

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ADILTON COSTA ALVES

**SÍNTESE DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO
DE BABAÇU COM ETANOL EMPREGANDO A LIPASE IMOBILIZADA
NOVOZYM 435 COMO CATALISADOR**

São Luís - MA
2008

ADILTON COSTA ALVES

**SÍNTESE DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO
DE BABAÇU COM ETANOL EMPREGANDO A LIPASE IMOBILIZADA
NOVOZYM 435 COMO CATALISADOR**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências
Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do
Maranhão como parte integrante dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Química.

*Orientador: Prof. Dr. Henrique Tadeu Castro
Cardias*

São Luís - MA
2008

Alves, Adilton Costa

Síntese de Biodiesel por transesterificação enzimática do óleo de babaçu com etanol empregando a lipase imobilizada Novozym 435 como catalisador/ Adilton Costa Alves. – São Luís, 2008

X f.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Tadeu Castro Cardias.

Dissertação Mestrado apresentado ao PPG-Química da Universidade Federal do Maranhão, 2008.

1.babaçu, 2.biodiesel, 3.etanol, 4.Novozym 435

CDU: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

ADILTON COSTA ALVES

**SÍNTESE DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO
DE BABAÇU COM ETANOL EMPREGANDO A LIPASE IMOBILIZADA
NOVOZYM 435 COMO CATALISADOR**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências
Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do
Maranhão como parte integrante dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Henrique Tadeu Castro Cardias (Orientador)
Doutor em Engenharia Química
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Luis Ferreira de França
Doutor em Engenharia de Alimentos
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr^a. Aldalea Lopes Brandes Marques
Doutor em Química Analítica
Universidade Federal do Maranhão

A Deus por ser meu guia em busca de vida íntegra. Aos meus Pais, José de Ribamar e Magnólia, pela dedicação na minha formação como pessoa e profissional. Aos meus Irmãos, Ademilton e Tatyane, por serem testemunhas e companheiros de todas as vitórias e dificuldades da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Henrique Tadeu Castro Cardias, pela orientação e por toda ajuda durante a elaboração desse trabalho.

Ao Prof. Fernando Carvalho Silva, por todos os conselhos científicos e pessoais.

Aos amigos Antonio Edilberto, Jorge Farid, Ronald, Renata, pelo companherismo.

A Luciana por toda compreensão e dedicação.

Aos colegas de laboratório, Caio, Tâmara, Jaciene, Marcio, Amanda, Alexandre, Karlene, Maurício, Marcelle, Euzenira, Natividade, Kiany, Poliana e Ulisses pela amizade e companherismo em momentos bons e/ou nem tão bons assim.

Aos amigos da Central Analítica Janyeid, Vívía, Marcelo, Jemmla e Prof^a Cristina, pela colaboração e paciência durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do Mestrado, Jaldir, Manoel, Adilson, João, Glene, Adalberto, Valdez, Francivaldo, Vívía, Mônica, Rosiane, Franscristiane, Cristiane, Joubety, Gladson, Regina, Crediciomar, Arine que também me apoiaram nesta caminhada.

A OLEAMA pela doação do óleo vegetal de babaçu

A NOVOZYM pela doação das enzimas.

A CAPES pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente, também, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento”.

Provérbios 2:6

RESUMO

No presente trabalho se estuda as condições reacionais para a produção de biodiesel através da alcoólise de óleo babaçu com etanol usando como catalisador a enzima imobilizada comercial Novozym 435. Para tanto, foi proposto um planejamento fatorial para avaliar a influencia dos seguintes fatores no meio de reação: temperatura, tempo, concentração de enzima e razão molar óleo-etanol. Através desta ferramenta estatística buscou-se identificar quais fatores influenciam no rendimento e teor de ésteres no produto final. Foi estudado também o reaproveitamento e o pré-tratamento das enzimas através de sua imersão em biodiesel e óleo em diversos ciclos de reação. O controle de qualidade do óleo de partida foi realizado através da análise de seu: índice de acidez, índice de iodo, umidade e viscosidade cinemática. E a qualidade do biodiesel etílico de babaçu produzido foi realizado através de algumas análises físico-químicas estabelecidas na resolução Nº 42 da Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis (ANP). Os resultados revelaram que os fatores que mais influenciaram o rendimento da reação foram a quantidade de catalisador, temperatura e razão molar óleo/álcool; por outro lado, o fator tempo não apresentou efeito significativo. Os maiores rendimentos alcançados foram da ordem de 80,2 a 88,6% e o modelo matemático proposto para estimar esta resposta se mostrou satisfatório explicando 87,8% da variação dos dados observados. Quase a totalidade das amostras de biodiesel possuía um teor de ésteres acima de 96 % e os efeitos que se mostram significativos para esta resposta foi quantidade de catalisador e temperatura. A correlação obtida através do modelo matemático explica 88,5% da variação dos dados experimentais. Os testes de reaproveitamento das enzimas revelaram que sua reutilização é viável até o oitavo ciclo de reação sem apreciável perda de atividade e o pré-tratamento dado à enzima antes da reação também foi bastante satisfatório ainda que se utilizasse um tempo de reação menor do que o praticado na etapa de otimização da reação, obtendo-se conversões acima de 96,5 % nos testes. As análises de qualidade do biodiesel produzido mostraram que este estava dentro das especificações estabelecidas na legislação vigente

Palavras-chave: Lipase, babaçu, biodiesel, etanol, Novozym 435.

ABSTRACT

In this work we have studied the biodiesel production through the transesterification (alcoholise) of babassu oil with ethanol using the immobilized enzyme commercial Novozym 435 (a lipase derivative) as catalyst. To achieve this purpose we have planned a factorial design to evaluate the influence of following factors in the reaction medium: temperature, time of reaction, enzyme concentration and oil/ethanol molar ratio. Though the utilization of this statistic tool we expected to identify which factor had the main influence in the reaction yield and ester concentration in the final product. We also have studied the enzyme derivative recycling and prior treatment by its immersion in vegetable oil and pure biodiesel before several batches of reaction. The control of quality of the departure babassu oil was made thru the following analyses: acid value, iodine index, humidity and viscosity. The quality of the final product was monitored thru the physical-chemical analyses established in the resolution number 42 from the "Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis (ANP)". The results have unveiled that the catalyst concentration, temperature and oil/alcohol molar ratio have the main influence in the reaction yield, by the other hand, the factor period of time doesn't have significant influence on it. The highest reaction yields has laid in the range of 85 to 88.6 % and the proposed mathematical model to estimate reaction yield can explain 87.8% of the observed data variation. Almost all the biodiesel samples had an ester concentration above 96 % and catalyst concentration and the temperature were the main effects upon this response. The data correlation obtained thru the mathematic model can explain 88.5 % the experimental data variation. The recycling tests have shown that it is viable to use them until up to 8 cycles of reaction without considerable loss of activity and the prior enzyme treatment before reaction had good results in terms of oil conversion reaching up to 96.5 % ester concentration, even though we had utilized a period of time smaller than the one used in the optimization step. The biodiesel produced quality control has shown that the samples were inside specifications established in the current law

Key-works: Lypase, babassu, biodiesel, ethanol, Novozym 435.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação de uma molécula de óleo ou gordura.....	6
Figura 2 - Estrutura dos ácidos oléico e linoléico.....	6
Figura 3 - Estrutura do ácido esteárico.....	7
Figura 4: A palmeira de babaçu e corte transversal do fruto.....	8
Figura 5 - Produção de amêndoa de babaçu.....	9
Figura 6 - Possíveis usos do coco Babaçu.....	10
Figura 7 - Etapas da reação de metanólise de um triglicerídeo.....	14
Figura 8 - Equação geral de Transesterificação de triacilgliceróis.....	14
Figura 9 - Estrutura genérica de um polipeptídeo.....	16
Figura 10 - Diagramas hipotéticos de energia para reações catalisadas por enzimas e a correspondente não catalisada.....	18
Figura 11: Desenvolvimento de um processo enzimático de interesse industrial.....	21
Figura 12 - Métodos de imobilização de enzimas.....	25
Figura 13 - Fluxograma do procedimento experimental.....	33
Figura 14 - Gráfico de Pareto para os efeitos significantes das variáveis e interações para a resposta rendimento.....	45
Figura 15 - (a) gráfico da superfície de resposta e (b) curva de contorno estimada pela relação entre os fatores 1-quantidade de enzima e 4 Razão molar O/A, para resposta rendimento.....	47
Figura 16 - (a) gráfico da superfície de resposta e (b) curva de contorno estimada para a relação entre os fatores 1- quantidade de enzima e 3-temperatura para resposta rendimento.....	47
Figura 17 - (a) gráfico da superfície de resposta e (b) curva de contorno estimada para a relação entre os fatores 3- temperatura e 4-razão molar O/A para resposta rendimento.....	47
Figura 18 - Gráfico de Pareto para os efeitos significantes das variáveis e interações para a resposta teor de ésteres.....	51
Figura 19 - (a) gráfico da superfície de resposta estimada pela relação entre os fatores 1- quantidade de enzima e 3: temperatura e (b) quantidade de enzima (1) e tempo (2), para a resposta teor de ésteres.....	53
Figura 20 - (c) gráfico da curva de contorno estimada pela relação entre os fatores 1- quantidade de enzima e 3: temperatura e (d) quantidade de enzima (1) e tempo (2) para a resposta teor de ésteres.....	53

Figura 21 - Cromatograma do biodiesel etílico de babaçu.....	59
Figura 22 – Espectros na região do infravermelho. Sendo (A) óleo de babaçu e (B) biodiesel de babaçu.....	60
Figura 23 – Espectro na região do Infravermelho da amostra de biodiesel etílico de babaçu.....	61
Figura 24 - Gráfico dos ciclos de reaproveitamento de enzima imobilizada.....	61
Figura 25 – (A) Enzima pura antes da reação. (B) Enzima após a reação.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais vegetais oleaginosos e seus respectivos conteúdos em óleo.....	5
Tabela 2- Características do fruto, componentes e seus respectivos poderes caloríficos.....	8
Tabela 3 - Composição do Óleo de Babaçu.....	11
Tabela 4 - Características Físico-químicas do óleo de babaçu.....	11
Tabela 5 - Classificação das enzimas segundo a IUBMB.....	17
Tabela 6 - Condições Cromatográficas.....	32
Tabela 7 - Resultados das análises físico-químicas do óleo de babaçu.....	37
Tabela 8 – Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial.....	39
Tabela 9 – Planejamento fatorial experimental.....	40
Tabela 10 - Resultados dos experimentos para o planejamento fatorial experimental para resposta teor de rendimento.....	42
Tabela 11 - Efeitos estimados em função da resposta rendimento	43
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) em função do rendimento.....	46
Tabela 13 - Resultados dos experimentos para o planejamento fatorial experimental para resposta teor de ésteres.....	48
Tabela 14 - Efeitos estimados em função da resposta do teor de ésteres.....	49
Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA) em função do teor de ésteres.....	51
Tabela 16 - Análises físico-químicas do biodiesel de babaçu etílico.....	54
Tabela 17 - Composição média dos ésteres etílicos de babaçu.....	58
Tabela 18 – Valores das frequências de vibração na região do IV da amostra de óleo de babaçu.....	60
Tabela 19 - Efeito do pré-tratamento (imersão) das enzimas na conversão.....	64

LISTA DE SIGLAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas.
- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- AOCS – American Oil Chemists’s Society.
- ASSEMA- Associação em áreas de assentamento do estado do Maranhão.
- ASTM – American Society for Testing and Materials.
- BIOMA – Bio Energia do Maranhão.
- CEN - Comité Européen de Normalisation.
- CG /DIC - Cromatografia a Gás com Detector de Ionização em Chama.
- EPA – Agência Ambiental Americana.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- INT – Instituto Nacional de Tecnologia.
- ISO - International Organization for Standardization
- IUBMB- União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.
- IV – Infravermelho.
- MCT – Ministério da Ciência e Tecnologia.
- MDA – Ministério do Desenvolvimento Agrário.
- MSR – Metodologia de Superfície de Resposta
- OLEAMA – Oleaginosas do Maranhão.
- PLU – Propil Lauriato Unit
- PNPB – Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel.
- Pr EN – Projeto de Norma Européia.
- PROBIODIESEL – Programa Brasileiro Tecnológico do Biodiesel.
- PROALCOOL – Programa Nacional do Alcool.
- RBTB – Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel.
- RPM- Rotações por minuto.
- SINIPOMA – Sindicatos das Indústrias Produtoras de Óleo do Maranhão.
- SMAOFD – Standard Methods for the Analysis of oils, fats and derivatives.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo Geral.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Óleos vegetais.....	4
2.1.1. Principais Fontes de Óleos e Gorduras.....	4
2.1.2 Composição e Estrutura dos Óleos e Gorduras.....	5
2.2 Coco Babaçu	7
2.2.1. Óleo de Babaçu.....	11
2.3 Biodiesel.....	12
2.4 Enzimas.....	15
2.4.1 Reações Enzimáticas.....	17
2.4.2 Aplicação Industrial das Enzimas: Vantagens e Limitações.....	19
2.4.3 Lípases	22
2.4.4 Imobilização de Enzimas.....	24
2.4.5 Produção de Biodiesel Utilizando enzimas.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	29
3.1 Materiais.....	29
3.1.1 Reagentes Analíticos.....	29
3.1.2 Equipamentos e Acessórios.....	29
3.2 Métodos.....	30
3.2.1 Análise Físico-Química do Óleo de Babaçu.....	30
3.2.1.1 Índice de Acidez (I.A.).....	31
3.2.1.2 Índice de Iodo (I.I.).....	31
3.2.1.3 Teor de umidade.....	31
3.2.1.4 Viscosidade cinemática.....	31
3.2.1.5 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.....	32
3.2.1.6 Análise do teor de ésteres.....	32
3.2.2 Etanólise de óleo de babaçu utilizando a lípase Novozym 435 como catalisador.....	32
3.2.3 Método do planejamento de experimentos.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36

4.1 Análises Físico-químicas do Óleo de Babaçu.....	36
4.2 Planejamento estatístico dos ensaios experimentais.....	39
4.2.1 Rendimento.....	41
4.2.2. Teor de ésteres.....	48
4.3 Análise do biodiesel de babaçu etílico.....	54
4.3.1 Análise cromatográfica do biodiesel de etílico.....	57
4.3.2 Análise do óleo de babaçu e do biodiesel etílico usando a técnica da espectrofotometria no Infravermelho.....	59
4.4 Reaproveitamentos das enzimas.....	61
4.5 Pré-tratamento das enzimas.....	63
5. CONCLUSÕES.....	65
6. Sugestões para trabalhos futuros.....	66
7.REFERÊNCIAS.....	67

1. INTRODUÇÃO

O aquecimento global é mais um alerta da degradação ambiental causada pela atividade humana e está provocando enormes preocupações em nível mundial quanto a seus efeitos de curto, médio e longo prazos no meio-ambiente e uma maior reflexão quanto a forma de produção de bens, diminuição do consumo energético e/ou a substituição de combustíveis fósseis por renováveis e de novos posicionamentos em relação aos dogmas tradicionais da economia de mercado (COSTA NETO, 1993).

Entre os maiores responsáveis por todos esses danos ambientais estão todos os agentes, incluindo pessoas físicas e jurídicas, que utilizam combustíveis fósseis em larga escala o que resulta no acúmulo do dióxido de carbono na atmosfera, intensificando o efeito estufa (BONN, PEREIRA, 1999).

Além do aspecto ambiental, outro aspecto de importância estratégica para qualquer nação do planeta, é a disponibilidade do petróleo e seus derivados no mercado mundial. Estes são finitos, ou seja, as reservas de combustíveis fósseis são necessariamente exauríveis e elas devem ser utilizadas com a clara noção de sua inerente e irreversível exaustão. Ademais, a excessiva dependência em sua oferta é a força motriz para a investigação de fontes alternativas de energia, preferencialmente, de caráter renovável, visando à substituição total ou parcial de combustíveis de origem fóssil, (NOGUEIRA, 2002).

Neste contexto, a busca de uma perspectiva sustentável para a indústria do petróleo e do gás natural, além de requerer enorme cuidado com as práticas de proteção e mitigação dos efeitos ao meio ambiente ao longo da cadeia de produção, processamento e consumo; é importante que se considerem as possibilidades de transição para fontes energéticas mais brandas.

No caso do Brasil algumas destas alternativas já estão identificadas e devem ser reforçadas, especialmente aquelas associadas ao uso dos biocombustíveis, cujo potencial brasileiro é reconhecido através do Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL) e o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, PNPB. Este último foi lançado no final do ano de 2004 e inseriu o biodiesel na matriz energética nacional. Sua comercialização está

amparada em leis que definem percentuais de mistura do biodiesel ao diesel, sendo autorizada a mistura de 2% de biodiesel ao diesel (B2) no período entre 2005 a 2007, e a mistura obrigatória de 5% de biodiesel ao diesel a partir de 2013 (IZIQUÉ, 2006).

A atual tecnologia para produção de biodiesel em escala industrial é realizada através de um processo químico conhecido como transesterificação que consiste na alcoólise (metílica ou etílica) de óleos e gorduras resultando na formação de ésteres e glicerol. Embora seja simples, rápida e com alto rendimento, apresenta algumas desvantagens: i) o catalisador (ácido ou base) empregado, que ao final do processo, permanece misturado ao principal subproduto da reação, a glicerina, dificultando a sua separação e purificação. ii) A produção é realizada via processo descontínuo levando a um menor aproveitamento da planta (baixa produtividade por volume de reator). iii) o processo de separação do biodiesel do álcool em excesso e da glicerina produzida é pouco estudada elevando os custos do processo de adequação do biodiesel as normas de comercialização; iv) a lavagem do biodiesel gera resíduos como sabões e v) a produção de glicerol (subproduto do processo) é elevada e sua utilização é ainda muito restrita (pequena demanda frente à alta produção)

Uma alternativa ao processo de transesterificação pode ser a adoção de uma rota enzimática, possibilitando a obtenção tanto do biodiesel como glicerina, com maior grau de pureza e ainda permitindo a reutilização do biocatalizador imobilizado.

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores de alta eficiência durante o transcurso das complexas reações bioquímicas que formam parte do metabolismo dos seres vivos. As propriedades catalíticas destas proteínas singulares podem ser utilizadas também “in vitro”, ou seja, fora dos organismos vivos, o que converte as enzimas em catalisadores com excelentes potencialidades para sua utilização industrial.

Apesar das excelentes perspectivas que as enzimas apresentam como catalisadores de síntese orgânica, sua aplicação industrial não é tão imediata. As enzimas não evoluíram biologicamente para serem bons catalisadores industriais, mas para adaptarem-se melhor as diferentes rotas metabólicas em que elas participam. Mesmo que as enzimas sejam capazes de catalisar os processos químicos mais complexos em condições experimentais amenas, a catálise enzimática apresenta algumas características que são muito úteis para a regulação

fisiológica de sua atividade que podem significar e, de fato, significam severas limitações para a sua aplicação como catalisadores industriais.

Por esta razão, uma vez descrita uma interessante transformação enzimática, ainda é necessário um intenso trabalho de engenharia molecular para obter a melhor enzima, o melhor derivado, as melhores condições experimentais e o melhor sistema de reação onde as propriedades catalíticas do biocatalisador atendam todos os parâmetros requeridos para sua posterior utilização industrial.

Há inúmeros fatores que afetam a catálise enzimática, dentre os parâmetros que a afetam, os mais importantes são: teor de água, natureza do solvente, temperatura, pH e os processos de transferência de massa.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Estudar a produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleo de babaçu com etanol utilizando como catalisador a lipase imobilizada Novozym 435.

1.1.2 Objetivos Específicos

? Promover a análise físico-química do óleo de babaçu;

? Aperfeiçoar as condições reacionais por meio de um planejamento fatorial com as seguintes variáveis: tempo de reação, temperatura, quantidade de enzima utilizada, relação óleo/álcool;

? Verificar a qualidade do biodiesel, de acordo com as especificações da ANP baseadas nas normas da ABNT, ASTM E ISO;

? Avaliar o pré-tratamento dado às enzimas antes da reação na conversão do óleo a biodiesel;

? Avaliar o comportamento das enzimas na sua reutilização;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleos Vegetais

Os termos óleos e gorduras designam substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana. A diferença entre óleos e gorduras reside exclusivamente na sua aparência física. O Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos define a temperatura de 20 °C como o limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo quando o ponto de fusão situa-se abaixo de tal temperatura (MORETTO E FETT, 1989).

Óleos vegetais são constituídos de cadeias curtas ou longas de ácidos graxos, cujo grau de saturação, ou insaturação é função da origem do tipo de óleo. Os ácidos graxos mais comumente encontrados nos óleos apresentam cadeias de 8 e 18 átomos de carbono. Essas cadeias podem ser saturadas ou insaturadas (COSTA NETO, 2002). Óleos que possuem um elevado número de ácidos graxos saturados, por exemplo, o óleo de babaçu (rico em ácido láurico), apresenta-se em estado sólido a temperaturas entre 20-25 °C; aqueles cujo teor de polinsaturados é mais elevado, por exemplo, soja, algodão e amendoim apresentam-se em estado líquido a temperatura ambiente um pouco abaixo desta (ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS, 2006).

A produção mundial de óleos e gorduras vem aumentando gradativamente devido à demanda. No período de 1983-1987 a demanda era de cerca de 13,9 kg/hab/ano e para o período de 2002-2010 a demanda estimada é de 18 kg/hab/ano. Nos últimos anos os óleos de soja e palma têm se constituído as principais "matérias-primas", sendo que na safra de 2005/2006 a produção de óleo de soja e palma no mundo chegou a 33,8 e 35,37 milhões de toneladas respectivamente (ABOISSA, op. cit).

2.1.1 Principais fontes de óleos e gorduras

As gorduras, como as proteínas e os carboidratos, são constituintes essenciais de todas as formas vivas e, portanto, potencialmente, todos os animais, vegetais e até microrganismos são fontes desses produtos. Contudo, quando está em foco o fator econômico, o fator disponibilidade prevalece. Assim, para ser industrialmente aproveitada a matéria-prima deve

apresentar um conteúdo em óleo superior a 12% ou 15%, além de ser abundante. Isso, naturalmente, restringe muito o número de fontes viáveis de óleos e gorduras, dentro de cada uma de suas classes. Algumas sementes, polpas de certos frutos e germens de alguns cereais, colocam-se como as mais importantes fontes de óleo na atualidade. A Tabela 1 reúne doze dessas fontes, que contribuem com mais de 95% na produção mundial de óleos vegetais.

Tabela 1: Principais vegetais oleaginosos e seus respectivos conteúdos em óleo.

Material oleaginoso	Conteúdo em óleo %
Coco	65-68
Colza	40-45
Babaçu*	60-65
Girassol	35-45
Gergelim	50-55
Açafrão	30-35
Polpa de Palma (dendê)	45-50
Oliva	25-30
Caroço de palma	45-50
Algodão	18-20
Amendoim	45-50
Soja	18-20

Fonte: MORETTO & FETT, 1998.

* O conteúdo de óleo refere-se ao contido nas amêndoas do coco babaçu.

2.1.2 Composição e Estrutura dos Óleos e Gorduras

As substâncias componentes dos óleos e gorduras podem ser reunidas em duas grandes categorias: glicerídeos e não-glicerídeos. A hidrólise ácida dos triacilglicerídeos leva aos correspondentes ácidos carboxílicos - conhecidos como ácidos graxos. Este é o grupo mais abundante de lipídios nos seres vivos, e são compostos derivados dos ácidos carboxílicos (URIOSTE, 2004).

Os ácidos graxos também podem ser classificados como saturados ou insaturados, dependendo da ausência ou presença de ligações duplas carbono-carbono. Os insaturados (que contém tais ligações) são facilmente convertidos em saturados através da hidrogenação catalítica (este processo é chamado de redução). A presença de insaturação nas cadeias de

ácido carboxílico dificulta a interação intermolecular, fazendo com que, em geral, estes se apresentem à temperatura ambiente, no estado líquido; já os saturados, com uma maior facilidade de empacotamento intermolecular, são sólidos. (COSTA NETO, 2002).

Como componentes naturais das gorduras os ácidos graxos ocorrem em quantidades geralmente pequenas. Contudo, eles têm uma participação tão importante na construção das moléculas dos glicerídeos e de certos não glicerídeos que chegam a representar a quase totalidade do peso dessas moléculas, contribuindo decisivamente nas propriedades mais características dos diferentes óleos e gorduras.

Uma molécula de gordura (óleo) consiste de 3 moléculas de ácido graxo esterificada em uma molécula de glicerol, como pode ser visto na Figura 1, segundo MORETTO & FETT (1989).

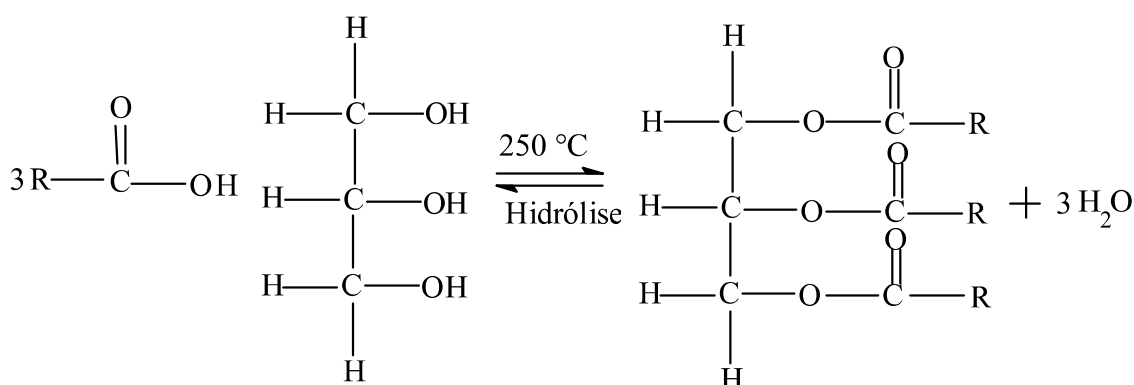


Figura 1 - Formação de uma molécula de óleo ou gordura (R= Ácido graxo).

Mais de 80% do óleo de oliva, por exemplo, é constituído por moléculas de ácido oléico. Este ácido graxo, assim como o ácido linoléico, é um ácido insaturado, isto é, possui duplas ligações na cadeia carbônica, como ilustrado na Figura 2, segundo MORETTO & FETT (1989).

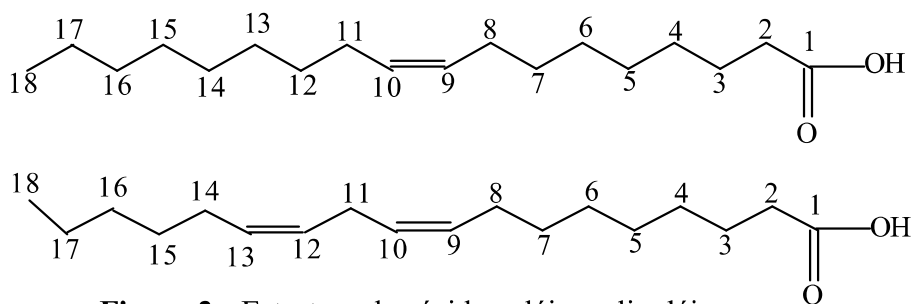


Figura 2 - Estrutura dos ácidos oléico e linoléico.

Existem ácidos graxos saturados, isto é, sem duplas ligações na cadeia carbônica, como é o caso do ácido esteárico (octanodecanóico), como mostra a Figura 3, segundo MORETTO & FETT (op.cit).

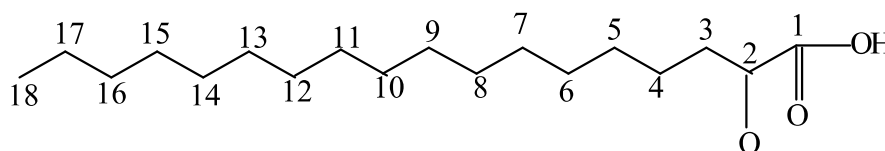


Figura 3 - Estrutura do ácido esteárico.

Alguns ácidos graxos são essenciais para o organismo humano. Muitos são encontrados em gorduras animais ou vegetais, tais como o palmítico, o esteárico e o oléico. Estes podem ser obtidos, também, “in vivo”, a partir de açúcares. Outros, entretanto, não podem ser sintetizados pelo organismo e são também essenciais, como o ácido linoléico (omega-6), ácido gama linolênico (omega-6), o ácido eicosapentanoico (omega-3) e o ácido docosahexaenoico (omega-3). Os ácidos omega-6 estão por toda a parte: óleo de milho, soja, girassol, etc.. Os omega-3, entretanto, são mais difíceis de encontrar, mas estão nas amêndoas, sementes de abóbora, linhaça, canola, soja e, principalmente, nos peixes. Devido à sua extrema importância, estes ácidos são adicionados a alguns produtos, tal como o leite, ou mesmo consumidos na forma de cápsulas (TURATTI, 2000).

A indústria óleoquímica transforma boa parte da produção global de óleos e gorduras. As principais matérias-primas utilizadas por este seguimento industrial são: sebo, palmiste, óleo de palma e coco. Os produtos mais importantes são ácidos graxos, ésteres metílicos, glicerol, álcoois e aminas graxas. Estes são empregados nas indústrias de cosméticos, aromas, alimentos, perfumaria, lubrificantes, anticorrosivos, tintas, látex, borrachas, produtos de limpeza, laminação, sabonetes, creme de barbear entre outros (RUIZ E TORALLES, 2001).

2.2 Coco Babaçu

O babaçu é uma espécie da família das palmáceas (Figura 4). A área de ocorrência dos babaçuais predomina em zonas de várzeas, junto ao vale de rios e, eventualmente, em pequenas colinas e elevações (MIC, 1982). O Maranhão é o Estado brasileiro com a maior área ocupada, estima-se em aproximadamente 10 milhões de hectares. Atualmente, verifica-se

nesse Estado um processo de substituição dos babaçuais por pastagens, principalmente em função dos baixos preços que a amêndoa de babaçu tem atingido no mercado regional.

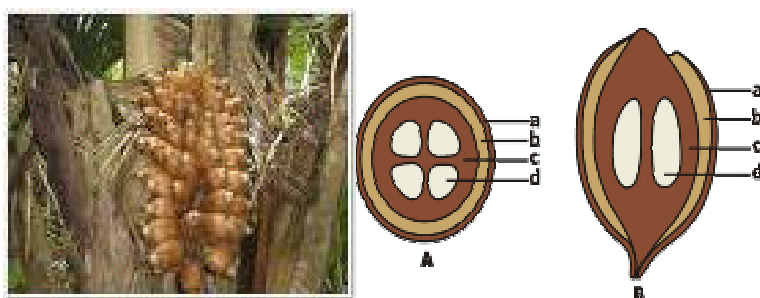


Figura 4 - A palmeira de babaçu e cortes transversal (A) e longitudinal (B) do seu fruto. Componentes: (a) epicarpo; (b) mesocarpo, (c) endocarpo e (d) amêndoa. Fonte: EMMERICH (1987).

Na Tabela 2 são apresentadas as características do fruto e o poder calorífico de cada fração.

Tabela 2 - Características do fruto, componentes e seus respectivos poderes caloríficos.

Componente	Percentuais [%]	Poder Calorífico [kJ/kg]
Epicarpo	11	18045,1
Mesocarpo	23	16202,9
Endocarpo	59	18840,6
Amêndoa	7	-
Total	100	18094,2

Fonte : Teixeira, 2002

A exploração se dá através da extração, em áreas de ocorrência natural. Embora a área de exploração dos babaçuais se estenda ao Piauí, Pará, Bahia, Ceará e Tocantins, o Maranhão, concentra quase toda produção de amêndoa de babaçu destinada ao mercado. A produção de amêndoas de babaçu no Brasil (Figura 5) chegou a 113.395 toneladas em 2003, sendo 104.466 no Maranhão, 6.179 no Piauí e 1.982 em Tocantins, estados mais importantes, de acordo com o IBGE (2005).

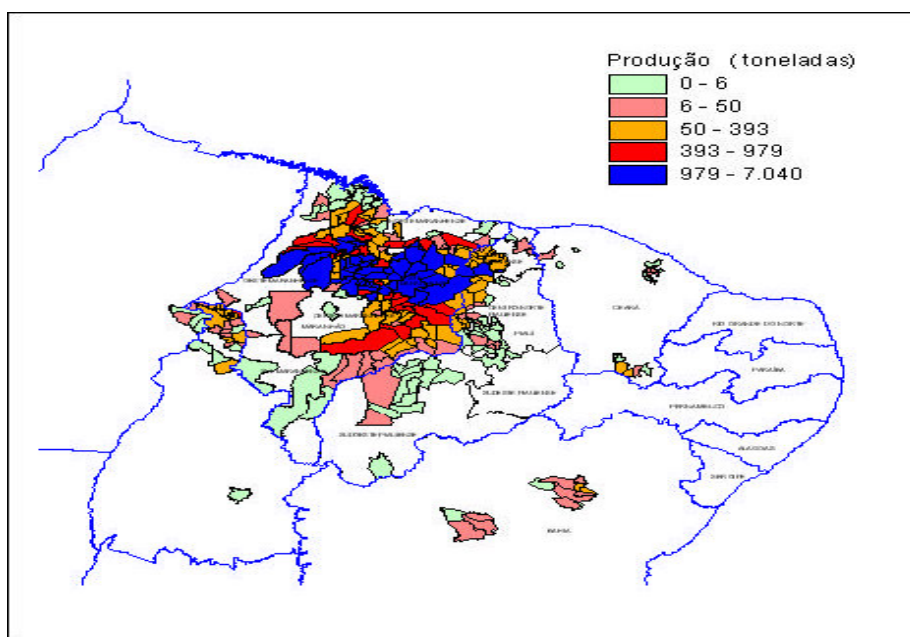


Figura 5 - Produção de amêndoa de babaçu (ton) segundo os volumes de produção, Estado e mesorregião produtora (Produção extrativa vegetal, IBGE, 2005).

O esmagamento do coco babaçu produz dois tipos de óleos: um para fins comestíveis e outro para fins industriais (óleo láurico). A utilização do óleo de babaçu para fins comestíveis tem sofrido declínio constante, por duas razões: a substituição por óleos mais acessíveis e a tendência dos consumidores optarem por óleos e gorduras não saturadas. O óleo de soja é o principal concorrente do óleo de babaçu no mercado de óleos comestíveis. O mercado brasileiro “formal” para o óleo de babaçu comestível é estimado em 5,5 mil toneladas/ano (dados do biênio 99/00), predominantemente para o mercado nordestino. O mercado brasileiro de óleos láuricos constitui-se atualmente no principal mercado para o óleo de babaçu. As indústrias dos segmentos de higiene, limpeza e cosméticos absorvem cerca de 35 mil toneladas anuais de óleo de babaçu bruto. O mercado brasileiro de láuricos (óleos, ácido e gorduras) está estimado em 80.000 toneladas. Os principais consumidores são as indústrias de higiene e limpeza e margarinas localizadas na região sudeste do país. A Gessy Lever, a Nestlé e Braswey estão entre os maiores consumidores de óleos e gorduras láuricas do Brasil. Grande parte destes produtos é comercializada através de corretoras (PENSA, 2000).

Além da produção destinada ao mercado, as famílias produtoras extraem e utilizam-se do que chamam de azeite de babaçu para o consumo familiar ou para vender no mercado local. O carvão é outro produto utilizado no consumo doméstico ou comercializado

localmente. É produzido a partir do que sobra do coco durante o processo de extração da amêndoa. Empresas siderúrgicas também têm feito uso do mesmo, sob a restrição de não utilizarem o coco inteiro, antes da extração da amêndoa. A amêndoa do babaçu é a parte mais importante, já que é dela que se extrai o óleo, o produto de maior valor comercial. Do coco do babaçu podem-se utilizar também o endocarpo, o pericarpo e o mesocarpo para o uso industrial, na alimentação animal e na produção de fertilizantes (Figura 6).

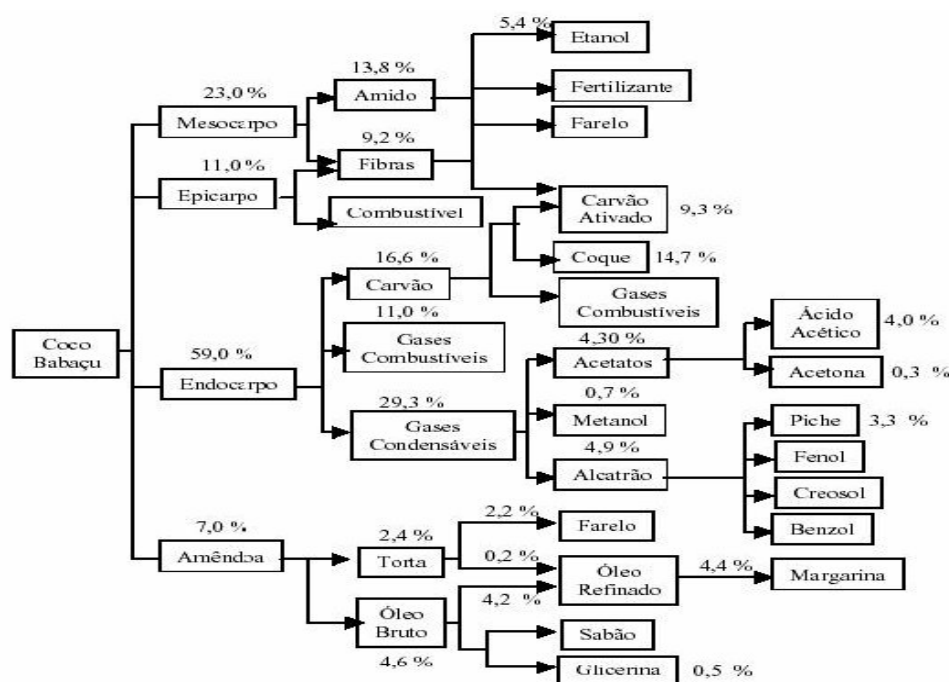


Figura 6 - Possíveis usos do coco Babaçu. Fonte: Anderson et al apud May.

Além dos usos indicados na Figura 6, outros usos estão sendo dados aos “subprodutos” do babaçu. Como exemplo disso, Associação em Áreas de Assentamento do Estado do Maranhão (ASSEMA) está produzindo e comercializando a farinha de mesocarpo de babaçu, utilizada na alimentação humana, rica em fibras. No que se refere ao óleo, à associação está testando-o na produção de cremes corporais, a exemplo a Body Shop uma grande empresa quem vem utilizando o óleo para esse fim.

2.2.1. Óleo de babaçu

O óleo de babaçu é classificado como saturado, pois apresenta 82,0 a 88,0% de ácidos graxos saturados na sua composição. Em média apresenta oito ácidos graxos principais: cáprico, caprílico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oléico e linoléico. A Resolução n°. 482, de 23 de setembro de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que regulamenta a identidade e qualidade dos óleos vegetais, estabeleceu o perfil cromatográfico para o óleo de babaçu (Tabela 3), bem como as características físicas, químicas e físico-químicas (Tabela 4).

Tabela 3 - Composição do Óleo de Babaçu

Ácidos Graxos	Composição	Tipo
C 8:0	2,6 – 7,3	CÁPRICO
C 10:0	1,2 – 7,6	CAPRÍLICO
C 12:0	40 – 55	LAURÍCO
C 14:0	11 – 27	MIRÍSTICO
C 16:0	5,2 – 11	PALMÍTICO
C 18:0	1,8 – 7,4	ESTEÁRICO
C 18:1	9,0 – 2,0	OLEÍCO
C 18:2	1,4 – 6,6	LINOLEÍCO

Fonte: ANVISA, 2007.

Tabela 4 - Características Físico-químicas do óleo de babaçu

PROPRIEDADES*	LIMITES	
Densidade relativa, 40°C/25°C	0,911 - 0,914	
Índice de refração (n D 40)	1,448 - 1,451	
Índice de saponificação	245 – 256	
Índice de iodo (Wijs)	10 – 18	
Matéria insaponificável, g/100g	Máximo 1,2%	
Acidez (g de ácido oléico/100g)	Óleo de babaçu	Máximo 0,3%
	Óleo de babaçu bruto	Máximo 5,0%
Índice de peróxido, meq/kg	Máximo 10	

2.3 Biodiesel

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), através do Regulamento Técnico nº 04/2004 define o biodiesel como: “um combustível para motores a combustão interna com ignição por compressão, renovável e biodegradável, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil”.

Enquanto produto, pode-se dizer que o biodiesel tem as seguintes características: é virtualmente livre de enxofre e compostos aromáticos; tem alto número de cetano; possui teor médio de oxigênio em torno de 11%, maior viscosidade e maior ponto de fulgor que o diesel convencional, atinge mercado específico diretamente associado a atividades agrícolas; tem preço de mercado relativamente superior ao diesel comercial; e, no caso do biodiesel de óleo de fritura, caracteriza-se por um grande apelo ambiental (FANGRUI E HANNA, 1999).

A obtenção do biodiesel é realizada através da reação de transesterificação de óleos vegetais com álcoois de cadeias curtas, tanto em meio ácido quanto em básico. A transesterificação, também chamada alcoólise, é a troca de um álcool de um éster por outro álcool em um processo similar ao da hidrólise, exceto o fato de que não se trata de um álcool no lugar da água. Os álcoois que podem ser utilizados são: o metanol, etanol, propanol, butanol ou álcool amílico. Metanol e etanol são utilizados mais frequentemente. Nos estudos publicados, o metanol tem sido o mais empregado devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade na Europa, Japão e EUA. O etanol pode também ser utilizado e visto que no Brasil, existe grande disponibilidade deste produto a baixo custo, provavelmente será este o substrato para o biodiesel brasileiro (MACEDO, G. A e MACEDO J. A, 2004).

O meio básico apresenta melhor rendimento e menor tempo de reação do que o ácido (FREEDMAN ET al., 1984). Entretanto, é necessário usar excesso de álcool devido ao caráter reversível da reação. A alcoólise com metanol é tecnicamente mais viável do que com etanol (BRASIL, 1985 e FREEDMAN et al, 1986).

O biodiesel apresenta diversos aspectos ambientais positivos em relação ao diesel de petróleo, conforme apresentado a seguir:

a) é virtualmente livre de enxofre e aromáticos em sua composição química, proporcionando uma combustão mais limpa e sem a formação de SO₂ (responsável pela chuva ácida) (WANG et al., 2000);

b) tem alto número de cetano (para alguns óleos esse valor é de 56, ou seja, 18% maior que o diesel) com conseqüente poder de auto-ignição e de combustão (ALBULQUERQUE, 2006);

c) possui teor de oxigênio em torno de 11% (DANTAS, 2006);

d) possui maior viscosidade que o diesel, mas é apropriado para a queima em motores, aspecto que se reflete no sistema de injeção no processo de combustão (FERNANDO, 2001);

e) possui maior ponto de fulgor (temperatura mínima na qual a mistura combustível-ar torna-se inflamável) que o diesel mineral (FERNANDO, 2001), isto significa que o biodiesel em suas condições normais de produção e armazenamento proporciona maior segurança;

f) é biodegradável, não tóxico e possui uma excelente capacidade lubrificante (COSTA NETO et al., 2000);

g) reduz as emissões de gases causadores do efeito estufa como o dióxido de carbono (CO₂) e monóxido de carbono (CO) diminuindo a poluição ambiental (ARAÚJO, 2005);

Os ésteres metílicos ou etílicos obtidos através da reação de transesterificação a partir de óleos vegetais e produzem como subproduto da reação a glicerina (glicerol) que corresponde cerca de 12% do total dos produtos obtidos, que pode ser aproveitada como matéria-prima para a produção de compostos oxigenados de alto valor, tais como, éteres de glicerina, ácido glicérico (GARCIA, 1995).

O processo global de transesterificação de óleos vegetais e de gorduras envolve uma seqüência de três reações reversíveis e consecutivas, nos quais os monoglicerídeos e os diglicerídeos são os intermediários (Figura 7). Nesta reação, são necessários 3 moles de álcool para cada mol de triglicerídeo (FIGURA 8) (VARGAS et al., 1998).

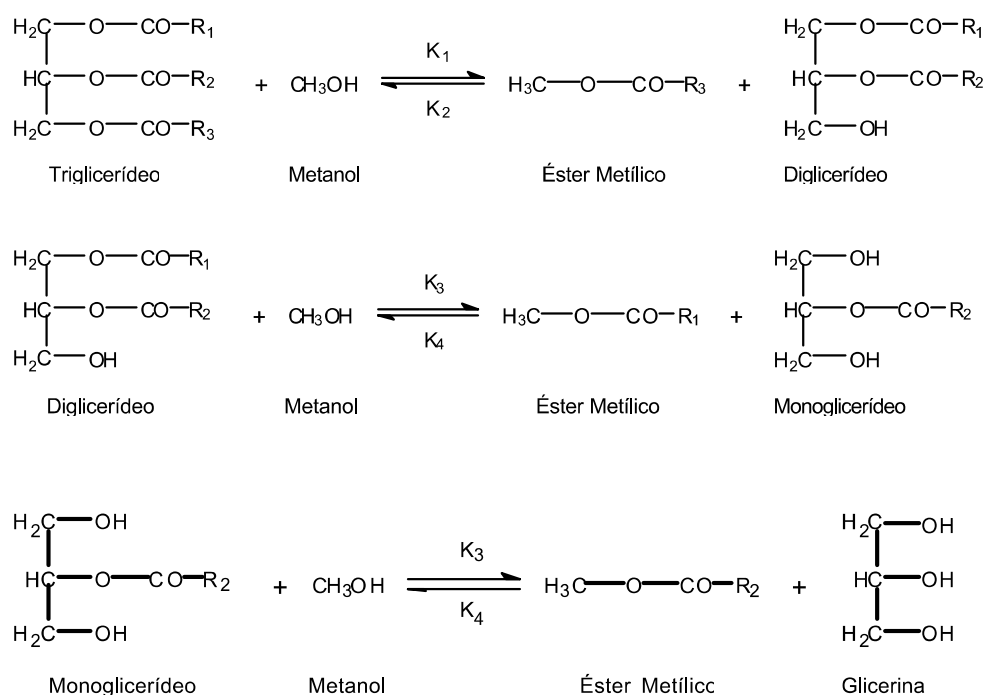


Figura 7 - Etapas da reação de metanolise de um triglicerídeo, onde R_1 , R_2 , R_3 , representam a cadeia carbônica dos ácidos graxos.

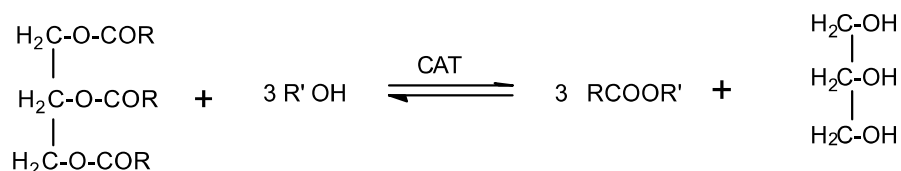


Figura 8 - Equação Geral de Transesterificação de triacilgliceróis, onde R representa a cadeia carbônica dos ácidos graxos.

No processo de transesterificação, os triglicerídeos são convertidos a diglicerídeos, em que estes por sua vez, são convertidos a monoglicerídeos, e então ao glicerol. Cada etapa produz uma molécula de éster metílico de ácido graxo. Caso a reação não ocorra completamente, haverá triglicerídeos, diglicerídeos, e monoglicerídeos na mistura reacional (GERPEN, 2006).

Métodos químicos convencionais para transformação de óleos e gorduras envolvem a produção de triglicerídeos modificados, de importância para indústria de alimentos e farmacêutica, na presença de catalisadores ácidos e básicos, sendo o ácido sulfúrico e

hidróxido de sódio os dois mais usados para esta função. No entanto estes geralmente levam a formação de subprodutos indesejáveis que podem ser difíceis de serem separados e recuperados do produto final (AL SAADI et al. 1981). Neste sentido o uso de catalisadores ácidos, além de proporcionar baixos rendimentos, possui o inconveniente da ação corrosiva destes compostos, o que implica na necessidade de equipamentos específicos para tal fim, ou para o fim que se propõe.

Apesar dos elevados rendimentos obtidos na utilização de catalisadores básicos, como hidróxidos alcalinos, as reações devem ser conduzidas somente usando óleos vegetais neutros ou de baixa acidez, pois a presença de ácidos graxos livres neutraliza a ação catalítica.

Embora eficiente em termos de rendimento de reação e tempo, a abordagem química para sintetizar biodiesel, possui severos inconvenientes, como a dificuldade na recuperação do glicerol, a necessidade de remover o sal residual e o gasto com energia para aquecimento do meio reacional. Por outro lado, o uso de biocatalizador permite a síntese específica de ésteres, podendo facilitar a recuperação do glicerol e transesterificação de glicerídeos com grande quantidade de ácido graxo livre (ASANO et al, 2002).

O biodiesel pode ser usado puro ou em misturas com o óleo diesel em qualquer proporção, sendo que para a mistura B5(mistura 95% Diesel/ 5% Biodiesel) não é necessária nenhuma adaptação dos motores. O Brasil prevê o uso da mistura 20% de biodiesel no diesel a partir de 2013, segundo a agência reguladora (ANP, 2006). No Brasil a ANP, estabeleceu os padrões e procedimentos desse combustível. No anexo 2 são apresentadas as especificações do B100.

2.4 Enzimas

A utilização de enzimas na transformação de compostos orgânicos é conhecida há mais de cem anos, mas elas foram mais intensamente exploradas a partir da segunda metade da última década. Durante este período um grande número de reações catalisadas por enzimas foi desenvolvido e a tecnologia enzimática é hoje uma das áreas mais promissoras entre as novas tecnologias para a síntese de compostos como alto valor agregado. Nos países desenvolvidos, os projetos nesta área são considerados prioritários e executados por grupos de pesquisa com alto potencial de produção de conhecimento e geração de tecnologias de ponta. No Brasil, por

outro lado, a tecnologia de produção e de aplicação de enzimas em nível industrial está em poder de algumas companhias internacionais, que não desenvolvem pesquisas no país, limitando a participação do Brasil como consumidor de tais produtos. Os altos custos envolvidos nos processos de produção e purificação de enzimas fazem com que poucos grupos de pesquisas no país sejam competitivos na área de tecnologia enzimática (ZIMMERMANN, 2005).

Quimicamente, as enzimas são macromoléculas de alta massa molecular formadas por subunidades conhecidas por aminoácidos, unidos por ligações peptídicas (Figura 9). Os resíduos de aminoácidos formam ligações covalentes entre si, pelo grupo amino de um aminoácido com o grupamento carboxílico de outro, constituindo cadeias polipeptídicas extensas, que assumem um arranjo espacial complexo sendo a sua forma estrutural difícil de ser determinada (CAMPBELL, 1995 e VOET, 1995).

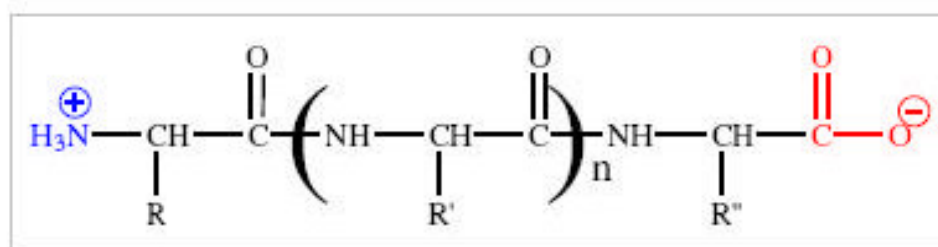


Figura 9 - Estrutura genérica de um polipeptídeo mostrando, a direita o resíduo C-terminal e a esquerda o N-terminal.

A nomenclatura sistemática foi estabelecida pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), na qual as enzimas são divididas em seis classes principais e várias subclasses: as Oxirredutases realizam oxidações e reduções; as Transferases fazem a transferência de um grupo entre substratos; as Hidrolases catalisam hidrólises; as Liasas realizam a eliminação de moléculas pequenas; as Isomerases promovem isomerizações; e as Ligases produzem a ligação de duas ou mais moléculas (Tabela 5), (CAMPBELL, 1995; MC MURRY, 1997 e KOSKINEM et. al, 1996).

Tabela 5 - Classificação das enzimas segundo a IUBMB

Classe de Enzimas	Algumas Sub classes	Tipos de Reações Catalisadas
Oxidoreduases	Desidrogenases Oxidases Redutases	Formação de ligação dupla por eliminação de H ₂ Oxidação Redução
Tranferases	Quinases Transaminase	Transferência de um grupo fosfato Transferência de um grupo amino
Hidrolases	Nucleases Lípases Proteases	Hidrólise de um grupo fosfato Hidrólise de um grupo éster Hidrólise de um grupo amido
Liases	Descarboxilases Desidrases	Eliminação de CO ₂ Eliminação de H ₂ O
Isomerases	Epimerases	Isomerização de um centro estereogênico
Ligases	Carboxilases Sintetases	Adição de CO ₂ Formação de clivagem de ligações C-O, C-S, C-N, C-C

Para sua identificação todas as enzimas possuem um código EC do tipo A.B.C.D. Onde EC representa “Enzyme Commission”; A, denota o tipo principal de reação; B indica a posição para o substrato ou da molécula transferida; C indica a natureza do co-substrato; e D, é o número individual da enzima. Por exemplo, o código EC 3.1.1.3 corresponde à lípase de *Chromobacterium viscosum*. Neste caso, 3 corresponde a classe das hidrolases; 3.1 atua sobre as ligações de ésteres; 3.1.1 indica que é hidrolases de ésteres carboxílicos e 3.1.1.3 é o número de série da enzima em sua subclasse (SIGMA, 1998).

2.4.1. Reações enzimáticas

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores e aceleram a velocidade das reações. Atua em sistemas biológicos com alta especificidade de reação e provavelmente sem a atuação enzimática, a vida não existiria da forma como a conhecemos (CAPBELL, 1995).

Linus Pauling em 1946 elaborou uma teoria onde diz que, na ordem das reações catalisadas, uma enzima assume a conformação complementar ao estado de transição da reação. Neste caso, uma enzima hipotética “pinoase” é designada para catalisar a quebra de um pino de metal (Figura 10): a) antes do pino ser quebrado, ele é dobrado (estado de transição), ocorrendo em seguida a quebra do pino em duas partes (produtos). b) a enzima apesar de envolver o substrato (pino), estabiliza-o, de maneira que a interação magnética impede que o pino seja dobrado pela pinoase. c) a enzima então assume uma conformação complementar ao estado de transição da reação, o que desestabiliza a estrutura do substrato (pino), contribuindo para a formação dos produtos (NELSON et al, 2000).

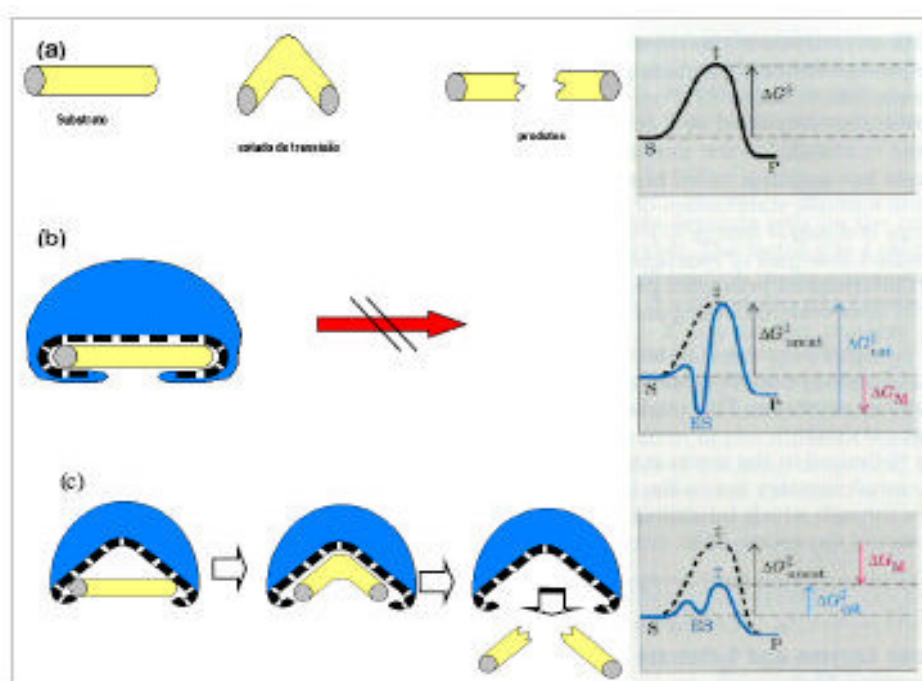


Figura 10 - Diagramas hipotéticos de energia para reações catalisadas por enzimas e a correspondente não catalisada (Nelson et al, 2000).

As enzimas são altamente versáteis na catálise de vários tipos de reações, que ocorrem sob condições suaves, normalmente à temperatura ambiente e em pH próximo à neutralidade. As velocidades de algumas reações catalisadas por enzimas podem ser até 10¹² vezes maiores do que as não catalisadas. Uma enzima geralmente catalisa uma única reação química ou um conjunto de reações intimamente relacionadas. Quando na forma livre exibem uma alta atividade catalítica em água. São seletivas para substratos. Reações colaterais que levam ao desperdício de formação de produtos secundários raramente ocorrem. O grau de

especificidade para o substrato é normalmente alto e, às vezes, absoluto (CAPBELL, 1995 e NELSON et al., 2000). Por outro lado, a causa mais comum da inativação das enzimas é a temperatura elevada, com a perda da conformação secundária ou terciária. No entanto, segundo TURNER e col. (2000) a termodesnaturação é dependente da quantidade de água associada com a proteína.

2.4.2 Aplicação Industrial das Enzimas: Vantagens e Limitações.

As enzimas apresentam excelentes potencialidades para sua utilização em nível industrial. As seguintes propriedades enzimáticas constituem importantes vantagens para sua aplicação em escala produtiva:

- **Grande eficiência catalítica em condições suaves de reação:** Elevada atividade frente ao substrato de interesse, em temperaturas próximas da ambiente, pHs neutros e meio aquoso. Isso possibilita a utilização de pequeno volume de enzima para catalisar satisfatoriamente a reação em relação ao volume total a processar, com conseqüente redução de custos fixos e variáveis em relação a catalisadores químicos tradicionais.

- **Alta seletividade:** As enzimas são capazes de catalisar especificamente uma única transformação sobre complexos que contenham vários grupos funcionais com reatividade similar, tornando-as úteis em processos complexos da química fina, tais como oxidações, condensações e hidrólises seletivas.

- **Elevada especificidade frente ao substrato:** As enzimas podem modificar somente um tipo de substrato dentro de uma mistura complexa de compostos similares e, inclusive, são capazes de diferenciar entre os isômeros de um composto quiral.

Todas estas características justificam o fato de que, atualmente, os processos enzimáticos tenham se convertido em grandes competidores dos métodos químicos tradicionais. E, de fato, começaram a se introduzir com êxito em setores industriais de grande relevância como o Alimentício, onde o processamento de alimentos requer reações muito específicas e seletivas, e o Químico-Farmacêutico onde intervêm substratos ou produtos quirais, complexos e instáveis. Ademais, é necessário ressaltar que a forte tendência no aumento da aplicação dos processos enzimáticos em nível industrial é devido à crescente preocupação social pela preservação dos recursos ecológicos e a implantação de medidas

legislativas que sancionem as indústrias que contaminem o meio ambiente devido a sua atividade produtiva.

Entretanto, apesar das excelentes perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, sua aplicação industrial não é imediata, pois, além das características favoráveis mencionadas, as enzimas apresentam também outras peculiaridades que limitam seu uso em escala industrial:

i - São solúveis no meio de reação, por tanto, dificulta sua separação dos produtos e sua reutilização.

ii - Geralmente são catalisadores muito instáveis.

iii - Algumas enzimas podem apresentar inibições competitivas causados pelos produtos da reação.

iv - Algumas enzimas podem apresentar inibições ou alterações alostéricas por interação com substratos, produtos ou outras moléculas em zonas distantes de seu centro ativo.

v - Algumas enzimas apresentam cinéticas de ordem zero, inclusive em concentrações muito baixas de substrato (constantes de Michaelis muito pequenas), por tanto, as transformações com altas concentrações de substratos se tornam muito lentas.

vi - Algumas enzimas podem catalisar “in vitro” reações que não realizavam “in vivo”, e para as quais não estavam otimizadas (por exemplo; poderiam apresentar algumas reações laterais, e diferentes manifestações de estereoespecificidade ou regioseletividade).

Atualmente, o objetivo prioritário da engenharia enzimática moderna é buscar alternativas tecnológicas que contribuam para solucionar ou atenuar os efeitos negativos das propriedades enzimáticas e possibilitem sua utilização em um número maior de processos.

O projeto de um processo industrial catalisado enzimaticamente requer uma série de estudos integrados em diversas áreas de investigação relacionadas entre si cuja finalidade é obter soluções ao conjunto de problemas propostos. A engenharia enzimática conta com três ferramentas fundamentais, conforme ilustrado na Figura 11:

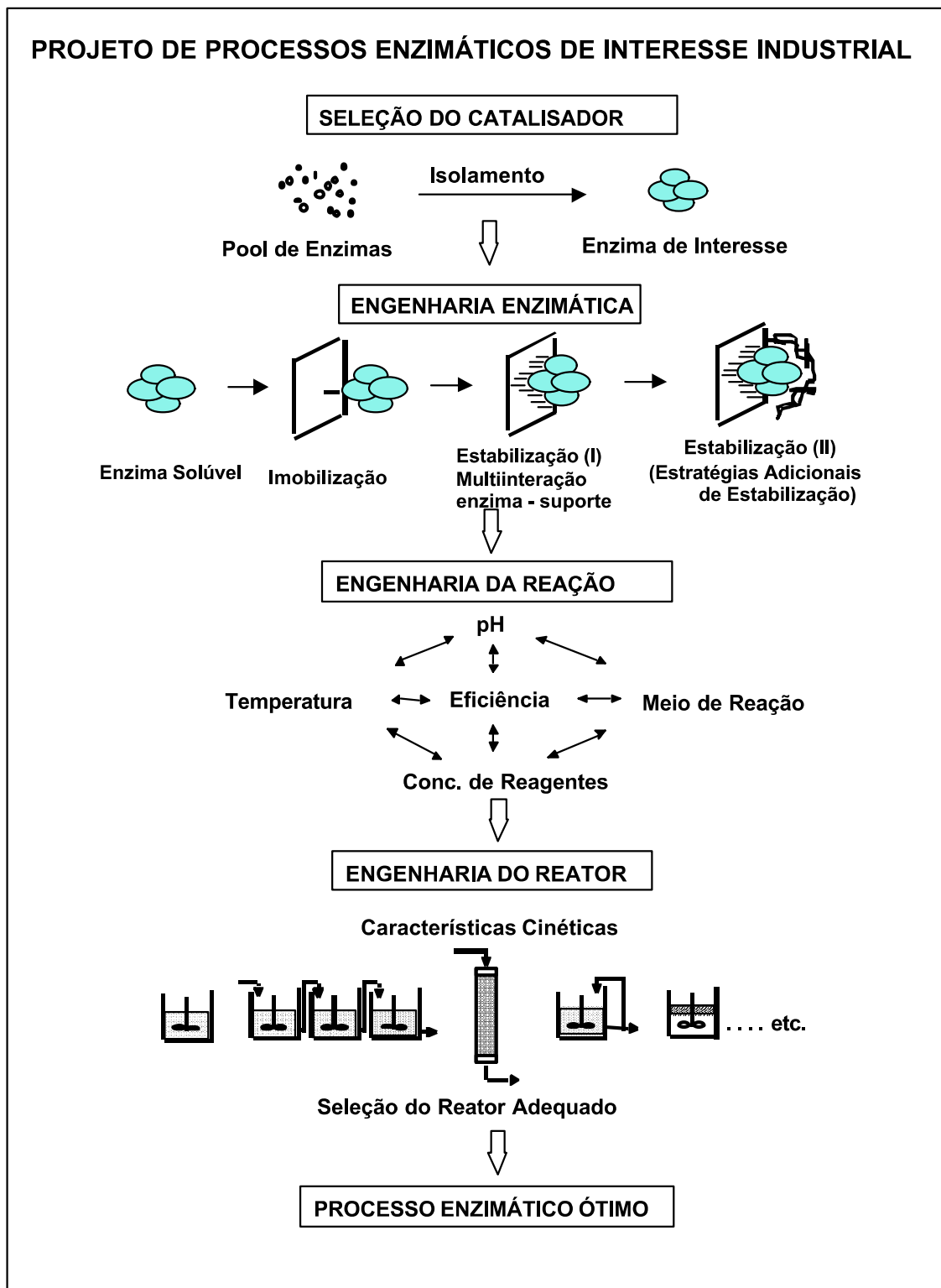


Figura 11 - Desenvolvimento de um processo enzimático de interesse industrial.

2.4.3 Lípases

Lípases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3) e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. A hidrólise de triacilgliceróis utilizando lípases é uma reação reversível e, portanto, o equilíbrio pode ser alterado através da variação da concentração de reagentes e/ou produtos. A possibilidade de se deslocar o equilíbrio no sentido da síntese de éster tem sido estudada e comprovada (MACRE e HAMMOND, 1985). Para a obtenção de altos rendimentos em reações de transesterificação de óleos vegetais é necessário promover o controle da quantidade de água no sistema reacional.

As lípases encontram-se entre as enzimas mais empregadas tanto em nível industrial (indústria alimentícia, de cosméticos, biomédica, pesticidas, detergentes, entre outras) como acadêmico, (Pandey et al., 1999). Elas são capazes de catalisar não apenas reações de hidrólise, mas também de síntese em meios aquo-restritos, como reações de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise, por atuar sobre substratos não naturais (JAEGER e EGGERT, 2002).

As lípases têm sido definidas nos trabalhos mais recentes, simplesmente como carboxilestearases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são tidas genericamente como estearases (JAEGER et al., 1999; FERRATO et al., 1997; VERGER, 1997; JAEGER et al., 1994).

Entre as lípases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas, por sua facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las. As fontes fúngicas têm sido preferencialmente utilizadas, não devido as suas melhores características em relação às lípases bacterianas, mas sim porque na sua grande maioria não são nocivas à saúde humana (JAEGER et al., 1994).

Fungos de diversos gêneros são bons produtores de lípase e suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Para exemplificar, temos as lípases de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium roqueforti* e da levedura *Cândida rugosa*, para

processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivo em preparações digestivas e para síntese quiral.

Dentre as bactérias produtoras de lipase estão disponíveis comercialmente as enzimas de *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia cepacia*, que vêm sendo empregadas na síntese de compostos quirais e as lipases *Burkholderia sp.* e *Arthrobacter sp.*, utilizadas na determinação de triacilgliceróis. O rápido crescimento celular, em relação aos fungos, se constitui em uma das vantagens das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (Jaeger et al.,1999).

As lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente. A maioria das lipases apresenta sua atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 40 °C. Sua termoestabilidade varia consideravelmente em função de sua origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica. (MACRE e HAMMOND, 1985).

Em geral as lipases são ativas em uma ampla faixa de valores de pH, apresentando uma alta atividade na faixa de pH 5-9, um máximo freqüentemente situado entre 6 e 8 (MACRE e HAMMOND, 1985).

O peso molecular pode variar de 20000 a 60000 daltons. Algumas lipases são conhecidas por formar agregados em solução e isto pode explicar o alto peso molecular reportado para algumas lipases parcialmente purificadas (MACRE e HAMMOND, 1985).

A especificidade é uma característica importante das lipases. De forma geral, quatro tipos de especificidades podem ser definidos. A primeira é a especificidade em relação à classe de lipídeos. A enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo, tri-, di-, ou monoglicerídeos, colesterol éster, metil éster, etc. A segunda é a regioespecificidade, que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula. O terceiro tipo é a especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo, na qual a lipase é específica em relação ao comprimento da cadeia ou em relação à presença da dupla ligação nesta cadeia. Finalmente, merece referência a estereoespecificidade, ou seja, algumas lipases catalisam apenas a hidrólise ou a esterificação de um ou dois estereoisômeros. (VAN DER PADT, 1998).

Uma característica das lípases é a sua capacidade de agir sobre substratos pouco solúveis em água, atuando somente na interface água/lipídeo. A atividade catalítica das lípases é sensivelmente diminuída na ausência de uma interface, o que é evidenciado pela baixa conversão na hidrólise de ésteres solúveis em água por elas catalisada (OLIVEIRA, 1999).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a ativação de lípases nas interfaces e elas incluem: a) uma mudança conformacional induzida interfacialmente gerando uma enzima mais ativa: isto é explicado devido aos sítios de adsorção na interface não serem os sítios onde ocorre a reação, desta forma, ao entrar em contato com a interface a lípase assume uma nova conformação espacial: b) uma maior concentração do substrato no local: c) uma orientação mais favorável do substrato: d) um menor grau de hidratação do substrato, tendo em vista que a hidratação de moléculas de lipídeo representa uma proteção às ligações éster. Logo, devido à redução do número das moléculas de água esta proteção diminui, favorecendo a ação de lípases (YANG e RUSSEL, 1996).

2.4.4 Imobilização de enzimas

Uma das grandes vantagens da catálise em meio não aquoso é que as enzimas são insolúveis em praticamente todos os solventes orgânicos. Contudo, quando enzimas livres, estão suspensas em um solvente orgânico, elas tendem a agregar-se e prendem-se às paredes do reator, principalmente quando água é adicionada a este sistema para aumentar a atividade enzimática. Este problema pode ser solucionado através da imobilização de enzimas em suportes sólidos. A imobilização da enzima também pode minimizar o efeito desnaturante que muitos solventes orgânicos exercem sobre a maioria das enzimas, através de um material hidrofílico que permite a manutenção de um microambiente de alta atividade de água em torno das moléculas de enzima (ILLANES, 1994).

A imobilização de enzimas consiste no confinamento das mesmas em um determinado material. Este processo pode ocorrer de diferentes maneiras. No caso de lípases, numerosos métodos de imobilização são viáveis, cada um envolvendo diferentes graus de complexidade e eficiência. Os vários métodos usados podem ser subdivididos em duas categorias principais: método químico quando ligações covalentes são formadas com a lípase, e o método físico, quando interações fracas ou retenção mecânica é utilizada. No método químico, a lípase é

fixada no suporte por ligação covalente com formação de ligação cruzada. No método físico a lipase pode ficar retida ou micro encapsulada no interior de um gel insolúvel, fibras porosas ou materiais adsorventes. A recuperação de lipases imobilizadas depende da meia vida da enzima, que após certo tempo precisa de purificação antes de ser reutilizada. (PANDEY, 1999; VILLENEUVE, 2000, BASHEER, 1995 e NAVRÁTIL, 1999). Alguns sistemas mais utilizados são mostrados na Figura 12.

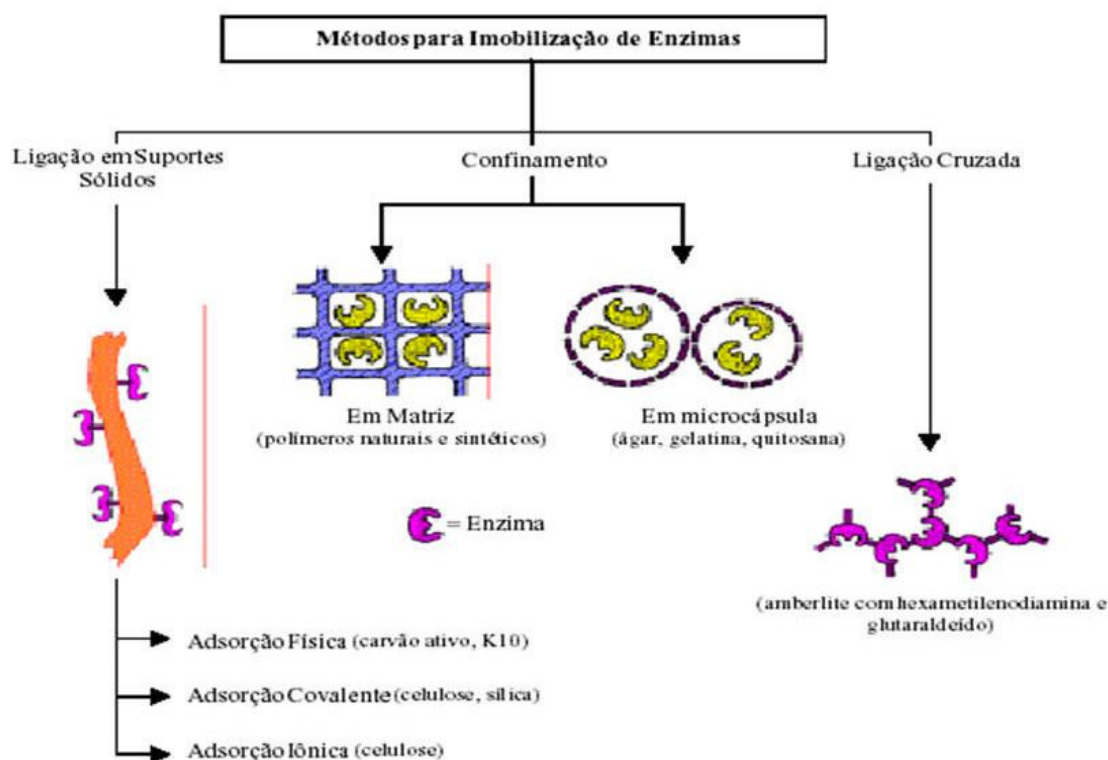


Figura 12 - Métodos de imobilização de enzimas (COSTA NETO, 2002)

As enzimas liofilizadas são catalisadores convenientes para muitas aplicações sintéticas. O uso das preparações enzimáticas cresceu consideravelmente em numerosos setores, mas o custo elevado dos processos de extração e purificação das macromoléculas e sua instabilidade em solução representam um obstáculo à recuperação do biocatalisador após sua utilização (LYE, 1996; QUEIROZ, 1997; LOUGHLIN, 2000; BAN, 2001; KRAMER, 1997).

Segundo BONN e PEREIRA, 1999, este assunto começou a ser estudado no início do século XX, ao se observar que o carvão ativo ao qual havia sido adicionada uma preparação biológica com atividade invertásica mantinha a capacidade de hidrolisar sacarose mesmo após ser lavado. Entretanto, o assunto só foi novamente retomado após a segunda guerra mundial. Em 1948, o bioquímico americano James Batcheller Summner (1877-1955), ganhador do

Prêmio Nobel de Química em 1946 pelo isolamento e cristalização da enzima urease com a subsequente identificação da sua estrutura protéica, reportou a sua imobilização. Em 1954, pesquisadores alemães demonstraram que polímeros sintéticos e resinas diazotadas de poliaminoestireno poderiam ser usados para imobilizar proteínas com atividade biológica, tais como a pepsina, diastase, ribonuclease e carboxipeptidase (BONN e PEREIRA, 1999).

Os sistemas de enzimas imobilizadas também têm espaço definido em metodologias analíticas, particularmente na obtenção de biosensores. As aplicações mais recentes de biocatalisadores imobilizados incluem a produção de substâncias de alto valor agregado por bioconversão regioespecífica ou estereoespecífica; o tratamento seletivo de poluentes específicos para resolver problemas ambientais; a análise contínua com alta sensibilidade e especificidade de compostos de interesse; a conversão de energia em sistemas biológicos e, finalmente, em medicina na obtenção de órgãos artificiais e na formulação de drogas à base de enzimas. (BONN e PEREIRA, 1999; LIMA e ANGNES, 1999).

A escolha do suporte é dependente de diversas características que são importantes para aplicações em processos industriais. Entre esses fatores estão a resistência microbiológica, estabilidade térmica, durabilidade química e funcional, caráter hidrofóbico e hidrofílico, facilidade de regeneração, capacidade de carga e baixo custo (VILLENEUVE et al, 2002; MALCATA et al, 1990).

Alguns dos suportes insolúveis comumente utilizados para a imobilização de enzimas são vidros porosos e seus derivados, terras diatomáceas, carvão ativo, duolita, celulose e derivados, caolin, alumina, titania, sílica e derivados, aço inoxidável, polietileno e derivados, polipropileno e derivados, poliestireno, óxido de polifenilparafenileno, copolímeros acrílicos, poliacrilamida, poliamida, enzacril®, poliuretana, sepharose® e derivados, sephadex®, agarose® e derivados, gelatina, alginato, Dowex®, colágeno, polietileno glicol fixado em magnetita, fragmentos de micela fungal ou paredes de células bacterianas. (PANDEY et al., 1999; VILLENEUVE, 2000; LYE, 1996; BAN, 2001; MALCATA, 1990; FERREIRA DA SILVA, 2001). Materiais sintéticos para suportes têm sido manufaturados ou obtidos em grande variedade de formas, incluindo membranas, fibras, grânulos e pós. Outros suportes citados na literatura incluem o nylon, (BRAUN et al, 1996) casca de arroz ativada (TANTRAKULSIRI et al., 1997) carbonato de cálcio, (ROSU et al., 1997), etc.

A utilização de lipases imobilizadas facilita o desenvolvimento de processos contínuos, em escala comercial, ao contrario de operações em pequena escala, que geralmente empregam enzimas livres. O uso de reatores com lipase imobilizada também conduz a um decréscimo no potencial para a contaminação do produto com lipase residual. Isto permite a reutilização da lipase, resultando em processos mais econômicos. A imobilização geralmente aumenta a estabilidade térmica e química da lipase, podendo aumentar a resistência aos efeitos desnaturantes de vários solventes orgânicos, permitindo um melhor controle do processo e da qualidade do produto (MALCATA et al., 1990). Além disso, facilita a separação do biocatalisador do sistema de reação para posterior reutilização (ILLANES, 1994 e CASTRO, 1995).

2.4.5 Produção de biodiesel utilizando enzimas.

ISSO et al, (2001) compararam o desempenho da lipase de *Pseudomonas fluorescens* livre e imobilizada na produção de ésteres, usando como substrato trioleína, óleo de girassol, propanol e butanol. Com o uso de propanol e enzima imobilizada a conversão chegou a 100% em 10 horas, enquanto que para a enzima livre obteve-se 90% em 25 horas, a temperatura foi mantida em 50 °C. Os autores constataram que para o butanol, a reação teve maior conversão em um menor tempo com o uso de enzima imobilizada.

A alcoólise do óleo de girassol com etanol sem solvente, MITTELBACH (1990), obteve o melhor rendimento (82%) com lipase de *Pseudomonas* sp. A ausência de solvente foi considerada por facilitar aplicações técnicas, mas em função da viscosidade do óleo, foi necessária vigorosa agitação e um longo período de tempo de reação (14 h). A otimização da reação de interesterificação de óleo de soja e mamona com metanol, utilizando lipase de *Cândida antarctica* imobilizada em cerâmica, foi estudada por SHIMADA et al. (1999). Nessa reação, foram utilizados três equivalentes de metanol para um de óleo, sendo observado que o equivalente molar de metanol superior a 1,5 provocou a inativação da enzima. Portanto, a reação foi conduzida com a adição do álcool em etapas. Nas primeiras 10h, a reação foi conduzida com um equivalente de MeOH. Após a conversão de 95% do metanol inicialmente adicionado, foi acrescido mais um equivalente de MeOH e a reação prosseguiu por mais 14 h. Finalmente, o terceiro equivalente foi adicionado e a reação continuou por mais 24 h, sendo obtido um rendimento global em ésteres metílicos de 98,4%. WATANABE et al. (2000) também demonstraram um processo de metanólise efetivo utilizando um sistema de batelada,

com 2 e 3 etapas, catalisado pela Novozym 435. A taxa de conversão molar no final do último estágio foi de 90-93% e a preparação de lipase pode ser reutilizada por 100 ciclos, sem perder a atividade. O efeito do pré-tratamento da lipase Novozym 435 em metanol para a metanólise de óleos foi investigada por SAMUKAWA et al. (2000). A metanólise progrediu muito mais rápido quando a Novozym 435 foi pré-incubada em metioleato por 0,5 h e subsequentemente em óleo de soja por 12 h. Como resultado, a taxa de conversão atingiu 97% em 3,5 h de reação, com adição contínua de 0,33 moles de metanol após cada 0,25-0,4 de reação.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes Analíticos

Os principais reagentes utilizados foram: óleo de babaçu clarificado gentilmente cedido pela empresa; Oleaginosas Maranhense S.A.- OLEAMA, etanol P. A (99,3%)-QUIMEX, Butanol P.A (99,5%)-QUIMEX, Ácido Acético Glacial P.A-QUIMEX, Amido Solúvel P.A - ISOFAR, Clorofórmio P. A (99,3%)-QUIMEX, Éter Etilíco P. A.-QUIMEX, Fenolftaleína P A. -REAGEN, Hexano P.A- QUIMEX, Solução de Wijs P.A-MERCK.

A enzima comercial utilizada foi a Novozym 435, que é uma preparação enzimática granulada, com atividade declarada de 10000 PLU/g, de cor branca, o suporte é de resina acrílica, o microorganismo produtor é o *Aspergillus oryzae*, a qual foi recebida através de doação da Novozymes Latin America Ltda.

3.1.2 Equipamentos e Acessórios

Os testes reacionais foram realizados em um reator encamisado de vidro hermeticamente fechado com capacidade de 50 mL.

Para pesagens das massas utilizou-se uma balança semi-analítica da marca ACCLAB, modelo L-série LT-320 com precisão 0,001 g.

Na agitação do meio reacional utilizou-se um agitador magnético da marca SCHOTT, modelo TM 125.

No aquecimento do meio reacional utilizou um banho termostático da marca QUIMIS, modelo Q-218.2.

Para separação do produto utilizou-se uma centrífuga da marca BIOENG, modelo BE 6000.

As medidas de viscosidades foram realizadas em um banho termostático da marca SCHOTT, modelo CT52 e os capilares modelos 520 01/75 e 520 10/100 da mesma marca.

O preparo das pastilhas de KBr foi realizado utilizando uma prensa hidráulica Graseby Speac.

As análises por infravermelho foram realizadas utilizando um espectrômetro infravermelho médio da marca BOMEM Hartmann and Braun, modelo MB - series.

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um Cromatógrafo a Gás, VARIAN CP 3800, equipado com injetor 1175 com e sem divisão de fluxo (split/splitless), coluna capilar VARIAN (WCOT sílica fundida) de fase estacionária 5% fenil 95 % dimetilpolisiloxano com dimensões 30 m de comprimento, 0.25 mm diâmetro interno e 0.25 µm de espessura de filme e um detector de ionização em chama (FID);

Para determinação do teor de água utilizou-se um titulador automático da marca SCHOTT, modelo Tritoline KF.

O ponto de fulgor foi determinado utilizando um aparelho da marca Herzoe, modelo HFP 362.

Na determinação do teor de enxofre utilizou-se um equipamento da marca TANAKA SCIENTIFIC LIMITED, modelo RX-3505.

A massa específica do óleo e do biodiesel foram determinadas utilizando-se um aparelho da marca ANTON PAAR, modelo DMA.

O ponto de entupimento foi determinado utilizando um aparelho da marca HERZOE.

3.2 Métodos

3.2.1 Análise Físico-Química do Óleo de Babaçu (*Orbigynia martiniana*)

As análises do óleo de babaçu foram realizadas de acordo com as normas internacionais da American Oil Chemists' Society. As análises do biodiesel puro (B100) foram realizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (2004) indicadas pela Resolução nº. 42 da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP (2004).

3.2.1.1 Índice de Acidez (I.A.)

O índice de acidez é o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres em 1g de amostra de óleo. Foi utilizado o método Cd 3^a-63 da AOCS para determinar o grau de acidez dos óleos vegetais.

3.2.1.2 Índice de Iodo (I.I.).

O Índice de iodo (I.I.) é a medida da insaturação química de óleos e gorduras, sendo expresso em centigramas de iodo absorvido por grama de amostra (% iodo absorvido). Foi utilizado o método Cd-125 da AOCS para determinar o grau de insaturação do óleo vegetal.

3.2.1.3 Teor de umidade

A quantidade de água existente no óleo vegetal e no biodiesel foi determinada baseando-se no método Karl Fisher Ca 2e-84 da AOCS.

Esse método está baseado na oxidação de SO₂ pelo I₂ em presença de água.



Equação 1 - Oxidação de SO₂ com iodo.

3.2.1.4 Determinação da Viscosidade cinemática.

A viscosidade cinemática foi medida por meio de viscosímetros capilares em acordo com a norma ASTM D445. Esse método consiste em medir o tempo que um volume do líquido flui, sob o efeito da gravidade, através do capilar, submerso em um banho termostático a temperatura de 40°C.

3.2.1.5 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos através análises de pastilhas de KBr impregnadas com o óleo de babaçu ou biodiesel analisadas usando um espectrômetro de infravermelho (BOMEM, modelo MB) faixa de 4000–400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.1.6 Análise do teor de ésteres

Para determinar o teor de ésteres reações de transesterificação, utilizou-se um método cromatográfico que consiste no uso de um Cromatógrafo a Gás, modelo VARIAN CP-3800, equipado com um injetor 1177 com divisão de fluxo (1:50) e um detector Ionização em Chamas, uma coluna capilar VARIAN (WCOT sílica fundida) (5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano) com dimensões de 30 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 μm de espessura do filme (GOH, 1985; FREEDMAN et al., 1986; PLANCK, 1995). Conforme a Tabela 6, as condições de operação cromatográficas.

Tabela 6 - Condições Cromatográficas.

PARÂMETRO	VALOR
Fluxo da Coluna	1,2 mL/min
Temperatura do Detector	300°C
Temperatura do Injetor	290°C
Temperatura do Forno	150°C – 1 min / 240°C - 2 min / 300°C -21 min
Gás de Arraste	Hélio (99,95 %)
Volume Injetado	1,0 μL

3.2.2 Etanolise de óleo de babaçu utilizando a lipase Novozym 435 como catalisador.

O óleo de babaçu Clarificado (OLEAMA) e o álcool etílico P.A. (QUIMEX) foram escolhidos como substrato para ser utilizado na alcoólise enzimática em todos os experimentos, o meio foi isento de solvente orgânico.

As reações foram realizadas em frascos (balões) de 3 vias de 50 ml. A quantidade de óleo foi mantida fixa em 25 g e eram adicionados de 10 a 20 % p/p da lipase imobilizada. Os balões eram incubados em banho com controle de temperatura e com agitação magnética a

150 rpm no período de tempo determinado para cada experimento. A agitação mecânica era iniciada e, em seguida, era adicionado etanol em diferentes razões molares em relação ao óleo. Decorrido o período de tempo especificado, brecava-se a reação através da retirada da enzima do meio reacional através de sua filtração com o auxílio funil de vidro de placa porosa (retenção das enzimas para posterior recuperação e reutilização). No fluxograma abaixo (Figura 13) pode-se observar todas as etapas do processo de produção utilizado.

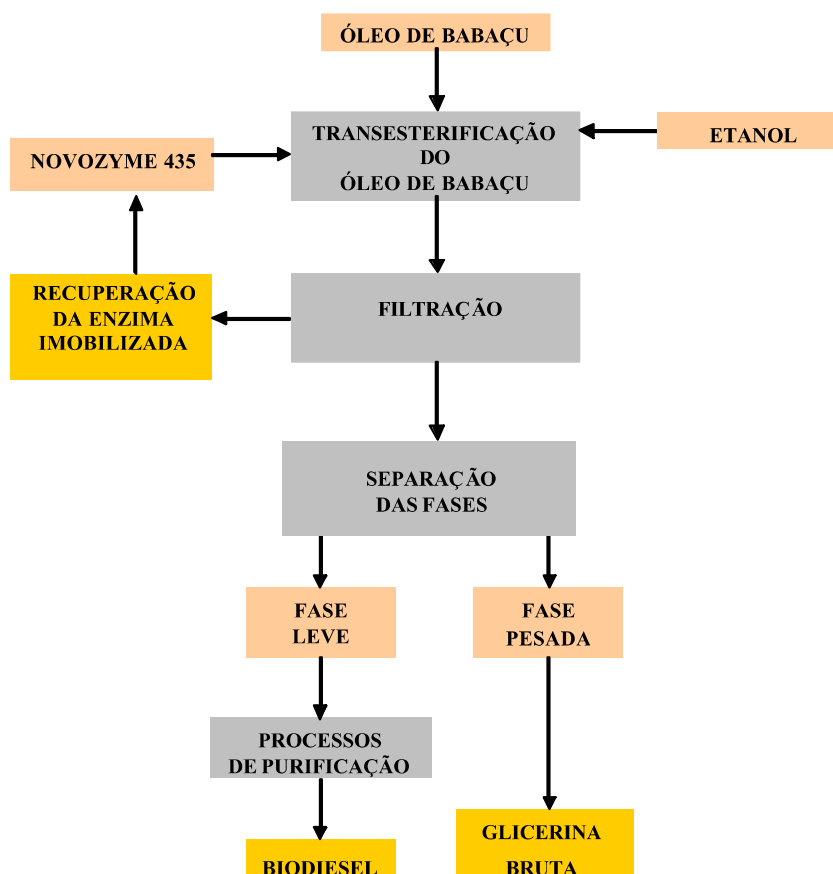


Figura 13 - Fluxograma do procedimento experimental na a reação de etanolise enzimática do óleo de babaçu utilizando a enzima Novozym 435.

Para a separação da glicerina liberada na síntese do biodiesel, o meio reacional foi submetido a uma etapa de purificação, constituída basicamente de uma lavagem com água destilada. O volume da amostra recolhido foi medido e em seguida adicionado o mesmo volume de água destilada. A mistura foi transferida para um funil de decantação, efetuando-se a lavagem com água e deixando a mistura em repouso por 30 min para a separação das fases.

A fase superior era composta pelos ésteres de etila (biodiesel) e a fase inferior por glicerol e água de lavagem. Após a decantação, a glicerina era separada e pesada e a fase superior submetida à secagem em estufa.

3.2.3 Método do planejamento de experimentos.

Nos últimos anos, os sistemas multivariados de otimização têm ganhado bastante força, demonstrando a sua utilidade nos mais variados campos do conhecimento. Dentro deste contexto, destaquem-se os estudos envolvendo processos biotecnológicos (DUEÑAS et al, 2003), sínteses orgânicas (KOCHANA et al, 2003), psicologia (SHARP e HARGROVE, 2004), processos químicos (MONTES, et al, 2004; HARDY et al, 2004) e, o que nos parece mais importante, otimização de processos industriais (GALETAKIS e RAKA, 2004; YI-ZENG et al, 2001).

JURAN et al. (1951) E MONTGOMERY (1997) recomendam o uso de técnicas clássicas de planejamento como, por exemplo, técnica de planejamento fatorial completo, fatorial, fracionado ou experimentos com pontos centrais, quando é importante investigar o efeito provocado nas respostas dos experimentos por dois ou mais fatores de controle.

BARROS NETO et al. (2002) diz que as propriedades de uma mistura são determinadas pelas proporções de seus ingredientes e não pela sua quantidade total. Além disso, as proporções dos diversos componentes de uma mistura não são independentes.

No presente trabalho usou-se a técnica de planejamento fatorial completo composto com quatro pontos centrais.

Para análise de dados, podem ser utilizados os softwares estatísticos (tais como o MINITAB, o EXCEL e o STATISTICA etc.) que ajudam a usar as técnicas de planejamento e análise de experimentos, além de gerar os gráficos lineares e os gráficos de probabilidade normal (WERKEMA & AGUIAR, 1996; MONTGOMERY, 1997). A análise estatística permite tomar decisões quanto a aceitar ou rejeitar as hipóteses formuladas na primeira etapa de experimentos (REY, 1993).

O programa Statistica versão 7 (StatSoft, Inc, 2004) foi utilizado para elaboração das matrizes dos planejamentos experimentais e posterior análises de dados.

Os três princípios básicos de um planejamento de experimentos são: replicação, aleatoriedade e blocagem. Fazer um experimento com réplicas é muito importante por dois motivos. O primeiro é que isto permite a obtenção do erro experimental. A estimativa desse erro é básica para verificar se as diferenças observadas nos dados são estatisticamente diferentes. O segundo motivo se refere ao fato de que, se a média de uma amostra for usada para estimar o efeito de um fator no experimento, a replicação permite a obtenção de uma estimativa mais precisa desse fator.

Os experimentos, com suas réplicas, foram realizados de forma aleatória, de modo a garantir a distribuição equânime de todos os fatores não considerados.

Antes de começar a realizar os experimentos, escolheu-se:

1. As variáveis envolvidas nos experimentos: tempo, temperatura, concentração de enzima no meio reacional, razão molar óleo/álcool.

2. A faixa de variação das variáveis selecionadas;

-Tempo [t]: de 8 a 24 h de reação

-Temperatura [T]: de 30 a 50 °C

-Concentração de enzima [E]: de 5 a 20 % p/p.

-Razão molar óleo álcool [R]: de 1:3 a 1:10 mol/mol

3. Dos níveis escolhidos para essas variáveis: Os níveis escolhidos para as variáveis em estudo foram baseados em dados da literatura e considerações.

4. Da variável de resposta: conversão e rendimento da reação.

5. O planejamento experimental.

Foi utilizado um planejamento fatorial completo para estudar os seguintes fatores que mais influenciam no processo de produção de biodiesel com a lipase imobilizada Novozym 435. O número de experimentos neste planejamento fatorial completo foi de 24, o que corresponde a 16 experimentos, com adição de 4 pontos centrais, ou seja, um total de 20 experimentos. A resposta foi teor de éster final e o rendimento.

O método da Análise da Variância (ANOVA - analysis of variance) foi desenvolvido por Ronald Fischer, em 1930 (MONTGOMERY, 1991). Esta análise foi utilizada para testar diferenças significativas entre médias comparando variâncias. Pode ser estranho que um procedimento que compara médias é chamado de análise de variância. Entretanto, este nome é devido ao fato que ao invés de testar a significância estatística entre médias, é verdadeiramente comparado (analisado) variâncias. Cabe lembrar que a variância (s^2) é computada como a soma dos quadrados dos desvios em relação à média total dividida pelo número de amostras menos 1. Portanto, a variância é uma função da soma dos (desvios) quadrados (SQ). No anexo 4 pode-se observar como é calculado os valores da tabela da ANOVA.

Para determinar se um valor F está suficientemente grande (estatisticamente), três aspectos dos dados devem ser considerados: o nível de significância necessário, os graus de liberdade associados à variância do numerador e os graus de liberdade associados à variância do denominador. A tabela da distribuição F de Snedecor que especifica valores exigidos para alcançar um nível de significância de 5% é fornecida no anexo 5.

Além da análise individual da influência de cada fator (concentração de enzima, temperatura, tempo e razão molar Óleo/Álcool) nas respostas (rendimento e teor de ésteres), é feita uma análise se há ou não interação entre os estes fatores estudados. Para isto, utiliza-se o programa computacional Statistica 7.0 que apresenta, através da representação gráfica, a ocorrência ou não de interação entre os fatores.

Para esta análise são considerados os valores médios tanto do rendimento como de teor de ésteres. Estes valores são calculados levando-se em consideração cada experimento e sua respectiva replicação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises Físico-químicas do Óleo de Babaçu

Na Tabela 7 são apresentados os resultados da análise do óleo de babaçu clarificado utilizado nos experimentos em termos de índice de acidez, índice de iodo, teor de umidade e viscosidade utilizando a metodologia descrita na seção 3.2.1.

Tabela 7 - Resultados das análises físico-químicas do óleo de babaçu

Características	Metodologia Aplicada	Resultados
Índice de Acidez (mg KOH/g)	AOCS	0,23 ±0,02
Índice de Iodo (g/100g)	AOCS	12,92 ±0,06
Umidade (%)	AOCS	0,22 ±0,10
Viscosidade Cinemática a 40°C (mm ² /s)	AOCS	31,05 ±0,92

Por se tratar de um óleo semi-refinado, o valor encontrado do índice de acidez (0,23 mg de KOH/ g de óleo) esta dentro da faixa adequada para utilização na reação de transesterificação. Óleos com elevado índice de acidez inibem a atuação de catalisadores químicos ou até mesmo bioquímicos (ROSENAAL, 1992).

Ainda não foi determinado um limite do índice de acidez para óleos para a utilização na produção de biodiesel, o valor de acidez encontrado não acarreta perdas significativas de rendimento durante o processo de alcoólise básica que considera um valor de até 2% para que não haja problemas na reação. Esta diminuição no rendimento da reação se deve ao fato de o catalisador ser consumido na neutralização dos ácidos graxos livres. Esta perda de rendimento é significativa para valores de índice de acidez acima de 2%. A partir deste valor ou procede-se a prévia neutralização do óleo com solução de NaOH 28 ° Bé em reator agitado e posterior lavagens do óleo com solução de NaCl e água ou procede-se a reação em duas etapas: esterificação e transesterificação (NBB, 2008).

O valor encontrado para o índice de iodo ficou dentro da faixa esperada de 10-18 g/100 g de óleo (JOURNEY to FOREVER, 2006). No caso do o óleo de babaçu, este índice teste foi utilizado como um parâmetro de pureza do óleo, visto que ele é classificado como saturado, pois apresenta 82 a 88% de ácidos graxos saturados na sua composição, com maior percentual

de ácido láurico (44 % em média). Isso significa que em sua porção (resíduos) de ácidos graxos todos os carbonos são ligados a dois átomos de hidrogênio e não tem dupla ligação. É por isso que o óleo se solidifica a temperaturas menores de 20 °C.

Quando a cadeia de ácidos graxos do triglicerídeo é quebrada e posteriormente re-esterificada com grupos etílicos (ou metílicos), os ésteres formados herdarão os mesmos ácidos graxos com as características de suas cadeias carbônicas. Isso significa que quanto maior o número de ligações saturadas, maior o ponto de névoa do combustível e este também tenderão a solidificar em temperaturas mais altas.

Quanto maior o valor do índice de iodo do óleo, maior o número de duplas ligações na cadeia dos ácidos graxos o que reduz a habilidade destes obter a conformação para a solidificação permanecendo no estado líquido. Apesar de ser uma vantagem quando se trabalha em ambientes de temperatura mais baixas; nos combustíveis provenientes de óleos não saturados existe a possibilidade polimerização, processo este que é acelerado nos motores de combustão interna onde são encontradas altas temperaturas. Neste caso aumenta a formação de gomas com o óleo polimerizado podendo causar falhas e danos precoces no motor.

A amostra de óleo utilizada apresentou teor de umidade baixo (0,22 %). A concentração de água é fator importante na biocatálise, visto que muitas enzimas requerem certa quantidade de água para manter sua conformação ativa. A habilidade de reter água pode diferir dependendo do tipo de enzima. Em muitos casos, a velocidade de reação é baixa quando o percentual de água é muito baixo, e aumenta drasticamente quando mais água é adicionada ao sistema. (KAIEDA, 2001).

Além dessas análises foi medida a viscosidade do óleo. A viscosidade é a medida da resistência ao escoamento de um líquido, constitui outra importante propriedade intrínseca dos óleos vegetais. Em relação ao diesel de petróleo, os óleos vegetais apresentam valores de viscosidade bastante altos podendo exceder a 10 vezes a do óleo diesel; e, em alguns casos, essa relação pode atingir índices 100 vezes maior, por isso é que eles devem ser transformados em alquil ésteres que apresentam viscosidades semelhantes ao diesel de petróleo.

A viscosidade cinemática a 40 °C do óleo babaçu foi de 31 mm²/s, cerca de 10 vezes maior que o do óleo diesel, como pode-se observar na Tabela 7. A alta viscosidade do óleo é o fator crítico da utilização direta do triglicerídeo em motores, pois pode causar sérios problemas de durabilidade no motor podendo causar coqueificação do bico injetor e depósitos na câmara de combustão. Ademais a combustão da fração glicerídica do óleo pode levar a formação de acroleína que por sua vez pode levar a formação de compostos considerados cancerígenos. Esta é uma razão do por que os ésteres dos óleos vegetais têm um desempenho superior em motores diesel que seus respectivos óleos de partida.

4.2 Planejamento estatístico dos ensaios experimentais

A tabela 8 mostra os fatores usados no planejamento experimental e os níveis estudados com seus respectivos valores e unidades.

Os níveis escolhidos para as variáveis em estudo foram baseados em dados da literatura e considerações práticas. O nível mais baixo escolhido para o fator tempo foi de 8 h e o mais alto foi de 24 h O nível mais baixo para temperatura foi à temperatura ambiente (25°C) e o mais alto foi de 50°C. O nível mais alto escolhido para a concentração de enzima foi de 20% e o nível mais baixo de 5 % p/p em relação à massa de óleo inicial e o nível mais baixo a razão molar óleo/etanol foi de 1:3 (estequiométrica) e o nível mais alto de 1:10 (233 % em excesso de álcool).

Tabela 8 – Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial:

Fatores	Nível (- 1)	Nível (0)	Nível (+ 1)	Unidade
1. Tempo [t]	8	16	24	h
2. Temperatura [T]	30	40	50	(°C)
3. Concentração de enzima [E]	5	12,5	20	(%p/p)
4. Razão molar óleo/álcool [R]	1:3	1:6,5	1:10	(mol/mol)

Pode-se observar na Tabela 9 a matriz experimental codificada usada para todos os experimentos, obtida através do software estatística 7.0.

Tabela 9 – Planejamento fatorial experimental:

Experimento	Concentração de enzima [E]	Tempo [t]	Temperatura [T]	Razão molar óleo/etanol [R]
1	-1	1	1	-1
2	1	1	1	-1
3	0	0	0	0
4	-1	1	-1	-1
5	1	1	-1	1
6	1	-1	-1	1
7	1	1	1	-1
8	-1	1	-1	1
9	0	0	0	0
10	1	1	-1	-1
11	-1	-1	-1	1
12	1	-1	-1	-1
13	1	-1	1	1
14	-1	1	1	1
15	0	0	0	0
16	-1	-1	-1	-1
17	1	1	1	1
18	-1	-1	1	-1
19	-1	-1	1	1
20	0	0	0	0

É importante ressaltar que os experimentos previstos pelo planejamento fatorial foram realizados randomicamente. Este cuidado visa evitar desvios estatísticos que possam comprometer a qualidade dos resultados obtidos e dos efeitos calculados para as variáveis estudadas.

4.2.1 Rendimento

Um parâmetro de grande importância para avaliar a viabilidade do processo de produção de biodiesel é o rendimento. O rendimento (R) das reações de síntese de biodiesel foi definido como o valor que expressa a massa total obtida de ésteres de etila (Mt) em relação a massa teórica esperada de ésteres de etila (Me). Me foi determinada a partir da massa de ácidos graxos presente na massa inicial do óleo de babaçu (M0), da massa molecular correspondente a cada ácido (MMa) e do éster correspondente (MMe). Este cálculo é representado pela Equação 2-a, em que M0 corresponde ao produto da concentração mássica de cada ácido graxo (Ca), com a massa inicial de óleo utilizada (Mi) (Equação 2-b). O rendimento foi calculado utilizando a massa total de ésteres obtida pela análise por cromatografia gasosa (Mt) pela massa teórica de ésteres de etila (Me), conforme mostrado na Equação 2-c.

$$Me = \frac{(M_0 \cdot MMe)}{MMa} \quad (a) \quad M_0 = Ca \cdot Mi \quad (b) \quad (c) \quad R = \frac{Mt}{Me} \times 100$$

Equação 2: a- massa teórica do éster, b-massa do óleo, c-rendimento.

O rendimento costuma ser decisivo na implantação de um processo enzimático em escala industrial. Baixas conversões do substrato no produto de interesse podem inviabilizar economicamente o processo, seja por custo do reagente, seja pelo custo advindo da dificuldade na separação e reciclo de reagente não convertido em produto desejado. Para o aperfeiçoamento das condições reacionais buscam-se soluções e alternativas tecnológicas para minimizar ou eliminar os efeitos dos problemas cinéticos ou de outra natureza que surjam durante a reação como: inibição por excesso de substrato e/ou produto, hidrólise do produto final, etc., de forma que a reação enzimática forneça o melhor rendimento possível.

Levando-se em conta essa importância foi realizado o estudo estatístico de modo a aperfeiçoar o processo, onde será aplicado também para a resposta teor ésteres. Na tabela 10 são apresentados os resultados experimentais obtidos na transesterificação enzimática do óleo de babaçu utilizando a lipase comercial imobilizada Novozym 435.

Tabela 10 - Resultados dos experimentos para o planejamento fatorial experimental para resposta teor de ésteres:

Experimento	Rendimento % em Massa [Y₁]
1	81,01
2	76,88
3	74,65
4	84,66
5	79,89
6	88,64
7	75,01
8	72,22
9	74,34
10	67,17
11	73,73
12	64,47
13	80,25
14	69,25
15	78,11
16	76,19
17	71,89
18	67,88
19	65,36
20	77,45

A seleção e o projeto do meio de reação para processos catalisados por derivados de enzimas são de grande importância quando se está projetando o desenvolvimento industrial destes processos. Eles devem ser feitos tendo-se em conta o efeito que cada variável pode ter sobre todos e cada um dos parâmetros assinalados acima. De modo geral busca-se realizar a reação em condições onde se possa obter alta concentração de substrato, onde se possam alcançar altos rendimentos de produtos, onde os substratos sejam muito estáveis, onde não se produza nem mesmo traços de produtos indesejáveis, onde a estereo- e régio- seletividade da

enzima sejam as maiores possíveis e onde a atividade e a estabilidade do biocatalizador seja ao menos moderadamente alta.

A Tabela 11 apresenta o efeito das principais variáveis do sistema sobre o rendimento da reação (R): a quantidade de enzima (1), o tempo (2), a temperatura (3) e a razão molar óleo/álcool (4). Além dos três efeitos principais (1), (2), (3) e (4), foram também calculados os efeitos decorrentes das interações existentes entre eles. Também são mostrados, os valores das médias e os erros padrões (desvio padrão) de cada efeito, o qual estima os possíveis erros de amostragem.

Tabela 11 - Efeitos estimados em função da resposta rendimento:

Fator	Efeito estimado	Erro puro	Significância estatística(p)	Coefficiente de regressão
Mean/Interc.	73,48	0,4293	0	73,48
(1)Quantidade de Catalisador	8,231	0,9599	0,003333	4,115
(2)Tempo	1,556	0,9599	0,2034	0,7781
(3)Temperatura	3,1537	0,9599	0,04623	1,577
(4)Razão molar O/A	6,694	0,9599	0,006052	3,347
1 e 2	-1,821	0,9599	0,1540	-0,9106
1 e 3	1,621	0,9599	0,1898	0,8106
1 e 4	6,401	0,9599	0,006875	3,201
2 e 3	2,036	0,9599	0,1240	1,018
2 e 4	-0,6387	0,9599	0,5534	-0,3194
3 e 4	-5,481	0,9599	0,0106	-2,741

Valores em vermelho apresentam-se significativos ao nível de 5% ($p = 0,05$).

Como pode se observar, os efeitos da quantidade de catalisador (1), Razão molar O/A e temperatura (3) foram considerados significativos ($p = 0,05$). Estes efeitos apresentam respostas significativas dentro da faixa de trabalho estipulada. Isto significa que o aumento linear da quantidade de catalisador, temperatura e da razão molar O/A aumenta a probabilidade de se obter melhores rendimentos durante os experimentos.

A interação entre os efeitos da quantidade de catalisador (1) e razão molar O/A (4) também foi significativa apresentando o mesmo sinal (positivo) que as variáveis anteriores. Isso implica que, caso haja elevação da quantidade de catalisador e da quantidade de álcool no meio reacional aumenta a chance dos experimentos terem melhores rendimentos.

Estes resultados são muito animadores e, de certa forma, até surpreendentes, principalmente pelo fato da enzima apresentar um rendimento muito alto em presença de excesso de álcool e temperaturas elevadas. Isto significa que a enzima além da estabilidade térmica possui também uma grande estabilidade química frente ao álcool utilizado (etanol). Utilizou-se um excesso de até 2,3 vezes a quantidade estequiométrica. Este fato pode ser explicado pelo caráter hidrofóbico que o suporte da Novozym 435 possui o que provavelmente evitou a adsorção do álcool na parte sólida do meio reacional e favoreceu, conseqüentemente o alcance de melhores rendimentos.

A maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta, Um aumento na temperatura imprime maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. As reações catalisadas por enzimas se comportam de modo até certo ponto semelhante. As enzimas são moléculas protéicas complexas. Sua atividade catalítica provém de uma estrutura terciária precisa, altamente ordenada que justapõe os grupamentos R específicos dos aminoácidos de modo a formar sítios estéreo-específicos de ligação com o substrato e o centro ativo. A estrutura terciária de da enzima é mantida principalmente por um grande número de ligações não covalentes fracas. Em termos práticos, uma molécula de enzima é uma estrutura muito delicada e frágil. Se a molécula absorve energia demais, a estrutura terciária romper-se-á e a enzima ficará desnaturada, isto é, perderá a atividade catalítica. Logo, à medida que aumenta a temperatura, é esperado o aumento na conversão, resultante do aumento das colisões entre enzima e substrato, que é compensado pelo aumento da velocidade de desnaturação. Conseqüentemente, um gráfico de conversão versus temperatura em geral apresenta um pico algumas vezes chamado de “temperatura ótima”. Esta depende do tempo escolhido para a realização das medidas. A verdadeira temperatura “ótima” para uma determinação é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um período de tempo pelo menos tão longo quanto o tempo da determinação

CRUZ JR., 2007 justifica o fato da Novozym 435 apresentar grande estabilidade térmica com a origem do microorganismo que produz a enzima, a *cândida Antártica*, sabe-se que esse microorganismo foi descoberto na Antártica e dessa forma produz enzimas que possuem grande estabilidade quando submetidos a baixas temperaturas. No entanto, curiosamente, as enzimas produzidas por esse microorganismo também possuem grande termo estabilidade quando submetidas a elevadas temperaturas. Este comportamento pode ser explicado pelo fato dos mecanismos envolvidos na resistência das enzimas em temperaturas extremas serem semelhantes.

Assim, a estabilidade frente ao solvente (químico estabilidade) assim como a termo estabilidade representa uma importante vantagem para o uso prático dessa enzima. Isto, também reforça a premissa de que a imobilização estabiliza a estrutura terciária da enzima tornando-a mais resistente aos agentes externos como temperatura e presença de solventes.

A Figura 14 apresenta o gráfico de Pareto obtido do planejamento experimental. Neste tipo de gráfico, o efeito é mais significativo para rendimento quanto mais à direita da linha vermelha ele estiver. O diagrama de Pareto foi usado para ilustrar graficamente essas influências, a um nível de 95 % de confiança, ($p < 0,05$).

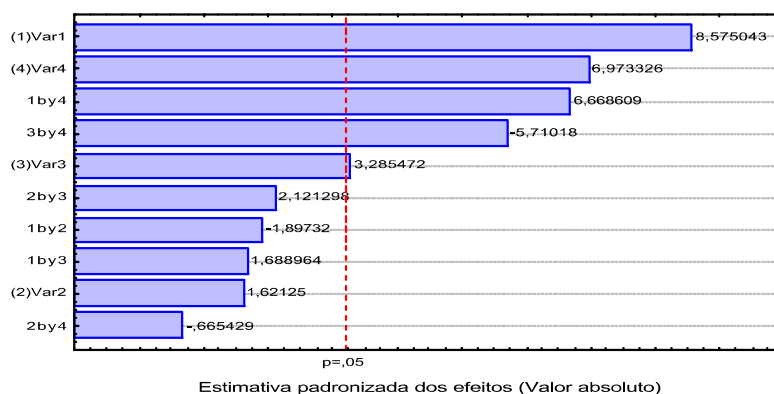


Figura 14 - Gráfico de Pareto para os efeitos significantes das variáveis e interações para a resposta rendimento.

A Tabela 12 corresponde à tabela da análise de variância para os estudos de rendimento em massa para cada um dos efeitos observados. Nesse testes de significância estatística de cada efeito é feita a comparação com a média quadrada em função do erro experimental.

Eliminando os fatores não significativos, verificou-se na análise de variância, pelo teste F (Tabela 12), a significância da regressão e a falta de ajuste ao nível de 5%.

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) em função do rendimento.

	Soma Quadrática	Nº de grau de liberdade	Media quadrática	F Calculado	F tabelado
Regressão (R)	876,8	10	87,67	6,534	3,14
RESIDUO (r)	120,8	9	13,42	-	-
FALTA DE AJUSTE	109,7	6	18,28	4,961	8,94
ERRO PURO	11,06	3	3,686	-	-
TOTAL	756	19	-	-	-

Pelo teste F (Tabela 13), verifica-se que a regressão foi significativa ($F_{cal} > F_{tab}$) ao nível de 5% e a falta de ajuste não foi significativa ($F_{cal} < F_{tab}$) no mesmo nível. Diante desses resultados e do valor de R^2 , pode-se concluir que o modelo ajustado para o rendimento foi preditivo. Modelo ajustado e coeficiente de determinação (R^2) para teor de ésteres:

Variável independente	Modelo	R^2
Rendimento	$=73,48 + 4,105x + 3,044 + 3,200xy + 0,1$	0,8781

x-quantidade de enzima; y: razão molar Óleo/álcool

O modelo para a resposta rendimento foi considerado preditivo por apresentar fatores de efeitos significativos, regressão significativa ($p = 0,05$). Neste caso, o coeficiente de determinação (R^2) para o modelo ajustado foi de 0,87808, indicando que o modelo explicou 87,81% da variação dos dados observados. Os parâmetros do modelo de primeira ordem foram determinados pelo modelo estatístico linear, obtido após avaliação das variáveis que se mostraram mais significativas no processo.

A superfície de resposta e as curvas de nível correspondente ao estudo dos fatores que mais influenciam na resposta rendimento são mostradas nas Figuras 15-16-17. E as demais superfícies de resposta e as curvas de nível que correspondem a todos os fatores e suas interações desde modelo ajustado estão no anexo 2.

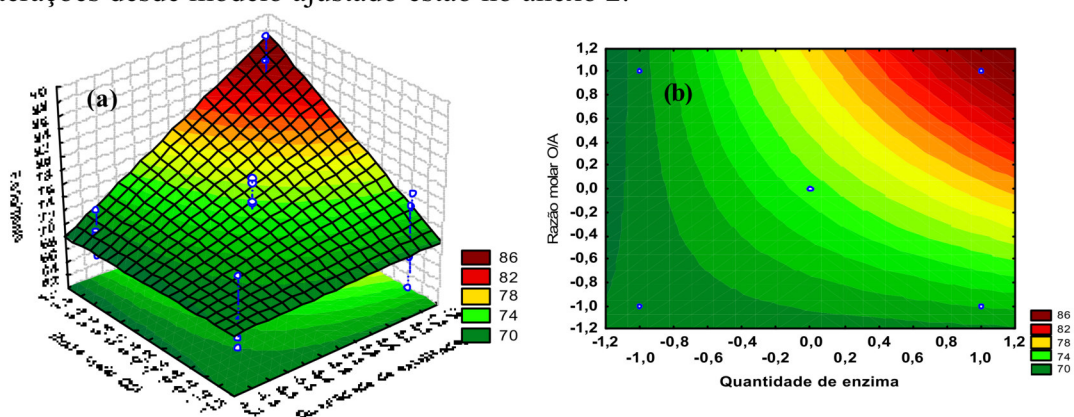


Figura 15 - (a) gráfico da superfície de resposta e (b) curva de contorno estimada pela relação entre os fatores 1-quantidade de enzima e 4 Razão molar O/A. para resposta rendimento.

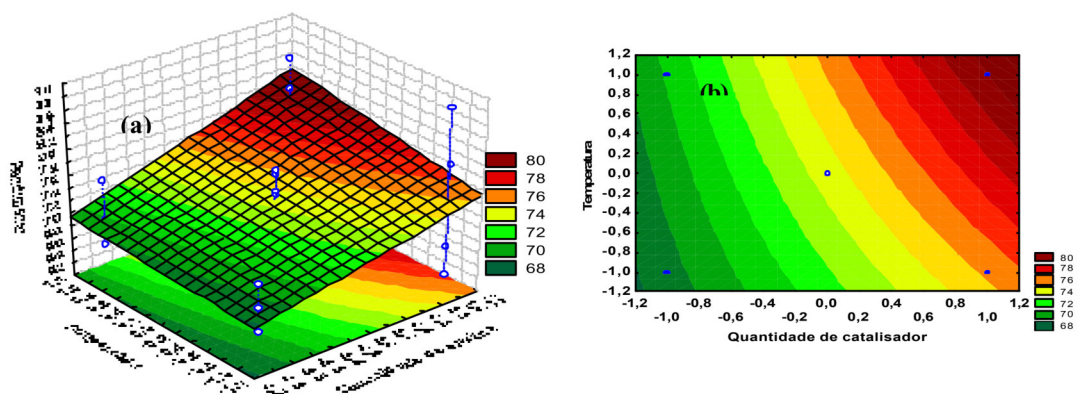


Figura 16 - (a) gráfico da superfície de resposta e (b) curva de contorno estimada para a relação entre os fatores 1- quantidade de enzima e 3-temperatura, para resposta rendimento.

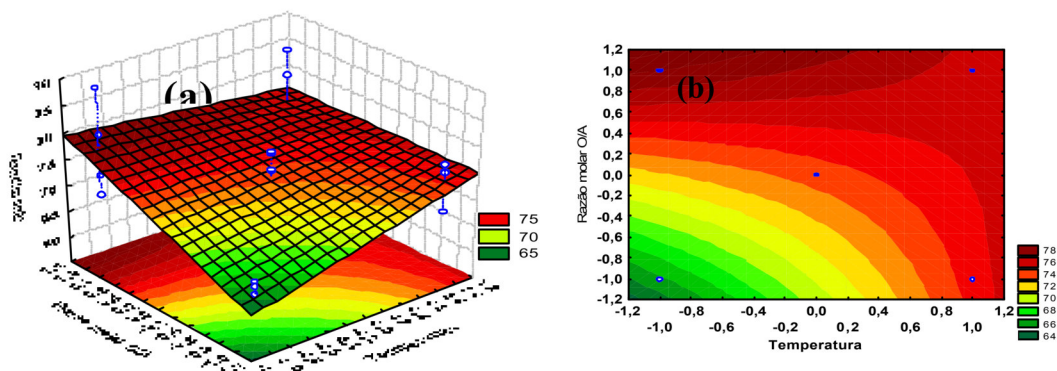


Figura 17 - (a) gráfico da superfície de resposta e (b) curva de contorno estimada para a relação entre os fatores 3- temperatura e 4-razão molar O/A, para resposta rendimento.

Segundo WATANABE et al, 2000, inicialmente os triglicerídeos são hidrolisados pela lipase em glicerídeos parciais e ácidos graxos livres, e depois são sintetizados os ésteres metílicos com metanol e os ácidos graxos livres. Isso sugere que, ácidos graxos livres contidos em óleos usados podem ser convertidos facilmente em ésteres na catálise enzimática.

URIOSTE (2004) no seu trabalho de produção de biodiesel por catalise enzimática do óleo de babaçu utilizando álcoois de cadeias curtas testou varias preparações enzimáticas, sendo a Novozym 435 a que apresentou melhor desempenho com rendimentos superiores a 50% e tempo de reação de 24 h.

4.2.2. Teor de ésteres

Um biodiesel de qualidade deve ter um teor em ésteres acima de 96% segundo normas européias, nas normas brasileiras essa característica não é especificada, ou seja, a ANP manda anotar o valor obtido. Os dados experimentais obtidos na transesterificação enzimática do óleo de babaçu utilizando a lipase comercial imobilizada Novozym 435, tendo como resposta o teor de ésteres são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados dos experimentos para o planejamento fatorial experimental para resposta teor de ésteres:

Experimento	Teor de Ésteres [Y₀]
1	96,2
2	96,8
3	95,7
4	95,2
5	97,5
6	95,8
7	98,2
8	94,3
9	96,1
10	96,5
11	95,4
12	96,1
13	96,7
14	96,2
15	96,4
16	95,1
17	97,9
18	95,6
19	96,8
20	96,3

Os efeitos estimados para cada variável e as correlações entre elas são mostrados na Tabela 14 em função do teor de ésteres obtidos em cada experimento. Também são mostrados, os valores das médias e os erros padrões (desvio padrão) de cada efeito, o qual estima os possíveis erros de amostragem.

Tabela 14 - Efeitos estimados em função da resposta do teor de ésteres

Fator	Efeito estimado	Erro puro	Significância estatística(p)	Coefficiente de regressão
Mean/Interc.	96,24	0,0692	0	96,24
(1)Quantidade de Catalisador	1,337	0,1547	0,0033	0,6687
(2)Tempo	0,4625	0,1548	0,0582	0,2312
(3)Temperatura	1,062	0,1548	0,0063	0,5312
(4)Razão molar O/A	0,1125	0,1548	0,5199	0,0562
1 e 2	0,7125	0,1548	0,0197	0,3562
1 e 3	-0,1375	0,1548	0,4399	-0,0687
1 e 4	-0,0375	0,1548	0,8241	-0,0187
2 e 3	0,1875	0,1548	0,3125	0,0937
2 e 4	-0,1625	0,1548	0,3709	-0,0812
3 e 4	0,0875	0,1548	0,6114	0,0437

Valores em vermelho apresentam-se significativos ao nível de 5% ($p = 0,05$).

Os efeitos da quantidade de catalisador (1) e temperatura (3) foram considerados significativos ($p = 0,05$) (Tabela 14), sendo este efeito positivo dentro da faixa de trabalho estipulada, com isso o aumento linear da quantidade de catalisador e da temperatura aumenta a probabilidade do experimento ter melhor resultado em teor ésteres.

Estes resultados eram esperados visto que a atividade catalítica da enzima é altamente dependente da temperatura, como no caso dos catalisadores convencionais e sob determinadas condições, a velocidade de transferência do substrato em produto é proporcional à quantidade de enzima. Desvios da linearidade podem ocorrer devido a: presença de inibidores no meio de reação que pode ocorrer com os sub-produtos como os mono e di glicerídeos; presença de substâncias tóxicas como o álcool; presença de um ativador que dissocia a enzima; e limitações impostas pelo método de análise.

A interação entre os efeitos da quantidade de catalisador (1) x tempo (2) foi significativa apresentando o mesmo sinal (positivo) que as variáveis anteriores. Isso implica que, caso haja elevação da quantidade de catalisador, consegue-se diminuir o tempo de reação obtendo melhor teor de éster no biodiesel. Este resultado pode ser explicado devido à possível limitação da velocidade da reação devido a problemas de difusão do substrato do seio do meio reacional para a superfície do catalisador e daí para os sítios ativos da enzima imobilizada nos poros da partícula do suporte. Esta limitação torna-se ainda maior nos instantes (horas) iniciais da reação, pois como a conversão do óleo ainda é pequena, a viscosidade do meio reacional é muito alta. A viscosidade do meio reacional vai diminuindo conforme a reação avança. Então se for adicionada maior quantidade de catalisador no meio, aumenta a quantidade de sítios ativos disponíveis para catalisar a reação diminuindo o tempo para alcançar o estado de equilíbrio.

À medida que se eleva a temperatura dois efeitos ocorrem simultaneamente: (a) a velocidade da reação aumenta, como se observa na maioria das reações químicas; e (b) a estabilidade da proteína decresce, apesar de estar no estado imobilizado e estabilizado, devido à desativação térmica. No processo de desnaturação térmica ocorre perda de atividade biológica da enzima. O processo de imobilização da enzima frequentemente protege a enzima da desnaturação pelo calor.

Toda enzima tem uma temperatura ótima para que atinja sua atividade máxima, ou seja, é a temperatura máxima na qual a enzima possui uma atividade constante por um período de tempo.

A Figura 18 apresenta os gráficos de Pareto obtido no planejamento experimental, no qual o efeito é tão significativo no teor de ésteres quanto mais à direita da linha vermelha ele estiver. O diagrama de Pareto foi usado para ilustrar graficamente essas influências, a um nível de 95 % de confiança, $p < 0,05$, conforme a Figura 18.

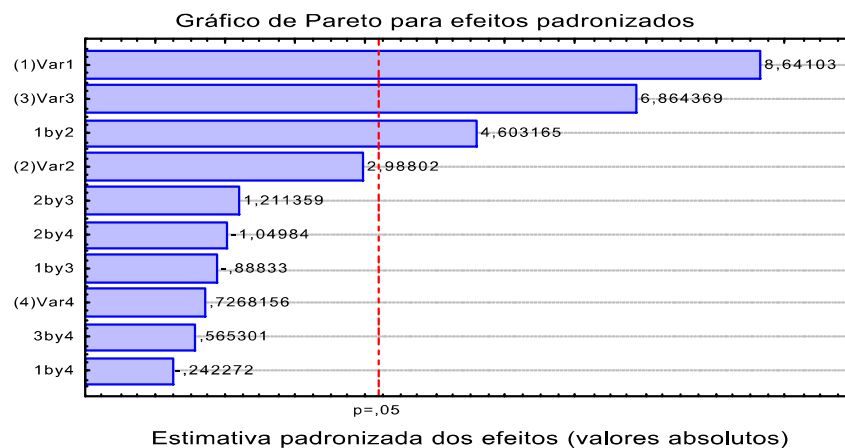


Figura 18 - Gráfico de Pareto para os efeitos significantes das variáveis e interações, para resposta teor de ésteres.

Pode-se observar através dos resultados apresentados na figura 18 que de todas as variáveis estudadas, a razão molar óleo/etanol foi a menos significativa e que a interação quantidade de catalisador/razão molar O/A possui a menor influencia no teor de éster final.

A Tabela 15 corresponde à tabela da ANOVA expressa à variabilidade em teor de ésteres para cada um dos efeitos observados respectivamente. Nesse testes de significância estatística de cada efeito é feita a comparação com a média quadrada em função do erro experimental. O valor de F é dado pela média quadrada entre grupos divididos pela média quadrada dentro de cada grupo.

Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA) em função do teor de ésteres:

	Soma Quadratica	Nº de grau de liberdade	Media quadratica	F Calculado	F tabelado
REGRESSÃO (R)	1051,13	10	105, 113	8,548	3,14
RESIDUO (r)	110,674	9	12, 297	-	-
FALTA DE AJUSTE	103, 605	6	17, 2675	4,685	8,94
ERRO PURO	11, 0571	3	3, 6857	-	-
TOTAL	940, 4528	19	-	-	-

O teste F, realizado pela análise de variância, tem como objetivo avaliar a adequação do modelo testando a significância da regressão e da falta de ajuste, onde a primeira tem que ser significativa ($F_{cal} > F_{tab}$) e a segunda não significativa ($F_{cal} < F_{tab}$), ao nível de 5% de significância ($p=0,05$).

Pelo teste F (Tabela 16), verifica-se que a regressão foi significativa ($F_{cal} > F_{tab}$) ao nível de 5% e a falta de ajuste não foi significativa ($F_{cal} < F_{tab}$) no mesmo nível. Diante desses resultados e do valor de R^2 (Tabela 17), pode-se concluir que o modelo ajustado para o teor de ésteres foi preditivo.

Modelo ajustado e coeficiente de determinação (R^2) para teor de ésteres: x-quantidade de enzima; y: temperatura:

Variável independente	Modelo	R^2
Rendimento	$73,479 + 4,51675x + 0,848y - 0,910625xy$	<u>0,8851</u>

O modelo para a resposta teor de ésteres foi considerado preditivo por apresentar fatores de efeitos significativos, regressão significativa ($p= 0,05$).

Segundo KHURI & CORNELL (1987), o coeficiente de determinação (R^2) é uma medida da proporção da variação total da resposta que é explicada pelo modelo. Portanto, quanto mais próximo o R^2 de 1 (100 %), melhor o modelo. Neste caso, o coeficiente de determinação (R^2) para o modelo ajustado foi de 0, 8851, indicando que o modelo explicou 88,51% da variação dos dados observados.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi usada para modelagem da reação de transesterificação e para aperfeiçoar condições reacionais. Os parâmetros do modelo de primeira ordem foram determinados pelo modelo estatístico linear obtido a partir da influência real de cada variável no processo.

A superfície de resposta é a verdadeira relação funcional existente entre a resposta e os fatores estudados. A superfície de resposta e as curvas de nível correspondente ao estudo dos fatores que mais influenciam na resposta do teor de ésteres são mostradas nas Figuras 19-20,

respectivamente. E as demais superfícies de resposta e as curvas de nível que correspondem a todos os fatores e suas interações desde modelo ajustado estão no apêndice 1 e 2.

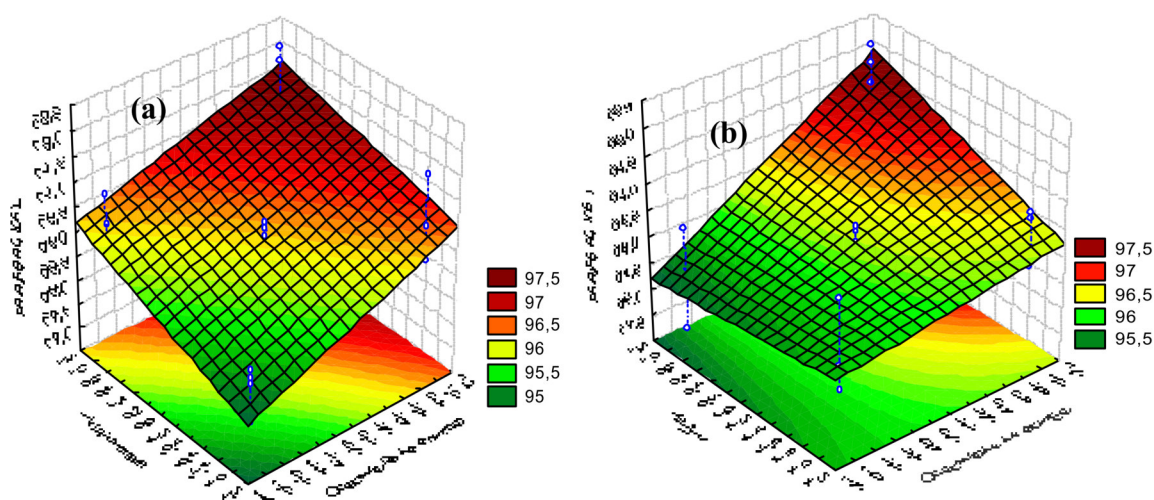


Figura 19 - (a) gráfico da superfície de resposta estimada pela relação entre os fatores 1- quantidade de enzima e 3: temperatura e (b) quantidade de enzima (1) e tempo (2), para a resposta teor de ésteres.

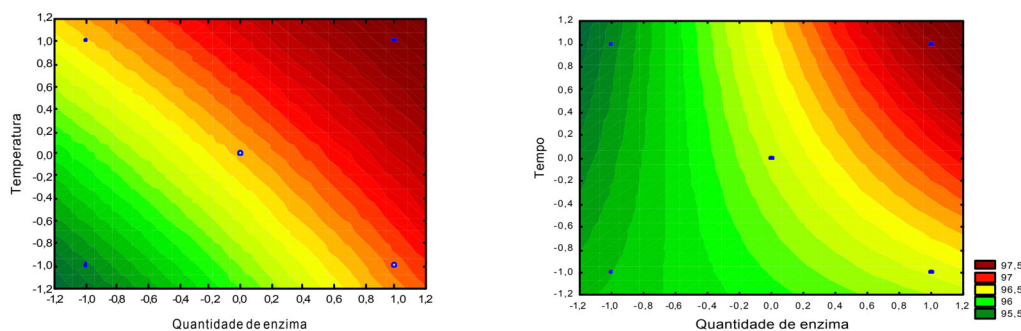


Figura 20 - (c) gráfico da curva de contorno estimada pela relação entre os fatores 1- quantidade de enzima e 3: temperatura e (d) quantidade de enzima (1) e tempo (2) para a resposta teor de ésteres.

Como mostra às Figuras 19 e 20, os experimentos com maior conversão a ésteres ficaram na região vermelho tijolo, que correspondem aos extremos da quantidade de enzima e temperaturas do planejamento experimental. Foi possível observar também um

comportamento similar quando levamos em conta o efeito da interação da quantidade de enzima e tempo.

4.3 Análise do biodiesel de babaçu etílico

Os valores mostrados na Tabela 16 representam às caracterizações físico-químicas do biodiesel de babaçu etílico empregando o catalisador a enzima imobilizada Novozym 435 que obteve melhor desempenho catalítico (experimento 7) e indicam que o biodiesel encontra-se nas condições permitidas pela Resolução 42 da ANP.

Tabela 16 - Análises físico-químicas do biodiesel de babaçu etílico

Parâmetros	Biodiesel de babaçu	Limite ANP
Índice de iodo (g/100g)	11,52	Anotar
Massa específica à 20°C (kg/m ³)	881,7	Anotar
Viscosidade cinemática à 40°C (mm ² /s)	3,910	Anotar
Ponto de entupimento de filtro à frio (°C)	1	2
Teor de água (%)	300	500
Teor de enxofre (%)	ND	0,001
Teor de ésteres (%)	98,20	96,5
Glicerina livre, Max. (%)	0,017	0,02
Etanol, Max (%)	0,05	0,50

Anotar: os valores dos parâmetros estão relacionados ao óleo vegetal empregado e ao órgão que estabelece os limites máximos e mínimos das análises físico-químicas do biodiesel.

O índice de iodo é um indicativo do número de duplas ligações no biodiesel. Uma limitação de ácidos graxos insaturados pode ser necessária, devido ao fato que um alto aquecimento dos ácidos graxos insaturados resulta na polimerização dos glicerídeos. Isto pode conduzir na formação de depósitos ou para deterioração do óleo lubrificante. Este efeito aumenta com o número de duplas ligações na cadeia de ácido graxo. Foi proposto que biodiesel com um valor de iodo acima 115 aumenta o risco de polimerização no motor.

Na amostra obtida nos experimento 7 obteve-se índice de iodo de 11,52 g por 100g de amostra, sendo este valor já esperado devido a origem do óleo de partida ser o óleo de babaçu, que é um óleo formado por maioria de ácidos graxos saturados.

A Viscosidade de um fluido é a sua resistência ao fluxo sob a ação da gravidade. Uma das principais razões do controle da viscosidade dos biocombustíveis é a melhoria de suas características de escoamento. A viscosidade dos óleos vegetais puros é de 10 a 15 vezes maior que a viscosidade do óleo diesel. O biodiesel com altos ou baixos valores de viscosidade afeta o fluxo do combustível nos tubos, bocais e orifícios de injeção e a temperatura varia de maneira significativa na combustão desse combustível. Assim, a viscosidade pode causar problemas no injetor, reduzindo a vida útil do motor.

A viscosidade obtida em torno de 3,9 mm²/s esta dentro dos limites estabelecidos pelo órgão de controle (ANP).

O ponto de entupimento de filtro a frio é a temperatura a qual cristais de cera precipitam do combustível. O ponto de entupimento de filtro a frio mostra quase linear dependência com respeito a ponto de névoa e é um bom indicador dos limites de operabilidade.

Problemas de operabilidade e armazenamento podem surgir de um ponto de entupimento de filtro a frio, como entupimento do filtro e solidificação do tanque de combustível.

Os óleos saturados geralmente apresentam pontos de entupimento a frio elevados, na amostra analisada o valor encontrado de 1 °C encontra-se dentro dos limites vigentes para o B100.

Água pode surgir em qualquer combustível durante seu processamento químico. No entanto, seu aparecimento é mais comum no biodiesel do que em combustíveis destilados. A quantidade de água no combustível depende de sua solubilidade e pode acumular por umidade do ar que entra em áreas de armazenamento através de ventos e lacres. O teor de água obtido na amostra de 300 ppm encontra-se dentro dos limites para esse parâmetro, é importante ressaltar que a norma vigente estabelece limites para água e mais sedimentos.

Durante a armazenagem o biodiesel pode absorver cerca de 1000 ppm de água, portanto estabelecer um limite abaixo deste valor não é o mais adequado. É importante verificar o teor de álcool no biodiesel, pois quanto maior a sua concentração maior será o conteúdo de água absorvida. Por exemplo, um biodiesel com um teor de 0,2% de metanol pode ter uma concentração máxima de água de 1500 ppm.

A ANP não faz a diferença entre o conteúdo de água dissolvida e água livre, portanto não indica limites e métodos específicos para a determinação do conteúdo de água livre. A norma europeia prEN 14214 e americana ASTM D 6751, também não estabelecem um limite para conteúdo de água dissolvida.

O óleo vegetal ou animal, em geral tem menos de 15 ppm de enxofre. Muitos pesquisadores afirmam que o biodiesel puro é essencialmente livre de enxofre ou com um teor de enxofre muito baixo.

Geralmente são impostos limites de enxofre por razões ambientais. O diesel de petróleo contém enxofre e quando queimado emite para atmosfera dióxido de enxofre (SO₂) e material particulado. Assim, ao compararmos o combustível diesel com o biodiesel pode-se obter uma redução total de óxidos de enxofre e aerossóis em termos de matéria particulada.

Não foi detectada a presença de enxofre na amostra analisada, isso pode indicar que a amostra é virtualmente livre de enxofre ou a quantidade está abaixo do limite de detecção do método.

Uma conversão mais elevada de óleos para ésteres aumenta o desempenho dos motores. Óleos vegetais são constituídos basicamente por triglicerídeos e quantidades residuais de outras substâncias apresentando por isso uma viscosidade alta. Viscosidade elevada é associada com depósitos de carbono. Os triglicerídeos parcialmente reagidos possuem baixa solubilidade nos ésteres metílicos e precipitam à baixa temperatura. Outras impurezas que afetam a concentração dos ésteres é o teor de glicerol livre e o resíduo de álcool.

O método padrão europeu para biodiesel prEN 14214 estabelece um limite mínimo para conteúdo de ésteres de 96.5% em massa. Ele especifica o método padrão prEN 14103 para determinar o teor de ésteres.

Por sua vez, a norma padrão americana ASTM D 6751 não indica nenhuma especificação para teor de ésteres. O teor de ésteres metílicos geralmente é analisado através de cromatografia a gás.

Todas as amostras foram analisadas por cromatografia a gás para determinação do teor de ésteres. O experimento 7 foi o que apresentou maior teor de ésteres(98,20%), sendo o experimento 8 o que teve o menor (94,30%).

Glicerol livre (ou glicerina) é um subproduto do processo de transesterificação e é separado durante o processamento do éster, sendo vendido como subproduto. Porém, algum glicerol livre pode permanecer no éster devido à separação ineficiente ou insuficiente durante o processo de transesterificação.

No que diz respeito às conseqüências de sua atuação nos motores diesel, um conteúdo mais alto de glicerol livre pode causar problemas durante o armazenamento ou mesmo no sistema de combustível devido à separação do glicerol, podendo levar à formação de emissões de aldeído muito elevadas. A glicerina livre é associada com depósitos em motores no fundo dos tanques de combustível atraindo outras combinações como água e monoglicérides.

O teor de glicerina encontrado foi de 0,017 %, sendo este valor abaixo do valor máximo permitido que é de 0,02%.

Metanol e etanol são geralmente usados na produção de biodiesel. Estes podem ser encontrados no produto final da reação de transesterificação em pequenas quantidades. O etanol tem um baixo ponto de fulgor que pode afetar o ponto de fulgor global do combustível biodiesel. Vale lembrar que o ponto de fulgor é a temperatura à qual o combustível entra em ignição quando na presença de uma centelha.

Altas concentrações de etanol (> 5%) tendem a ocasionar um aumento sobre o número de cetano e lubricidade do combustível e atenuação o ponto de fulgor. Baixos pontos de fulgor são associados a emissões seguras no armazenamento e no próprio motor.

O teor de álcool na amostra de 0,05 % esta bem abaixo do estabelecido pela ANP (0,5%), ou seja, 10 vezes menor. Mostrando que o processo de purificação foi realizado com eficiência.

4.3.1 Análise cromatográfica do biodiesel de etílico

A Tabela 17 apresenta a composição média dos ésteres etílicos e de ácidos graxos do óleo de babaçu obtidos por cromatografia gasosa empregando a enzima imobilizada Novozym 435.

Tabela 17 - Composição média dos ésteres etílicos de babaçu

Ésteres etílicos	Massa molar dos ésteres	%(ésteres)
Compostos		
Octanoato	186	8,66
Decanoato	214	19,15,
Dodecanoato	242	30,12
Tetradecanoato	270	19,25
Hexadecanoato	284	8,22
Oleato	282	5,11
Estearato	280	6,48
A	-	0,15
B	-	0,44
C	-	0,31
D	-	0,35
Total	-	98,2

A-D: correspondem aos picos dos ésteres não identificados pela análise cromatográfica.

A Tabela 17 ilustra o teor de ésteres presente no biodiesel de babaçu etílico empregando o a lipase Novozym 435 com conversão de 98,20%. O teor de ésteres foi superior ao estabelecido pelas normas de diversos países da comunidade europeia que é de 96,5% e um rendimento percentual bem significativo de biodiesel puro, ou seja, 77,01%.

A Figura 21 apresenta o cromatograma dos ésteres etílicos de babaçu. Pode-se observar que a uma boa separação entre os picos, com exceção dos picos do estearato e oleato, que tiveram seus picos em tempos de retenção muito próximos, causando sobreposição dos picos.

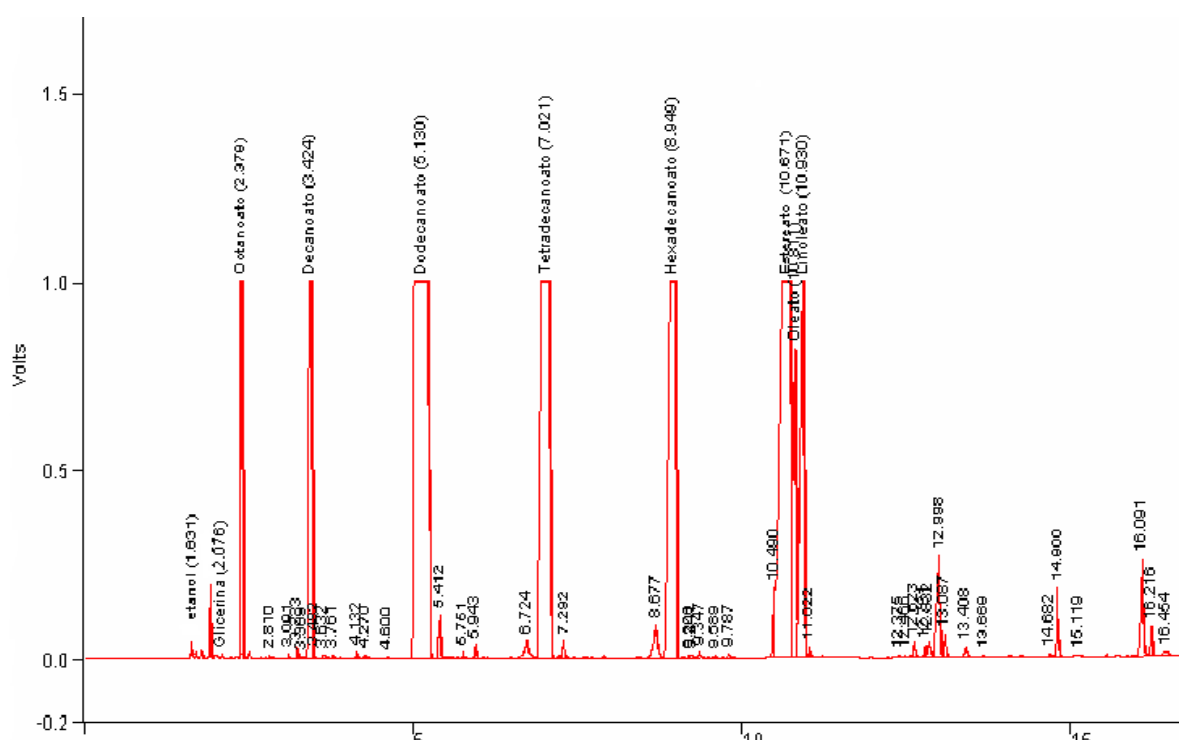


Figura 21 - Cromatograma do biodiesel etílico de babaçu.

4.3.2 Análise do óleo de babaçu e do biodiesel etílico usando a técnica da espectrofotometria no Infravermelho.

Na Figura 22 pode-se observar o espectro do óleo de babaçu e do biodiesel etílico de babaçu, onde é mostrado o número de ondas e a transmitância de cada banda e estiramento. Na Tabela 18 são listados os valores atribuídos às frequências de vibração correspondentes para biodiesel e óleo de babaçu.

Alguns picos importantes do grupo dos ésteres estão encobertos por picos de impurezas ou não são claramente visíveis. Como os picos da ligação C-O, que podem aparecer com duas ou mais bandas entre 1000 e 1300 cm^{-1} , o pico da ligação alquil C-H situa-se entre 1350 - 1480 cm^{-1} .

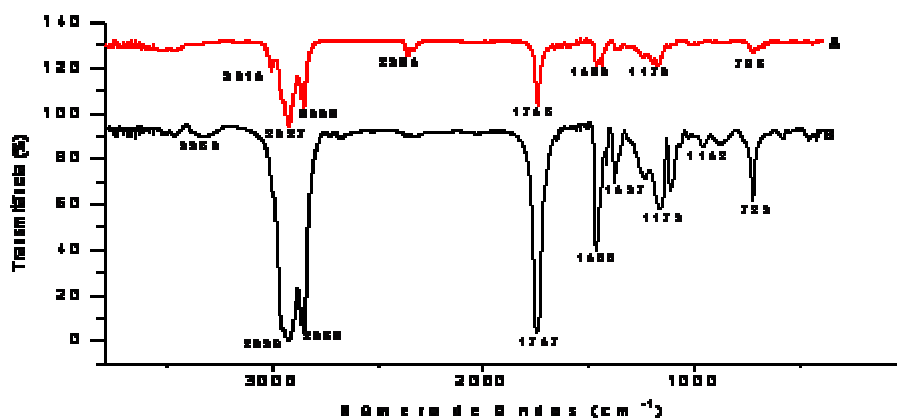


Figura 22 – Espectros na região do infravermelho. Sendo (A) óleo de babaçu e (B) biodiesel de babaçu.

Alguns picos importantes do grupo dos ésteres estão encobertos por picos de impurezas ou não são claramente visíveis. Como os picos da ligação C-O, que podem aparecer com duas ou mais bandas entre 1000 e 1300 cm^{-1} , o pico da ligação alquil C-H situa-se entre 1350 - 1480 cm^{-1} .

No espectro típico do óleo de babaçu apresentado na Figura 22, se observa picos muito fortes devido ao estiramento da ligação C-H na região de comprimento de onda de 2836 - 2927 cm^{-1} e da ligação C=O na região de 1745 cm^{-1} . O espectro apresentou uma banda de baixa intensidade em 3324 cm^{-1} referente à vibração de estiramento da ligação O-H. Esta banda é atribuída à presença de umidade e tem uma amplitude larga porque o grupo hidroxila não está livre, mas participando de ligações hidrogênio intermoleculares.

Tabela 18 – Valores das frequências de vibração na região do IV da amostra de óleo de babaçu.

Número de Onda (cm^{-1})	Intensidade	Atribuição
3324	Fraca	O-H
2928	Muito Forte	CH_2 , CH_3
2854	Muito Forte	CH_2 , CH_3
1747	Muito Forte	C = O
1466	Forte	CH_2
1418	Fraca	CH_2
1378	Muito Fraca	C-O
1233	Média	C-O
1162	Fraca	C-O
960	Muito Fraca	C-O
870	Muito Fraca	C-O
722	Média	CH_2

É importante salientar que este método serve para comparação qualitativa da formação dos ésteres, pois, o pico que caracteriza o grupo dos ésteres é claramente visível nas amostras de biodiesel. Este pico é muito agudo e pode ocorrer entre $1735\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$, sendo mais esperado em 1745 cm^{-1} , pois a molécula esperada é do tipo $\text{RCO}_2\text{R}'$, como pode ser visto na Figura 23.

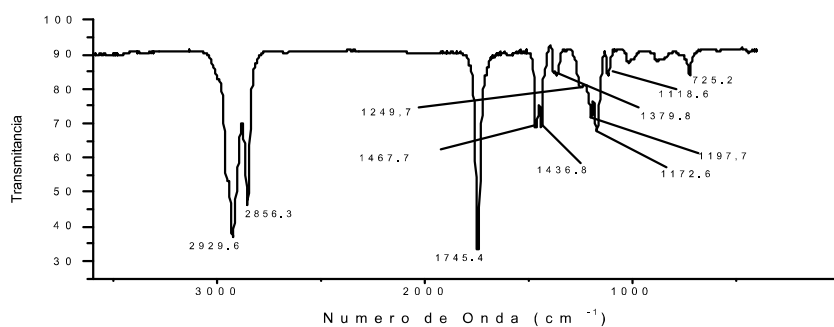


Figura 23 – Espectro na região do Infravermelho da amostra de biodiesel etílico de babaçu.

4.4 Reaproveitamento das enzimas

A enzima Novozym 435 é uma enzima imobilizada em resina macroporosa e apresenta uma área superficial $860\text{ m}^2/\text{g}$, esta característica confere a enzima uma maior interação com o meio reacional. Ademais, por ser imobilizada, permite sua reutilização e facilita sua recuperação. Ademais o processo enzimático torna-se mais atrativo devido a facilidade de separação do produto (biodiesel) do sub-produtos.

O teste de reaproveitamento foi realizado utilizando as mesmas condições reacionais do experimento 7, sendo estas tempo de 24 horas, massa da enzima 20%, temperatura $50\text{ }^\circ\text{C}$ e razão molar óleo/álcool 1:10. A adição do álcool foi realizada em três etapas para minimizar o efeito da desativação das enzimas por este solvente. A Figura 24 mostra o resultado de 10 ciclos (bateladas).

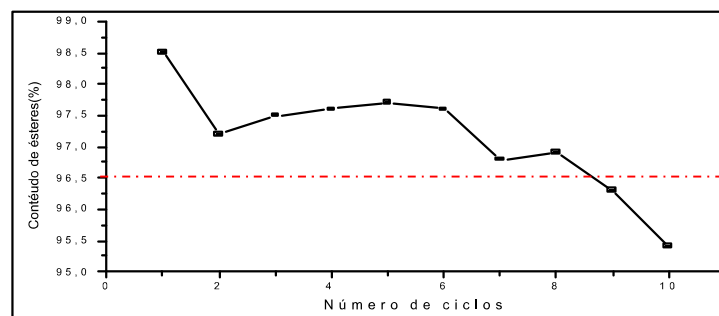


Figura 24 - Gráfico dos ciclos de reaproveitamento de enzima imobilizada.

Uma grande vantagem da enzima imobilizada é que ela pode ser reutilizada varias vezes. Pode-se observar que o conteúdo de ésteres diminui à medida que vai se reutilizando a enzima ciclo 1 ao ciclo 10, este decréscimo pode esta relacionada com a perda da atividade enzimática. A linha vermelha na Figura 24 mostra o limite do teor de ésteres segundo a norma européia. É importante lembrar que a ANP não estabelece limites para o teor de ésteres.

HERNANDEZ-MARTÍN e OTERO (2007) mostraram que a Novozym resistiu muito mais ciclos de reutilização que a Lipozyme TL IM. A Novozym 435 retém 84% de sua atividade inicial depois de 9 ciclos, enquanto Lipozyme TL IM só tem aproximadamente 10% de sua atividade inicial depois do primeiro ciclo. Depois de 24 h (igual ao tempo de ciclo para Lipozyme TL IM), Novozym 435 perdeu só cerca de 10% da sua atividade inicial na presença de uma concentração muito mais alta de etanol. Isso mostra que a Novozym 435 apesar de não ser tão especifica é mais robusta em relação ao efeito deletério do álcool.

COSTA NETO (2002) no seu trabalho de obtenção de ésteres alquílicos por via enzimática utilizando como substrato óleo de soja, testou a reutilização da Lipolase/ágar e Lipozyme imobilizada comercial, assim ele evidenciou que a preparação Lipolase/Agar manteve constante os resultados das conversões de óleo em ésteres por três vezes consecutivas, ao contrário da Lipozyme que perdeu a atividade após a primeira utilização.

LIU et al (2006) estudaram o efeito do metanol frente à estabilidade da enzima Novozym 435 na produção de biodiesel de óleo de soja desodorizado, onde a enzima manteve-se praticamente estável após ser utilizada por 10 ciclos.

Outro fator que pode ser ressaltado é que a glicerina produzida durante a reação pode ficar adsorvida dentro do suporte da enzima como pode ser observado na Figura 25-B, e isso levar a perda drástica da atividade pelo seu acúmulo.

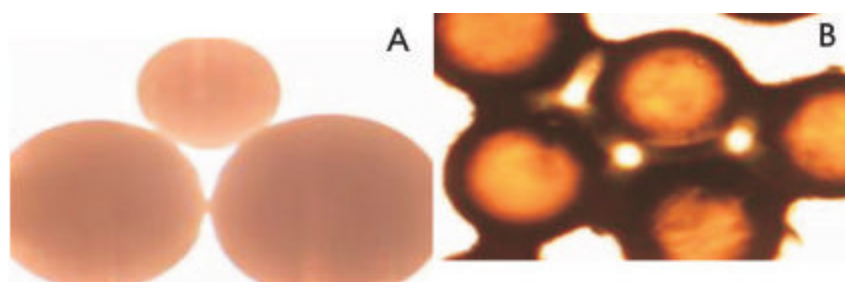


Figura 25 – (A) Enzima pura antes da reação. (B) Enzima após a reação.

4.5 Pré-tratamento das enzimas

Devido o fato de que a enzima é uma estrutura muito frágil mesmo estando em sua forma imobilizada, diversos pesquisadores buscam métodos para diminuição da perda de atividade nos processos enzimáticos. Nos processos de produção de biodiesel, os métodos mais utilizados é o de adicionar um solvente orgânico para diminuir o efeito de desativação da enzima pelo álcool empregado. Os álcoois que possuem sua maior cadeia alifática são menos nocivos a enzima. Entretanto, esse método aumenta muito o custo do processo. Outro método usado seria de pré-incubação da enzima no substrato ou em um meio que ajude a manter a conformação da enzima de forma que haja maior disponibilidade dos seus sítios ativos para a reação. Como base nessa informação foram realizados os testes de pré-incubação da enzima.

O efeito do pré-tratamento da lipase 435 em metanol para metanólise de óleos foi investigada por Samukaiva et al. 2000. Segundo o autor, a metanólise progrediu muito mais rápido quando a Novozym 435 foi pré-incubada em metiloleato por 0,5 horas e subsequentemente em óleo de soja por 12 h. Como resultado, a taxa de conversão atingiu 97 % em 3,5 horas de reação, com adição contínua de 0,33 moles de metanol após cada 0,25-0,40 h de reação.

MITTELBAACH, 1990, reportou a transesterificação dos álcoois primários: metanol, etanol e 1-butanol, com e sem éter de petróleo como solvente. Os resultados mostram que as taxas de conversão obtidas para etanol e 1-butanol foram relativamente altas, tanto na presença, quanto na ausência de solvente orgânico. No entanto, na reação com metanol somente traços de ésteres metílicos foram obtidos.

ABIGOR et al., 2000; também observou que na conversão de óleo de palma por lipase P. Cepácia, o etanol atingiu melhores taxas de conversão (72%) que o metanol (15%).

A Tabela 19 mostra os resultados obtidos dos ensaios com tratamento o pré-tratamento das enzimas para alcoólise de óleo de babaçu. Pode-se verificar que sem nenhum tratamento a lipase apresenta uma baixa conversão em éster (53,3%) após 8 horas de reação. Quando a enzima é imersa em éster etílico (biodiesel) há um aumento significativo na conversão do óleo de babaçu. Pode se observar também que o tempo de imersão no óleo por toda a noite (período de 15 h) não foi significativo em relação à imersão em apenas 5 horas.

Tabela 19 - Efeito do pré-tratamento (imersão) das enzimas em relação ao teor de ésteres:

Ensaio	Tipo de tratamento	Teor de ésteres (%)
1	Nenhum	53,3
2	Imersão em óleo de babaçu por 5 h	60,0
3	Imersão em óleo de babaçu por toda noite	68,2
4	Imersão em biodiesel etílico por 0,5 h e depois óleo de babaçu por 5 h	93,2
5	Imersão em biodiesel etílico por 1 h e depois óleo de babaçu por 5 h	96,5
6	Imersão em biodiesel etílico por 1,5 h e depois óleo de babaçu por 5 h	95,8
7	Imersão em biodiesel etílico por 2 h e depois em óleo de babaçu por 5 h	96,0
8	Imersão em biodiesel etílico por 0,5 h e depois óleo de babaçu por toda noite	96,5
9	Imersão em biodiesel etílico por 1 h e depois óleo de babaçu por toda noite	96,6
10	Imersão em biodiesel etílico por 1,5 h e depois óleo de babaçu por toda noite	96,8
11	Imersão em biodiesel etílico por 2 h e depois óleo de babaçu por toda noite	96,6

SHIMADA et al., 1999; observaram que a lipase imobilizada de *C. antártica* (Novozym 435) mostrou-se mais efetiva na metanólise do que outras lípases testadas. O grupo desenvolveu um processo de adição do metanol em etapas, o que se mostrou necessário, uma vez que a enzima foi desativada pela agitação em sistemas contendo mais de 1,5 moles de metanol por mol de óleo. Como resultado, foi mantida uma taxa de mais de 95% de conversão após 50 ciclos de reação, em processo de adição contínua de metanol

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

5. CONCLUSÕES.

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial da utilização de biocatalisadores, isto é, o emprego da lipase comercial Novozym 435, na alcólise enzimática de óleo de babaçu clarificado, assim:

Os resultados de transesterificação mostraram que esta catalise (etanólise) do óleo de babaçu ocorreu de forma eficiente.

Alcançando-se rendimentos de 64,5 (experimento 12) a 88 % (experimento 6) com 20% enzima, 8 horas de reação, temperatura de 30 °C e razão molar 1:10) e teores de ésteres variando de 94,3 (experimento 8) a 98,2 (experimento 7).

A lipase imobilizada permite a sua reutilização o que pode reduzir os custos de produção.

O processo enzimático traz vantagens ambientais em relação ao processo tradicional como: menor gasto energético com temperatura e pressão alta, maior facilidade de recuperação dos produtos e menor quantidade de glicerol como subproduto.

Na caracterização do óleo de babaçu e biodiesel a técnica IR mostrou-se eficaz para o acompanhamento dos ésteres formados.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo com base os resultados obtidos neste trabalho, algumas sugestões para trabalhos futuros podem se apontadas em função da forma de condução do processo:

- ✍ Testar a utilização de álcool etílico hidratado como substrato.
- ✍ Testar a utilização de óleo de babaçu bruto como substrato.
- ✍ Avaliar o desempenho do sistema reacional, em termos de conversão, em outros modelos de reatores, tais como: reatores de coluna de leito fixo e reações assistidas por microondas.
- ✍ Fazer um estudo mais abrangente a respeito da purificação e reaproveitamento da enzima para o processo de alcoólise enzimática.
- ✍ Efetuar um estudo econômico da produção de biodiesel por via enzimática, adotando o processo aqui proposto.

REFERÊNCIAS

ABIGOR, R.; et al. **Lípase-Catalysed Production of Biodiesel Fuel from Nigerian Lauric Oils.** *Biochemical Society Transactions*, [S.I.]:[s.n.] v. 28, p. 974-981, 2000.

ABOISSA REPRESENTAÇÕES. **Óleos Vegetais.** Disponível em: <<http://www.aboissa.com.br>>. Acesso em: 05 nov. 2006.

ACRE, A. R.; HAMMOND, R.C. Present and future applications of lipases. In: __. **Biotechnology and Genetic Reviews**, [S.I.], intercept Ltd., v.3, 1985.

ALBUQUERQUE, G. A. de. **Obtenção e Caracterização Físico-Química do Biodiesel de Canola (Brassica napus).** 2006. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.2006

AI SAADI, A. N. JEFFREYS S. G.V. Esterification of butanol in a two phase liquid-liquid system. *ALChE Journal*. v. 27, p. 754-772, 1981. ANP: O Brasil regulamentou o uso da mistura 20% de biodiesel. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/>>. Acesso em: 22 dez 2006.

ANDERSON, A., ANDERSON, S. **People and the palm forest: biology and utilization of babassu palm in Maranhão, Brazil.** Gainesville, University of Florida, 1983.

ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Portaria nº 30/2003. Regulamento Técnico nº 20/2003. <<http://www.anp.gov.br/>>. Acesso em: 21 dez 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, 2003. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 05 jan. 2007.

ARAÚJO, P. E. S. de. **Implicações Técnicas do Biodiesel em Relação ao Diesel utilizado em Motores a Combustão Interna.** 2005. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro Mecânico. Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, MA, 2005

ASANO, Y., FUKUDA. Y. S. TANAKA. A. e UEDA, M. “Biofuel production process by novel biocatalysts”. *Journal of molecular catalysis – B: enzymatic*, [S.I.], v. 17, p. 111, 2002.

BAN, K. KAIEDA, et. al. **Whole Cell Biocatalyst for Biodiesel Fuel Production Utilizing Ruinous oryzae Cells Immobilized with in Biomass Support Particles.** *Biochem. Eng. J.*; n. 8; 39-43; 2001.

BASHEER, S.; MOGI, K.; and NAKAJIMA, M. **Interesterification Kinetics of Triglycerides and Fatty Acids with Modified Lipase in n-Hexane**, *J. Am. Oil Chem. Soc.* v. 72; n. 5; 511-518; 1995.

BONN, E.P.S.; PEREIRA JR, N. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: Fundação Biblioteca Nacional; 113 p.; 1999.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio, Secretaria de Tecnologia Industrial. Obtenção de Combustível de Óleo Vegetal em Nível de Propriedade Rural. Brasília, STI/CIT, 98 p. **Doc. 18**, 1985.

BRAUN, B.; KLEIN, E. **Immobilization of Candida rugosa Lipase to Nylon Fibers Using its Carbohydrate Groups as Chemical Link**, **Biotechnol. Bioeng.** V. 51; .327-341; 1996.

CAMPBELL, M. K., **Biochemistry**; 2 th: USA; Sauders Publishing College: 1995.

CASTRO, H.F. **Fine chemicals by biotransformation using lipase**. [S.I.] Química Nova, v.18, n.6, pp. 544-554. 1995.

COCKS, L. V.; Van Rede, C. **Laboratory Handbook for Oil and Fat Analysts**. Academic Press: London, 1966.

COSTA NETO, P. R. **Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja**. 2002. Tese (Doutorado) - Departamento de Química; Centro de Ciências Físicas e Matemáticas – Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2002.

COSTA NETO, Pedro R. et al. Produção de biocombustíveis alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. **Química. Nova**, jul/ago 2000, vol 23, nº 4, p. 531-537.

COSTA NETO, P. R. **Estudos preliminares sobre alterações e purificação do óleo de soja usado em frituras múltiplas**. 1993. 114p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CRUZ JR., A. et al . Alcoólise do óleo de girassol com lípase de *Candida antártica B* para produção de biodiesel. IN: **Anais do II Congresso da Rede Brasileira de Produção de Biodiesel**, Novembro, 2007.

DANTAS, H. J. **Estudo Termoanalítico, Cinético e Reológico de Biodiesel Derivado do Óleo de Algodão (*Gossypium hisutum*)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

DUEÑAS, M. et al. Exopolysaccharide Production by *Pediococcus Damnosus* in a Semidefined Medium Under Different Growth Conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 1-2, p. 113-120, 2003.

EMMERICH, FRANCISCO GUILHERME. **Modelo granular, percolação resistividade, RSE e módulo de elasticidade da materiais carbonosos: aplicação ao endocarpo de babaçu tratado termicamente até 2200 °C**. Campinas: Instituto de Física "Gleb Wataghin", tese de Doutorado apresentada em 08 de Julho de 1987.

FANGRUI, M. and HANNA, M. A. Biodiesel Production: a review, **Bioresorce Technology**. 70: 1-15: 1999.

FERNANDO, S. & HANNA, M. Trans ASAE, 2001, 44(6), 1403-1407. FERRATO, F.; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R **A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. Methods Enzimol**, 284, part B, 327-347, 1997.

FERREIRA DA SILVA, P. L. **Utilização de α -amilase e amiloglicosidase Imobilizada em Carvão Ativo de Casca de Coco na Hidrólise de Amido**. 2001. 70p. Dissertação (Mestrado em Química) Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FREEDMAN, B.; MOUNTS, T. L.; PRYDE, E. H. **Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils**, J. Am. Oil Chem. 61, 1638-1643. 1984.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. **Transesterification Kinetics of Soybean Oil**. J. Am. Oil Chem. Soc. 63; 1375; 1986.

GALETAKIS, M.; RAKA, S. **Utilization of Limestone Dust for Artificial Stone Production: an Experimental Approach**. Minerals Engineering, v. 17, n. 2, p. 355-357, 2004.

GARCIA, R.; BESSON, M.; GALLEZOT, P. **Chemoselective catalytic oxidation of glycerol with air on platinum metals**. Appl. Catal. A: Gen., 127, 1995, 165-176.

GERPEN, John Van. **Biodiesel Production and Fuel Quality**. Disponível em: www.uidaho.edu/bioenergy/BIODIESELEd/Publication/01.pdf. Acesso em: 27 junho 2006.

Gil, M. P. A. **Novos Métodos de Caracterização e ativação de Géis de Agarose como suportes para a imobilização de proteínas de interesse industrial**. 1997 Tese (Doutorado) - Universidade Complutense de Madrid.

GOH, E. M. & TIMMS, R. E., **Determination of monoglycerides and diglycerides in palm oil, olein and stearin**. JAOCS, 62(4), 1985, p. 730-734.

GUISÁN, J.M. et al. **Imobilization of Enzymes Acting on Macromolecular Substrates". En: Immobilization of Enzymes and Cells**, 1, 261-275. Editor: Gordon.F.. Editorial: Bickerstaff. Humana Press Inc, 1997.

HARDY, A. et al. A Statistical Approach to the Identification of Determinant Factors in the Preparation of Phase Pure (Bi,Lu)₄Ti₃O₁₂ from an Aqueous Citrate Gel. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 24, n. 9, p. 2575-2581, 2004.

HARRIS, Daniel C. Análise Química Quantitativa. **LTC. Livros Técnicos e Científicos**. [S.I.] Editora S. A. 6ª ed. 2005.

HERNANDEZ, E.M.; OTERO, C. Different Enzyme Requirements for the Synthesis of Biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 277-286. 2008.

HOJO, O. **Estudo sobre a Produção de Penicilina G Acilase por Bacillus megaterium ATCC 14945**. 1997. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, [São Paulo], 229p.

IBGE. **Produção Extrativa Vegetal 2003**. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 12 mar 2005.

ILLANES, A. Biotecnologia de enzimas. **Ediciones Universitárias de Valparaiso de la Universidade Católica de Valparaiso**, Chile, 1994.

INTERNATION UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 7a ed. Boston, method 2507, IUPAC, 1987.

ISO, M et al . “Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase”. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 16, pp. 53-58, 2001.

IUPAC - **Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivates**, 6a ed., Pergamon Press: Oxford, 1979.

IZIQUE, C. **Tanque quase cheio**. Disponível em: <http://www.cni.org.br/produtos/diversos/src/revista66/biodiesel.pdf> Acesso em: agosto de 2006. Acesso em: 17 novembro 2006.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 13, 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; HERTZ, M. T. Bacterial biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol**, 53, 315-351, 1999.

JAEGER, K. et al. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Rev**, 15, 29-63, 1994.

JOURNEY to FOREVER. Disponível em: <http://www.journeytoforever.org/biodiesel>. Acesso em: 21 de dezembro de 2006.

KAIEDA, M. et al. “Effect of Methanol and Water Contents on Production of Biodiesel Fuel From Plant Oil Catalyzed by Various Lípases in a solvent-free system”. **Journal of Biociencia and Bioengineering**, V. 91, n.1, p.12-15. 2001.

KOCHANA, et al. Synthesis of Standards of the most Important Markers of Leuckart p-methoxymethamphetamine (PMMA): Examination of the Influence of Experimental Conditions and a Drug Diluent on SPE/TLC profiling. **Forensic Science International**, v. 134, n. 2-3, p. 207-213, 2003.

KOSKINEN, A.M.P. and KLISBANOL, A, M. **Enzymatic Reactions in Orgânica Media**. Blackie Academic & Professional, 314p.; 1996.

KRAMER, G. F. H. **Convenient Activity Assay for Immobilized Lipases**. J. Mol. Catal. B:Enzymatic; 3; 121 – 125; 1997.

KHURI, A.I.; CORNELL, J.A. **Response Surface- designs and analyses**. New York: Marcel Dekker, 1987.

LIMA, A. W. O. e ANGNES, L. Biocatálise em Meios Aquo-Restritos: Fundamentos e Aplicações em Química Analítica. **Química Nova**; vol. 22; no. 2; 229 – 245; 1999.

LIU, D; DU, W.; LI, W. **Improved Methanol Tolerance During Novozym435-Mediated Methanolysis of SODD for Biodiesel Production**. *Green Chemistry*, 2006.

LOUGHLIN, W. A. Biotransformations in Organic Synthesis. **Bioresource Technology**. 74; 49 – 62; 2000.

LYE, G. J.; PAVLOU, O. P.; ROSJIDI, M. et. al. Immobilization of Candida Cylindracea Lipase on Colloidal Liquid Aphrons (CLAs) and Development of a Continuous CLA-Membrane Reactor. **Biotechnol. and Bioeng.** V.51; 69 78; 1996.

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. “Produção de Biodiesel por transesterificação de óleos vegetais” em Biotecnologia – **Ciência e Desenvolvimento** nº 32 , jan/jun 2004.

MACRE, A. R e HAMMOND, R.C. “Present and Future Applications of Lípases”. **Biotechnology and Genetic Reviews**, V.3, Intercept LTD. 1985.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S. et. al. Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils – **A Review, J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 67, no.12, 890-910; 1990.

MALACATA, F.X.; REYES, H.R.; GARCÍA, H.S.; HIIL, C.G. JR. Y AMUNDSON, C.H. (1992). Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 14, 426-446.

Mc CORNMICK, R. L. et al. Environ. S.: **Trans. ASAE**, 2001, 35, 1742-1747.

Mc MURRY. J. **Química Orgânica**. v.2; 4ª edição (traduzida); LTC EDITORA S.A; 660 p.;1997.

MINGARRO, Y.; ABAD, C. e BRACO, L.). Interfacial activation based molecular bioimprintimp of lipolytic enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 92, 3308-3312, 1995.

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA E COMÉRCIO (MIC). Mapeamento e levantamento de potencial das ocorrências de babaçuais. MIC/SIT. Brasília, 1982. Apud: Almeida, A. W. B. Quebradeiras de Coco Babaçu: Identidade e Mobilização. **II Encontro Interestadual das Quebradeiras de Coco Babaçu**. São Luís, 1995.

MILMAN, B. L. Identification of chemical compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 24, Issue 6, p. 493-508, 2005.

MITTELBACH, M. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemist Society**, v. 67, pp. 3, 1990.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. John Willey & Sons, New York, 1991, 326p.

MONTES, P.; BREMNER, T.W.; LISTER, D.H. Influence of Calcium Nitrite Inhibitor and Crack Width on Corrosion of Steel in High Performance Concrete Subjected to a Simulated Marine Environment. **Cement and Concrete Composites**, v. 26, n. 3, p. 243-253, 2004.

MORETTO E FETT,R. **Óleos e Gorduras Vegetais: Processamento e Análises**. 2ª. ed. Editora da UFSC, Florianópolis; 179 p. 1989.

NAVRÁTIL, M. & STURDÍK, E. **Bioactive Components in Productions Using Immobilized Biosystems**. Biologia, Bratislava; 54; 635 – 648; 1999.

NBB. **Site oficial da National Biodiesel Board**. 1998. Disponível em: <<http://www.biodiesel.org>> .Acesso em 22 dez. 2007.

NELSON, D. L. AND COX. M. M. LEHNINGER. **Principles of Biochemistry**. 3rd. edition; Worth Publishers; p. 1151, 2000.

NOVO NORDISK. Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions. **Relatório interno da Novo Nordisk**, A-05948, 1992.

OLIVEIRA, D. **Estudo Comparativo da Produção Enzimática de Ésteres a partir de Óleos Vegetais em Solvente Orgânico e CO₂ supercrítico**. Tese de (doutorado) Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE, RJ, Brasil, 1999.

OLIVEIRA, D; ALVES, T. L. M. Enzymatic alcoholysis of palm and kernel oils. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, pp. 835-844, 1999.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29, 119-131, part 2, 1999.

PARENTE, E.J. de S.; SANTOS JUNIOR, J.N.; PEREIRA, J.A.B.; PARENTE JUNIOR, E.J.de S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza: Tecbio, 2003.68p.

PAVIA, D. L.; LAMPSON, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy – A Guide for Students of Organic Chemistry**. 2ªed., Saunders College Publishing: USA, 1996.

PENSA/ USP. **Reorganização do Agro negócio do babaçu no Estado do Maranhão**. USP, 2000.

PLANCK, C. & LORBEER, E. **Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography**. *J. Chromotogr. A.*, 697, 1995, 461-468.

PROGRAMA NACIONAL DE PRODUÇÃO E USO DO BIODIESEL. PNPB. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/programa.html>>. Acesso em: 15 jan 2006.

QUEIROZ, N. **Aplicações Sintéticas de Enzimas Imobilizadas em Organo-gel e Gel de Agar**. 1997. 75p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ROSENAAL, A. (1992). **Interesterification of oils and Fats**. Inform. V.3,n.2,p. 1232-1237.

ROSU, R.; UOZAKI, Y.; IWASAKI, Y. et. al. Repeated Use of Immobilized Lipase for Monoacylglycerol Production by Solid-Phase Glycerolysis of Olive Oil, **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 74; n. 4; 445-450; 1997.

RUIZ, W. A; TORALLES, R. P. Hidrólise Enzimática dos Óleos Vegetais. **Óleos & Grãos**; 61; 26-32; 2001.

SAMUKAWA, T. et al Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel. Production from plant oil. **Biochemical Engineering Journal**, v.90, n.2, p. 180-183. (2000).

SARDA, L.; DESNUELLE, P. (1958). Actino de la lipase pancreática sur les ésteres en emulsion. **Biochemistry Biophysical Acta**, v. 30, p. 513-521.

SCHUCHARDT, U.; SERCHEL, R.; VARGAS, R. M. (1998) Transesterification of vegetable oils: A review: **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 9, n.3, p. 199-210.

SHARP, W.G.; HARGROVE, D.S. Emotional Expression and Modality: an Analysis of Affective Arousal and Linguistic Output in a Computer vs.Paper Paradigm. **Computers in Human Behavior**, v. 20, n. 4, p. 461-475, 2004.

SHIMADA, Y. WATANABE, Y. SAMUKAWA, T. et al. Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilizad *Candida antarctica* Lipase. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 76; n. 7; 789-793; 1999.

SIGMA, Co, S. A. Biochemiscals and reagentes for life science research. **Catálogo da Sigma**. 1998. 680.

SILVERSTAIN, R. M. & WEBSTER, F. X.. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 6ª ed. LTC, Rio de Janeiro, 2000.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ªed.: Editora Bookman-SBQ, 2002.

SRIVASTAVA. A. e PRASAD. R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 4, 111-133, 2000.

TANTRAKULSIRI, J.; JEIASHOPE, N. and KRISANANGKURA, K. Utilization of Rice Hull Ash as a Support Material for Immobilization of *Candida Cylindracea* Lipase. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 74, n. 2; 173-175; 1997.

TECPAR: O Biodiesel - Publicação da Divisão de Biocombustíveis—DBIO e do Centro Brasileiro de Referência em Biocombustíveis – Cerbio. Disponível em: <http://www.tecpar.br/cerbio/biodiesel/Ed_012.pdf>. Acesso em: 02 mar 2006.

TEIXEIRA, M. A. “Estimativa do Potencial Energético na Indústria do Óleo de Babaçu no Brasil”. Campinas: Departamento de Energia – FEM; UNICAMP, 2001.

TUNER N. A. and VULFSON, E. N. At What Temperature can Enzymes Maintain their Catalytic Activity? **Enzyme and Microb. Technol.** 27; 108-113; 2000.

TURATTI, R. A. Componentes Minoritários de Óleos Vegetais. *Óleos & Grãos*; Ano 9, N 54; mar/abr; 24-28;2000.

URIOSTE.D. **Produção de Biodiesel por Catálise Enzimática do óleo de Babaçu com Alcoóis de Cadeia Curta. Dissertação de Mestrado.** 2004. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Departamento de Engenharia Química. Lorena, dezembro de 2004.

VARGAS, R.M.; SERCHELI,R.;SCHUCHARDT,V,J.Braz.Chem.Soc.1998,9

VAN DER PADT, A. **Enzymatic acylglycerol sintesis in membrane reactor.** Ph. D. dissertation. Landbouw Universiteit the Wageningen, Holanda, 1998,9(3), 199-210.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trans Biotechnol**, 15, 32-38, 1997.

VILLENEUVE, P. MUDERHWA, J. M. GRAILLE, J. et. al. Customizing Lipases or Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approaches. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic.** 9:4-6:113 – 148; 2000.

VILLANUEVA, L. Z. D. **Uso de Gás Natural em veículos leves e mecanismo de desenvolvimento limpo no contexto brasileiro.** 2002. Tese (Doutorado em Energia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

VOET, D.; VOET, J. Biochemistry; New York; **Saunders Publising College**; 1995

ZIMMERMANN, A. **Aplicação de resolução enzimática na síntese estereosseletiva de feromônios de agregação de insetos-praga de palmáceas.** 2005. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

YI-ZENG, L.; KAI-TAI, F.; QING-SONG, X. Uniform Design and its Applications in Chemistry and Chemical Engineering. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 1, p. 43-57, 2001.

YANG, Z. e RUSSEL, A. J. “Fundamentals of non-aqueous enzymology” . In: Koskinen, A. M. D. e Kibanov, A. M. (eds), **Enzymatic Reactions in Organic Media**, 1ª ed., London, Blackie Academic & Professional, 1996

WANG, W. G.; LYONS, D. W.; CLARCK, N. N.; GAUTAM, M. *Eviron. Sci. Technol.* 2000, 34, 933-939.

WATANABE, Y. SHIMADA, Y. SUGIHARA, A. et. al. Continuous Production of Biodiesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. **J. Am. Oil Chem. Soc.** V. 77; n. 4; 355-360; 2000.