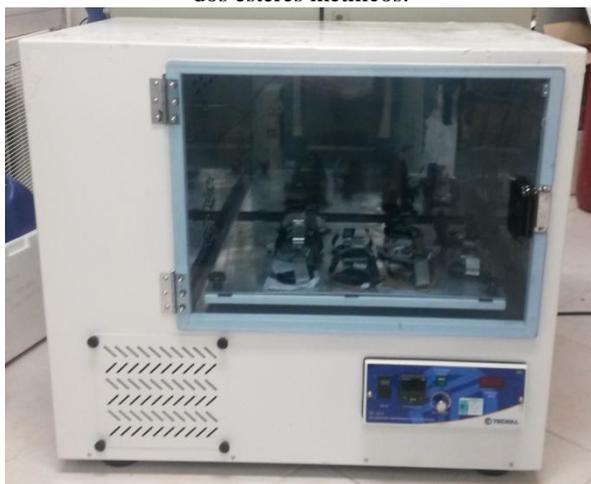
Figura 12 - Erlenmeyer aletado utilizado para a produção dos ésteres metílicos.



Fonte: O Autor.

Após o preparo do meio reacional, os erlenmeyers eram acondicionados em uma incubadora com agitação orbital (Shaker), marca Tecnal, modelo TE-424, Figura 13. Em todas as reações se utilizou a velocidade orbital de 250 rpm para agitação constante e variou-se os seguintes parâmetros: razão molar óleo:álcool, quantidade de catalisador adicionada, teor de água e temperatura, a qual foi mantida constante em todos os experimentos.

Figura 13 - Incubadora com agitação orbital (Shaker) utilizada para a produção dos ésteres metílicos.



Fonte: O Autor.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Caracterização físico-química do óleo de polpa de macaúba

Para a caracterização físico-química do óleo bruto de polpa de macaúba, utilizado como matéria-prima principal (substrato) na produção dos ésteres metílicos, as análises a seguir foram realizadas.

3.2.1.1 Índice de acidez

Na realização da análise do índice de acidez, a fim de determinar a quantidade de ácidos graxos livres presentes na matéria-prima, um procedimento adaptado da metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz foi realizado em triplicata (IAL, 2008).

Após homogeneizado, mediu-se 2 g do óleo em um erlenmeyer de 250 mL, onde foi adicionado em seguida 25 mL de uma solução neutra de éter de petróleo e etanol (2:1 v/v) para a dissolução do óleo e duas gotas de uma solução alcoólica de fenolftaleína a 1%, a qual atua como indicador. O conteúdo do erlenmeyer foi titulado com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L até o aparecimento da coloração rosa por no mínimo 30 segundos sob forte agitação. O índice de acidez, expresso em mg de KOH/g de óleo, é determinado pela Equação 1 a seguir:

$$IA = \frac{V \cdot N \cdot 56,1}{m} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

IA = Índice de acidez (mg KOH/g);

V = Volume adicionado da solução de hidróxido de sódio (mL);

N = Concentração molar da solução de hidróxido de sódio (mol/L);

m = Massa de amostra utilizada (g).

2.2.1.2 Índice de peróxidos

Método utilizado para determinar o grau de oxidação das amostras de óleos ou gorduras, tendo em vista que os peróxidos são considerados os produtos primários da oxidação desses materiais. Este método determina todas as substâncias, em termos de miliequivalentes de peróxido por kg de amostra, que oxidam o iodeto de potássio nas condições do teste. Foram realizadas análises, em triplicata, conforme as metodologias recomendadas pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

Mediu-se 5 g de amostra em um frasco erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se a este 30 mL de uma solução de ácido acético e clorofórmio (3:2 v/v) seguido de agitação até a dissolução da amostra. Em seguida, 0,5 mL de uma solução saturada de iodeto de potássio foi adicionada e deixou repousar ao abrigo da luz por exatamente 1 min. Acrescentou-se então 30 mL de água e foi realizada uma titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol/L, com constante agitação. Continuou-se a titulação até que a coloração amarela tivesse desaparecido. Adicionou-se então 0,5 mL de uma solução saturada de amido solúvel (indicador) e prosseguiu a titulação até o completo desaparecimento da coloração azul. Também foi preparada e titulada uma prova (branco) nas mesmas condições. O índice de peróxidos, expresso em mg de KOH/kg de amostra, é determinado pela Equação 2 a seguir:

$$IP = \frac{(A - B) \cdot N \cdot 1000}{m}$$

(Equação 2)

Onde:

IP = Índice de peróxidos (mg KOH/kg);

A = Volume da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL);

B = Volume da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL);

N = Concentração molar da solução de tiosulfato de sódio (mol/L);

m = Massa de amostra utilizada (g).

3.2.1.3 Índice de saponificação

Método utilizado para determinar a quantidade de álcali necessária para saponificar uma quantidade definida de amostra. Os procedimentos descritos por Santos (2013) foram realizados em triplicata.

Mediu-se 2 g de amostra em um balão de fundo chato, onde foi adicionada em seguida uma solução alcoólica de hidróxido de potássio 0,1 mol/L seguido de agitação para dissolução completa da amostra. Em outro balão de fundo chato de 250 mL colocou-se 25 mL de KOH 0,1 mol/L para servir como prova (branco). Em seguida os balões foram adaptados a condensadores de refluxo e realizou-se o aquecimento dos mesmos através de um banho termostático para volatilização, por 30 min. A cada 5 min, a solução era agitada para promover uma melhor dissolução da mesma. Após retiradas do aquecimento, 1 mL de solução do indicador fenolftaleína 1% foi adicionado nas soluções, e as mesmas foram tituladas com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,5 mol/L até o desaparecimento da cor rosa. O índice de saponificação, expresso em mg KOH/g de amostra, foi determinado pela Equação 3 a seguir:

$$IS = \frac{(B - A) \cdot N \cdot 56,1}{m}$$

(Equação 3)

Onde:

IS = Índice de Saponificação (mg KOH/g);

B = Vol. da sol. de ácido clorídrico utilizado na titulação do branco (mL);

A = Volume da solução de ácido clorídrico utilizado na titulação da amostra (mL);

N = Concentração molar da solução de ácido clorídrico (mol/L);

m = Massa de amostra utilizada (g).

3.2.1.4 Índice de refração

Conforme Willard (1974) o índice de refração pode ser um instrumento para determinar o grau de pureza de algumas substâncias, ao avaliar a refração da luz nas mesmas em comparação à refração da luz em substâncias conhecidas, como o ar e a água. Além da determinação do teor de sólidos solúveis presentes na mesma.

Análises visuais do índice de refração foram realizadas, em triplicata, utilizando-se um refratômetro Abbe de bancada, marca Quimis, modelo Q767B, calibrado para 25 °C (AMARAL, 2007).

3.2.1.5 Densidade

A densidade é uma medida simples de ser realizada e correlaciona a massa de uma substância com o volume ocupado pela mesma. Em geral, para óleos ela é um pouco menor do que a da água, considerado o padrão unitário.

É expressa em g/cm³ e sua determinação foi realizada, em triplicata, pesando-se, em uma balança analítica, a quantidade de amostra capaz de ser adicionada em um balão volumétrico de 10 mL, previamente tarado, até atingir o menisco do mesmo. Após isso, a densidade do óleo de macaúba foi determinada conforma a Equação 4:

$$\rho = \frac{m}{V}$$

(Equação 4)

Onde:

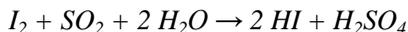
ρ = Densidade (g/cm³);

m = Massa da amostra utilizada (g);

V = Volume do balão (cm³).

3.2.1.6 Umidade

A umidade da amostra, que prediz o teor de água presente na mesma, foi determinada através do Método Karl Fisher. Para realização do mesmo utiliza-se o reagente Karl Fisher (constituído por uma mistura de iodo, dióxido de enxofre e piridina em metanol), com este reagente podem ser determinadas pequenas quantidades de água. Conforme Park e Antonio (2006) ocorre uma reação onde o iodo é reduzido pelo dióxido de enxofre na presença da água:



Essa titulação fornece os valores referentes à água total: água livre mais água de hidratação. Para determinação da umidade (% m/m) na amostra, o procedimento a seguir foi realizado em triplicata:

Utilizou-se um titulador manual, marca Quimis, modelo Q349-2. O titulante empregado foi uma solução comercial do reagente Karl Fisher. Adicionou-se primeiramente metanol ao copo do reator, cobrindo a ponta do eletrodo, realizando-se então uma titulação até o aparelho apresentar cor vermelha no sensor. É realizada uma fatoração com água para determinar o fator de correção, conforme a Equação 5:

$$Fc = \frac{m_a \cdot 1000}{V} \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde:

Fc = Fator de correção;

m_a = Massa de amostra utilizada (g);

V = Volume gasto da solução Karl Fisher (mL).

Em seguida, a amostra para análise foi pesada e colocada no frasco do reator Karl Fisher onde continha o metanol seco. Fazendo com que o sensor voltasse para a coloração verde (umidade), seguiu-se a titulação até voltar a coloração vermelha no mesmo (seco). Em seguida, foi realizado o cálculo da umidade ou teor de água da amostra:

$$U = \frac{V \cdot Fc}{10 \cdot m_a} \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde:

U = Umidade ou teor de água na amostra (% m/m);

V = Volume gasto da solução Karl Fisher (mL);

Fc = Fator de correção;

m_a = Massa de amostra adicionada (g).

3.2.1.7 Viscosidade

A viscosidade da amostra, que representa a resistência de um fluido ao escoamento foi determinada, em triplicata, utilizando-se um viscosímetro marca TermoHaake, modelo Visco Tester 6^L. O mesmo apresenta os valores referentes à viscosidade dinâmica, expressa em mPas, equivalente a 1 cP (centipoise).

3.2.2 Determinação do perfil de ácidos graxos

A análise do perfil de ácidos graxos se faz necessária para uma caracterização mais minuciosa da matéria-prima utilizada na produção dos ésteres metílicos, pois tais estruturas são obtidas justamente a partir da reação de síntese entre os ácidos graxos e o álcool utilizado, neste caso, o metanol. Dessa forma, conhecendo-se o perfil de ácidos graxos presentes na matéria-prima é possível determinar também o perfil de ésteres metílicos presentes no produto final (biodiesel).

A determinação do perfil de ácidos graxos do óleo de polpa de macaúba utilizado para a produção dos ésteres metílicos foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, seguindo a metodologia utilizada por Salvador (2014).

Primeiramente as amostras, em duplicata, foram metiladas seguindo a metodologia de O'Fallon (2007), com algumas pequenas alterações. 0,7 mL de uma solução de KOH a 10 mol/L e 5,3 mL de metanol foram adicionados em 100 µL de óleo, previamente colocado em um tubo de ensaio, seguido de uma agitação constante por 5 min e incubação dos tubos em um banho termostático a 55 °C por 1,5 h. Após, 580 µL de solução de ácido sulfúrico a 12 mol/L foram adicionados seguido de nova incubação a 55 °C por mais 1,5 h. Para finalizar esta etapa, 3 mL de hexano foram adicionados aos frascos, seguido de centrifugação para retirada do sobrenadante.

O sobrenadante foi injetado no cromatógrafo gasoso equipado com injetor split (razão do Split 1:40). As condições de análise foram: Cromatógrafo Gasoso Capilar – GC 2010 – Shimadzu; coluna capilar: HP 88 (88% cianopropil metilpolisiloxano) de sílica fundida, dimensões de 100 m, Ø int: 0.25 mm, 0.20 µm filme.; condições de operação do cromatógrafo: split: 1:150; fluxo da coluna: 0,92 mL/min.; temperatura do detector: 260 °C; temperatura do injetor: 150 °C; temperatura do forno: 140 °C/6 min, 140 °C a 240 °C (taxa de aquecimento de 4 °C/min), 240 °C/6 min; gás auxiliar (make up gás): nitrogênio; gás de arraste: hélio; volume injetado: 1 µL. Cada sobrenadante foi injetado duas vezes no cromatógrafo (SALVADOR, 2014).

Para fim de identificação dos picos gerados nos cromatogramas foram utilizados os padrões Supelco Mix 37 com 37 ésteres metílicos conhecidos e o padrão GLC 20 A com 7 ésteres metílicos conhecidos e que apresentava os principais constituintes do material analisado.

Cada um dos picos gerados nos cromatogramas refere-se a um dos ácidos graxos presentes no óleo analisado e sua identificação foi

feita conforme seu tempo de retenção, em comparação aos picos gerados nas análises dos padrões, onde todos os picos eram conhecidos conforme sua ficha técnica fornecida pelo fabricante. Já a quantificação do percentual de cada ácido graxo detectado foi realizada integrando-se a área sob a curva de seu pico e comparando-a com a soma total das áreas de todos os picos, a qual corresponde a 100%.

3.2.2.1 Cálculo da massa molar do óleo de polpa de macaúba

Com o resultado da determinação do perfil de ácidos graxos, foi possível realizar o cálculo da massa molar do óleo de polpa de macaúba. Esta informação é fundamental para o conhecimento das condições de reação utilizadas na produção dos ésteres metílicos, pois alguns parâmetros, como a adição de álcool ao meio reacional, se baseiam na relação estequiométrica do mesmo em relação à matéria-prima.

A massa molar, expressa em g/mol, foi calculada conforme a Equação 7 desenvolvida por Chaves (2008).

$$M = 3 \cdot \frac{\sum(X_i \cdot M_i)}{\sum X_i} + 38,04 \text{ g/mol} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

M = Massa molar do óleo (g/mol);

X_i = Fração molar de cada um dos ácidos graxos presentes;

M_i = Massa molar de cada um dos ácidos graxos presentes (g/mol).

OBS: A fração é multiplicada por 3 pois cada molécula de triacilglicerol que compõem o óleo é formada por três moléculas de ácidos graxos. O valor de 38,04 g/mol se refere à diferença entre a massa molar do glicerol e das três moléculas de água que substituem o mesmo quando os ácidos graxos são liberados.

3.2.3 Determinação da atividade enzimática da NS-40116

A determinação da atividade enzimática (hidrolítica) da formulação líquida da lipase NS-40116, utilizada como catalisador nas reações de produção dos ésteres metílicos a partir do óleo de polpa de macaúba bruto foi realizada em triplicata seguindo a metodologia descrita por Chiou e Wu (2004).

Utilizou-se 50 mL de p-nitrofenil palmitato (p-NPP) como substrato, dissolvidos em 100 mL de etanol. O aumento da absorbância,

a 410 nm, causado pela liberação do p-nitrofenol na hidrólise do p-NPP, foi determinado em espectrofotômetro. Um volume de 0,1 mL da lipase livre foi adicionado a uma mistura contendo 1 mL de solução de p-NPP 0,5% (m/v) e 0,5 mg/L de solução tampão fosfato (pH 7) incubados por 5 min a 30 °C. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 0,5 mg/L, seguido de centrifugação por 10 min a 10.000 rpm. Retirou-se 0,5 mL do sobrenadante, o qual foi diluído 10 vezes em água destilada e então sua absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV/VIS, a 410 nm. Utilizou-se um coeficiente de extinção molar (ϵ_{410}) de $15.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para o p-nitrofenol. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 μmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições experimentais utilizadas. A atividade foi expressa em U/mL (CHIOU; WU, 2004).

3.2.4 Produção dos ésteres metílicos

A produção dos ésteres metílicos ocorreu em erlenmeyers aletados de 250 mL (Figura 12), os quais foram acondicionados em uma incubadora com agitação orbital (Shaker), marca Tecnal, modelo TE-424 (Figura 13). Em todos os experimentos utilizou-se 100 g de óleo de polpa de macaúba bruto e uma velocidade constante de agitação orbital de 250 rpm.

As variáveis independentes avaliadas foram:

- Temperatura;
- Razão molar óleo:álcool*;
- Concentração do composto enzimático em relação à massa de óleo utilizada;
- Teor de água adicionada em relação à massa de óleo utilizada.

* A quantidade de álcool (metanol) necessária em cada um dos experimentos foi dividida e adicionada em 6 partes iguais, nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 h de reação, com a finalidade de não causar a inativação da enzima pelo excesso de álcool. Dessa forma, o mesmo já era consumido, em sua maior parte, na medida em que eram realizadas as adições ao meio reacional. Esse procedimento seguiu uma orientação do fabricante da enzima (NOVOZYMES, 2014).

Todos os experimentos realizados para produção dos ésteres metílicos, bem como a sequência dos mesmos, são apresentados a seguir.

3.2.4.1 Planejamento e ordem dos experimentos

A fim de determinar, entre as quatro variáveis analisadas, quais destas interferiam significativamente nos intervalos avaliados, inicialmente realizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) onde todos os parâmetros foram analisados ao mesmo tempo. Este DCCR era composto por 16 pontos fatoriais (níveis -1 e +1), 8 pontos axiais (níveis $-\alpha$ e $+\alpha$ que nesse caso representam os níveis -2 e +2) e 6 pontos centrais (nível 0), representando um total de 30 experimentos. O esquema desse planejamento inicial está representado na Tabela 4, onde também estão os valores reais utilizados em cada um dos níveis, para os parâmetros avaliados. Os intervalos utilizados para cada uma das variáveis analisadas foram determinados a partir de dados encontrados na literatura, onde tentou-se englobar as condições de maior conversão encontradas por autores que trabalharam com sistemas reacionais similares, além da análise dos resultados de alguns testes já feitos anteriormente pelo grupo de pesquisa. O tempo de duração destes experimentos foi de 8 h, também definido após análise dos resultados de alguns trabalhos encontrados na literatura em que se utilizava catálise enzimática para produção de ésteres metílicos a partir de diferentes matérias-primas, percebeu-se que com esse tempo já era possível atingir um valor próximo à máxima conversão e, dessa forma, poder avaliar quais variáveis eram significativas e se essa interferência era positiva ou negativa. A variável dependente foi o teor de ésteres no produto final.

Tabela 4 - Valores das variáveis independentes utilizadas no 1º DCCR.

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
Temperatura (°C)	35	40	45	50	55
Razão molar óleo:álcool	1:3	1:4,5	1:6	1:7,5	1:9
Conc. do comp. enzimático (% m/m)	0,05	0,25	0,45	0,65	0,85
Conc. de água (% m/m)	0	1	2	3	4

Como se trabalhou com um número alto de variáveis independentes, todas analisadas ao mesmo tempo em intervalos significativamente grandes e também devido ao fato de se utilizar um catalisador biológico, nesse primeiro planejamento se avaliou os resultados a um nível de significância de 90%, o qual já traz bastante relevância aos resultados, tendo-se em vista as condições empregadas.

Após a análise estatística dos resultados obtidos neste DCCR inicial, em relação ao teor de ésteres produzidos (variável dependente),

se determinou quais variáveis independentes interferiam significativamente nos resultados. Após isso, se padronizou aquelas variáveis que não causavam interferência no resultado, em um valor determinado após análise criteriosa dos resultados e das condições de processo utilizadas, e se realizou um novo DCCR, agora apenas com as variáveis que interferiram significativamente na variável dependente no 1º DCCR, nos intervalos avaliados. As variáveis independentes e as condições deste 2º DCCR estão expostas na seção Resultados e Discussão, pois as mesmas são parte da avaliação dos resultados obtidos no planejamento experimental realizado inicialmente.

No segundo Delineamento Composto Central Rotacional, agora com apenas as variáveis mais relevantes e interferentes no resultado final, e trabalhando mais próximo da condição de maior conversão, a avaliação dos resultados experimentais foi realizada com um nível de significância de 95%.

Em seguida, com o intuito de avaliar a reação no decorrer do tempo, realizaram-se cinéticas destrutivas de produção dos ésteres metílicos, com coleta e análise dos resultados em 0, 2, 4, 6, 8, 18, 24, 32, 40 e 48 h. Para a realização destas cinéticas, foram utilizadas as condições de maior produção de ésteres, a partir do segundo planejamento experimental realizado.

3.2.4.2 Purificação dos ésteres produzidos

Após o término das reações no Shaker, era realizada uma centrifugação do meio reacional, a qual tem a finalidade de separar os ésteres produzidos (biodiesel) do glicerol e do composto enzimático, além de outras substâncias que poderiam estar em solução, como resíduos de água e álcool, por exemplo. Esta separação era realizada em uma centrífuga de tubos marca Quimis, modelo Q222T, onde o meio reacional resultante dos experimentos era centrifugado a 10.000 rpm durante 15 min.

Após a centrifugação, o sobrenadante (fase rica em ésteres) era colocado em frascos âmbar específicos para essa finalidade e se realizou uma evaporação a fim de eliminar o álcool não reagido e a água residual que poderia ainda estar presente.

Utilizou-se uma estufa a vácuo marca Quimis, modelo Q819V2, a qual era acoplada à uma bomba a vácuo de mesma marca e modelo, na temperatura de 80 °C e pressão de 0,1 bar, até que as amostras atingissem massa constante.

3.2.5 Análise dos produtos gerados

3.2.5.1 Determinação do teor de ésteres

Para a quantificação do teor de ésteres metílicos no produto final, as amostras foram preparadas medindo-se 0,25 g das mesmas em um balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume deste com n-heptano. Após homogeneizado, transferiu-se uma alíquota de 50 μ L da solução para um balão volumétrico de 1 mL, onde também foi adicionado 50 μ L do padrão interno heptadecanoato de metila na concentração de 5 g/L e o volume foi novamente completado com n-heptano.

Em seguida, 1 μ L desta solução foi injetado em um cromatógrafo gasoso (CG), marca Shimadzu (modelo 2010), o qual possui injetor automático (Split) e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se uma coluna capilar Rtx-WAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) seguindo as condições cromatográficas descritas na Norma EN 14103:2003, do Comitê Europeu de Padronizações (*European Standard*).

Utilizou-se uma temperatura inicial na coluna de 120 °C durante 1 min, seguido de um aquecimento na taxa de 15 °C/min até atingir 180 °C, permanecendo então por 2 min nessa temperatura, em seguida realizou-se um novo aquecimento a uma taxa de 5 °C/min até 250 °C, permanecendo assim por mais 2 min. Ar sintético e nitrogênio foram utilizados como gás de araste e a temperatura do injetor e do detector foram de 250 °C, com uma taxa Split de 1:50. Possibilitando assim, a determinação do teor de ésteres metílicos produzidos nas reações, o cálculo utilizado está expressos na Equação 8 a seguir.

$$TE = \left(\frac{\sum A - A_{pi}}{A_{pi}} \cdot \frac{C_{pi}}{C_a} \right) \cdot 100$$

(Equação 8).

Onde:

TE = Teor de ésteres metílicos na amostra analisada (% m/m);

$\sum A$ = Somatório total das áreas correspondentes aos picos dos ésteres (C14 a C24) e do padrão interno (C8:0);

A_{pi} = Área do pico do padrão interno cilicilato de metila (C8:0);

C_{pi} = Concentração do padrão interno silicilato de metila na amostra injetada (mg/L);

C_a = Concentração da amostra diluída em n-heptano (mg/L).

3.2.5.2 Determinação do índice de acidez

A determinação do índice de acidez nos produtos gerados seguiu a mesma metodologia descrita no item 3.2.1.1, para a matéria-prima.

3.2.6 Avaliação dos resultados

3.2.6.1 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software STATISTICA[®] 7.0, seguindo os níveis de significância determinados em cada situação, conforme as condições utilizadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo apresenta os resultados encontrados durante a realização dos experimentos, bem como a discussão e contextualização dos mesmos. É apresentada, além de análises de caracterizações, tanto da matéria-prima utilizada como dos produtos finais das reações, um estudo detalhado sobre a influência dos parâmetros temperatura, concentração de catalisador, concentração de água e razão molar óleo:álcool, na produção de ésteres metílicos a partir de óleo de polpa de macaúba bruto (*Acrocomia aculeata*) via catálise enzimática. Destacando o fato de este trabalho ser realizado com uma formulação muito recente de enzima livre, a Novozymes[®] NS-40116, e dessa forma a mesma apresenta pouquíssimos dados referentes à sua utilização na literatura. Não foi encontrado nenhum trabalho em que este biocatalisador estivesse sendo aplicado na produção de biodiesel a partir de óleo de macaúba.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Antes de se realizar a caracterização da matéria-prima e sua utilização na produção dos ésteres metílicos, a mesma foi submetida a um pré-tratamento, constituído de uma filtragem e de centrifugação. Essa filtragem foi realizada com o objetivo de retirar alguns contaminantes sólidos que ainda estavam presentes no mesmo após seu recebimento, provavelmente resíduos da própria polpa e casca do fruto da macaúba, já que a extração do óleo é realizada através de prensagem. A Figura14 apresenta um exemplo dos resíduos retirados nesta etapa.

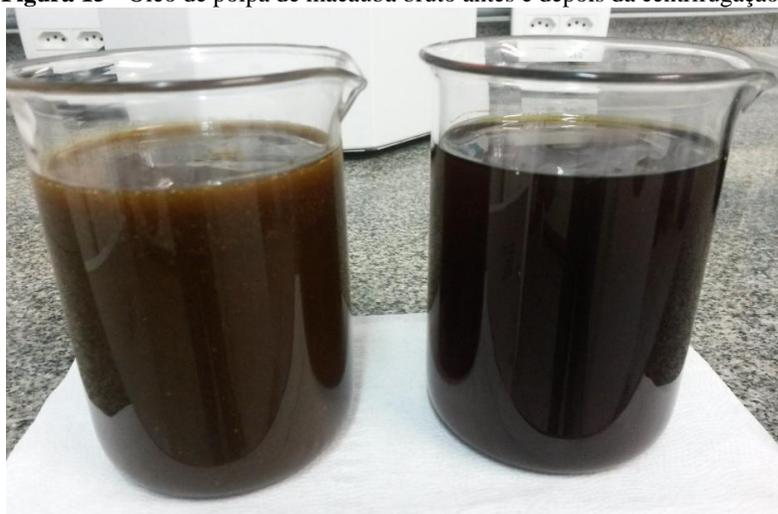
Figura 14 - Resíduos sólidos retirados do óleo de polpa de macaúba bruto.



Fonte: O Autor.

Após a filtragem inicial se percebeu que a matéria-prima apresentava ainda uma espécie de *borra*, formada através de resíduos da polpa que haviam ficado no óleo após sua extração. A fim de não comprometer a transferência de massa durante as reações de síntese dos ésteres metílicos e com o intuito de se trabalhar apenas com o óleo extraído da polpa de macaúba, foi realizada uma centrifugação do mesmo a 10.000 rpm durante 10 min. A Figura 15 representa o óleo antes e depois dessa centrifugação, onde é possível verificar visualmente uma melhora significativa em seu aspecto.

Figura 15 - Óleo de polpa de macaúba bruto antes e depois da centrifugação.



Fonte: O Autor.

4.1.1 Análises físico-químicas

A Tabela 5 apresenta os resultados das análises de caracterização físico-química realizadas para o óleo de polpa de macaúba bruto utilizado na produção dos ésteres metílicos. Todos os valores foram obtidos em triplicata e seguindo metodologias amplamente utilizadas. Os resultados estão próximos aos encontrados na literatura para este mesmo material. Também são apresentados os resultados encontrados por Amaral (2007) que realizou um estudo físico-químico detalhado do óleo de polpa de macaúba.

Tabela 5 - Resultados das análises físico-químicas do óleo de polpa de macaúba bruto utilizado na produção dos ésteres metílicos.

Parâmetros avaliados	Resultados	Amaral (2007)
Índice de acidez (mg KOH/g)	83,39 ± 0,42	59,9
Índice de peróxidos (meq/kg)	6,25 ± 0,3	27,28
Índice de saponificação (mg KOH/g)	195,88 ± 5,27	211,8
Índice de refração (a 25°C)	1,475 ± 0,005	1,462
Densidade (g/cm ³)	0,9027 ± 0,006	0,9193
Umidade (% m/m)	1,219 ± 0,042	0,886
Viscosidade (mPas)	57,7 ± 0,2	51,01

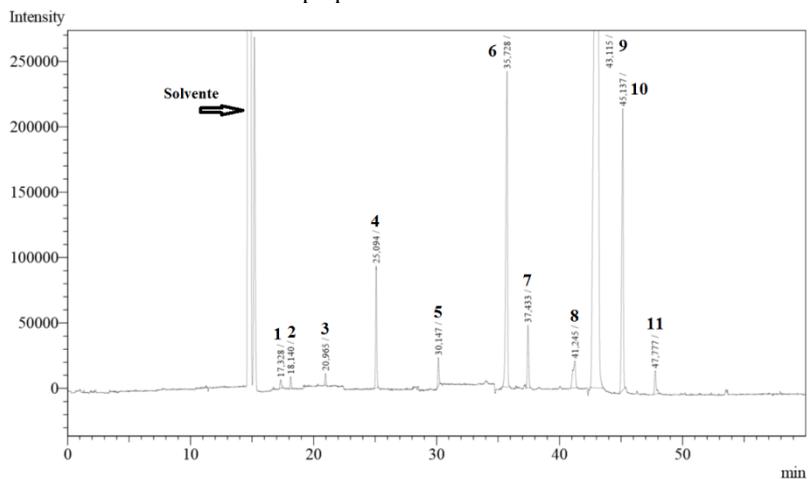
Os resultados da Tabela 5 demonstram que esse tipo de matéria-prima não se aplica diretamente nos processos convencionais de produção de biodiesel utilizados atualmente pelas indústrias, os quais são majoritariamente realizados com catalisadores químicos alcalinos. Algumas características como a elevada acidez e o teor de água presente provocariam a formação de outros produtos como os sais de ácidos graxos (sabão) ao invés dos ésteres de ácidos graxos (biodiesel) durante os processos químicos. Podendo-se concluir que a matéria-prima utilizada neste trabalho, apesar de possuir muitas vantagens agrônomicas e elevada produtividade, não tem aplicação direta nos processos convencionais de produção de biodiesel, a não ser que a mesma seja submetida a etapas preliminares, como desacidificação e secagem, o que ocasionaria um aumento considerável nos custos de produção.

4.1.2 Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos do óleo de polpa de macaúba foi obtido por cromatografia gasosa (CG), onde através de um cromatograma é possível identificar quais os constituintes do óleo, em termos de ácidos graxos, bem como o percentual de cada um.

A Figura 16 apresenta o cromatograma resultante onde, com uso de padrões conhecidos, foi possível identificar a qual ácido graxo cada um dos picos se refere. Nesta figura foram identificados, através de uma legenda numérica, todos estes picos e na Tabela 6 estão as informações a respeito dos mesmos como sua nomenclatura e o percentual que o mesmo ocupa na constituição do material analisado.

Figura 16 - Cromatograma representando o perfil de ácidos graxos presentes no óleo de polpa de macaúba utilizado.



Fonte: O Autor.

Tabela 6 - Composição dos ácidos graxos presentes no óleo de polpa de macaúba utilizado.

Identificação	Ácidos Graxos	Proporção (% molar)
1	Ácido Capróico (C6:0)	0,26
2	Ácido Caprílico (C8:0)	0,26
3	Ácido Cáprico (10:0)	0,25
4	Ácido Láurico (C12:0)	2,76
5	Ácido Mirístico (C14:0)	0,66
6	Ácido Palmítico (C16:0)	10,79
7	Ácido Palmítico (C16:1)	1,69
8	Ácido Esteárico (C18:0)	1,50
9	Ácido Oleico – ω9 (C18:1)	71,79
10	Ácido Linoleico – ω6 (C18:2)	9,28
11	Ácido Linolênico – ω3 (C18:3)	0,76

Observa-se na Tabela 6 que o ácido graxo predominante no óleo de polpa de macaúba é o ácido oleico, um ácido graxo insaturado, o mesmo representa mais de 70% da composição do óleo. Seguido pelos ácidos palmítico e linoleico, com aproximadamente 10% cada e pelo ácido láurico com quase 3% da composição, os demais constituintes estão presentes em quantidades muito pequenas.

4.1.3 Massa molar do óleo de polpa de macaúba

Após a determinação do perfil de ácidos graxos foi possível calcular a massa molar para o óleo de polpa de macaúba utilizado na produção dos ésteres metílicos. O valor calculado da massa molar (M) é de 863,93 g/mol, valor próximo aos encontrados por Gonzalez (2012) e Andrade (2006) que foram de 861,17 e 866 g/mol, respectivamente. Este dado é indispensável para a realização das reações de síntese dos ésteres metílicos, já que a adição de álcool é realizada de maneira estequiométrica em relação ao óleo.

4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA LIPASE LIVRE NS-40116

A atividade enzimática (hidrolítica) do composto enzimático líquido utilizado como catalisador biológico na produção dos ésteres metílicos, o qual é constituído basicamente pela enzima livre Novozymes[®] NS-40116, produzida e modificada a partir do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, foi determinada em triplicata e seu valor corresponde a $3,29 \pm 0,19$ U/mL.

4.3 PRODUÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS

Todos os experimentos realizados para produção dos ésteres metílicos ocorreram em erlenmeyers aletados de 250 mL, os quais foram mantidos fechados com uso de tampas, para evitar a evaporação do álcool durante a reação. Os mesmos eram agitados constantemente a 250 rpm, através de uma incubadora com agitação orbital (Shaker), a qual também era responsável por manter constante a temperatura, em cada uma das condições analisadas.

Após o término da reação, os frascos eram retirados do equipamento e seu conteúdo centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos para a separação das fases. A Figura 17 exemplifica como ficavam as soluções após centrifugação, é possível ver claramente a formação de 3 fases, sendo a superior a fase rica em ésteres metílicos (fase do biodiesel), a fase intermediária é rica no composto enzimático utilizado como catalisador e a fase inferior contém o glicerol, além da maior parte do álcool não reagido e da água residual ao final da reação.

Por se tratar de um catalisador enzimático, a purificação do glicerol produzido se faz com grande facilidade. Sendo que o mesmo também apresenta qualidade superior ao glicerol resultante dos processos químicos (RANGANATHAN et al., 2008; YU et al., 2015).

Figura 17 - Separação de fases após a centrifugação dos produtos gerados na reação de síntese enzimática dos ésteres metílicos.



Fonte: O Autor.

Após a centrifugação, a fase superior era coletada e submetida à estufa a vácuo na temperatura de 80 °C e pressão de 0,1 bar, até atingir massa constante, para a evaporação do álcool e da água residuais que ainda poderiam estar presentes na mesma. Em seguida eram realizadas as análises para determinação do teor de ésteres e índice de acidez.

4.3.1 Planejamento experimental inicial

4.3.1.1 Teor de ésteres

A produção dos ésteres metílicos a partir do óleo de polpa de macaúba ocorreu inicialmente através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), onde as quatro variáveis independentes foram avaliadas ao mesmo tempo, sendo elas: temperatura (35 a 55 °C), razão molar óleo:álcool (1:3 a 1:9 ou 1 a 3 equivalentes estequiométricos), concentração do composto enzimático (0,05 a 0,85% m/m em relação à massa de óleo utilizada) e teor de água adicionado (0 a 4% m/m em relação à massa de óleo adicionada), valores estes determinados a partir de alguns levantamentos realizados na literatura e de recomendações do fabricante da enzima.

Este DCCR era composto por 16 pontos fatoriais (níveis -1 e +1), 8 pontos axiais (níveis $-\alpha$ e $+\alpha$ que nesse caso representam os níveis -2 e +2) e 6 pontos centrais (nível 0), correspondendo a um total de 30 experimentos. A Tabela 7 apresenta todos os experimentos realizados nesse planejamento experimental inicial, bem como os valores reais e codificados (entre parênteses) de cada uma das variáveis independentes analisadas, além do resultado, variável dependente, para cada experimento, que corresponde ao teor de ésteres presentes no produto final.

Todas as reações deste planejamento experimental ocorreram com duração de 8 h e após a análise cromatográfica dos produtos gerados em cada uma delas, para determinação do teor de ésteres metílicos, se realizou a análise estatística dos resultados através do software STATISTICA[®] 7.0, a um nível de significância de 90%. Este parâmetro foi escolhido levando-se em consideração o número elevado de variáveis independentes e o fato de se trabalhar com um catalisador biológico.

Tabela 7 - Valores reais e codificados das variáveis independentes utilizadas no primeiro planejamento DCCR e o resultado final em relação ao teor de ésteres metílicos produzidos.

Temperatura*	Óleo:Álcool**	Enzima***	Água***	Teor Ésteres***
40 (-1)	1:4,5 (-1)	0,25 (-1)	1,0 (-1)	74,45
50 (+1)	1:4,5 (-1)	0,25 (-1)	1,0 (-1)	74,15
40 (-1)	1:7,5 (+1)	0,25 (-1)	1,0 (-1)	65,32
50 (+1)	1:7,5 (+1)	0,25 (-1)	1,0 (-1)	48,11
40 (-1)	1:4,5 (-1)	0,65 (+1)	1,0 (-1)	84,78
50 (+1)	1:4,5 (-1)	0,65 (+1)	1,0 (-1)	82,14
40 (-1)	1:7,5 (+1)	0,65 (+1)	1,0 (-1)	75,13
50 (+1)	1:7,5 (+1)	0,65 (+1)	1,0 (-1)	73,33
40 (-1)	1:4,5 (-1)	0,25 (-1)	3,0 (+1)	74,55
50 (+1)	1:4,5 (-1)	0,25 (-1)	3,0 (+1)	76,00
40 (-1)	1:7,5 (+1)	0,25 (-1)	3,0 (+1)	71,99
50 (+1)	1:7,5 (+1)	0,25 (-1)	3,0 (+1)	68,56
40 (-1)	1:4,5 (-1)	0,65 (+1)	3,0 (+1)	84,29
50 (+1)	1:4,5 (-1)	0,65 (+1)	3,0 (+1)	81,47
40 (-1)	1:7,5 (+1)	0,65 (+1)	3,0 (+1)	74,34
50 (+1)	1:7,5 (+1)	0,65 (+1)	3,0 (+1)	74,20
35 (-2)	1:6 (0)	0,45 (0)	2,0 (0)	75,76
55 (+2)	1:6 (0)	0,45 (0)	2,0 (0)	67,53
45 (0)	1:3 (-2)	0,45 (0)	2,0 (0)	72,42
45 (0)	1:9 (+2)	0,45 (0)	2,0 (0)	71,97
45 (0)	1:6 (0)	0,05 (-2)	2,0 (0)	44,27

(Cont.)

Temperatura*	Óleo:Álcool**	Enzima***	Água***	Teor Ésteres***
45 (0)	1:6 (0)	0,85 (+2)	2,0 (0)	70,56
45 (0)	1:6 (0)	0,45 (0)	0,0 (-2)	10,04
45 (0)	1:6 (0)	0,45 (0)	4,0 (+2)	79,54
45 (0)	1:6 (0)	0,45 (0)	2,0 (0)	74,88
45 (0)	1:6 (0)	0,45 (0)	2,0 (0)	77,62
45 (0)	1:6 (0)	0,45 (0)	2,0 (0)	79,33
45 (0)	1:6 (0)	0,45 (0)	2,0 (0)	74,08
45 (0)	1:6 (0)	0,45 (0)	2,0 (0)	76,16
45 (0)	1:6 (0)	0,45 (0)	2,0 (0)	76,03

* A temperatura é expressa em °C.

** Os valores se referem à razão molar entre óleo e álcool, 1:3 por exemplo, significa que foram utilizados 3 mols de metanol para cada mol de óleo. Como cada molécula de triacilglicerol que constitui o óleo é formada por três moléculas de ácido graxo, 1:3 se refere a 1 equivalente estequiométrico.

*** Estão expressos em percentual (% m/m), em relação à massa de óleo adicionada, a qual foi de 100 g em todos os experimentos. Com exceção do teor de ésteres, onde este percentual é em relação ao produto final da reação.

Pode-se observar que os valores referentes ao teor de ésteres produzidos variaram de uma condição para outra, sendo o maior valor atingido (84,78% m/m) na condição de 40 °C, razão molar óleo:álcool de 1:4,5 (1,5 eqv.), 0,65% m/m do composto enzimático e 1,0% m/m de água adicionada, o valor encontrado é bastante significativo para este tipo de matéria-prima. Michelin et al. (2015) empregaram óleo de polpa de macaúba bruto na produção de ésteres etílicos, utilizando a enzima Novozym 435 como catalisador, e atingiu um máximo de conversão de pouco mais de 70% de ésteres no produto final, mesmo trabalhando em sistema de ultrassom.

O valor de menor conversão, de apenas 10,04% m/m de ésteres no produto final, foi atingido na condição em que se trabalhou com ausência de água, demonstrando que ela é indispensável a esse tipo de reação. A água é responsável por realizar a hidrólise da molécula de triacilglicerol, liberando os ácidos graxos para serem esterificados com o álcool (hidroesterificação). Além disso, ela é necessária para hidratar a enzima livre, fazendo com que a mesma possa aproximar seu sítio ativo do substrato e promover, dessa forma, sua ação hidrolítica de catálise (HAMA; KONDO, 2013).

Segundo Gog et al. (2012), a água também desempenha várias funções durante a reação e exerce uma forte influência sobre a atividade catalítica e a estabilidade da lipase. A água tem importância inclusive na

ativação da própria enzima, que passa a trabalhar na interface água/óleo. A água aumenta essa região interfacial e, portanto, a área de ação da enzima, melhorando sua atividade. Porém, deve-se levar em consideração também que as lipases são hidrolases em ambientes aquosos, e um excesso de água além da quantidade necessária poderá estimular a reação de hidrólise concorrente causando a redução dos rendimentos de transesterificação (CHRISTOPHER et al., 2013).

Em geral, pode-se afirmar que os valores de teor de ésteres não variaram muito, com apenas alguns experimentos apresentando valores abaixo ou um pouco acima da faixa de 70 a 80%. Isso significa que o catalisador utilizado é bastante robusto e capaz de tolerar até mesmo grandes variações nas condições operacionais, apresentando bons resultados em praticamente todas as condições em que o mesmo foi empregado. Cesarini et al. (2013) também encontraram bons resultados para a produção de FAMES a partir de óleo de soja não degomado em praticamente todas as condições analisadas com resultados finais, após 24 h de reação, próximos a 90% de teor de ésteres, eles utilizaram como catalisador a enzima livre Callera Trans L, a qual apresenta características semelhantes à utilizada neste trabalho. Pedersen et al. (2014) também utilizaram a enzima Callera Trans L para a produção de ésteres etílicos a partir de óleo de canola, desenvolvendo diversas cinéticas de produção em condições variadas, porém as mesmas apresentaram comportamentos bastante similares. Sendo possível atingir quase 100% de ésteres no produto final, após 24 h de reação, entretanto utilizou-se óleo refinado enquanto o presente trabalho foi desenvolvido com um óleo bruto.

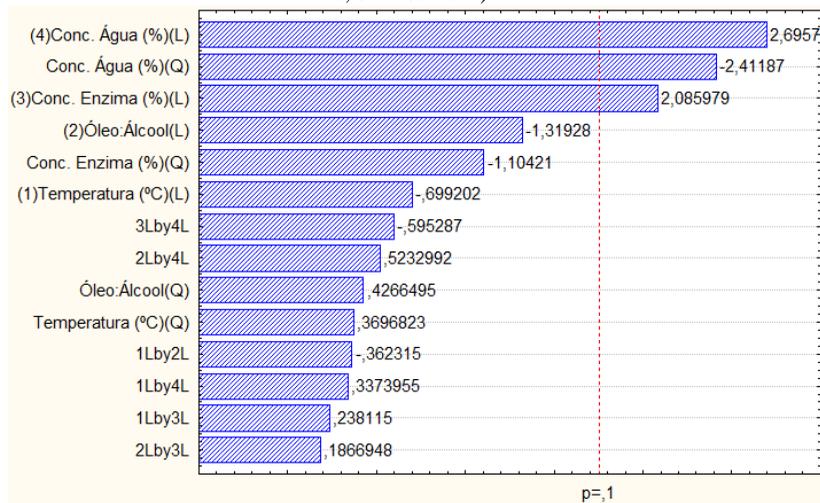
Numa análise prévia e visual dos resultados, é possível se observar que a variação na concentração do composto enzimático causa melhoras pontuais na conversão dos ácidos graxos, quando se mantém constante as outras variáveis. O que é explicado pelo fato de o mesmo ser o catalisador da reação, sendo mais facilmente utilizado quando estiver mais disponível no meio reacional e também, a princípio, não ter efeitos negativos quando empregado em quantidades mais elevadas, diferente de outras variáveis como a água e principalmente o álcool (ANTCZAK et al., 2009).

No caso da enzima, o principal limitante em relação a utilizar quantidades altas é o seu custo, já que em quantidades elevadas a mesma pode inviabilizar economicamente o processo. Porém, em pequenas quantidades torna o processo competitivo com os métodos convencionais de catálise química, levando-se em consideração o fato de que essas novas formulações de enzima livre apresentam um custo bem

menor do que as convencionais enzimas imobilizadas, já utilizadas a bastante tempo na produção de biodiesel. O próprio fato de não serem formulações imobilizadas em suportes contribui consideravelmente na redução de seu custo, pois o processo de imobilização em suportes é bastante caro e eleva seu custo final. Além disso, esse tipo de catalisador permite o emprego de matérias-primas de menor qualidade e, portanto, mais baratas (CESARINI et al., 2014; NOVOZYMES, 2014).

Realizou-se uma análise estatística, a 90% de confiança, com os valores referentes ao primeiro DCCR. Cujos resultados são apresentados a seguir.

Figura 18 - Diagrama de Pareto, a 90% de confiança, para a produção dos ésteres metílicos utilizando-se as variáveis temperatura (35, 40, 45, 50 e 55 °C), razão molar óleo:água (1:3, 1:4,5, 1:6, 1:7,5 e 1:9), concentração do composto enzimático (0,05; 0,25; 0,45; 0,65 e 0,85% m/m) e teor de água adicionada (0, 1, 2, 3 e 4% m/m).



Observa-se na Figura 18 que as únicas variáveis que influenciaram significativamente, a 90% de confiança, no teor de ésteres produzidos são a concentração de água e de enzima. Em relação à água, variável mais significativa, essa interferência está relacionada em grande parte ao fato de uma das condições ter sido realizada com ausência de água, onde o valor para o teor de ésteres nessa amostra variou muito em relação aos demais. Porém, esse resultado é importante pois demonstra a necessidade de se adicionar água obrigatoriamente ao meio reacional para que a produção de ésteres possa ocorrer. Skoronski et al. (2016)

analisaram a produção de biodiesel com metanol e também etanol a partir de resíduo de gordura suína, utilizando como catalisador as enzimas Lipozyme TL ILM, Lipozyme RM IM e Lipolase, em vários experimentos realizados não foi utilizado água na reação e em praticamente todos eles não houve produção de ésteres, já com pequenas quantidades de água a produção subiu consideravelmente, com 8% m/m de água foi possível atingir quase 99% de ésteres, em alguns casos.

Já em relação à concentração do composto enzimático, sua influência significativa se justifica por ele ser o catalisador da reação e, como seu excesso não causa grandes problemas no desenvolvimento da reação, pode-se concluir que a quantidade adicionada tem uma relação ampla com a produção de ésteres. Em baixas quantidades, o aumento no teor de enzima causa melhora na produção dos ésteres, pois um maior número de sítios ativos estará disponível para agir na interface óleo/álcool (WANG et al., 2015).

Ambas as variáveis que influenciaram significativamente na produção dos ésteres metílicos possuem efeito positivo, ou seja, quanto mais forem adicionados maior será a produção dos ésteres metílicos, na faixa de valores avaliada.

As Figuras 19 e 20 apresentam as superfícies de resposta em 2D e 3D, respectivamente, para as duas variáveis que influenciaram significativamente no teor de ésteres metílicos, nas condições apresentadas no primeiro planejamento experimental.

Figura 19 - Superfície de resposta em 2D para a produção de ésteres metílicos no 1º DCCR em função da adição do composto enzimático e da água.

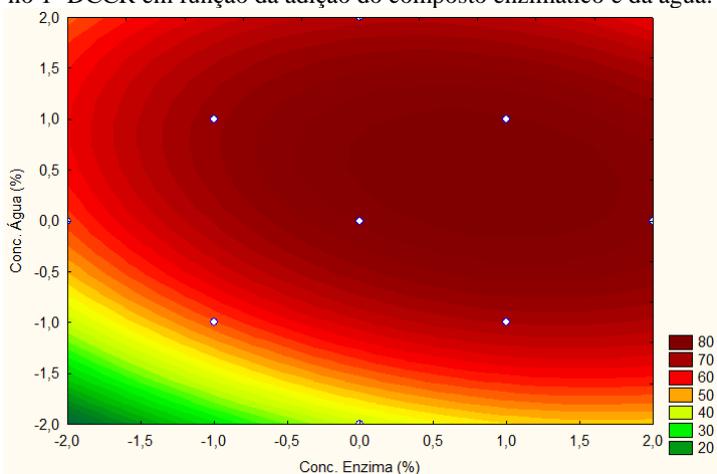
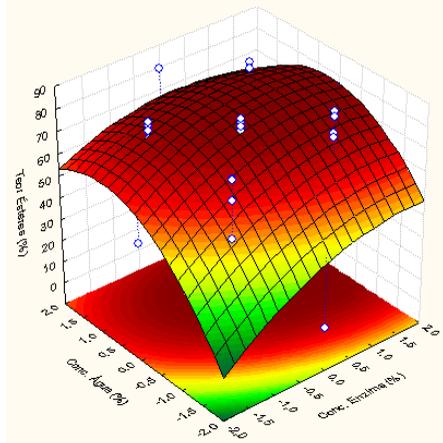


Figura 20 - Superfície de resposta em 3D para a produção de ésteres metílicos no 1º DCCR em função da adição do composto enzimático e da água.



Observa-se que, apesar de ambas as variáveis apresentarem efeito positivo, a região que apresenta a maior conversão está localizada próximo ao centro, levemente deslocada em direção às extremidades superiores de ambos os eixos, o que demonstra uma boa escolha na região em que se trabalhou o planejamento experimental, podendo afirmar dessa forma que a mesma contempla as condições que promovem a maior produção dos ésteres metílicos.

Em relação ao fato de a temperatura não ter apresentado influência significativa na produção de ésteres, pode-se afirmar que a enzima é bastante termoestável, não tendo sua ação afetada significativamente pelas variações de temperatura, o que é um fator bastante positivo para aplicações industriais, onde alterações no decorrer da reação podem ocorrer com maior facilidade. Porém, segundo Wang et al. (2015), deve-se tomar cuidado com valores extremos de temperatura, pois valores muito elevados podem causar inativação da enzima e valores demasiadamente baixos podem não dispersar completamente o substrato, deixando-o sólido ou semi sólido.

Segundo Price et al. (2016), a enzima NS-40116 utilizada neste estudo tem a grande vantagem de ser bastante termoestável. Eles estudaram alguns parâmetros técnicos para a ampliação de escala de um processo para produção de biodiesel a partir de óleo de cozinha usado, onde esta lipase é o catalisador utilizado. Sendo um dos poucos trabalhos existentes na literatura até o momento com aplicação desta enzima na produção de biodiesel.

Já a respeito do álcool, como o mesmo é consumido de maneira estequiométrica em relação ao óleo, o seu excesso vai apenas aumentar a sua participação no meio reacional, mas não necessariamente a produção de ésteres, já que não haverá ácidos graxos suficientes para reagirem com o álcool adicionado além da equivalência. Uma pequena quantidade além do equivalente estequiométrico é interessante, para deslocar o equilíbrio da reação e diminuir os impedimentos estéricos. Porém, quantidades muito grandes vão apenas gerar um excesso de álcool na solução, o qual não será consumido, esse excesso pode inclusive ser prejudicial causando inativação da enzima (ANTCZAK et al., 2009; DUARTE et al., 2015).

4.3.1.2 Índice de acidez

Realizou-se também a análise do índice de acidez de todos os produtos finais gerados no primeiro planejamento experimental. A seguir, na Tabela 8, estes valores são apresentados ao lado do teor de ésteres obtidos em cada um dos experimentos, a nível de comparação.

Tabela 8 - Relação entre o teor de ésteres e o índice de acidez do biodiesel produzido no primeiro planejamento experimental.

Teor de ésteres (% m/m)	Índice de acidez (mg KOH/g)	Teor de ésteres (% m/m)	Índice de acidez (mg KOH/g)
74,45	6,58	74,20	7,18
74,15	8,68	75,76	4,01
65,32	8,99	67,53	10,48
48,11	35,86	72,42	13,70
84,78	6,13	71,97	8,30
82,14	5,55	44,27	51,81
75,13	5,64	70,56	5,72
73,33	8,01	10,04	71,17
74,55	7,07	79,54	6,41
76,00	7,95	74,88	7,16
71,99	6,88	77,62	6,57
68,56	14,27	79,33	6,51
84,29	6,93	74,08	6,68
81,47	6,62	76,16	6,50
74,34	4,70	76,03	6,71

Ao analisar a tabela acima é possível concluir que há uma relação direta entre a produção de ésteres metílicos com a diminuição do índice de acidez, que na matéria-prima era de 83,39 mg KOH/g, ou seja,

é possível concluir que durante a transesterificação dos triacilgliceróis ocorre também a esterificação dos ácidos graxos livres, o que é um ponto muito positivo, já que isso não é possível nos métodos convencionais com catálise básica, onde os AGL são convertidos a sais de ácidos graxos (sabão) ao invés de ésteres de ácidos graxos (biodiesel) (ANTCZAK et al., 2009; GOG et al., 2012). Observa-se também que, mesmo nas condições onde houve pouca produção de ésteres metílicos, a redução no valor do índice de acidez foi significativa se comparado com o valor inicial da matéria-prima. Demonstrando que a esterificação dos AGL presentes na matéria-prima inicial ocorre com bastante facilidade.

Kleiner et al. (2015) estudaram a produção de biodiesel através de óleos ácidos residuais em duas etapas utilizando as formulações líquidas de enzima livre Callera Trans L e Lipozyme TL 100L. Observou-se uma grande diminuição no teor de AGL em solução à medida que os ésteres etílicos estavam sendo gerados com relação direta entre as taxas de produção de ésteres e o consumo de AGL em cada fase das cinéticas desenvolvidas durante os experimentos.

Com base nesses comparativos, pode-se verificar também que a análise do índice de acidez durante o processo de produção dos ésteres metílicos se apresenta como um método de controle do processo, tendo em vista que traz também uma boa aproximação em relação ao estágio em que se encontra a reação para o teor de ésteres, o qual exige uma metodologia bem mais complexa para quantificação através de cromatografia gasosa, mais difícil de ser realizada na planta industrial a qualquer momento se comparado com a análise de acidez, a qual utiliza uma metodologia rápida e de fácil aplicação.

4.3.2 Segundo planejamento experimental

Após a análise do primeiro planejamento experimental, a 90% de confiança, se decidiu realizar um segundo DCCR apenas com as variáveis que influenciaram significativamente os valores referentes ao teor de ésteres, porém este segundo planejamento foi realizado com o intuito de analisá-lo a 95% de confiança, já que o número de variáveis agora foi reduzido à metade e se tem mais certeza de que a região escolhida contempla as condições que proporcionam maior produção dos ésteres metílicos.

A temperatura e a razão molar óleo:álcool, as quais não influenciaram significativamente o resultado final, no primeiro DCCR,

foram mantidas constantes durante a realização do segundo planejamento.

Em relação à temperatura, como a mesma não apresentou influencia significativa, poderia optar-se por utilizar o menor valor no intervalo analisado no primeiro planejamento, já que isso significaria menor consumo energético. Porém, pensando em uma aplicação industrial, optou-se por não utilizar o menor valor (35 °C), já que nessa temperatura pode ocorrer facilmente um “congelamento” do óleo devido às suas características, dificultando bastante as etapas de bombeamento e agitação, comprometendo assim a transferência de massa e o contato entre o sítio ativo da enzima e o substrato. Dessa forma, o segundo planejamento foi realizado a 45 °C, que também é uma temperatura relativamente baixa para aplicação industrial, e coincide com a recomendação feita pelo fabricante da enzima para a utilização desta formulação de lipase livre (NOVOZYMES, 2014; PRICE et al., 2016).

Wang et al. (2015) afirmaram que os óleos menos nobres e mais insaturados, como é o caso do óleo utilizado neste estudo, não são totalmente dissolvidos quando se trabalha em temperaturas baixas (abaixo de 40 °C), ficando semi sólidos, o que dificulta a agitação e transferência de massa da reação.

Yadav e Trivedi (2003) afirmaram que, no processo de síntese enzimática, especialmente em sistemas livres de solventes, a transferência de massa entre a fase aquosa e não aquosa é muito importante, já que a lipase atua justamente na interface das duas fases. Ou seja, para promover uma transferência de massa eficiente, a agitação do meio reacional não pode ser comprometida, o que aconteceria, por exemplo, se o substrato utilizado não estivesse completamente em sua fase líquida.

A razão molar óleo:álcool também não apresentou influencia significativa no intervalo utilizado no primeiro planejamento, dessa forma poderia optar-se também pelo menor valor promovendo um consumo reduzido de álcool. Porém, como o menor valor utilizado foi de 1:3, que significa 1 equivalente estequiométrico, estaria se trabalhando exatamente com a quantidade mínima de álcool necessária para ocorrer a (trans)esterificação de todo o óleo, e como se trabalha com uma reação reversível, decidiu-se utilizar um pouco mais de álcool para promover o deslocamento do equilíbrio da reação, além de diminuir os impedimentos estéricos, que poderiam ocorrer e dificultar o contato entre o álcool e o ácido graxo. Optou-se, dessa forma, por utilizar uma razão molar óleo:álcool de 1:4,5 (1,5 equivalentes) durante o segundo planejamento experimental.

Para determinar quais seriam os valores (regiões) das variáveis independentes utilizadas no segundo planejamento experimental, fixou-se no ponto central do mesmo (nível 0), as coordenadas referentes ao ponto crítico (pico de produção) do primeiro planejamento, que foram de 0,65% m/m do composto enzimático e 2,7% m/m de água adicionada. A partir daí foram distribuídos os demais níveis, sendo que para a concentração do composto enzimático os valores variaram entre 0,225 e 1,75% m/m e para o teor de água adicionada os valores variaram entre 1,29 e 4,11% m/m, ambos em relação à massa total de óleo adicionada em cada um dos experimentos, que foi de 100 g.

O segundo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), também com duração de 8 h, era composto por 4 pontos fatoriais (níveis -1 e +1), 4 pontos axiais (níveis $-a$ e $+a$ que nesse caso representam os níveis -1,41 e +1,41) e 3 pontos centrais (nível 0), correspondendo a um total de 11 experimentos. A Tabela 9 apresenta todos os experimentos realizados nesse planejamento experimental, bem como os valores reais e codificados (entre parênteses) de cada uma das variáveis independentes analisadas, além do resultado (variável dependente) para cada experimento, que corresponde ao teor de ésteres presentes no produto final. A tabela também apresenta o índice de acidez, determinado no produto final de cada uma das condições reacionais.

Tabela 9 - Valores reais e codificados das variáveis independentes utilizadas no segundo planejamento DCCR e o resultado final em relação ao teor de ésteres metílicos produzidos e ao índice de acidez no produto final.

Conc. Enzima (% m/m)	Conc. Água (% m/m)	Teor de Ésteres (% m/m)	Índice de Acidez (mg KOH/g)
0,35 (-1)	1,7 (-1)	70,72	7,13
0,95 (+1)	1,7 (-1)	76,83	7,02
0,35 (-1)	3,7 (+1)	70,50	8,22
0,95 (+1)	3,7 (+1)	71,02	7,62
0,225 (-1,41)	2,7 (0)	68,17	7,32
1,075 (+1,41)	2,7 (0)	77,90	7,58
0,65 (0)	1,29 (-1,41)	72,52	7,09
0,65 (0)	4,11 (+1,41)	74,90	6,88
0,65 (0)	2,7 (0)	74,38	7,63
0,65 (0)	2,7 (0)	74,66	7,01
0,65 (0)	2,7 (0)	72,09	7,35

A partir de uma análise prévia e puramente visual dos resultados encontrados é possível verificar que os mesmos apresentam

elevada similaridade, mesmo em condições bastante distintas, sendo que todos têm bons resultados, apesar de nenhum ter atingido o valor máximo de produção de ésteres encontrado no primeiro planejamento, que ficou um pouco acima. Esse fato, de certa forma inesperado se levamos em consideração que o segundo planejamento experimental está mais próximo das condições de melhor conversão, se justifica por aquela condição com melhor produção estar numa região muito similar à utilizada no segundo DCCR.

Os valores de índice de acidez também estão muito próximos entre si. Essa similaridade, tanto no teor de ésteres como no índice de acidez, é uma característica positiva quando se avalia o potencial para ampliação de escala, principalmente a nível industrial, já que proporciona maior robustez ao método, tolerando com facilidade as variações eventuais que possam ocorrer no dia-a-dia da usina.

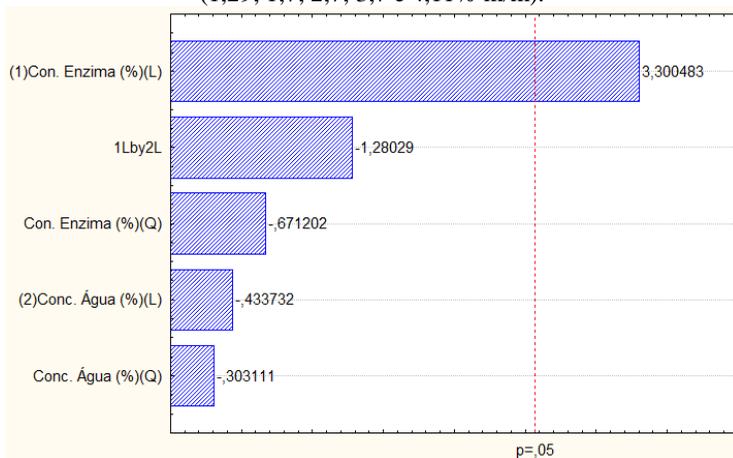
Os únicos valores que destoam um pouco dos demais são os obtidos quando se trabalha com os pontos axiais para a concentração de enzima, sendo que a menor produção de ésteres foi registrada com a menor concentração do catalisador e a maior conversão na condição em que o catalisador foi utilizado em maior quantidade, mantendo-se a outra variável no ponto central, fato este que se explica pois a enzima é o catalisador da reação e portanto interfere diretamente na velocidade e eficiência da mesma. Porém, essa variação não é tão significativa se considerarmos a grande diferença entre as quantidades de catalisador utilizadas em ambas as condições. O que é positivo se analisado em termos da viabilidade econômica do processo, já que a enzima representa a parte mais onerosa do processo quando se faz necessário a utilização de uma quantidade elevada. Com base nos dados apresentados, é possível atingir altos valores de produção de ésteres mesmo com pequenas quantidades do catalisador, demonstrando sua eficiência para este tipo de matéria-prima e um bom indício de que o processo tem condições de competir economicamente com as rotas convencionais de produção (CHISTIPHER et al., 2014; HWANG et al., 2014; PRICE et al., 2016).

Silva (2014) avaliou a produção de ésteres etílicos a partir de gordura suína, utilizando a enzima comercial Lipozyme TL IM como catalisador e n-hexano como solvente, mantendo-se constante a temperatura em 45 °C, concentração de água em 5% m/m e razão molar óleo:álcool de 1:6, variou-se a concentração do catalisador em duas cinéticas, sendo 10 e 15% m/m. Observou-se, após 24 h, que com 10% de enzima o teor de ésteres produzidos foi de apenas 25,26% no produto

final, enquanto na condição de 15% de catalisador, esse resultado saltou para 92,84%.

Uma análise estatística deste DCCR foi realizada através do software STATISTICA® 7.0, a um nível de significância de 95%, a qual é apresentada a seguir.

Figura 21 - Diagrama de Pareto, a 95% de confiança, para a produção dos ésteres metílicos utilizando-se as variáveis concentração do composto enzimático (0,225; 0,35; 0,65; 0,95 e 1,075% m/m) e teor de água adicionada (1,29; 1,7; 2,7; 3,7 e 4,11% m/m).



Na Figura 21 é possível observar que a única variável que apresentou diferença significativa, a 95% de confiança, foi a concentração do composto enzimático, com efeito positivo, demonstrando que quanto mais catalisador for adicionado à reação, no intervalo analisado, maior será a produção dos ésteres, confirmando a avaliação visual realizada dos resultados.

A concentração de água adicionada não influenciou significativamente na produção de ésteres no intervalo analisado.

Superfícies de resposta em 2D e 3D foram produzidas para este planejamento experimental, as quais estão representadas nas Figuras 22 e 23 a seguir.

Figura 22 - Superfície de resposta em 2D para a produção de ésteres metílicos no 2º DCCR em função da adição do composto enzimático e da água.

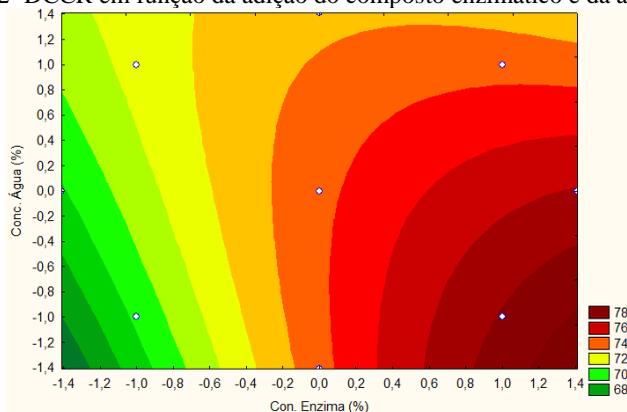
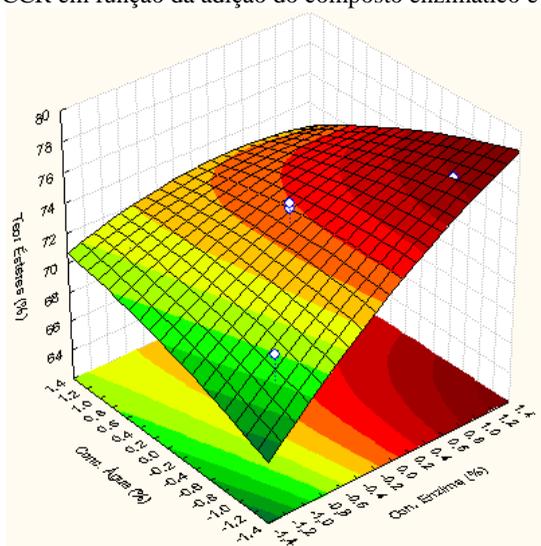


Figura 23 - Superfície de resposta em 3D para a produção de ésteres metílicos no 2º DCCR em função da adição do composto enzimático e da água.



Observa-se nas superfícies de resposta acima que o aumento da concentração de enzima influencia positivamente na produção dos ésteres metílicos. Porém, já em relação ao teor de água, os melhores valores ocorreram quando a quantidade de água foi menor, o que também confirma o efeito negativo apresentado por essa variável no diagrama de Pareto. Gog et al. (2012) e Christopher et al. (2013)

alertaram para o fato de que, apesar da água ser indispensável para a síntese enzimática de biodiesel, seu excesso pode trazer sérios danos à reação. Como as lipases são enzimas hidrolases em ambientes aquosos, grandes quantidades de água podem estimular sua ação hidrolítica para estruturas não desejáveis, aumentando sua flexibilidade e fazendo com que as mesmas atuem em estruturas secundárias e terciárias (WHITELEY; LEE, 2013).

4.3.3 Cinéticas de produção dos ésteres metílicos

Após as análises dos resultados obtidos no segundo planejamento experimental, cinéticas de produção de ésteres metílicos nas melhores condições encontradas foram realizadas, com o intuito de avaliar também o comportamento da reação no decorrer da mesma, e não apenas seu resultado final.

Desenvolveram-se cinéticas destrutivas, onde para cada um dos pontos analisados foram realizadas reações em frascos diferentes. Os tempos avaliados foram 0, 2, 4, 6, 8, 16, 24, 32, 40 e 48 h, na tentativa de atingir o máximo valor de conversão dos ésteres em cada uma das cinéticas realizadas.

Em relação às variáveis utilizadas, manteve-se constante novamente a temperatura em 45°C e a razão molar óleo:álcool em 1:4,5 (1,5 equivalentes estequiométricos). Já em relação à água, variável que não apresentou influência significativa a 95% de confiança no segundo planejamento experimental, no intervalo analisado, optou-se por utilizar o menor valor do intervalo (1,3% m/m em relação ao óleo) para promover uma reação em que não houvesse consumo elevado de água além da quantidade necessária e também seguindo o efeito negativo que essa variável apresentou durante a análise estatística dos resultados.

Portanto, a única variável restante foi a concentração do composto enzimático (catalisador), a qual apresentou influência significativa, a 95% de confiança, na análise do segundo DCCR.

Como a variável apresentou efeito positivo na análise estatística, além de ser possível verificar visualmente que a maior produção ocorre quando se utiliza quantidades elevadas de catalisador, uma das cinéticas a serem realizadas foi utilizando uma concentração do composto enzimático de 1% m/m em relação ao óleo, valor este próximo ao limite superior do intervalo analisado. Cesarini et al. (2013) utilizaram também uma concentração de 1% m/m da enzima livre Callera Trans L (líquida) para a produção de FAMES a partir de óleo de soja não degomado, obtendo ótimos resultados.

Porém, como verificou-se que, mesmo sendo a única variável que influenciou significativamente o segundo planejamento experimental, foi possível atingir também bons resultados quando se utiliza uma concentração baixa do composto enzimático, realizou-se também a cinética com uma quantidade pequena de catalisador, a fim de comparação do comportamento destas reações no decorrer do tempo.

Nesta segunda cinética foi utilizada uma concentração de catalisador de apenas 0,25% m/m em relação ao óleo, valor quatro vezes menor que o utilizado na primeira cinética e próximo ao menor valor utilizado no planejamento experimental. Esta condição foi empregada para avaliar também a reação num nível que permita a competitividade do processo, em termos de custos, com os métodos convencionais de catálise química e não apenas analisá-la em relação à maior produtividade de ésteres.

Price et al. (2016) estudaram a ampliação de escala para nível industrial da produção de FAMEs a partir de óleo ácido residual, empregando a mesma enzima NS-40116 como catalisador. Os autores avaliaram o uso de apenas 0,067 a 0,2% m/m do composto enzimático, em relação à massa de óleo, para os testes feitos em reatores de 80 L e de 4 m³ (plantas pilotos em batelada). Já nos reatores em escala industrial de 40 m³, foi utilizado 0,67% m/m no reator em batelada e 0,1% m/m no reator contínuo. Estes pesquisadores justificam que caso seja possível produzir grandes quantidades de éster nessas condições, empregando óleos com acidez elevada, o processo se torna competitivo economicamente com as rotas químicas. Nesses testes, a quantidade de água adicionada variou entre 1 e 2% m/m em relação à massa de óleo.

A Tabela 10 apresenta os resultados das análises de teor de ésteres e índice de acidez, realizadas ao final das reações, para cada um dos tempos analisados, em ambas as cinéticas. O tempo inicial (0 hora) representa os valores referentes à matéria-prima utilizada e os demais são referentes aos produtos finais das reações.

Tabela 10 - Teor de ésteres e índice de acidez das cinéticas realizadas com 0,25 e 1% m/m do composto enzimático, em relação à massa de óleo. Mantendo-se constante a temperatura em 45 °C, razão molar óleo:álcool em 1:4,5 (1,5 eqv.) e teor de água em 1,3% m/m.

Tempo (h)	0,25% de Enzima		1% de Enzima	
	Teor Ésteres (% m/m)	Ind. Acidez (mg KOH/g)	Teor Ésteres (% m/m)	Ind. Acidez (mg KOH/g)
0	0,00	83,39	0,00	83,39
2	33,17	47,26	37,35	45,33
4	57,16	20,66	60,07	18,03
6	62,04	11,00	65,71	9,58
8	66,04	8,56	70,24	7,45
16	69,62	7,85	72,35	6,73
24	71,83	7,13	73,46	6,45
32	72,36	6,83	73,48	6,29
40	72,15	6,32	73,03	6,13
48	71,76	6,13	73,15	6,10

Os valores expressos na tabela acima são representados graficamente nas Figuras 24 e 25 a seguir, as quais apresentam comparações entre o teor de ésteres e o índice acidez, respectivamente, analisados no decorrer das cinéticas.

Navarro-Díaz et al. (2014) realizaram um estudo teórico e analítico das características do óleo de polpa de macaúba e concluíram que o potencial dessa matéria-prima para produção de biodiesel metílico é de cerca de 80 a 90% m/m de FAMES no produto final, dependendo das condições do material utilizado. Portanto, as cinéticas realizadas nesse trabalho atingiram um valor próximo ao potencial teórico de obtenção de ésteres metílicos para esse substrato.

Figura 24 - Comparação entre as cinéticas realizadas com 0,25 e 1% do composto enzimático em relação ao teor de ésteres metílicos produzidos. As demais variáveis foram temperatura de 45 °C, razão molar óleo:álcool de 1:4,5 (1,5 eqv.) e teor de água de 1,3% m/m.

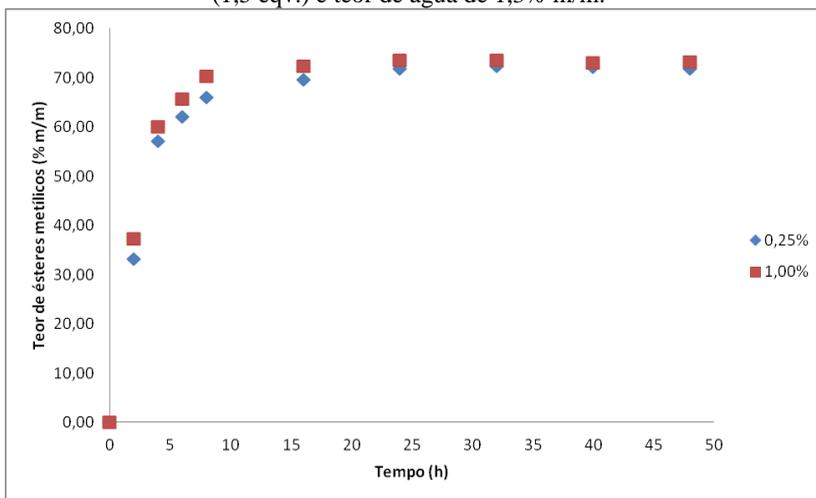
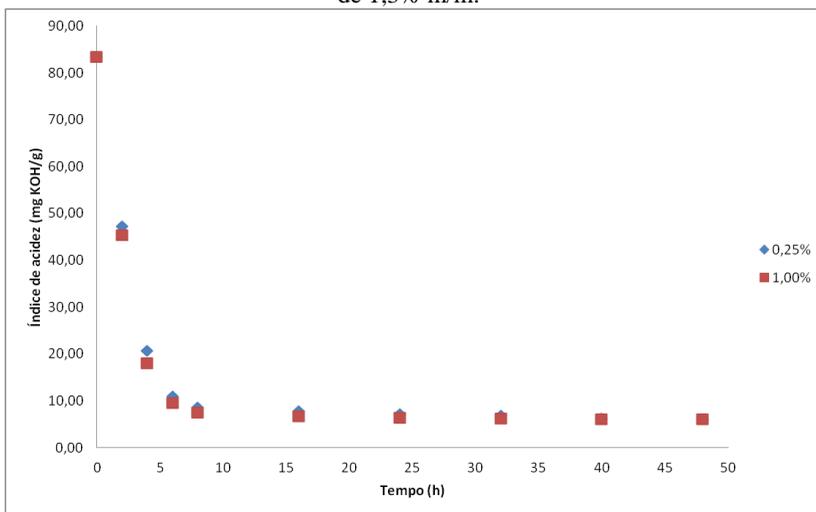


Figura 25 - Comparação entre as cinéticas realizadas com 0,25 e 1% do composto enzimático em relação ao índice de acidez. As demais variáveis foram temperatura de 45 °C, razão molar óleo:álcool de 1:4,5 (1,5 eqv.) e teor de água de 1,3% m/m.



Após a análise desses resultados pode-se afirmar que, mesmo com quantidades de catalisador bastante distintas, o comportamento de ambas as cinéticas foi bastante similar, tanto em relação ao aumento do teor de ésteres como em relação à diminuição do índice de acidez, as variações foram mais acentuadas para a reação que possuía mais catalisador apenas no início das cinéticas e após algumas horas de reação os valores tendiam a uma maior aproximação, ou seja, o efeito da maior quantidade de catalisador se dá apenas nas primeiras horas de reação, onde a maior quantidade do mesmo promove um aumento da velocidade inicial de conversão de ésteres.

Wang et al. (2015) trabalharam com produção de biodiesel a partir de óleo de cozinha usado e como álcool utilizou-se um resíduo da produção de etanol aplicando a lipase imobilizada de *Candida* sp. como catalisador. O autor observou que o rendimento de ésteres aumentou quando a dosagem de lipase foi aumentada até um certo valor, porém, a partir deste o rendimento estabilizou sem haver melhora na produção dos ésteres mesmo com mais catalisador. Isso se justifica pois, como a enzima lipase atua na interface entre a fase aquosa e a oleosa, mais lipase proporciona que mais sítios ativos sejam empregados no sistema reacional, o que explica o aumento inicial quando a quantidade de enzima ainda é baixa. No entanto, a partir de um determinado ponto, a própria interface óleo/água se torna limitada, de modo que o aumento adicional de enzima não vai melhorar a produtividade de ésteres, já que a mesma não terá espaço disponível para desenvolver sua ação catalítica (TAN et al., 2010).

Levando-se em consideração que o custo da enzima é significativamente mais elevado do que o gasto energético do processo, para uma aplicação industrial é mais interessante diminuir a quantidade de catalisador adicionada e manter a reação por um tempo um pouco maior do que quando se utiliza maior quantidade de enzima, atingindo uma mesma produtividade de ésteres a um custo reduzido (NOVOZYMES, 2014).

Observa-se que a produção de ésteres metílicos ocorre com bastante rapidez já no início da reação, sendo que, em ambas as cinéticas avaliadas, nas primeiras horas já se produz a maior parte do total de ésteres presentes no produto final após 48 h. Um tempo de até 16 h, por exemplo, já é suficiente para a obtenção da maior parte dos ésteres possíveis de serem produzidos nessas condições, possibilitando assim a redução no tempo do processo e diminuindo consideravelmente o gasto energético do mesmo. O mesmo comportamento foi encontrado por Cesarini et al. (2013) que avaliaram a produção de FAMES a partir de

óleo de soja não degomado. Os autores encontraram uma elevação significativa no teor de ésteres metílicos até aproximadamente a sétima hora (cerca de 85% m/m), a partir daí o aumento no teor de ésteres foi muito pequeno em relação ao tempo, sendo que ao final da reação (24 h), o valor era apenas 10% maior.

Assim como no teor de ésteres, as variações na redução do índice de acidez foram bastante significativas já nas primeiras horas de reação, significando que esse processo possibilita uma eficiente e rápida esterificação dos AGL presentes na matéria-prima. Fato este que influenciou, em parte, nos elevados índices de produção dos ésteres metílicos nesse mesmo período. Assim como no teor de ésteres, os valores de índice de acidez se estabilizaram após as primeiras horas de reação, demonstrando que uma parte dos AGL não pode ser esterificada, mesmo com a ação eficiente dessa enzima, e acabam permanecendo no produto final. Price et al. (2016), que trabalharam com esta mesma enzima utilizando como substrato óleo ácido residual com mais de 60% de AGL, também avaliaram uma diminuição drástica da acidez já nas primeiras horas, sendo que na quinta hora esse valor já estava abaixo de 10%, o qual se manteve praticamente constante até o final da cinética avaliada, que foi de 24 h.

Observa-se um grande potencial na utilização dessas formulações recentes de enzima livre na produção de biodiesel, incluindo ampliações de escala para níveis industriais, principalmente devido à sua competitividade econômica frente aos processos químicos. Autores como Chistipher et al. (2014), Hwang et al. (2014) e Price et al. (2016), afirmam que pela primeira vez se conseguiu produzir catalisadores enzimáticos com potencial para competir com os catalisadores químicos convencionais em termos de custo de produção. Somado a isso, se tem a vantagem de poder utilizar óleos menos nobres, com elevada acidez e teor de água, por exemplo, e consequentemente mais baratos do que os óleos de boa qualidade utilizados atualmente na maioria das indústrias de biodiesel.

Em relação à matéria-prima utilizada como substrato neste estudo, alguns trabalhos foram encontrados na literatura em que ela já havia sido empregada na produção de biodiesel com bons resultados, porém em muitos desses casos se utilizavam processos em que a demanda energética ou tecnológica era muito alta para processos em larga escala, como por exemplo, o uso de condições supercríticas ou emprego de ultrassom durante o processo de produção. Nas situações em que se utilizou catálise enzimática eram utilizadas formulações que possuem um custo elevado, inviabilizando aplicações industriais.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

Após a realização deste trabalho foi possível chegar a algumas conclusões em relação à produção enzimática de ésteres metílicos a partir de óleo de polpa de macaúba bruto utilizando a enzima livre Novozymes[®] NS-40116.

Primeiramente, em relação às características dessa matéria-prima observou-se que a mesma apresenta algumas condições como elevada acidez e teor de água que inviabilizariam seu processamento através dos métodos convencionais de produção de biodiesel com catálise química.

O perfil de ácidos graxos do óleo de polpa de macaúba mostrou que o mesmo é constituído em sua maior parte pelo ácido oleico, o qual representa mais de 70% da composição total no óleo analisado, além disso, os ácidos palmítico, linoleico e láurico também estão presentes em quantidades significativas. Já os demais constituintes da matéria-prima, em termos de ácidos graxos, estão presentes em pequenas quantidades.

Após a realização das reações é possível separar facilmente a composição final das mesmas através de centrifugação onde, em três fases distintas, pode-se isolar o biodiesel produzido do catalisador e do glicerol gerado na reação.

Como se utiliza um catalisador enzimático, a recuperação do glicerol produzido ocorre com maior facilidade do que aquele obtido nos processos de catálise química, além disso, sua qualidade é bastante superior. A produção de resíduos e efluentes químicos ou de difícil tratamento também é reduzida significativamente nos processos enzimáticos.

Em relação à produção dos ésteres metílicos se observou, no primeiro planejamento experimental, que o método empregado apresenta robustez e é capaz de tolerar até mesmo grandes variações nos parâmetros da reação, já que o mesmo apresentou valores altos de produção de ésteres metílicos em praticamente todas as condições analisadas no planejamento.

Observou-se que a adição de água é indispensável nesse tipo de reação, sendo que a menor produção de ésteres (apenas 10% no produto final) resultou de quando a reação ocorreu na ausência de água. A água além de ser necessária na hidrólise da estrutura do triacilglicerol, promove a hidratação da enzima, para que o sítio ativo da mesma

encontre o substrato. Conclui-se que o processo predominante na produção dos ésteres metílicos é a hidroesterificação (hidrólise + esterificação).

A concentração de enzima influenciou pontualmente na produção de biodiesel no primeiro planejamento quando se mantiveram constantes as demais variáveis. Neste planejamento experimental, o maior valor para o teor de ésteres (quase 85% da composição final) se obteve a uma temperatura de 40 °C, razão molar óleo:álcool de 1:4,5 (1,5 equivalentes estequiométricos), concentração de enzima de 0,65% em relação à massa de óleo e teor de água de 1%, também em relação à massa de óleo.

No primeiro planejamento a análise estatística realizada, a 90% de confiança, concluiu que as variáveis: teor de água adicionada e concentração de enzima foram as únicas que influenciaram significativamente na produção dos ésteres metílicos. Enquanto a temperatura e a razão molar óleo:álcool não apresentaram influência significativa no intervalo avaliado.

Já no segundo planejamento, realizado com apenas as duas variáveis independentes que apresentaram diferença significativa na análise do primeiro DCCR, houve pouca variação nos resultados apresentados em todos os experimentos, sendo que apenas a concentração de enzima teve influência significativa na produção de ésteres, a 95% de confiança, no intervalo analisado. Foi exatamente nos pontos axiais dessa variável que se apresentaram as maiores variações em relação aos demais resultados. Sendo que o maior teor de ésteres no produto final (77,9%) e o menor valor (68,17%) foram atingidos quando se trabalhou com a maior e menor quantidade de catalisador (1,075 e 0,225% m/m), respectivamente. Nesses dois casos, os demais parâmetros foram temperatura de 45 °C, razão molar óleo:álcool de 1:4,5 e teor de água de 2,7% em relação à massa de óleo.

Em relação às cinéticas de produção de ésteres metílicos e de redução no índice de acidez se observou que, em ambos os casos, as maiores variações ocorrem já nas primeiras horas de reação, sendo que um tempo de até 16 h já é suficiente para a obtenção de praticamente todos os ésteres metílicos possíveis de serem produzidos, mesmo quando se aplicam pequenas quantidades de enzima.

A adição de maior quantidade de catalisador traz vantagens apenas nas primeiras horas de reação onde, tanto a produção de ésteres como a redução da acidez ocorrem mais intensamente. Porém, depois de algumas horas, as diferenças se tornam muito pequenas podendo se afirmar que é mais interessante a utilização de pequenas quantidades de

enzima, 0,25% em relação à massa de óleo, por exemplo, e a realização da reação por um tempo um pouco maior, já que o custo da enzima é significativamente maior do que os gastos energéticos do processo.

Observou-se, em todos os experimentos realizados neste trabalho, que ocorre uma redução significativa na acidez da matéria-prima durante a reação com catálise enzimática, demonstrado que o catalisador utilizado é capaz de esterificar os AGL com muita facilidade, além de tolerar presença de água no material utilizado. Possibilitando assim o emprego de matérias-primas menos nobres e, conseqüentemente, com menor custo.

Também observou-se uma relação direta entre a produção dos ésteres metílicos com a redução na acidez do meio reacional, permitindo que a análise de acidez possa ser utilizada como um parâmetro de controle de processo na síntese de biodiesel por catálise enzimática, principalmente em processos industriais. Já que a mesma, apesar de não apresentar valores com precisão, traz boas previsões a respeito da produção de ésteres metílicos em cada instante. Levando-se em consideração que essa análise é simples e rápida se comparada com a cromatografia gasosa utilizada para quantificar o teor de ésteres, a mesma pode ser uma boa ferramenta e usada constantemente para acompanhamento das reações.

Após todas estas constatações pode-se concluir que é possível realizar a produção de ésteres metílicos a partir do óleo de polpa de macaúba bruto utilizando a enzima Novozymes[®] NS-40116 (a qual apresenta um custo bastante reduzido se comparado com outras formulações), de forma competitiva economicamente com os processos de catálise química, já que em relação aos processos convencionais é possível utilizar poucas quantidades do catalisador, trabalhar em condições mais brandas de temperatura, purificar os produtos gerados com maior facilidade, trabalhar com matérias-primas menos nobres (como o óleo de macaúba), tolerar altos teores de AGL e de água na composição inicial, possuir um *layout* produtivo mais simples e com menos etapas que demandam gastos energéticos elevados, entre outros fatores.

Além disso, esta tecnologia permite a expansão da produção de biodiesel para novos cenários, por exemplo, utilizando-se matérias-primas produzidas por agricultores familiares em regiões isoladas, promovendo distribuição de emprego e renda e uma produção regionalizada de energia. Também se apresenta como uma opção para a produção de biodiesel com materiais que não sejam empregados amplamente como fonte alimentícia, diminuindo a competição entre a

produção de alimentos e de biocombustíveis que ocorre atualmente em muitos países, incluindo o Brasil.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a reutilização da enzima;
- Realizar o processo em sistemas semi-contínuos e contínuos;
- Promover a ampliação de escala do processo para nível de planta piloto e, eventualmente, a nível industrial;
- Realizar um estudo detalhado da reação em relação às variações de triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis;
- Realizar uma caracterização do biocatalisador de maneira mais aprofundada;
- Realizar a modelagem matemática das cinéticas envolvidas na produção dos ésteres metílicos;
- Simular computacionalmente a produção de biodiesel enzimático em escala industrial, a partir dos dados experimentais de bancada, para promover não só a melhora nas condições do meio reacional, mas também buscar a maior eficiência energética do processo, permitindo sua aplicação em escala industrial, bem como a realização de projetos dos *layouts* industriais.

REFERÊNCIAS

- AARTHY, M. et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1591–1601, 2014.
- ABIGOR, R. D. et al. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. **Biochemical Society transactions**, v. 28, n. 6, p. 979–981, 2000.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315–321, 2014.
- AHMAD, A. L. et al. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 1, p. 584–593, 2011.
- AMARAL, Fabiano Pereira do. **Estudo das características físico-químicas dos óleos da amêndoa e polpa da macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart]**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, 2007.
- ANDRADE, M. H. C. et al. **Óleo do fruto da palmeira macaúba – Parte 1: Uma aplicação potencial para indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos ANVISA**. In: II ENBTEQ – Encontro Brasileiro sobre Tecnologia na Indústria Química / II Seminário ABQUIM de Tecnologia. Anais do ENBTEQ. São Paulo, 2006.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. 2015.
- ANUAR, M. R.; ABDULLAH, A. Z. Challenges in biodiesel industry with regards to feedstock, environmental, social and sustainability issues: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 208–223, 2016.

ANTCZAK, M. S. et al. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185–1194, 2009.

ASTURIAS, R. Bioenergía en Centroamérica. **Anais...** In: FORO REGIONAL ALIANZA EN ENERGÍA Y AMBIENTE, 3., Antigua, Guatemala. 2004.

ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070–2093, 2012.

AZOCAR, L. et al. Improving fatty acid methyl ester production yield in a lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 609–614, 2010.

BASKAR, G.; AISWARYA, R. Trends in catalytic production of biodiesel from various feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 496–504, 2016.

BASHA, S. A.; GOPAL, K. R.; JEBARAJ, S. A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6-7, p. 1628–1634, 2009.

BERGMANN, J. C. et al. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411–420, 2013.

BHUIYA, M. M. K. et al. Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel - Part: 1 selection of feedstocks, oil extraction techniques and conversion technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 1109–1128, 2015.

BONDIOLI, P. The Preparation of Fatty Acid Esters by Means of Catalytic Reactions. **Topics in Catalysis**, v. 27, p. 77-82, 2004.

BRASIL. Decreto de 23 de dezembro 2003. **Institui a Comissão Executiva Interministerial encarregada da implantação das ações direcionadas à produção e ao uso de óleo vegetal – biodiesel como fonte alternativa de energia.** 2003.

BRASIL. Decreto Nº 5.297, de 6 de dezembro de 2004. **Dispõe sobre os coeficientes de redução das alíquotas da Contribuição para o PIS/PASEP e da COFINS incidentes na produção e na comercialização de biodiesel, sobre os termos e as condições para a utilização das alíquotas diferenciadas, e dá outras providências.** 2004.

BRASIL. Lei Nº 11.097, DE 13 de janeiro de 2005. **Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências.** 2005.

BRASIL. Lei Nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. **Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, e 8.723, de 28 de outubro de 1993; revoga dispositivos da Lei no 11.097, de 13 de janeiro de 2005; e dá outras providências.** 2014.

BROCKMAN, H. L.; MOMSEN, W. E.; TSUJITA, T. Lipid-Lipid Complexes: Properties and Effects on Lipase Binding to Surfaces. **The Biology, Biochemistry and Technology of Lipases**, v. 65, n. 6, p. 891–896, 1988.

CASTRO, M. Óleo da palmeira nativa de Minas, ganha status de produto de qualidade para vários setores. **Caderno Agropecuário**. Jaboticatubas/MG: Portal Estado de Minas, 2008.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D. et al. Methods to prevent acidification of Macaúba (*Acrocomia aculeata*) fruit pulp oil: A promising oil for producing biodiesel. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 703–707, 2015.

CESAR, A. D. S.; BATALHA, M. O.; ZOPELARI, A. L. M. S. Oil palm biodiesel: Brazil's main challenges. **Energy**, v. 60, p. 485–491, 2013.

CESAR, A. DA S. et al. The prospects of using *Acrocomia aculeata* (macaúba) a non-edible biodiesel feedstock in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 1213–1220, 2015.

CESARINI, S.; DIAZ, P.; NIELSEN, P. M. Exploring a new, soluble lipase for FAMES production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 484–487, 2013.

CESARINI, S. et al. Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 29, 2014.

CHAVES, Aníger Teresa Costa Aranha. **Otimização do processo de produção de biodiesel etílico do óleo de girassol (*Helianthus annuus*) aplicando um delineamento composto central rotacional (DCCR)**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2008.

CHIOU, S. H.; WU, W. T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 197–204, 2004.

CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN KUMAR; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497–520, 2014.

CREMONEZ, P. A. et al. Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 415–428, 2015.

D´AGOSTO, M. DE A. et al. Evaluating the potential of the use of biodiesel for power generation in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 807–817, 2015.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DATTA, A.; MANDAL, B. K. A comprehensive review of biodiesel as an alternative fuel for compression ignition engine. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 57, p. 799–821, 2016.

DEMIRBAS, A. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other

methods: a survey. **Energy Conversion and Management**, v. 44, p. 2093–2109, 2003.

DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 31, n. 5-6, p. 466–487, 2005.

DEMIRBAS, A. Importance of biodiesel as transportation fuel. **Energy Policy**, v. 35, n. 9, p. 4661–4670, 2007.

DORS, Gisanara. **Etanólise enzimática de óleo de palma visando a produção de biodiesel em sistema contínuo**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.

DU, W. et al. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 3-4, p. 125–129, 2004.

DUARTE, S. H. et al. Enzymatic biodiesel synthesis from yeast oil using immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase. **Bioresource Technology**, v. 183, p. 175–180, 2015.

EMBRAPA. **Oleaginosas e seus óleos: vantagens e desvantagens para produção de biodiesel**. Documentos 201 – Por Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão e Maria Isaura Pereira de Oliveira. Embrapa Algodão. Campina Grande, 2008.

EMBRAPA. **Embrapa busca viabilizar o cultivo da Macaúba em sistemas sustentáveis**. Brasília, 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/6438362/embrapa-busca-viabilizar-o-cultivo-da-macauba-em-sistemas-sustentaveis>>. Acesso em: 15 de novembro de 2015.

ENWEREMADU, C. C.; MBARAWA, M. M. Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil-A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 9, p. 2205–2224, 2009.

FAN, Y.; QIAN, J. Lipase catalysis in ionic liquids/supercritical carbon dioxide and its applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 1–7, 2010.

FERRARI, R.; FILHO, J. D. A. Macauba as promising substrate for crude oil and biodiesel production. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 2, p. 1119–1126, 2012.

FLORIN, M. J.; VAN ITTERSUM, M. K.; VAN DE VEN, G. W. J. Family farmers and biodiesel production: Systems thinking and multi-level decisions in Northern Minas Gerais, Brazil. **Agricultural Systems**, v. 121, p. 81–95, 2013.

FREITAS, L. et al. Monoglicérides: Produção por via enzimática e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1514–1521, 2008.

GOG, A. et al. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, n. 1, p. 10–16, 2012.

GONZALEZ, Samantha Lemke. **Produção contínua de biodiesel por transesterificação de óleo de fruto de macaúba (*Acrocomia aculeata*) e óleo de fritura em metanol e etanol supercrítico**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.

GUI, M. M.; LEE, K. T.; BHATIA, S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. **Energy**, v. 33, n. 11, p. 1646–1653, 2008.

HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386–395, 2013.

HANNA, M. A.; FANGRUI, M. A. Biodiesel production: a review, **Bioresource Technology**, vol. 70, p. 1-15, 1999.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HELWANI, Z. et al. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 12, p. 1502–1514, 2009.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 277–286, 2008.

HORCHANI, H. et al. Staphylococcal lipases: Biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 125–132, 2012.

HWANG, H. T. et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Protein engineering and lipase production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 4, p. 639–653, 2014.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coord: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. 4ª ed. São Paulo, 2008.

KEIFF, G. et al. Synthesis of ethyl esters from crude macauba oil (*Acrocomia aculeata*) for biodiesel production. **Fuel**, v. 165, p. 360–366, 2016.

KHIARI, K. et al. Experimental investigation of pistacia lentiscus biodiesel as a fuel for direct injection diesel engine. **Energy Conversion and Management**, v. 108, p. 392–399, 2016.

KLEINER, B.; FLEISCHER, P.; SCHÖRKEN, U. two-step-one-pot approach with free lipases suitable for acidic and used oil processing. **Process Biochemistry**, 2015.

KNOTHE, G.; VON GERPEN, J.; KRAHH, J.; RAMOS, L. P. Ramos (Eds.) **Manual de Biodiesel**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2006.

KUMARI, A. et al. Enzymatic transesterification of Jatropha oil. **Biotechnology for biofuels**, v. 2, n. 1, p. 1, 2009.

LEHNINGER, Albert L; NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

- LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, n. 4, p. 1083–1095, 2010.
- LOPES, D. D. C. et al. Economic feasibility of biodiesel production from Macauba in Brazil. **Energy Economics**, v. 40, p. 819–824, 2013.
- LORENZI, Gisele Maria Amim Caldas. **Acrocomia aculeata (Jacq) Lodd. Ex Mart - Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- MACRAE, A. R. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 60, n. 2, p. 291–294, 1983.
- MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, n. 6, p. 1300–1311, 2007.
- MELLO, Patrícia Gontijo. **Produção e caracterização de biodiesel a partir da oleaginosa macaúba (*Acrocomia aculeata*)**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2012.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119–134, 2012.
- MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011.
- MICHELIN, S. et al. Kinetics of ultrasound-assisted enzymatic biodiesel production from Macauba coconut oil. **Renewable Energy**, v. 76, p. 388–393, 2015.
- MINAMI, E.; SAKA, S. Kinetics of hydrolysis and methyl esterification for biodiesel production in two-step supercritical methanol process. **Fuel**, v. 85, n. 17-18, p. 2479–2483, 2006.

MME. Ministério de Minas e Energia. **Boletim mensal dos combustíveis renováveis**. Ed. 95. Dez/15. Brasília, 2015.

MOSER, B. R. Fuel property enhancement of biodiesel fuels from common and alternative feedstocks via complementary blending. **Renewable Energy**, v. 85, p. 819–825, 2016.

NASCIMENTO, Rafaella Ferreira. **Fracionamento e transesterificação do óleo ácido de macaúba para produção sustentável de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2013.

NAVARRO-DÍAZ, H. J. et al. Macauba oil as an alternative feedstock for biodiesel: Characterization and ester conversion by the supercritical method. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p. 130–137, 2014.

New World Fruits (2006). In: S. M. Nucci. (2007).

NORAINI, M. Y. et al. A review on potential enzymatic reaction for biofuel production from algae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 24–34, 2014.

NOVOZYMES. **The Novozymes enzymatic biodiesel handbook**. 70 p. Bagsvaerd – Dinamarca, 2014.

NUCCI, Stella Maris. **Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microsatélites em genética de população de macaúba**. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agrônômico. Campinas, 2007.

O’FALLON, J. V. et al. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 1511–1521, 2007.

PARENTE, Expedito José de Sá. **Biodiesel: Uma aventura tecnológica num País engraçado**. Fortaleza: Tecbio – Tecnologias bioenergéticas, 66 p, 2003.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C. **Análises de materiais biológicos.**

Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola. Campinas, 2006.

PEDERSEN, A. T. et al. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 89–94, 2014.

POPPE, J. K. et al. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 511–525, 2015.

PRICE, J. et al. Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m³ using a liquid lipase formulation. **Biotechnology and Bioengineering**, p. n/a–n/a, 2016.

RANGANATHAN, S. V.; NARASIMHAN, S. L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 3975–3981, 2008.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation iii: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 1, p. 57-109, 2003.

RICO, J. A. P.; SAUER, I. L. A review of Brazilian biodiesel experiences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 513–529, 2015.

SAJID, Z.; KHAN, F.; ZHANG, Y. Process simulation and life cycle analysis of biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 85, p. 945–952, 2016.

SALVADOR, Ana Augusta. **Atividade antioxidante e perfil de ácidos graxos de extratos da torta de noz pecã (*Carya illinoensis*) obtidos por extração supercrítica.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

SANTIN, Claudia Mara Trentin. **Síntese de biodiesel pela transesterificação e esterificação enzimática em sistema livre de**

solvente em banho de ultrassom. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim, 2013.

SANTOS, J. R. M. et al. Caracterização físico-química do óleo de coco obtido artesanalmente. In: 5º Congresso Norte-Nordeste de Química. **Anais...** Natal, 2013.

SIENIAWSKA, E. Targeting Mycobacterial Enzymes with Natural Products. **Chemistry & Biology**, v. 22, n. 10, p. 1288–1300, 2015.

SILVA, Camila da. **Produção contínua de biodiesel por transesterificação não catalítica de óleo de soja.** Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2009.

SILVA, Jacqueline Rodrigues Pires da. **Produção de ésteres etílicos a partir de gordura suína.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

SILVA, L. N.; CARDOSO, C. C.; PASA, V. M. D. Synthesis and characterization of esters from different alcohols using Macauba almond oil to substitute diesel oil and jet fuel. **Fuel**, v. 166, p. 453–460, 2016.

SILVA, Nívea de Lima da. **Produção de biodiesel: processo e caracterização.** Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

SILVEIRA, Sandro Dourado. **Produção de biodiesel de óleo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) via esterificação seguida de transesterificação metílica com catalisador básico.** Dissertação (Mestrado Profissional em Engenharia de Biocombustíveis e Petroquímica). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2014.

SKORONSKI, E. et al. Valorization of agro-industrial by-products: analysis of biodiesel production from porcine fat waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 2553–2559, 2016.

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Ultrasound assisted intensification of biodiesel production using enzymatic interesterification. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 67–75, 2016.

TAN, T. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 5, p. 628–634, 2010.

TORRES, E. A. et al. Recovery of different waste vegetable oils for biodiesel production: A pilot experience in Bahia State, Brazil. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2670–2674, 2013.

VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production—current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 421–430, 2008.

VENERAL, Josamaique Gilson. **Produção enzimática de poli(ϵ -caprolactona) em reator de leito empacotado utilizando fluido pressurizado**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

VIANNA, Fernanda Cristina. **Análise de ecoeficiência: avaliação do desempenho econômico-ambiental do biodiesel e petrodiesel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

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

XU, Q.-Q. et al. Continuous production of biodiesel from soybean flakes by extraction coupling with transesterification under supercritical conditions. **Fuel Processing Technology**, v. 144, p. 37–41, 2016.

WANG, M. et al. Biodiesel with low temperature properties: Enzymatic synthesis of fusel alcohol fatty acid ester in a solvent free system. **Renewable Energy**, v. 83, p. 1020–1025, 2015.

WAN GHAZALI, W. N. M. et al. Effects of biodiesel from different feedstocks on engine performance and emissions: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 585–602, 2015.

WATANABE, Y. et al. Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 151–155, 2002.

WHITELEY, C. G.; LEE, D. J. Enzymes for energy. Structural computational analysis, substrate association and product dissociation from the thermophilic esterase of *Alicyclobacillus acidocaldarius*: Implications in biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 156–168, 2013.

WILLARD, H.; MERRIT JR., L.; DEAN, J.; **Análise Instrumental**. 5.ed. Lisboa: Fundação Kalouste Goulbenkian, p. 579, 1974.

YADAV, G. D.; TRIVEDI, A. H. Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media, *Enzyme Microb. Technol*, v. 32, p. 783-789, 2003.

YU, H.; YUE, H.; HALLING, P. Optimal Experimental Design for an Enzymatic Biodiesel Production System. *IFAC-PapersOnLine*, v. 48, n. 8, p. 1258–1263, 2015.

YÜCEL, Y. Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace. *Bioresour Technol*, v. 120, n. 4, p. 3977-3980, 2011.

YÜCEL, Y. Optimization of biocatalytic biodiesel production from pomace oil using response surface methodology. **Fuel Processing Technology**, v. 99, p. 97–102, 2012.

ZENEVICZ, Mara Cristina Picoli. **Hidroesterificação enzimática de óleos de soja e de fritura em sistema de ultrassom**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2015.

ZENEVICZ, M. C. P. et al. Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 235–241, 2016.